

UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI” CLUJ-NAPOCA

FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENȚĂ

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Maria Lugojanu



UNIVERSITATEA "BABEŞ-BOLYAI" CLUJ-NAPOCA



FACULTATEA DE FIZICĂ

SPECIALIZAREA FIZICĂ MEDICALĂ

LUCRARE DE LICENŢĂ

INFLUENŢA PH-ULUI ŞI A CONCENTRAŢIEI DE IONI ASUPRA

ADN-ULUI DUBLU CATENAR OBSERVATĂ PRIN FLUORESCENŢĂ

Coordonator științific

Conf. Dr. Zoltán Bálint

Absolvent

Maria Lugojanu

Cuprins

Introducere	5
Capitolul 1. Spectroscopia de fluorescență	6
1.1. Noțiuni introductive	6
1.2. Scurt istoric al spectroscopiei și al fluorescenței	7
1.3. Fluorescența	9
1.4. Fluoroforii	11
Capitolul 2. Sistemul StellarNet.....	13
2.1. Noțiuni introductive despre spectrometru	13
2.2. Componentele aparatului.....	16
Capitolul 3. Acidul dezoxiribonucleic (ADN)	18
3.1. Noțiuni generale	18
3.2. Caracteristici și proprietăți	19
3.3. Structurile biomoleculare	20
3.4. Denaturarea	22
3.5. Marcarea cu Sybr Green.....	23
Capitolul 4. Materiale și metode	25
4.1. Procurarea probelor	25
4.2. Pregătirea probelor	25
4.3. Parametrii de achiziționare a datelor	29
4.4. Procesarea datelor	31
Capitolul 5. Rezultate și discuții	34
5.1. Rezultate.....	34
5.2. Interpretarea rezultatelor	38
Concluzii	39
Bibliografie.....	40

Introducere

Spectrometrul este un instrument ușor de utilizat, oferind rapid informații despre probă care nu necesită o pregătire laborioasă. Fiind accesibilă atât din punctul de vedere al vitezei de obținere a unui rezultat cât și al dimensiunilor dispozitivului în sine, poate fi utilizată la scară largă pentru determinarea diferitelor caracteristici ale substanțelor observate pe un spectru. Spectrometria de fluorescență urmărește determinarea proprietăților probei privind emisia în regiunea UV-Vis.

Obiectivul principal al lucrării constă în determinarea proprietăților ADN-ului dublu catenar prin spectrometrie de fluorescență. Pentru acest scop am urmărit detectarea și cuantificarea pH-ului și concentrației de ioni la care ADN-ul dublu catenar se denaturează cu ajutorul spectroscopului de fluorescență. Astfel, am obținut valorile pentru care ADN-ul analizat într-o concentrație de ordinul ng/μL devine mono-catenar. Rezultatul acestor observații fiind propunerea unei metode simple cu posibilitatea de a fi folosită pentru analiza rapidă a stării ADN-ului în concentrații mici.

Capitolul 1 prezintă noțiuni generale despre spectroscopia de fluorescență și un scurt istoric.

Capitolul 2 este axat pe descrierea spectrometrului, a principiului de funcționare a acestuia și pe tipurile de spectrometre existente. În a doua parte sunt prezentate particularitățile sistemului utilizat pentru această lucrare (StellarNet).

Capitolul 3 se rezumă la informații despre ADN, caracteristicile și rolul acestuia, cât și despre proprietățile fluoroforului folosit (Sybr Green) și importanța sa în detectarea semnalului de la probele de analizat.

Capitolul 4 descrie în detaliu materialele și metodele experimentale, incluzând procurarea probelor, prepararea acestora, aparatura și tehnicile utilizate, parametrii de achiziție a spectrelor și procesare a informațiilor folosite.

Capitolul 5 are scopul de a aduce la cunoștință rezultatele obținute în urma achiziționării și procesării spectrelor din lucrarea de față. Lucrarea se termină cu o analiză comparativă a rezultatelor obținute cu cele publicate în literatură și o concluzie asupra posibilității de utilizare a acestei tehnici.

Capitolul 1. Spectroscopia de fluorescență

1.1. Noțiuni introductive

Spectroscopia este ramura științei care se ocupă cu investigarea și măsurarea spectrelor produse în urma interacțiunii materiei cu radiația electromagnetică (absorbție, emisie sau împrăștiere de radiație electromagnetică). Principiul utilizează faptul că proprietățile radiative ale substanțelor sunt corelate cu starea lor fizio-chimică [1].

Printre tipurile de spectroscopie, se numără și cea de fluorescență, exploatându-se astfel caracterul fluorescent al unor substanțe. Fluorescența este proprietatea optică a unor molecule de a emite radiație electromagnetică (fotoni de o anumită lungime de undă) ca urmare a tranziției de dezexcitare de pe un nivel electronic superior pe unul inferior, în urma absorbției de radiație electromagnetică în domeniul UV sau vizibil [2].

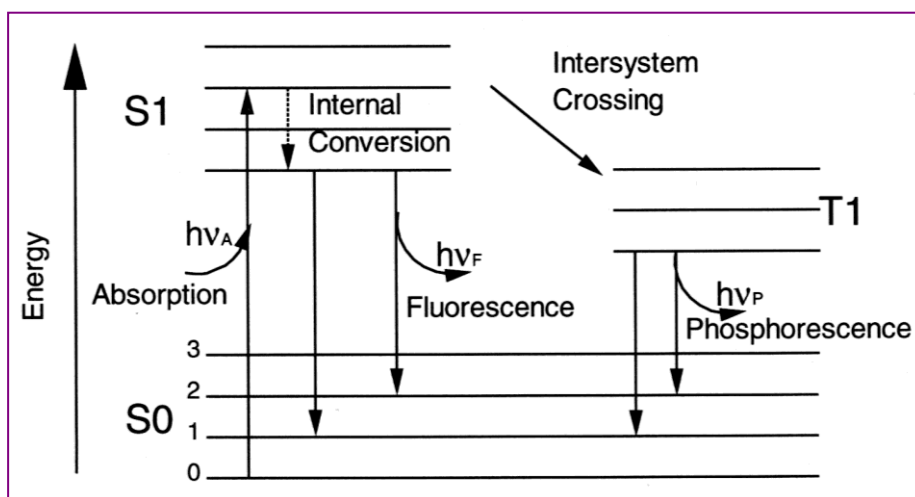


Figura 1.1. Diagrama Jablonski [1]

Radiația electromagnetică excită molecula și induce trecerea pe un nivel excitat, iar emisia este revenirea la nivelul fundamental. Pentru fenomenul de fluorescență, diferența în timp dintre aceste etape este de ordinul nanosecundelor [2].

Lungimile de undă ale fotonilor emiși prin fluorescență sunt situate la lungimi de undă mai mari decât cele de absorbție ($\lambda_{\text{absorbit}} < \lambda_{\text{emis}}$), cauza fiind pierderea energiei prin relaxarea vibrațională în starea excitată. Fenomenul fiind probabilistic pentru energia fotonilor absorbiți (spectru de excitare), la emisie vom primi fotoni cu diferite lungimi de undă (spectru de emisie).

Această diferență între maximul poziției benzii de absorbție și maximul poziției

fluorescenței se numește deplasarea Stokes $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$; fenomen care permite separarea și analiza fotonilor emiși față de cei absorbiți prin filtrarea spectrală a semnalului; pas necesar datorită randamentului de fluorescență scăzut [2].

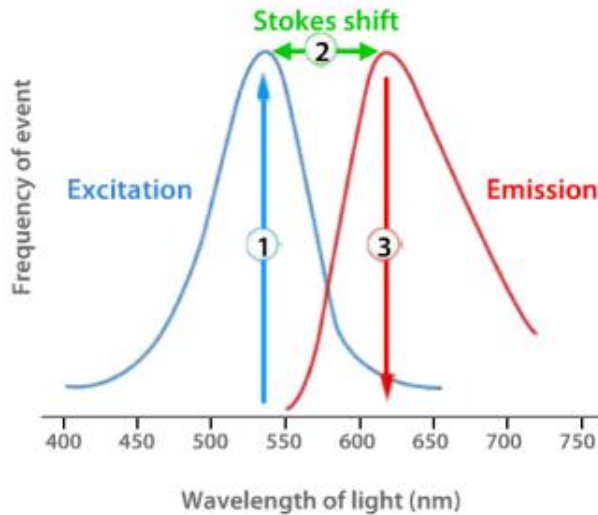


Figura 1.2. Deplasarea Stokes [2]

1.2. Scurt istoric al spectroscopiei și al fluorescenței

Termenul „spectru” a fost introdus de Isaac Newton în 1666 pentru a descrie faptul că lumina albă, provenită de la soare, poate fi descompusă într-o serie continuă de culori [3].

Spectroscopia joacă un rol important în știința analitică modernă cu aplicații în arii foarte diferite precum cercetare științifică, criminalistică, controlul calității produselor și astronomie. Determinarea prezenței sau concentrației elementelor din probe este o parte importantă a muncii laboratoarelor de analiză. Spectroscopia a jucat, de asemenea, un rol crucial în dezvoltarea științei moderne [3].

Printre primele obiecte supuse studiului spectroscopic a fost Soarele, și la începutul secolului al XIX-lea a fost stabilit că spectrul curcubeului prezentat de Isaac Newton nu era continuu. Liniile negre pe care acum le considerăm de absorbție, erau inițial numite linii Fraunhofer, după cercetătorul german care le-a localizat sistematic cu noua sa invenție – spectrometrul. Studiile sale au dus la descoperirea că fiecare element are o linie spectrală sau o serie de linii spectrale care îi permite să fie unic identificat [1].

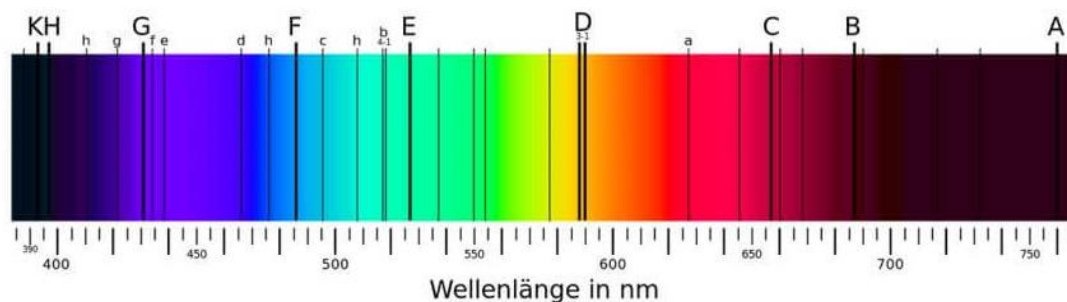


Figura 1.3. Reprezentarea grafică a liniilor Fraunhofer [1]

În 1817 J. Fraunhofer a denumit cele mai intense linii solare de absorbție de la A la H, iar în 1859 G. Kirchoff și W. Bunsen au susținut pentru prima dată că elementele au atât spectre de absorbție cât și spectre de emisie caracteristice [4].

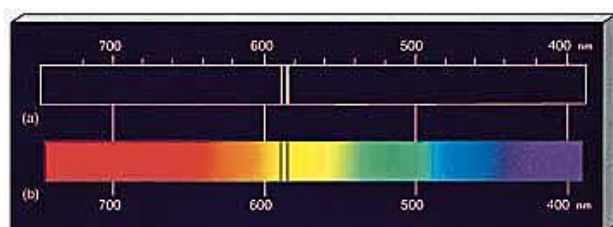


Figura 1.4. Liniile spectrale de emisie (a) și de absorbție (b) [5]

La jumătatea secolului al 19-lea, G. G. Stokes a studiat extensiv proprietățile a ceea ce astăzi numim fluorescență și cum diferă lumina incidentă de cea fluorescentă. El și-a prezentat descoperirea în fața Societății Regale din Londra în 1852. Studiile sale au fost realizate pe probe organice (chinină) și anorganice (cristalul de fluorit) identificând un fenomen comun pe care, inițial, l-a numit reflexie dispersivă: lungimea de undă a luminii dispersate era întotdeauna mai mare decât cea a luminii originale. Unul dintre experimentele lui Stokes a fost formarea spectrului solar cu ajutorul unei prisme. Când mișca un tub cu soluție de chinină prin partea vizibilă a spectrului, nu se întâmpla nimic, soluția rămânea transparentă. În momentul când trecea de porțiunea violet a spectrului, care este corespunzătoare regiunii cu radiație ultraviolet, soluția avea o strălucire albăstruie. De la acest tip de experiment realizat pe numeroase substanțe, Stokes a concluzionat că lumina dispersată are întotdeauna lungimea de undă mai mare decât cea incidentă. Mai târziu, această constatare a devenit „Legea lui Stokes”. De asemenea, în lucrarea pe care a scris-o, a notat că nu îi place termenul folosit pentru fenomenul observat, de dispersie internă sau reflexie dispersivă. Astfel, a preferat să utilizeze un cuvânt nou, derivat de la fluorit – analog termenului opalescență derivat de la opal – adică fluorescență [6].

După peste 50 de ani, în 1905, E. Nichols și E. Merrit, au înregistrat primul spectru de fluorescență la un colorant [5].

1.3. Fluorescența

În urma absorbției radiației din domeniul UV-Vis, moleculele sunt excitate electronic. Dezexcitarea electronică a unei molecule se poate realiza:

- radiativ: o parte din energia absorbită de moleculă este eliberată sub formă de radiație electromagnetică;
- neradiativ: energia absorbită de moleculă se transformă în alte forme de energie [5].

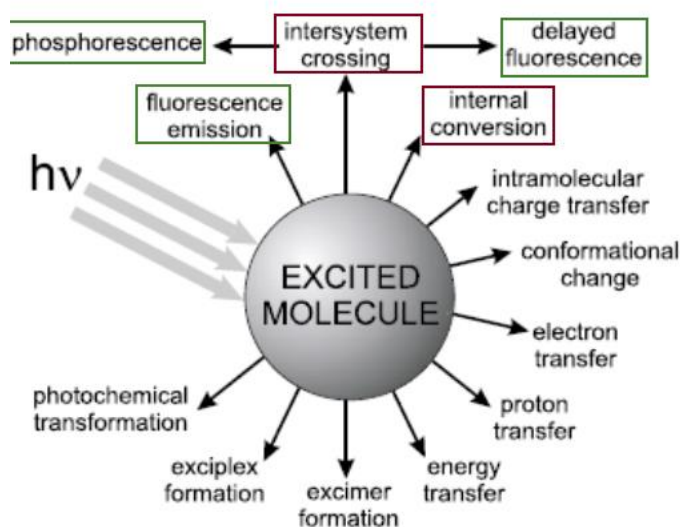


Figura 1.5. Dezexcitarea unei molecule, încadrate cu verde fenomenele radiative și cu roșu cele neradiative [5]

Fotoluminescența este emisia de fotoni ce apare în urma dezexcitării electronice și poate fi:

- fluorescența (starea excitată este o stare de singlet, adică spinii celor doi electroni sunt paraleli);
- fosforescența (starea excitată este o stare de triplet, adică spinii celor doi electroni sunt antiparaleli);
- fluorescența întârziată (starea excitată electronic este o stare de singlet) [5].

