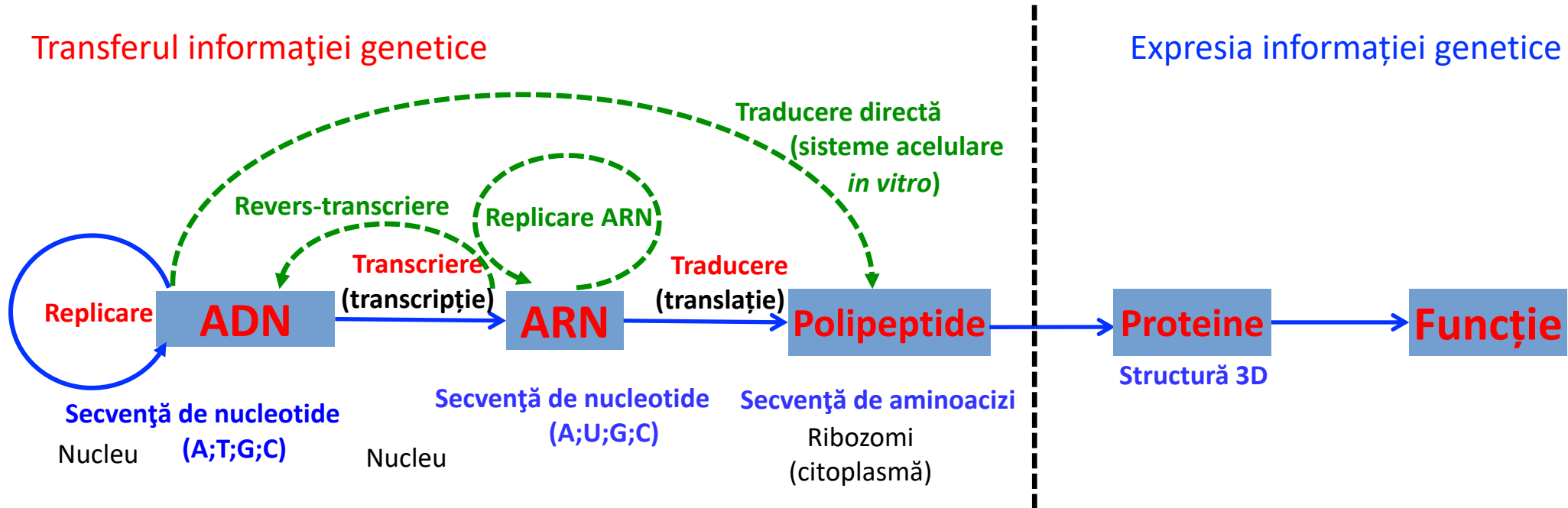
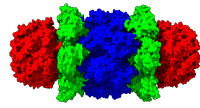


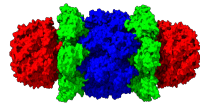
Capitolul V

Modificarea mesajului genetic

I. Mutație, recombinare, inginerie genetică



Mutațiile



Mutația genei *bithorax* implicată în reglarea dezvoltării normale a musculitei de oțet – *Drosophila melanogaster*



Dacă to ADN-ul din toate celulele corpului uman ar fi pus cap la cap, s-ar întinde pe 100 milioane de km, de 3 ori distanța de la Pământ la Jupiter. Tot ADN-ul din corpul uman provine prin replicarea ADN-ului celulei zigot rezultate prin fertilizare.

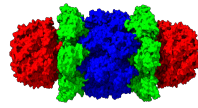
Deși foarte strict controlată, replicarea ADN-ului se poate face și cu erori ce duc **la modificări spontane nedorite a mesajului genetic** – **mutații**. Acestea reprezintă materialul de bază pentru variabilitatea și evoluția organismelor vii . **Cum?**

Funcțiile de celulă în care apar mutațiile pot fi:

1. **mutații ale celulelor somatice** – nu se transmit descendenților, dar poate avea efecte asupra organismului – toate celulele derivate din celula purtătoare a mutației o vor conține.
2. **mutații ale celulelor sexuale** – (ovul, spermatozoid) – se transmit descendenților. **Frecvența de apariție a mutațiilor pentru o genă în aceste celule este de o mutație la un milion de gameți.**

Funcție de **amplarea** lor mutațiile se clasifică în:

1. **Mutații punctiforme**
2. **Mutații de amplare mică**
3. **Mutații de amplare mare**



Tipuri de mutații

1. Mutațiile punctiforme - mutații ce afectează o singură bază azotată din secvența acizilor nucleici.

Au fost identificate **trei tipuri de mutații punctiforme**:

• **Substituții** – înlocuirea unei baze azotate cu alta

5 ' ACCGTCTA3 ' → 5 ' AC **G**GTCTA3 '

• **Insertii** – adăugarea unei baze azotate suplimentare

5 ' ACCGTCTA3 ' → 5 ' ACC **T**GTCTA3 '

• **Deleții** – pierderea uneia sau a mai multor baze azotate

5 ' ACCGTCTA3 ' → 5 ' AGTCTA3 '

Funcție de efectul lor asupra produsului codificat de gena în care apar, mutațiile punctiforme se clasifică în:

- **mutație non-sens** – modificare unei baze duce la schimbarea mesajului unui codon în STOP, proteina codificată de genă fiind astfel mai scurtă

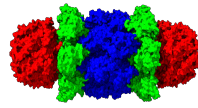
5 ' AUGGUCUAUCUAGGCGAUUAA 3 ' → 5 ' AUGGUCUA **A**CUAGGCGAUUAA 3 '
START V T L G D Stop START V STOP

- **mutație cu sens greșit** – modificare unei baze duce la schimbarea mesajului unui codon și duce la încorporarea unui alt aminoacid în molecula proteică și care afectează funcția proteinei codificate

5 ' AUGGUCUAUCUAGGCGAUUAA 3 ' → 5 ' AUGGUCUAUCUAGGCGA **A**UAA 3 '
START V T L G D Stop START V T L G **E** Stop

- **mutații cu schimbarea cadrului de lectură** (frame-shifts) – inserția sau deleția unei baze azotate ce duce la modificarea modului în care ribosomul citește mesajul genetic de pe molecula de ARNm.

