



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00906**

(22) Data de depozit: **18/12/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **POPA LAURA - IOANA, STR. A II - A,
NR.182, ET.1, AP.107, SULINA, TL, RO;**
• **CZEIZLER EUGEN, BVD.BUCUREȘTI,
NR.24A, BL.1C, ET.2, AP.7, PLOIEȘTI, PH,
RO;**
• **IȚCUȘ CORINA, STR.BISTRIȚEI, NR.1,
BL.35, SC.C, AP.1, SUCEAVA, SV, RO;**
• **DOBRE ANA - MARIA,
ALEEA DEALUL MĂCINULUI, NR.1,
BL.A44B, SC.1, ET.3, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TUȘA IRIS-MARIA, STR. ELIE CARAFOLI
NR. 12, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PĂUN MIHAELA,
ALEEA COMPOZITORILOR, NR.13,
BL.OD5, SC.7, AP.248, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **AMĂRIOAREI ALEXANDRU,
STR.PIAȚA DOROBANȚI, NR.3, BL.A1,
SC.C, ET.6, AP.55, BRĂILA, BR, RO;**
• **PĂUN PAUL ANDREI, STR.VLĂDEASA,
NR.11, BL.C33, SC.A, AP.11, ET.1,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRANDAFIR ROMICĂ,
STR.BIBESCU VODĂ, NR.2, BL.P5, SC.3,
ET.5, AP.41, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **MITRANA VICTOR, BVD.BUCUREȘTI,
NR.24A, BL.1C, ET.2, AP.7, PLOIEȘTI, PH,
RO;**
• **BARAD GEFRY, STR.CETATEA HISTRIA,
NR.1, BL.M II B8/13, SC.A, AP.5,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PETRE ION, BVD.BUCUREȘTI, 24A,
BL.1C, AP.7, PLOIEȘTI, PH, RO;**
• **SIDOROFF MANUELA ELISABETA,
DRUMUL TABEREI, NR.138, BL.715, SC.A,
ET.1, AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **ASOCIEREA UNOR SECVENȚE DE ADN SPECIFICE
CARE SE AUTO-ASAMBLEAZĂ ÎN FORMA HĂRȚII
ROMÂNIEI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o combinație specifică de secvențe sintetice scurte de ADN monocatenar care determină plierea unei terțe secvențe lungi de ADN monocatenar, într-o structură având forma hărții României, cu utilitate în domeniul biotehnologiilor. Secvențele specifice constau în 162 secvențe capsă de ADN monocatenar având dimensiuni de 20...63 baze azotate per secvență, care se auto-asamblează cu

secvența scaffold de ADN a bacteriofagului M13mp18 în condiții de reacție. Rezultatul este o structură sub forma granițelor României la nivel nanometric, așa cum este vizualizată prin microscopie de forță atomică.

Revendicări: 1
Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI

ASOCIEREA UNOR SECVENȚE DE ADN SPECIFICE CARE SE AUTO-ASAMBLEAZĂ ÎN FORMA HĂRȚII ROMÂNIEI

Prezenta invenție se referă la crearea unei combinații specifice de secvențe sintetice scurte de ADN monocatenar (denumite și secvențe capsă) ce determină plierea unei secvențe lungi de ADN monocatenar provenind de la bacteriofagul M13mp18 (denumită și secvență scaffold) într-o formă predefinită, de hartă a României, cu utilitate în domeniul biotehnologiilor. Combinația este caracterizată prin aceea că secvențele capsă sunt generate într-o succesiune exactă de baze azotate ce determină plierea secvenței scaffold în forma predefinită de hartă a României prin legarea de aceasta în anumite puncte fixe stabilite anterior pe bază de complementaritate dintre bazele azotate.