Fluorescența presupune emisie de fotoni ca rezultat al absorbției de radiație din domeniul UV-Vis și apare după un timp foarte scurt de la absorbție [5].

Durata proceselor implicate este foarte mică: aproximativ 10^{-15} s absorbția, 10^{-12} s conversia internă și relaxarea vibrațională, iar fluorescența propriu-zisă după 10^{-9} s de la excitare [3].

Nivelurile implicate în procesul de fluorescență sunt nivelele vibraționale ale primului nivel electronic excitat (S1) și cele vibraționale ale nivelului electronic fundamental (S0) [5].

Emisia de fluorescență se inițiază totdeauna de pe nivelul vibrațional fundamental al primei stări excitate electronic (S1, $v = 0$) de singlet (Figura 1.6.C) [5].

Fazele procesului de fluorescență se împart în trei, după cum urmează:

- Faza I reprezentată de absorbția sau excitarea electronică (figura 1.6.A);
- Faza a II-a reprezentată de relaxarea vibrațională și/sau conversia internă (figura 1.6.B);
- Faza a III-a corespunde momentului de emisie fluorescentă (figura 1.6.C) [5].

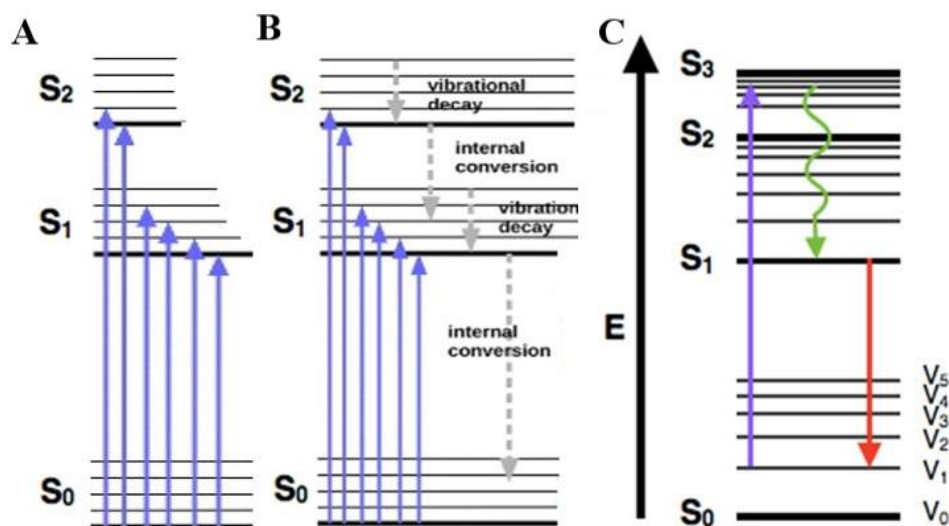


Figura 1.6. Faze proces fluorescență: A. Absorbție, B. Relaxare și conversie internă, C. Emisie fluorescentă [5]

Dintre caracteristicile fluorescenței amintim:

- deplasarea Stokes care reprezintă diferența dintre maximul de emisie fluorescentă și maximul de absorbție al unei substanțe (mai mare sau egal cu zero) [5];
- timpul de viață sau de fluorescență (τ) este timpul în care electronul rămâne în starea excitată și este timpul necesar pentru ca numărul de molecule excitate să ajungă la $1/e$ din valoarea inițială (τ de ordinul ns) [5];
- randamentul de fluorescență (Φ) este raportul dintre numărul de fotoni emiși și cei absorbiți, indicând eficiența unui fluorofor de a converti lumina absorbită în emisie fluorescentă [5].

Dintre tehnicile de fluorescență le menționăm pe următoarele:

- steady-state fluorescence*: se păstrează fixă lungimea de undă a radiației emise și se înregistrează lungimea de undă a radiației excitatoare, obținându-se spectrul de excitație sau se menține lungimea de undă de excitație și se înregistrează cea de emisie, rezultând spectrul de emisie (ca în cazul măsurătorilor din această lucrare);
- time-resolved fluorescence*: determinarea timpului de viață al moleculei în starea excitată.

1.4. Fluoroforii

R. Meyer în 1897 a folosit termenul „*fluorophore*” pentru a descrie grupările chimice ce pot fi asociate cu fluorescența - analog cuvântului „*chromophore*”. Aceștia prezintă un spectru de absorbție (în care sunt excitați) și unul de emisie [5].

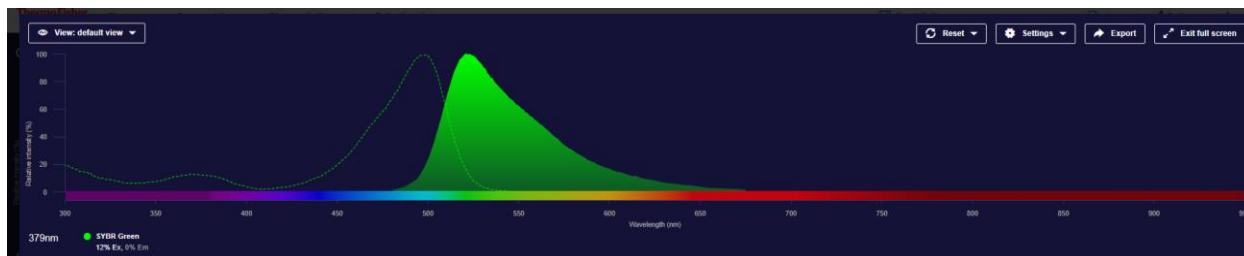


Figura 1.7. Spectre de fluorescență Sybr Green (absorbție și emisie) [7]

Un fluorofor (sau fluorocrom, similar cu cromofor) este un compus chimic fluorescent care poate reemite lumină după excitație. Fluoroforii conțin, de obicei, numeroase grupuri aromatice combinate sau molecule planare sau ciclice cu multe legături π [8].

Fluoroforii sunt utilizați singuri sau ca trasori în fluide sau drept coloranți pentru a crește contrastul anumitor structuri, ca substrat pentru enzime sau ca indicator (când fluorescența este afectată de elemente exterioare ca polarizarea sau ionizarea). Mai general, ei sunt legați covalent de o macromoleculă cu scopul de a servi ca markeri (colorant, etichetă sau reporter) pentru agenți bioactivi (anticorpi, peptide, acizi nucleici). Fluoroforii sunt cel mai des utilizați pentru a colora țesuturi, celule sau materiale într-o varietate de metode analitice, ca de exemplu imagistica prin fluorescență și spectroscopia [8].

Fluoresceina, prin gruparea amino-reactivă izotiocianat derivată din izotiocianatul de fluoresceină (FITC), a fost unul dintre cei mai populari fluorofori. De la etichetarea anticorpilor, aplicațiile s-au îndreptat spre acizii nucleici mulțumită carboxifluoresceinei (FAM). Alți fluorofori comuni din punct de vedere istoric sunt derivați ai rodaminei (TRITC), cumarin și cianină. Noile generații de fluorofori sunt mai fotostabile, mai luminoase și/sau mai puțin sensibile la pH decât cele tradiționale, cu excitare și emisie comparabile [8].

Majoritatea fluoroforilor sunt molecule organice mici de 20-100 atomi (200-1000 Dalton), dar există și fluorofori naturali mult mai mari care sunt proteine, de exemplu proteina verde fluorescentă (*green fluorescent protein* - GFP) are 27 kDa [9].

În ultimii ani, modificările genetice făcute asupra proteinelor fluorescente extrase din surse variate, au dus la denumirea lor corespunzătoare culorii fructului la care semănau emisiile precum mCherry

sau mBanana (figura 1.8) [9]. În 2020, fluoroforul cu cele mai mici dimensiuni era 3-hidroxiizonicotinaldehida, un compus cu 14 atomi și având o mărime de doar 123 Da [9].

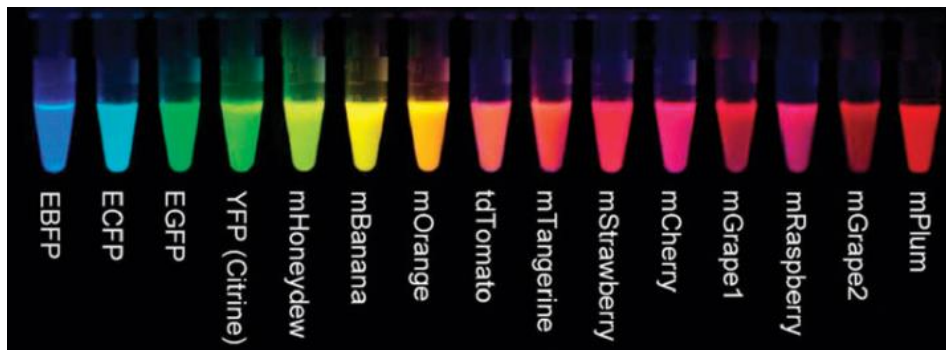


Figura 1.8. Culi protei fluorescete [9]

În lucrarea de față am folosit Sybr Green ca fluorofor pentru a observa ADN-ul dublu catenar; informații pe care le-am detaliat în capitolul 3.

Capitolul 2. Sistemul StellarNet

2.1. Noțiuni introductive despre spectrometru

Spectrometrul este un instrument care separă și măsoară componentele unei probe, determinând variația caracteristicilor fizice (frecvențele nucleare de rezonanță, raportul masă-sarcină sau absorbția și emisia luminii) ale acestora într-un anumit interval. Există mai multe tipuri de spectrometre, iar dintre acestea le amintim pe cele mai des folosite: spectrometrul de rezonanță magnetică nucleară, spectrometrul de masă și spectrometrul optic [10].

Un spectrometru este alcătuit din 5 componente principale: sursă de lumină, fantă de intrare, grilaj, detector și suport pentru probă.

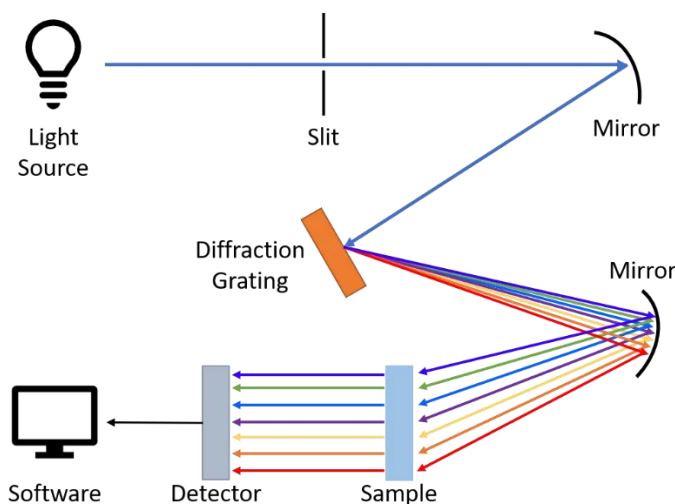


Figura 2.1. Schemă a principiului de funcționare a spectrometrului [10]

Lumina de la sursă pătrunde prin fanta de intrare, iar mărimea acesteia determină cantitatea de lumină care poate fi măsurată de instrumentul în sine. De asemenea, mărimea fantei influențează rezoluția optică a spectrometrului, astfel cu cât este mai mică fanta, cu atât este mai bună rezoluția (se separă lungimile de undă apropiate) [10].

Raza devine divergentă după ce trece prin fantă și reflectând această rază divergentă pe o oglindă, raza este colimată. Aceasta este ulterior direcționată spre grilajul/grila de difracție care acționează ca un element dispersiv și descompune lumina în lungimile de undă din care este compusă [10].

Un monocromator folosește fenomenul de dispersie optică într-o prismă sau difracția produsă de gridul de difracție pentru a selecta o lungime de undă specifică a luminii. În spectrometrele tradiționale, prismele erau folosite pentru dispersia luminii [10].

După descoperirea gridului de difracție, acesta a devenit cel mai folosit monocromator în spectrometrele modern, având mai multe avantaje decât prisma. Ambele dispozitive sunt capabile să descompună lumina în culori, dar gridul de difracție împrăștie culorile cu un unghi mai mare decât prisma. De asemenea, prismele prezintă o dispersie mai bună în spectrul UV, spre deosebire de gridul de difracție care oferă o dispersie bună și constantă pentru spectrele UV, VIS și IR [10].

Odată ce lumina lovește gridul de difracție, fiecare lungime de undă este reflectată la un unghi diferit. Raza devine divergentă din nou după ce este reflectată de pe grid, apoi ajunge la a doua oglindă pentru a fi focalizată și direcționată spre detector [10].

Cele mai comune tipuri de oglinzi sunt de obicei plane și sferice. Oglinzile sferice pot fi concave sau convexe. Cele mai utilizate într-un spectrometru sunt oglinzile sferice concave [10].

Detectorul capturează spectrul luminos și măsoară intensitatea luminii în funcție de lungimea de undă. Aceste date sunt apoi digitalizate și sunt transpuse de un software într-un grafic [10].

Există o varietate de detectori care sunt utilizați în diferite spectrometre, dar cei mai des utilizați detectori sunt tuburile fotomultiplicatoare (*photomultiplier tube* – PMT), fotodiodele, camerele CCD (*charge-coupled device*), analizatoarele multi-canal (*multi-channel analyser* – MCA) [10].

Sursele de lumină găsite în spectrometre sunt fabricate din tungsten halogen, deuteriu, arcuri de xenon, led-uri sau laseri [10].

Probele de obicei sunt lichide, dar și gazele sau solidele pot fi testate. Substanțele de analizat se pun într-o cuvă transparentă [10].

Materialul folosit pentru producerea cuvelor depinde de intervalul spectral pe care îl acoperă spectrometrul. Sticla de cuarț este folosită adesea întrucât este transparentă de la regiunile UV până la cele IR [10].

Cele mai multe interfețe spectrometru-computer se realizează prin USB, RS-232 sau Ethernet, dar există și sisteme mai noi care transferă datele wireless, folosind Wi-Fi sau Bluetooth [10].

Majoritatea companiilor care produc instrumentul, produc și un software compatibil cu spectrometrul. De exemplu, spectrometrele de la StellarNet vin cu software-ul SpectraWiz, dezvoltat de către producător [10].

Spectrometrele optice pot fi clasificate în două moduri: după lungimea de undă folosită sau după proprietățile interacțiunii luminii.

