



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

**Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 -2013,
“Investește în oameni!”**

Titlu Proiect: **PERFECTIONAREA RESURSELOR UMANE DIN MEDICINA VETERINARĂ**

ID Proiect: **POSDRU/81/3.2./S/58833**

DENUMIREA PROGRAMEI P5: **TEHNOLOGII MODERNE ÎN BIOCHIMIA CLINICĂ ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ**

C11.APLICAȚII BIOMEDICALE ALE TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

Formator: Conf. univ. Dr. Andreea Iren Șerban
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ UTILIZATE ÎN DIAGNOSTICUL MOLECULAR MEDICAL VETERINAR

Cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară se pot determina:

- boli cu determinism genetic datorate
 - mutațiilor punctiforme care pot fi:
 - tranziții la nivelul purinelor când $A \rightarrow G$ sau invers
 - tranziții la nivelul pirimidinelor când $C \rightarrow T$ sau invers
 - transversii care sunt substituții între purine și pirimidine $A \rightarrow T$ sau $G \rightarrow C$
 - Dacă într-o populație frecvența mutației punctiforme este de 1% atunci devine un **SNP (single nucleotide polymorphism)**.
 - inserții: inserarea uneia sau a mai multor noi perechi de baze
 - deleții: dispariția uneia sau a mai multor perechi de baze
 - mutații frame shift (se modifică cadrul de citire al secvenței în procesul de translație) care au loc în timpul replicării prin fenomenul de slippage (alunecare) și pot fi:
- predispoziție genetică la anumite boli (ex.Scrapie)
- boli virale, bacteriene și parazitare
- teste de paternitate-pedigree.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Tehnica Polymerase Chain Reaction (PCR)

Realizează copii multiple ale unei *secvențe ADN specifice* prin replicări succesive având la bază proprietate ADN polimerazelor de a sintetiza în direcția 5'-3' o secvență de nucleotide complementară cu secvența ADN țintă (matriță) pornind de la un primer cu capăt 3'-OH liber. Astfel, numărul de copii ale secvenței țintă este dublat la fiecare replicare (ciclu), acesta crescând deci exponențial odată cu fiecare ciclu de amplificare.

Succesul realizării practice a unei reacții PCR constă în alegerea unor primeri sintetici (molecule monocatenare, scurte de ADN, desemnați artificial pe bază de complementaritate cu secvența ADN ce urmează a fi amplificată), capabili să hibridizeze la capetele secvenței ADN țintă și în optimizarea condițiilor de reacție

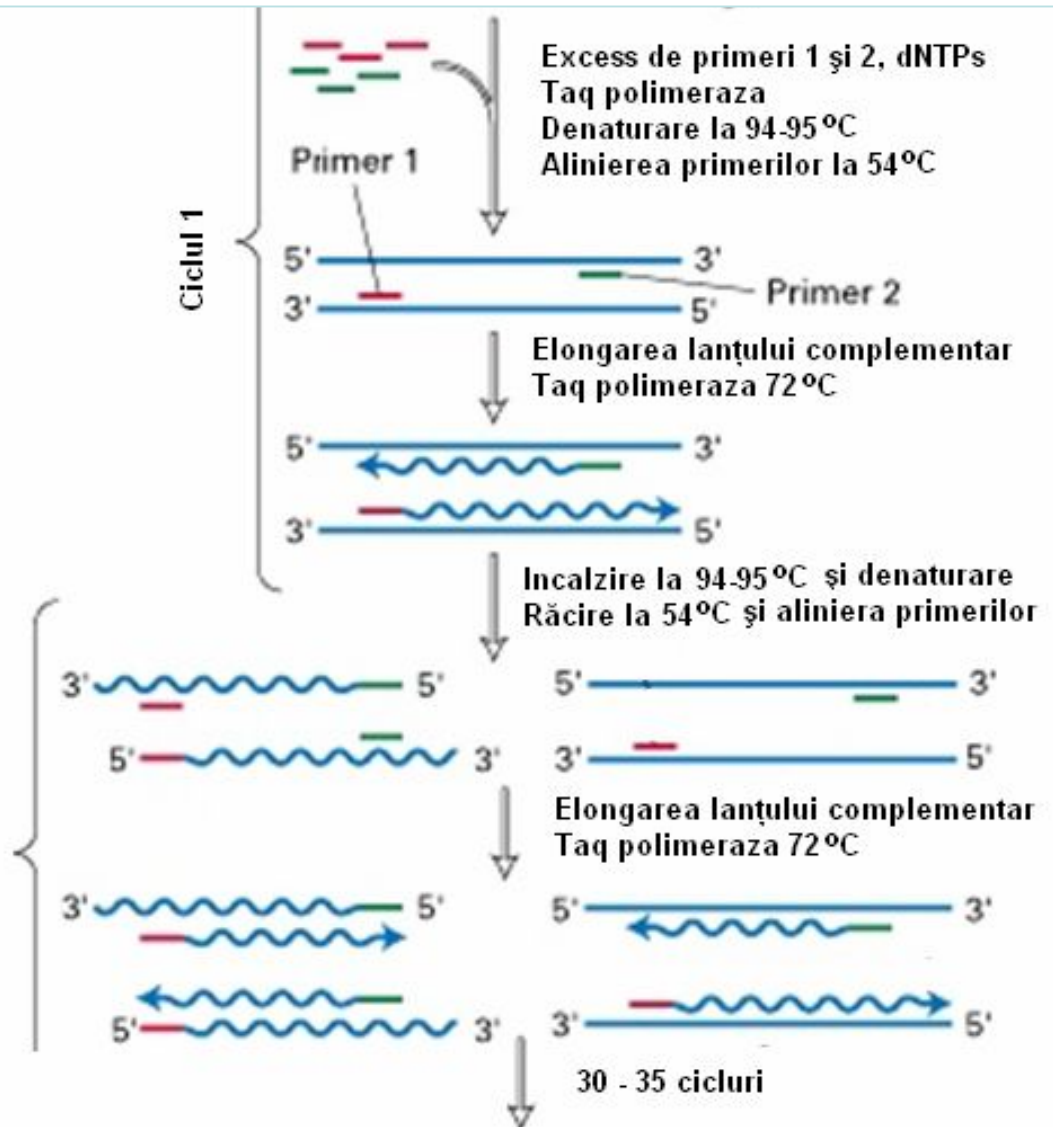
Permite cercetătorilor să "țintească" gene sau secvențe ADN specifice din structura unui genom complex.

ETAPELE PCR

- 1. Denaturarea termică a macromoleculi dublu-catenare ADN matriță:** temperatura amestecului de reacție, care conține ADN matriță, este ridicată până la 95°C, ducând la ruperea punților de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate între cele două catene iar în soluție vom regăsi ADN monocatenar.
- 2. Hibridizarea (anelarea) primerilor pe bază de complementaritate la matrița ADN:** hibridizarea primerilor se efectuează prin scăderea temperaturii amestecului de reacție până la o valoare care permite refacerea punților de hidrogen dintre aceștia și catena ADN matriță în regiunea complementară

3. Polimerizarea sau sinteza unei noi catene având drept matriță catena veche ADN: are loc sinteza unei noi catene de ADN complementară cu secvența ADN matriță pornind de la primeri cu ajutorul unei ADN polimeraze în prezența deoxinucleotidelor trifosfat. La finele acestei etape, în amestecul de reacție, moleculele de ADN sunt dublucatenare.

Dublarea cantității de ADN țintă se poate realiza prin reluarea celor trei pași, iar acest fapt reprezintă intrarea într-un nou ciclu de amplificare. Fiecare catenă nou sintetizată devine matriță pentru un nou ciclu de amplificare, astfel încât secvența țintă de ADN este selectiv amplificată după fiecare ciclu de reacție.

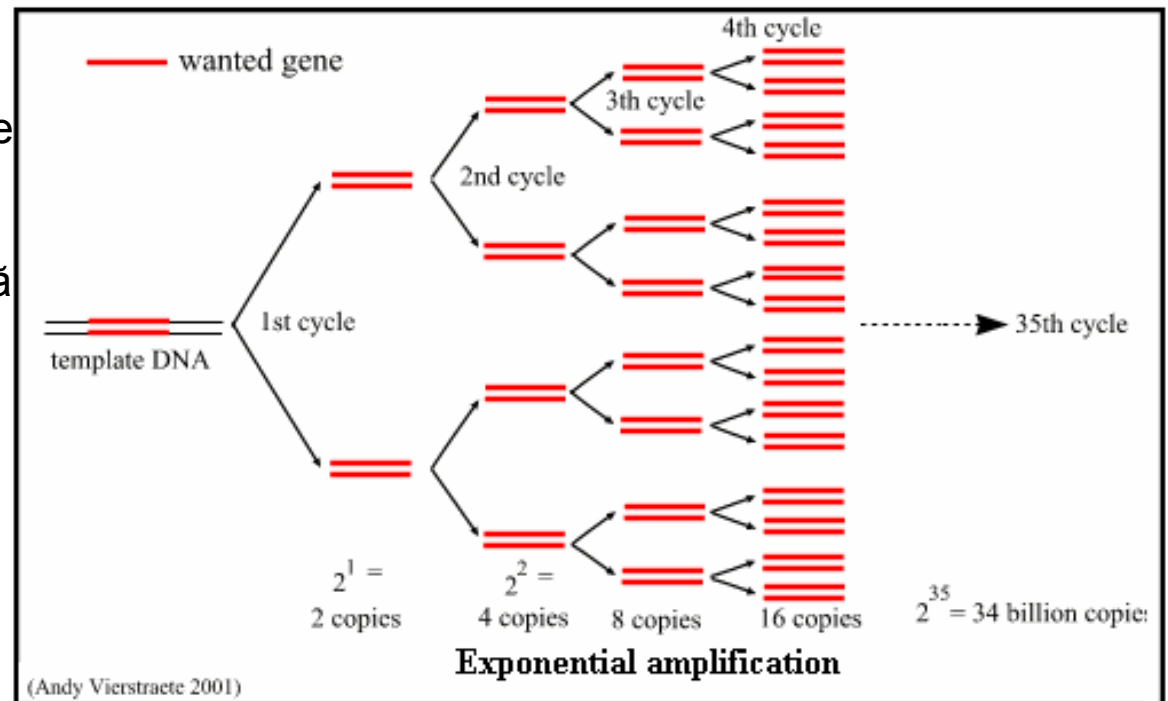


- Primii produși rezultați prin copierea catenelor originale au o lungime diferită față de secvența țintită (ciclul 1 și 2). În al treilea ciclu de amplificare fragmentele obținute au o lungime definită, corespunzătoare distanței dintre primeri.
- Numărul de copii al secvenței țintă crește exponențial începând cu ciclul 4. În final în amestecul de reacție se obțin $(2^n - Z) * Y$ copii ale secvenței de interes (n-nr de cicluri de amplificare, Z-nr produși cu lungime nedefinită și Y-nr de copii al secvenței originale).
- După un număr finit de cicluri de amplificare (35-40) reacția PCR intră într-o fază de platou deoarece:

-cantitatea de polimerază activă se diminuează datorită denaturării termice și valoarea activității enzimatică totale scade.

- are loc rehibridarea catenelor matriță cu o viteză mai mare atunci când concentrația ampliconilor depășește o anumită valoare ce va duce la scăderea eficienței de hibridizare a primerilor.

- are loc scădere concentrației de dNTP și a eficienței tamponului de reacție.





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Componentele reacției PCR

Rezultatul reacției PCR este dependent de determinarea experimentală a concentrației optime a componentelor amestecului de reacție.

