$$SS_{ext} = SS_c + SS_r + SS_i,$$

$$SS_c = \sum\left[\frac{\left(\sum x_c\right)^2}{n_t r}\right] - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t}$$

$$SS_r = \sum\left[\frac{\left(\sum x_r\right)^2}{n_t c}\right] - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t}$$

$$SS_i = \frac{\left(\sum x_{c1r1}\right)^2}{n_{c1r1}} + \frac{\left(\sum x_{c1r2}\right)^2}{n_{c1r2}} + \frac{\left(\sum x_{c2r1}\right)^2}{n_{c2r1}} + \frac{\left(\sum x_{c2r2}\right)^2}{n_{c2r2}} - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t} - SS_c - SS_r$$

$$SS_{int} = SS_t - SS_c - SS_r - SS_i$$

glt =nt – 1, glt=grade de libertate totale, nt=număr total de valori;
glc = c – 1, glc=grade de libertate pe coloane, c=număr de valori pe coloane;
glr = r – 1, glr=grade de libertate pe rânduri, r=număr de valori pe rânduri;
gli = (c-1)(r-1), gli=grade de libertate ale interacţiunii;
glint = nt – cr, glint=grade de libertate interne

Tabel sintetic al valorilor calculate pentru testul ANOVA

Sursa de variabilitate	SS	Grade de libertate	$\overline{SS}$	F
c	SS_c	c - 1	SS_c / c - 1	$\overline{SS}_c / \overline{SS}_{int}$
r	SS_r	r - 1	SS_r / r - 1	$\overline{SS}_r / \overline{SS}_{int}$
i	SS_i	(c-1)(r-1)	SS_i /(c - 1)(r - 1)	$\overline{SS}_i / \overline{SS}_{int}$
int	SS_{int}	nt - cr	SS_{int} / nt - cr	
t	SS_t	nt - 1		

Dacă: Fc ≥ F (α, c – 1, g.l.int) ⇒ H01 (F), H11 (A)
Fr ≥ F (α, r – 1, g.l.int) ⇒ H02 (F), H12 (A)
Fi ≥ F (α, (c-1)(r-1), g.l.int) ⇒ H03 (F), H13 (A)

3.3. REACŢIA DE AMPLIFICARE GENICĂ PRIN POLIMERIZARE ÎN LANŢ (PCR)

3.3.1. PRINCIPII GENERALE

Apărută la începutul anilor '80, reac□ia de polimerizare în lan□ (PCR) este atât de utilizată în zilele noastre în nenumărate domenii, încât s-a uitat meritul său revoluţionar . Ştiinţa aşa numitei reacţii de polimerizare în lanţ este astăzi foarte bine cunoscută şi întâlnită în multe laboratoare. Tehnica PCR este considerată a fi un veritabil „fotocopiator genetic".

Reacţia de polimerizare în lanţ permite o rapidă amplificare a secvenţelor ADN, chiar si atunci când materialul de iniţiere este un ADN puternic degradat, acesta

fiind utilizat in studii de antropologie moleculara si paleogenetica, cum ar fi analiza ADN recuperat din oase fosile, din mumii sau din ţesuturi formolizate. Se poate realiza amplificarea ADN-ului chiar si dintr-o singura celula. Practic, PCR-ul reprezintă o forma de clonare „in vitro" ce poate genera şi modifica fragmente de lungimi şi secvenţe bine definite într-o simplă reacţie automatizată.

Metaforic vorbind, metoda permite sa fie găsit „acul în carul cu fân", deoarece prin ea, o singură genă dintre nenumăratele gene purtate de o moleculă de ADN poate fi reprodusă în câteva ore în miliarde de copii identice; ceea ce unei celule, în starea sa cea mai activă proliferativ (celula canceroasă) i-ar trebui o lună de zile, pentru a realiza acelaşi lucru.

Probele ADN şi reacţia de polimerizare în lanţ sunt descoperiri ce au fost puse imediat în practică, în medicina legală şi în identificarea genelor responsabile de boli ereditare.

Reacţia de polimerizare în Lanţ este o metodă foarte sensibilă de amplificare, prin care se realizează miliarde de copii identice ale unei anumite gene din macromolecula de ADN, în numai câteva ore, sistemul putând fi contaminat foarte uşor de elemente ale genelor ADN amplificate anterior sau de particule externe. Posibilitatea de contaminare în reacţiile de amplificare este un aspect cu implicaţii deosebite, atât în aplicaţii de cercetare cât şi în cele cu specific diagnostic.

În ciuda sensibilităţii deosebite, PCR este victima propriului său succes. Pot să apară reacţii fals pozitive prin acizii nucleici contaminaţi datorită puterii de amplificare incredibile a reacţiei. Contaminarea noilor probe cu ADN amplificat anterior este o problemă importantă a laboratoarelor în care se execută PCR.

Reacţia de polimerizare în lanţ permite manipularea directă a secvenţelor de acizi nucleici, putându-se realiza astfel secvenţierea unui fragment ADN (determinarea ordinii de succesiune a bazelor azotate în molecula de ADN), determinarea variaţiilor existente între diferite molecule ADN, modificarea secvenţei moleculelor de acizi nucleici de interes. Este o tehnică ingenioasă bazată pe capacitatea ADN-polimerazei de a copia o catenă ADN prin elongarea catenelor complementare, iniţiată de o pereche de primeri. Teoretic, fiecare ciclu dublează cantitatea de ADN ţintă. Comportamentul şi manipularea ADN polimerazei a fost o concentrare a eforturilor pentru a înţelege felul în care materialul genetic este copiat, reparat şi moştenit.

Se poate porni cu o cantitate extrem de mică de ADN, de la o singură sau câteva molecule de ADN ce trebuie amplificat, denumit ADN ţintă. Acest ADN ţintă ce urmează a fi amplificat, are în mod curent, sub 45 kilobaze.

Reacţia de polimerizare în lanţ se desfăşoară „in vitro", având nevoie de următorii reactivi: template-ul ADN ce urmează a fi amplificat, primerii necesari amplificării unui anumit sector din ADN ţintă, deoxiribonucleotide sub formă de trifosfaţi (dATP, dGTP, dTTP şi dCTP) care pot fi dozaţi în soluţie apoasă prin spectofotometrie UV la 260 nm, ADN polimeraza, capabilă de a rămâne funcţională la temperaturi înalte de pana la 100° C şi bufferul ($MgCl_2$ în concentraţii de aproximativ 1,5 mM) care este de o importanţă vitală, deoarece determină condiţiile de hibridare a primerilor şi cele de funcţionare a polimerazei (Taq polimeraza nu poate funcţiona când salinitatea mediului este crescută). ADN ce urmează a fi amplificat se află în cantitate foarte mică şi este utilizat ca template pe un sector limitat (ADN ţintă), delimitat de doi primeri, cu orientare opusă, unul pe catena directă 5` - 3` şi celălalt, pe catena 3` - 5`. Primerii sunt reprezentaţi de secvenţe scurte oligonucleotidice sintetizate „in vitro", de ADN monocatenar, de numai 20-30 nucleotide lungime. Secvenţa primerilor este proiectată înaintea sintezei artificiale,

astfel încât să fie realizată împerecherea complementară cu o secvenţă aflată înaintea sectorului din ADN ţintă ce urmează a fi amplificat, primerii delimitând astfel acel sector. Cei doi primeri sunt proiectaţi să se asocieze unul aproape de celălalt dar sunt situaţi pe catene diferite şi sunt orientaţi în aşa fel încât ei copie secvenţa de ADN care se găseşte între ei. Cu cât primerii sunt mai lungi, cu atât temperatura de asociere poate fi mai mare ceea ce creează o specificitate sporită. Cu toate acestea, priimerii nepurificaţi si lungi vor conţine cantităţi mai mari de produse nespecifice in amestecul final. Dacă este necesară utilizarea unor primeri mai lungi atunci se recomandă purificarea lor, în caz contrar aceasta nu este necesară.

Există şi aşa numiţii primeri nespecifici sau degeneraţi care sunt de fapt un amestec de oligonucleotide ale unor secvenţe de acizi nucleici diferite şi sunt utilizaţi pentru amplificarea simultană a mai multor loci în macromolecula de ADN ţintă.

Majoritatea polimerazelor recunosc ADN mono catenar ca fiind un posibil model de amplificare şi se leagă temporar la acest lanţ, pentru formarea unei duble catene. De asemenea, polimerazele se leagă şi de deoxinucleotidtrifosfaţii (dNTPs) valabili în mediu şi folosind energia înmagazinată în legăturile triple, catalizează reacţia de ataşare a nucleotidelor la a doua catenă de ADN; apoi enzima se mută la sfârşitul porţiunii unde catena este dublă iar procesul este repetat de sute sau mii de ori pe secundă.

ADN polimeraza acţionează unidirecţional; începe să acţioneze de la capătul 3` al porţiunii dublucatenare, sinteza decurgând în direcţia 5`→3`. Astfel, polimeraza poate începe să acţioneze, oriunde găseşte o joncţiune de tip ADN monocatenar – bicatenar. Pentru direcţionarea începutului sintezei unui anumit segment de ADN, este necesar un scurt segment oligonucleotidic (un mic număr de nucleotide unite într-un lanţ scurt complementar unei secvenţe de ADN) poziţionat chiar deasupra porţiunii dorite pentru sinteză (Prescott şi Harley, 1999).

Acest fragment oligonucleotidic nu se poate alinia la ADN dublu catenar, în schimb, se leagă imediat la secvenţa complementară a ADN mono catenar. Prin încălzire, legăturile dintre cele două catene ale ADN se rup, formându-se porţiuni monocatenare. Prin urmare, denaturarea ADN prin căldură, urmată de o uşoară răcire, în prezenţa oligonucleotidelor complementare, determină alinierea acestora la macromolecula de ADN monocatenar, oriunde întâlnesc secvenţe similare complementare. (Palumbi, 1996; Monod şi Francois 1996; Lisker şi Armendares, 2000; Mas Eva et al., 2001).

3.3.2. CICLURILE DE REPLICARE

Replicarea în PCR constă în trei faze mai importante: denaturare, aliniere şi extensie.

3.3.2.1. DENATURAREA

În această fază, căldura este folosită în scopul opririi tuturor reacţiilor enzimatice şi denaturării ADN de la dublu catenar, la mono catenar. De obicei, se foloseşte o temperatură de 94°C sau 92°C după metode mai noi. O temperatură prea joasă sau un timp de denaturare prea scurt, pot fi ineficiente, rămânând porţiuni de ADN bicatenar. Cu toate că *Taq* polimeraza este rezistentă la denaturarea termică, nu este totuşi imună la acţiunea căldurii, o încălzire excesivă, ducând la o scădere a activităţii

enzimatice. De exemplu, după 30 cicluri de replicare cu incubare la 94°C pentru 60 de minute, activitatea enzimei, se reduce la jumătate.

3.3.2.2. ALINIEREA PRIMERILOR

În această fază, temperatura este mai joasă, astfel încât primerii oligonucleotidici se pot lega în zonele complementare din catena de ADN. Aceasta este faza critică a reacției de amplificare, deoarece dacă primerii se leagă corect doar în zona țintă (zona care urmează a fi amplificată), atunci există o probabilitate suficient de mare să se obțină produși de calitate.

Alinierea este un proces randomic, care depinde de concentrația primerilor, disponibilitatea siturilor de legătură și de prezența zonelor cu similaritate scăzută secvenței primerilor, care duc la alinieri nespecifice. Trebuie remarcat și faptul că, dacă macromolecula de ADN care folosește drept matriță este fragmentată, atunci, mici fragmente din aceasta, pot acționa ca primeri, fiecare având o țintă precisă în cadrul genomului. Acesta este un motiv pentru care molecule de ADN cu greutate moleculară mare și molecule mici, nu trebuiesc amestecate ca matrițe pentru viitoare amplificări (Palumbi, 1996).

O temperatură mare de aliniere a primerilor, sau o concentrație mare a acestora în mediul de reacție, pot determina o blocare a formării legăturilor și implicit de aliniere a primelor cu matrița de ADN. O temperatură joasă, determină o aliniere nespecifică a primerilor în diferite porțiuni care prezintă o complementaritate scăzută, generându-se astfel numeroase artefacte. Dacă temperatura de aliniere este foarte scăzută, catenele de ADN se vor „realinia" formând structura inițială – ADN dublu catenar.

Timpul de aliniere a primerilor, constituie de asemenea o problemă foarte importantă pentru obținerea unui produs bun. Astfel, un timp de aliniere foarte lung, permite primerilor să găsească noi posibile situri de legătură și să se alinieze nespecific. Cu toate acestea, un timp scurt de aliniere, poate determina o mare specificitate de aliniere în PCR. În general, timpul de aliniere este de 30 – 60 secunde, dar poate funcționa la fel de bine și un timp mai scurt de 15 secunde la temperaturi mari de aliniere cu primeri specifici.

3.3.2.3. EXTENSIA

Faza de extensie sau elongare, determină activitatea enzimatică și sinteza segmentului de ADN. *Taq* polimeraza funcționează de obicei bine la 72°C, aceasta fiind și temperatura utilizată de obicei pentru această etapă. Enzima se activează și își începe activitatea la temperaturi scăzute, ceea ce este foarte important pentru succesul reacției de amplificare. Majoritatea primerilor au o temperatură de aliniere mai mică de 72°C, astfel încât majoritatea vor fi foarte slab legați de secvența țintă, o dată cu creșterea temperaturii de extensie. O dată cu creșterea temperaturii de la temperatura de aliniere către 72°C, începe și reacția de polimerizare, dar destul de lent. Oricum, această reacție de polimerizare este suficientă pentru a adăuga câteva extra-baze, crescând astfel stabilitatea complexului primer – matriță. Astfel, o dată cu trecerea timpului (de obicei 30 de secunde), temperatura de extensie crește, primerul fiind deja parte componentă a noii catene de ADN.

Timpul de extensie, este o altă variabilă importantă. În condiții optime, *Taq* poate lega mii de nucleotide pe minut. Prin urmare, produșii PCR cu o lungime mai mică de

500 perechi de baze (pb) nu necesită mult timp pentru o sinteză completă (aproximativ 30 de secunde fiind suficiente). În general, un timp de extensie de 30 de secunde este suficient pentru produşi sub 50pb, 60 de secunde sunt necesare pentru produşi cu lungimi cuprinse între 500 şi 1500pb şi 90 de secunde sunt necesare pentru produşi cu lungimi mai mari. Optimizarea timpului de elongare este necesară, deoarece un timp prea mare poate favoriza apariţia de artefacte (alinieri nespecifice) (Palumbi, 1996).

3.3.2.4. CONDIŢIILE DE REACŢIE

Pentru sistematica moleculară, atenţia a fost îndreptată către primeri şi cât de bine se aliniază la matriţa de ADN. Dacă alinierea nu este eficientă, sau dacă primerii se aliniază nespecific, amplificarea poate să fie blocată sau se pot amplifica produşi alternativi. Astfel, complementaritatea perfectă primer – matriţă, poate determina amplificări cu mare specificitate. Din păcate, temperaturile ridicate, adesea împiedică utilizarea primerilor universali (primeri realizaţi a fi eficienţi pentru un anumit număr de taxoni) (Kocher et al., 1989).

3.3.3. COMPONENTELE PCR

Mediul de reacţie este foarte important pentru specificitatea şi eficienţa amplificării. Astfel, mediul de reacţie trebuie să conţină un tampon, amestecul de nucleotide, polimerază, primeri, ADN şi Mg2+ (un cofactor necesar pentru activitatea enzimei) (Carbonari et al., 1993). Numai primerii şi nucleotidele se consumă în cursul reacţiei acestea fiind adăugate în exces, astfel încât sinteza să nu poată fi limitată de aceste componente.

Cofactorul, nu se consumă în timpul reacţiei şi nici nu este degradat de temperaturile extreme ale ciclurilor de amplificare, astfel încât concentraţiile iniţiale şi finale sunt aceleaşi. Ionul, este un important cofactor în cataliza enzimatică a reacţiei de sinteză, astfel, o concentraţie optimă poate accelera considerabil desfăşurarea reacţiei. Oricum, Mg2+ interacţionează cu sarcinile negative ale grupării fosfat ale nucleotidelor, suficient de puternic încât Mg2+ să atragă grupările PO4- şi să rămână în cantitate destul de mică pentru a mai reacţiona ca şi cofactor. Din acest motiv, concentraţia de Mg2+ trebuie să fie mai mare decât concentraţia dNTP.

Varierea concentraţiei de Mg2+ este una dintre cele mai comune metode de stabilire a condiţiilor de reacţie pentru PCR. De obicei se utilizează o cantitate de 1,5mM MgCl2.

3.3.4. AMPLIFICAREA GENICĂ LA REPREZENTANŢI AI FAMILIEI *CYPRINIDAE*

În cazul celor două specii analizate, a indivizilor ginogenetici şi a hibrizilor interspecifici, au fost amplificate 3 secvenţe aparţinând la trei gene diferite. Astfel, au fost amplificate regiunile cu hipervariabilitate aparţinând citocromului b şi regiunii de control a ADNmt (D-loop), precum şi o regiune conservativă necodificatoare la speciile analizate, segmentul 4L al dehidrogenazei (ND4L).