I. După lungimea de undă

a) Spectroscopia ultraviolet (UV):

- folosește lumină UV din intervalul 200 - 400 nm pentru a măsura ce cantitate de lumină a absorbit sau reflectat proba și a determina concentrațiile elementelor din probă [10].
- b) Spectroscopia vizibilă (VIS):
 - funcționează în mod similar cu cea UV, dar utilizează lumina din domeniul vizibil al radiației electromagnetice, cu lungimi de undă între 400 și 700 nm, cu scopul de a identifica compuși care nu interacționează cu lumina UV [10].
- c) Spectroscopia infraroșie (IR):
 - spectrul IR, cuprins între 700 nm și 1000 nm, poate fi divizat în 3 subintervale – apropiat, mediu și îndepărtat – față de spectrul vizibil [10].

II. După interacțiune

- a) Spectrometrie de absorbție:
 - după cum sugerează numele, spectroscopia de absorbție măsoară absorbția radiației unei surse de către o probă, în funcție de lungimea de undă sau frecvență (figura 2.1);
 - spectroscopia de absorbție este folosită pentru a determina prezența compușilor în probe și măsurarea concentrației lor; spectroscopiile UV, VIS și IR funcționează pe acest principiu [10].
- b) Spectrometrie de reflectanță:
 - această tehnică măsoară cantitatea de lumină reflectată sau împrăștiată de probă [10].
- c) Spectrometrie de transmisie:
 - se referă la măsurarea cantității de lumină care trece neschimbată prin probă [10].
- d) Spectrometrie de fluorescență (figura 2.2.):

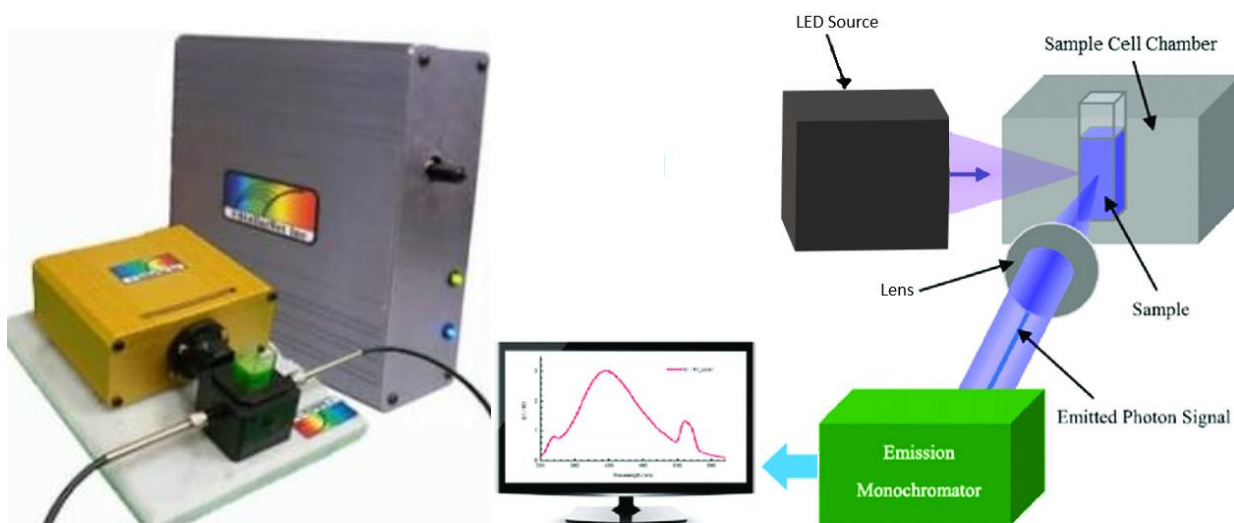


Figura 2.2. Spectrometrul de fluorescență (stânga) și schema sa (dreapta) [10]

- precum la spectrometria UV, electronii din probă devin excitați în urma absorbției luminii și trec de pe nivelul de bază pe unul superior cu numeroase niveluri vibraționale;
- electronii excitați revin la nivelul de bază prin emisie de fotoni, proces cunoscut ca fluorescență;
- cum electronii pot reveni la nivelul de bază pe oricare nivel vibrațional, lumina emisă de fotoni va avea energii diferite, variind astfel intensitățile și lungimile de undă;
- reprezintă, așadar, măsurarea fluorescenței de la probă; de obicei se folosesc surse de lumină din spectrul UV sau VIS pentru a excita moleculele;
- se măsoară diferite caracteristici ale fluorescenței precum intensitatea și distribuția lungimii de undă a radiației emise; din spectrul de emisie se observă ce lungimi de undă sunt emise de probă;
- instrumentele care măsoară fluorescența sunt cunoscute sub denumirea de fluorimetre; acestea folosesc de obicei laseri sau LED-uri ca surse de lumină și fotodiode ca detectori;
- metoda este folosită în domenii precum medicina, biochimia. Aplicațiile includ diagnosticarea cancerului din țesuturi umane, detectarea impurităților sau identificarea și măsurarea concentrației substanțelor, detectarea bacteriilor, virusurilor și paraziților care produc infecții [10].

2.2. Componentele aparatului

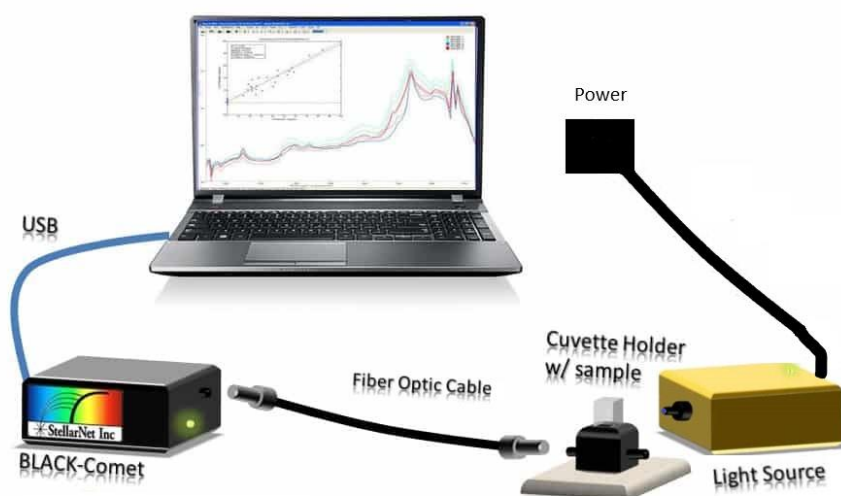


Figura 2.3. Schema bloc a spectrometrului tip StellarNet [11]

Componentele de bază ale spectrometrului StellarNet includ (figura 2.3.):

- a) spectrometrul propriu-zis **BLACK-Comet** care este principalul component al sistemului și este preconfigurat cu un randament optic crescut și o fantă largă de intrare, un detector ultra-sensibil și pentru niveluri de detecție joase, de la 200 nm la 1100 nm. Gridul concav pe care îl are **BLACK-Comet** este singurul element din designul gridului optic, reducând astfel numărul de suprafețe din calea luminii, deci cantitatea de lumină împrăștiată scade semnificativ (0.02% la 435 nm și 0.2% la 200 nm). Gridul de difracție prezintă corecții ale aberațiilor oferind o lungime de bandă cu rezoluție uniformă și forme spectrale clare [12];
- b) sursa de lumină **SL1-LED** care prezintă un con în care se află un LED. Acestea se pot schimba fără nicio modificare a cablurilor de legătură, doar se scoate unul și se introduce cel dorit. Sursa vine cu un kit de 6 LED-uri din spectrul UV și VIS (390, 470, 502, 590, 660 nm și unul cu lumină albă). Fiecare LED poate fi folosit pentru a induce fluorescența în probe, alegându-se cel cu lungimea de undă optimă corespunzătoare [13];
- c) suportul din fibră optică **CUV-F** pentru cuvă prezintă două lentile colimatoare pentru măsurarea fluorescenței produsă de sursa de lumina (SL1-LED) [14];
- d) cabluri de fibră optică **R600-8-UVVIS-SR** folosite pentru lungimi de undă din spectrul UV și VIS formate din 8 fibre optice legate într-o colecție de fibre de aproximativ 1600 μm. Pentru fluorescență, cele 7 fibre exterioare sunt luminate de o sursă de lumină (SL1-LED) și fibra interioară este cea de citire, care colectează emisia scăzută de lumină și duce semnalul înapoi la spectrometru [14];
- e) software-ul **SpectraWiz** instalat pe un computer pentru măsurători precise ale lungimilor de undă în urma emisiei, reflectanței, transmisiei, absorbției luminii. Pe lângă spectroscopia în timp real, software-ul are și aplicații pentru spectroradiometrie și spectrocolorimetrie [15].

Capitolul 3. Acidul dezoxiribonucleic (ADN)

3.1. Noțiuni generale

ADN-ul (acidul dezoxiribonucleic) este o moleculă care conține instrucțiunile biologice care fac fiecare specie unică [16].

A fost pentru prima dată descoperit în 1869, dar rolul său în moștenirea genetică nu a fost demonstrat. În 1953 James Watson și Francis Crick, ajutați fiind de munca biofizicienilor Rosalind Franklin și Maurice Wilkins, au determinat structura ADN-ului, o spirală alcătuită din două catene de ADN înfășurate una în jurul celeilalte. Această descoperire a condus la progrese semnificative în înțelegerea replicării și controlului eredității în mediile celulare [17].

În organismele eucariote, ADN-ul se află într-o zonă specială a celulei numită nucleu. Întrucât celula este foarte mică și organismele au o mulțime de molecule de ADN per celulă, fiecare moleculă de ADN trebuie să fie strâns împachetată. Această împachetare a ADN-ului se numește cromozom [16].

În timpul replicării ADN-ului, acesta se desface pentru a putea fi copiat. Și în alte faze ale ciclului celular, ADN-ul este neîmpachetat pentru ca instrucțiunile pe care le conține să poată fi folosite pentru fabricarea de proteine și pentru alte procese biologice. În timpul diviziunii celulare, ADN-ul este în cea mai compactă formă cromozomială pentru a facilita transferul spre noile celule [16].

Setul complet al unui organism de ADN nuclear se numește genom. Genomul uman este format din aproximativ 3 miliarde de baze și 20000 de gene pe cele 23 de perechi de cromozomi [16].

Fiecare catenă a unei molecule de ADN este formată dintr-un lanț lung de monomeri de nucleotide. Nucleotidele sunt formate dintr-o moleculă de dezoxiriboză la care se atașează o grupare fosfat și una din cele 4 baze azotate: două purine (adenină și guanină) și două pirimidine (citozină și timină) [17].

Bazele azotate de pe cele două catene pereche de ADN se completează conform regulilor lui Chargaff, purină cu pirimidină (A cu T, G cu C) și sunt menținute împreună de legături slabe de hidrogen (duble între A și T, triple între G și C) (figura 3.1).

Fosfatul unui nucleotid este legat covalent (o legătură în care una sau mai multe perechi de electroni sunt împărțite de doi atomi) la glucidul următoarei nucleotide. Legăturile de hidrogen dintre fosfați determină torsiunea ADN-ului. Bazele azotate sunt situate spre interior pe scară și formează perechi cu baze pe cealaltă parte, ca niște trepte [17].

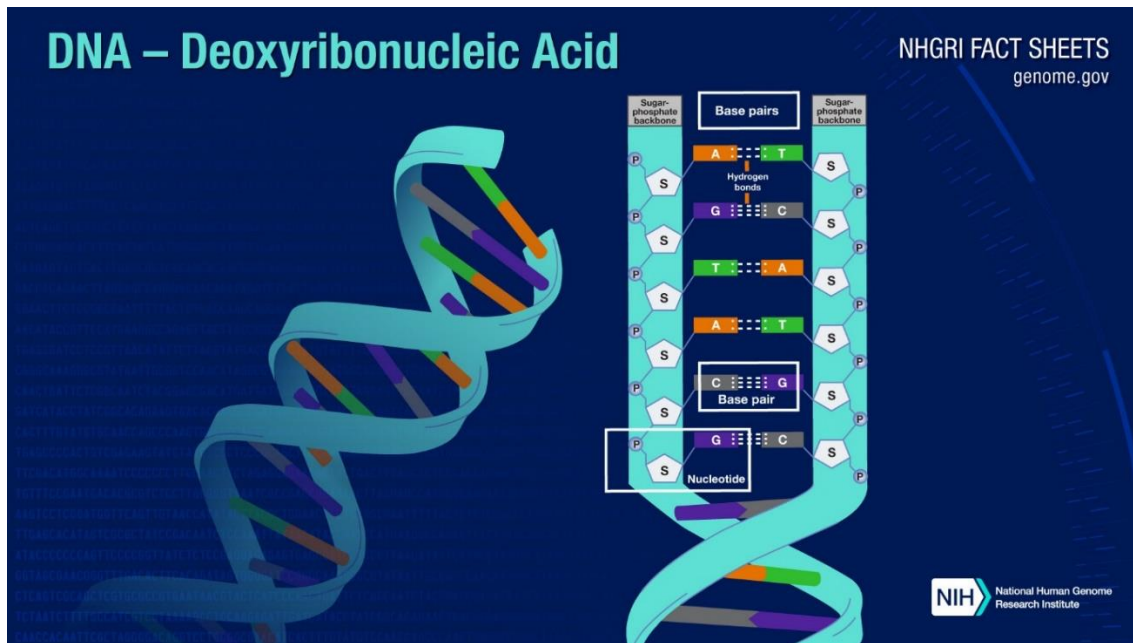


Figura 3.1. Reprezentare schematică ADN și legături de hidrogen [16]

3.2. Caracteristici și proprietăți

Structura dublu catenară a moleculei de ADN îi permite să se replice fidel prin separarea celor două catene, urmată de sinteza noilor catene complementare în concordanță cu secvența originală a catenelor matriță [18].

Structura genelor din genomul uman, precum și factorii determinanți ai expresiei genice sunt specificați în ADN-ul celor 46 de cromozomi umani din nucleul celulei somatice plus ADN-ul cromozomului mitocondrial. Fiecare cromozom uman este alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN dublu catenară, continuă; fiecărui cromozom îi corespunde o moleculă dublu catenară, lungă, astfel că genomul nuclear are 46 de molecule de ADN liniare totalizând peste 6 miliarde de perechi de nucleotide [18].

Cromozomii nu sunt formați numai din ADN-ul dublu catenar. În interiorul fiecărei celule, genomul este organizat în cromatină, în care ADN-ul genomic se asociază cu proteine specializate din clase diferite. Exceptând perioada diviziunii celulare, cromatina este distribuită în tot spațiul nuclear prezentând un aspect relativ omogen la microscop. Atunci când celula se divide, genomul său condensat este vizibil microscopic sub forma cromozomilor. Prin urmare, cromozomii sunt vizibili ca structuri distincte doar în timpul diviziunii celulare, dar își păstrează integritatea și între diviziunile celulare (figura 3.2) [18].