- 1. Matrița ADN poate fi:** ADN genomic, mitocondrial, viral, ADNc (caz particular ARN total – RT-PCR).
- 2. Tamponul de reacție:** furnizează pH optim al polimerazei utilizate și concentrația optimă a ionilor Mg^{2+} , acivatorii ADN polimerazei (cantitățile insuficiente de Mg^{2+} duc la amplificări slabe, iar cantitățile crescute conduc la cumulara de produși de amplificare nespecifici). Cel mai comun tampon (pH 8,3) folosit conține: Tris-HCl KCl și gelatină.
- 3. dNTP:** sunt livrate fie sub forma a patru soluții stoc individuale, fie sub forma unui amestec al celor patru nucleotide. Soluțiile sunt ajustate la o valoare optimă de pH. Concentrația optimă de dNTP depinde de: concentrația de $MgCl_2$, conc. primerilor, lungimea fragmentului ce urmează să fie amplificat și numărul de cicluri de reacție.
- 4. ADN polimeraza:** inițial s-a folosit fragmentul Klenow al ADN polimerazei din *E. Coli*. Ulterior au fost descoperite și utilizate ADN polimeraze termostabile ca:
 - *Taq/Amplitaq ADN polimeraza* – izolată din *Thermus aquaticus*. Viteza optimă de polimerizare este de 35-100 nucleotide/s la 70-80°C. Enzimele au o activitate 5'-3' exonucleazică care permite înlăturarea nucleotidelor situate în fața lanțului de creștere.
 - *AmpliTaq* polimeraza are aceleași proprietăți cu *Taq* polimeraza dar este produsă în *E. Coli* prin recombinare genetică. Reproducibilitatea și puritatea acesteia este mult mai mare decât a *Taq* polimerazei simple.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

5. Apa ultrapură: se utilizează exclusiv apă ultrapurificată, nucleuse-free, livrată de firme specializate.

6. Primerii: în desemnarea primerilor trebuie respectate câteva reguli generale:

- lungimea primerilor trebuie să fie cuprinsă între 20 și 35 de nucleotide, acest lucru permițând selectarea unei temperaturi de hibridizare ridicată.
- primerii trebuie să conțină un număr aproximativ egal din cele patru baze azotate, evitându-se pe cât posibil regiunile cu repetiții de nucleotide (evitare structuri hairpin).
- perechile de primeri trebuie alese astfel încât să nu prezinte complementaritate la nivel intra- și interindividual (evitarea dimerilor de primeri).
- distanța dintre doi primeri la nivelul matriței trebuie să fie mai mică de 5-10 kpb, dar s-a observat o eficiență foarte scăzută a reacției în cazul în care lungimea produsului de amplificare depășește 3 kpb.
- determinarea cu exactitate a temperaturii optime de hibridizare (anelare) prin realizarea unei reacții PCR în gradient de temperatură.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Parametrii de timp și de temperatură ai reacției PCR

La ora actuală se folosesc aparate de PCR total automatizate, în care etapele de temperatură se parcurg automat.

- În prima etapă are loc denaturarea matriței ADaN prin ridicarea rapidă a temperaturii la 95°C pentru o perioadă de timp suficientă pentru separarea totală a dublei catene (5-10 min în etapa inițială de denaturare și 30-60s la începutul fiecărui ciclu).
- În cea de-a doua etapă are loc hibridizarea primerilor iar temperatura scade rapid de la 95°C la o valoare determinată practic, prin PCR în gradient de temperatură. În general temperaturile de hibridizare variază între 50 și 64°C timp de 30-60s. O temperatură de anelare scăzută conduce la hibridizări nespecifice și la obținerea unor produși nespecfici de amplificare iar o temperatură crescută poate anula procesul. Temperatura depinde exclusiv de secvența și de lungimea primerilor.
- Etapa a treia, de extensie, se realizează la 70-72°C, care reprezintă temperatura optimă de activitate a ADN polimerazelor termostabile. Timpul lăsat pentru această etapă variază în funcție de lungimea fragmentului care trebuie amplificat (30-60s). În practică este prezentă și o etapă finală de elongare la 72°C, în care are loc extensia totală a tuturor ampliconilor acumulați (5-10 min).



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

APLICAȚII ALE TEHNICII PCR

- Detectarea infecțiilor parazitare, bacteriene și virale
- bază pentru tehnica PCR-RFLP prin care se detectează mutații punctiforme și SNPs
- bază pentru tehnica de secvențiere prin care se pot detecta mutații punctiforme și SNPs
- bază pentru genotipare sau analiza fragmentelor marcate fluorescent prin care se realizează teste de paternitate și detectarea delețiilor și inserțiilor



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

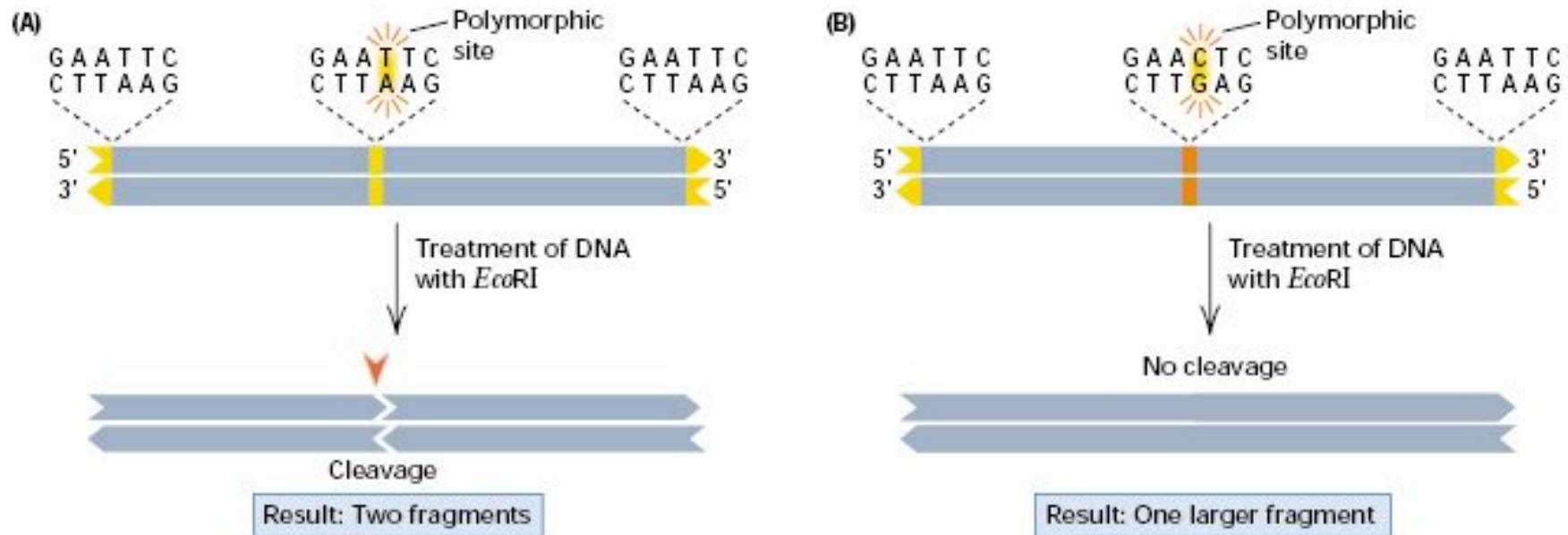


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

TEHNICA POLIMORFISMULUI FRAGMENTELOR DE RESTRICȚIE

(RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism)

- Principiul se bazează pe compararea profilurilor de restricție rezultate în urma digestiei unor produși PCR obținuți prin amplificarea unei secvențe țintă din ADN a unor indivizi diferiți de la nivelul aceluiaș locus cu aceeași pereche de primeri cu anumite enzime de restricție.
- Posibilele mutații care apar la nivelul secvenței ADN datorate delețiilor sau inserțiilor, substituțiilor sau rearanjamentelor situate exact la nivelul secvențelor palindromice care sunt recunoscute drept situsuri de restricție pot determina pierderea, apariția sau relocalizarea acestorași ca atare vor furniza fragmente de restricție de dimensiuni diferite.
- Inițial, pentru o anumită zonă din ADN, se identifică posibilele situsuri de restricție. Ulterior se verifică dacă mutațiile pe care dorim să le identificăm afectează un astfel de situs. Apoi se va trece la realizarea reacției PCR prin care se va amplifica fragmentul de interes cu primeri specifici desemnați. În final, ampliconul rezultat în reacția PCR va fi supus acțiunii enzimelor de restricție, iar fragmentele rezultate vor fi analizate prin electroforeză.
- **RFLP este o metodă relativ ieftină și se realizează într-un timp relativ scurt când reacțiile sunt optimizate.**



RFLP este folosită atât pentru identificarea de mutații responsabile de anumite maladii, cât și pentru a pune în evidență diferențele care pot apărea între indivizii aceleiași familii, rase, specie, putând fi utilizată în diferențierea unor alele responsabile de caracterele morfo-productive ale raselor de animale domestice fiind utile în selecționarea indivizilor valoroși asistată de markeri moleculari cât și în criminalistică.

Mutațiile identificate prin RFLP trebuie confirmate prin secvențiere



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

TEHNICA DE SECVENȚIERE A ADN





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

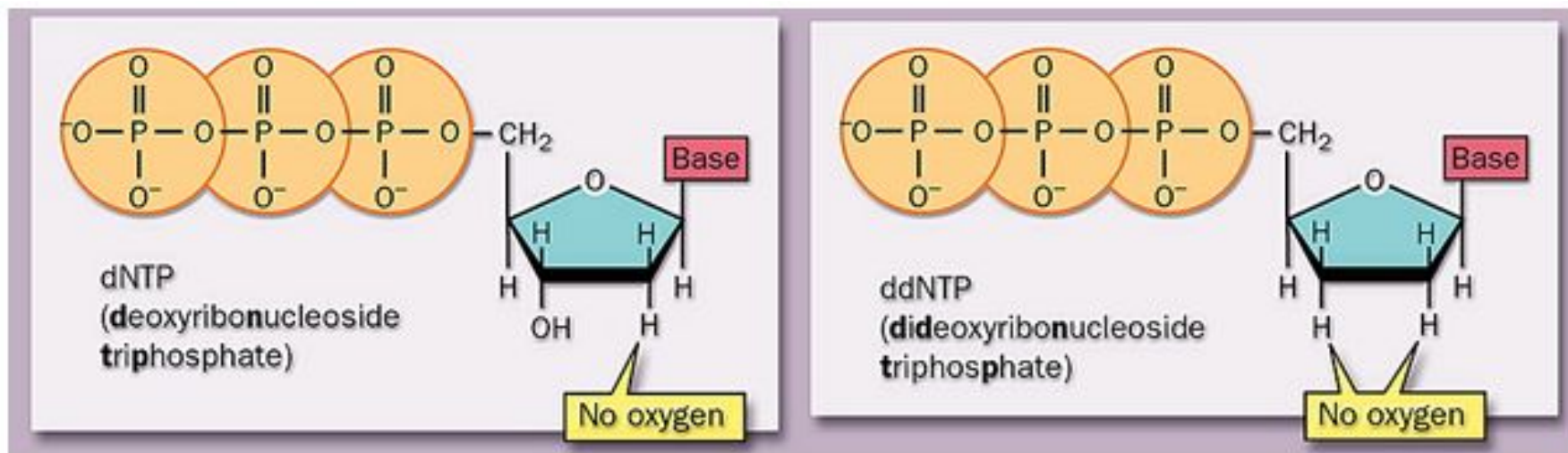


ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- Secvențierea este folosită pentru determinarea ordinii nucleotidelor într-o moleculă de ADN.
- Tehnica de secvențiere folosită pe scară largă la ora actuală are la bază metoda originală dezvoltată de Sanger și colaboratorii sai (1977) numită Dye-Terminator care utilizează 2',3'-dideoxinucleotide ddNTP marcate fluorescent și dNTP corespunzătoare celor patru baze azotate într-un raport bine stabilit.
- Metoda dideoxy sau enzimatică, utilizează ADN polimeraza și un primer sens sau antisens pentru a sintetiza o copie complementară monocatenară a unei catene din matrița de ADN, în prezența unui amestec de nucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) și dideoxinucleotide marcate fluorescent (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) cu rolul de a stopa reacția. În momentul încorporării unei dideoxi-nucleotide în catena ADN nou sintetizată polimeraza este nevoită să-și stopeze activitatea și deci elongarea lanțului ADN. În final se obține un amestec de fragmente de dimensiuni diferite care prezintă la capătul 5` primerul și la capătul 3` o molecula ddNTP.





