

ANEXA I. Compartimentul de genomică funcțională

Așa cum a fost conceput până la aceasta etapă, nucleul de cercetare moleculară din cadrul Platformei reprezintă un centru interdisciplinar de cercetare fundamentală în domeniul acizilor nucleici, genomicsii funcționale cu aplicații clinice și terapeutice. În cadrul compartimentului de genomică funcțională au fost elaborate, prin îmbinarea resurselor preexistente în Laboratorul de Imunologie și Genetică cu aparatura ultramodernă necesară achiziționată în 2006 și 2007, două circuite “sens unic” de biologie moleculară, de manipulare a acizilor nucleici (ADN/ARN), conform normelor și cerințelor internaționale în vigoare. Aspectul esențial și primordial al necesității circuitelor este evitarea contaminării și a degradării acizilor nucleici, fenomene de altfel curente și practic imposibil de evitat în absența unor condiții drastice de manipulare:

- Un circuit închis pentru manipularea ADN (circuit extracție-amplificare-electroforeză-lectură-conservare), în scopul evitării contaminării reacțiilor PCR sau a probelor de ADN destinate colecției.
- Un circuit paralel pentru unica manipulare a ARN (circuit extracție-amplificare-electroforeză-lectură -retrotranscriere---circuit ADN), în scopul consolidării unei zone de laborator “*Rnase free*” lipsită de contaminanți și de Rnazele omniprezente. O astfel de zonă necesită practic aceleași echipamente ca cele ale circuitului ADN, însă de folosință rezervată doar manipulărilor ARN.

Compartimentul de genomică funcțională este situat în incinta Laboratorului de Imunologie și Genetică, aflându-se sub responsabilitatea d-lui asistent universitar Lucian Negură. Compartimentul de genomică funcțională este structurat în 4 zone distincte cu echipamente proprii, cu activități separate dar interdependente (vezi anexa 1 – Compartimentu de genomică funcțională) :

1. Zona de stocare reactivi și preparare mix PCR

2. Zona de extracție / amplificare

- a) Zona de extracție
- b) Zona de cuantificare a acizilor nucleici
- c) Zona de definitivare a amestecului PCR
- d) Zona de amplificare

3. Zona de electroforeză / hibridizare

4. Zona de secvențiere / Real-Time PCR / Interpretare

Circuitul de biologie/medicină moleculară este alcătuit din 4 zone/săli distincte, independente și izolate, după cum urmează :

ZONA 1 : STOCARE REACTIVI / PREPARARE MIX PCR

Sala nr.1 este cea de stocare la rece (-20°C sau +4°C) a reactivilor necesari amplificărilor PCR, în părți alicote :

- primeri
- enzime (polimeraze, proteinaze, DNaze, kinaze, fosfataze)
- soluții buffer (tampon) asociate enzimelor
- săruri de Mg, Na, K
- mixuri de nucleotide și nucleotide modificate
- apă nuclease-free

ATENȚIE ! ÎN ACEASTĂ SALĂ NU SE PĂSTREAZĂ ȘI NU SE INTRODUC PROBE ADN !

Toți acești reactivi sunt eșantionați în alicote numerotate și etichetate, necesare fiecare uneia sau mai multor reacții, după caz. Rezervele mari de reactivi fiind criostocate (-80°C) în sala „de frig”, sala nr.1 va conține eșantioanele tuturor reactivilor necesari pentru totalitatea proiectelor/utilizatorilor, timp de o săptămână. Zona de stocare are un dublu rol protector :

- A) Evitarea contaminării reactivilor cu reziduuri ADN/ARN, contaminare ce ar anihila orice rezultat de amplificare PCR. În sala nr.1 nu va fi prezentă nici o sursă de ADN. Accesul în sală se face printr-o singură ușă frontală. Zona nu comunică direct cu sălile de culturi celulare sau de primire probe. Accesul în zona nr. 1 va fi strict limitat, atât ca număr de persoane, cât și ca frecvență de intrări/ieșiri.
- B) Evitarea degradării reactivilor termosensibili (primeri, enzime) prin cicluri repetate de dezghețare/înghețare. Fiecare utilizator va dispune de propriile părți alicote ce vor fi supuse la un număr cât mai mic de variații termice (maxim 10).