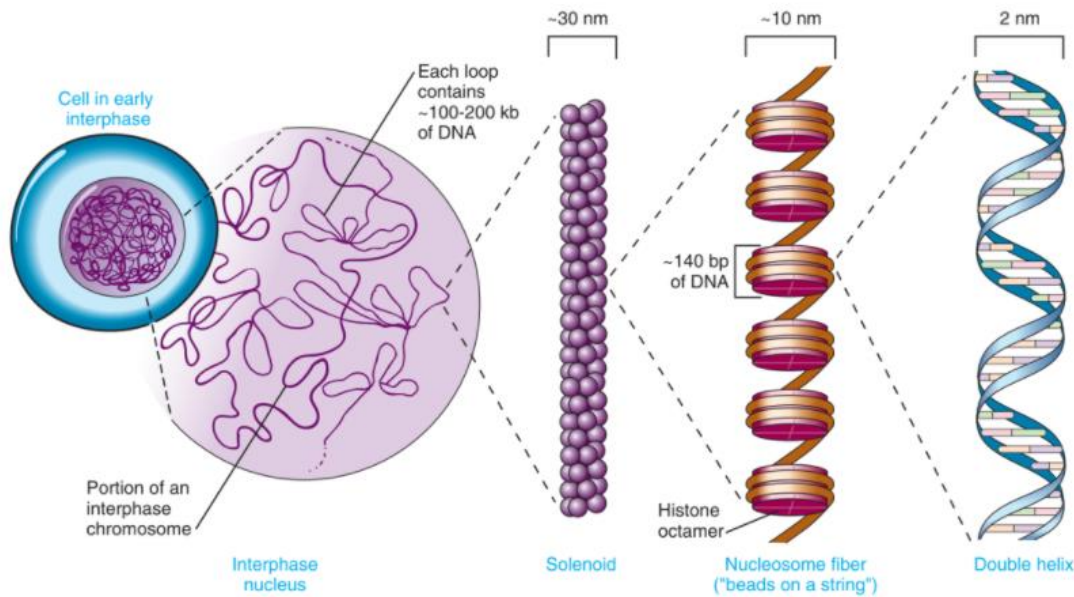


Figura 3.2. Nivelurile de organizare ale cromatinei în cromozom [18]

Informația genetică este conținută în ADN-ul cromozomilor din nucleul celular. Totuși, sinteza proteinelor, procesul prin care informațiile din genom sunt folosite pentru a determina funcțiile celulare, are loc în citoplasmă. Această compartimentare arată faptul că organismul uman este de tip eucariot. Celulele umane au nucleu, separat de citoplasmă prin membrana nucleară, iar nucleul celulelor conține genomul uman [18].

3.3. Structurile biomoleculare

Structura biomoleculară reprezintă gradul de împachetare intrinsecă, forma tridimensională pe care o ia molecula de proteine, ADN sau acid ribonucleic (ARN) și care este importantă pentru funcția acesteia. Structura acestor molecule poate fi considerată pentru oricare scară de lungimi, de la atomi individuali la relațiile dintre subunitățile unei întregi proteine [19].

Structura primară a unui biopolimer este specificarea exactă a compoziției sale atomice și a legăturilor chimice care conectează acești atomi. Pentru un biopolimer obișnuit neramificat, fără *crosslink* (precum o moleculă a unei proteine intercelulare tipice sau una de ADN sau ARN), structura primară este echivalentă cu specificarea secvenței subunităților monomerice, a aminoacizilor sau a nucleotidelor. Secvența de acizi nucleici se referă la secvența exactă a nucleotidelor care includ întreaga moleculă [19].

Structura secundară a acizilor nucleici sunt interacțiunile perechilor de baze într-un singur polimer de acid nucleic sau dintre doi polimeri. Poate fi reprezentată ca o listă de baze care sunt perechi într-o moleculă de acid nucleic. Structura secundară a ADN-ului și a ARN-ului sunt puțin diferite: ADN-ul biologic există sub formă dublu catenară a perechilor de baze în majoritatea timpului, spre deosebire de ARN care prezintă o singură catenă. Din alt punct de vedere, structura secundară este

considerată vitală în *design*-ul structurilor acizilor nucleici pentru nanotehnologia ADN și analiza computerizată a ADN-ului din moment ce *pattern*-ul perechilor de baze determină structura moleculei [20].

Structura terțiară este reprezentată de forma tridimensională a polimerului de acid nucleic. Moleculele de ADN și ARN sunt capabile de diverse funcții, de la recunoașterea moleculară la cataliză. Aceste funcții necesită o structură terțiară tridimensională precisă [21].

Cu alte cuvinte, răsucirea structurii secundare (bidimensionale) a ADN-ului conduce la formarea structurii terțiare (tridimensionale).

Forma de dublu helix este o parte importantă a structurii terțiare a moleculelor de acid nucleic care este în strânsă legătură cu cea secundară. Helixul dublu al acidului nucleic este un polimer spiral, de obicei răsucit spre dreapta, care conține două catene de nucleotide perechi. O singură răsucire a helixului constă din aproximativ zece nucleotide și prezintă o depresiune majoră (*major groove*) și una minoră (*minor groove*). Depresiunea majoră este mai largă și, de aceea, proteine ca cele implicate în transcripție se leagă aici [20].

În ceea ce privește fluoroforul (Sybr Green) folosit pentru a marca ADN-ul dublu catenar în lucrarea de față, acesta se leagă de depresiunea minoră.

Structura cuaternară a acizilor nucleici se referă la interacțiunile dintre molecule separate de acizi nucleici sau dintre acestea și proteine. Structura cuaternară are impact asupra funcției. De exemplu, când ADN-ul este împachetat sub formă de cromatină, o structură cuaternară, transcripția genică este inhibată [22].

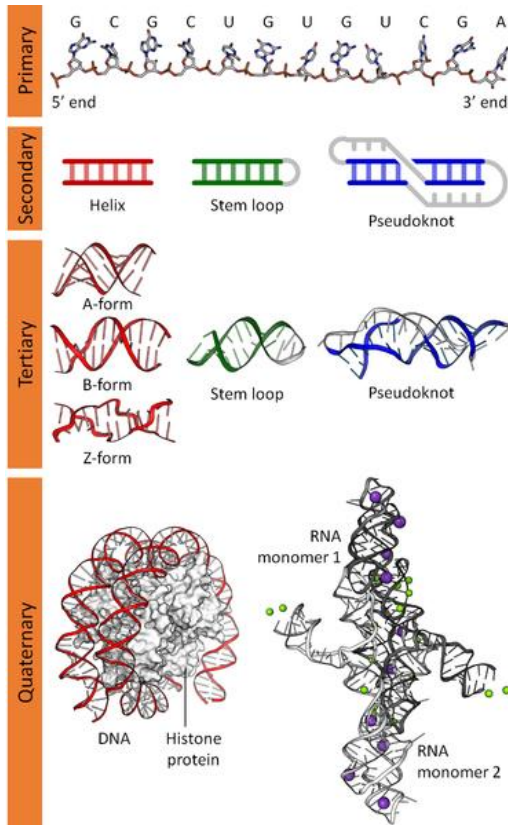


Figura 3.3. Cele patru tipuri de structuri biomoleculare [23]

3.4. Denaturarea

Procesul prin care ADN-ul dublu catenar (ADN_{dc}) devine monocatenar (ADN_{mc}) folosind agenți chimici sau fizici se numește denaturare (figura 3.4). Un agent de denaturare rupe legăturile de hidrogen dintre cele două catene și blochează renaturarea temporar sau permanent. Este de subliniat faptul că legăturile fosfodiesterice dintre nucleotidele adiacente nu sunt afectate de denaturare. Forma naturală și stabilă a ADN-ului uman este dublu catenară [24].

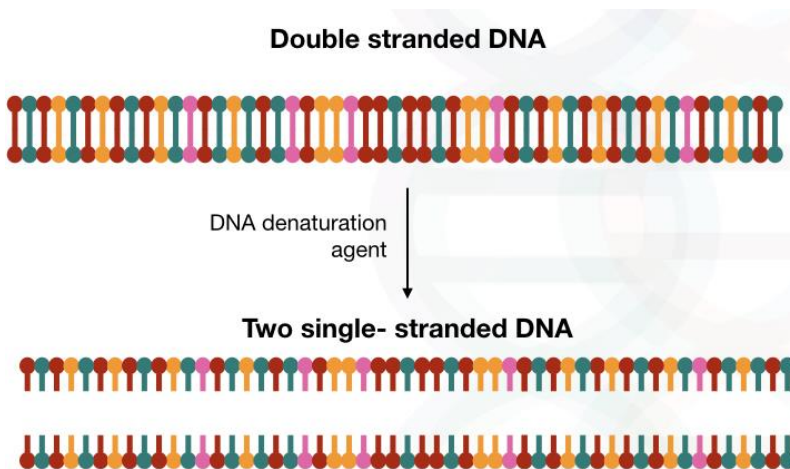


Figura 3.4. ADN_{dc} și ADN_{mc} [25]

Când vorbim despre sinteza *in vivo*, în timpul replicării, este nevoie de o singură catenă de ADN pentru a iniția procesul de citire a informației de pe lanțul ADN-ului. La fel se întâmplă și în cazul proceselor *in vitro* precum PCR (*polymerase chain reaction*), secvențiere a ADN-ului, electroforeză în gel de agaroză sau *microarray* [24].

Agenții fizici de denaturare sunt: căldura, radiația UV, presiunea înaltă sau ultrasunetele [24].

Agenții chimici de denaturare sunt: acizii, bazele, metalele grele, sărurile de uree, guanina și detergenții bazați pe aceasta, NaOH-ul, propilenul glicol [24].

3.5. Marcarea cu Sybr Green

Sybr Green (SG) este un fluorofor asimetric de cianină folosit pentru acizii nucleici în biologia moleculară și are formula chimică $C_{32}H_{37}N_4S^+$ (figura 3.5) [26].

Sybr Green este folosit pentru analiza cantitativă a ADN-ului dublu catenar. Acesta se leagă de depresiunea minoră a ADN-ului și are maximul de excitație la 498 nm, iar cel de emisie fluorescentă la 521 nm (figura 3.6) [27].

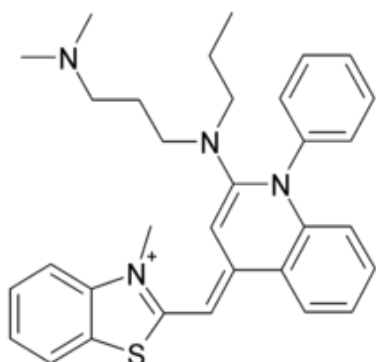


Figura 3.5. Structura chimică Sybr Green [26]

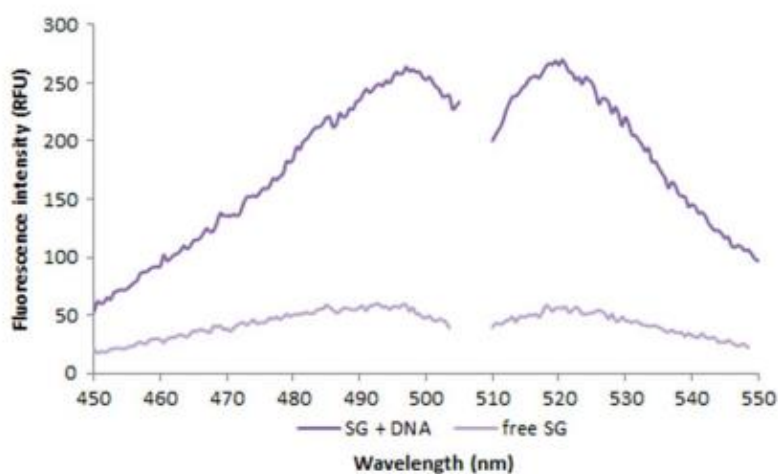


Figura 3.6. Spectrul de excitație și emisie a Sybr Green 1.0X liber (mov deschis) și în prezența a 50 ng/mL de ADNdc de somon (mov închis) [28]

Principalul avantaj pe care îl prezintă acest fluorofor este concentrația mică de ADNdc de care este nevoie pentru a obține semnal. Astfel limita cea mai joasă de detecție necesită doar două picograme de ADNdc per măsurătoare. De asemenea, și Sybr Green-ul este diluat până când este detectabil, în intervalul de 1:8000 – 1:10000 în soluția finală [29].

Capitolul 4. Materiale și metode

4.1. Procurarea probelor

Pentru realizarea experimentelor, am procurat ADN genomic de șoarece (Novagen Material Number 69239-3) de la compania Merck. ADN-ul provenea din sângele unor șoareci sănătoși. Pentru conservare, cele 100 μg au fost ținute la frigider, într-o soluție de TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

TE Buffer este format din Tris, buffer care menține pH-ul setat la 8, și EDTA care chelează cationii și are rolul de a solubiliza ADN-ul și de a-l proteja de degradare.

De asemenea, pentru observarea semnalului de la ADN-ul dublu catenar la spectrometru, am folosit Sybr Green I de la Thermo Scientific (Invitrogen Catalog Number - S-7567), păstrat în TE Buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA).

Pentru a determina pH-ul unor probe, am utilizat hârtie indicatoare MilliporeSigma colorpHast cu un interval de măsurare a pH-ului între 0 și 14.

Soluțiile pe care le-am folosit pentru denaturarea ADN-ului au fost HNO_3 68%, NaOH 1%, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ și NaCl, pe care le-am diluat ulterior.

Pentru măsurătorile la spectrometru, am folosit flacoane/cuve Avantor VWR de sticlă pură de 1 mL, 40x8 mm. Am optat pentru cuve înguste.

4.2. Pregătirea probelor

Am încercat mai multe valori ale concentrațiilor și ale volumelor celor două substanțe până am obținut rețeta cea mai eficientă conformă cu protocolul de pregătire a soluției de Sybr Green cu ADNdc [31].

Am utilizat volume de la 25 μL ADN cu 300 μL SG 1% până am ajuns la 5 μL , iar volumul de SG l-am scăzut, treptat, până la 100 μL . De asemenea, am redus timpul de integrare de la 5000ms la 1000ms. Astfel, prima probă măsurată avea parametrii: 25 μL ADN 10ng/ μL , 300 μL SG 1% și 500 μL apă.

Am folosit o pipetă de laborator pentru a dilua SG-ul de concentrație 10%; am extras 100 μL din acesta și am adăugat peste 900 μL de TE Buffer, rezultând SG 1%.

Proba de control avea următoarea compoziție: 5 μL ADN 10ng/ μL (diluat în TE Buffer), 100 μL SG (1%) și 300 μL apă.

