

Coșier Viorica

INGINERIE GENETICĂ



BIOFLUX
2025

COȘIER VIORICA

INGINERIE GENETICĂ

**EDITURA BIOFLUX
CLUJ-NAPOCA, 2025**

COȘIER VIORICA

Inginerie genetică – Coșier Viorica

Cluj-Napoca, 2025, Editura Bioflux

ISBN: 978-606-9736-31-9

Referenți științifici:

Prof. Dr. Vlaic Augustin

Prof. Dr. Drăgotoiu Tomița

CUPRINS

CURPRINS	1
Prefață	7
CAPITOLUL I: ELEMENTE DE GENETICĂ MOLECULARĂ	8
1.1 Compoziția chimică a acizilor nucleici	8
1.2 Structura acizilor nucleici	10
1.2.1 Structura primară a ADN și ARN	11
1.2.2 Structura secundară a ADN	12
1.3 Speciile ARN din celule	15
1.4 Organizarea și funcționarea genomului în lumea vie	17
1.4.1 Genomul virusurilor	18
1.4.2 Genomul procariot	22
1.4.2.1 Organizarea genomului nucleoidal procariot	22
1.4.2.2 Organizarea genomului extranucleoidal procariot	25
1.4.2.3 Structura genelor la procariote și controlul expresiei genice	29
1.4.3 Genomul eucariot	38
1.4.3.1 Organizarea genomului nuclear eucariot	38
1.4.3.2 Categoriile de secvențe din genomul eucariot	39
1.4.3.3 Organizarea genomului extranuclear eucariot	42
1.4.3.4 Structura genelor la eucariote și controlul expresiei genice	43
CAPITOLUL II: INSTRUMENTE MOLECULARE DE STUDIU SI CERCETARE IN GENETICA MOLECULARĂ ȘI INGINERIA GENETICĂ	48
2.1 Enzimele utilizate în cercetarea moleculară	51
2.1.1 Nucleazele	52
2.1.2 ADN polimerazele utilizate în cercetare	73
2.1.3 ADN ligazele	81
2.1.4 Enzimele de modificare a capetelor acizilor nucleici	82
2.2 Tehnica PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) și variantele tehnicii	84

2.2.1 Tehnica RT – PCR (<i>Reverse Transcription PCR</i>)	90
2.2.2 Tehnica PCR-RFLP - (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	93
2.2.3 Tehnica PCR – Asimetric (<i>Asymmetric PCR</i>)	96
2.2.4 PCR ancorat (<i>Anchored PCR</i>)	97
2.2.5 Tehnica Invers PCR (<i>Inverse PCR</i>)	99
2.2.6. Tehnica <i>Nested Polymerase Chain Reaction</i>	100
2.2.7 Tehnici de amplificare exponențială izotermă	101
2.3 Tehnici de hibridizare a acizilor nucleici	104
2.3.1 Strategii de laborator pentru sinteza sondelor convenționale	106
2.3.1.1 Metode de marcarea a sondelor	107
2.3.1.2 Metode de hibridizare a sondelor la probe	109
2.3.2 Tehnici de laborator de hibridizare a acizilor nucleici	111
2.3.2.1 Tehnica Southern blotting	112
2.3.2.2 Tehnica de hibridizare și transfer pe membrane a coloniilor transformate	115
2.3.2.3 Tehnologia ADN Microarray (DNA chips')	118
2.4 Tehnici de secvențiere a acizilor nucleici	121
2.4.1 Metoda Maxam & Gilbert	122
2.4.2 Metoda dideoxi sau metoda terminatorilor de lanț (Sanger)	123
2.4.3 Tehnici de secvențiere de ultimă generație (NGS- Next Generation Sequencing)	127
2.4.3.1 Pirosecvențierea	129
2.4.3.2 Tehnologia Ion torrent și Proton Ion torrent	131
2.4.3.3 Tehnologia Illumina	133
CAPITOLUL III: TEHNOLOGIILE CONSACRATE DE MANIPULARE A MATERIALULUI GENETIC	135
3.1 Tehnologia ADN recombinat	142
3.1.1 Elementele caracteristice tehnologiei ADN recombinat	148
3.1.2 Gena de interes pentru clonare -Metode de obținere	149
3.1.2.1 Gena pasager în context funcțional (constructul genic)	157
3.1.3 Vectori de clonare a genelor în bacterii	165
3.1.3.1 Vectorii plasmidiali standard	169
3.1.3.2 Vectorii derivați din bacteriofagul λ	176
3.1.3.3 Vectorii hibridi de tip cosmide și fagimide	180
3.1.3.4 Vectori specializați pentru clonarea produsului PCR	186
3.1.3.5 Vectorii cromozomi artificiali (BAC, YAC)	187