Posibilitatea de utilizare a ADN ului ca și “material de construcție” derivă atât din faptul că posedă o conformație predictibilă dar și din faptul că interacțiunile intra- și intermoleculare dintre perechile de baze pot fi programabile (Zhang et al. 2014). Crearea de diferite forme din acizi nucleici a fost propusă pentru prima dată de către Seeman în anul 1982 (Seeman 1982) iar în anul 2006 apare lucrarea lui Rothemund, în care este introdusă tehnica ADN origami, considerată de referință în domeniul nanotehnologiei ADN. În lucrare este descrisă metoda de obținere de diferite forme bidimensionale arbitrare (pătrate, discuri, stele în cinci colțuri) cu un diametru de aproximativ 100 nm, prin plierea unei molecule lungi de ADN monocatenar (7500 baze) cu ajutorul a 200 - 250 secvențe scurte de oligonucleotide (Rothemund 2006). Mai târziu, în anul 2009 au apărut și formele tridimensionale realizate din ADN: un tetraedru (Ke et al. 2009) și un cub (Andersen et al. 2009). În ceea ce privește realizarea în laborator a obiectelor sub formă de hărți nanofabricate din ADN, până în acest moment se cunosc doar patru exemple: harta Scandinaviei (Benson et al. 2016), harta Chinei (Qian et al. 2006), harta Sloveniei (Jerala, Jerala, and Hafner-Bratkovič 2011) și harta emisferei vestice, mai exact a Americii de Nord și de Sud (Rothemund 2006). ***Nici un alt grup de cercetători nu a reușit asamblarea în laborator a unei structuri de tip ADN origami sub formă de hartă a României.***

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este reprezentată de crearea la nivel nanometric a hărții României utilizând pentru aceasta molecule de ADN monocatenar.

Prezenta invenție constă în furnizarea combinației specifice de secvențe capsă de ADN monocatenar (respectiv structura fiecărei secvențe în parte) care, în anumite condiții de reacție, determină plierea unei secvențe lungi de ADN monocatenar ce provine de la bacteriofagul M13mp18 (secvența scaffold) în forma hărții României.

În afara faptului că anterior acestui moment nu exista o combinație de secvențe ADN care împreună cu secvența ADN a bacteriofagului M13mp18 să se autoasambleze în forma granițelor României, combinația de secvențe generată de noi duce la obținerea unei structuri ce prezintă mai multe avantaje față de modelele anterioare de hărți descrise în literatura de specialitate. Astfel, prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

Materialul ADN este folosit într-un mod mai eficient deoarece nu este sintetizată întreaga suprafață bidimensională (plină) a hărții (spre deosebire de modelele realizate de către (Qian et al. 2006; Jerala, Jerala, and Hafner-Bratkovič 2011; Rothmund 2006)) ci doar un schelet triangularizat al respectivei structuri, putând astfel obține pe baza aceleiași secvențe scaffold structuri de dimensiuni mai mari (Figura nr. 1).

Totodată, față de modelul de hartă obținut de (Benson et al. 2016), unde fiecare muchie este implementată printr-o singură moleculă de ADN dublucatenar, structura obținută de noi prezintă o rigiditate mărită deoarece fiecare muchie este implementată prin asocierea a două molecule de ADN dublu catenare (Figura nr. 2).

Figura nr. 1 prezintă modelul structurii de forma hărții României ce se dorește a fi obținut prin plierea structurii scaffold cu ajutorul combinației de secvențe capsă propusă de noi.

Figura nr. 2 prezintă o schiță a cum se vor asambla cele 162 de secvențe capsă (reprezentate prin liniile colorate) în jurul secvenței scaffold (reprezentată printr-o linie de culoare albastru deschis).

Figura nr. 3 prezintă vizualizarea structurii rezultate în urma implementării experimentale a procesului de auto-asamblare, conform exemplului descris mai jos. Vizualizarea este făcută folosind microscopia de forță atomică. Imaginile din partea dreaptă reprezintă structura hărții României izolată în detaliu. Barele de culoare galbenă sunt introduse ca factor de scalare, dimensiunile lor fiind de 150 nm pentru partea stângă a figurii și 50 nm, pentru detaliile din partea dreaptă.

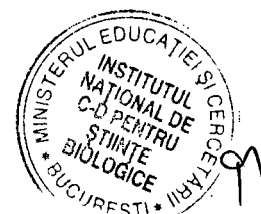
Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

EXEMPLU

Secvențele capsă (în număr de 162) ce asigură plierea secvenței scaffold sub forma hărții României pe baza complementarității cu diferite porțiuni ale acesteia au fost generate cu ajutorul programului PERDIX. Dimensiunile acestor secvențe capsă variază între 20 și 63 baze azotate per secvență iar structura fiecărei secvențe în parte este prezentată în cele ce urmează.

**Secvențele capsă:**

1. GCACTTTTTTTTAACTAATAGACAAACAATTCGACAACCTTATTAAATCC
2. GTATTAGACTTTATTAGAGCCGTCAATAGATAATACATTAATAATACC
3. GAACGAACATAAAACATCGCCATTATGAGGATTTAGAA
4. ACTGATAGCCCCACCAGCAGAAGATAAAAACAGTAATGCGCGA
5. TCTTAGGTGAGGCGGTCAGA
6. CTCAATTTTTTTTCTGAAATGGTTTTTGAATGTTTTTTTTTATTAG
7. CACAGACAATAATTATTTACATTGGCAGATTCGAATACGTGG
8. TGAAAGCGTAAACCAGTCACACGACCAGTAATCCTTCTGACC
9. GCTTTCCTCGTTACCAACAGAGATAGAACAAAAGGGACATTCTGGGAATC
AGAGCGGG
10. AGCTAAACAGGAGGCACGTATAACGT
11. TGCTTTGACGAGCCGATTAAAGGGATTTTAGAGTACTATGGT
12. AGGGCGCCAGGAACGGTACGCCAGAATTTTTTTTTCTGAGAAGTG
13. ACGTGGTTTTTTTTCGAGAAAGGAACGCCGCGCTTTTTTTGCCGCTAC
14. ACCACCACACCGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGCTGCGCGTA
15. AAAAGTTTGAGTACAAGTGTAGCGGTCACGGCGCTAGGGCGCTGGACATT
ATCATT
16. GCGGAACAAAGAACGTTATTAATTTT
17. TTTGCCCGAAACCACCAGAAGGAGCGGTTATCATATTCCTGATTATTTGTT
TG
18. CAATAGAAAAGGGAGGGAATTTTTTTAAATATTGACAGCCGCCACCA
19. ACCACCCTCAGGGAAATTATTCATTAAAGGTGCCTCAGAGCC
20. AGAACCGCCACAATTATCACCGTCACCGACTTCGCCACCCTC
21. TCCCTCAGAGCGAGCCATTTGGGAATTAGAGCCGGAACCGCC
22. GGAACTTTTTTGCCACCACCAGCAAATCACCAGTTTTTACCATTAGCA
23. GATAGCAGCACCGTAATTTTTCGACAGAATCAAGTTTGCCTTTAGCGTCAG
TCACC
24. CATAATCAAAAACGTAGCGGTTTTTCATCGGGCCATCTTTT
25. TGAATTTACCGTTCCCCTTATTAGCGTTTTTCATTTTCGGTCATAGCCCAGTAA
GCGTCA
26. TACATGGCTTTTTGAAAGCGCAGTCTC
27. AGCCAGAATGGATGATACAGGAGTGACTGGTTCCTCATTA

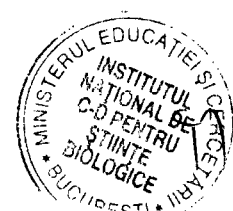


28. GTAACAGTGCCTGATATTCACCTTTTAATAAAAATAAGTTTTAACGGGTTTT
TTTGTGCCTTGA
29. ACGATTGGCCTCGTATAAACAGTTAATGCCCCGGCAGGTCAG
30. CAGGAGGTTGACTGCCTATTTTCGGAACCTATTCAGCATTGA
31. GATTATATTTTCTGAATAATGGAGTAACAGTACCTTTTTTTTCATCGGGAGA
AACTAGGA
32. TAAAATATCTTAATAACGGATTCGCCTGATTGGAAGGTTATC
33. AAGGAATTGAGCTTTGAATACCAAGTTACAAACAACAGTTGA
34. AGTTGGCAAATATCGCGCAGAGGCGAATTATTATATCTGGTC
35. CGGCTTAGGTTGGGTTCTTGCTGAACC
36. TAAAGCATCACATATAACTATATGTAAATGCTATGAAAAATC
37. GCCAGCAGCAAGATGCAAATCCAATCGCAAGACACGCTGAGA
38. CCGCCTGCAACAGTGCCAAAGAACGCGAGA
39. GCCCCTTTTTTAAAAACAGGAAGATTGTATAAGTATTTTTGAGAGATC
40. TACAAAGGCTATCATTTTCATTGCCTGAGAGTCTGGAAAA
41. GTTGATAATCAGAGCAAACAAGAGAATCGATGATGTACCCCG
42. TTAGAATCCTTGACTAGCATGTCAATCATAACGGTAATCGTAAAAAACAT
AGCGATA
43. GCTTAGATTAAGAAATTAATTTTCCC
44. CGTCGCTATTCGCTGAGAAGAGTCAATAGTGAA
45. GAAGATGATGATGAATAACCTTTTTTTTTTGCTTCTGTAAAT
46. ATATATGTGAGAACAACATCAAGAAAACAAAACATAAATCA
47. TAATGGAAACAGTATTAATTACATTTAACAATTCATTTTAATTCGC
48. GTCTGGCCGGAACGCCATCAAAAAGAATTACCTTTTT
49. TTTAACCAATATTCCTGTAGCCAGCTTTCATCCAGCTCATT
50. TTAAATTTTTGTAAATAACATTAATGTTTTTTTTTCGAGTAACAACCCGTAA
CCGT
51. ATTCTACTAATATTAATATTTTGTTAAA
52. AATTGTAAACGGTAGTAGCATTAGAGGGTAGCCAAATATTTA
53. GATGAATATAACAAGGGTTAGAACCTACCATATTTTAACGTCA
54. GTAGATTTTCAGGCAAATTATTTGCACGTAAAACAGAAAATGGGAT
55. AGGTCACGACGGCGGATTGACCGTATAAAGAAATTGC
56. CGTGGGAACAATTGGTGTAGATGGGCGCATCGTCGGATTCTC
57. AAACTTTTTCAAATATTTTTTAGTTAATTCATCTTCTGACCTATGACG

58. TACCTACATTTAATTTAATGGTTTGAAATACCCTCATGGAAA
 59. CAGGAAAACGGACCGTGTGATAAATAAGGCGGCCATTGCAA
 60. TATTACCGCCATTAAATAAGAATAAACACCGGTCCAGAACAA
 61. TGCTGGTAATAAATCATAATTACTAGAAAAAGCTATCGGCCT
 62. AAGAACTCAAACCTGTTTAGTATCATATGCGTGCCTGAGTAG
 63. AGTAATTTTTTCACTTTATACAAATTCTTATTCCAGTATAA
 64. AGCCAACGCTTTTAGGCAGATTTTTTATTTTCGAGCTGATT
 65. CAATACTTCTTCAGTAATAAGAGAATATAAAGACCGTTGTAG
 66. CACGCAAATTATACCGACAAAAGGTAAAGTAAGTCTGTCCAT
 67. CGAGTAAAAGATTCTGTCCAGACGACGACAATGTGAGGCCAC
 68. TTTTATAATCAAACAACATGTTTCAGCTTTTTTTAGAACGCGCCAGCCA
 69. GAGCCGCCGACAATGACAACATTTTCGCCACGCATAACCG
 70. ACCGATAGTTGCACCACCCTCATTTTCAGGGAACAGCTTGAT
 71. GAATTTCTTAATAGCAAGCCCAATAGGAACCCCTTTCGAGGT
 72. TTATCAGCTTGATGTACCGTAACACTGAGTTTTTTGTATCGGT
 73. TTCTGTATGGGATTTTGCTAAAAGGCTCCAAATTTTTTTAGCCTTTAACGTC
 AC
 74. CTCCAAAAAACAACCTTTCAACAGTTTCAGCGCGTTGAAAAT
 75. AATAATTTTTTCAGAGTGAGAATAGAAAGGAACAATAAACGG
 76. GTAAAATACATGAGGAAGTTTCCAAGGAATTGCGAAT
 77. AAAGACTTTTTTCGTAATGCCACTACGAAGGCATTTGAGGACT
 78. CTACAGAGGCCCAACCTAAAACGAAAGAG
 79. TTACTIONTTTTTTGAACGAGGCGCAGCATCGGAACGTTTTTTTTGGGTAGC
 AACGG
 80. GCGAAAGACAGACGGTCAATCATAAGGGAACCACCCTCAGCA
 81. GCGGGATCGTCGAACTGACCAACTTTGAAAGAGGCCGCTTTT
 82. AGGGAGTTAAAGGACAGATGAACGGTGTACAGTGAGGCTTGC
 83. ATATATTCGGTCGCACCAGGCGCATAGGCTGGCTGACCTTTTTGAGTAATC
 TT
 84. GCAAAGAATACACTAAATTTTACTCATCTTTGACCCCCAGCGATTATCCA
 TG
 85. CCGCGACCTGCTACCAAGCGCGAAACAAAGTAGTGTCGAAAT
 86. AAGAAGTTTTGCCCATCGCCTGATAAATTCAACGGAGATTTGTATAGAGG
 GGGTAATA



87. GTAAAATGTTTAGGAGGCTTTTGCAA
88. ACGATTTTTTTAACCAAAATAGCGAACTGGATAGCG
89. CTGACAGATTTAGGATTTTTTTCCACATTCAAAGACG
90. CCTCGTTTACCCTAATGCAGATACATAACGCCCTATCATAAC
91. CCCAAATCAACGTCATAGTAAGAGCAACAAAAGGAATTACGAGGAACA
AAGCTGCTC
92. ATTCAGTGAATAACGGATATTCATTA
93. GACAAGAACGGCTTGCCCTGACGAGAAATTTTTTTCCAGAACGAGTAGTA
AATCAA
94. TATTATTTTTTTTTTATCCCAATCAGGGAAGCGCATTAGATTTTAATTAAC
95. AACATAAAAACCAAATAAGAAACGATTTTTTGCAGAGAGAAT
96. GTTAGCAAACGTAAAAATAGCAGCCTTTATTTAACGTCAAAAATGGAAAA
TACATACA
97. TAAAGGTGGCAACTATTACGCAGTAT
98. TTAAGACTCCTATATAAAAAGAAACGCAAAGACACTGGCATGA
99. ATAATAACTTTTTACCCAAAAGAACCACGGAATAAGTTTTGTCACAAT
100. AAGAGGCTGAGATTTGCTCAGTACCAGGCGTTTGCCGTCGAGAGGGTTG
ATGAAACGCA
101. AGGAAACCGAGATAAGTATAGCCCGGAATAGGAGTTACCAGA
102. TAGCCGAACAATGTATCACCGTACTCAGGAGGAGTAAGCAGA
103. TTTTAAAGAAATTTAGTACCGCCACCCTCAGAACCGAAGCCC
104. ATGAAATAGCAATAGCTATCTTACCGCCACCCTCAGAACCGCCTTTTTTT
CCCTCA
105. AAGAATAGTTAGGGTTGAGTGTTGTTTAAGCCCAATAATAAAAACA
106. CAAGAATTGAGTCCAGTTTGAACAAGAGTCCAGATAACCCA
107. TAATATCAGAGACTATTAAGAACGTGGACTCAATTGAGCGC
108. AGTCAGAGGGTCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCCTGAACAA
109. TGAACACGTCTATCAGGGCTTTTCCACTACGTGAACCATGGCGA
110. CCCTCATAGTTAGTTAGGATTAGCGGGGTCTCCTCAAGAGAAGGACGTAA
CGATCTAA
111. AGTTTTGTCGTCTATTCCACAGACAG
112. CAGTACATTTTTCAACGCCTGTAGCTTCCAGACGTTAGTAAATGAA
113. GGCCAACGTGGAGAGGCCCTGGCCTTTTAGAGTTGCAGCAA
114. GCCTAATGAGTGTTTAACTCACATTAATTGCGTATGAATC



115. GCCAGCTGCATTATGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGATCAATAT
116. AATCCTGACAGATGATGGCAATTCGGAAACCTGTCGT
117. CGGGGAAAGCCCACCCAAATCAAGTTTTTTGGTAGAGCTTGA
118. GGAGCCCCGATTGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATACCAGTGA
119. GACGGGCAGGTGGTTTTTCTTTTCCGGAACCCTAAAG
120. TTGGGCGCCAGACAGCTGATTGCCCTTCACCGGGTTTGCCTA
121. AAAATCCCTTATAAATTGGGCTTGAGATGGTTCGAAATCGGC
122. GATGGTGGTTCTAATTTCAACTTTAATCATTGAATCCTGTTT
123. CAGCAGGCGAATGAATTACCTTATGCGATTTTTGGTTTGCCC
124. GCGGTCCACGCAAGAAGTGGCTCATTATAACCAGTCATTTTTTTGGGAA
125. TTCATCAGTTGTATTATAGTCAGAAGCAAAGCGGTAGAAAGA
126. ACATTATTACAGGATTGCATCAAAAAGATTAATAACGGAACA
127. ATAAAACGAACGAGGAAGCCCGAAAGACTTCAATCTACGTTA
128. GAAAAAATATCGTTTTATTTCGAGCTTCAAAGCGAGGTACCGAGCTCG
129. TCCAATACTGCTTTATCGTCATAAATATTCATTCAAAAATCAGGTTTTTTC
TTTACC
130. GAATGACCATAAATGAATCCCCCTCAAATGCTTTAAACACTGAATAT
131. AATGCTGTGCTTAGAGCTTAATTGGTTCAGAAAACGA
132. GGTCATTTTTTTTTTTTGGCGGATGAGCTCAACATGTTTTAAATATGTTTTAA
GTACGGT
133. GTCTGGAAGTTTCGCCAGGGTTTTTTTTTCCAGTCACGATAAGA
134. GCTCCTTTTGACGTTGTAACGACGGCCAGTACCTTTAATT
135. GATTAGAGAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGAACAGGTCAG
136. AAGCAAACCTCCGTCGACTCTAGAGGATCCCCGACCAGACCGG
137. AAGTTGGGTAACATTCCATATAACAGTTGATTCAAGGCGATT
138. GGGATGTGCTGCCCAATTCTGCGAACGAGTAGTGGCGAAAGG
139. ATTACGCCAGCATTAGTTTGACCATTAGATACCTCTTCGCT
140. ATCGGTGCGGGCATTTCGCAAATGGTCAATAAGGGAAGGGCG
141. GCAACTGTTCCCTGTTTAGCTATATTTTCATTTGGGGCGCGATTTTAAAAGG
TGGCATCA
142. GCATCTGTTTTTTGAGGGGAGCAAAGCGCCATTCTTTTATTCAGGCTGC
143. CCGGAAACCAGCGACGACAGTATCGGCCTCAGGCTTCTGGTG
144. CAATTCCACACAACCAGCTTTCCGGCACCGAAGATCGCACTCCAGCATA
GAGCCGGA



145. AGCATAAAGTGTATGTTATCCGCTCA
 146. AATTCGTAATCATTATTTTATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATAAGCCTGGGGT
 147. ATTCAACCGATTGATTCATATGGTTTACCAGCGCCAAAGGGGAGGTT
 148. TTGAAGCCGAACCTCCCGACTTGCACAAAAGGGCGAC
 149. GCGTTTTAGCTTAAATCAAGATTAGTTGCTTTTTTTTTTGCACCCAGCT
 150. TTATTCATCGTAGGAATCATTAAAGGCTTATCCGGTATTTTAAAGAACGCG
 AG
 151. AGGCCGAAACGCAAATCAGATATAGACCGCGCCC
 152. ACAAATAAACTGTTTATCAACAATAGATAAGTTTGCCAGTT
 153. CCAGAGCCTAATCCTGAACAAGAAAAATAATAGAGCGTCTTT
 154. CCAACGCTAACTCCCATCCTAATTTACGAGCACTGAATCTTA
 155. ACAATTTTATCTGTAGAAACCAATCAATAATCGTTTTCTTTCCTT
 156. CGCCAACATGTAACAACAGTAGGGCTTAATTGAGAATCGCCAAGTAC
 157. CGCACTCAAAGAACGGGTATTAAACCATATTTAACAA
 158. ATCATTCTCGAGAACAAGCAAGCCGTTT
 159. AATAGCAAGTCACCAATGAAACCATC
 160. TCAAATATCAAATTTCTCAATCACATTTCAATTTTTTACCTGAGCAAAA
 161. TTTATCAAATCATAGGTCTGATTTACTACCTTTTTAACCTC
 162. GAACCACCACCTTTTTGAGCCGCCGATTCTGAAACTTTTTTTATGAAAGT
 ATT

Pentru construirea hărții se utilizează un amestec de concentrație 3 - 5 nM secvență scaffold și un exces de 18-20 ori din fiecare dintre secvențele capsă (indicate mai sus) într-un volum final de 100 μ l. Amestecul de reacție se prepară în tampon 1X TAE/Mg²⁺ având următoarea compoziție: 40 mM Tris, 20 mM acid acetic, 2mM EDTA și 12.5 mM acetat de magneziu (pH 8). Volumul final de reactivi este de 100 μ l. Amestecul este supus procesului de annealing în termocycler de la 90°C la 4°C în aproximativ 12 ore după cum urmează: de la 90° la 86°C cu o rată de 4°C per 5 min, de la 85° la 70°C cu o rată de 1°C per 5 min, de la 70° la 40°C cu o rată de 1°C per 15 min, și 40°C la 25°C cu o rata de 1°C per 10 min, ținute la final la 4°C (Jun et al. 2019). Structurile obținute în urma acestui proces pot fi vizualizate cu ajutorul microscopiei de forță atomică. În Figura nr. 3 este prezentată o astfel de vizualizare, obținută în urma implementării exemplului descris anterior.

Combinăția de secvențe ADN monocatenare ce permite asamblarea și obținerea structurii sub formă de hartă a României la nivel nanometric poate fi utilizată în domeniul biotehnologiilor la nivel educațional, servind ca model de studiu al capacității de autoasamblare

a ADN-ului în cadrul laboratoarelor de profil din centre educaționale (licee, universități sau laboratoare de cercetare) putând fi comercializată sub formă de kit de reactivi de laborator. Totodată, ea poate fi utilizată ca și identificator la nivel nanometric de produse naționale, tradiționale sau al unor caracteristici de țară.



REVENDICĂRI

Combi-na-ția de se-cven-țe de oli-gonucleo-tide capsă (furni-zate în des-cri-erea in-ven-ției, în sub-ca-pi-tolul ex-em-plu) ca-rac-te-rizată prin acea că asigură pli-erea se-cven-ței scaffold (ADN ge-nomic pro-ve-nind de la bac-terio-fa-gul M13mp18) în for-ma de hartă a Ro-mâ-niei.



DESENE

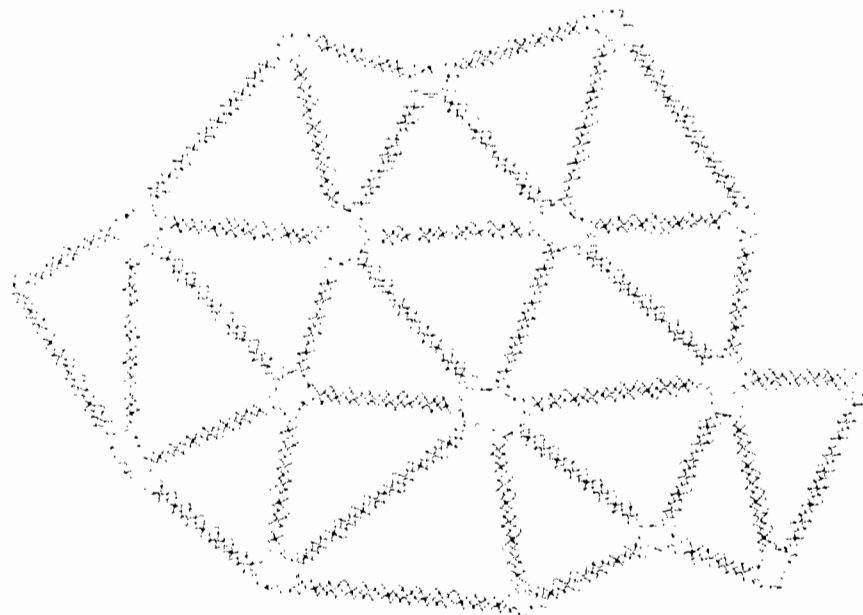


Figura nr. 1 Modelul structurii de forma hărții României ce se dorește a fi obținut

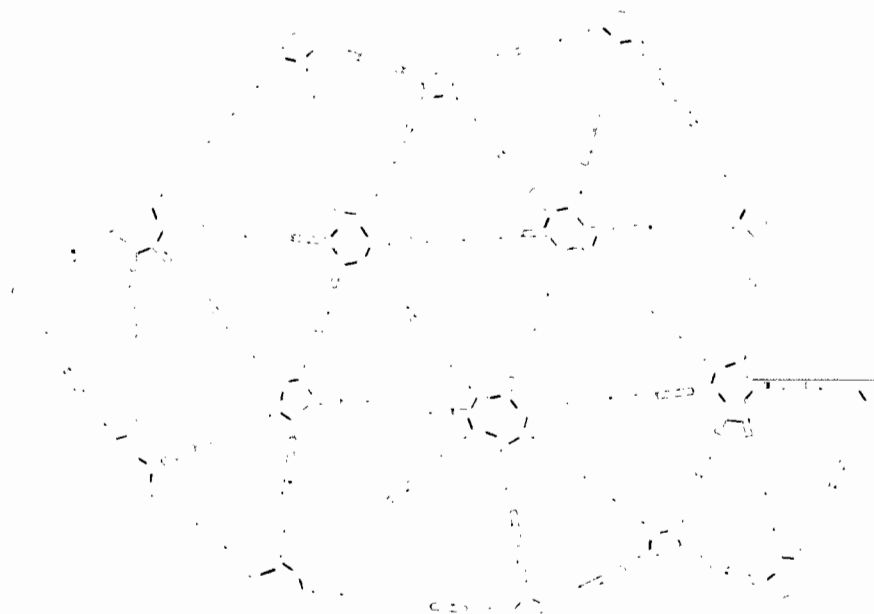


Figura nr. 2 Modelul schematic al poziționării secvențelor capsă față de secvența scaffold

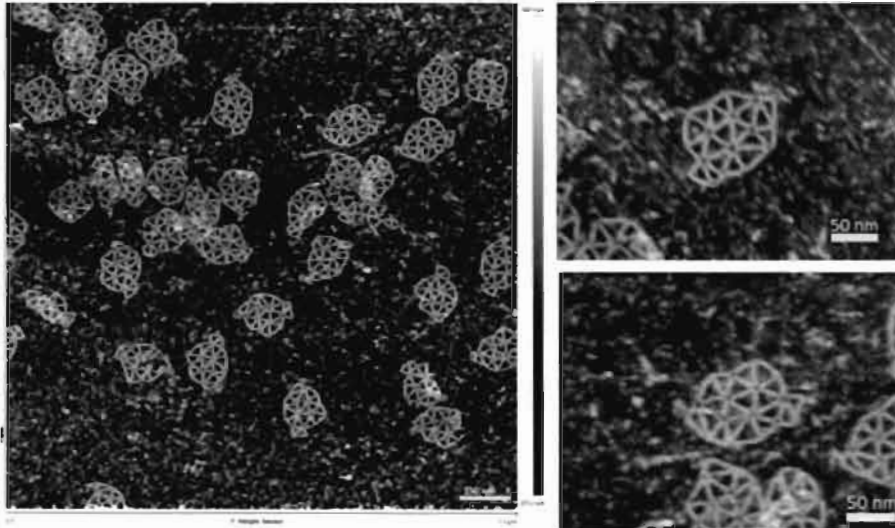


Figura nr. 3 Imaginea AFM reprezentând structura la nivel nanometric în forma de hartă a României obținută în laborator prin plierea secvenței scaffold de ADN cu ajutorul secvențelor capsă; stânga: imaginea de ansamblu; dreapta: detalii în care sunt izolate două copii reprezentative ale structurii. Barele de scalare au dimensiunile de 150 nm pentru imaginea inițială și de 50 nm, pentru imaginile din detaliu.