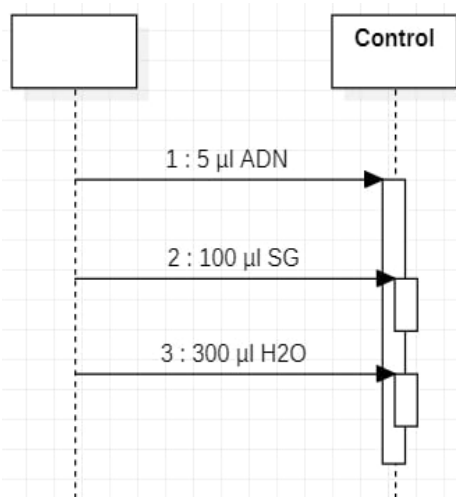


Figura 4.1. Schemă pregătire probă control

Măsurând pH-ul probei de control cu hârtia indicatoare, am obținut o valoare de 7.



Figura 4.2. Probă în spectrometru, neacoperită, înainte de măsurare, iluminat cu LED

Am identificat trei etape în care am urmărit influența pH-ului și a concentrației de ioni:

A) influența pH-ului:

A.1.) în mediu acid, cu HNO_3

Am folosit o pipetă de laborator pentru a adăuga la proba de control $1\mu\text{L}$ HNO_3 68%, cu un pH între 1 și 2.

Neobținând niciun semnal de la SG, am diluat HNO_3 -ul de la 68% la 34%, adăugând $1\mu\text{L}$ de acid în $200\mu\text{L}$ de apă și formând o soluție cu pH-ul 2. Din această soluție am luat, pe rând, câte $5\mu\text{L}$ și i-am adăugat peste soluția de control (figura 4.3.). M-am oprit când nu am mai obținut semnal de la SG (pasul 5), moment în care volumul de HNO_3 34% adăugat era de $20\mu\text{L}$, iar pH-ul probei era 3.

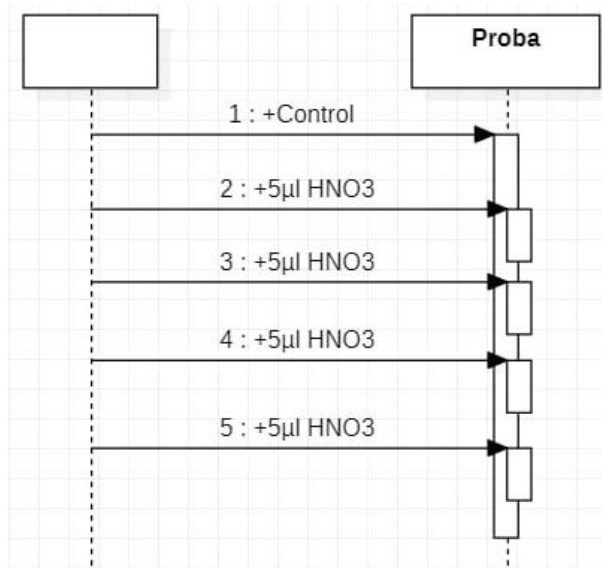


Figura 4.3. Schemă pregătire probă pH acid

A.2.) în mediu bazic, cu NaOH

Am luat, pe rând, câte 5μL de NaOH 1% și i-am adăugat peste soluția de control (figura 4.4.). În momentul în care nu am mai observat semnal de la SG (pasul 6), aveam un volum adăugat de **25μL de NaOH 1%**, iar pH-ul probei era **12**.

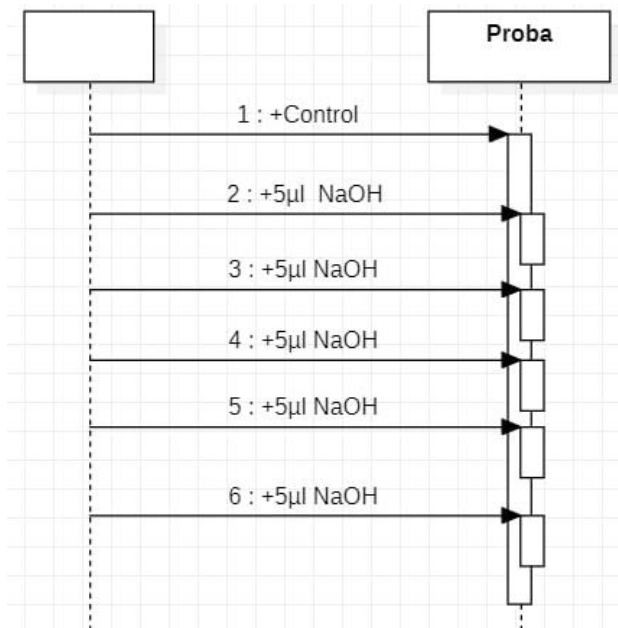


Figura 4.4. Schemă pregătire probă pH bazic

Am verificat și o soluție de 5μL ADN, 100μL SG și 300μL ser fiziologic (NaCl 9%) și, după cum era de așteptat, am obținut semnalul specific de fluorescență al Sybr Green-ului.

B) influența ionilor de Ca:

După ce am pregătit o soluție de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M din 0.82g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ și 5mL apă; am pipetat 300μL din aceasta peste cei 5μL ADN și 100μL SG, neavând semnal de la SG.

Am luat $40\mu\text{L}$ de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M și am pipetat în $360\mu\text{L}$ apă, formând o soluție cu concentrația de 0.1M . Am pregătit din nou $5\mu\text{L}$ ADN și $100\mu\text{L}$ SG peste care am adăugat $300\mu\text{L}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.1M (figura 4.5.).

Am repetat până când am obținut semnal de la SG, la o concentrație de **0.01M** (pasul 6).

Am efectuat măsurători până la o concentrație de 10^{-4}M .

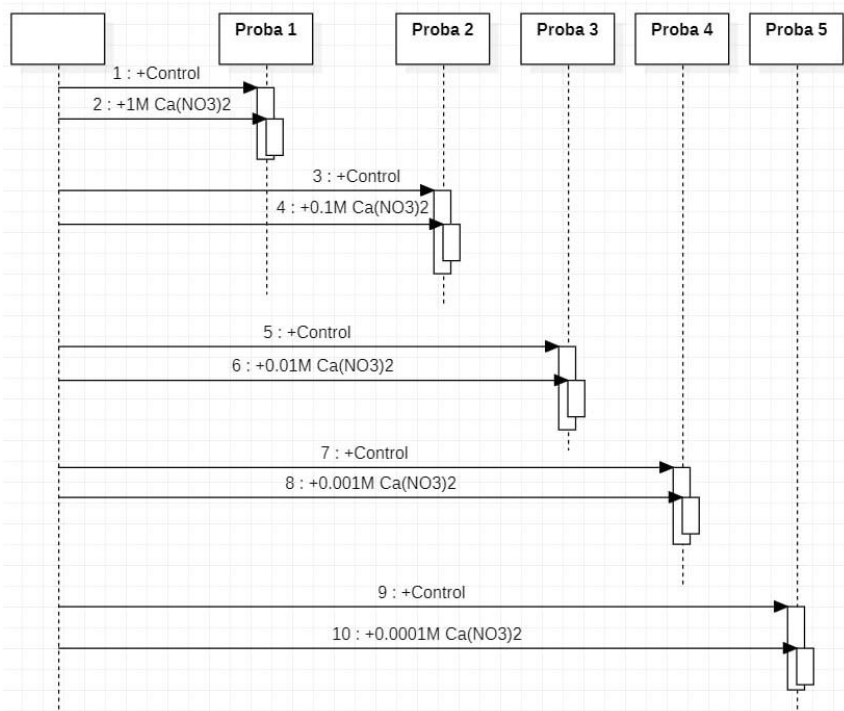


Figura 4.5. Schemă pregătire probă cu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

C) influența ionilor de Cl:

După ce am pregătit o soluție de NaCl 1M din 0.29g NaCl și 5mL apă; am pipetat $300\mu\text{L}$ din aceasta peste cei $5\mu\text{L}$ ADN și $100\mu\text{L}$ SG, neavând semnal de la SG.

Am luat $40\mu\text{L}$ de NaCl 1M și am pipetat în $360\mu\text{L}$ apă, formând o soluție cu concentrația de 0.1M . Am pregătit din nou $5\mu\text{L}$ ADN și $100\mu\text{L}$ SG peste care am adăugat $300\mu\text{L}$ NaCl 0.1M (figura 4.6.).

Am repetat până când am obținut semnal de la SG, la o concentrație de **0.1M** (pasul 4).

Am efectuat măsurători până la o concentrație de 10^{-4}M .

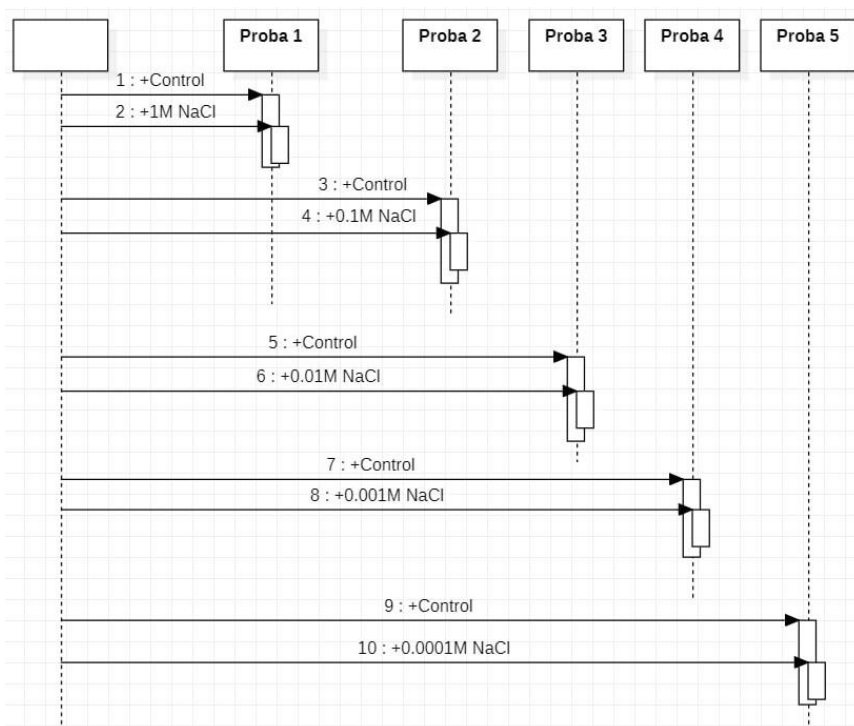


Figura 4.6. Schemă pregătire probă cu NaCl

4.3. Parametrii de achiziționare a datelor

După ce am instalat software-ul SpectraWiz pe laptop, am conectat spectrometrul printr-un cablu USB, proba era iluminată sub un unghi de 90 de grade fiindcă trebuie separat semnalul de emisie de cel de excitație.

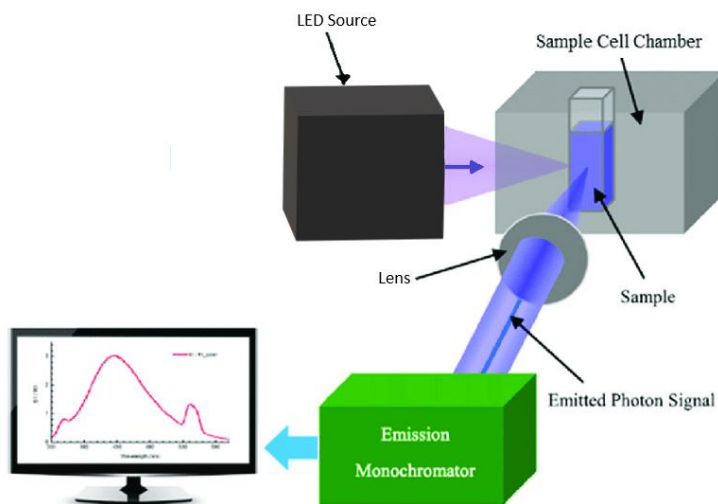


Figura 4.7. Schemă setup folosit [30]

Am poziționat recipientul în cuvă, am acoperit-o și am închis luminile din încăperea. Am pornit sursa de lumină cu LED-ul de 470 nm. Pe monitor a apărut un spectru cu un peak semnificativ la 470 de nm (cel dat de sursă) și un fundal de o intensitate scăzută din cauza zgomotului. Am salvat acest spectru, pe care ulterior l-am folosit ca spectru de referință. Pe abscisă se află lungimea de

undă în nanometri, iar pe ordonată intensitatea (figura 4.8.). Informațiile se salvează cu extensia SSM (*SCOPE mode file*) într-un fișier text care ulterior poate fi plotat în orice soft.

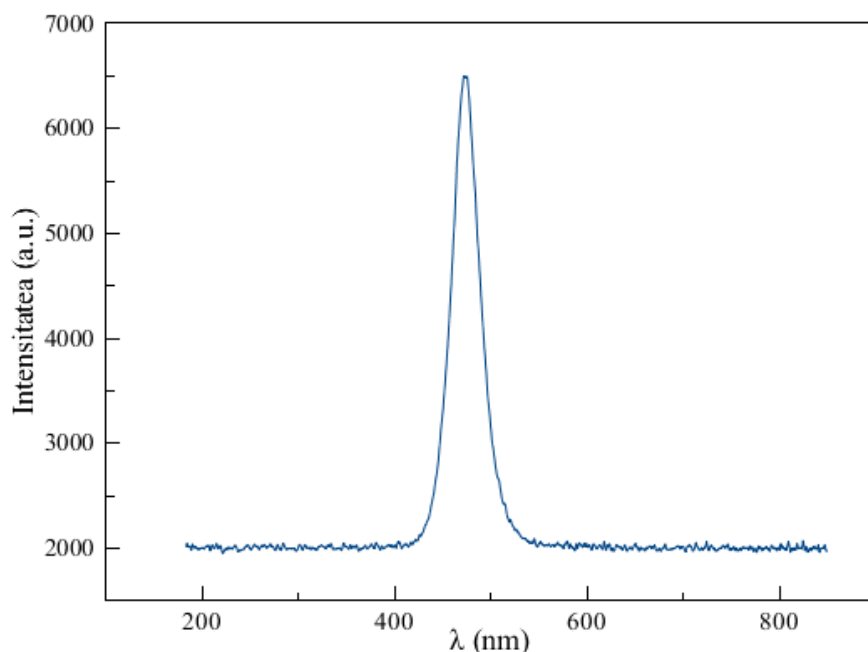


Figura 4.8. Spectru referință sursă

Timpul de integrare reprezintă perioada de timp în care detectorul primește fotoni de la probă înainte de a-i transforma în semnal. Se alege o valoare (între 1 și 1000ms) a timpului de integrare astfel încât spectrul să nu fie saturat, dar cât de aproape posibil de 65000 de numărări pe axa Oy. Dacă o porțiune a spectrului este în afara graficului, se reduce timpul de integrare [31].