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

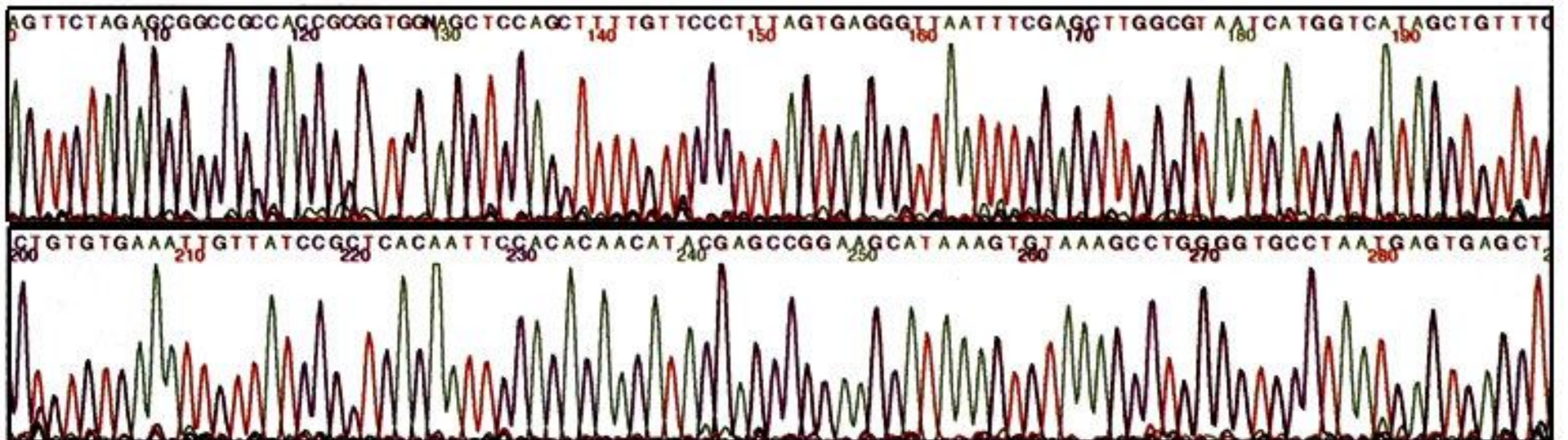
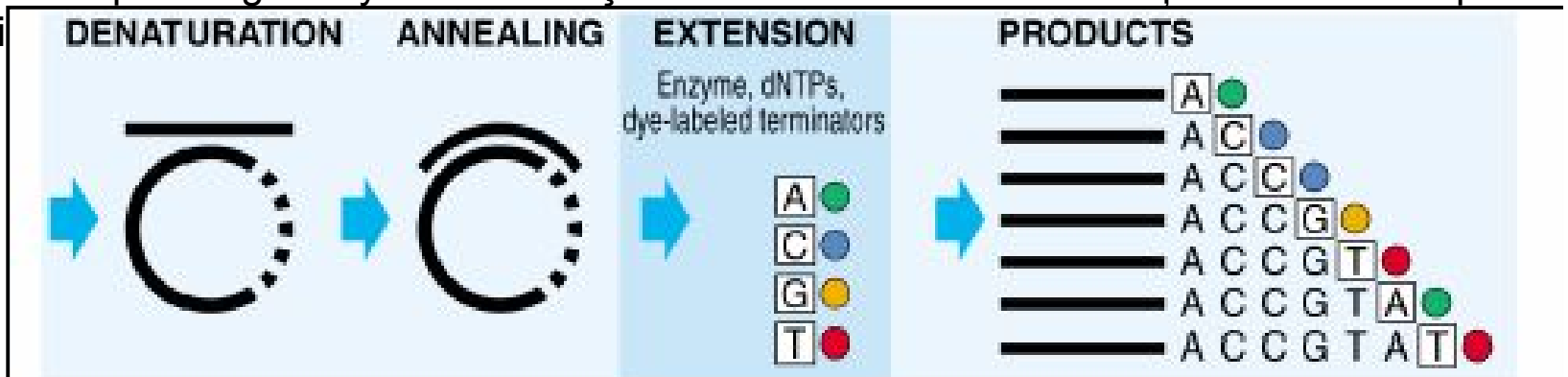


ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

• Producții de elongare monocatenari obținuți au diferite dimensiuni și sunt marcați fluorescent cu un anumit fluorocrom la capătul 3' în funcție de dideoxinucleotida cu care se termină. Astfel producții fluorescenți pot fi separați în funcție de numărul de perechi de baze prin electroforeză capilară automatizată, și detectați prin achiziția semnalului fluorescent de emisie (Analizor genetic automat, ABI Prism 310, ABI Prism 3130). Ulterior datele sunt prelucrate automat cu ajutorul programului „ABI Prism DNA Sequencing Analysis V 3.4.1” și astfel se reconstituie secvența care a fost supusă secvențializării





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Etapele tehnicii de secvențiere prin metoda dye-terminator

1. Extracția ADN din proba biologică
 - 1.1. determinarea purității (A260nm/A280nm)
 - 1.2. determinarea concentrației ADN (1 A260nm=50μADNdc/ml)
2. Amplificarea secvenței ADN țintă folosind primeri specifici nemarcați fluorescent prin reacție PCR clasic. Fragmentul amplificat trebuie să aibă maxim 1500 pb și pentru o amplificare corectă trebuie optimizată temperatura de anelare (Ta)
 - 2.1. evidențierea și determinarea numărului de pb a produsului PCR obținut prin electroforeză în gel de agaroză
 - 2.2. purificarea ampliconilor (depinde de calitatea produsului PCR obținut, adică de optimizarea reacției PCR)
 - 2.2.1. Purificarea din gel de agaroză: - elimină produșii nespecifici de amplificare;
- necesită eliminarea agarozei;
- se obțin cantități foarte mici de ADN;
- lumina UV poate afecta produsul ADN.
 - 2.2.2. Purificarea folosind colonite (gelfiltrare: kit Qiagen; ultrafiltrarea – centricoane Millipore; legarea ADN la substrat – kit Promega).-
 - rapidă și reproductibilă;
 - costisitoare;
 - nu elimină produșii PCR nespecifici mai mari de 100 pb.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

2.2.3. Purificare enzimatică – folosește exonuclează I sau fosfatază alcalină pentru degradarea ADN monocatenar și pentru defosforilarea dNTP.

- rapidă, ușoară, reproductibilă, pretabilă la automatizare.
- nu elimină produșii PCR nespecifici mai mari de 100 pb și dimerii primerilor.

2.2.4. Secvențierea directă (fără purificare).

- necesită o foarte bună optimizare a reacției PCR.

2.3. determinarea concentrației ampliconului purificat

3. Realizarea reacției de amplificare pentru secvențiere (BigDye ® Terminator Kit). În vederea obținerii colecției de fragmente monocatenare marcate fluorescent cu dimensiuni de: 1pb, 2pb....., n pb (unde n este numărul de perechi de baze al fragmentului obținut prin PCR normal) este foarte important raportul dNTP/ddNTP

Componente	Volum (μl)	Cantități
Ready Reaction Premix 2,5X (amestec de nucleotide și dideoxi-nucleotide marcate fluorescent)	8 μl	
Proba ADN purificat	x	1-20 ng (în funcție de mărimea fragmentului)
Tampon BigDye 5x	4 μl	
Primer sens sau antisens	y	3,2 pmol
Apă deionizată	până la un volum final de 20 μl	



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

	Etape	Temperatură	Durață	Număr cicluri
Aparat PCR	Etapa inițială	96°C	1 minute	1
	Denaturare	96 °C	10 secunde	} 25
	Hibridizare	50°C	5 secunde	
	Elongare	60°C	4 minut	
Etapa finală	4°C	∞		

4. Purificarea produșilor PCR monocatenari fluorescenți în vederea îndepărtării sărurilor și a nucleotidelor trifosfat neincorporate (ddNTP fluorescente și dNTP) care interferează cu electroforeza capilară. Purificarea se poate realiza prin precipitarea cu acetat de sodiu/etanol sau cu ajutorul kitului BigDye XTerminator® Purification Kit (Applied Biosystems). Dacă purificarea s-a realizat prin precipitare, acesta trebuie uscat și reluat în aproximativ 15μl formaldehidă. În vederea evitării formării de duplexuri ADN între produșii PCR monocatenari, probele sunt denaturate în prezența formaldehidei prin încălzire 3 minute, la 95°C și răcire bruscă pe gheață 5 minute. În cazul folosirii kitului se trece direct la etapa următoare

5. Analiza produșilor PCR monocatenari fluorescenți prin electroforeză capilară (secvențierea fragmentului ADN de interes)

Produșii purificați prin una dintre metodele prezentate mai sus se introduc în analizatorul genetic automat ABI Prism 3130 unde se realizează o electroforeză capilară. Profilele rezultate în urma citirii cu ajutorul unei surse laser sunt prelucrate cu ajutorul programului Sequencing Analysis 5.1 (*Applied Biosystems*).



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

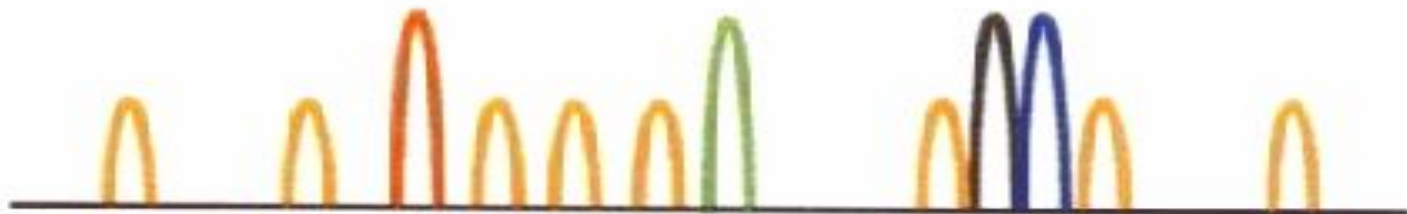


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

ANALIZA DE FRAGMENTE MARCATE FLUORESCENT TEHNICA GENOTIPĂRII



**Determinarea mărimii (pb) a fragmentelor
ADN marcate fluorescent**





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

APLICAȚII ALE TEHNICII DE GENOTIPARE

- identificarea delețiilor și inserțiilor (boli cu determinism genetic)
- ADN forensic (medicină legală) sau amprentare genetică prin efectuarea profilului genetic al unui individ
- teste de paternitate și de filiație
- diagnostic molecular (diagnostic incipient al cancerelor)
- diversitate genetică și filogenie moleculară

Tesele de filiație, amprentarea genetică, studiul diversității genetice ale speciilor și filogenia moleculară s-au putut dezvolta datorită descoperirii unor secvențe ADN din genom înalt repetitive denumite **microsateliți**.

Microsateliți sunt secvențe scurte repetate în tandem de 1– 10 pb care conțin motive mono, di, tri și tetranucleotidice de tipul: (A)_n(T)_n sau (C)_n(G)_n, (CA)_n(GT)_n sau (GA)_n(CT)_n, (CTG)_n și (ACTC)_n.

Principala trăsătură a microsateliților o reprezintă polimorfismul lor crescut care constă nu în secvența bazelor din care sunt compuși ci de câte ori se repetă în tandem la un anumit locus pe cromozom.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

