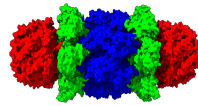


Modificarea mesajului genetic

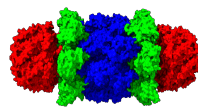
III. Ingineria genetică: abordări generale pentru clonarea fragmentelor de ADN în vectori



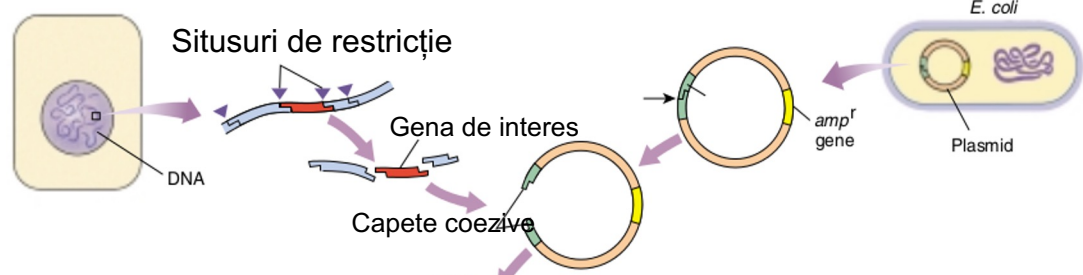
Ingenierie genetică își propune să manipuleze în mod direct și rațional informația genetică. Cel mai frecvent, procesul presupune parcurgerea următoarelor etape:

- 1. Clivarea ADN-ului sursă** (ADN genomic, ADN obținut prin PCR, ADN complementar rezultat prin revers-transcrierea ARN-ului mesager sau un fragment ADN sintetizat chimic) – prin folosirea cel mai frecvent a endonucleazelor de restricție se obțin multe fragmente de ADN flancate de capete coezive, între acestea aflându-se și zona (gena) de interes
- 2. Obținerea moleculei de ADN recombinat** – fragmentele generate sunt inserate și ligate într-un **vector** – plasmid sau virus - care să permită replicarea acestuia în celula gazdă. Vectorul a fost inițial liniarizat prin utilizarea aceleiași enzime de restricție. Inserarea se realizează prin acțiunea **ligazei** și pentru fiecare fragment se va obține o moleculă ADN-recombinant.
- 3. Multiplicarea moleculei de ADN recombinat** – **vectorul recombinat** este introdus într-o celulă gazdă (de obicei, dar nu întotdeauna, *E. coli*) unde **se replică**. Prin diviziuni succesive ale unei celule ce conține vectorul se obțin copii identice ale acesteia – **clone** – ce conțin și ele copii ale vectorului recombinat. În acest fel molecula recombinată este multiplicată – **clonată**. Dacă în etapa 2 s-au inserat mai multe fragmente, pentru fiecare fragment se va obține o moleculă ADN-recombinant ce va genera un set de celule identice - **un set de clone**. Toate clonele obținute dintr-un set de fragmente – o **bibliotecă de clone**.
- 4. Selecția clonei de interes** – are în vedere în special identificarea acelei clone ce conține secvența de interes.

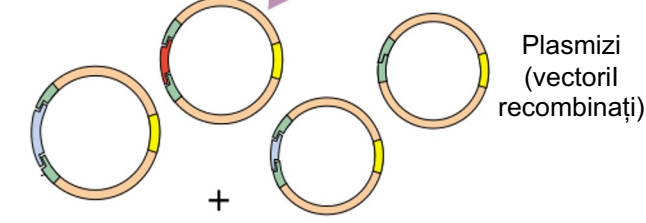
Etapele generale ale unui experiment de inginerie genetică



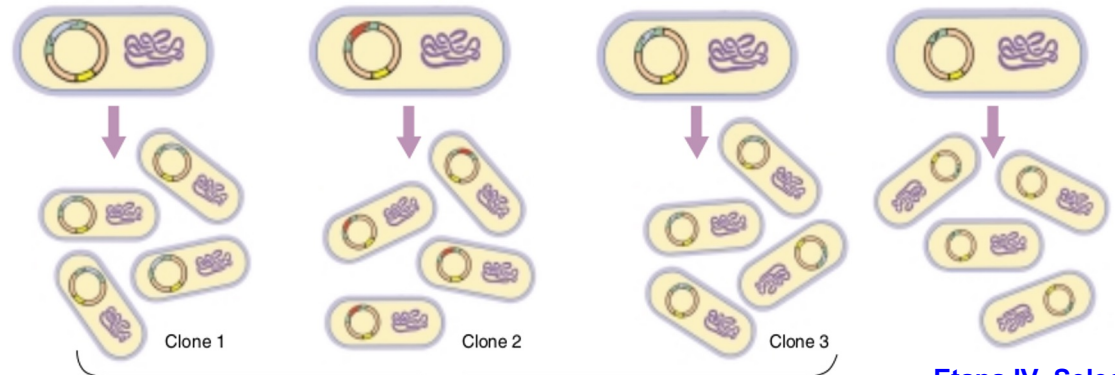
Etapa I. ADN-ul din surse diferite este clivat cu aceleași enzime de restricție



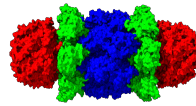
Etapa II. Capetele coezive permit ligarea moleculelor de ADN prin intermediul ADN-ligazei



Etapa III. Vectorii recombiinați sunt introduși în celule gazdă unde se replică



Etapa IV. Selecția secvenței de interes



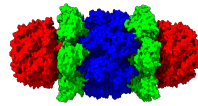
Fragmentarea moleculei ADN în vederea separării regiunii/fragmentului de interes **se poate realiza**

a) **non-enzimatic** sau b) **enzimatic**.

Fragmentarea non-enzimatică nu oferă un control strict asupra dimensiunilor fragmentelor obținute, utilizarea enzimelor de restricție fiind preferată datorită specificității foarte mari a acestora.

Metodele ce pot fi folosite pentru fragmentarea non-enzimatică a ADN-ului sunt:

- **Fragmentarea acustică** – sunete cu lungimi de undă reduse și de frecvențe foarte înalte sunt aplicate concentrat în proba de ADN ceea ce duce la ruperea mecanică a catenelor cu obținerea de fragmente cuprinse de sute până la mii de pb;
- **Sonicarea** – aplicarea de sunete cu lungime de mari duce la apariția procesului de cavitație și ruperea catenelor de ADN în fragmente de 700 pb până la câțiva kpb;
- **Fragmentarea prin centrifugare** - forța centrifugală este utilizată pentru a forța soluțiile cu ADN să treacă printr-un orificiu îngust de o dimensiune dată. Viteza de centrifugare este cea ce dictează dimensiunea fragmentelor rezultate, în general aceste fiind de ordinul kpb;
- **Fragmentarea hidrodinamică** - se realizează prin forțarea soluției cu ADN printr-un tub îngust (**point-sink shearing**, rezultă fragmente de câteva kpb) sau printr-un ac de seringă (**needle shearing**, rezultă fragmente de câteva zeci de kpb).



Clivarea ADN-ului sursă - endonucleazele de restricție

Fragmentarea enzimatică se bazează pe o clasă specifică de nucleaze este reprezentată de **endonucleazele de restricție** (sau **restrictaze**).

Restrictazele clivează specific moleculele de ADN dublu catenar după recunoașterea unei scurte secvențe (4-8 nucleotide) de nucleotide cel mai frecvent **palindromice**. Secvența specifică se numește **situs de restricție**, iar **enzima clivează 2 legături fosfodiesterice**, una de pe o catenă, alta de pe cealaltă catenă.

Restrictazele se clasifică în:

- 1. restrictaze de de tip I** – clivează în mod aleatoriu molecula de ADN și produc fragmente cu fosfat în 5' și OH în 3';
- 2. restrictaze de de tip II** – clivează molecula de ADN dublucatenar în mod specific, în situsuri palindromice foarte clar definite. Clivarea se poate realiza la **nivelul axei de simetrie** a situsul de restricție, fragmentele rezultate având **extremitățile drepte**, sau **decalat față de axa de simetrie**, fragmentele rezultate având capetele **monocatenare și complementare (capete coezive)**; În cadrul acestui grup, se disting restrictazele de **tip IIS** ce recunosc specific situsuri foarte clar definite din molecula de ADN pe care o clivează la o distanță dată de situs; capetele formate sunt coezive;
- 3. restrictaze de de tip III** – recunosc specific situsuri specifice, dar care nu sunt palindromice;
- 3. restrictaze de de tip IV** – acționează asupra ADN-ului modificat chimic;



Cu numere romane se indică a câta restrictază este identificată în tulpina dată

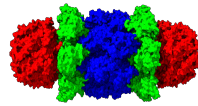
Inițiala numelui genului urmată de primele 2 litere ale denumirii speciei

Tulpina specifică din care a fost izolată

Endonuclease	Sequence Recognized Cleavage Sites Shown	Bacterial Source
<i>Bam</i> HI	↓ GGATCC CCTAGG ↑	<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> H
<i>Bgl</i> II	↓ AGATCT TCTAGA ↑	<i>Bacillus globigii</i>
<i>Eco</i> RI	↓ GAATTC CTTAAG ↑	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>Eco</i> RII	↓ CCTGG GGACC ↑	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>Hind</i> III	↓ AAGCTT TTCGAA ↑	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
<i>Hha</i> I	↓ GCGC CGCG ↑	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>Hpa</i> I	↓ GTTAAC CAATTG ↑	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Mst</i> II	↓ CCTNAGG GGANTCC ↑	Micrococcus strain
<i>Pst</i> I	↓ CTGCAG GACGTC ↑	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>Taq</i> I	↓ TCGA AGCT ↑	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

Palindrom (palin -inapoi, dromos – drum) – cuvinte, fraze sau secvențe ce au aceeași semnificație indiferent de sensul în care sunt citite.

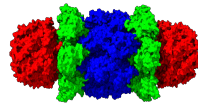
Endonucleazele de restricție



Cel mai frecvent **fragmentarea enzimatică** utilizează **restrictaze de tip II sau III** deoarece nu situs-ul de clivare, dar și **modul de clivare este foarte specific**, ducând la apariția a două tipuri de capete. În situația în care clivarea se realizează pe ambele catene în aceeași poziție din interiorul situs-ului de restricție, cele două catene se vor sfârși la același nivel, iar capătul rezultat poartă numele de **capăt drept**. Dacă clivarea se realizează în situs-uri diferite pe cele două catene, capetele formate vor avea cele două catene de lungimi diferite. Una dintre catene va fi mai lungă și va expune deci nucleotide neîmperecheate spre exterior. Dacă două fragmente de ADN au la capăt o catenă mai lungă cu aceeași secvență, fragmentele se pot asocia prin formarea unor legături de hidrogen. Din acest motiv capetele poartă numele de **capete coezive**.

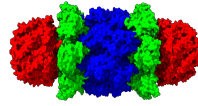
Enzimă de restricție	EcorV	BamHI	BclI	PvuII
Situs de restricție	$5' \text{ .GATATC. } 3'$ $3' \text{ .CTATAG. } 5'$	$5' \text{ ...GGATCC... } 3'$ $3' \text{ ...CCTAGG... } 5'$	$5' \text{ .TGATCA... } 3'$ $3' \text{ .ACTAGT... } 5'$	$5' \text{ ...GGATCC... } 3'$ $3' \text{ ...CCTAGG... } 5'$
Capete generate	$5' \text{ .GAT}$ $ATC. 3'$ $3' \text{ .CTA}$ $TAG. 5'$	$5' \text{ .G}$ $GATCC. 3'$ $3' \text{ .CCTAG}$ $G. 5'$	$5' \text{ .T}$ $GATCA... 3'$ $3' \text{ .ACTAG}$ $T... 5'$	$5' \text{ ...GGA}$ $TCC... 3'$ $3' \text{ ...CCT}$ $AGG... 5'$
	capete drepte	capete coezive	capete coezive	capete drepte

Capete coezive și rolul ligazelor



Enzimă de restricție	EcoRV	BamHI	BclI	PvuII
Capete generate	5' .GAT ATC.3' 3' .CTA TAG.5'	5' .G GATCC.3' 3' .CCTAG G.5'	5' .T GATCA...3' 3' .ACTAGT T...5'	5' ...GGA TCC...3' 3' ...CCT AGG...5'
Compatibilitate capete	5' .GATATC.3' 3' .CTATAG.5' 5' .GATGATCC.3' 3' .CTA G.5' 5' .GATGATCA...3' 3' .CTA T...5' 5' .GATTCC...3' 3' .CTAAGG...5'	5' G ATC.3' 3' CCTAGTAG.5' 5' .GGATCC.3' 3' .CCTAGG.5' 5' .GGATCA...3' 3' .CCTAGT...5' 5' .G TCC...3' 3' .CCTAGAGG...5'	5' T ATC.3' 3' .ACTAGTAG.5' 5' .TGATCC.3' 3' .ACTAGG.5' 5' .TGATCA...3' 3' .ACTAGT...5' 5' T TCC...3' 3' .ACTAGAGG...5'	5' ...GGA ATC.3' 3' ...CCT TAG.5' 5' ...GGAGATCC.3' 3' ...CCT G.5' 5' ...GGA GATCA...3' 3' ...CCT T...5' 5' ...GGATCC...3' 3' ...CCTAGG...5'

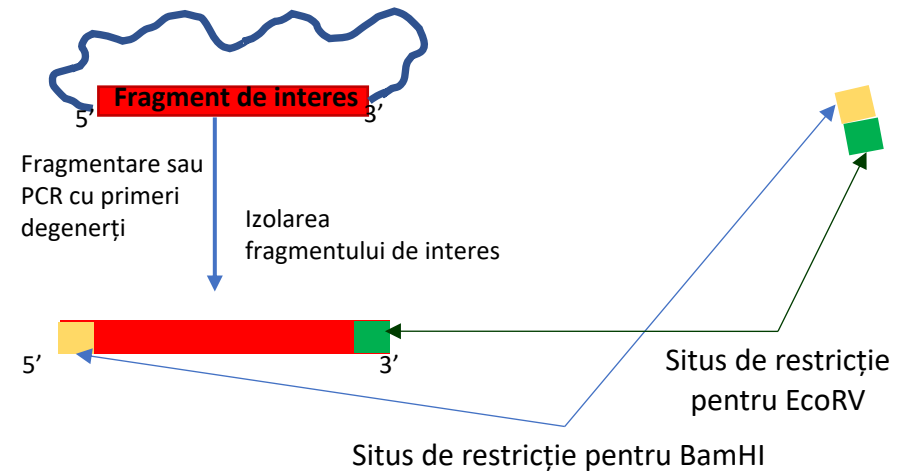
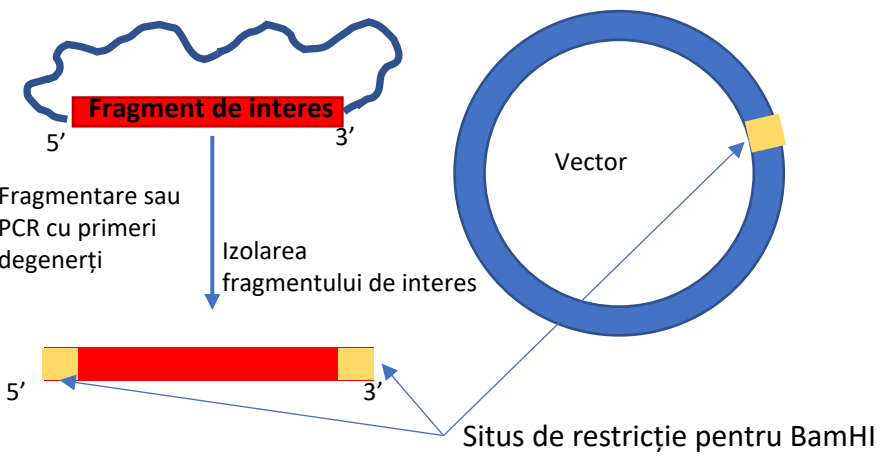
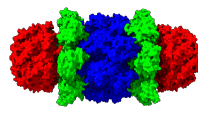
Legăturile de H formate mențin moleculele în contact și permit acțiunea **ligazelor**. Aceste enzime au capacitatea de a reface legătura fosfodiestică și deci continuitatea catenelor. În acest fel, două fragmente de ADN pot fi sudate una de cealaltă. Cel mai frecvent, un fragment conținând secvența de interes interes este sudat în vectorul acceptor, obținându-se o moleculă recombinată.



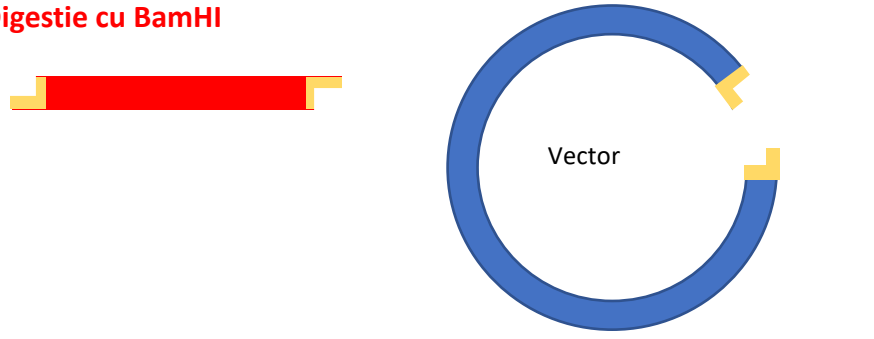
Pentru a putea utiliza enzimele de restricție pentru producerea unei molecule de ADN recombinat, este necesară existența de situsuri de restricție în poziții convenabile. Când acestea nu există, cel mai frecvent fragmentul de ADN ce se dorește a se clona este **amplificat printr-o reacție PCR** ce folosește **primeri degenerați**. Aceste oligonucleotide nu au secvența perfect complementară cu a ADN-ului de amplificat, ci ușor modificată pentru a include un situs de restricție pentru o enzimă dată. Deoarece primer-ul este inclus în toate catenele de ADN amplificate, acestea vor fi diferite de catenele template prin noul situs de restricție creat.

Cea mai simplă strategie de clonare constă din digestia vectorului și fragmentului de interes cu aceeași enzimă de restricție, ceea ce duce la obținerea de capete coezive compatibile care pot fi ligate. Abordarea poartă numele de **clonare oarbă**, deoarece **nu oferă un control foarte strict al orientării fragmentului în vector și de asemenea, vectorul se poate foarte ușor re-circulariza fără a prelua fragmentul de clonat**. Clonarea oarbă este una dintre primele strategii de clonare dezvoltată și foarte intens utilizată care, treptat, prin identificarea unui număr din ce în ce mai mare de enzime de restricție a fost înlocuită de așa-numita **clonare direcționată**. Aceasta presupune utilizarea a cel puțin două enzime pentru digestia fragmentului și vectorului. Prin digestia vectorului cu două enzime de restricție diferite care generează capete incompatibile, recircularizarea vectorului este împiedicată. Deoarece fragmentul este tăiat cu aceleași două enzime, el va putea fi ligat în vector și doar astfel se poate realiza recircularizarea acestuia și obținerea moleculei ADN recombinante. Legarea este de această dată strict coordonată prin alegerea enzimelor de restricție.

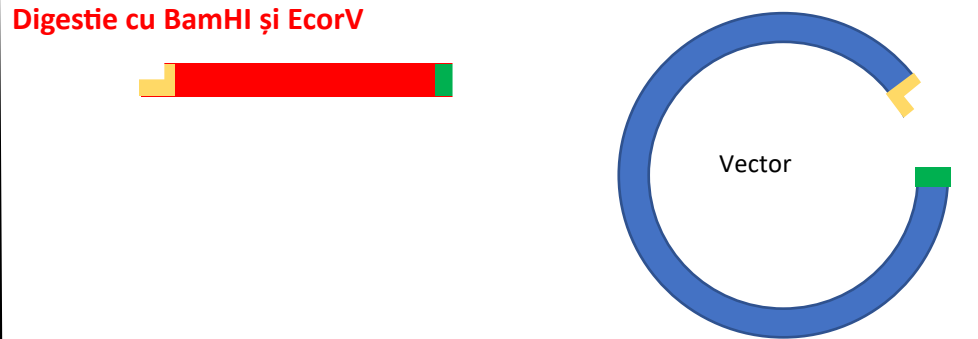
Clonare oarbă vs clonare direcționată



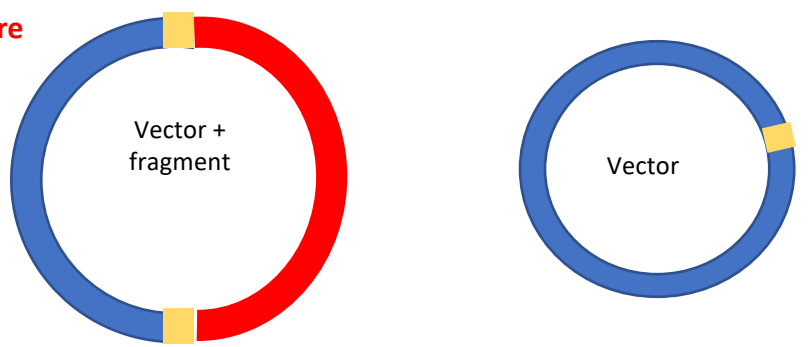
Digestie cu BamHI



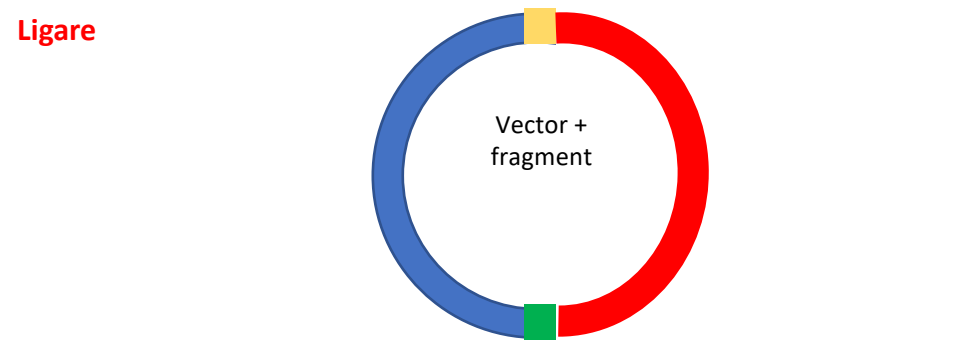
Digestie cu BamHI și EcorV



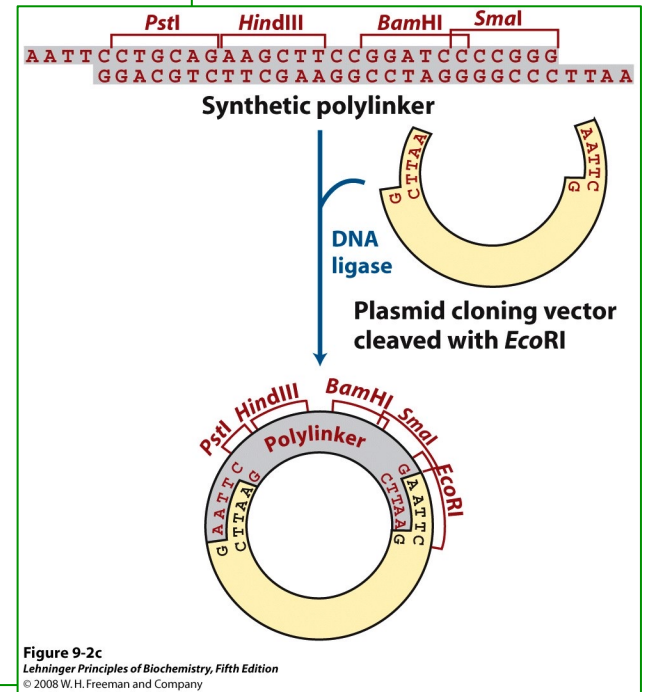
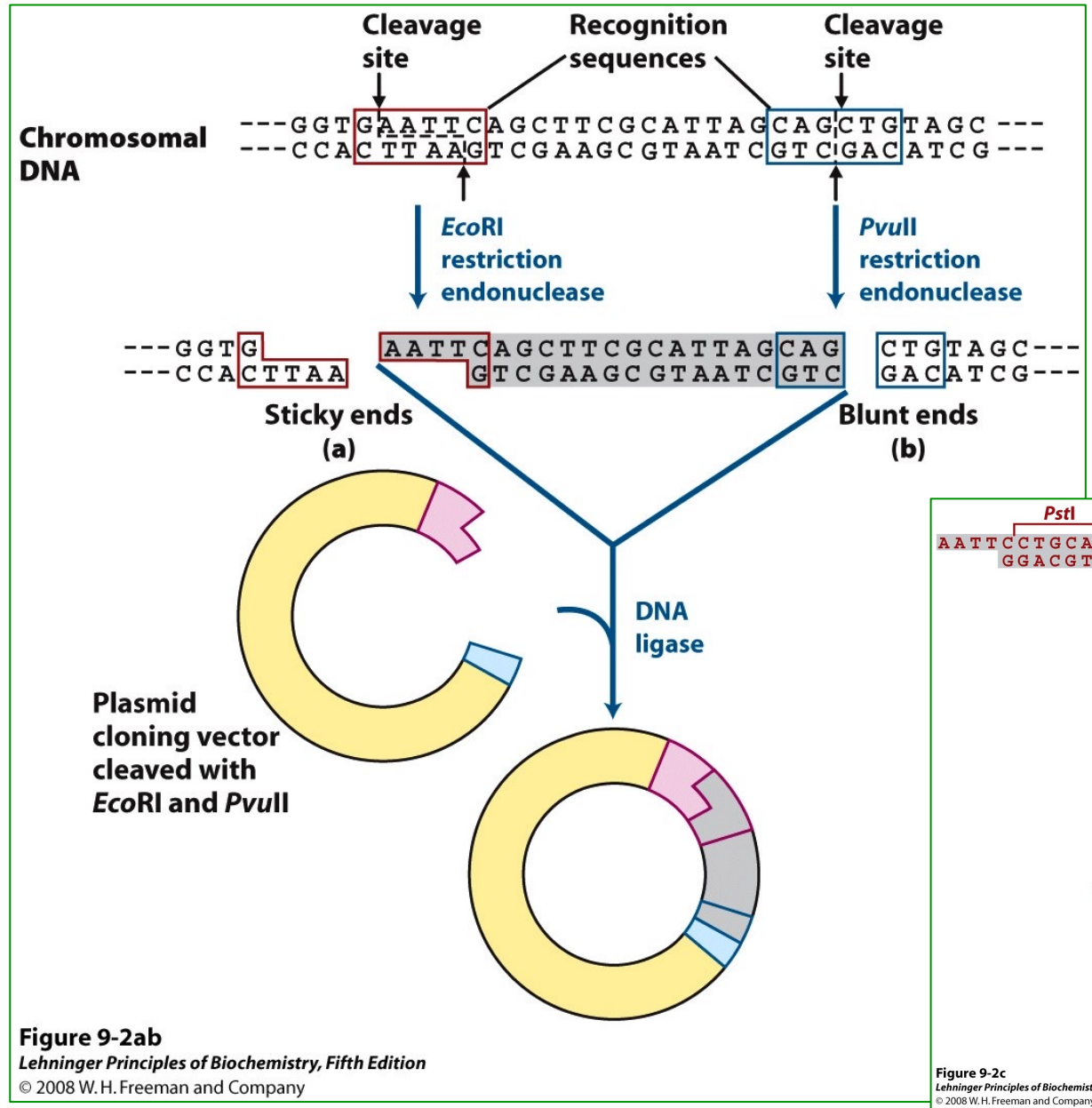
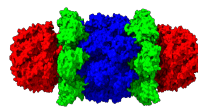
Ligare

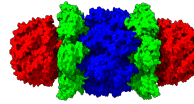


Ligare



Privire de ansablu asupra clonării direcționate



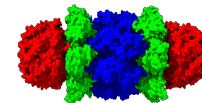


Alegerea enzimelor de restricție și localizarea acestor situs-uri de restricție pe primer trebuie să se facă ținând cont de următoarele elemente:

1. enzima să fie plasată în situs-ul de clonare multiplu al plasmidului;
2. gena de clonat trebuie să fie amplasată în situsul multiplu de clonare în așa fel încât să respecte cadrul de lectură specific vectorului pentru a permite expresia unei proteine recombinante;
3. să înlăture cât mai mult din situs-ul multiplu de clonare pentru ca proteina recombinată să fie cât mai puțin modificată;
4. să taie o singură dată în fragmentul de clonat, în situs-ul dorit; un program extrem de util pentru a analiza situs-urile de restricție existente într-un fragment ADN dat și pentru a alege judicios enzimele de restricție este **NEBCutter**.

După obținerea moleculei recombinante, aceasta trebuie introdusă în celula gazdă. Deși există specii care pot să accepte molecule de ADN exogen în mod natural, *E. coli* nu este una dintre acestea. De aceea, celulele de *E.coli* trebuie aduse într-o stare artificială de competență prin aplicarea unui tratament chimic. Cea mai simplă metodă a fost descoperită în anul 1970 și constă în utilizarea clorurii de calciu. După realizarea transformării, celulele care conțin vectorul sunt selectate, cel mai frecvent, **prin utilizarea proprietăți specifice codificate de către markerul de selecție al plasmidului (de exemplu rezistența la antibiotice)**.

Variante ale clonării direcționate: asamblarea Golden Gate



Asamblarea sau **clonarea Golden Gate** este o variantă a clonării direcționate ce permite asamblarea simultană și rapidă a mai multor fragmente de ADN în același vector. Elementul cheie în acest tip de clonare este utilizarea **enzimelor de restricție de tip IIS** (precum **BsaI**, **BsmBI**, and **BbsI**). Spre deosebire de restrictazele de tip II obișnuite, acestea taie moleculele de ADN la distanță de secvențele palindromice țintă, generând capete coezive non-palindromice. În principiu există 256 de combinații de câte 4 nucleotide unice ce pot constitui aceste capete coezive și sunt generate de aceeași enzimă. Pentru a asambla simultan 2 fragmente într-un vector este necesar ca:

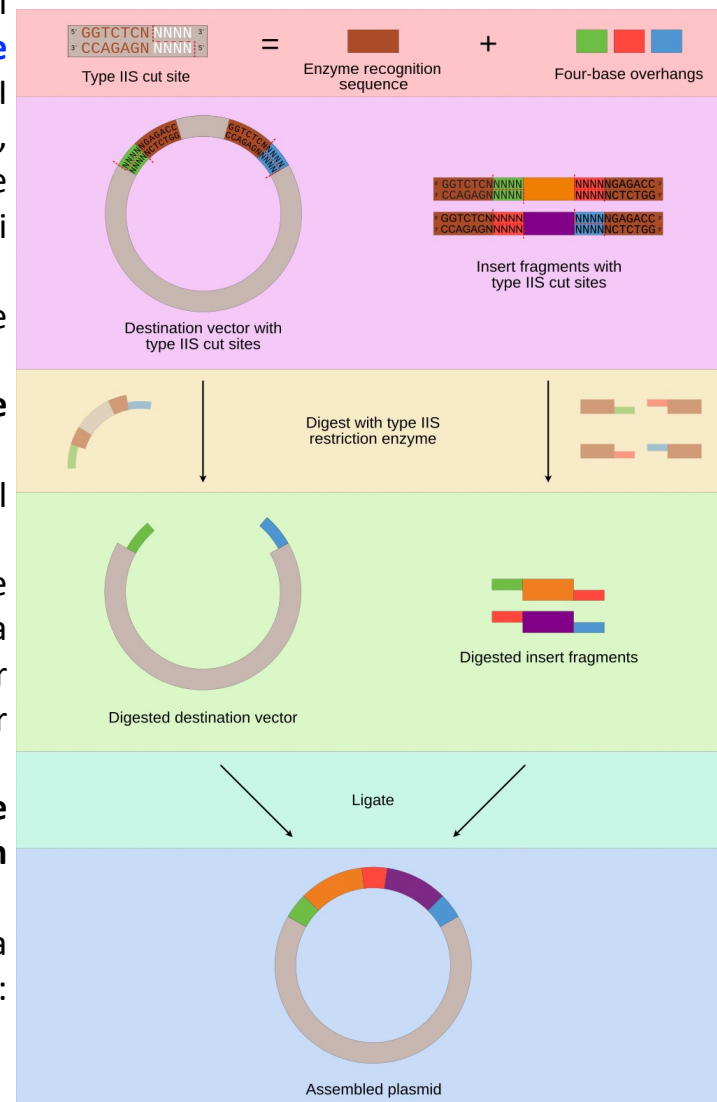
- **vectorul să conțină 2 situsuri de recunoaștere** pentru o restrictază de tip IIS ce generează 2 capete coezive diferite;
- **cele 2 fragmente să conțină fiecare câte unul din capetele coezive unice ale vectorului;**
- **cele 2 fragmente să conțină ambele un capăt coeziv comun**, diferit de al vectorului.

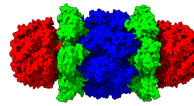
Capătul coeziv comun al fragmentelor va permite asamblarea pe bază de complementaritate a acestora, iar capetele coezive comune cu ale vectorului va permite orientarea corectă a ansamblului în vector. Întregul complex vector recircularizat-fragmente este apoi tratat cu ligază pentru refacerea legăturilor fosfodiesterice și obținerea unei molecule circulare continue.

În cazul asamblării mai multor fragmente, fragmentele din extremități vor conține **câte unul din capetele coezive unice ale vectorului și fiecare pereche de fragmente câte un capăt coeziv comun unic**.

Protocolul proprii-zis poate fi realizat pe un termociclor deoarece necesită alternarea repetată între 2 temperaturi:
37 °C – temperatura optimă de reacție pentru restricție;
16 °C – temperatura optimă pentru reacția de ligare.

Deoarece produsul reacției de ligare este nu mai conține situsul de recunoaștere pentru restrictază, reacția este ireversibilă și extrem de eficientă.

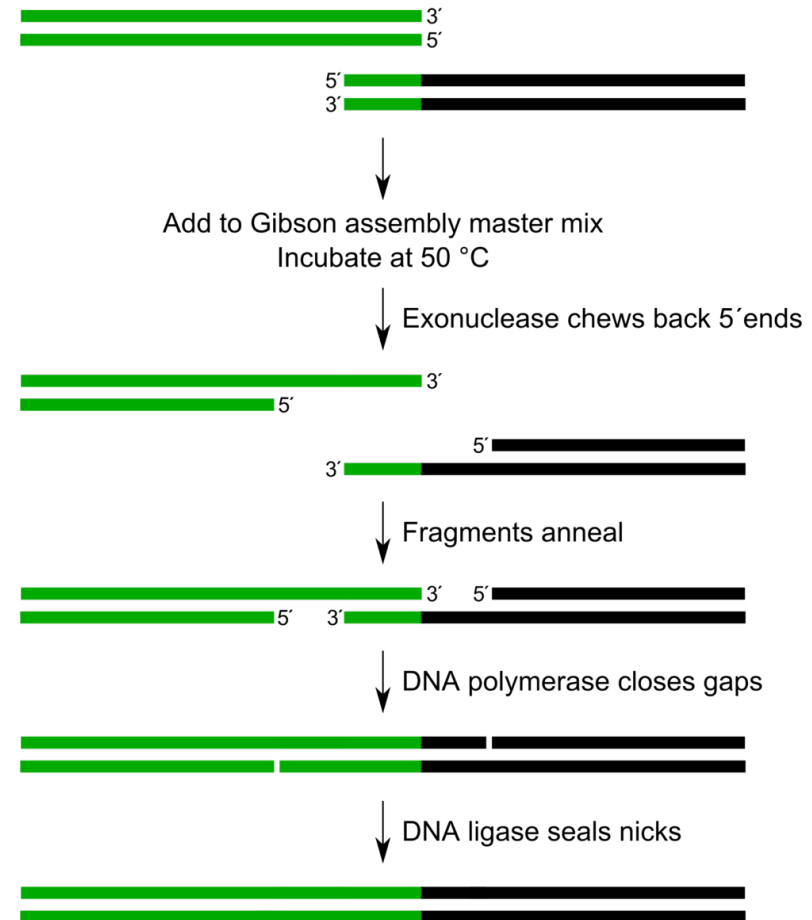




Asamblarea Gibson este o tehnică de clonare care de asemenea permite asamblarea mai multor fragmente, însă realizează acest lucru într-o singură reacție la temperatură constantă. Elementul cheie în această abordare este faptul că nu utilizează enzime de restricție, ci un amestec de 3 enzime:

1. O exonuclează care excizează nucleotide de la capătul 5' al ADN-ului bicatenar și generează zone monocatenare;
2. O ADN-polimerază ce permite refacerea zonelor monocatenare în direcția 3' -5';
3. O ligază care reface legăturile fosfodiesterice.

Pentru a putea fi asamblate, fragmentele adiacente trebuie să conțină o secvență de ~20-40 perechi de baze comună. Prin activitatea exonucleazei, aceste zone comune generează zone monocatenare complementare. ADN-polimeraza completează zonele lipsă, iar ligaza va reforma legăturile fosfodiesterice.



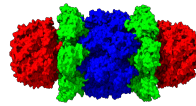


TABLE 9–1 **Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology**

Enzyme(s)	Function
Type II restriction endonucleases	Cleave DNAs at specific base sequences
DNA ligase	Joins two DNA molecules or fragments
DNA polymerase I (<i>E. coli</i>)	Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends
Reverse transcriptase	Makes a DNA copy of an RNA molecule
Polynucleotide kinase	Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation
Terminal transferase	Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex
Exonuclease III	Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand
Bacteriophage λ exonuclease	Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends
Alkaline phosphatase	Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both)

Table 9-1

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company