Din aceste motive, zona nr. 1 se va afla permanent sub responsabilitatea unei persoane competente în manipularea/supravegherea reactivilor. Responsabilul reactivi are următoarele sarcini :

- Recepționarea, direcționarea și stocarea reactivilor ;
- Eșantionarea și etichetarea tuturor stocurilor de reactivi ;
- Realizarea unui flux permanent între camera „de frig” și camera „reactivi” ;
- Verificarea și înnoirea săptămânală a părților alicote. Responsabilul reactivi și persoanele delegate de acesta sunt singurii care efectuează, în condiții de sterilitate maximă, operațiile de eșantionare/alicotare. Un set de pipete automate va fi destinat exclusiv acestor operații.

Zona nr.1 este o zonă de protecție maximă, sterilă, nucleaze-free. Accesul se face obligatoriu în halat + mănuși. Stocarea se va face în două combine frigider/freezer, una destinată reactivilor necesari amplificărilor ADN, cealaltă pentru reactivii ARN (Reverse-Transcription PCR). Primerii și enzimele vor fi stocate în sertare separate.

Totodată, zona nr.1 trebuie să fie accesibilă tuturor utilizatorilor de amplificare PCR, în scopul pregătirii amestecurilor de reacție, EXCLUSIV ADN. Cu acordul responsabilului reactivi, fiecare utilizator își va pregăti probele de amplificare la o masă de lucru sterilă nucleaze-free. Sunt necesare două astfel de mese de lucru, fiecareia fiindu-i atribuită un set distinct de pipete automate. Astfel în zona nr.1 pot avea acces simultan maximum 2 utilizatori.

Echipamente necesare în zona nr.1 :

- Combină frigider / freezer X 2
- Masă lucru biologie moleculară X 2
- Centrifugă de masă cu răcire X 2
- Agitator vortex X 2
- Baie de apă de masă cu agitare
- Baie uscată cu agitare
- Set pipete automate X 3
- Alte ustensile comune de laborator (sticlărie....)
- Etajere, dulapuri...

ZONA 2 : EXTRACTIE / AMPLIFICARE

Zona nr.2, învecinată cu sala reactivilor, este sala în care probele sunt primite, procesate și amplificate. În această sală sosesc, în scopul extracției ADN/ARN :

- probele de sânge periferic, din exteriorul laboratorului
- probele celulare/tisulare din camera de culturi celulare sau din camera de criostocare
- amestecuri de amplificare provenite din zona nr.1
- geluri electroforeză din zona nr.3, în scopul purificării ADN din gel.

ATENȚIE ! COMUNICAREA ZONEI NR.2 CU SALA REACTIVILOR (1) SE FACE OBLIGATORIU ÎNTR-UN SINGUR SENS, DE LA 1 SPRE 2 ȘI NICIODATĂ INVERS. Astfel, reactivii din 1 pot ajunge în 2, dar nici un reziduu ADN nu se va întoarce în sala reactivilor.

Comunicarea între zonele 2 și 3 se face în ambele sensuri.

Zona nr. 2 este formată din 4 poziții distincte, putând primi simultan maxim 5 utilizatori :

a) **Zona de extracție** – separată la mijloc în 2 părți pentru extracția ADN și ARN. Cele două operații necesită obligatoriu seturi de pipete și consumabile distincte, jumătatea ARN fiind RN-ase free. Extracția acizilor nucleici presupune existența proximală a următoarelor aparate :

- Masă lucru biologie moleculară / Hotă laminară
- centrifugă cu răcire și adaptatori pentru tuburi 0,5-50 ml
- agitator vortex
- Baie de apă de masă cu agitare
- Baie uscată cu agitare
- Set pipete automate X 2
- Alte ustensile comune de laborator (sticlărie....)

Probele destinate extracției ajung direct în zona de extracție și nu intră în contact cu celelalte zone ale sălii nr.2. Un responsabil de extracții veghează la buna desfășurare a manipulărilor, la accesul utilizatorilor în zone și la respectarea independenței ADN/ARN. Reactivii necesari extracțiilor (păstrați la temperatura camerei) sunt depozitați în dulapuri și etajere murale separate în regiuni individuale. Soluțiile-stoc se află în partea superioară a dulapurilor, accesul la acestea fiind rezervat responsabilului de zonă. Ceilalți reactivi (păstrați la rece) se găsesc în zona (c). Consumabilele necesare sunt păstrate în ambalaje sterile și nu

pot fi deschise decât sub hotă laminară. În zona extracție pot lucra simultan 2 utilizatori (1 ADN și 1 ARN). Accesul la zonă se face cu ajutorul unui caiet de programări, gestionat de responsabilul de zonă.

După cuantificare (b), acizii nucleici vor fi eșantionați și etichetați corespunzător, în funcție de destinația lor :

- spre zona de amplificare
- spre spațiul de stocare pe termen scurt-mediu (zona c)
- spre spațiul de stocare pe termen lung (camera „de frig”)

b) **Zona de cuantificare a acizilor nucleici**, formată din spectrofotometru + computer. După extracție, cantitatea acizilor nucleici este determinată spectrofotometric folosind diluții corespunzătoare provenite din zona de extracție. Aceste diluții nu se întorc în zona de extracție. Accesul este liber, sub supravegherea responsabilului de extracție. Alternativ, cuantificarea poate fi realizată prin estimare de intensitate de bandă în gel, la nivelul sălii de electroforeză (3).

c) **Zona de definitivare a amestecului PCR**, în care sosesc mixurile de amplificare din sala de reactivi (aceste mixuri nu intersectează zona de extracție (a)). În această zonă există frigider + freezere în care sunt stocați la rece reactivi de extracție (alcooli, tampoane, etc), precum și eșantioanele ADN păstrate pe termen scurt-mediu. Este necesară o masă de lucru pentru adăugarea ADN în mixurile PCR. Accesorii necesare în zona (c) :

- Combină frigider / freezer X 2
- Masă lucru biologie moleculară
- Centrifugă de masă cu răcire
- Agitator vortex
- Baie de apă de masă cu agitare
- Baie uscată cu agitare
- Set pipete automate
- Alte ustensile comune de laborator (sticlărie....)

După definitivarea mixurilor și distribuirea acestora în tuburi/plăci PCR, se trece în zona de amplificare propriu-zisă (d).

Concomitent, în zona (c) se întorc anumiți produși de amplificare în vederea **purificării**. Este vorba de acele produse destinate secvențierii (sau hibridizărilor moleculare).

Purificarea intră în sarcina responsabilului de secvențiere. În zona (c) nu pot avea loc simultan pregătirea mixului și purificarea produșilor de amplificare.

d) **Zona de amplificare**, formată din 3 termocyclere de performanță, dintre care unul conectat la computer. Accesul și programarea aparatelor se realizează doar cu acordul și sub supravegherea responsabilului specialist PCR. Cele 3 aparate pot funcționa simultan cu acordul responsabilului PCR. Accesul se face pe baza unui caiet de programări. Produșii de amplificare sunt dirijați spre zona 3 pentru vizualizare în gel de electroforeză sau se pot întoarce în zona (c) pentru purificare.

Alternativ, amplificarea se poate realiza în timp real în zona 4 (unde este situat aparatul de Real-Time PCR). Atenție ! tuburile destinate zonei 4 părăsesc zona 2 ÎNCHISE !!!

ZONA 3 : ELECTROFOREZĂ / HIBRIDIZARE

În această zonă, produșii de amplificare pot fi vizualizați prin electroforeză în gel, operație ce permite simultan vizualizarea, cuantificarea și, uneori, diagnosticarea ADN. Responsabilul de electroforeză are în grijă buna desfășurare și independența migrărilor verticale / orizontale, în geluri de agaroză / acrilamidă. În zona 3 pot lucra concomitent 7 utilizatori. Pentru electroforeză sunt necesare :

- Reactivi pentru geluri, depozitați la rece (frigider) sau în dulapuri și etajere murale
- Surse curent X 4
- Accesorii electroforeză orizontală (set complet X 2)
- Accesorii electroforeză verticală (set complet X 2)
- Transiluminator UV
- GelDoc X 2 + computere

În paralel, aceeași zonă 3 este accesibilă experimentelor de hibridizare / blotting. Diversitatea acestor tehnici și a aplicațiilor lor nu face necesară prezența unui responsabil de hibridizare ; fiecare utilizator va fi responsabil de propriul experiment. Probele necesare hibridizării provin din zona 2c, unde a fost realizată purificarea produșilor de amplificare.

Zona 3 va reprezenta de asemenea spațiul de arhivare a documentației de electroforeză. De aceea, necesitatea exploatării maxime a spațiului mural, prin dulapuri/etajere.

ZONA 4 : SECVENTIERE / REAL-TIME PCR / INTERPRETARE

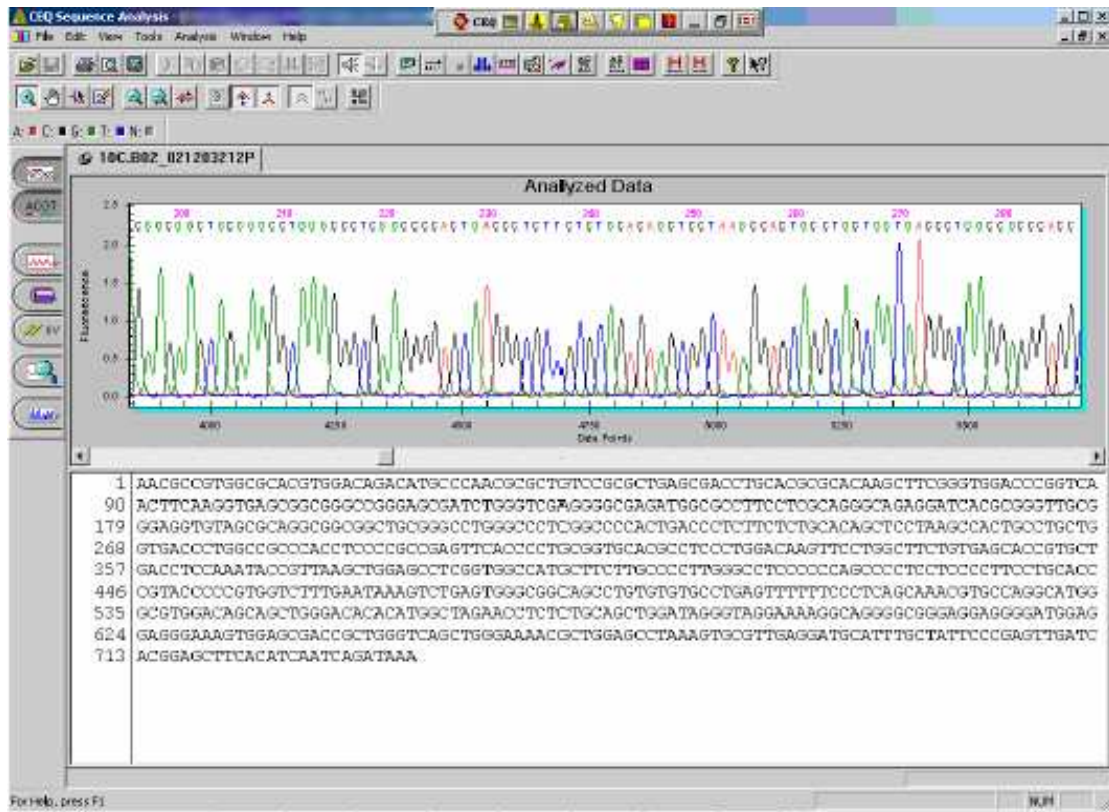
În zona 4, reactivii sau probele trebuie să pătrundă ÎNCHISE. În acest spațiu nu există mese de lucru cu reactivi, ci doar aparatură de înaltă performanță : secvențiator ADN, aparat de PCR în timp real, computerele asociate acestora, precum și alte computere de analiză și stocare a informațiilor. Zona 4 reprezintă punctul de întâlnire al circuitului ADN cu alte circuite de același tip. Responsabilul de zonă este specialist în secvențiere și Real-Time (poate fi vorba de două persoane sau de una singură). Accesul în zonă se face cu acceptul responsabilului și sub îndrumarea acestuia, după un caiet de programări. Spațiul mural este exploatat la maxim cu dulapuri / etajere necesare depozitării accesoriilor de secvențiere/real-time și arhivării informațiilor. Zona 4 nu este obligatoriu sterilă.

În zona 4 pot avea acces simultan 2 persoane în afara responsabilului.

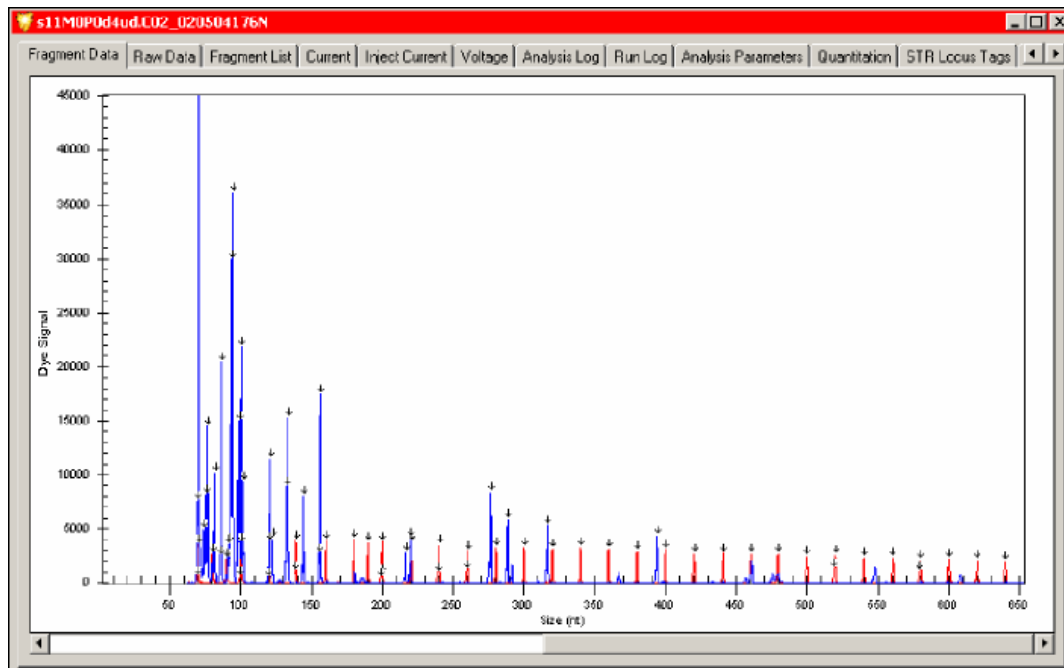
Exemple de activitate în cadrul compartimentului de genomică funcțională :



Sistemul de analiză genică Beckman Coulter CEQ8000, folosit pentru secvențiere genică și analiză de fragmente ADN prin electroforeză capilară



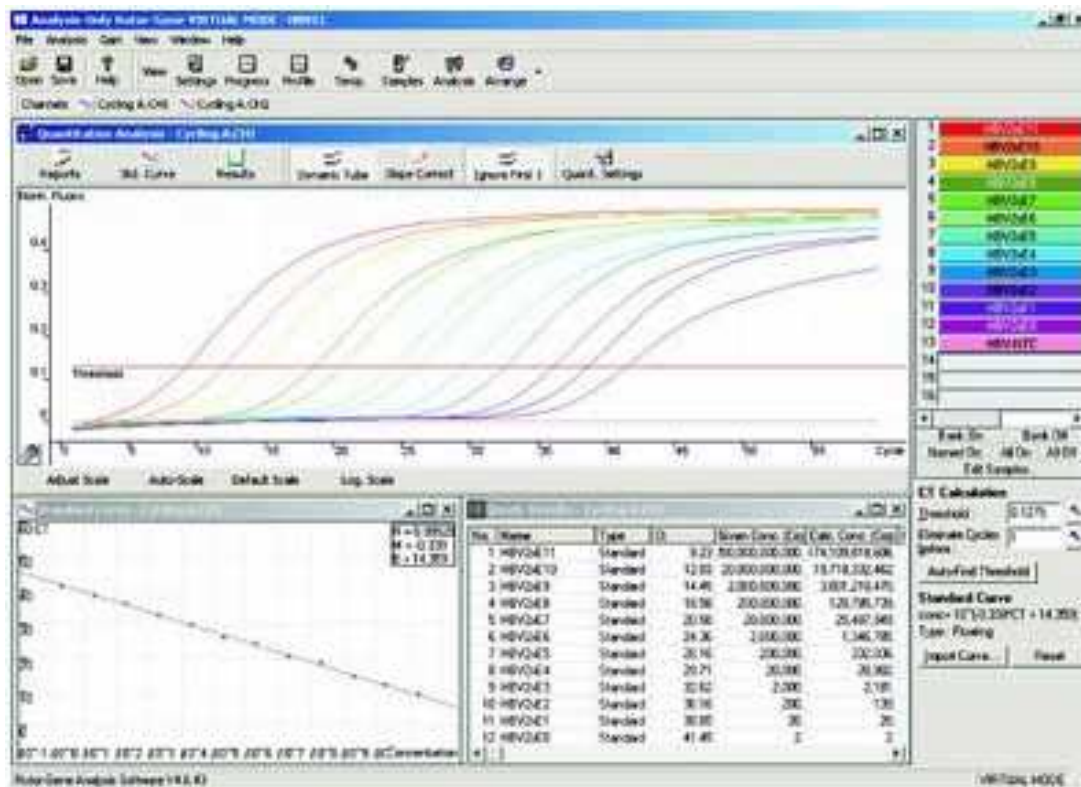
*Exemplu de secvențiere ADN folosind
sistemul de analiză genică Beckman Coulter CEQ8000*



*Exemplu de analiză de fragmente ADN folosind
sistemul de analiză genică Beckman Coulter CEQ8000*



Sistemul de amplificare PCR în timp real Corbett Resarch Rotor Gene 6000, folosit pentru amplificarea cantitativă a acizilor nucleici



Exemplu de cuantificare a expresiei genice Real-Time folosind Sistemul de amplificare PCR în timp real Corbett Resarch Rotor Gene 6000