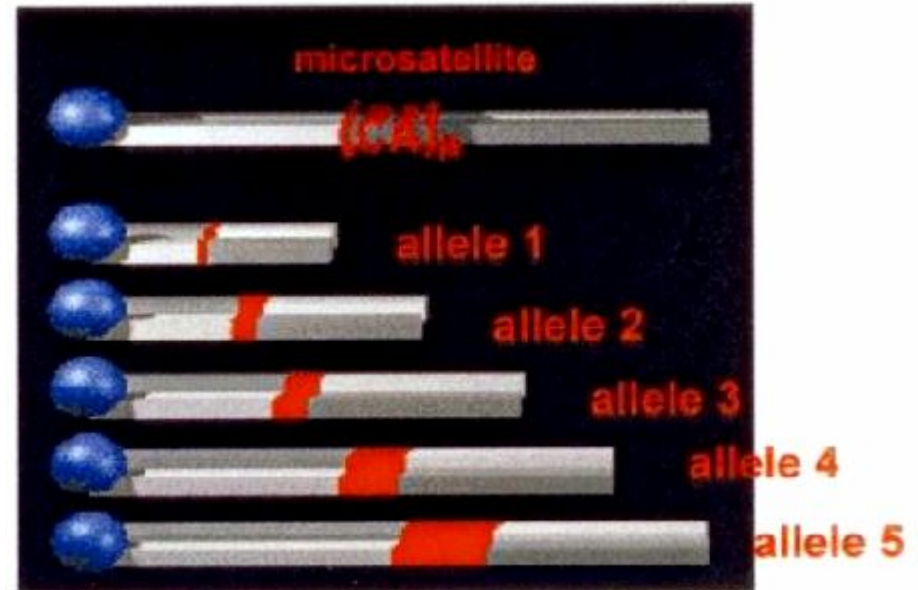
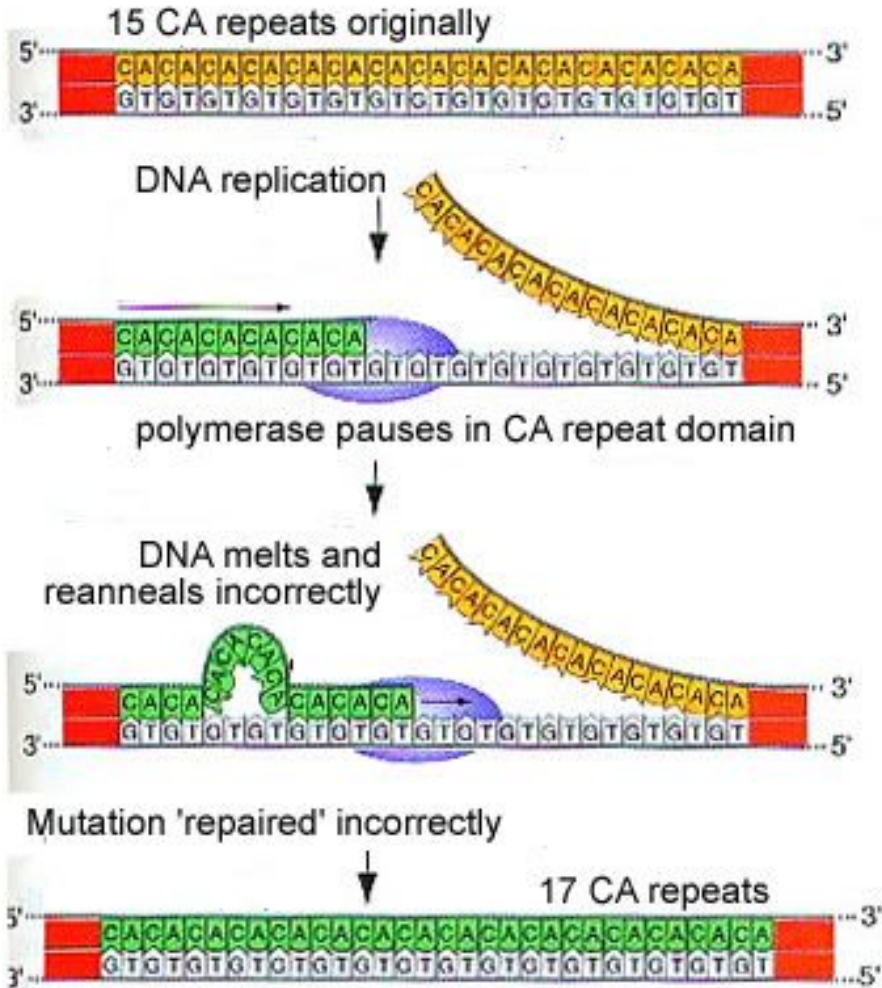


ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Polimorfismul microsateliților și apariția inserțiilor/delețiilor se poate datora unei împerecheri necorespunzătoare între cromozomii omologi urmată de un crossing-over inegal precum și fenomenelor de alunecare (slippage) din timpul replicării.





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Identificarea mutațiilor de tipul inserțiilor și delețiilor

- în vederea determinării unei inserții/deleții la un anumit locus pe cromozom trebuie să se cunoască secvența fragmentului de ADN susceptibil la mutații
- pe baza secvenței fragmentului de interes se desemnează primeri specifici Pentru a putea fi detectat în urma electroforezei capilare cu detecție în fluorescență, unul dintre primeri trebuie să fie marcat fluorescent la un capăt. Astfel, în urma unui PCR clasic se va amplifica fragmentul dorit care va fi fluorescent.
- Pentru a determina nr de pb a fragmentului țintă, o dată cu proba se va migra un standard de pb a cărui colecție de fragmente ADN sunt marcate cu un fluorocrom diferit (LIZ/Rox), permițând estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentului amplificat (sesizează diferențe de 1pb).
- Ampliconii fluorescenți separați prin electroforeză capilară sunt analizați cu ajutorul unui soft care pe baza standardului de pb și a timpilor de migrare derermină nr de pb a acestora.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

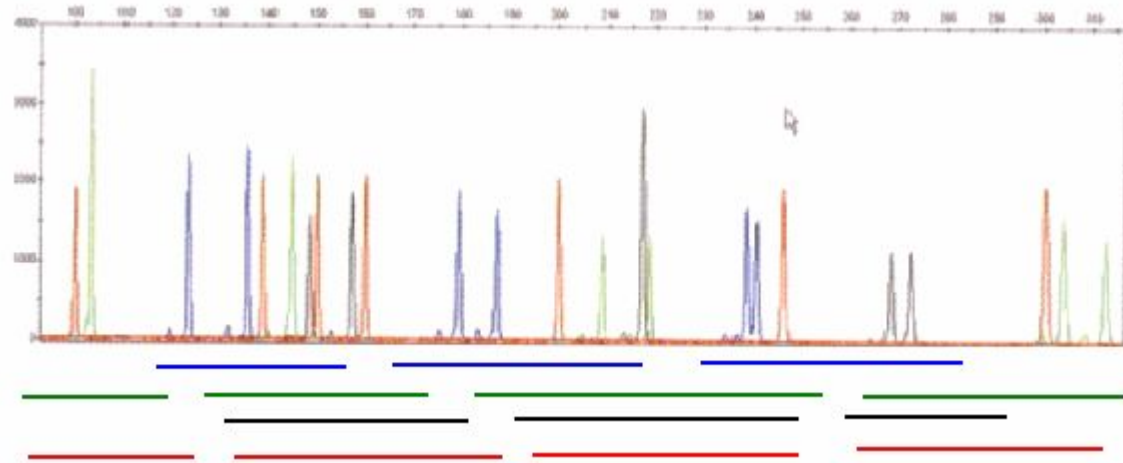


ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Analiza multiplex a microsateliților



- în vederea realizării testului de paternitate/filiație, microsateliții trebuie să fie diferiți și în număr cât mai mare (9-30) să prezinte un grad înalt de polimorfism, să prezinte un nivel mutațional scăzut, să fie ușor de marcat și să poată fi amplificați într-o singură reacție PCR multiplex.
- se desemnează primeri specifici și determină condițiile optime pentru un PCR multiplex, astfel încât microsateliții să poată fi amplificați într-o singură reacție;
- dacă domeniile în care variază dimensiunea (pb) microsateliților nu se suprapun, atunci primerii cu ajutorul cărora sunt amplificați pot fi marcați cu același fluorocrom (doar primerul 5' din cadrul unei perechi de primeri este marcat);
- dacă domeniile în care variază dimensiunea (pb) microsateliților se suprapun, atunci primerii cu ajutorul cărora sunt amplificați vor fi marcați cu fluorocromi diferiți;



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

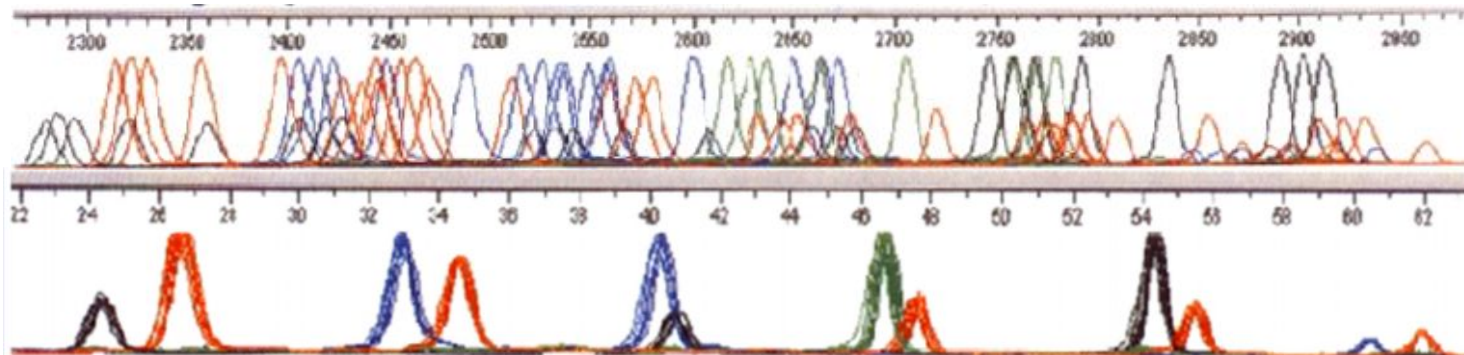


ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- după realizarea reacției PCR multiplex utilizând ADN genomic, fragmentele obținute marcate fluorescent sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență (principala problemă pe care o pune această tehnică este selectarea mai multor perechi de primeri care să aibă aproximativ aceeași temperatură de hibridizare, care să nu formeze dimeri sau structuri secundare și care să asigure amplificări eficiente).
- estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentelor fluorescente amplificate se realizează prin migrarea concomitentă a probelor cu standard de pb marcat la rândul său cu un fluorocrom diferit față de cei utilizați la marcarea microsateleților.
- marcarea microsateleților și a standardului de masă moleculară cu coloranți fluorescenți diferiți permite practic vizualizarea acestora în cadrul aceleiași migrări.
- rezultatele sunt prelucrate cu ajutorul unor programe ca GeneScan Analysis și Genotyper (*Applied Biosystems*) când sunt alinate fragmentele în funcție de mărimea lor (pb) prin comparare cu standardul de pb făcându-se o corespondență cu timpul de migrare.





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- polimorfismul microsateleților reflectă moștenirea genetică și permite detectarea diferențelor între indivizi.
- numărul de alele prezente pe un anumit locus depinde de homo- sau heterozigoția individului la nivelul locilor analizați. Astfel, la indivizii homozigoți care prezintă o singură alelă pe un anumit locus pe electroforegramă o să apară un singur semnal. Indivizii heterozigoți prezintă două alele diferite pe un anumit locus, deci pe electroforegramă vor apărea două semnale. Â
- pentru a realiza interpretarea corectă a testelor de filiație se desemnează inițial alelele produșilor. Acestea trebuie să fie moștenite, câte una de la fiecare genitor în parte. Dacă nu există nici o nepotrivire la nivelul tuturor locilor analizați putem afirma că produsul aparține cu o probabilitate de peste 99,999% aceluia cuplu de genitori. În practică se întâlnesc și cazuri de excludere, în care produsul nu aparține unuia sau ambilor părinți. În astfel de cazuri el nu va avea alelele comune cu genitorii. Pentru a avea un caz de excludere, la analiza alelelor, trebuie să întâlnim cel puțin două nepotriviri între genitori și produs. Dacă există o singură excludere nu putem afirma cu siguranță că produsul nu aparține aceluia cuplu pentru că aceasta poate fi rezultatul unei mutații.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Tipuri de fluorocromi utilizați

Dye	Max A (nm)	Max E (nm)	Rel. Intensity
5-FAM™	494	530	100
6-FAM™	494	522	100
JOE™	528	554	100
VIC®	538	554	100
HEX™	535	553	50
NED™	546	575	40
TAMRA/TAMRA™	560	582	25
PET®	558	595	25
ROX™	587	607	12
LIZ®	638	655	50



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Etapele tehnicii de genotipare

1. Extracția și purificarea ADN genomic

- probe de sânge, țesut sau material seminal;
- se pot folosi kituri sau metoda clasică de extracție;
- concentrația și puritatea ADN este verificată spectrofotometric
- integritatea ADN se stabilește electroforetic.

2. Amplificarea fragmentelor ADN - PCR multiplex

- cantitatea ADN necesară reacției de amplificare, cât și protocolul PCR variază în funcție de tipul aplicației și sunt stabilite prin PCR în gradient de temperatură
- se folosesc primeri sens marcați fluorescent.

3. Denaturare probelor și analiza ampliconilor prin electroforeză capilară cu ajutorul analizorului genetic automat

- ampliconii marcați fluorescent sunt amestecați cu standardul de pb marcat la rândul său cu un fluorocrom și cu formamidă deionizată;
- amestecul este supus unei denaturări termice la 95°C, 2 minute fiind apoi răcit brusc pe gheață;
- probele se încarcă în analizatorul genetic.

