

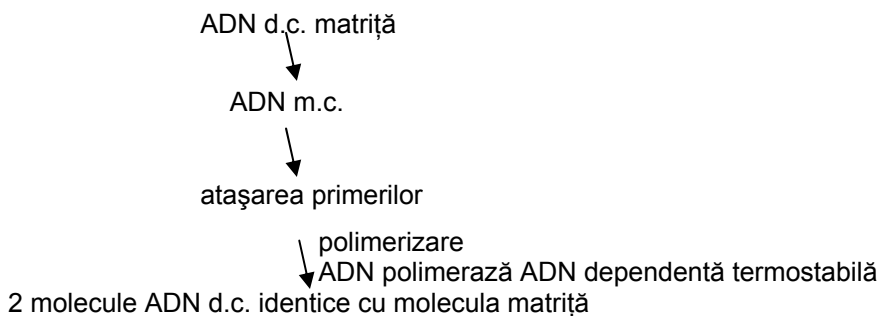
3.3. TEHNOLOGIA PCR

Definire. Generalități.

Reacția PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction = Reacție de Polimerizare în Lanț) este o metodă de amplificare enzimatică *in vitro* a unei anumite secvențe de ADN. În prezent a fost dezvoltată o adevărată tehnologie PCR care este folosită într-o varietate foarte mare de domenii: biologie moleculară, științele mediului, criminalistică, științe medicale, biotehnologie, microbiologie, industria alimentară, epidemiologie etc.

Din punct de vedere chimic, reacția PCR este constituită din cicluri succesive de replicare ADN *in vitro*, folosind 2 primeri oligonucleotidici ce hibridizează cu cele 2 catene ale secvenței originale (folosită ca matriță în replicare). Diferența esențială între o asemenea reacție de replicare și un proces de replicare ADN *in vivo*, îl reprezintă faptul că în reacția PCR etapa de desfacere a dublului helix matriță și, respectiv, cea de atașare a primerilor, nu sunt realizate enzimatic, ci prin parcurgerea unor trepte de temperatură, iar singura enzimă folosită în reacție este o ADN polimerază ADN-dependență (cu funcție de replicază).

Principalele 3 etape ale unei reacții PCR pot fi sintetizate astfel :



Principalele componente ale reacției sunt : ADN matriță, o ADN polimerază termostabilă, primeri oligonucleotidici, deoxinucleotidtrifosfați (dNTP), tamponul de reacție, ioni de Mg^{++} . O reacție PCR este formată din n cicluri (între 25 și 40), în fiecare ciclu fiind parcurse 3 etape principale: denaturarea termică a matriței (deci, desfacerea dublului helix ADN), atașarea primerilor și polimerizarea propriu-zisă. La terminarea unui ciclu de replicare *in vitro* (de amplificare), cantitatea de ADN rezultată este dublă față de matriță. Mai mult, produsele rezultate într-un ciclu sunt folosite ca matriță în ciclul următor, astfel încât numărul final de copii ADN este de $2^n \times y$, unde y = numărul inițial de copii, iar n = numărul de cicluri de replicare. Este de subliniat faptul că moleculele acumulate exponențial reprezintă copii ale matriței care la capete au incorporați primerii.

În concluzie, reacția PCR este o metodă prin care se obțin cantități mari dintr-o anumită secvență ADN. Aceste molecule pot fi ulterior manipulate/analizate fără a fi necesară o prealabilă clonare moleculară a acestora.

Prima raportare în literatura de specialitate a unui experiment de amplificare *in vitro* a unei secvențe ADN prin PCR a fost realizată de Kary Mullis în 1985. Ulterior, metoda a fost aplicată de către un grup de cercetători de la Departamentul de Genetică Umană de la *Cetus Corporation* (SUA) pentru amplificarea secvenței de ADN ce codifică α -globina umană și pentru diagnosticul prenatal al anemiei falciforme.

Inițial, reacția PCR folosea ca replicază fragmentul mare (*Klenow*) al ADN polimerazei I de la *Escherichia coli*. Această enzimă era însă inactivată de temperaturile ridicate necesare etapei de denaturare a matriței. Ca urmare, la fiecare ciclu de replicare trebuia adăugată enzimă "proaspătă".

Ulterior, a fost descoperită și introdusă în reacția PCR o ADN polimerază termostabilă izolată inițial dintr-o tulpină de *Thermus aquaticus* (bacterie termofilă izolată din izvoarele termale Yellow Spring din SUA).

Un alt pas important în dezvoltarea tehnologiei PCR a fost procesul de automatizare care a condus la producerea în prezent a unor aparate ce desfașoară "singure" întreg procesul de PCR, parcurgând toate treptele de temperatură în n cicluri.

Componentele reacției

a) Matrița ADN. De cele mai multe ori, într-o reacție PCR se introduc molecule de ADN d.c. linear/circular ce include secvența de amplificat.

Puritatea ADN introdus ca matriță reprezintă un parametru important pentru succesul unei reacții PCR. De exemplu, cantități mari de ARN dintr-un extract ADN pot chelata ionii de Mg^{++} , determinând astfel o activitate scăzută a ADN polimerazei. Pe de altă parte, o serie de contaminanți din extractul ADN pot inhiba acțiunea ADN polimerazei.

Cantitatea de matriță ADN introdusă într-o reacție PCR influențează puternic performanța reacției. Cantitățile recomandate pentru o reacție PCR standard sunt: maximum 500 ng pentru ADN genomic uman, 1-10 ng ADN bacterian, 0.1-1 ng ADN plasmidial. Cantitatea ADN trebuie însă corelată cu numărul de copii de secvență matriță, aceasta depinzând de complexitatea moleculelor de ADN. Astfel, pentru un plasmid de 4 kbp din care trebuie amplificată o secvență de 1 kbp, secvența matriță reprezintă 25% din ADN introdus în reacție. În timp ce, o secvență tot de 1 kbp, dar dintr-un ADN genomic uman (specia umană având un genom de aproximativ 3.3×10^9 bp), reprezintă doar 0.00003% din ADN introdus în reacție. Ca urmare, pentru a avea același număr de secvențe matriță, trebuie introdusă o cantitate de aproximativ 1 milion de ori mai mare în cazul ADN genomic uman. Ca recomandare generală, se pornește cu un minimum de 10^4 copii de secvență matriță pentru a obține un semnal într-o reacție PCR de 25-30 cicluri, având însă grijă ca, concentrația finală de ADN în amestecul de reacție să fie mai mică sau egală cu 10 ng/ μ l.

Conversia acizilor nucleici din microgram în număr de molecule

Cantitate	Acid nucleic	Număr de molecule
1 μ g	1 kbp ARN	1.80×10^{12}
1 μ g	1 kbp ADN d.c.	9.18×10^{11}
1 μ g	Vectorul pGEM 3/4 Z	2.85×10^{11}
1 μ g	ADN de fag λ	1.90×10^{10}
1 μ g	ADN genomic – <i>E. coli</i>	2.00×10^8
1 μ g	ADN genomic uman	3.04×10^5

b) primerii oligonucleotidici. În general, dimensiunea primerilor folosiți în reacțiile PCR este cuprinsă între 15 și 30 bp și, de obicei, sunt complementari cu capetele 5' și, respectiv, 3' ale regiunii ce urmează a fi amplificată. Se recomandă ca primerii să aibă un procent molar de guanină + citozină (% mol GC) cuprins între 40 – 60% și să aibă o distribuție echilibrată a domeniilor bogate în A/T și G/C. Este recomandabil ca cei 2 primeri să aibă valori T_m care să permită temperaturi de atașare între 55 și 65°C (pentru specificitate maximă se folosesc temperaturi de 62-65°C). Pe de altă parte, este ideal ca cei 2 primeri să aibă valori T_m identice sau foarte apropiate și să nu prezinte secvențe cu complementaritate intracatenară (și care, deci, să determine structuri secundare interne). Totodată, pentru a se evita dimerizarea primerilor, este necesar ca primerii să nu fie complementari unul cu celalalt. În general, concentrațiile optime ale primerilor într-o reacție PCR sunt cuprinse între 0.1 și 0.6 μ M.

Intr-o reacție PCR, un parametru important îl reprezintă temperatura de atașare a primerilor la matrița ADN (*“primer annealing temperature”*). Astfel, în cazul primerilor cu valori ridicate de T_m poate fi crescută temperatura de atașare a primerilor. Acest lucru conduce la minimizarea atașărilor nespecifice, la reducerea cantității de dimeri de primeri, precum și la creșterea cantității de produs PCR corect.

Pentru a determina valorile T_m ale acizilor nucleici există numeroase formule. Pentru determinarea acurată a valorilor T_m ale primerilor, se recomandă efectuarea reacției PCR la diverse temperaturi de atașare, pornind de la o temperatură cu 5°C mai mică decât valoarea T_m calculată. Formula de mai jos poate fi folosită pentru a estima temperatura de topire pentru orice oligonucleotid:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \times (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 \times (\%G+C) - 675/n$$

Unde $[\text{Na}^+]$ reprezintă concentrația salină molară ($[\text{K}^+] = [\text{Na}^+]$)
și n = numărul de baze din oligonucleotid

De exemplu, pentru calcularea T_m a unui oligonucleotid 22mer (format din 22 de nucleotide) cu 60% G + C în 50 mM KCl:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \times (\log_{10}[0.05]) + 0.41 \times (60) - 675/22 = 53.84^\circ\text{C}$$

c) ADN polimeraza termostabilă

În prezent în toate reacțiile de tip PCR se introduc ADN polimeraze termostabile. Variantele naturale ale unor asemenea enzime au fost izolate din microorganisme termofile, care posedă echipamente enzimatice cu temperaturi optime ridicate (mai mari de 70°C) și care sunt capabile să desfășoare activitățile specifice și după treceri peste temperaturi extreme (în jur de 100°C). În marea majoritate a cazurilor, pornind de la asemenea variante naturale, ADN polimeraze termostabile au fost manipulate genetic (cu obținerea unor variante ameliorate) și clonate în tulpini de *E. coli* (microorganism ce este mult mai ușor de crescut și manipulat decât bacteriile termofile).

În majoritatea experimentelor, cantitatea optimă de ADN polimerază termostabilă (sau de amestec de ADN polimeraze) este cuprinsă între 0.5 și 0.25 U / 50 μ l volum de reacție.

Tipuri de ADN polimeraze ADN dependente termostabile

a) ADN polimeraze ADN dependente termostabile din clasa Taq

- 1) ADN polimeraza Taq

Dezvoltarea foarte mare a tehnologiei PCR, precum și a aplicațiilor sale se datorează în bună măsură, înlocuirii în asemenea tehnici, a fragmentului *Klenow-ADN pol I* izolat din *E.coli* cu o ADN polimerază termostabilă izolată din *Thermus aquaticus* și denumită *Taq pol*.

Prima specie moleculară de *Taq pol* izolată (în anii 1976-1980) avea o greutate moleculară de aproximativ 70 kDa și o activitate specifică de 2000 unități/mg.

Ulterior (în 1989), a fost izolată o altă specie moleculară de *Taq pol*, cu o greutate moleculară de 94 kDa și cu o activitate specifică de 20.000 unități/mg. Această enzimă are temperatura optimă de 75-78°C, iar la temperaturi de peste 90°C activitatea sa scade semnificativ. La temperatura optimă, o moleculă din această enzimă polimerizează aproximativ 150 nucleotide/sec. În afară de activitatea de polimerizare (în direcția 5'-3'), această specie moleculară de ADN polimerază, mai are și activitate exonucleazică în aceeași direcție cu cea de polimerizare (5'-3'). Nu are însă activitate exonucleazică în direcție inversă polimerizării (3'-5' - activitate enzimatică ce asigură funcția de citire și incorporare corectă a nucleotidtrifosfaților - *proofreading*), astfel încât fidelitatea încorporării depinde strict de concentrația dNTP în amestecul de reacție.

Analizele moleculare au demonstrat ca *Taq pol* prezintă similaritate de secvență a aminoacizilor cu ADN polimeraza I din *E.coli*, mai ales în treimea dinspre capătul amino-terminal, domeniu care la *E.coli* - *ADN pol I* este responsabil de activitatea exonucleazică 5'-3'.

Taq pol permite realizarea de reacții PCR în 3 trepte de temperatură (Fig.3.31), în care denaturarea moleculelor de ADN d.c. se realizează la 90-95°C, atașarea primerilor la 55-60°C, iar polimerizarea la 72-75°C.

2) ADN polimeraza *Ampli-Taq*. Această enzimă este o ADN polimerază recombinantă obținută prin exprimarea unei forme modificate a genei pentru *Taq pol* în *E.coli*. Activitatea optimă a acestei enzime se desfășoară în range-ul de temperatura la care are loc și atașarea stringentă a primerilor (55-75°C, cu maximumul la 60°C). Ca urmare, folosirea acestei enzime simplifică reacția PCR de la 3 trepte de temperatură la 2 trepte (Fig. 3.32): 95°C - temperatura la care se realizează denaturarea ADN d.c., 60°C - atașarea primerilor și polimerizarea. Pe de altă parte, *Ampli-Taq pol* are o stabilitate mult mai mare la temperaturi de peste 90°C, față de *Taq pol*, a cărei activitate enzimatică scade semnificativ cu fiecare trecere peste 90°C. În plus, *Ampli-Taq pol* are și activitate exonucleazică în direcție 3'-5', ceea ce determină ca această enzimă să prezinte o mult mai mare specificitate de citire și de incorporare.

3) ADN polimeraza *Ampli-Taq* - fragmentul *Stoffel* este reprezentat de *Ampli-Taq* din care a fost scos un fragment de 290 aminoacizi de la capul N-terminal. Fragmentul excizat este responsabil de activitatea exonucleazică în direcție 5' → 3', și deci, *Stoffel-Ampli-Taq* nu prezintă acest tip de activitate, ceea ce, pe de o parte, crește mult viteza de polimerizare, iar pe de altă parte permite o amplificare mai eficientă a matricei circulare (de ex. ADN plasmidial). Este de 2 ori mai termostabilă decât *Ampli-Taq* și își păstrează activitatea optimă într-un range mult mai larg de concentrații de Mg⁺⁺.

b) ADN polimeraze ADN dependente termostabile din clasa VENT

1) ADN polimeraza *VENT pol* este o ADN polimerază ADN dependentă termostabilă izolată din *Thermococcus litoralis*. Această bacterie trăiește în izvoare marine calde, cunoscute în literatura de specialitate sub denumirea de "vent-uri". *VENT pol* desfășoară ambele tipuri de activități exonucleazice (în direcție 3'-5' și, respectiv, în direcție 5'-3').

2) ADN polimeraza *VENT pol (exo-)* este similară cu *VENT pol*, dar nu are activitate exonucleazică 5' → 3'.

c) ADN polimeraze ADN dependente termostabile din clasa DEEP VENT

1) ADN polimeraza *DEEP VENT pol* este o enzimă izolată dintr-o tulpină de *Pyrococcus* (microorganism ce trăiește în izvoare marine calde de mare adâncime). Această enzimă desfășoară ambele tipuri de activități exonucleazice, dar este mai rezistentă decât *VENT pol*, și decât *Ampli-Taq pol* la temperaturi de 100°C - temperaturi necesare denaturării matricei (în mod special la matricele circulare, lungi sau cu % mol GC ridicat).

2) *DEEP VENT (exo-) pol* este similară cu *DEEP VENT pol*, dar nu are activitate exonucleazică 5' → 3'.

d) ADN polimeraze ambivalente termostabile

1) ADN polimeraza *rTth pol* este o ADN polimerază recombinantă obținută prin exprimarea unei forme modificate a genei din *Thermus thermophilus*, în *E.coli*.

Caracterul ambivalent al acestei enzime constă în faptul că poate fi folosită ca ADN polimerază ARN dependentă (revers-transcriptază), în prezența MnCl₂, după care, prin chelatarea ionilor de Mn și adăugare de MgCl₂, poate acționa ca ADN polimerază ADN dependentă, desfășurând o reacție PCR.

În afară de asemenea enzime tipic ambivalente, este de menționat faptul că și alte ADN polimeraze (*Taq*, *Ampli-Taq*, *Stoffel*) prezintă și activitate revers-transcriptazică, dar foarte slabă.

În ceea ce privește concentrația de enzima polimerizatoare, aceasta depinde de tipul de enzimă folosită. Pentru ADN polimeraza *Taq pol* sunt suficiente 1.25 U într-un volum de reacție de 50 μl (pentru multe aplicații va fi chiar într-un oarecare exces). Cantități crescute de enzimă sau timp

prelungiți de polimerizare nu vor crește semnificativ produsul de reacție, ci vor genera artefacte datorate activității exonucleazice 5' → 3' a ADN polimerazei *Taq pol* (în gelul de verificare vor apărea ca niște benzi "mânjite").

Un alt parametru important al reacției PCR este temperatura la care are loc reacția de polimerizare ("extension temperature"). Această temperatură este determinată de tipul de ADN polimerază folosită, în general recomandându-se menținerea timpului de 1 minut pentru fiecare kbp de amplificat.

Ca număr de cicluri, pentru marea majoritate a reacțiilor PCR sunt suficiente 25-40 de cicluri.

Un alt aspect important în manipulările genetice ulterioare ale unui produs de reacție PCR îl reprezintă tipul de capete pe care îl generează ADN polimeraza respectivă. Astfel, ADN polimeraza *Taq pol* generează capete coezive cu prelungiri 3'-A. În timp ce majoritatea enzimelor ce prezintă activitate exonucleazică 3' → 5' generează capete netede.

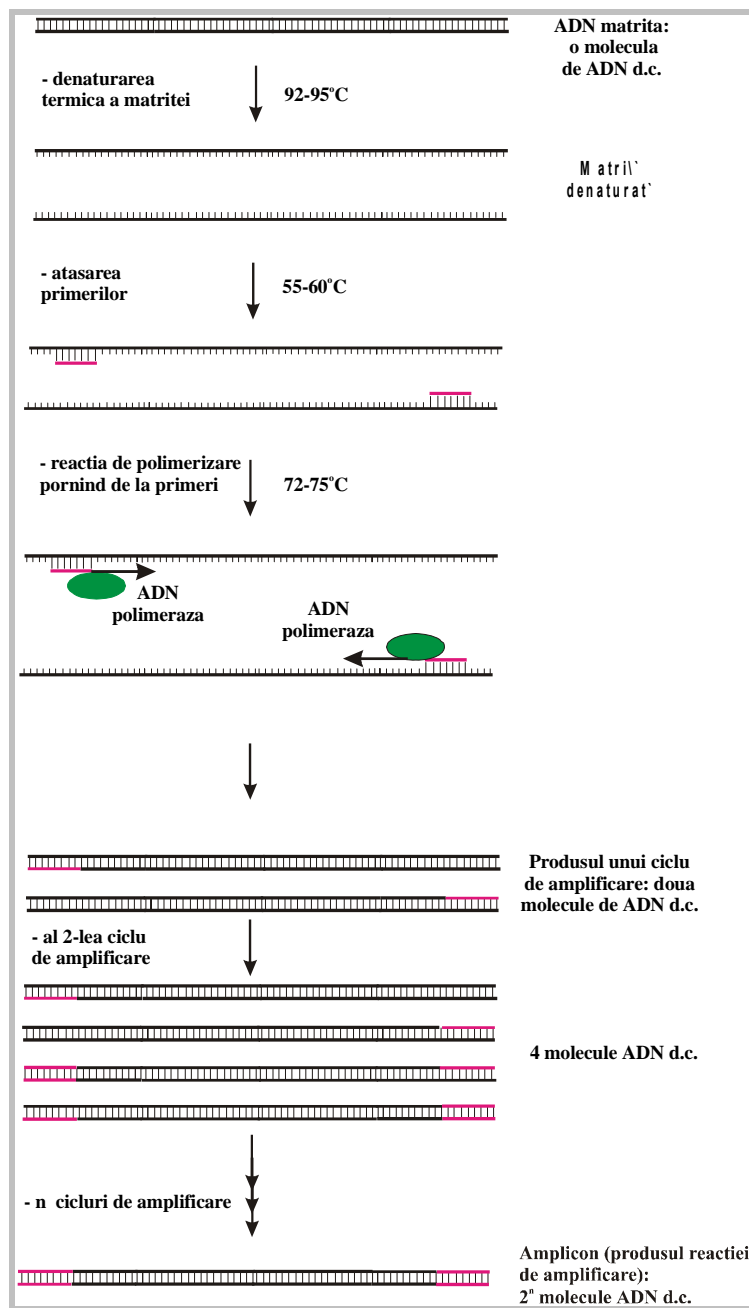


Fig.3.31. Reacția PCR în 3 trepte de temperatura

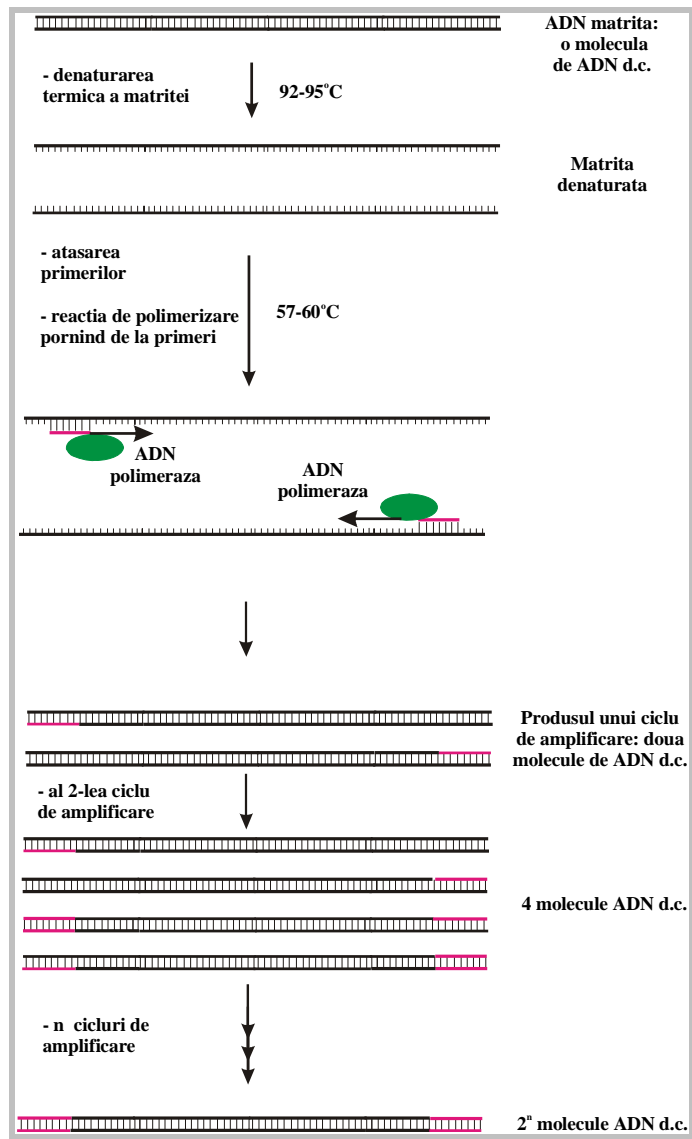


Fig.3.32. Reacția PCR în 2 trepte de temperatură

Tipul de ADN polimerază	Microorganism de origine	T°C optimă	Stabilitate la 95-100°C	Activitate exonucleazică 3'→5'	Activitate exonucleazică 5'→3'	Nr.trepte de temperatură
Klenow-ADN pol I	<i>E.coli</i>	37	-	+	-	-
Taq pol	<i>Thermus aquaticus</i>	75-80		-	+	3
Ampli-Taq ADN pol	"	55-75	+	+	+	2
Stoffel-Ampli-Taq pol	"	55-60	+	+	-	2
Vent pol	<i>Thermococcus litoralis</i>	55-60	+	+	+	2
Vent pol (exo)	"	55-60	+	+	-	2
Deep Vent pol	"	55-60	+	+	+	2
Deep Vent pol (exo-)	"	55-60	+	+	-	2
Pfu pol	<i>Pyrococcus furiosus</i>	55-60	+	+	-	2
RTth pol					-	2

d) dNTP (deoxinucleotidtrifosfați = dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Deoxinucleotidtrifosfații introduși în reacție sunt folosiți de către ADN polimerază în reacția de polimerizare. În amestecul de reacție se introduc cantități echimolare din cele 4 tipuri de molecule; în caz contrar scade fidelitatea ADN polimerazei. Concentrația optimă a dNTP variază între 50 și 500 μM (pentru fiecare dNTP), valoarea cea mai uzuală fiind 200 μM. Această concentrație trebuie corelată cu concentrația Mg⁺⁺. În cazul în care se dorește obținerea unor produși de reacție PCR marcați (radiativ sau neradioactiv), se introduc dNTP marcate.

e) tamponul de reacție (contine Tris-hidroxi-aminometan - ca substanță amfoter - , și $MgCl_2$, necesar funcționării optime a ADN polimerazei termostabile). Există și variante în care tamponul de reacție nu conține Mg^{++} , iar acesta este livrat separat, permițând optimizarea concentrației ionilor de Mg^{++} .

Ionii Mg^{++} formează complexe solubile cu moleculele dNTP pentru a produce substratul propriu-zis recunoscut de ADN polimerază. Concentrația ionilor de Mg^{++} este un factor crucial ce afectează performanța oricărei ADN polimeraze. Astfel, o serie de componente ale reacției de PCR (matrița ADN, agenți chelatori prezenți în proba de ADN – cum sunt de exemplu EDTA sau citrații - sau diverse tipuri de proteine) pot scădea cantitatea ionilor liberi de Mg^{++} , ceea ce conduce la o activitate slabă sau chiar inactivitate a Taq polimerazei. Pe de altă parte, excesul ionilor de Mg^{++} reduce fidelitatea enzimei și poate conduce la creșterea amplificărilor nespecifice. Concentrația optimă de $MgCl_2$ variază între 1 și 5 mM, valoarea cea mai frecvent folosită fiind 1.5 mM (cu dNTP la concentrația de 200 μ M fiecare). Mg^{++} influențează activitatea enzimei și crește valoarea T_m a ADN d.c. Excesul ionilor de Mg^{++} într-o reacție PCR poate crește atașările nespecifice ale primerilor.

Din aceste motive este necesar a determina concentrația optimă de $MgCl_2$ pentru fiecare reacție PCR. Acest lucru poate fi realizat prin prepararea unei serii de reacții ce conțin diverse concentrații de Mg^{++} , între 1.5 și 3.0 mM Mg^{++} (cu incremente de 0.5 mM), prin adăugarea a 3, 4, 5 și, respectiv, 6 μ l dintr-o soluție stoc de 25 mM $MgCl_2$ la amestecuri de reacție de 50 μ l. Este important de reținut că în acest caz trebuie folosit un tampon de reacție ce nu conține $MgCl_2$.

Nota: Înainte de folosire, soluțiile ce conțin Mg^{++} trebuie dezghețate complet și vortexate câteva secunde pentru că atunci când sunt înghețate soluțiile de $MgCl_2$ tind să formeze gradienti de concentrație.

Dupa amestecarea tuturor componentelor unei reacții PCR se adaugă un strat de ulei mineral pentru a preveni evaporarea în timpul reacției. Dacă termocycler-ul este prevăzut cu un capac cu încălzitor, nu este necesar stratul de ulei mineral.

Treptele de temperatură ale unei reacții PCR standard

Denaturarea inițială

Pentru ca reacție PCR să se desfășoare eficient, este foarte important ca moleculele ADN matriță să fie denaturate inițial complet. Acest lucru poate fi realizat prin încălzirea inițială a amestecului de reacție 2 min la 94-95°C.

Treapta de denaturare din cadrul fiecărui ciclu

De obicei, este suficientă o denaturare de 20-30 sec la 94-95°C, dar aceasta trebuie adaptată funcție de termocycler și de tuburile folosite (de ex., dacă se lucrează în tuburi de 500 μ l sunt necesari timpi mai lungi decât dacă se lucrează în tuburi de 200 μ l). Totodată, pentru matrițe bogate în GC se recomandă folosirea unor timpi de denaturare mai lungi.

Atașarea primerilor

În marea majoritate a experimentelor, temperatura de atașare a primerilor trebuie determinată și optimizată empiric. Alegerea acestei temperaturi reprezintă unul din factorii cei mai critici pentru asigurarea unei înalte specificități a reacției PCR. Dacă temperatura de atașare este mult prea înaltă, nu are loc atașarea primerilor, iar dacă temperatura este prea scăzută, atunci crește probabilitatea atașărilor nespecifice.

Polimerizarea propriu-zisă

Taq ADN polimerizează aproximativ 60 baze per secundă la 72°C. În fiecare ciclu, o perioadă de polimerizare de 45s este suficientă pentru amplificarea unor fragmente de până la 1 kbp. Pentru amplificarea unor fragmente mai mari de 1 kbp, timpul se calculează în multipli de 45s, urmat de ajustări pentru diverse matrițe.

Pentru a obține o cantitate cât mai mare de amplicon, se poate varia timpul de polimerizare, astfel: pentru primele 10 cicluri se folosește un timp constant de polimerizare (de ex. 45s pentru 1 kbp), iar pentru următoarele 20 de cicluri se crește timpul de polimerizare cu 2-5s per ciclu (de ex. 50s pentru ciclul 11, 55s pentru ciclul 12 etc). O asemenea mărire progresivă a timpului de polimerizare oferă enzimei mai mult timp pentru polimerizare, pentru că pe măsură ce reacția PCR avansează, în amestecul de reacție se găsește din ce în ce mai multă matriță și din ce în ce mai puțină enzimă activă (randamentul enzimei scade datorită expunerii prelungite la temperaturi înalte).

Numărul de cicluri

Într-o reacție PCR obișnuită, mai puțin de 10 molecule de matriță pot fi amplificate în mai puțin de 40 de cicluri, obținându-se un produs (amplicon) detectabil în electroforeză în gel de agaroză. La o creștere mult prea mare a numărului de cicluri, se pot acumula produși de reacție nespecfici.

Polimerizarea (extensia) finală

În multe reacții, după ultimul ciclu de amplificare, tuburile de reacție se țin 5-15 min la 72°C pentru a realiza polimerizarea completă a produșilor parțiali, precum și renaturarea moleculelor monocatenare.

Platoul amplificării

O reacție PCR de amplificare ADN *in vitro* nu este infinită: după un anumit număr de cicluri, secvența amplificată nu se mai acumulează exponențial, iar reacția intră într-o fază lineară (staționară) denumită platoul amplificării.

În laboratorul nostru efectuăm reacțiile PCR cu ajutorul unui kit *Promega PCR Core System II* (cu *Taq polymerase*) pentru care producătorii recomandă următoarele volume de reacție și concentrații finale pentru reacția de control :

Component	Volum	Concentrație finală
Soluție MgCl ₂ 25 mM	3 μl	1.5 mM
Tampon 10X fără MgCl ₂	5 μl	1 X
Amestec dNTP 10mM	1 μl	0.2 mM
<i>Upstream control primer</i> 15μM *	3.3 μl	1 μM
<i>Downstream control primer</i> 15μM *	3.3 μl	1 μM
ADN polimeraza Taq 5U/μl	0.25 μl	1.25 U / 50 μl
Plasmid - control pozitiv 1ng/μl *	1 μl	<1ng / 50 μl
Apa <i>nuclease-free</i>	Până la volum total de 50 μl	

* *Kitul Promega PCR Core System II* conține (ca, de altfel, toate kiturile de PCR comercializate) și un sistem de control pozitiv constituit dintr-un ADN matrice plasmidială și 2 primeri specifici pentru acesta. Acest sistem permite verificarea calității celorlalte componente ale reacției: ADN polimerază, tamponul, soluția de MgCl₂, amestecul de dNTP.

Volumele și concentrațiile listate în acest tabel sunt valabile pentru sistemul de control pozitiv. Pentru diverse probe este necesară încercarea a mai multor variante de reacție. Este evident că cei 2 primeri sunt utili numai pentru matricea plasmidială de control.

În laboratorul nostru s-a folosit o schemă similară celei prezentate mai sus:

Component	Volum	Concentrație finală
Tampon 10X cu 15mM MgCl ₂	5 μl	1X cu 1.5 mM MgCl ₂
Amestec dNTP 10mM	1 μl	0.2 mM
<i>Upstream control primer</i> 15μM *	2 μl	0.6 μM
<i>Downstream control primer</i> 15μM *	2 μl	0.6 μM
ADN polimeraza Taq 5U/μl	0.3 μl	1.5 U / 50 μl
Plasmid - control pozitiv 1ng/μl *	1 μl	<1ng / 50 μl
Apa <i>nuclease-free</i>	38.7 μl	

Componentele reacției (cu excepția matricei) au fost amestecate într-un tub Eppendorf de 0.5 ml cu pereți subțiri (pentru a se realiza mai rapid transferul de temperatură). Într-un alt tub a fost pus 1.25 μl ADN matrice (plasmid de control pozitiv 1ng/μl). Tubul a fost introdus în termocycler unde a fost denaturat 6 min la 95°C. Apoi, din matricea denaturată a fost adăugat 1 μl în amestecul de reacție. Tubul a fost apoi vortexat și centrifugat 30 sec. În final, tubul a fost introdus în termocycler, iar acesta a fost programat pentru :

25 cicluri formate din: 95°C – 1 min : denaturare
 50°C – 1 min : atașare primeri
 72°C – 2 min : polimerizare
elongare finală – 7 min la 72°C

Dupa terminarea reacției PCR, ca de altfel, în foarte multe alte situații, înainte de a analiza sau manipula ampliconul, este necesară efectuarea unei electroforeze în gel de agaroză pentru verificarea reacției. În funcție de dimensiunea moleculei amplificate se prepară un gel de agaroză de diverse concentrații. Totodată, pentru verificarea dimensiunii moleculare a ampliconului este necesară folosirea unui marker de greutate moleculară.

Pentru ampliconul de control din kitul *Promega PCR Core System II* (323 bp) se recomandă folosirea unui gel de agaroză de concentrație 2%, preparat în tampon TBE 1X, iar tamponul de electroforeză să fie TBE 0.5X (în general, pentru fragmente de ADN d.c. linear de dimensiuni relativ mici se recomandă TBE 0.5X ca tampon de electroforeză).

Nr. fragmente	λ -ADN / BstEII	λ -ADN / EcoRI, HindIII	Sigma PCR marker
1	8.454 bp	12.226 bp	2.000 bp
2	7.242	5.148	1.500
3	6.369	4.973	1.000
4	5.686	4.268	750
5	4.822	3.530	500
6	4.324	2.027	300
7	3.675	1.904	150
8	2.323	1.584	50
9	1.929	1.375	
10	1.371	947	
11	1.264	831	
12	702	564	
13	224	125	
14	117		

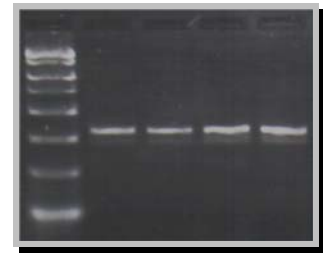


Fig.3.33. Electroforeza în gel de agaroză 2%, TBE 0.5X a ampliconului de control

din kitul *Promega PCR Core System II* (ampliconul a fost obținut în condițiile de reacție menționate mai sus). Godeuri: **1-** λ -ADN / BstEII; **2-** Ampliconul de control (25 μ l); **3-** Sigma PCR marker; **4-** λ -ADN / EcoRI, HindIII.

În laboratorul nostru se realizează un studiu privind frecvența alelelor STR în diverse segmente din populația României. Locii STR (*Short Tandem Repeat*) constau în secvențe repetitive scurte, de 3-7 bp. Aceste repetiții sunt abundente în genomul uman și sunt localizate în diverse gene (de ex. genele pentru lipoproteinlipază, tirozinhidroxilază, tiroidperoxidază, factorul XIII de coagulare etc). Pentru fiecare din aceste gene se manifestă un polimorfism al locilor STR (distingându-se astfel diverse alele), polimorfism dat de prezența / absența secvențelor repetitive și, respectiv, de numărul acestor secvențe. Folosirea STR ca markeri polimorfici este utilă în diferențierea populațiilor umane. Cea mai facilă metodă de detectare a acestor secvențe folosește reacția PCR. Cu ajutorul kiturilor Promega, se realizează următorul amestec de reacție :

Componentele reacției	Volum (μ l)
Apa <i>nuclease-free</i>	18.5
Tampon 10X pentru STR *	2.5
Pereche de primeri specifici pentru locusul analizat 10X	2.5
Taq ADN pol 0.5U/ μ l	0.5
ADN genomic uman **	1

* Tampon 10X pentru STR: 500 mM KCl, 100 mM Tris.HCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X100, 2mM din fiecare dNTP

** Acest protocol poate fi folosit utilizând cantități foarte mici de ADN (1-5 ng)

Dupa amestecarea tuturor componentelor reacției se adaugă o picătură de ulei mineral.

Condițiile de amplificare:

Denaturare inițială - 2 min la 96°C

Amplificare – 30 cicluri : 1min la 94°C

1 min la 60°C

1.5 min la 70°C

Variante tehnice și aplicații ale tehnologiei PCR

Marele avantaj al tehnicilor PCR îl reprezintă faptul că permite obținerea unei cantități mari dintr-o anumită secvență ADN, fără a necesita clonarea acesteia în prealabil într-o moleculă de tip vector. Pe de altă parte, tehnologia PCR a revoluționat și implicarea geneticii moleculare în domenii în care se apelează la cantități foarte mici de ADN. Asemenea situații se întâlnesc în :

- diagnosticul unor boli monogenice, precum și detectarea de noi tipuri de mutații în gene importante în anumite boli;
- diagnosticul unor infecții umane: permite detectarea particulelor infecțioase bacteriene și virale chiar aflate într-o proporție mică, chiar pentru specii ce se cultivă dificil *in vitro*, chiar pentru patogeni cu variabilitate antigenică mare, și chiar pentru patogeni ce au perioadă mare de latență; astfel, pot fi identificați indivizii umani pozitivi înainte de seroconversie;
- studii privind mecanismele genetice ce acompaniază procesele maligne (detectarea secvenței și țesutului în care se exprimă anumite oncogene în diverse procese maligne);
- studii de taxonomie, sistematică și filogenie moleculară: obținerea rapidă a unei cantități mari din secvențe ADN cu valoare taxonomică și/sau filogenetică;
- biologia populațiilor, inclusiv la organisme mici: tehnologia PCR permite secvențierea rapidă a unor molecule de ADN de la foarte mulți indivizi, fără a necesita în prealabil clonarea acestora;

- studii de antropologie: tehnica PCR permite în prezent recuperarea și analiza unor secvențe ADN din fosile;
- medicină legală: cu ajutorul reacțiilor PCR pot fi în prezent analizate la nivel molecular o serie întreagă de probe biologice.

În afară de toate aceste aplicații directe ale tehnologiei PCR, pornind de la reacția inițială de amplificare, au fost imaginat o serie întreagă de variante tehnice ce permit abordarea unor manipulări cât mai acurate a moleculelor de acizi nucleici.

1. Obținerea unor cantități suficiente dintr-o anumită secvență

Cu ajutorul tehnologiei PCR se pot obține cantități suficiente dintr-o anumită secvență ADN, astfel încât să poată fi folosită în diverse manipulări, inclusiv pentru secvențiere sau experimente de clonare.

2. Obținerea de sonde ADN/ARN marcate

Foarte multe tehnici de obținere de sonde ADN/ARN folosesc variante de reacții PCR. Astfel, într-o primă variantă, se folosesc primeri marcați (în sistem radioactiv sau neradioactiv de marcarea) și dNTP nemarcate. Ampliconii obținuți într-o asemenea reacție sunt molecule dublu-catenare marcate la capete (primerii unei reacții PCR intră în structura produșilor de reacție).

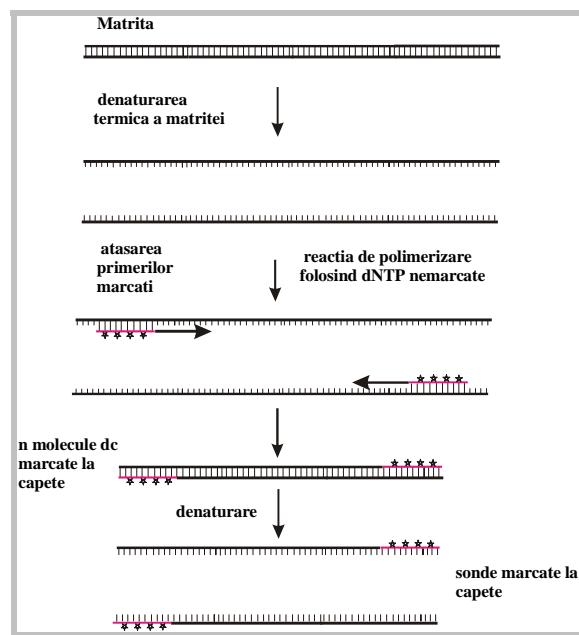


Fig.3.34. Obținerea prin PCR de sonde marcate la capete

Într-o altă variantă tehnică, în reacția PCR se introduc atât primeri marcați, cât și dNTP marcate. Ampliconii obținuți vor fi reprezentați de molecule marcate pe toată lungimea.

În ambele cazuri, ampliconii rezultați sunt denaturați termic, obținându-se în final sondele monocatenare utilizabile în reacțiile de hibridizare moleculară.

3. PCR în mutagenza situs-specifică

Pornind de la faptul că primerii folosiți într-o reacție PCR sunt incluși în produsele PCR (ampliconi), au fost dezvoltate o serie întreagă de variante tehnice ale acestei reacții. Astfel, în experimentele de mutagenză situs-specifică, modificările dorite pot fi introduse în ampliconi pe calea primerilor, fie că este vorba de inserții sau de deleții.

În toate aceste cazuri se utilizează o tehnologie PCR în care reacția de amplificare este împărțită în 2 reacții PCR separate în care sunt amplificate cele 2 secvențe ADN aflate de o parte și de alta a situsului de modificat (Fig.3.36). În aceste 2 etape se folosesc perechi de primeri constituite dintr-un *primer extern* (pentru capătul moleculei ADN inițiale) și un *primer intern* (primerii interni sunt complementari situsului de modificat și conțin în secvență modificarea dorită). Prin folosirea unor asemenea primeri, ampliconii rezultați conțin deja modificarea dorită, precum și o zonă de complementaritate inter-ampliconi.

După această etapă se realizează îndepărtarea primerilor interni, amestecarea celor 2 produse PCR, denaturarea termică a moleculelor urmată de renaturarea acestora în condiții de stringență. Se adaugă primeri exteriori și se realizează o noua reacție PCR, al cărui rezultat va fi reprezentat de molecule ADN identice cu matricea inițială, conținând însă și modificarea dorită.

Spre deosebire de tehnicile clasice de mutageneză, și chiar de experimentele de mutageneză cu ajutorul transposonilor, asemenea variante tehnice de PCR permit o rezoluție și o acuratețe mult mai mare în obținerea de molecule ADN modificate. În mare majoritate, aplicațiile practice vizează analiza corelațiilor dintre secvența de nucleotide a unor molecule ADN și realizarea anumitor funcții.

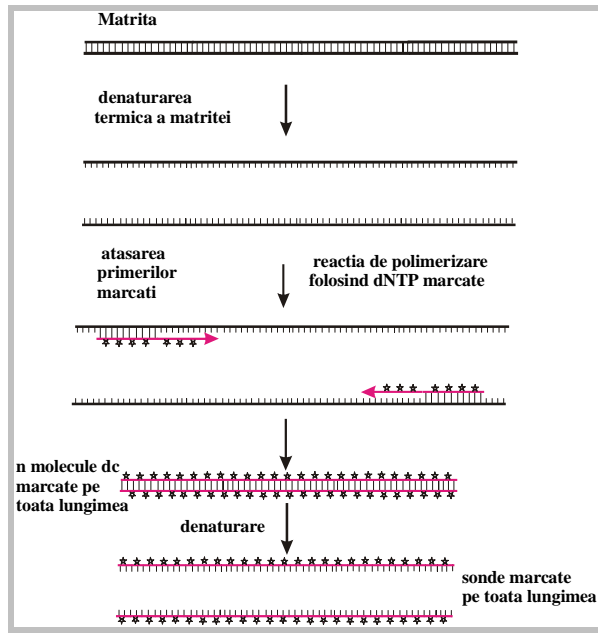


Fig.3.35. Obținerea prin PCR de sonde marcate pe toata lungimea

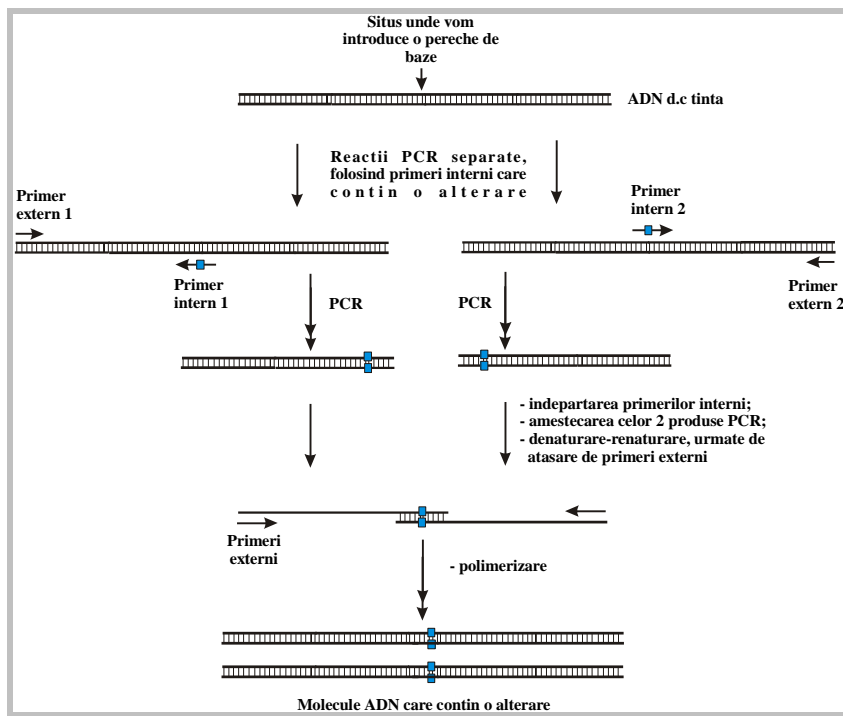


Fig.3.36. Mutageneză situs specifică prin PCR

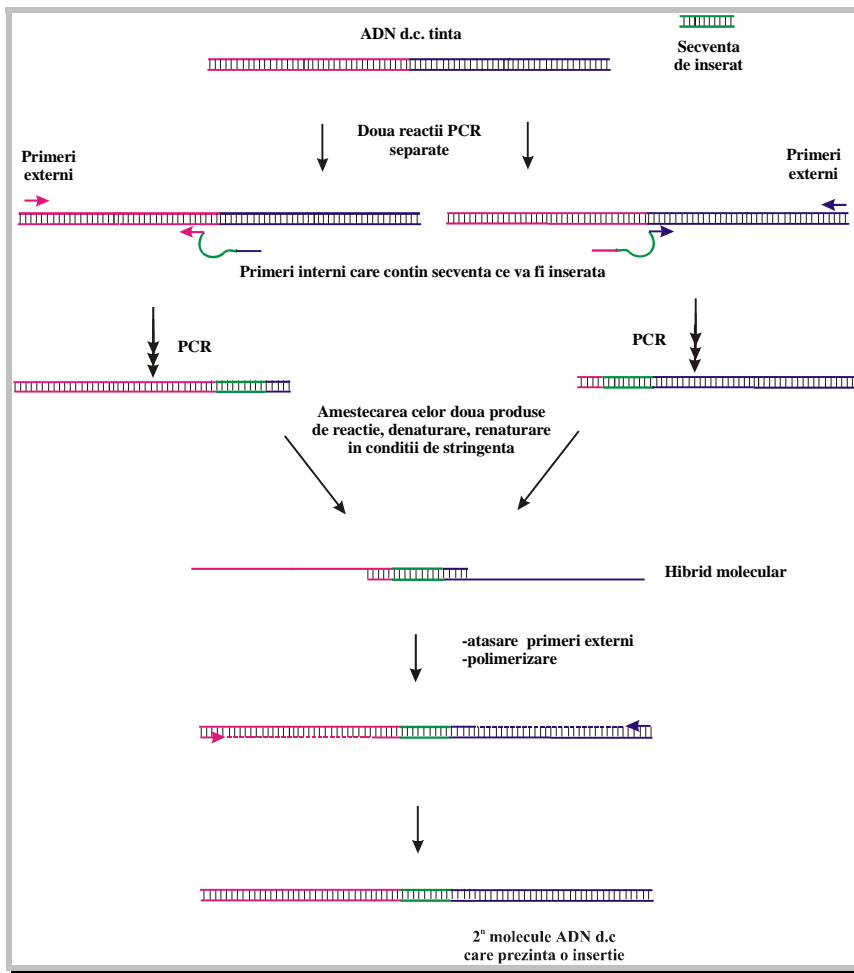


Fig.3.37. PCR pentru introducerea de inserții

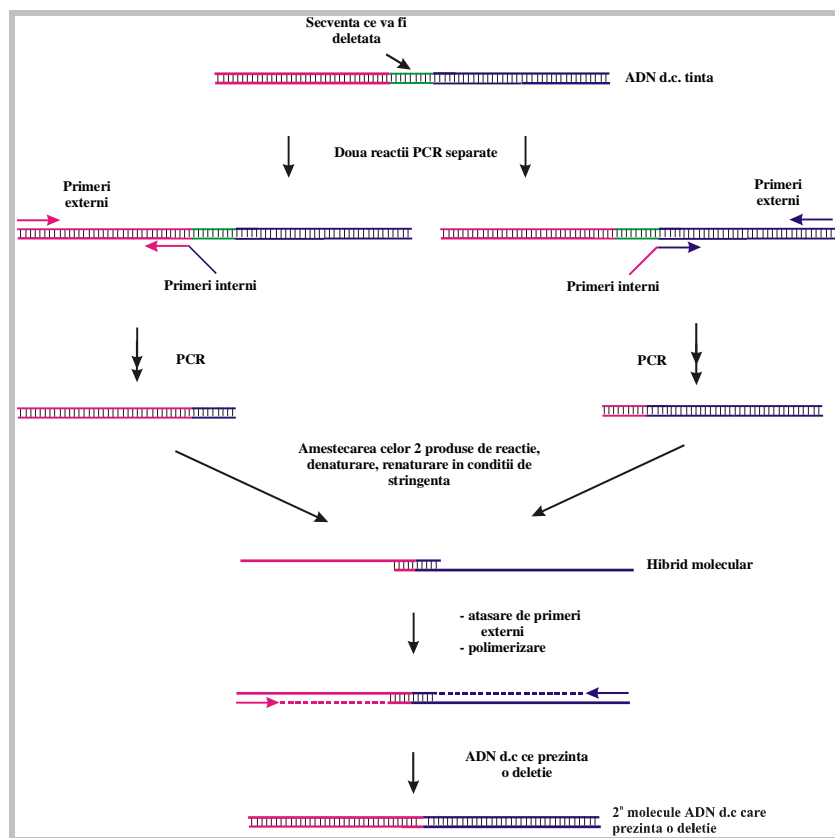


Fig.3.38. PCR pentru producerea de deleții

4. PCR în obținerea de molecule ADN recombinante

Un alt set de studii își propun analiza funcțiilor de promotor a unor secvențe ADN, sau chiar obținerea de molecule ADN recombinante cu rată înaltă de transcriere (Fig.). În acest scop, se folosește o schemă de manipulare genetică similară celei de mai sus. Astfel, se realizează 2 reacții PCR separate în care sunt amplificate secvența potențial promotor și, respectiv, secvența codificatoare. În ambele reacții PCR se utilizează perechi de primeri constituite dintr-un *primer extern* și un *primer intern* (în acest caz, primerii interni conțin și o porțiune complementară celeilalte molecule). Etapele următoare sunt similare: ampliconii rezultați în aceste 2 reacții PCR se amestecă, se denaturează și se renaturează în condiții de stringență. În această a treia reacție PCR se introduc doar primeri externi și se obțin molecule ADN recombinante, formate din secvența promotor și din secvența codificatoare.

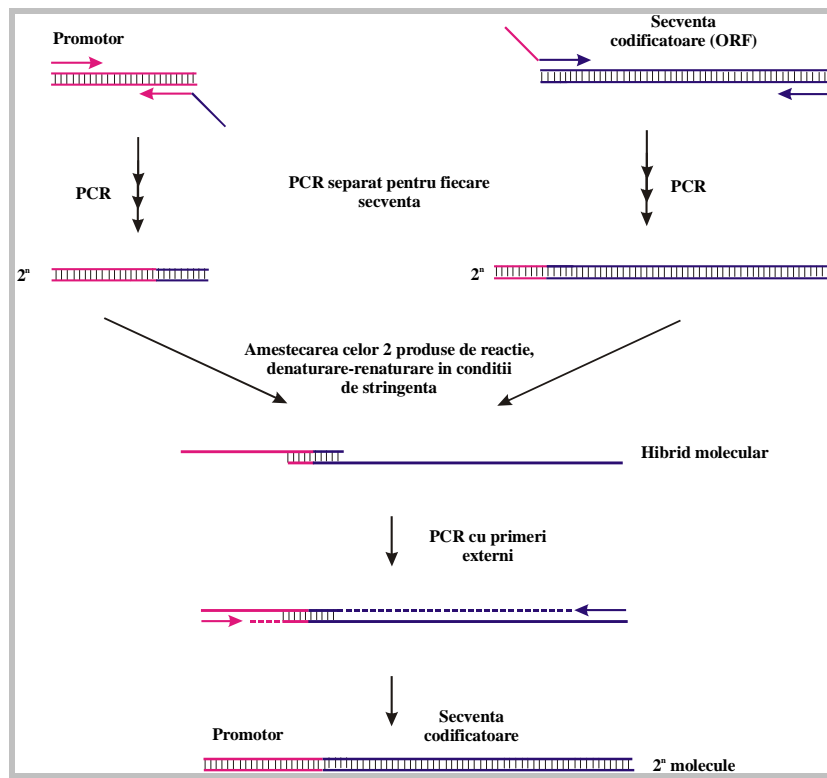


Fig.3.39. PCR combinatorial

5. ARN – PCR

O serie întreagă de experimente vizează obținerea de molecule de ADNc (complementar cu anumite molecule ARN). O variantă tehnică utilizează reacțiile de revers-transcriere, în timp ce o altă variantă se bazează pe reacții PCR (Fig.3.40). Astfel, după denaturarea structurilor secundare ale moleculelor ARN, se atașează un primer complementar capului 3' al moleculei ARN și are loc sinteza primei catene de ADNc. În această reacție se folosește o ADN polimerază ARN-dependentă (revers-transcriptază), de tipul AMV-RT (*Avian Myeloblastosis Virus Revers-Transcriptase*), MLV-RT (*Murine Leukaemia Virus Revers-Transcriptase*), rTth (*recombinant Thermus thermophilus DNA polymerase*). Hibridul ARN:ADN obținut în această reacție de revers-transcriere este supus unei reacții de distrugere a catenei ARN cu RNaza H, după care la catena ADN rămasă este atașat un primer complementar cu capul 3' al acesteia. După sinteza celei de-a doua catene ADN, moleculele sunt introduse într-o reacție PCR obișnuită la sfârșitul căreia sunt obținute moleculele de ADNc (complementar cu moleculele ARN de la care s-a plecat). Avantajul unei asemenea variante tehnice îl reprezintă faptul că se obține o cantitate mare a secvențelor ADNc.

PCR invers

În foarte multe experimente este necesară amplificarea unor molecule de ADN cu secvență necunoscută. Un asemenea caz este și cel în care se studiază situsurile în care se inserează o serie de transposoni sau genomul unor virusuri (Fig.3.41). În această situație se secționează cu endonucleaze de restricție o moleculă ADN ce cuprinde secvența cunoscută (transposon, genom viral) încadrată de secvențe necunoscute (aparținând genomului gazdei). Această moleculă este apoi circularizată și introdusă într-o reacție PCR în care se folosesc primeri complementari cu capetele secvenței cunoscute. Ampliconul rezultat este reprezentat de secvența necunoscută.

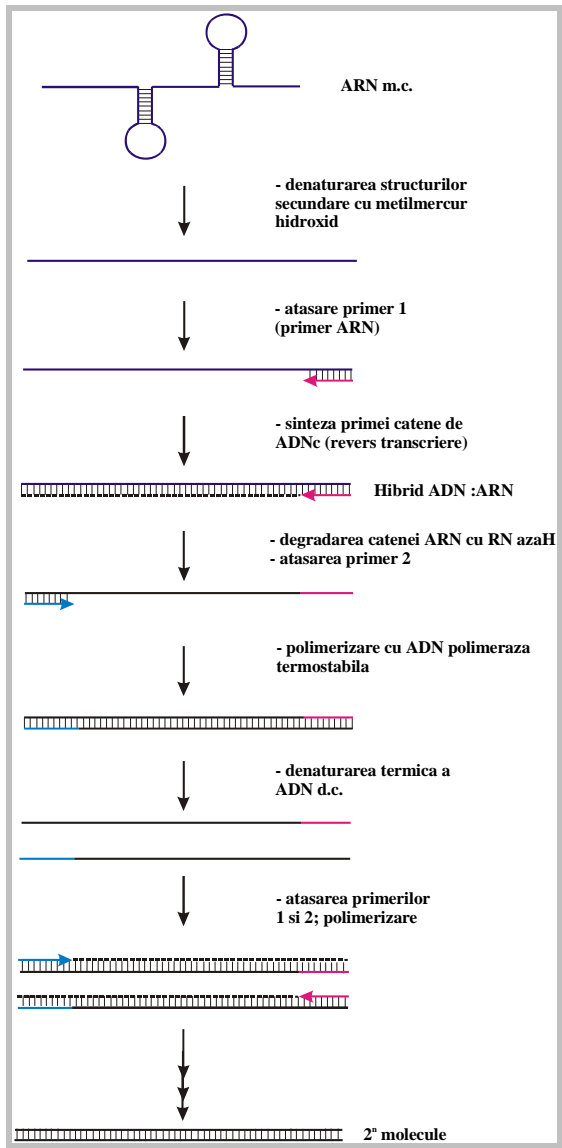


Fig.3.40. ARN-PCR

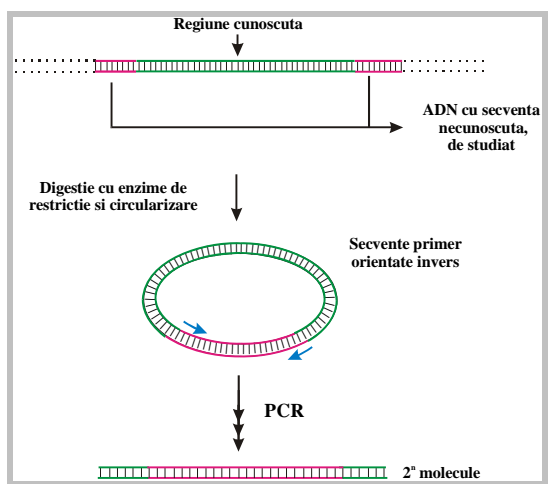


Fig.3.41. PCR invers

6. PCR *in situ*

Una din limitările tehnicii PCR o reprezintă necesitatea de a extrage și purifica matricea (ADN sau ARN) înainte de amplificare. Varianta tehnică *PCR in situ* combină o reacție PCR cu o hibridizare moleculară *in situ*. Astfel, reacția PCR se realizează în celule intacte și este apoi detectată prin hibridizare *in situ* (întreaga reacție, atât PCR, cât și hibridizarea, se realizează pe țesut împrăștiat și plasat pe lama de microscop). Printr-o asemenea tehnică se poate identifica foarte exact care celule posedă o anumită secvență ADN, sau care exprimă o anumită genă. Pe de altă parte, se reduce foarte mult riscul contaminării produselor PCR cu alte secvențe ADN.