5 ' AUGGUCUAUCUAGGCGAUUAA 3 ' → 5 ' AUGGUC **UU**ACUAGGCGAUUAA 3 '
START V T L G D Stop START V F STOP



2. Mutații de amploare mică – sunt asemănătoare mutațiilor punctiforme d.p.v. al tipurilor și efectelor, dar cuprind câteva baze azotate;

3. Mutații de amploare mare – mutații de dimensiuni mari ce afectează poziția unei gene în cadrul cromozomului și modul de organizarea a materialului genetic. În general nu este afectat produsul genei ci mecanismul de reglare a expresiei acesteia. **Cum se explică acesta?**

Tipuri:

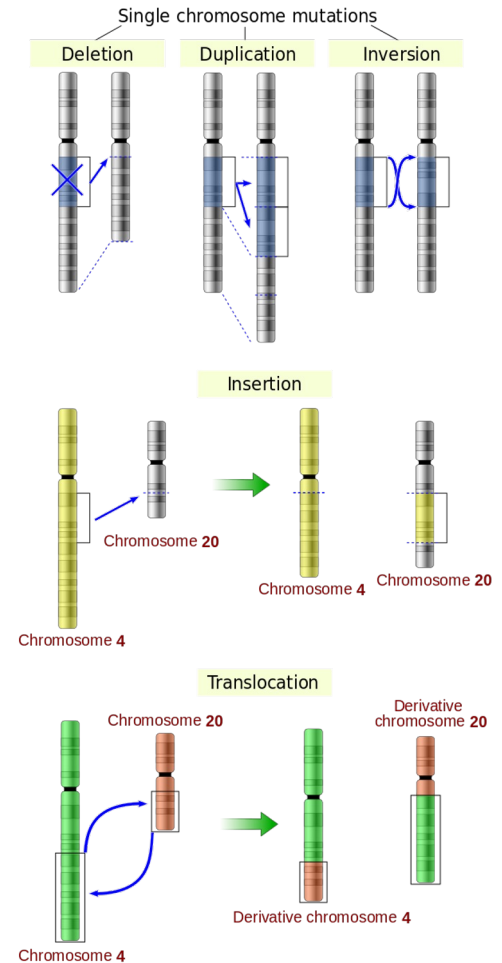
1. duplicări ale genelor – măresc numărul de copii ale unei genei în genom, afectând mecanismul de reglaj al expresiei

2. deleții

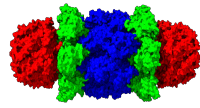
3. rearanjări cromozomiale – reprezentate din:

Translocații – mutarea unei porțiuni de pe un cromozom pe altul

Inversii – modificarea orientării unei porțiuni de cromozom



Recombinarea genetică



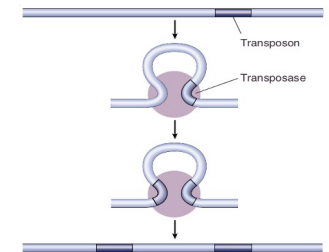
Mutațiile reprezintă o modificare a conținutului mesajului genetic, dar nu sunt singurele responsabile de diversitatea informației genetice. Genele per ansamblu pot fi transferate de la un organism la altul și combinate între ele prin fenomenul de **recombinare genetică**.

Fenomenul de **recombinare genetică** constă în modificarea locației și contextului genetic al unei gene sau a unui fragment al unei gene.

Ex: transferul genei *Amp* – rezistența de ampicilină de la *E. coli* la *Streptococcus*



Barbara McClintock
(1902-1992)



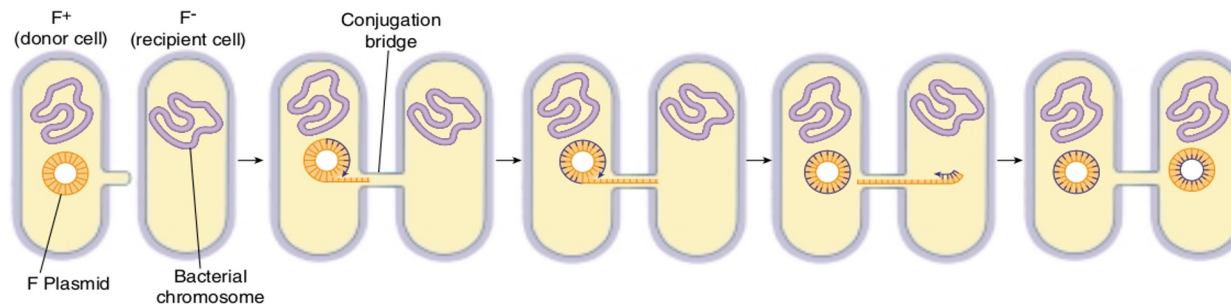
Tipuri de recombinare genetică:

1. **Recombinare reciprocă** prin crossing-over în timpul meiozei.

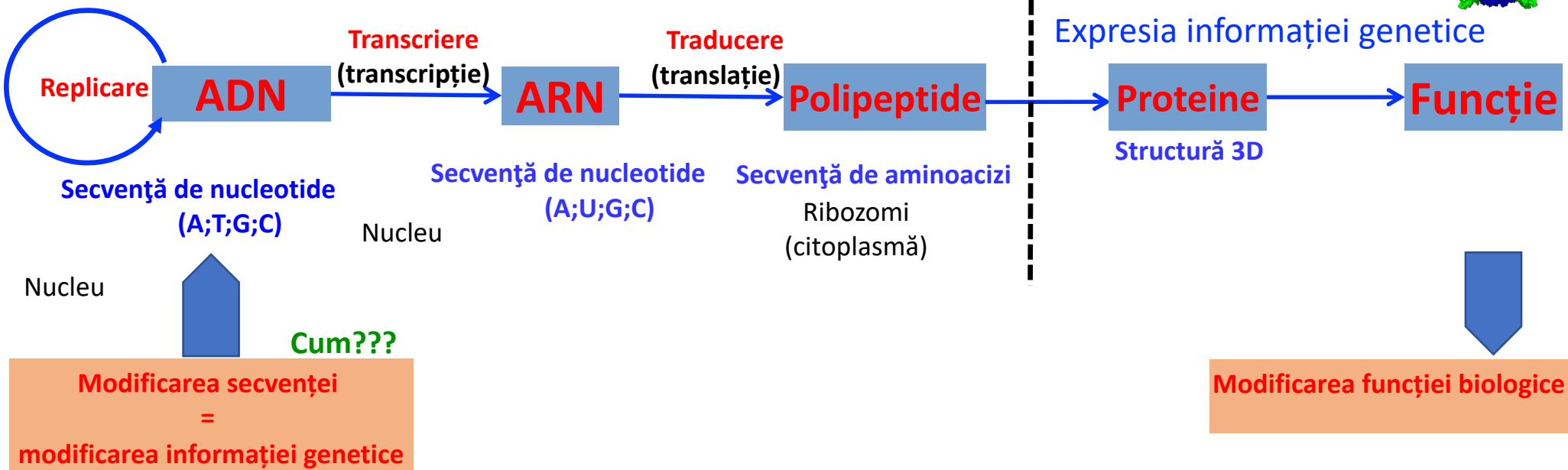
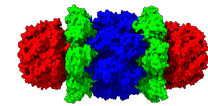
2. **Transferul de gene** prin:

Transpoziție – unii transpozoni conțin gene suplimentare ce sunt integrate în diverse locuri în genom.

Conjugare – transferul de ADN (cel mai frecvent sub formă de plasmide, dar pot fi transferați și cromozomi) de la o celulă bacteriană la alta



Dogma centrală a Biologiei Moleculare



Mutațiile și recombinația genetică sunt **mecanisme naturale** de alterare a informației genetice. Acumularea de cunoștințe privind modul de funcționare a genelor au permis oamenilor să **manipuleze în mod direct și rațional informația genetică** printr-un ansamblu de tehnici reunite sub denumirea de **inginerie genetică**.

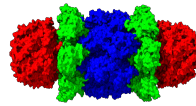
Asociat în mod direct cu ingineria genetică este termenul de **clonare**. Acesta desemnează, în sens larg, **o tehnică ce are drept scop producerea mai multor copii identice ale unui fragment ADN de interes**.

Această multiplicare se poate realiza în două moduri:

- *in vitro*, folosind polimeraze ADN dependente și reacția de amplificare PCR;
- *in vivo* utilizând sistemele enzimatică ale unor organisme gazdă precum *E. coli*.

Un al doilea sens al termenului de **clonare** este **introducerea unui fragment de ADN dintr-o sursă într-o moleculă acceptoare care provine dintr-o altă sursă și obținerea unei molecule ADN recombinante**.

Acesta este motivul pentru care, în mod uzual, termenul de **clonare** este mai degrabă **rezervat pentru desemnarea procesului desfășurat *in vivo*** în urma căruia se obține o moleculă de ADN-recombinat, iar cel de **amplificare** este utilizată pentru **procesul enzimatic desfășurat *in vitro* (PCR)**.

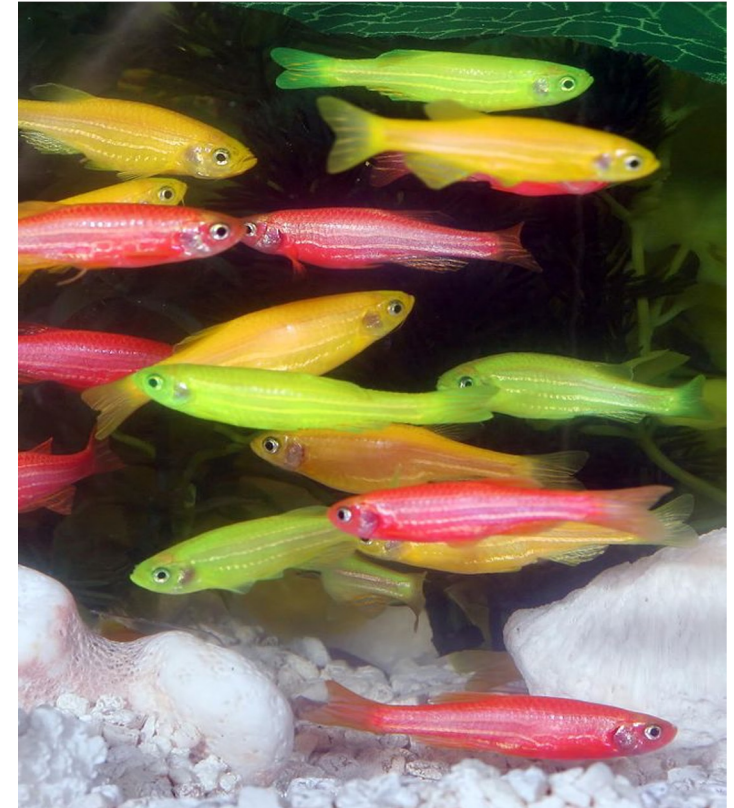


În principiu, prin ingineria genetică se are în vedere:

- **izolarea, copierea și modificarea unei gene de interes** – obținerea unei molecule **ADN recombinant**;
- **introducerea genei de interes într-o nouă gazdă** într-o asemenea manieră încât aceasta să fie funcțională. Organismul obținut poartă denumirea de **organism recombinat genetic, organism transgenic** sau **organism modificat genetic (GMO)**.

Exemple de GMO:

- **primul organism transgenic** –1973 - o tulpină de *E. coli* în care a fost inserat un plasmid conținând genele pentru rezistență la antibiotic;
- **primul șoarece transgenic** – 1974 – ADN-ul exogen a fost inserat în nucleul zigotului de șoarece;
- 1978 – se creează o tulpină de *E. coli* în care a fost introdusă gena pentru insulina umană – tulpina produce insulină comercializată sub denumirea de "*Humulin*";
- 2003 – **primul animal de companie transgenic** – Glofish - *Danio rerio* modificat genetic pentru a fi fluorescent;
- 2010 – tulpina bacteriană Synthia (*Mycoplasma laboratorium*) – **prima formă de viață sintetică** – genomul său este unul artificial, sintetizat în laborator;

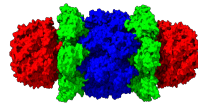


RESEARCH ARTICLE

Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome

Daniel G. Gibson,¹ John I. Glass,¹ Carole Lartigue,¹ Vladimir N. Noskov,¹ Ray-Yuan Chuang,¹ Mikkel A. Algire,¹ Gwynedd A. Benders,² Michael G. Montague,¹ Li Ma,¹ Monzia M. Moodie,¹ Chuck Merryman,¹ Sanjay Vashee,¹ Radha Krishnakumar,¹ Nacyra Assad-Garcia,¹ Cynthia Andrews-Pfannkoch,¹ Evgeniya A. Denisova,¹ Lei Young,¹ Zhi-Qing Qi,¹ Thomas H. Segall-Shapiro,¹ Christopher H. Calvey,¹ Prashanth P. Parmar,¹ Clyde A. Hutchison III,² Hamilton O. Smith,² J. Craig Venter^{1,2*}

Gibson D et al. (2010) "Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome". Science 329 (5987): 52–6.



Ingineria genetică și GMO

- **plante modificate genetic** - prin introducerea în plantele de cultură a genelor pentru rezistența la frig sau pesticide, sinteza de insecticide, sau fixarea N₂ s-au obținut soiuri de plante cu productivitate crescută.

Orez transgenic - Golden Rice

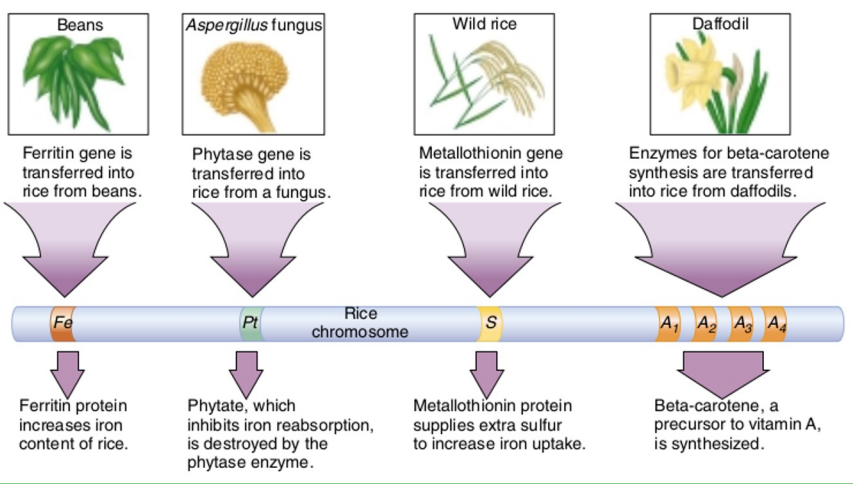


FIGURE 19.21 Transgenic rice. Developed by Swiss bioengineer Ingo Potrykus, transgenic rice offers the promise of improving the diets of people in rice-consuming developing countries, where iron and vitamin A deficiencies are a serious problem.

Engineering the Provitamin A (β-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm

Xudong Ye,^{1*†} Salim Al-Babili,^{2*} Andreas Klöti,^{1‡} Jing Zhang,¹ Paola Lucca,¹ Peter Beyer,^{2,§} Ingo Potrykus^{1,§}

Rice (*Oryza sativa*), a major staple food, is usually milled to remove the oil-rich aleurone layer that turns rancid upon storage, especially in tropical areas. The remaining edible part of rice grains, the endosperm, lacks several essential nutrients, such as provitamin A. Thus, predominant rice consumption promotes vitamin A deficiency, a serious public health problem in at least 26 countries, including highly populated areas of Asia, Africa, and Latin America. Recombinant DNA technology was used to improve its nutritional value in this respect. A combination of transgenes enabled biosynthesis of provitamin A in the endosperm.

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 287 14 JANUARY 2000 303

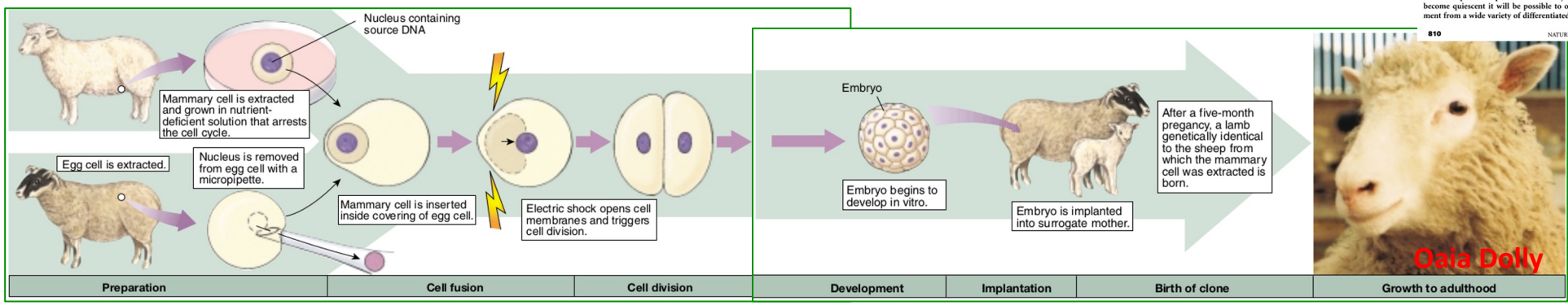
Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells

I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind & K. H. S. Campbell
Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK
 * FPL Therapeutics, Roslin, Midlothian EH25 9PP, UK

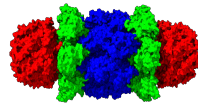
Fertilization of mammalian eggs is followed by successive cell divisions and progressive differentiation, first into the early embryo and subsequently into all of the cell types that make up the adult animal. Transfer of a single nucleus at a specific stage of development, to an enucleated unfertilized egg, provided an opportunity to investigate whether cellular differentiation to that stage involved irreversible genetic modification. The first offspring to develop from a differentiated cell were born after nuclear transfer from an embryo-derived cell line that had been induced to become quiescent. Using the same procedure, we now report the birth of live lambs from three new cell populations established from adult mammary gland, fetus and embryo. The fact that a lamb was derived from an adult cell confirms that differentiation of that cell did not involve the irreversible modification of genetic material required for development to term. The birth of lambs from differentiated fetal and adult cells also reinforces previous speculation¹ that by inducing donor cells to become quiescent it will be possible to obtain normal development from a wide variety of differentiated cells.

810 NATURE VOL 385 27 FEBRUARY 1997

- **clonarea unui animal adult** - prin introducerea unui nucleu dintr-o celulă adultă în ovulul anucleat al altei celule și dezvoltarea unui embrion și apoi a organismului adult.

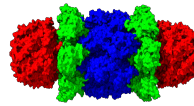


Oaia Dolly



Capacitatea de a izola molecule de ADN și de a cunoaște secvența de nucleotide a acestora sunt 2 elemente cheie ce stau la baza majorității covârșitoare a experimentelor de inginerie genetică și biologie moleculară. Spre deosebire de alte molecule biologice (proteine, lipide, glucide), acizii nucleici (ADN-ul în particular) sunt relativ omogeni din punct de vedere al proprietăților (au întotdeauna sarcină negativă datorită resturilor fosfat, este bicatenar, dimensiunea este strict dependentă de numărul de nucleotide, etc). Acest lucru face posibilă existența unor **metode de studiu a ADN-ului cvasi-universale** – pot fi aplicate pentru a investiga orice moleculă de ADN, indiferent de sursa sau secvența acesteia. Din punct de vedere al implicațiilor practice și semnificației lor, 3 metode s-au impus ca fiind de bază în studiul ADN-ului :

- 1. Amplificarea enzimatică *in-vitro* a ADN-ului** – permite sintetizarea în eprubetă a moleculelor de ADN și ARN, eliminând astfel necesitatea de avea la dispoziție cantități mari de material biologic. Tehnica se folosește de mecanismele replicării ADN-ului și, teoretic, permite ca o singură moleculă de ADN dintr-o probă biologică să fie copiată pentru a obține virtual oricât de multe copii ale respectivei molecule;
- 2. Electroforeza ADN-ului** – permite separarea moleculelor de ADN funcție de dimensiune. Poate fi utilizată în scopuri analitice (aprecierea numărului de nucleotide și a concentrației) cât și preparative (separarea fizică a 2 molecule de ADN de dimensiuni diferite);
- 3. Secvențierea ADN-ului** – permite stabilirea tipului și ordinii nucleotidelor într-o moleculă de ADN izolată;



Amplificarea enzimatică in vitro a ADN-ului sau PCR-ul este așadar o **reacție de replicare enzimatică repetată a unei molecule de ADN matriță**, reacție ce este mediată de un set oligonucleotide și realizată de o ADN-polimerază ADN-dependentă termorezistentă. Tehnica este cunoscută sub denumirea de **reacția PCR**, *polymerase chain reaction* – reacția în lanț a polimerazei. Metoda a fost descrisă pentru prima dată în 1983 de Kary Banks Mullis, acesta primind premiul Nobel pentru descoperirea sa.



Pentru realizarea acestei reacții sunt necesare următoarele componente:

1. O **moleculă de ADN matriță** ce conține secvența ce se dorește a fi amplificată;
2. o **ADN polimerază** – enzimă capabilă să polimerizeze o nouă catenă de ADN pe baza complementarității cu ADN-ul matriță; **Cel mai frecvent se utilizează enzime termostabile** precum DNA polimeraza Taq din *Thermus aquaticus* sau DNA-polimeraza Pfu din *Pyrococcus furiosus*;
3. **2 oligonucleotide amorsă (primers)** – complementare cu capetele 3' ale catenelor sens și anti-sens ale ADN-ului matriță;
4. **4 deoxiribonucleozid-trifosfat** (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP; dTTP) – **care este rolul lor?**
5. o **soluție tampon** în care ADN-polimeraza este activă și stabilă;
6. **Ioni bivalenți**, cel mai frecvent Mg^{2+} sau Mn^{2+} ; și **ioni monovalenți**, cel mai frecvent K^{+} ;

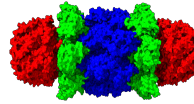
"highly original and significant, virtually dividing biology into the two epochs of before PCR and after PCR"

Wade, Nicholas (September 15, 1998), "Scientist at Work - Kary Mullis; After the 'Eureka', a Nobel Dips Out", The New York Times.

"What if I had not taken LSD ever; would I have still invented PCR?" He replied, "I don't know. I doubt it. I seriously doubt it."



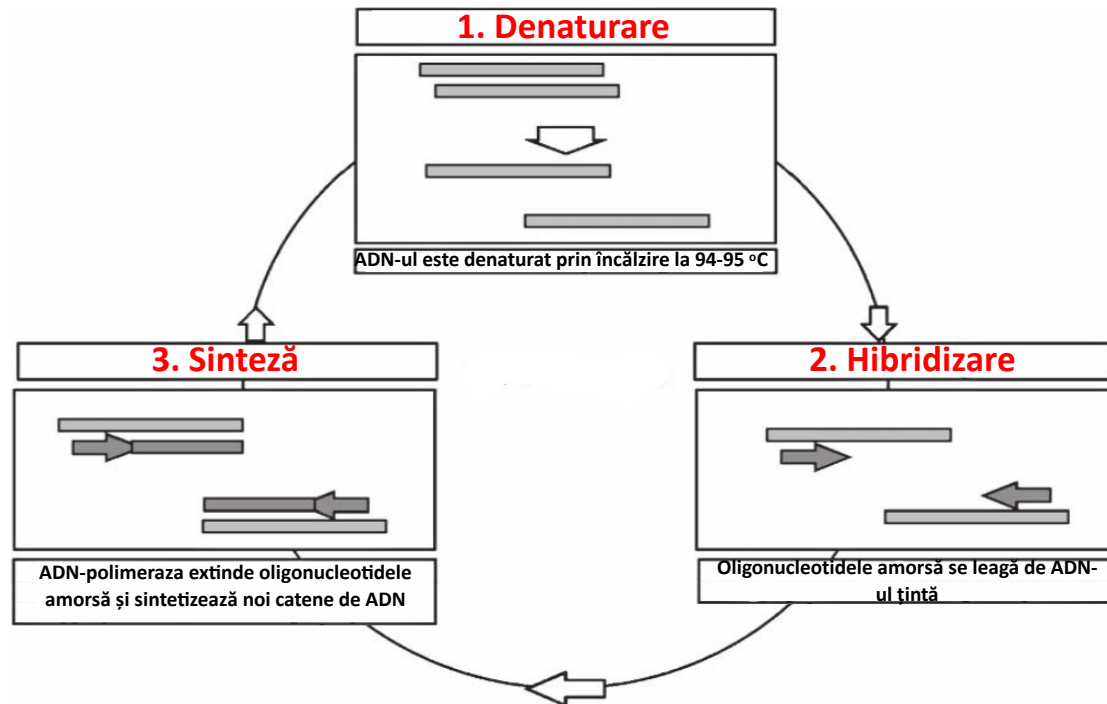
Kary Banks Mullis
(1944-2019)

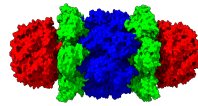


Reacția PCR are la bază:

1. **proprietatea oligonucleotidelor amorsă (primer) de a se hibridiza** (de a se lega pe bază de complementaritate), la o anumită temperatură, de molecula ADN matriță. Oligonucleotidele amorsă hibridizate vor expune un capăt 3`-OH;
2. **proprietatea ADN-polimerazei de a încorpora nucleotide pe bază de complementaritate** în direcția 5`-3`, începând cu capătul 3`-OH al oligonucleotidelor amorsă (primer).

.....și constă în replicarea ciclică a **3 etape**:

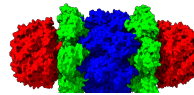




- 1. Denaturarea** constă în incubarea amestecului de reacție alcătuit din sursa de ADN-matriță, polimeraza și oligonucleotidele amorsă și cele 4 deoxiribonucleozide-trifosfat la temperatura de 94-95 °C timp de un minut. Prin încălzire, ADN-ul dublu-catenar din amestec este denatura, separându-se în cele 2 catene componente. La finalul acestei etape tot ADN-ul din amestec este mono-catenar;
- 2. Hibridizarea** presupune incubarea amestecului de reacție la o temperatură dictată de temperatura de topire a oligonucleotidelor amorsă. În această etapă are loc legarea oligonucleotidelor amorsă de ADN-ul monocatenar obținut în etapa anterioară, pe bază de complementaritate la nivel de secvență;
- 3. Sinteza** implică incubarea amestecului din etapa anterioară la temperatura de 72°C pentru un interval de timp variabil, cuprins între 0 secunde până la 2 minute. ADN-polimeraza devine activă și adaugă nucleotide la capătul 3`-OH al oligonucleotidelor amorsă legate, extinzându-le. Nucleotidele sunt adăugate în ordinea dictată de complementaritatea cu ADN-ul matriță. În acest mod are loc *replicarea sau sinteza* unei noi molecule de ADN dublucatenar. Una dintre catenele acestei molecule este catena originală, matriță, iar a doua este catena nou sintetizată, care încorporează oligonucleotida amorsă (primer).

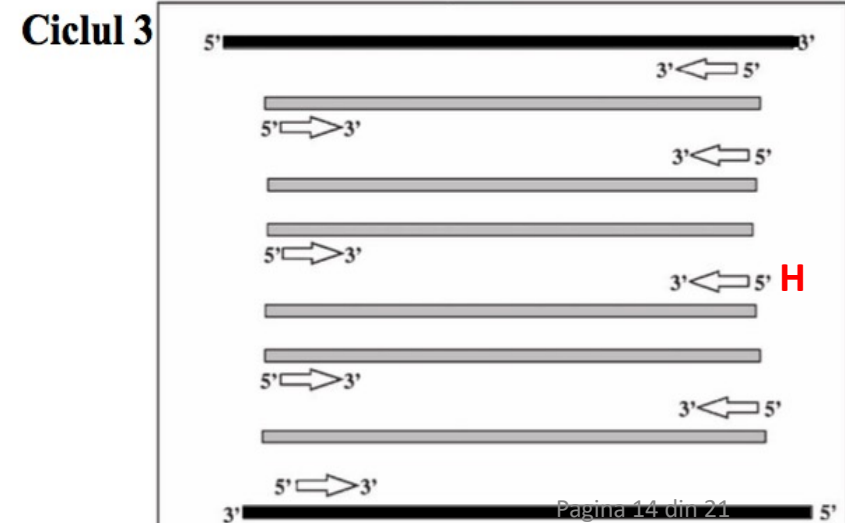
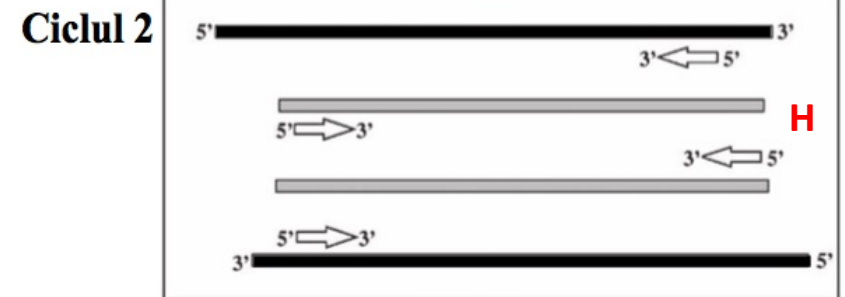
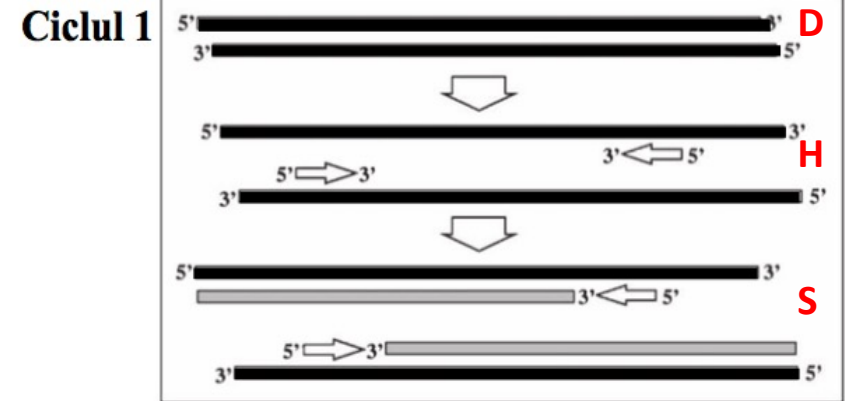


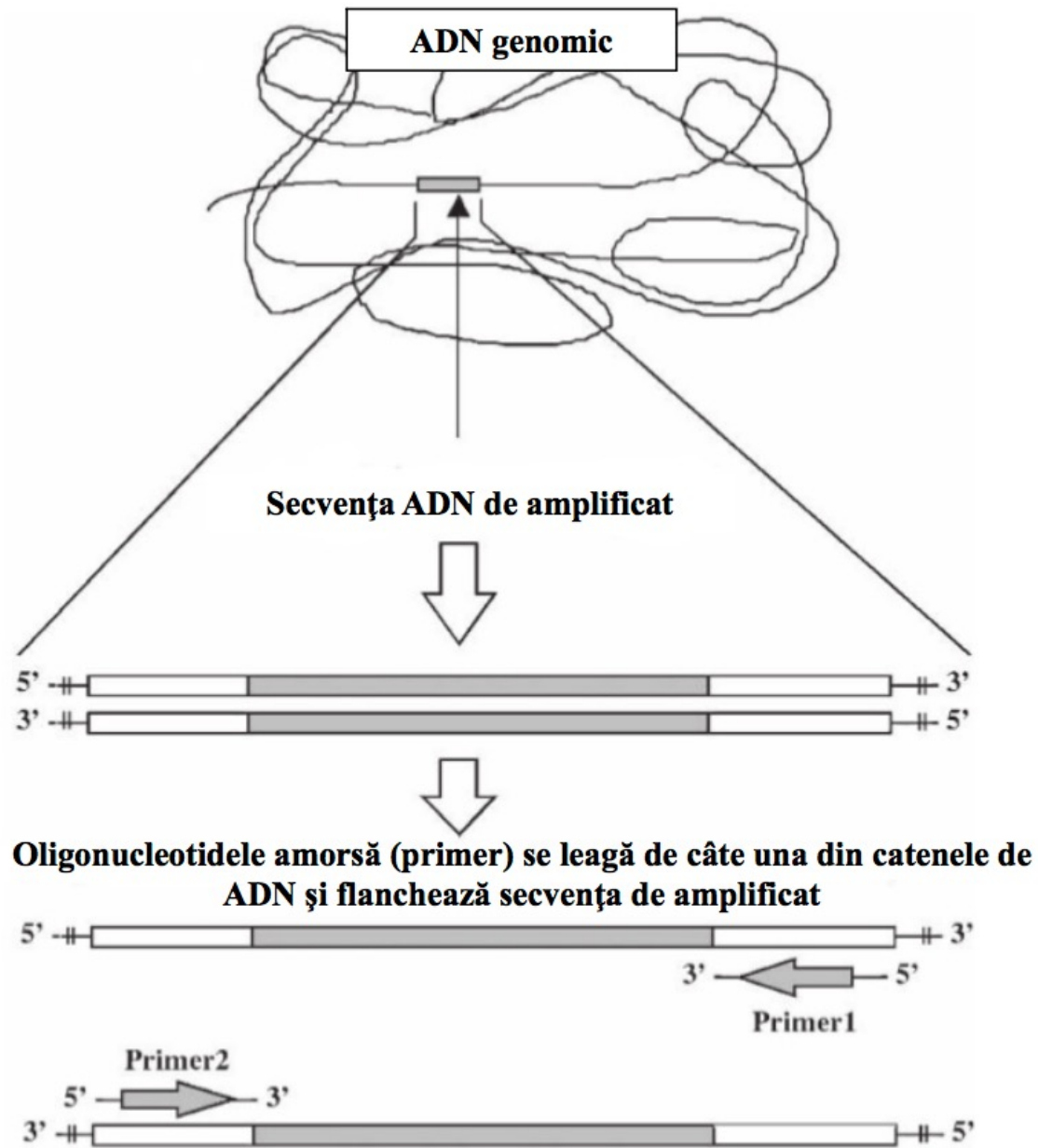
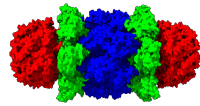
Etapele unei reacții PCR

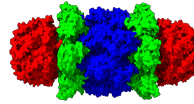


Cele trei etape alcătuiesc un **ciclu** care este repetat în mod obișnuit într-o reacție PCR de **30-35 ori**, întregul proces durând în jur de 3-4 ore. În etapa de *legare* a primului ciclu, oligonucleotidele amorsă (primer) se leagă doar de catenele separate ale ADN-ului sursă, iar catenele nou sintetizate sunt clar definite doar la capătul 5` (cel reprezentat de oligonucleotida amorsă). Poziția capătului 3` depinde de durata etapei de sinteză și poate fi variabilă. După primul ciclu PCR se obține un amestec de molecule de ADN sursă și ADN nou sintetizat de dimensiuni variabile. În ciclurile următoare sunt utilizate ca matriță și catenele nou sintetizate, ceea ce face ca pe măsură ce procesul înaintază, moleculele nou sintetizate să încorporeze treptat, la ambele capete, oligonucleotidele amorsă (primer). Faptul că la fiecare ciclu nou se utilizează ca matriță și catenele sintetizate în etapele anterioare face ca sinteza ADN-ului pornind de la noile catene să fie un proces exponențial, înlănțuit. La sfârșitul celor 30-35 cicluri, produsul rezultat în urma amplificării (numit *amplicon*) va fi format predominant din catene sintetizate în ultimele cicluri

În cursul unei reacții de amplificare enzimatică in vitro a ADN-ului (PCR), are loc multiplicarea exponențială, înlănțuită a fragmentului de ADN cuprins între cele două oligonucleotide amorsă.







Cele 3 etape obligatorii ale reacției PCR pot fi la ora actuală complet automatizate prin intermediul **termocicloarelor**. Acestea sunt dispozitive termice cu unul sau mai multe elemente Peltier care au capacitatea de a modifica în mod controlat, cu precizie și viteză mare temperatura unui bloc de incubare în care este amplasat amestecul de reacție. În mod curent, la programarea unui termociclor, pe lângă cele trei etape obligatorii pentru realizarea amplificării *in vitro* a ADN-ului, se adaugă trei etape suplimentare care nu se repetată:

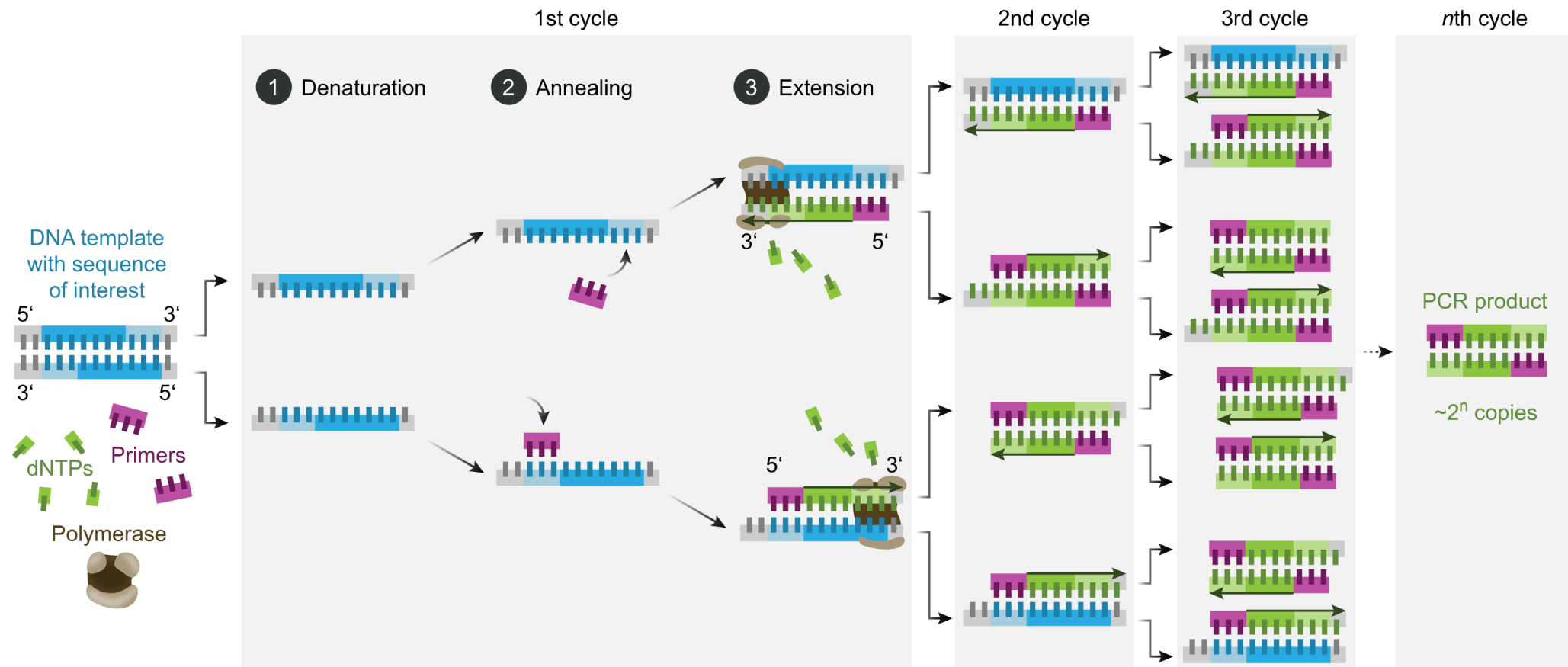
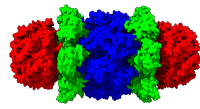
A. denaturarea inițială – constă în menținerea timp de 5 minute a amestecului PCR la temperatura de 95°C pentru denaturarea completă a ADN-ului matriță sau a celulelor, atunci când acestea sunt utilizate direct ca sursă de ADN;

B. finalizarea sintezei – după realizarea celor 30-35 cicluri, menținerea timp de 10 minute la temperatura de 72°C are rolul de a permite finalizare sintezei tuturor catenelor la care s-a început extensia;

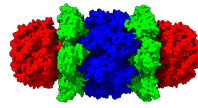
C. menținerea amestecului de reacție la temperatura de 4-12°C este etapa finală, în general fără limită de timp, care are rolul de a păstra probele la o temperatură optimă până la intervenția operatorului.



Etapele unei reacții PCR



Simultan cu mărirea numărului de molecule ADN disponibile dintr-o probă, prin PCR se realizează și o izolare a fragmentului de ADN cuprins între cele 2 oligonucleotide amorsă. Tehnicile de purificare ale ADN-ului total permit obținerea ADN-ului genomic total (sau plasmidial, după caz) sub forma unor fragmente de dimensiuni variabile. Amplificarea enzimatică in vitro a acizilor nucleici permite izolarea unui fragment ADN specific a cărui dimensiune și secvență pot fi controlate de către cercetător (cum?)



După 30 cicluri 1 molec ADN este copiată în 536870912 exemplare

Etapa 1

100 molec primer
1 molec. ADN
matriță dublu-
catenară → 2
catene matriță)

Etapa 2

98 molec primer
2 complexe primer
– catenă ADN
matriță

Etapa 3

98 molec primer
2 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

Ciclul 1

98 molec primer
2 molec. ADN
matriță dublu-
catenară → 4
catene matriță)

94 molec primer
4 complexe primer
– catenă ADN
matriță

94 molec primer
4 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

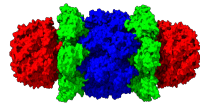
Ciclul 2

94 molec primer
4 molec. ADN
matriță dublu-
catenară → 8
catene matriță)

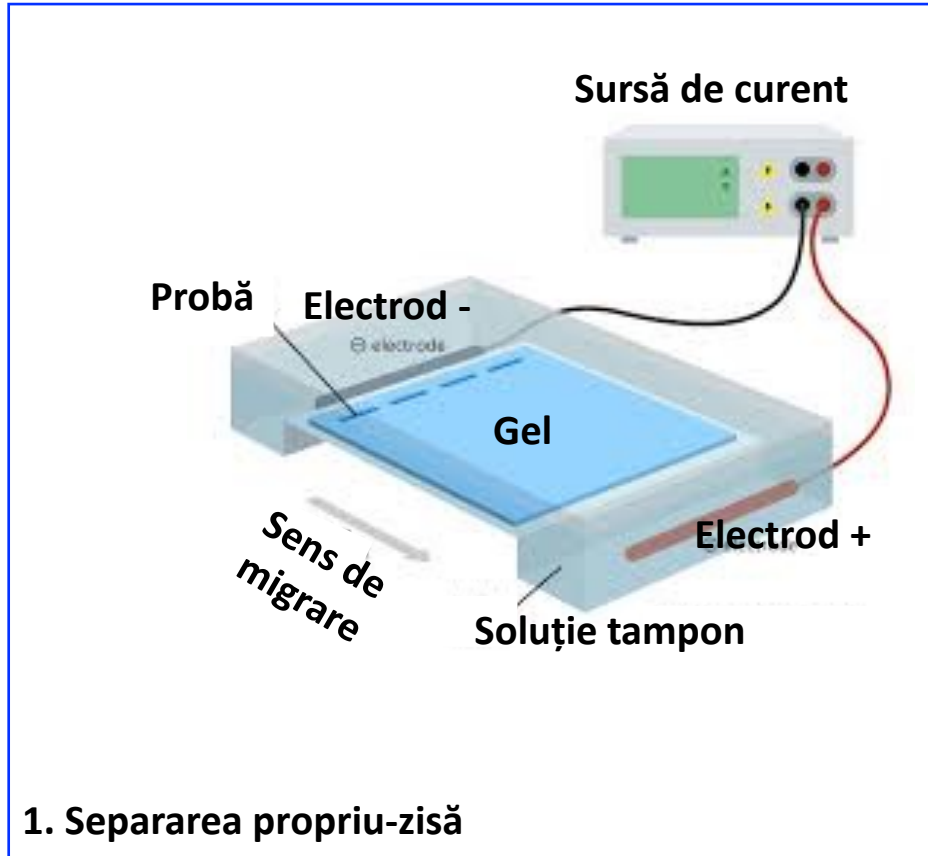
86 molec primer
8 complexe primer
– catenă ADN
matriță

86 molec primer
8 molecule de ADN
dublucatenare,
fiecare alcătuită din
o catenă veche și
una nou sintetizată

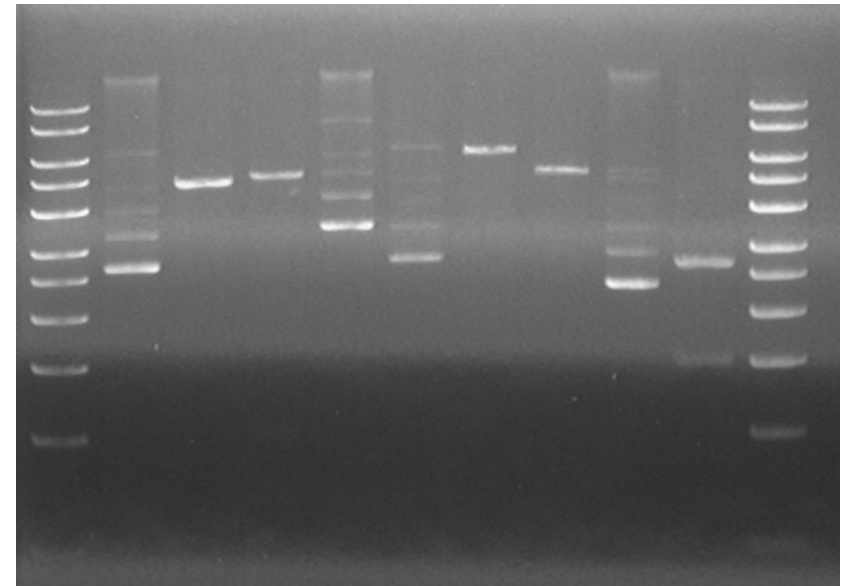
Ciclul 3



Abordarea generală

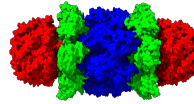


Electrod -



Electrod +

2. Evidențierea moleculelor de ADN



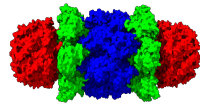
Separarea electroforetică a moleculelor de ADN este una din metodele care au stat la baza dezvoltării foarte rapide a biologiei moleculare. **Tehnica permite nu numai separarea fragmentelor de ADN, ci și izolarea (în ce sens?), evidențierea (în ce sens?) și caracterizarea (în ce sens?) acestora.**

Electroforeza este o tehnică de laborator ce permite separarea moleculelor pe baza dimensiunii și încărcării lor electrice. Prin aplicarea unui curent electric moleculele de acizi nucleici încărcate negativ (**de ce?**) se vor deplasa spre polul pozitiv. **Deplasarea se realizează printr-un gel** ce funcționează ca o sită, **moleculele mici deplasându-se mai repede decât moleculele mari.** Gelurile cel mai frecvent utilizate pentru separarea ADN-ului sunt **agaroză** sau **poliacrilamida.**

Poliacrilamida este deosebit de eficientă în separarea fragmentelor de dimensiuni mici între **50 pb-500 pb**. Rezoluția este foarte bună, putând fi separate fragmente ce diferă în lungime doar printr-o pereche de baze. Din acest motiv, gelurile de poliacrilamidă au fost intens utilizate pentru reacții de secvențiere manuală. Gelurile de poliacrilamidă prezintă dezavantajul că este dificil de preparat și manipulat.

Gelurile de **agaroză** au o rezoluție semnificativ mai mică, dar sunt mai ieftine și mai simplu de preparat și manipulat. Acest tip de geluri permite separarea de fragmente cu dimensiuni cuprinse între **0,5 kb-25 kb**, însă diverse îmbunătățiri au condus la mărirea domeniului de uzabilitate până la fragmente de ordinul **mpb**.

ADN-ul este un polimer puternic încărcat negativ care sub influența curentului electric se va deplasa către polul pozitiv. **Viteza de migrare este invers proporțională cu dimensiunea fragmentelor și direct proporțională cu tensiunea aplicată.** Porii gelului au un efect de sită, astfel încât moleculele mici trec mult mai rapid prin porii gelului decât moleculele mari.



Pentru a explica modul în care are loc migrarea ADN-ului în gelurile de agaroză au fost dezvoltate mai multe modele. Cel mai simplu model este cel în care **moleculele de ADN șerpuiesc printre porii gelului**. Moleculele mici vor migra mai rapid decât cele mari, deoarece creșterea dimensiunii moleculei duce la creșterea forțelor de frecare dintre moleculă și gel. Pe lângă întârzierea cauzată de dimensiuni, moleculele mari se pot de asemenea, „**înnoda**” în gel, conducând la un proces suplimentar de întârziere. Moleculele mari de ADN vor migra mult mai puțin prin gel decât ne-am aștepta ținând cont doar de dimensiunile lor, deoarece fenomenul de înnodare este atât de puternic încât elimină complet șerpuirea. **Dimensiunea limită la care procesul de înnodare acoperă total șerpuirea este de 30 kb**. Astfel, fragmente de 30 kb, 40 kb sau 120 kb vor migra perfect identic și nu vor putea fi separate prin metodele clasice.