4. Prelucrarea datelor



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

DETERMINISMUL GENETIC AL UNOR MALADII LA BOVINE

- Cele mai cunoscute maladii la bovine cu determinism genetic sunt:
 - BLAD (deficiența de adeziune leucocitară la bovine)
 - DUMPS (deficiența în uridin monofosfat sintaza)
 - citrulinemia bovină
 - CVM (malformația vertebrală complexă)
- Datorită implicării animalelor de prăsilă în tot mai multe programe de inseminare artificială, riscul răspândirii maladiilor ereditare recesive este foarte mare.
- Utilizarea de noi tehnici moleculare facilitează noi și rapide progresii în biotehnologia animală.
- Maladiile genetice pot determina anomalii atât fizice cât și fiziologice, cu un impact negativ asupra vitalității. În cazul animalelor, un important efect al unei maladii este scăderea sau pierderea unei calități.
- Maladiile genetice care afectează animalele reprezintă principala problemă a crescătorilor de animale, iar incidența acestora este monitorizată de mulți ani. În SUA Asociația Holstein a inițiat în 1957 un program de identificare a purtătorilor și, de atunci, s-a înregistrat fiecare animal, permițându-se astfel identificarea fiecărui animal purtător al unei anomalii fiziologice, al unui defect biochimic sau a unei deficiențe enzimatică. Până în acest moment există înregistrări pentru acondroplazie, sindactilism, deficiența de adeziune leucocitară bovină, citrulinemia bovină, malformația vertebrală complexă, gestație prelungită, deficiență în uridin monofosfat sintază și porfirie congenitală.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- În majoritatea cazurilor, cauza maladiilor genetice în cazul animalelor este reprezentată de mutații la nivelul unor gene autozomale
- Manifestarea unei mutații recesive implică prezența a două gene recesive mutante în genotipul animalului afectat. Răspândirea acestor maladii poate fi atent monitorizată prin limitarea împerecherilor naturale și mărirea numărului de masculi de elită utilizați în programe de inseminare artificială.

MALADIA BLAD (deficiența de adeziune leucocitară)

- taurul responsabil de răspândirea acestei maladii la rasa Holstein a fost Carlin-M Ivanhoe Bell. Acesta a avut peste 79 000 de fiice, înregistrate oficial în sistemul USDA și peste 1200 de fii cu fiicele sale. Același taur Bell a fost purtător și al CVM (malformația vertebrală complexă).
- gena mutantă a fost moștenită de Bell de la bunic, Osborndale Ivanhoe, prin tatăl său Pennstate Ivanhoe Star. S-a determinat că și Pennstate Ivanhoe Star era heterozigot pentru CVM, maladie moștenită probabil de la mamă. Astfel, jumătate dintre urmașii lui Bell erau heterozigoți pentru BLAD și jumătate dintre ei pentru CVM. Aceste maladii au fost evidențiate când urmașii masculi ai lui Bell au fost împerecheați cu urmașe femele, tot ale lui Bell.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- BLAD este o boală autozomală recesivă congenitală
- e caracterizată prin - infecții recurente bacteriene (pneumonii)
 - întârzierea vindecării
 - creștere neregulată
 - asociată cu neutrofie
 - ulcere severe la nivelul mucoaselor
 - paradontoză și pierderea dinților
 - diaree recurentă sau cronică
 - mor la vârste tinere datorită complicațiilor.
- Baza moleculară a BLAD o reprezintă o mutație punctiformă o tranziție când $A \rightarrow G$ în poziția 383 al genei CD18
- mutația determină substituția acidului aspartic cu glicina în poziția 128 a proteinei de adeziune CD18 care face parte din familia integrinelor $\beta 2$.
- pentru expresia corectă a integrinelor $\beta 2$ este nevoie de asocierea intracelulară a subunităților CD11 și CD18, defecte la nivelul CD18 împiedică expresia tuturor integrinelor $\beta 2$ care sunt molecule de adeziune ce mediază interacțiile celulă – matrix extracelular și celulă – celulă.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

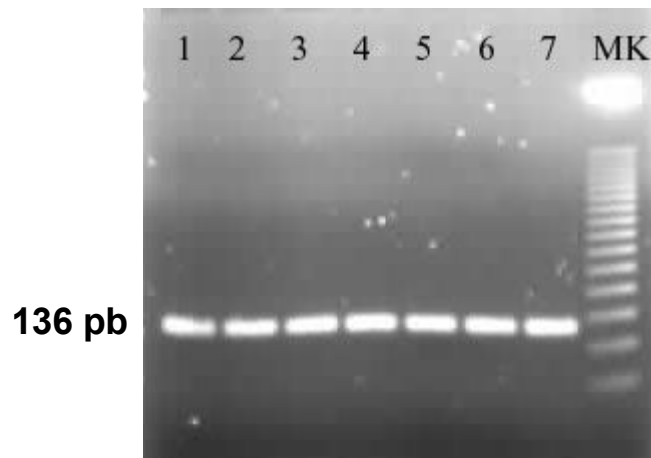


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

• la vacile afectate de BLAD s-a evidențiat un nivel scăzut al expresiei integrinelor în cazul neutrofilelor izolate care conduce la scăderea abilității neutrofilelor de a agrega ca răspuns la stimuli chemotactici și scăderea abilității lor de a migra de-a lungul endoteliului celular. Astfel deficiența de adeziune leucocitară duce la scăderea imunității de la nivelul mucoasei, iar bovinele afectate de BLAD manifestă severe și dese infecții ale mucoaselor: pneumonii, gingivită ulcerative, papilomatozis, dermatosis, pierderea dinților.

Diagnosticarea BLAD pe baza analizei alelelor locusului

- Identificarea specimenelor normale și purtătoare s-a utilizat tehnica RCR-RFLP.
- inițial s-a realizat amplificarea PCR a ADN genomic cu primeri specifici desemnați pentru amplificarea regiunii de 136 pb care conține situsul pentru enzima de restricție *Taq I* și care conține și mutația punctiformă răspunzătoare de BLAD.



Godeurile 1 – 7 - ampliconi netăiați cu enzima de restricție *Taq I*; MK – markerul de masă moleculară 50 bp.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

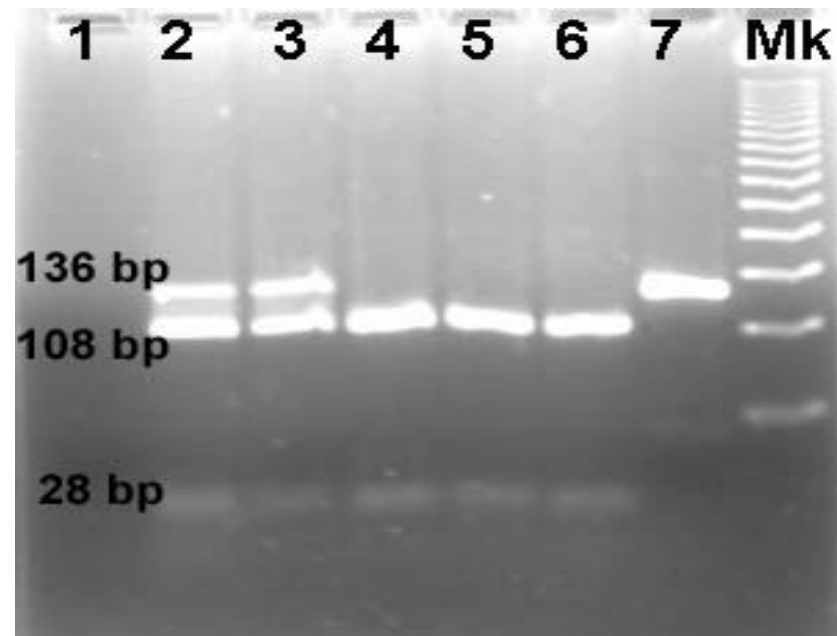


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

• Pentru diagnosticarea deficienței de adeziune leucocitară bovină produsul PCR este supus digestiei cu enzima de restricție *Taq I*. Diferențe între bovinele afectate și cele sănătoase sunt evidențiate astfel:

- genotipul homozigot normal prezintă două benzi de 108 și 28 pb
- genotipul heterozigot purtător are trei benzi de 108, 28 și 136 pb
- genotipul homozigot recesiv o singură bandă de 136 pb.

Situs de restricție enzima *Taq I*





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



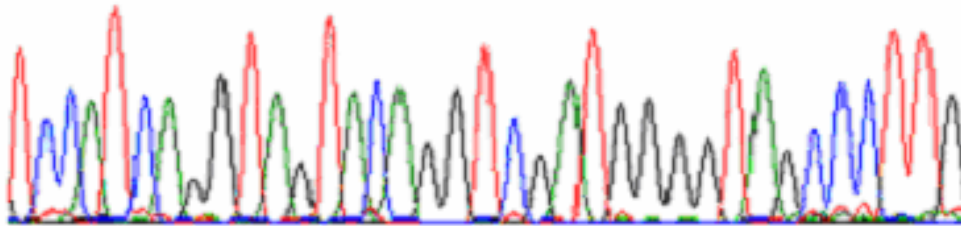
ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- Animale homozigote normale (AA) și heterozigote (AG) pentru BLAD (purtători) s-au secvențiat produșii PCR pentru confirmarea diagnosticului.

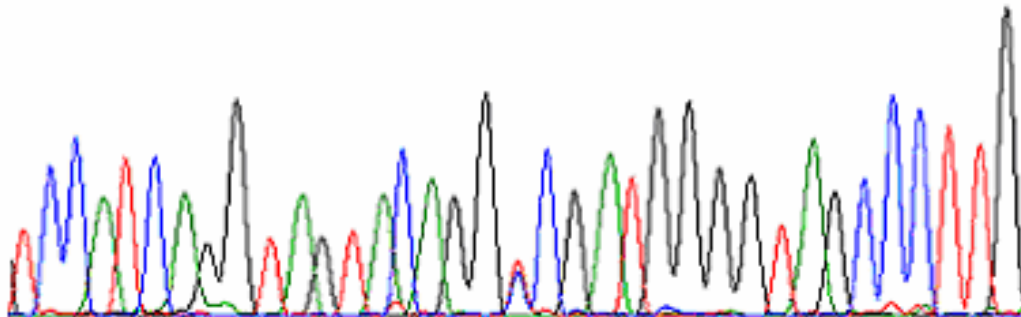
3' T C C A G C T 5'
5' T C C A T C A G G T A G T A C **A G G T C** G A T G G G G T A G C C C T T G 3'



5'... TCGA... 3'
3'... AGCT... 5'

Catena antisens 3' – 5' animale homozigote AA/TT

3' T C C N G C T 5'
5' T C C A T C A G G T A G T A C **A G G N C** G A T G G G G T A G C C C T T G 3'



Catena antisens 3' – 5' animale heterozigote AG/TC



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

DEFICIENȚA ÎN URIDIN MONOFOSFAT SINTAZA (DUMPS)

- Deficiența în uridin monofosfat sintaza este o maladie autozomală recesivă care este letală în stadiu embrionar, în a 40 a zi după concepție, în cazul homozigoților recesivi, pe când în cazul heterozigoților maladia nu se manifestă.
- Mortalitatea se datorează insuficienței activității a UMPsintazei, enzimă care catalizează conversia acidului orotic în UMP. UMP este precursorul tuturor pirimidin nucleotidelor, molecule care intră în constituția ADN și ARN; fiind astfel indispensabile creșterii și dezvoltării normale, precum și un constituent normal în laptele de vacă și în laptele altor rumegătoare.
- DUMPS a fost observată în cazul vitelor de lapte în special a celor din rasa Holstein-Friesian din Statele Unite. S-a constatat faptul că anumite exemplare din ferma Universității Illinois produceau lapte ce conținea de 5 până la 10 ori mai mult acid orotic decât normal. Aceste concentrații ale acidului orotic în lapte s-au evidențiat în toate stadiile lactației și persistau de la o lactație la următoarea, afectând calitatea laptelui. Nivelul acidului orotic era ridicat atât în urina cât și în sângele acestor animale în perioada lactației. Câțiva autori au înaintat ipoteza conform căreia dacă activitatea enzimei UMP sintaza este deficientă, are loc acumularea de acid orotic.
- Baza moleculară a acestei maladii s-a evidențiat în 1993 ca fiind o mutație în gena UMPsintazei.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