3.1.4 Gazda sau receptorul în tehnologia ADN recombinat	195
3.1.4.1 Caracteristicile tulpinilor bacteriene specifice tehnologiei ADN recombinat	196
3.1.5 Ligarea pasagerului cu vectorul pentru formarea moleculelor de ADN recombinat (Strategiile de obținere a moleculelor de ADN recombinat)	199
3.1.5.1 Producerea capetelor complementare la pasager și vector cu ajutorul enzimelor de restricție	199
3.1.5.2 Alte strategii specifice de producere a capetelor complementare	202
3.1.5.3 Producerea capetelor complementare prin PCR	205
3.1.5.4 Producerea capetelor complementare cu enzimele terminal transferaze	208
3.1.5.5 Producerea capetelor complementare prin utilizarea linkerilor și adaptorilor	210
3.1.6 Transferul ADN recombinat în celule gazdă	211
3.1.7 Selecția și analiza clonelor recombinat	215
3.1.8 Detectia genei clonate și a produsului său de sinteză	217
CAPITOLUL IV: BIOLOGIA SINTETICĂ ȘI STRATEGIILE DE CLONARE CU VECTORII MODULARI	221
4.1 Vectorii seriei pZ și BioBricks	220
4.2 Vectorii SEVA (<i>Standard European Vector Architecture</i>)	225
4.3 Strategia de asamblare Gateway	228
4.4 Strategia de asamblare Gibson	233
4.5 Strategia de clonare Golden Gate	242
CAPITOLUL V: STRATEGII PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA PERFORMANȚELOR DE SINTEZĂ A PROTEINELOR HETEROLOGE ÎN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINAT	248
5.1 Noile abordări în înțelegerea proceselor metabolice pentru îmbunătățirea tulpinilor sintetizatoare de biomolecule utile	251
5.2 Solubilizarea proteinelor și purificarea lor	254
5.3 Sinteza proteinelor recombinat sub forma corpilor de incluziune	255
5.4 Prezența codonilor rari în mesajul genetic eucariot	256
CAPITOLUL VI: TRANSGENEZA ANIMALĂ	257

6.1 Constructul genic pentru clonare în celule animale	260
6.1.1. Secvențele de reglaj din amonte și din aval de segmentul structural	260
6.1.2 Genele marker pentru selecția clonelor recombinante în celule de mamifere	268
6.2 Metode de transfer a ADN recombinant în celule de mamifere pentru obținerea animalelor transgenice	271
6.2.1 Metodele transfecției	273
6.2.1.1 Microinjecția	272
6.2.1.2 Transferul genelor mediat de lipozomi	277
6.2.1.3 Transferul genelor mediat de celule stem	277
6.2.1.4 Tehnologia de transfer a nucleilor celulelor somatice transgenice (TNCS)	278
6.2.1.5 Transferul genelor mediat de vectori derivați din transpozoni	284
6.2.1.6 Metodele mecanice de transfer a genelor	288
6.2.2 Metodele transducției	289
6.2.2.1 Vectorii adenovirali	290
6.2.2.2 Vectorii retrovirali	296
6.2.3 Mecanismele de recombinare genetică cu sistemele de clonare Cre-loxP	298
6.2.3.1 Vectorii pentru integrarea specifică a transgenei prin recombinarea de omologie (HR)	298
6.2.3.2 Aplicații practice ale sistemelor de clonare Cre-loxP	302
6.2.4 Vectorii cromozomi artificiali de mamifere și vectorii cromozomi artificiali umani (<i>Mammalian Artificial Chromosomes - MACs/ Human Artificial Chromosomes – HACs</i>)	304
6.2.4.1 Obținerea cromozomilor artificiali de mamifere (MAC) și a cromozomilor artificiali umani (HAC) (strategia de sus în jos)	308
6.2.4.2 Construirea <i>de novo</i> a cromozomilor artificiali de mamifere (MAC) și a cromozomilor artificiali umani (HAC)	312
6.2.4.3 Metoda de transfer a cromozomilor artificiali de mamifere și umani în celule gazdă	316
CAPITOLUL VII: APLICAȚIILE TEHNOLOGIEI ADN RECOMBINAT	319
7.1 Sinteza proteinelor heterologe în diferite celule	319

7.2 Aplicațiile transgenezei animale	330
7.2.1 Aplicațiile transgenezei animale în medicină	330
7.2.1.1 Scoaterea temporară din funcție a genelor (mecanismul <i>knock down</i>)	330
7.2.1.2 Scoaterea definitivă din funcție a genelor (mecanismul <i>knockout</i>) pentru studiul funcțiilor genelor	343
7.2.1.3 Mecanismul <i>knock in</i>	347
7.2.1.4 Animalele model pentru studiul bolilor umane	348
7.2.1.5 Animalele model pentru xenotransplant	351
7.2.2 Animalele și plantele transgenice pentru sinteza proteinelor recombinatate cu rol farmaceutic	356
7.2.3 Aplicațiile transgenezei în agricultură	363
7.2.3.1 Sinteza proteinelor recombinatate în laptele animalelor transgenice	366
CAPITOLUL VIII: NOILE TEHNOLOGII DE EDITARE A GENOMULUI (NTG)	370
8.1 Modificările genomice mediate de nucleazele dirijate pe situsuri (SDN)	370
8.1.1 Nucleazele direcționate pe situsuri (SDN)	372
8.1.1.1 Meganucleazele	373
8.1.1.2. Nucleazele ZF (<i>Zinc Finger</i>) și TALE (<i>Transcription Activator-Like Effector</i>)	378
8.1.1.3 Sistemul CRISPR-Cas	382
8.2 Editorii genomici CRISPR -Cas	389
8.3 Editarea genomică fără producere clivajelor dublu catenare în genom	392
8.4 Mutageneza mediată de oligonucleotide (ODM)	394
8.5 Editarea specifică a genomului prin reverstranscripție	396
8.6 Editorii de bază azotată	397
8.7 Editarea epigenomului	401
8.7.1 Statusul epigenomului și modularea specifică pe situsuri	402
8.7.2 Editorii activatorilor și represorilor specifici de situs	404
8.8 Editarea direcționată pe situsuri a moleculelor de ARN	405
8.9 Aplicațiile NTG	408

8.9.1 Produse obținute în microorganisme, plante și animale transgenice prin intermediul noilor tehnologii genomice	408
CAPITOLUL IX: CADRUL LEGISLATIV ACTUAL PRIVIND TEHNICILE DE MANIPULARE A MATERIALULUI GENETIC	413
9.1 Modificări legislative emergente privind tehnicile de manipulare a materialului genetic pentru obținerea OMG	413
9.2 Retrospectivă privind modificarea materialului genetic	415
9.3 Preambulul modificării legislației privind munca cu OMG	417
9.4 Evoluția tehnologiilor de manipulare a materialului genetic	422
9.5 Clasificarea actuală a tehnicilor specifice biotehnologiilor care fac sau nu obiectul legislației de modificare a materialului genetic	425
9.5.1 Tehnicile convenționale de ameliorare (TCA) a plantelor, animalelor și microorganismelor	425
9.5.2 Tehnicile consacrate de modificare genetică sau de obținere a OMG (TCOMG)	426
9.5.3 Noile tehnologii genomice (NTG)	427
9.6 Concluziile privind modificările legislative emergente cu noile tehnici de editare genomică (NTG)	429
BIBLIOGRAFIE	432

Prefață,

Dezvoltările tehnologice recente, de editare direcționată a genomului, combinate cu tehnologiile de inginerie genomică au deschis oportunități noi înspre aplicații de cercetare din domeniul medical, farmaceutic și agricol.

Concepută ca un ghid complet de inginerie genetică, cartea oferă cititorului o înțelegere graduală a avansului tehnologic extraordinar al acestei discipline.

Capitolele au fost concepute să acopere atât concepte de bază, moleculare și tehnice, cu care operează Ingineria genetică, cât și cele mai noi instrumente și tehnologii de modificare a genomului, focusate pe aplicațiile potențiale. Acestea fac referire la domeniul farmaceutic și sinteza de proteine recombinante, domeniul medical și de diagnostic, domeniul agricol și de cercetare fundamentală.

Secțiunea finală este dedicată evoluției cadrului legislativ sub presiunea noilor dezvoltări tehnologice de editare genomică. Aceasta a condus la definiții și delimitări mai clare în legislație, într-un proces de armonizare la nivel european și internațional.

Prin integrarea conceptelor Ingineriei genetice, din perspective moleculare, tehnologice, aplicative și legislative, această carte își propune să ofere cititorilor avizați, o sinteză a unui domeniu cu o evoluție remarcabilă și perspective inovatoare.

Autoarea