Se ține cont de faptul că afișajul în timp real este actualizat după ce numărul de spectre a fost achiziționat. Această opțiune permite o uniformizare pe axa Y, crescând efectiv raportul semnal-zgomot al sistemului prin rădăcina pătrată a numărului de scanări a cărăror medie se face. Se setează numărul mediu de scanări la cel mai mare număr unde este suficient semnal luminos și timpul de integrare este scurt [32].

Din meniu, de la ''Setup'', am selectat timpul de integrare al detectorului și numărul mediu de scanări. Pentru măsurătorile efectuate am ales un timp de integrare de 1000 ms. În ceea ce privește numărul de scanări, am considerat că două scanări ar fi optime.

După setarea parametrilor, pe ecran am obținut instant un grafic (figura 4.9.) de pe care puteam citi coordonatele peak-ului fie apăsând click-dreapta pe spectru, fie mutând cursorul pe acesta și citindu-le în bara de jos, de sub grafic.

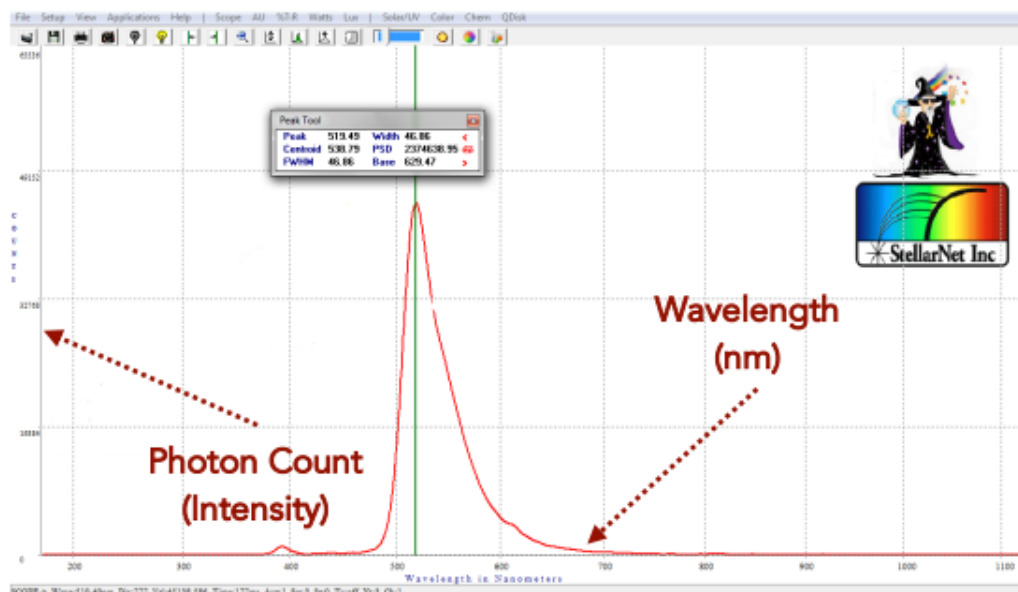


Figura 4.9. Reprezentare spectru în SpectraWiz [31]

Probele au fost analizate la spectrometrul StellarNet Black-Comet, folosind o sursă LED cu lungimea de undă 470 nm. Am utilizat această sursă deoarece era cea mai potrivită pentru excitarea SG-ului care are un maxim la 498 nm (figura 1.7.).

Măsurătorile au fost repetate de 3 ori pentru fiecare probă.

4.4. Procesarea datelor

După achiziționarea spectrelor, le-am salvat și le-am plotat într-un soft specializat pentru grafice. Am importat fișierul text cu valorile spectrale în MagicPlot, s-a creat un tabel cu două coloane, una a lungimilor de undă și cealaltă a intensităților, iar din acesta am obținut graficul.

Pe axa orizontală se găsesc lungimile de undă, iar pe cea verticală intensitățile (figura 4.10.).

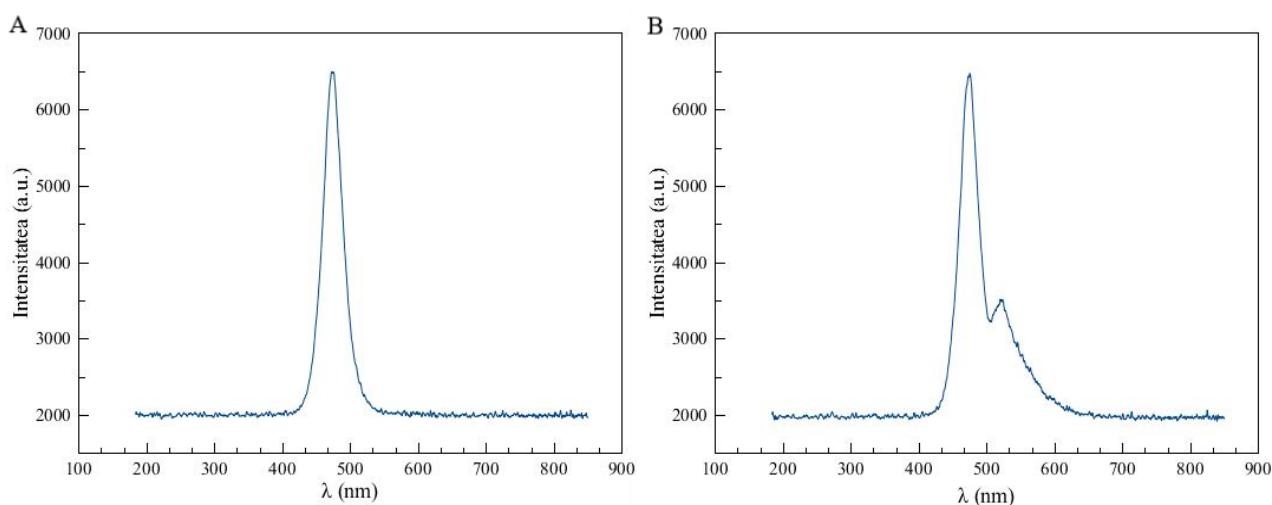


Figura 4.10. Grafic spectral: A. Spectru sursă de excitare, B. Spectru probă cu ADNc

Folosind soft-ul Quasar Orange am procesat datele și spectrele (figura 4.11.).

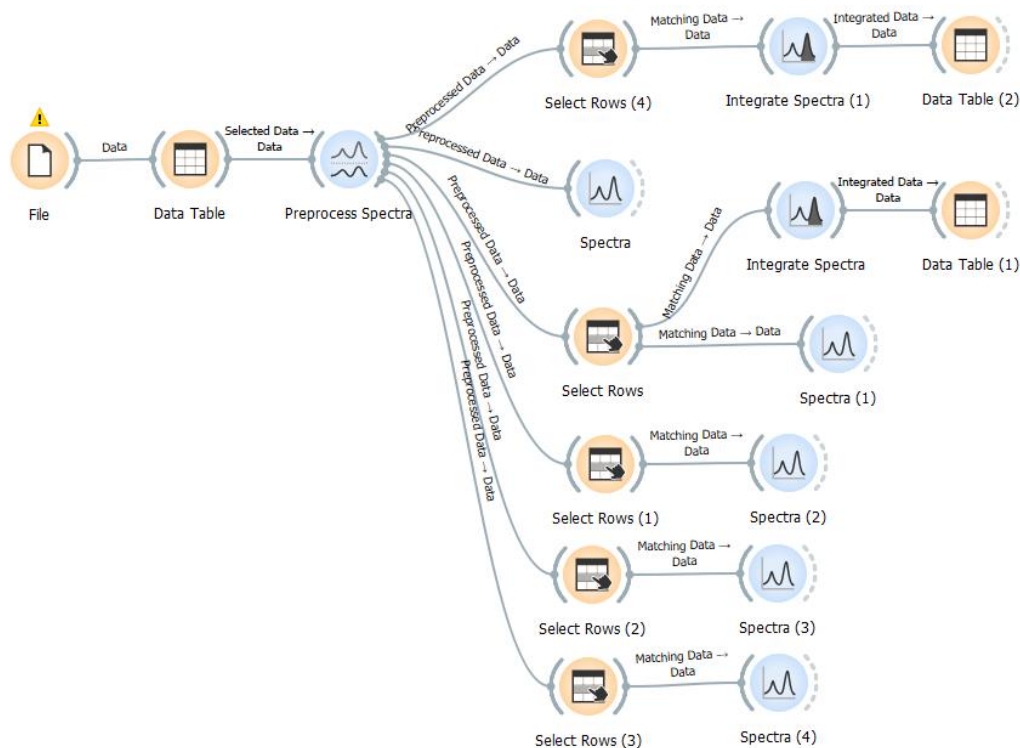


Figura 4.11. Workflow din Quasar

După importarea datelor dintr-un fișier Excel, în faza de preprocesare a spectrelor, am folosit următoarele opțiuni (figura 4.12.):

- „Cut” pentru a păstra din intervalul lungimilor de undă, doar segmentul în care se găseau peak-urile de interes;
- „Baseline Correction” pentru a avea pe axa intensităților valorile de la zero;
- „Normalize Spectra” pentru a normaliza valorile; am selectat „Area Normalization” și „Peak from 0” pentru a obține toate peak-urile de la LED în aproximativ același punct, deoarece sursa de excitație era constantă;
- „Gaussian smoothing” pentru a reduce zgomotul; am setat valoarea deviației standard (SD) la 5 considerând-o suficientă pentru a-și îndeplini scopul, dar nu prea mare încât să pierdem din informație.

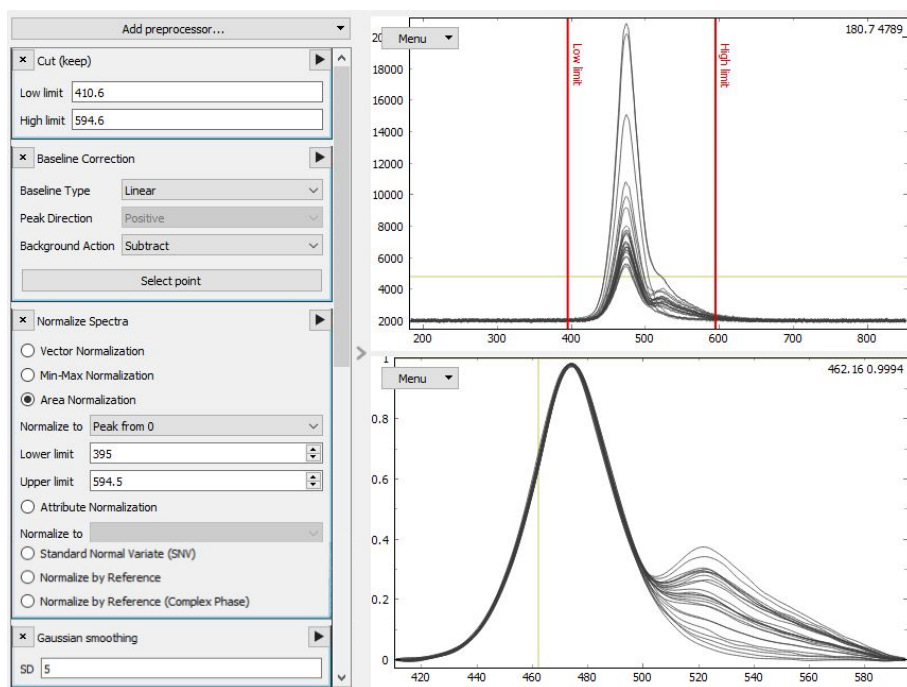


Figura 4.12. Opțiuni preprocesare folosite

După efectuarea pașilor menționați, am vizualizat pe un grafic, toate spectrele măsurate, în funcție de un parametru evidențiat (colorat) (figura 4.13.). De exemplu, în figura de mai jos, am ales ca parametru pH-ul acid și neutru (1, 3, 7) și avem cele trei culori corespunzătoare (albastru, roșu, verde) – din colțul din dreapta sus – reprezentate grafic. Linia intensă conține valoarea medie a celor 3 spectre măsurate și este încadrată o zonă mai deschisă, cu intervalul pe care s-a făcut media. În imagine se vede numai variația la pH 7. La pH-urile 1 și 3 variația este atât de mică încât nu se vede.

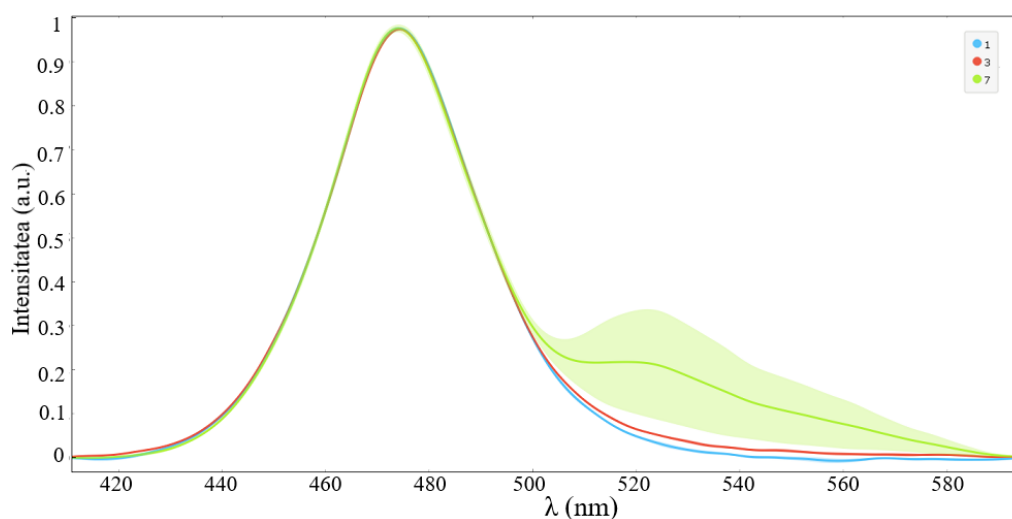


Figura 4.13. Spectre măsurate, colorat pentru pH acid și neutru, valoarea medie (culoare închisă)

Folosind soft-ul SciDAVis, am făcut graficele intensității în funcție de concentrația de ioni sau de pH; rezultatele sunt prezentate în capitolul următor.

Capitolul 5. Rezultate și discuții

5.1. Rezultate

Măsurătorile efectuate pe diferite probe se desfășurau între cele două situații prezentate în figura 5.1. Rezultatele se traduceau prin prezența (peak-ul albastru de pe grafic, la 521 nm) sau absența semnalului de la SG. Cu alte cuvinte, dacă aveam semnal, SG-ul era legat de ADNdc, iar dacă lipsea semnalul, ADN-ul era mono-catenar, deci denaturat.

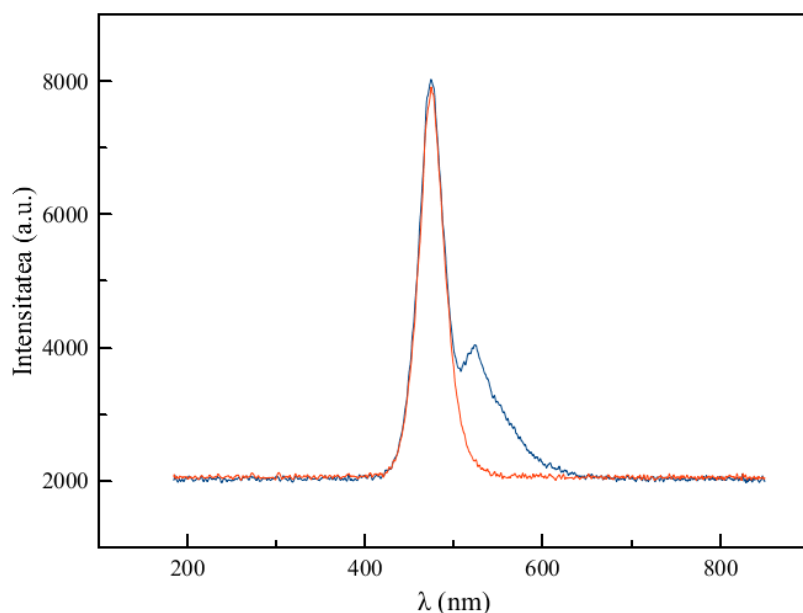


Figura 5.1. Spectru neprocesat: semnal de la SG legat de ADNdc (albastru), semnal de la LED (roșu)

Din informațiile obținute în urma procesării spectrelor (baseline correction, normalizare și netezire) în Quasar, am extras un tabel cu valorile intensităților pentru peak-urile de 521 nm (emisia SG-ului, figura 1.7.). Cu valorile date, am făcut grafice în funcție de pH și de concentrația de ioni pentru a vedea dependența semnalului de acești parametri.

Întrucât am efectuat 3 măsurători pentru fiecare probă, am luat valoarea medie a intensității în tabelele de mai jos.

a) Influență pH

Am ales din totalitatea spectrelor obținute, patru imagini exemplare pentru probele analizate: spectrele pentru control la pH = 7 (figura 5.2.a.), spectrele la pH = 1 (figura 5.2.b.), spectre la pH = 3 (figura 5.2.c.) și spectre la pH = 12 (figura 5.2.d.).

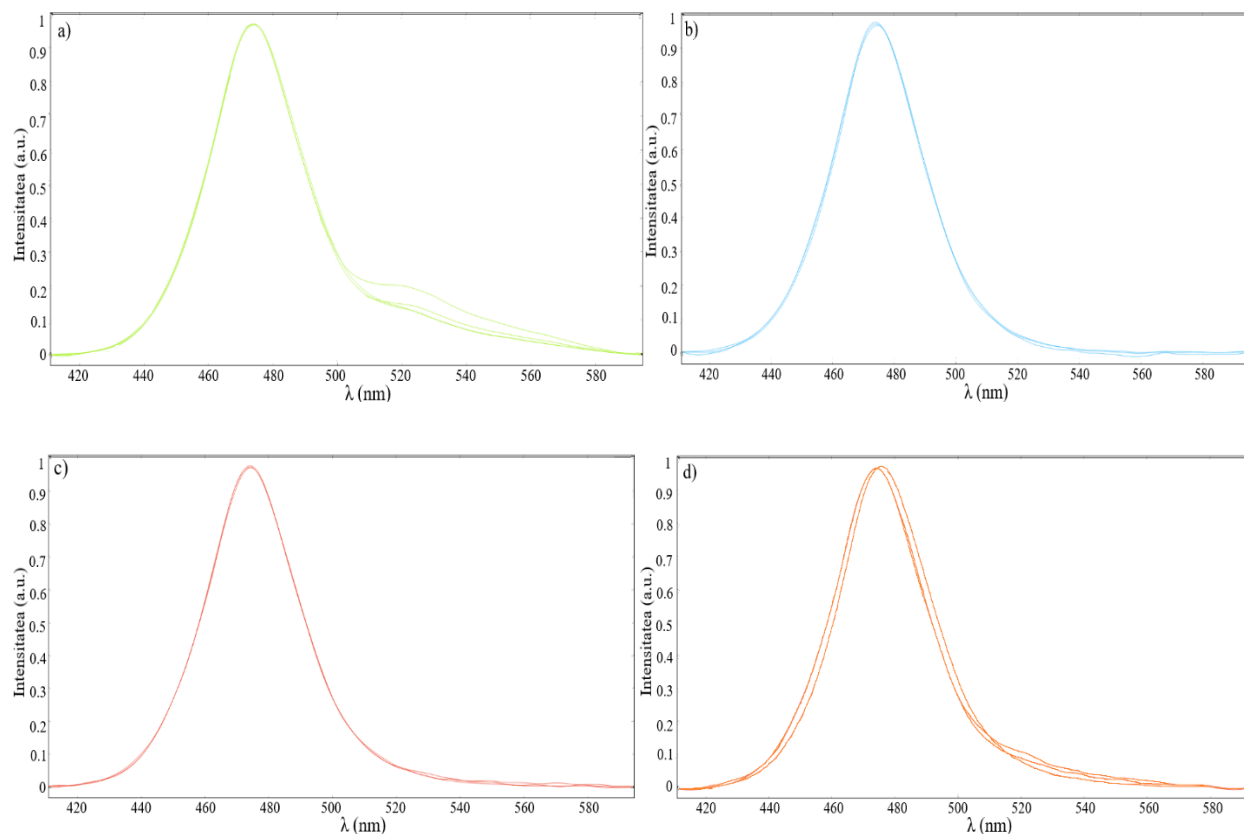


Figura 5.2. Spectrele probei a). control (pH 7), b). la pH 1, c). la pH 3 și d). la pH 12

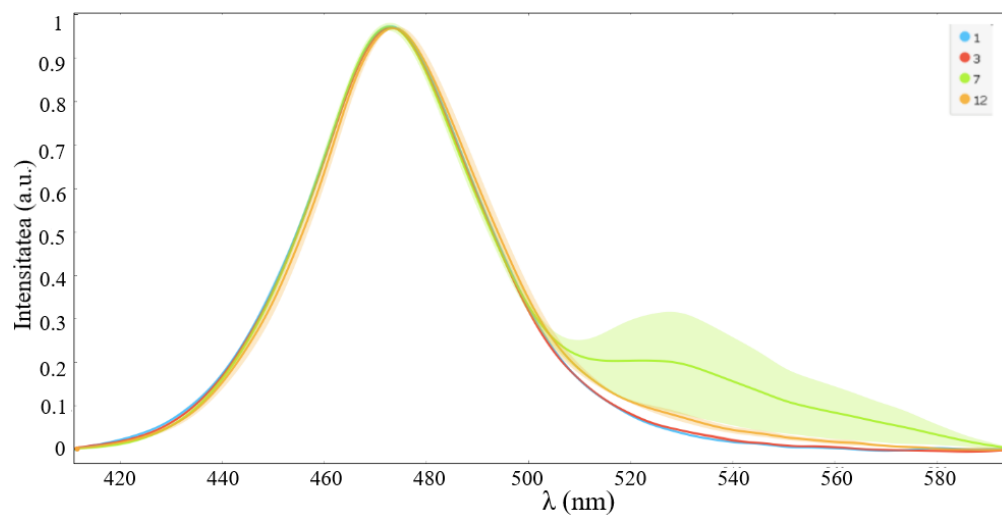


Figura 5.3. Spectre în funcție de pH, valori medii și varianță

Tabel 5.1. Tabel pH și intensitate medie

pH	Intensitatea medie $\times 10^{-2}$ (a.u.)	S.D. $\times 10^{-2}$
1	4.64	0.7
3	5.29	0.81
7	20.2	4.74
12	8.41	1.1

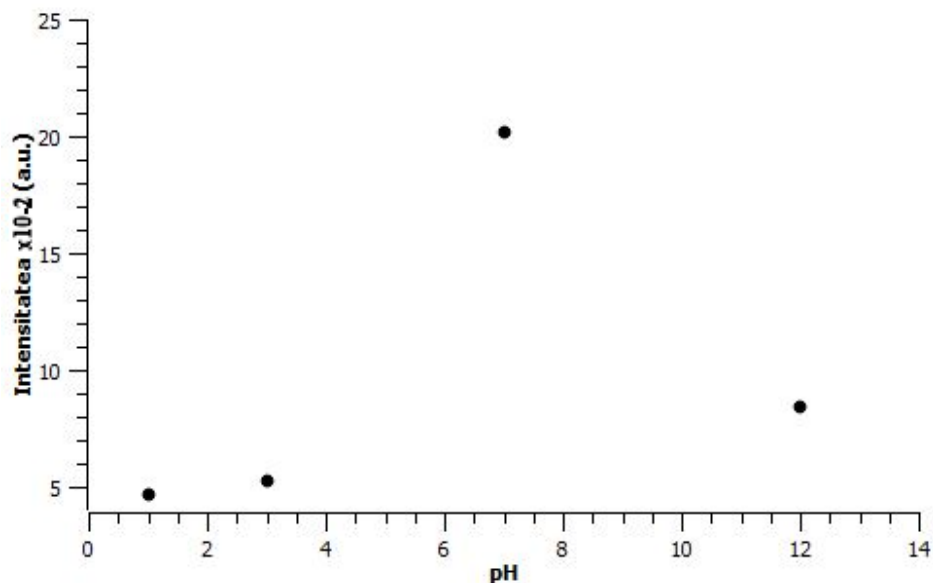


Figura 5.4. Grafic intensitate medie semnal în funcție de pH

După cum se observă în figura de mai sus, pentru valori de pH 1 și 3 respectiv 12, ADN-ul se denaturează, intensitatea semnalului de la SG fiind scăzută. De asemenea, se poate concluce că acidul afectează la variații de concentrații mai mici catena dublă, valorile nefiind echidistante față de situația control, pH=7.

b) Influență concentrație de ioni

Am ales din totalitatea spectrelor obținute, valorile medii (linii mai intense) pentru concentrațiile de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ după cum urmează (figura 5.5.): 1M, 0.1M, 0.01M, 0.001M, respectiv 0.0001M. Se observă un răspuns nelinier a dispariției peak-ului în funcție de concentrația utilizată (figura 5.7). Am procedat similar pentru NaCl (figura 5.6).

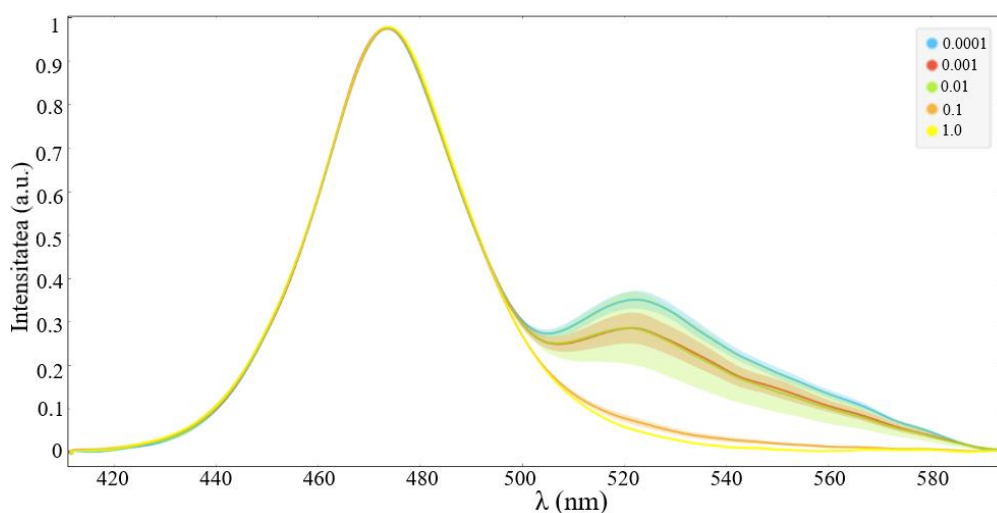


Figura 5.5. Spectre în funcție de concentrația de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

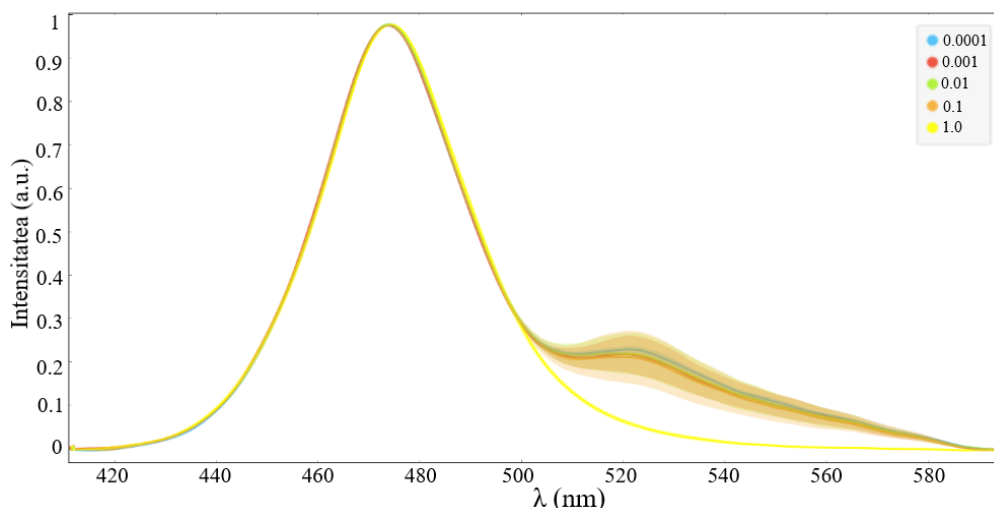
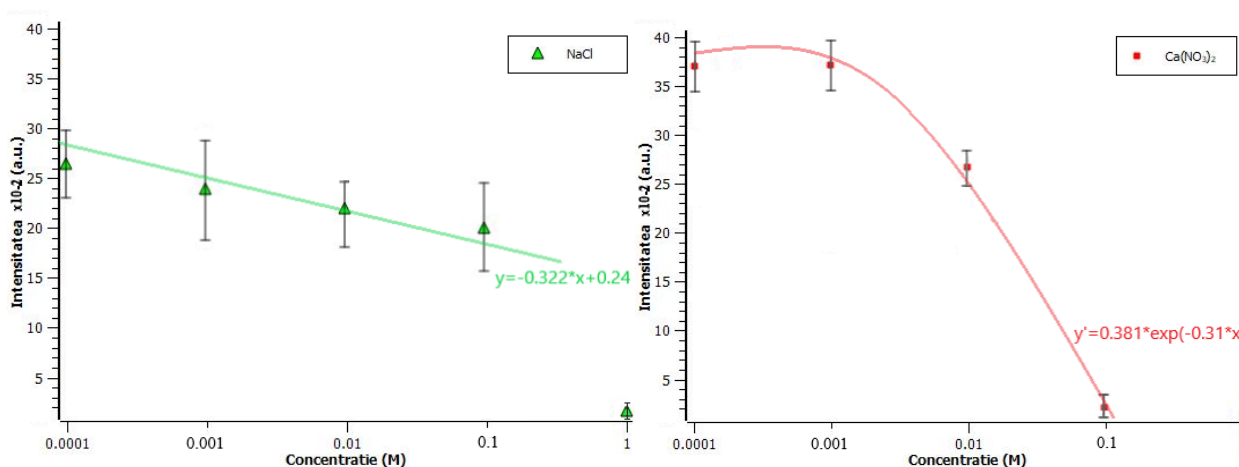


Figura 5.6. Spectre în funcție de concentrația de NaCl

Tabel 5.2. Tabel concentrație de ioni și intensitate medie

Concentrație ioni (M)	Intensitate medie NaCl $\times 10^{-2}$ (a.u.)	S.D. $\times 10^{-2}$ NaCl	Intensitate medie $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 10^{-2}$ (a.u.)	S.D. $\times 10^{-2}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
1	1.08	0.06	1.31	0.04
0.1	21.35	0.9	3.27	0.1
0.01	22.33	0.7	28.13	0.18
0.001	23.84	1.2	37.78	0.29
0.0001	26.47	0.7	37.31	0.27

Scara abscisei din graficul de mai jos este logaritmică deoarece concentrațiile folosite au fost puteri (negative) ale lui 10. În urma fitării rezultatelor obținute în programul SciDavis, am obținut următoarele ecuații: ecuație liniară cu $a = -0.322$ și $b = 0.24$ pentru NaCl, respectiv o ecuație exponențială de tip $y = 0.381 * e^{-0.31*x}$ pentru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (figura 5.7.).

Figura 5.7. Grafic intensitate medie semnal în funcție de concentrația de ioni, bare de eroare cu deviație standard, stânga fit liniar pt NaCl (linia verde) și dreapta fit exponențial pt $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (curba roșie)

În ceea ce privește concentrația de ioni, aceștia afectează în mod diferit catena dublă. Urmărind graficul de mai sus, se constată că de la proba în care am adăugat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ nu este semnal până la o concentrație de 0.01 M, iar de la cea cu NaCl doar până la 0.1 M (tabel 5.2.). Un motiv pe care l-am luat în considerare este competitivitatea SG cu Ca^{2+} de legare de ADN-ul dc pe care îl stabilizează; de unde și lipsa mai lungă de semnal de la SG în proba cu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

5.2. Interpretarea rezultatelor

A fost demonstrat că în prezența ADN-ului dublu catenar chiar în concentrații scăzute, fluorescența SG-ului crește semnificativ, adică sensibilitatea este sub 10pg/mL. Această proprietate face SG-ul potrivit pentru aplicații în biologia moleculară precum detecția ADN-ului în analiza PCR sau urmărirea dinamicii digestiei enzimatice a ADN-ului sau marcarea cromozomilor [33].

În studiul de față am observat asemănarea spectrelor obținute cu cele descrise în literatura de specialitate. În articolul lui B. Bruijns et al. [28] s-au folosit 50ng/ μL ADN de somon. S-a constatat o creștere a intensității semnalului de la SG-ul legat de ADNdc de aproximativ 6 ori. În experimentul realizat, am folosit 10ng/ μL ADN de șoarece, iar creșterea pe care am observat-o în emisia SG-ului legat de ADNdc a fost de 4 – 7 ori, ceea ce ne confirmă că datele obținute sunt în conformitate cu literatura.

În studiile anterioare s-a raportat un interval de pH între 3 și 9 în care ADN-ul este stabil. Dacă pH-ul devine mai acid sau mai alcalin, moleculele de ADN sunt denaturate [34]. În lucrarea de față, intervalul pe care l-am obținut pentru care ADN-ul era stabil este 3 – 12, iar pH-ul optim pe care l-am observat este 7 urmărind mărimea peak-ului de la 521 nm, unde markerul SybrGreen are emisie maximă.

Un alt aspect pe care l-am obținut în urma măsurătorilor este că în momentul în care introducem calciu în soluția control, apare competitivitate între acesta și SG de legare la ADN-ul dc. Întrucât ADN-ul are o afinitate crescută pentru Ca [35], face mai dificilă legarea SG-ului. Din această cauză observăm o tendință diferită între soluția cu $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ și NaCl (figura 5.7.). Pentru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ am obținut o dependență exponențială a semnalului față de concentrație, iar pentru NaCl dependența era liniară.

În ceea ce privește perspectivele, această metodă este fezabilă pentru a seta condiții de măsurare de fluorescență a emisiei Sybr Greenului pentru diferite tipuri de ADNdc, în concentrații foarte mici.

Concluzii

Începând cu Miescher, continuând cu Watson și Crick și atingând apogeul cu Proiectul Genomul Uman, lumea a fost preocupată să găsească și să înțeleagă ce stă la baza ființelor, ce le face unice și ce le diferențiază. Astăzi, avem încă nenumărate întrebări, dar și răspunsuri pe care cu greu le-ar fi intuit cineva. Din această fascinație pentru genetică am început și eu lucrarea de mai sus. Am răspuns la întrebările pe care le aveam, dar am descoperit altele. Plecând de la ideea simplă – fundamentală pentru acest studiu – că fluoroforul Sybr Green se leagă doar de ADN-ul dublu catenar, am putut observa denaturarea prin spectrofluorimetrie. Bazat pe cuantificarea semnalului fluorescent de la SG, am obținut pentru valori ale pH-ului între 3 și 12 respectiv ale concentrațiilor de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ de sub 0.01M și NaCl de sub 0.1M, că ADN-ul este încă dublu catenar, adică viabil din punct de vedere fiziologic. Am observat pentru $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o dependență exponențială a semnalului față de concentrație, iar pentru NaCl dependența era liniară.

Am adaptat concentrațiile și volumele de substanțe folosite pornind de la articole și protocoale anterioare. Astfel, am folosit cantități minime de ADN și SG pentru analiză, ajungând la valori de ordinul 5 μL pentru ADN (10ng/ μL) și 100 μL pentru SG (1%). Atât din punctul de vedere al costurilor, cât și al timpului necesar (câteva minute pentru pregătirea probei și 5-10 secunde pentru măsurare), metoda de față este una eficientă. Un alt avantaj este că efectuarea măsurătorilor sau pregătirea probelor pot fi însușite într-un timp redus.

Un neajuns al experimentului de față este că probele nu au fost măsurate în aceeași poziție, întrucât schimbarea ionilor și astfel modificarea parametrilor probei necesita re poziționarea în spectrometru. O îmbunătățire a metodei poate veni exact din acest punct de vedere: adaptarea ansamblului experimental astfel încât procesul să aibă parametri de măsură constanți pe tot parcursul, inclusiv la schimbarea pH-ului sau a concentrațiilor.

În concluzie, studiul de față și-a atins scopul inițial – de cuantificare a pH-ului și concentrației de ioni asupra ADN-ului dublu catenar cu spectrofluorimetrul – deschizând astfel drumul spre îmbunătățirea și adaptarea metodei prezentate.

Doresc să le mulțumesc dlui. conf. dr. Zoltán Bálint și dnei. drd. Ștefania Iancu care m-au sprijinit și ghidat cu răbdare și competență pe tot parcursul acestui studiu.

Bibliografie

- [1] D.-S. Maniu, “CURS DE BAZELE SPECTROSCOPIEI MOLECULARE Generalități”, Ian. 2015 (accessed Mar. 01, 2022).
- [2] M. Focsan, “LUCRARE DE LABORATOR Monitorizarea denaturării proteinelor prin spectroscopie de fluorescență” (accessed Mar. 01, 2022).
- [3] “The history of spectroscopy - from the flame test to the AAS.” <https://www.kruess.com/en/campus/spectroscopy/history-of-spectroscopy/> (accessed Mar. 01, 2022).
- [4] “MIT Spectroscopy Lab - History.” <https://web.mit.edu/spectroscopy/history/history-classical.html> (accessed Mar. 01, 2022).
- [5] D.-S. Maniu, “CURS DE BAZELE SPECTROSCOPIEI MOLECULARE Bazele spectroscopiei de fluorescență”, Ian. 2015 (accessed Mar. 01, 2022).
- [6] B. Valeur, M. Ario, and N. Berberan-Santos, “A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory,” *J. Chem. Educ.*, vol. 88, pp. 731–738, 2011, doi: 10.1021/ed100182h (accessed Mar. 01, 2022).
- [7] “Fluorescence SpectraViewer.” <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/> (accessed Apr. 13, 2022).
- [8] “Fluorophore - Wikipedia.” <https://en.wikipedia.org/wiki/Fluorophore> (accessed Mar. 01, 2022).
- [9] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, and G. P. C. Drummen, “Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM,” *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4047–4132, Apr. 2012. doi: 10.3390/molecules17044047 (accessed Mar. 01, 2022).
- [10] “What is a Spectrometer? UV, VIS and IR Spectrometer Explained.” <https://wavelength-oe.com/blog/what-is-a-spectrometer/> (accessed Feb. 28, 2022).
- [11] “uv-vis-absorbance-setup-diagram - StellarNet, Inc.” <https://www.stellarnet.us/systems/spectrochemistry-systems-uv-vis-nir/uv-vis-absorbance-setup-diagram/> (accessed Feb. 28, 2022).
- [12] “BLACK-Comet UV-VIS Concave Grating Spectrometers | StellarNet.us.” <https://www.stellarnet.us/spectrometers/black-comet-uv-vis-concave-grating-spectrometers/#tabs2|1> (accessed Mar. 27, 2022).

- [13] “LED Sources - StellarNet, Inc.” <https://www.stellarnet.us/light-sources/led-sources/> (accessed Mar. 27, 2022).
- [14] “SpectroFluorometer Systems | StellarNet.us.” <https://www.stellarnet.us/systems/low-cost-spectrofluorometer-systems/> (accessed Mar. 27, 2022).
- [15] “Spectroscopy Software | StellarNet.us.” <https://www.stellarnet.us/software/> (accessed Mar. 27, 2022).
- [16] “Deoxyribonucleic Acid (DNA) Fact Sheet.” <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Deoxyribonucleic-Acid-Fact-Sheet> (accessed Mar. 27, 2022).
- [17] “DNA | Definition, Discovery, Function, Bases, Facts, & Structure | Britannica.” <https://www.britannica.com/science/DNA> (accessed Mar. 27, 2022).
- [18] “Thompson & Thompson Genetics in Medicine E-Book - Robert MD Nussbaum, Roderick R. McInnes, Huntington F Willard - Google Cărți.” https://books.google.ro/books?id=4yV1CQAAQBAJ&pg=PA3&hl=ro&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false (accessed Mar. 27, 2022).
- [19] “Biomolecular structure - Wikipedia.” https://en.wikipedia.org/wiki/Biomolecular_structure#Secondary_structure (accessed Mar. 27, 2022).
- [20] “Nucleic acid secondary structure - Wikipedia.” https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_secondary_structure (accessed Mar. 27, 2022).
- [21] “Nucleic acid tertiary structure - Wikipedia.” https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_tertiary_structure (accessed Mar. 27, 2022).
- [22] “Nucleic acid quaternary structure - Wikipedia.” https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleic_acid_quaternary_structure (accessed Mar. 27, 2022).
- [23] “File:DNA RNA structure (full).png - Wikipedia.” [https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_RNA_structure_\(full\).png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_RNA_structure_(full).png) (accessed Mar. 27, 2022).
- [24] “Process to Denature DNA- Definition, Importance, Techniques and Applications – Genetic Education.” <https://geneticeducation.co.in/process-to-denature-dna-definition-importance-techniques-and-applications/> (accessed Mar. 27, 2022).
- [25] “DNA-denaturation.001.jpeg (756×436).” <https://geneticeducation.co.in/wp-content/uploads/2021/10/DNA-denaturation.001.jpeg> (accessed Mar. 27, 2022).

- [26] “SYBR Green I - Wikipedia.” https://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Green_I (accessed Mar. 27, 2022).
- [27] “SYBR Green I nucleic acid gel stain 10,000× DMSO 163795-75-3.” https://www.sigmaaldrich.com/RO/en/product/sial/s9430?gclid=Cj0KCQiA95aRBhCsARIsAC2xvfz_jYdemYDjv3ckbAekcxHwKCgETWqAOgYs7nqnoZ0nzJXXkqgHmEaAr3REALw_wcB (accessed Mar. 27, 2022).
- [28] B. Bruijns, R. Tiggelaar, and H. Gardeniers, “Dataset of the absorption, emission and excitation spectra and fluorescence intensity graphs of fluorescent cyanine dyes for the quantification of low amounts of dsDNA,” *Data in Brief*, vol. 10, pp. 132–143, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.dib.2016.11.090 (accessed Mar. 01, 2022).
- [29] T. Fisher, “PROTOCOL NanoDrop 3300 Sybr ® Green I dsDNA Assay.” [Online]. Available: www.nanodrop.com (accessed Mar. 01, 2022).
- [30] “Spectrometer Measurement Setups” [Online]. Available: www.StellarNet-Inc.com (accessed Mar. 01, 2022).
- [31] “Introduction to Modular Systems” [Online]. Available: www.StellarNet-Inc.com (accessed Mar. 01, 2022).
- [32] “Connect spectrometer and computer” [Online]. Available: <https://www.stellarnet.us/wp-content/uploads/SpectroSetups.pdf> (accessed Mar. 01, 2022).
- [33] A. I. Dragan *et al.*, “SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA,” *Journal of Fluorescence*, vol. 22, no. 4, pp. 1189–1199, Jul. 2012, doi: 10.1007/s10895-012-1059-8 (accessed Mar. 01, 2022).
- [34] K. Saeki, T. Kunito, and M. Sakai, “Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols,” *Biology and Fertility of Soils* 2010 46:5, vol. 46, no. 5, pp. 531–535, Feb. 2010, doi: 10.1007/S00374-010-0447-Y (accessed Mar. 01, 2022).
- [35] N. Korolev, A. P. Lyubartsev, A. Rupprecht, and L. Nordenskiöld, “Competitive Binding of Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, and K⁺ Ions to DNA in Oriented DNA Fibers: Experimental and Monte Carlo Simulation Results,” *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 5, pp. 2736–2749, Nov. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77107-9 (accessed Mar. 01, 2022).