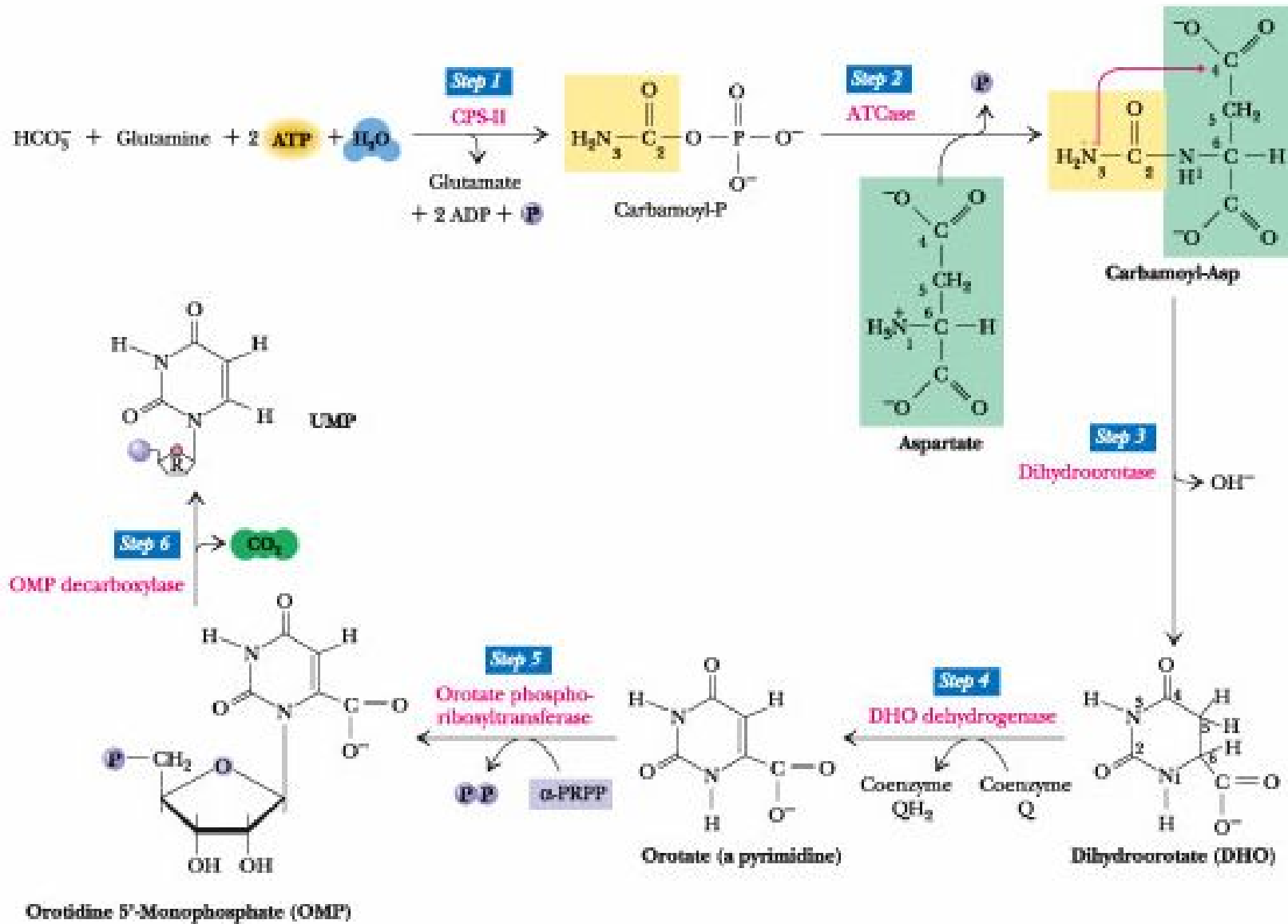
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013

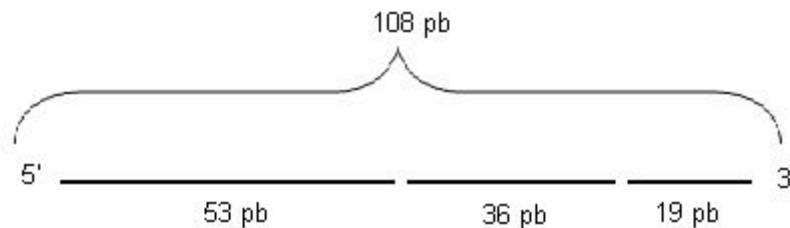


ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- Prin cartarea genomului bovin s-a evidențiat că gena UMP sintaza se află pe cromozomul1 (q31-36). DUMPS este cauzată de o mutație punctiformă, de o tranziție C→T la nivelul codonului 405, în exonul 5 (Viana *et al.* 1998).
- maladia se poate diagnostica cu ajutorul tehnicii PCR-RFLP.
- prin PCR se va amplifica un fragment de 108 pb din ADN, ce poate conține mutația. Produsul obținut va fi digerat cu enzima de restricție *Ava I* care are două situsuri de restricție în fragmentul de 108 pb pentru indivizii normali.În cazul mutației dispăre un situs de restricție.
- în cazul indivizilor homozigoți normali se vor obține în urma digestiei trei benzi de 53, 36 și 19 pb.
- pentru heterozigoți se vor obține patru benzi de 89, 53, 36 și 19 pb
- În cazul iar homozigoților recesivi se vor obține două benzi de 89 și 19 pb.



5'...CYCGRG...3'
3'...GRGCYC...5'

Ava I



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



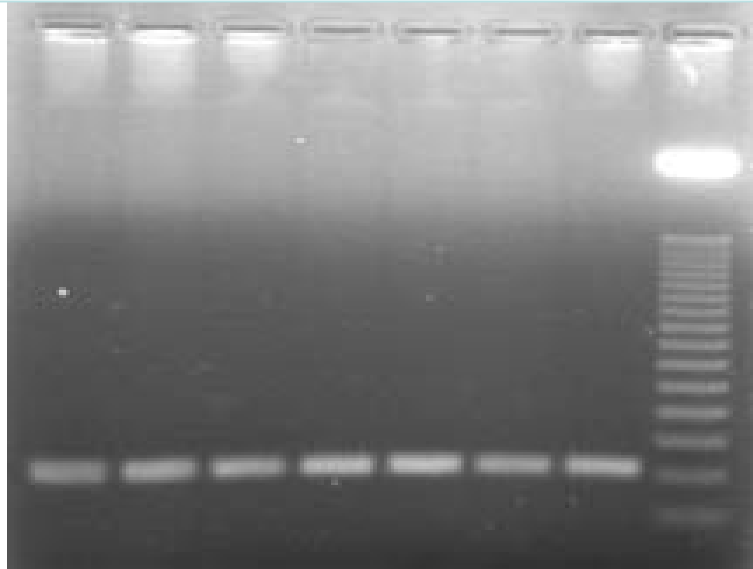
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

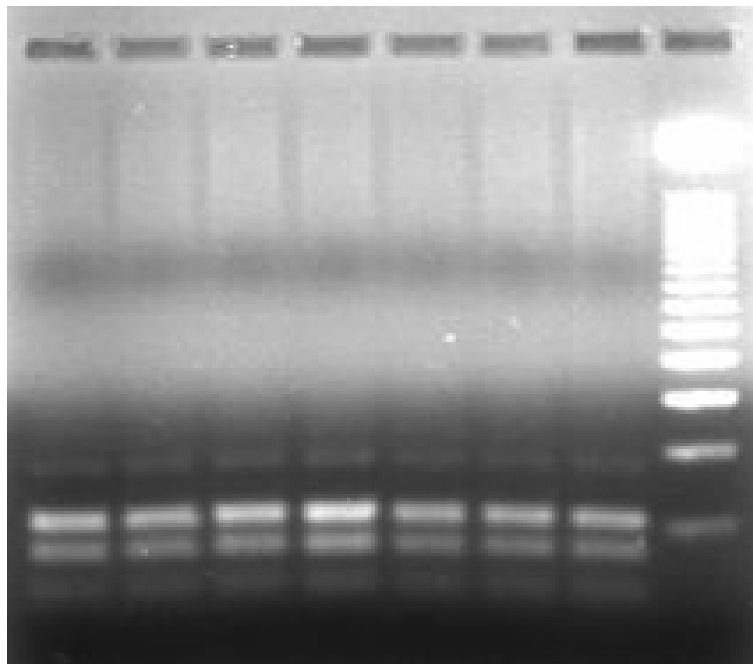


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA



108 pb

Godeurile 1-7, amplificarea fragmentelor pentru locusul DUMPS. Godeul 8, markerul de masă moleculară (50 pb DNA Step Ladder).



53 pb

36 pb

19 pb

Godeurile 1-7, trei fragmente de 53, 36 și 19 pb pentru DUMPS indică alelele normale ale indivizilor homozigoți. Godeurile 8, markerul de masă moleculară (50 pb DNA Step Ladder).



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

CITRULINEMIA BOVINĂ

- Citrulinemia bovină a fost răspândită de la populația Holstein Australian, prin taurul Linmack Kriss King, al cărui tată a fost Gray View Crisscross, acesta fiind cunoscut ca purtător al acestei maladii.
- Citrulinemia este o maladie autozomală, genetică întâlnită la rasa Holstein; maladia fiind prima dată descrisă la populația Holstein Australian. Această maladie genetică împiedică sinteza enzimei arginosuccinat sintaza (ASS), enzimă ce catalizează conversia citrulinei și aspartatului în arginosuccinat. Astfel, citrulinemia este o maladie care afectează metabolismul ureei ducând la creșterea nivelului de citrulină, și al celui de amoniac din plasmă, ca urmare a activității deficitare a ASS din ciclul ureei. Bovinele afectate (homozigote) nu pot excreta amoniacul și prezintă numeroase simptome neurologice, care devin din ce în ce mai accentuate, ducând la deces după o săptămână de la naștere.
- Citrulinemia bovină este datorată de o tranziție a citozinei în timidină la nivelul codonului 86, în exonul 5 al genei care codifică ASS (Padeeri *et al.* 1999).
- Maladia a fost prima dată evidențiată la om, apoi la câini, iar mai târziu la vacile Holstein-Friesian.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



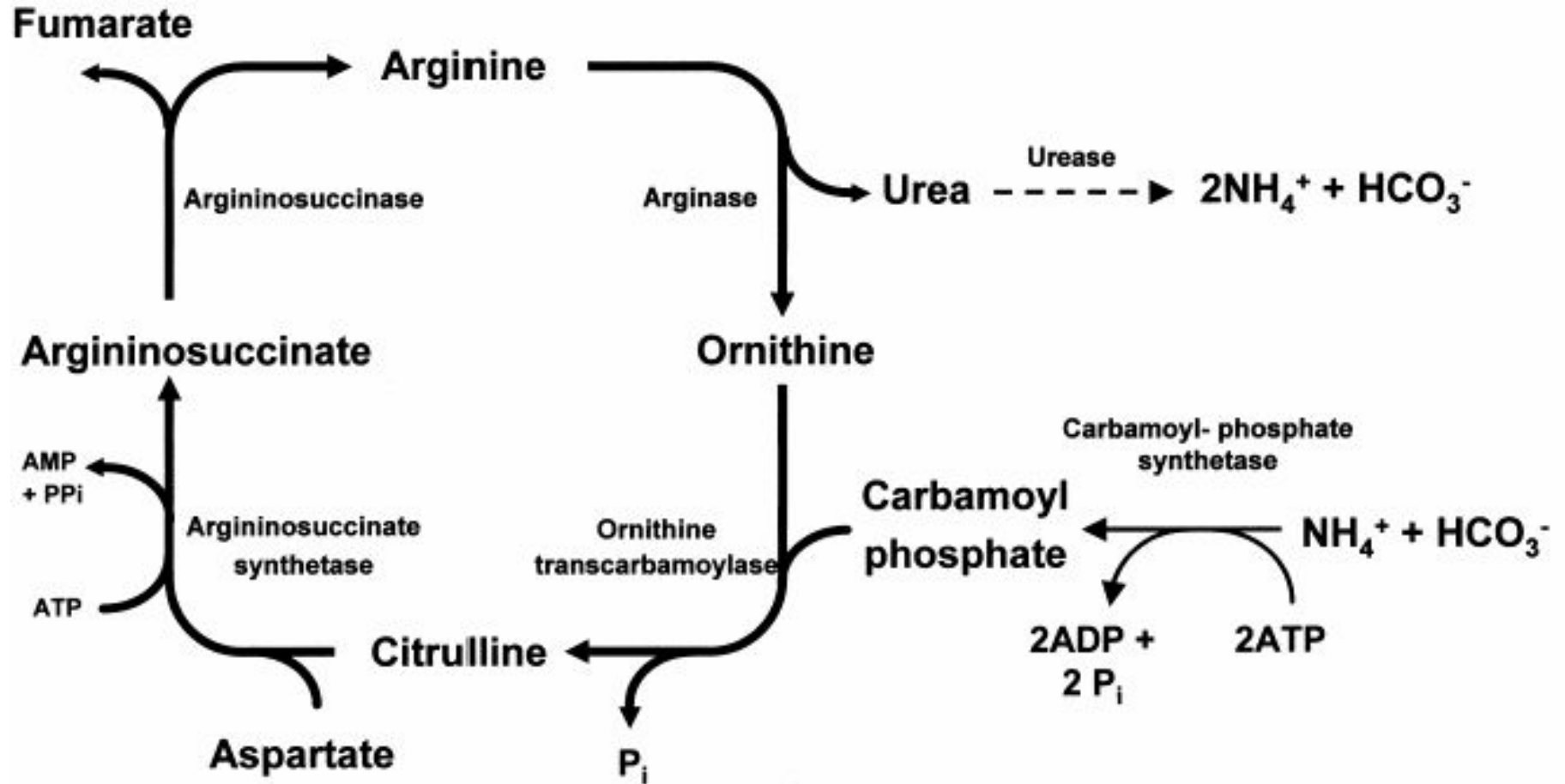
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

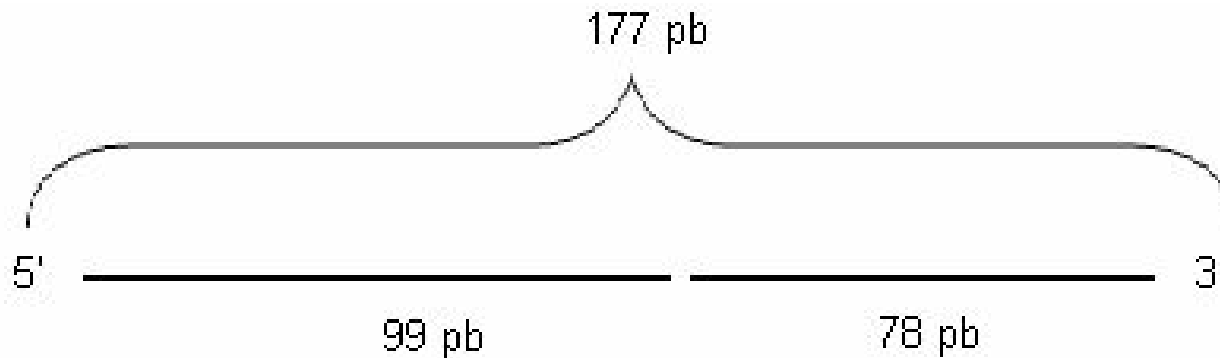
- prin PCR folosind primeri specifici a fost amplificat un segment de 177 pb din exonul 5 al genei ASS.



- În urma digestiei cu enzima de restricție *Ava* II s-au obținut pentru homozigoții normali, fragmente de 99 și 78 pb, pentru heterozigoții purtători fragmente de 177, 99 și 78 pb iar pentru homozigoții recesivi de 177 pb.

Ava II

C → T





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

SINDROMUL SPIDER LAMB LA OVINE

- condrodisplazie moștenită a ovinelor
- boală semi-letală la rasele de ovine Suffolk și Hampshire și a fost pentru prima dată observată la sfârșitul anilor '70 în America de Nord.
- este caracterizat prin creșterea excesivă a oaselor lungi, precum și alte deformări la nivelul membrelor și a scheletului.
- polimorfismul care stă la baza declanșării acestei boli este localizat la nivelul domeniului tirozin-kinazei II al receptorului factorului 3 de creștere fibroblastic (FGFR3). FGFR3 este un reglator negativ al creșterii osoase, având un rol important în proliferarea condrocitelor și în diferențierea acestora în timpul osificării endocondrale iar mutația evidențiată la nivelul genei *FGFR3* induce elongarea oaselor.
- miei care prezintă SLS sunt avortați sau născuți morți, iar dacă trăiesc prezintă deformări la nivelul scheletului. În prima lună de viață dezvoltă semne tipice ale bolii, incluzând membre lungi, disproporționate, un corp de dimensiuni reduse, picioare tip "păianjen", scolioză și/sau cifoza, deformări ale sternului.
- în urma analizei genei *FGFR3* au fost evidențiată mutația T→A la nivelul exonului 17, în poziția 69 care determină substituția valină→glutamat (V700E) la nivelul domeniului II tirozin-kinazic al FGFR3.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- a fost desemnată o pereche de primeri pentru amplificarea unui fragment de 432pb de la nivelul exonului 16 până la nivelul intronului 17, fragment ce corespunde regiunii 476-908 de la nivelul genei *FGFR 3* de la ovine (GenBank [AY737275](#)), la nivelul căruia poate fi evidențiată transversia T→A (poziția 743).

- produșii de amplificare de 432 pb rezultați au fost supuși digestiei cu enzima de restricție *BtgI*, care recunoaște situsul palindromic



la nivelul căruia poate fi identificată mutația punctiformă (T/A).

- polimorfismul mononucleotidic incriminat poate modifica situsul de restricție al acestei enzime *BtgI* putându-se astfel diferenția între animalele purtătoare și cele nepurtătoare. Astfel, în urma digestiei enzimatică produșii de restricție migrați în gelul de agaroză vor avea următoarele profile:

- în cazul animalelor afectate se vor obține două fragmente de 369 și 63 pb

- în cazul animalelor sănătoase trei fragmente de 203pb, 166pb, respectiv 63pb

- în cazul animalele purtătoare ale mutației se vor obține toate cele patru fragmente.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



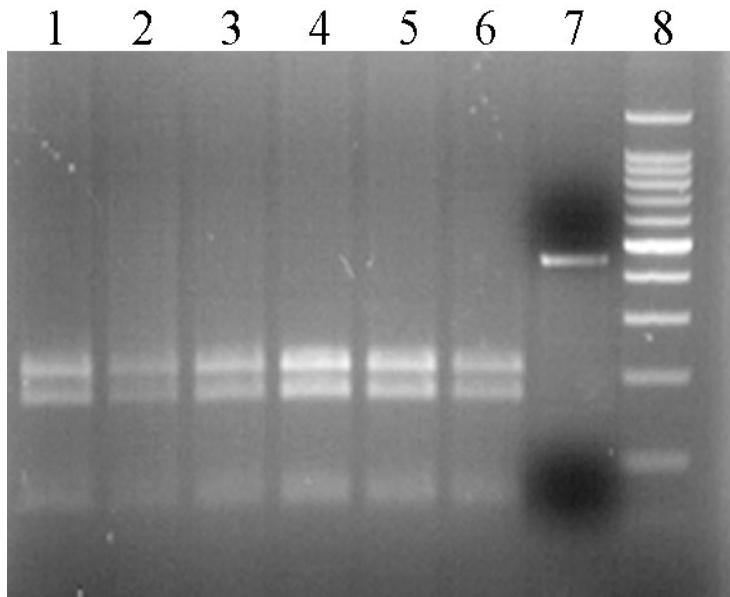
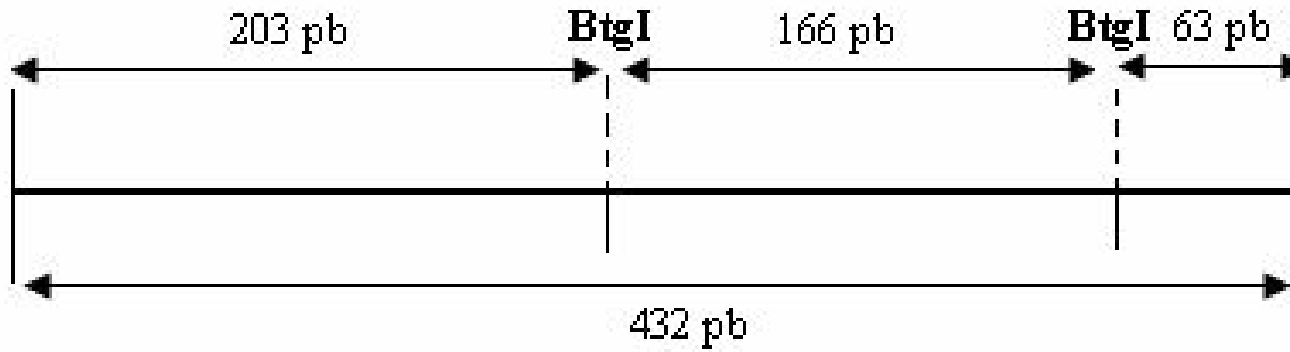
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

DIAGNOSTICARE SCID- UTILIZÂND TEHNICA ANALIZEI FRAGMENTELOR MARCATE FLUORESCENT

- Sever Combined Immunodeficiency (SCID) a fost evidențiată în cazul rasei Pur Sângelui Arab, fiind transmisă recesiv, autozomal.
- la cabaline SCID este cauzată de o deleție de cinci perechi de baze la nivelul genei ce codifică subunitatea catalitică a protein-kinazei ADN dependente (Shin *et al.*, 1997). În cazul apariției deleției are loc o deplasare a cadrului de citire care va duce la activarea unui codon STOP (codonul TAA) și deci la sinteza unei proteine trunchiate care nu-și poate îndeplini funcția biologică. Această mutație se soldează cu o imunodeficiență primară severă.
- incidența SCID la mânjii Pur Sânge Arab este de aproximativ 1% și se consideră că un sfert din caii adulți sunt purtători ai genei defecte. Indivizii diagnosticați ca purtători sunt scoși din procesul de reproducție.
- maladia se caracterizează printr-o diminuare severă a numărului de limfocite B și T. Mânjii bolnavi nu sintetizează anticorpi, ei prezintă doar imunoglobuline serice derivate din colostrul matern. Dacă colostrul nu este acceptat, viața exemplarelor cu SCID se scurtează drastic. Boala la cai este reversibilă prin transplant de măduvă osoasă (celule stem B și T).



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

- În vederea diagnosticării maladii inițial se realizează o reacție PCR pentru amplificarea fragmentul (235 pb) care poate conține deleția ce poate modifica cadrul de citire, activând codonul STOP folosind o pereche de primeri specifici cu primerul sens marcat cu compusul fluorescent 6-FAM.
- Producții de amplificare sunt supuși apoi unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență, în prezența unui standard de perechi de baze marcat la rândul său cu un compus fluorescent.
- În funcție de mărimea fragmentelor de amplificare obținute se poate stabili cu certitudine dacă individul analizat este sănătos, purtător sau bolnav.
- În cazul unui individ homozigot normal se obține un singur produs cu mărimea de 235 pb
- În cazul unui individ purtător se obțin două semnale, unul la 235 pb și altul la 230 pb (datorită deleției de 5 pb)
- În cazul unui individ homozigot recesiv se va evidenția un singur semnal la 230 pb (în cazul indivizilor homozigoți se obține doar un semnal deoarece prezintă două alele identice ca mărime și deci suprapuse)



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



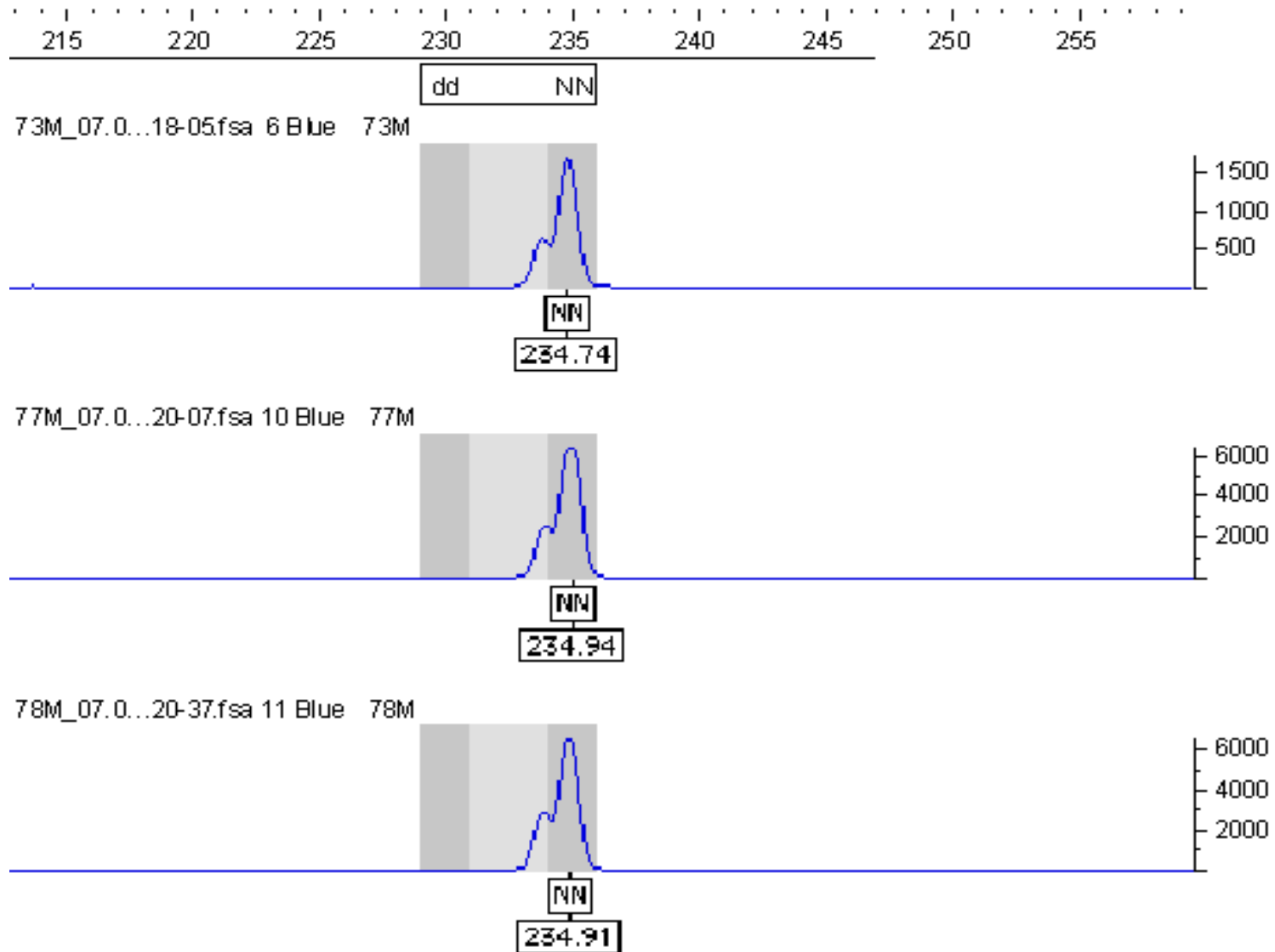
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA



Profilele pentru trei exemplare din rasa Pur Sânge Arab diagnosticate normale pentru SCID.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

GENOTIPAREA LA CABALINE ÎN VEDEREA TESTĂRII PATERNITĂȚII UTILIZÂND TEHNICA ANALIZEI FRAGMENTELOR MARCATE FLUORESCENT

- inițial se realizează o reacție PCR multiplex utilizând ADN genomic extras de la produs și cei doi genitori, urmată de o electroforeză capilară și de detecția în fluorescență a produșilor rezultați.
- amplificarea microsateiților din ADN extras s-a realizat cu ajutorul kitului StockMarks For Horses ce conține 17 perechi de primeri necesari amplificării a 17 microsateiți, marcați cu patru compuși fluorescenți diferiți (6-FAM, NED, VIC și PET) astfel încât dimensiunea fragmentelor amplificate să nu se suprapună. Cei 17 microsateiți sunt amplificați printr-o singură reacție PCR multiplex, deci reacția a fost optimizată astfel încât primerii să aibă aceeași temperatură de anelare.
- primerii din kitul StockMarks realizează amplificarea unor microsateiți care prezintă un număr variat de repetiții dinucleotidice conferind un aspect caracteristic profilelor genetice obținute.
- după amplificare, pentru a putea fi vizualizate, fragmentele obținute prin PCR multiplex sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență iar pentru a fi analizate în ceea ce privește dimensiunea fragmentelor în pb în momentul încărcării probelor este adăugat un standard de pb, marcat la rândul său cu un fluorocrom diferit (LIZ)-Gene-Scan-500 LIZ Size Standard, acesta permițând estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentelor amplificate.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTERMEDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV

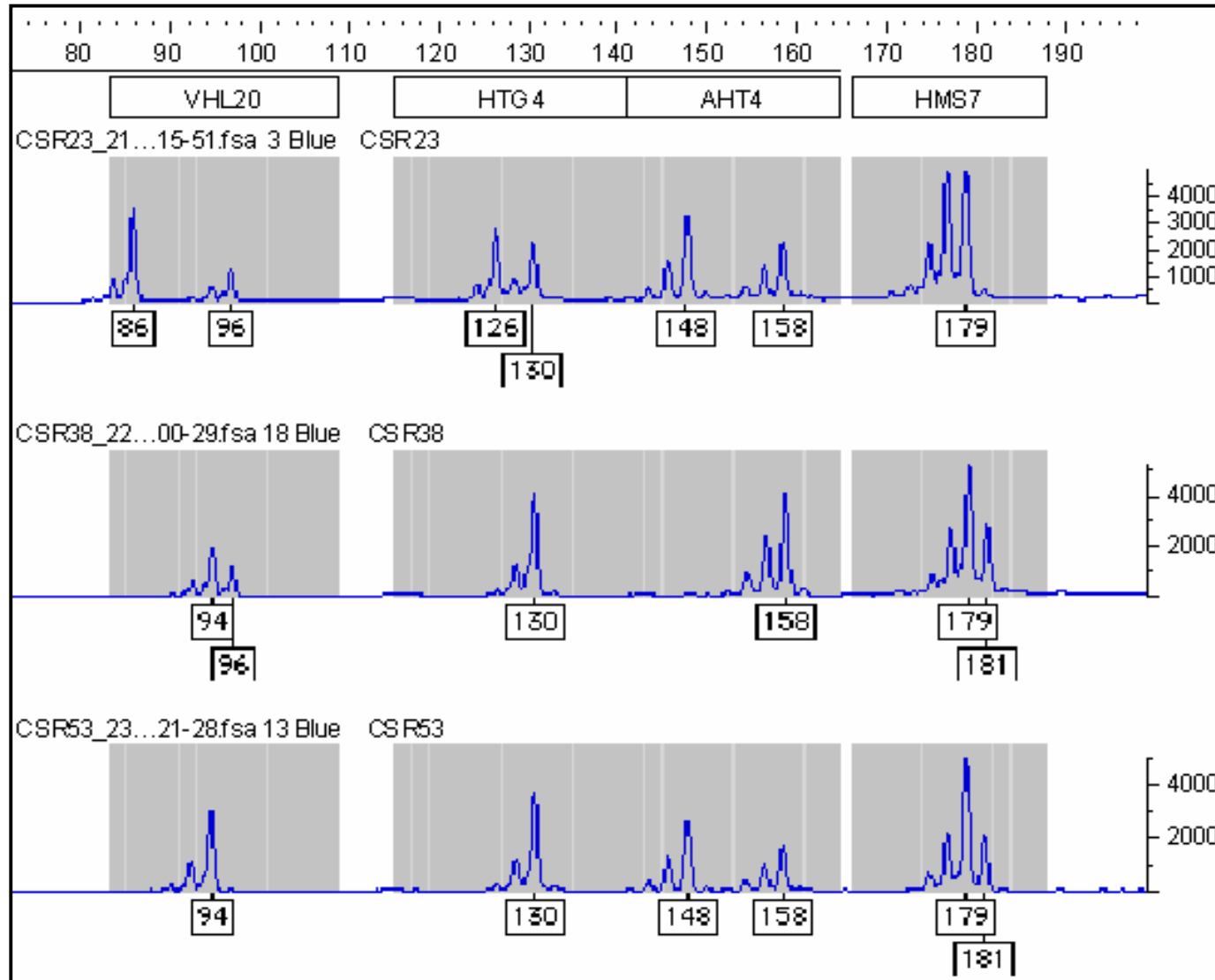


COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Locus	Colorant	Culoare	Mărimea estimată a fragmentelor (pb)
VHL20	6-FAM	Albastră	83–102
HTG4	6-FAM	Albastră	116–137
AHT4	6-FAM	Albastră	140–166
HMS7	6-FAM	Albastră	167–187
HTG6	VIC	Verde	74–103
AHT5	VIC	Verde	126–147
HMS6	VIC	Verde	154–170
ASB23	VIC	Verde	276–212
ASB2	VIC	Verde	237–268
HTG10	NED	Galbenă	83–110
HTG7	NED	Galbenă	114–128
HMS3	NED	Galbenă	146–170
HMS2	NED	Galbenă	215–236
ABS17	PET	Roșie	104-116
LEX3	PET	Roșie	137-160
HMS1	PET	Roșie	166-178
CA425	PET	Roșie	224-247



Rezultatele unui test de paternitate la o familie de cabaline realizat cu un set de microsateliți marcați cu 6-FAM și VIC





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



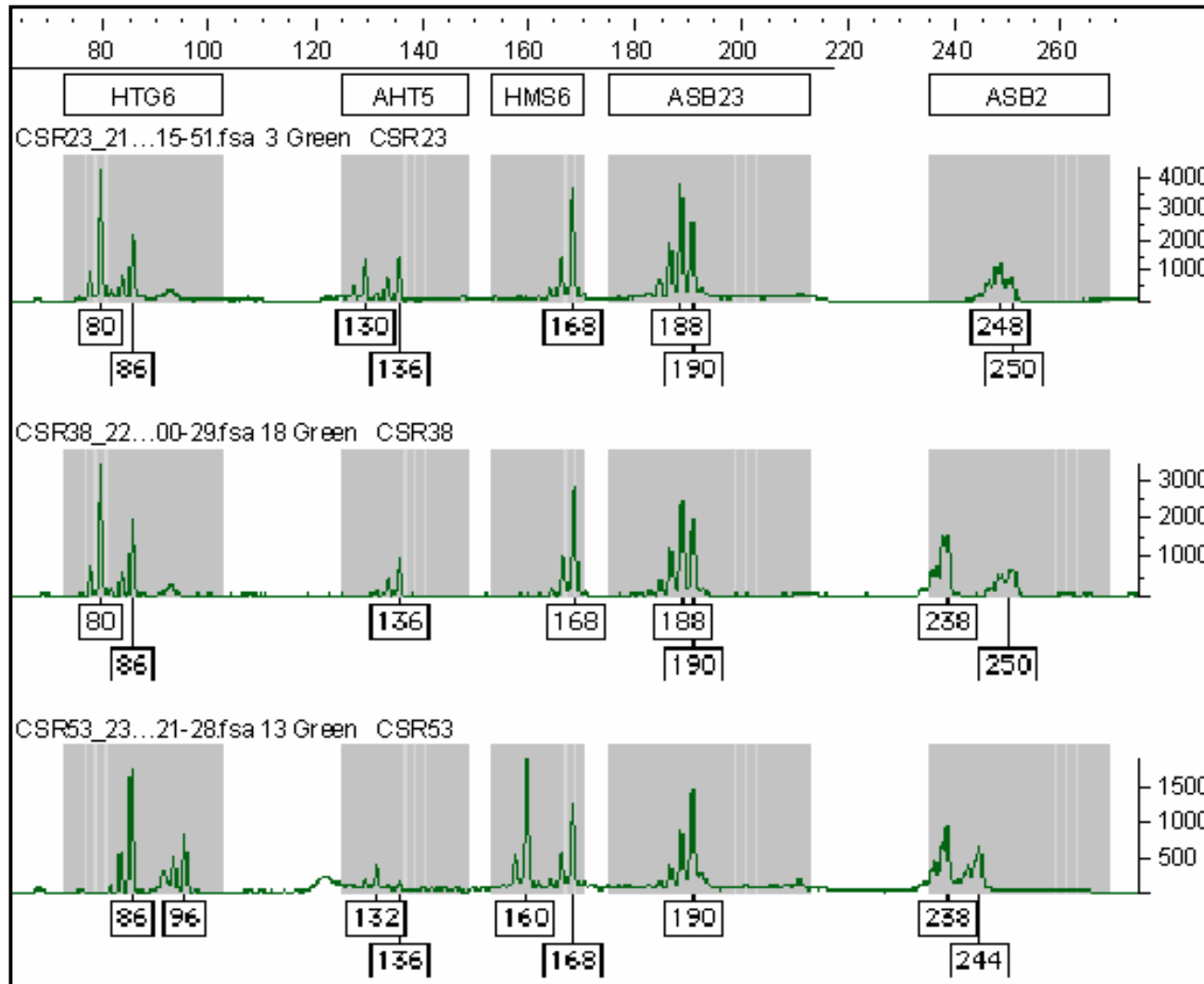
Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA





UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



ORGANISMUL INTEREDIAR
REGIONAL PENTRU POSDRU
REGIUNEA BUCUREȘTI ILFOV



COLEGIUL MEDICILOR
VETERINARI
DIN ROMANIA

Proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 -2013,
“Investește în oameni!”

Titlu Proiect: **PERFEȚIONAREA RESURSELOR UMANE DIN MEDICINA VETERINARĂ**

ID Proiect: **POSDRU/81/3.2./S/58833**

DENUMIREA PROGRAMEI P5: **TEHNOLOGII MODERNE ÎN BIOCHIMIA CLINICĂ ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ**

C11. APLICAȚII BIOMEDICALE ALE TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

Va multumesc!

Formator: Conf. univ. Dr. Andreea Iren Șerban
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI