

# Ćwiczenie C06A

## Replikacja DNA *in vivo* i *in vitro*

### Podstawy replikacji DNA

### Technika PCR

### Odmiany reakcji PCR

Prof. dr hab. Roman Zieliński

## 1. Podstawy replikacji DNA

Budowa cząsteczki DNA, która składa się z dwóch komplementarnych nici, ma istotne implikacje dla procesu syntezy nowych cząstek, czyli replikacji. Komplementarność sprawia, że dowolny fragment sekwencji DNA może stanowić matrycę do powstania nowej cząstki.

**Replikacja DNA to proces, w którym z cząsteczki DNA powstają dwie identyczne cząsteczki. Replikacja jest procesem semikonserwatywnym, dwukierunkowym tzn. rozpoczyna się w specyficznym miejscu i widełki replikacyjne poruszają się w dwóch przeciwnych kierunkach. Synteza nowej nici zachodzi w kierunku 5' do 3' na nici o orientacji przeciwnej.**

### ➔ 1.1. Chemizm replikacji DNA

Przyłączenie deoksyrybonukleotydu do końca 3' łańcucha polinukleotydowego i utworzenie wiązania fosfodiesterowego jest podstawową reakcją umożliwiającą syntezę DNA. **Chemicznie wiązanie fosfodiesterowe powstaje, gdy grupa hydroksylowa (-OH) kwasu ortofosforowego reaguje z grupami hydroksylowymi innych molekuł i tworzy wiązania estrowe według schematu C-O-PO<sub>2</sub>O-C.** Wiązanie fosfodiesterowe jest najbardziej znane z kwasów nukleinowych, ale występuje także w innych związkach, np. ACP (ang. acyl carrier protein) – białkowy nośnik grup acylowych.

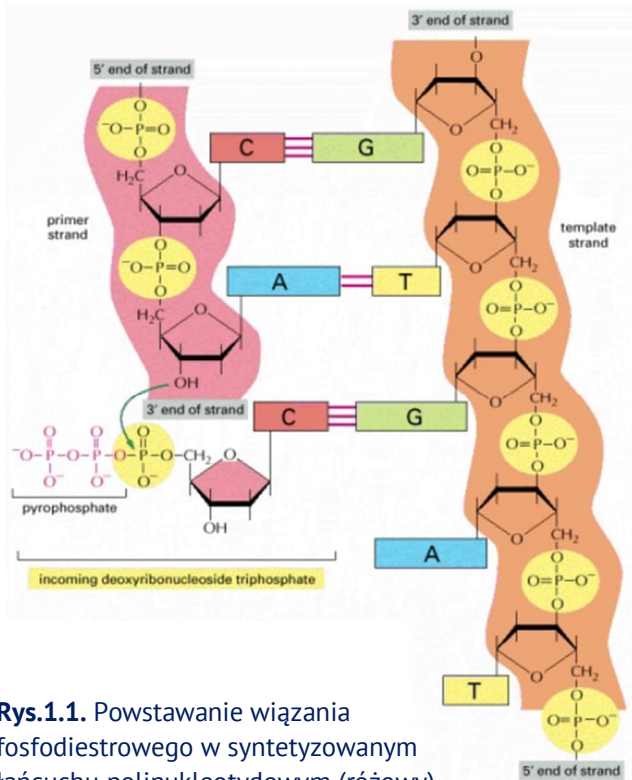
W kwasach nukleinowych wiązanie fosfodiesterowe powstaje przez połączenie grupy hydroksylowej w pozycji 3' pentozy z grupą hydroksylową grupy fosforanowej w pozycji 5' pentozy (Rys. 1.1). Dlatego wiązanie to nosi nazwę **wiązania 3' 5' fosfodiesterowego**. Fosfodiestry mają ładunek ujemny w pH = 7, co sprawia, że reagują z dodatnio naładowanymi histonami, kationami metali oraz poliaminami. Energia do powstania wiązania fosfodiesterowego jest dostarczana przez rozbitcie dwu- i trójfosforanów nukleotydów. Hydroliza wiązań fosfodiesterowych jest katalizowana przez fosfodiesterazy.

Wiązania fosfodiesterowe między dwoma nukleotydami są tworzone przez polimerazę DNA. Mogą one być także utworzone przez ligazę. Ligaza to enzym uczestniczący w wypełnianiu luk powstałych podczas replikacji, np. po wycięciu starterów RNA oraz podczas łączenia fragmentów Okazaki. Ligaza uczestniczy również w naprawie DNA.

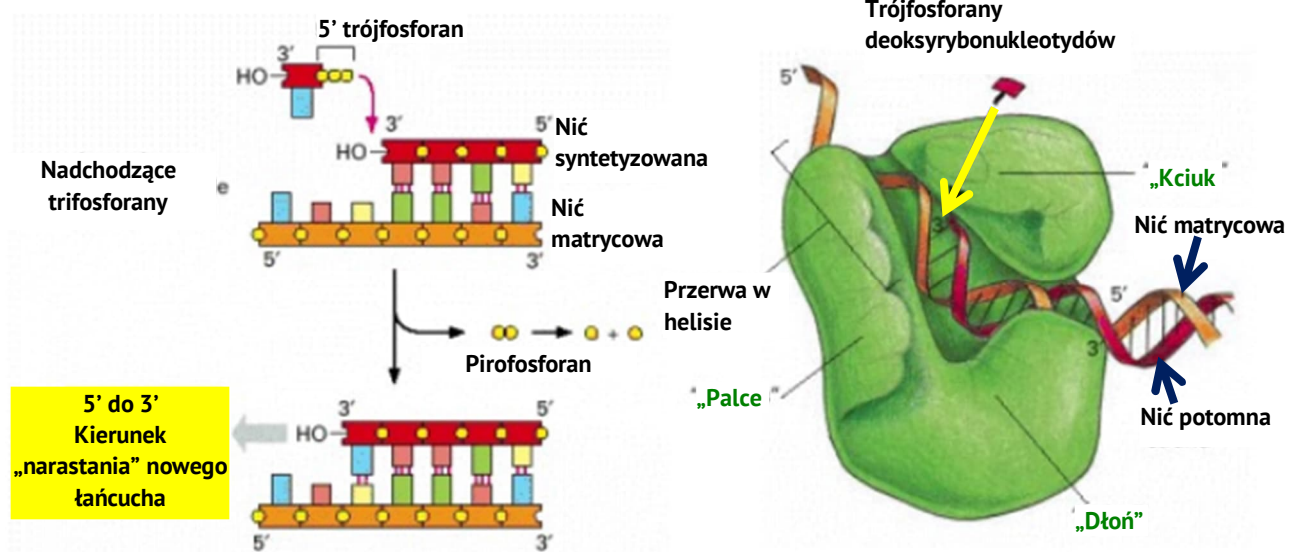
## ➔ 1.2. Rozpoznanie miejsc początku replikacji

Synteza DNA jest katalizowana przez polimerazę DNA zależną od DNA (Rys. 1.2). Polimeraza dodaje nukleotydy do syntetyzowanej nici, przy czym przed wstawieniem, nukleotyd musi wytworzyć wiązanie wodorowe z nukleotydem na nici matrycowej. Tylko wówczas polimeraza rozpozna nukleotyd i katalizuje tworzenie wiązania fosfodiesterowego.

Polimerazy DNA nie mają zdolności samodzielnego rozpoczęcia replikacji. Mogą tylko wydłużać łańcuch polinukleotydowy. Funkcję starterów pełnią krótkie odcinki RNA syntetyzowane przez polimerazę RNA. Struktura chemiczna RNA jest podobna do DNA. Nić RNA może łączyć się (hybrydować) z nicią DNA przez tworzenie wiązań wodorowych między rybonukleotydami i deoksyrbonukleotydami. Powstała cząsteczka to hybryda DNA/RNA.



Rys.1.1. Powstawanie wiązania fosfodiesterowego w syntetyzowanym łańcuchu polinukleotydowym (różowy).

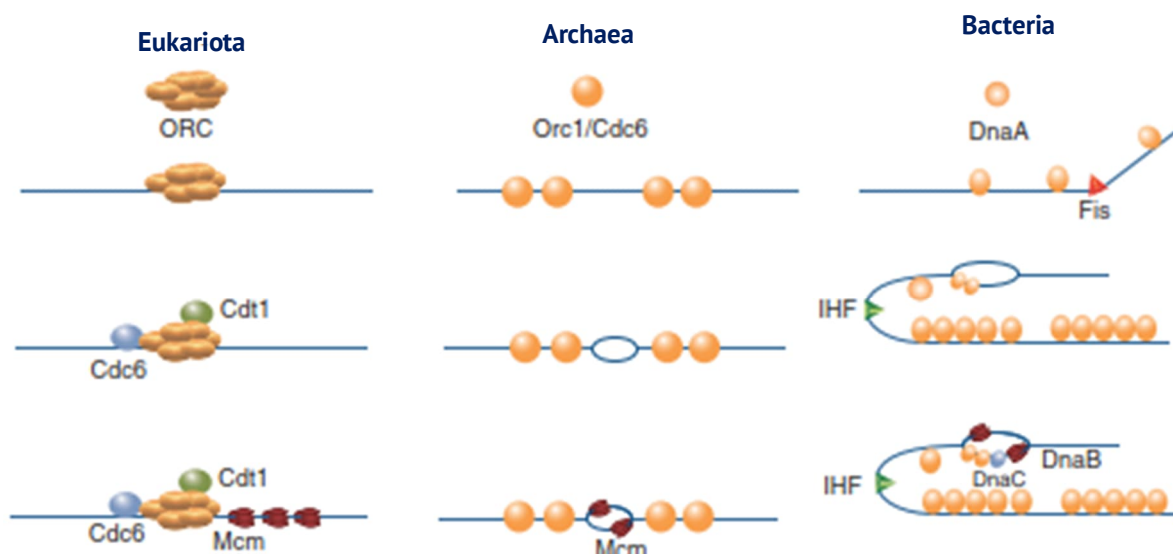


Rys.1.2a. Synteza DNA katalizowana przez polimerazę DNA.

Replikacja DNA jest procesem złożonym, zwłaszcza u Eukariota, u których zaangażowanych jest co najmniej 60 białek. Aby polimeraza DNA mogła działać, podwójna helisa musi zostać rozdzielona na pojedyncze nici w procesie zwanym **denaturacją lub topnieniem**. Rozplecenie nici DNA zachodzi w miejscach inicjacji replikacji.

We wszystkich domenach (Eukariota, Archaea, Bacteria) czynniki inicjujące typu *trans* rozpoznają miejsca początku replikacji i tworzą kompleks pre-replikacyjny (pre-RC, ang. pre-replication complex), który uczestniczy w rozpleceniu DNA. Białka rozpoznające miejsca początku replikacji wykazują istotne podobieństwo strukturalne, w tym przynależność do rodziny ATPaz (AAA+). Białka te są aktywowane przez przyłączenie ATP. Pomimo podobieństw, inicjacja replikacji u Prokariota i Eukariota różni się.

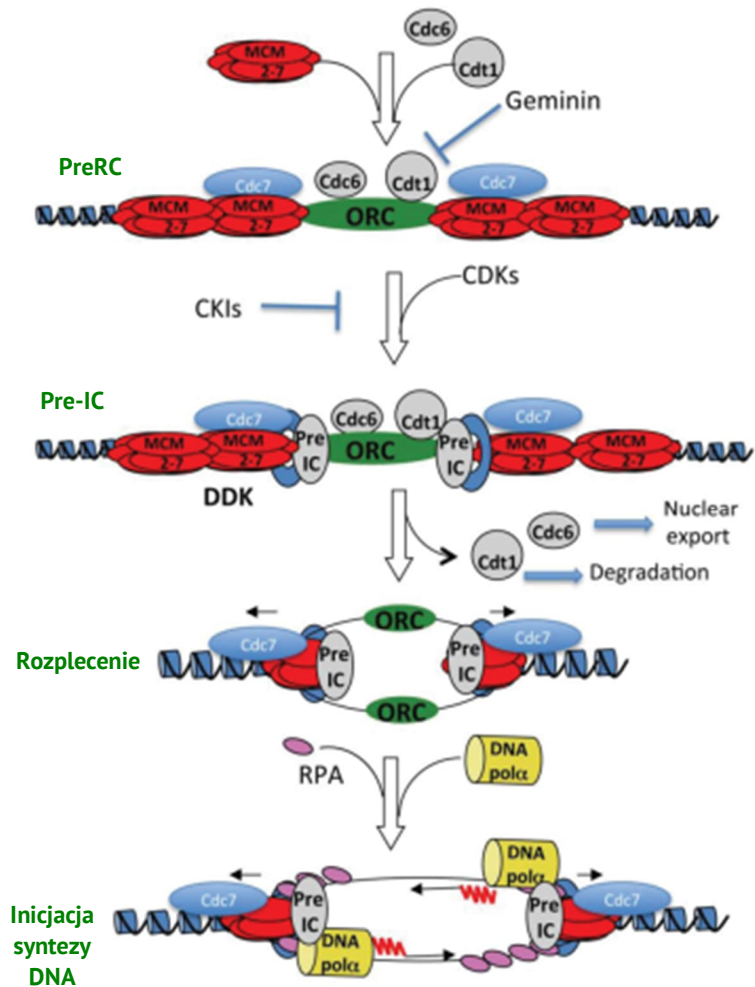
U Prokariota rozpoznanie sekwencji powtarzalnych oraz ich układu przez monomery białek inicjujących prowadzi do tworzenia oligomerów białek inicjujących i rozplatania DNA. U Bacteria denaturacja DNA jest katalizowana przez jeden enzym – helikazę kodowaną przez gen *DnaA*. Dodatkowo białka zaginające, Fis i IHF mogą wpływać na tworzenie kompleksu pre-RC. Białko inicjujące Archaea, CDC6/ORC1 wykazuje homologię z białkami ORC Eukariota, ale także z białkiem *DnaA* Bacteria. Podobnie jak helikaza Prokariota, CDC6/ORC1 rozpoznaje *OriC* jako monomer i dopiero później tworzy oligomery. Inicjacja replikacji u Eukariota wymaga obecności złożonego heksameru ORC, który następnie rekrutuje kolejne białka (Rys. 1.2b).



**Rys.1.2b.** Porównanie inicjacji replikacji u Eukariota, Archaea i Bacteria (Leonard i Mechali 2013).

Kompleks ORC (ang. Origin Recognition Complex) łączy się z miejscami inicjacji replikacji wraz z białkami CDC6 i CDT1 (Rys. 1.2c). Kompleks ORC umożliwia przyłączenie helikazy MCM2-7 w pobliżu miejsc inicjacji replikacji. Etap ten jest często określany jako powstawanie kompleksu pre-replikacyjnego, pre-RC lub „licencjonowanie replikacji DNA”. U Metazoa, w tym u człowieka białko Geminin inhibuje replikację przez blokowanie tworzenia kompleksu pre-RC na skutek interakcji z CDT1. Dodatkowo rozplecenie DNA wymaga przyłączenia kinazy białkowej CDC7, CDC45, kompleksu GINS, MCM10 i kilku innych białek. Białka CDC45, MCM2-7 oraz GINS tworzą kompleks helikazy CMG, który uważany jest za aktywną formę helikazy (Recolin i inni 2014).

Sekwencje miejsc początku replikacji są bardziej zróżnicowane niż u Prokariota, co sprawia, że inne mechanizmy, w tym epigenetyczne, rozpoznania i inicjacji muszą być zaangażowane. W trakcie mitozy, kompleks pre-RC u Eukariota powstaje w fazie G1. Występuje on w postaci nieaktywnej. W fazie S tylko część miejsc początku replikacji z przyłączonym kompleksem pre-RC jest aktywowana. Nadmiar miejsc inicjacji replikacji jest charakterystyczną cechą Eukariota. Na ogół wykorzystywane jest tylko 20% „licencjonowanych” miejsc inicjacji. Ten nadmiar umożliwia poszczególnym komórkom organizmu wielokomórkowego, aktywację różnych miejsc inicjacji replikacji.



Rys.1.2c. Model inicjacji syntezy DNA u Eukariota (Recolin i inni 2014).

### ➔ 1.3. Właściwości korektorskie polimeraz

Dokładność kopiowania DNA jest związana z korektorskimi właściwościami polimerazy DNA. Błędy w DNA występują z częstością  $10^{-9}$ - $10^{-8}$ , co jest znacznie niższą częstością niż wynikałoby to tylko z komplementacji zasad. Przykładowo, nieznaczna zmiana geometrii helisy DNA umożliwia tworzenie wiązań między G i T. Ponadto, tzw. formy tautomeryczne zasad występują z częstością  $10^{-5}$ - $10^{-4}$ . Efektem ich występowania jest parowanie C-A.

Przed inkorporacją nukleotydu, konformacja przestrzenna prawidłowo utworzonego wiązania wodorowego różni się nieznacznie od konformacji nieprawidłowo sparowanych zasad. To powoduje, że polimeraza ma większe powinowactwo do prawidłowo sparowanych zasad. Po wstawieniu nieprawidłowego nukleotydu i utworzeniu wiązania kowalencyjnego, korekta następuje dzięki egzonukleolitycznym właściwościom korektorskimi polimerazy w kierunku  $3' \rightarrow 5'$ . Polimeraza wycina nieprawidłowo wstawiony nukleotyd tak, aby odtworzyć grupę  $3'OH$ .

Polimeraza DNA różni się od polimeraz RNA obecnością właściwości korektorskich. Polimerazy RNA nie są wrażliwe na błędy w parowaniu zasad, dlatego częstość błędów podczas syntezy RNA wynosi  $10^{-4}$ .

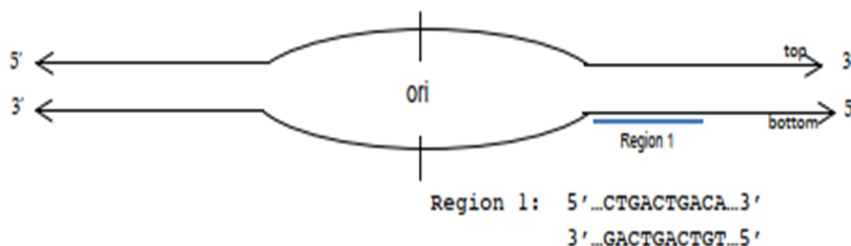
## 1.4. Zadania



### 1.4.1. Widelki replikacyjne

Na rysunku 1.4.1 przedstawiono miejsce rozpoczęcia replikacji. Podano także sekwencję regionu 1 na obu niciach.

- Która z nici będzie matrycą do syntezy nici wiodącej w regionie 1, górna czy dolna?
- Proszę podać sekwencję nici opóźnionej od końca 5', dla której matrycą będzie region 1.

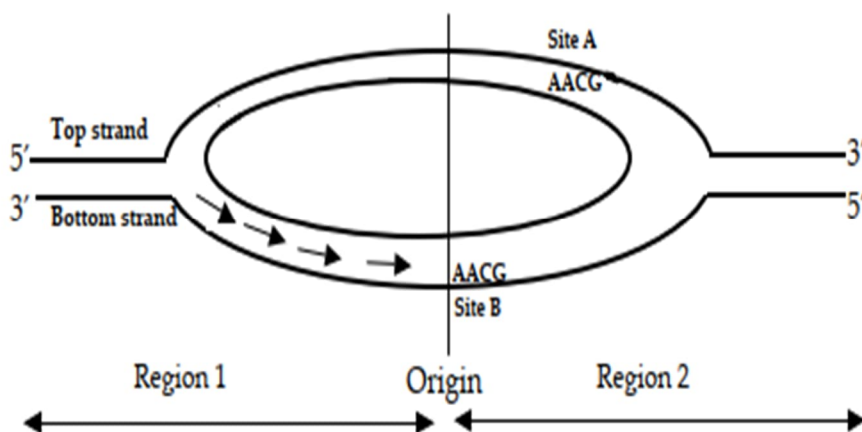


**Rys.1.4.1.** Widelki replikacyjne.

### 1.4.2. Replikacja kolistego DNA bakteryjnego

Na rysunku 1.4.2. pokazano schemat replikacji bakteryjnego DNA kolistego.

- Która z nici, dolna czy górna jest matrycą do syntezy nici wiodącej w regionie 2.
- Z którym miejscem, A, B łączy się starter 5'UUGC3'?
- Która nić w regionie 2 nie będzie powielona, jeżeli przed rozpoczęciem replikacji nie będzie obecna polimeraza RNA?



**Rys. 1.4.2.** Replikacja bakteryjnego DNA.

### 1.4.3. Czas trwania replikacji

Szybkość replikacji wynosi 500 par zasad na sekundę. Ile będzie trwała replikacja genomu składającego się z 3,5 mln par zasad? Proszę podać czas w minutach.

## 2. Technika PCR

### ➔ 2.1. Definicja

**PCR: reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction) jest enzymatyczną reakcją replikacji DNA *in vitro*. Pozwala ona na powielenie danego fragmentu DNA w wielu kopiach.**

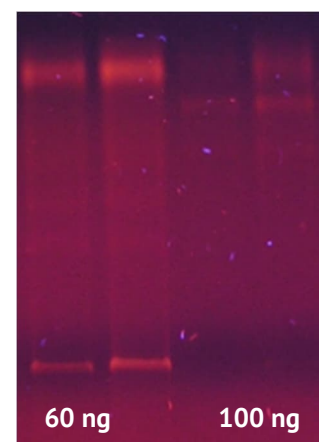
Łańcuchowa reakcja polimerazy służy do namnożenia DNA, który później można poddać analizom, np. sekwencjonowaniu. Od czasu pierwszego opisu PCR w 1985 r. powstały liczne odmiany reakcji różniące się typem wykorzystywanych starterów, rodzajem matrycy i sposobem detekcji produktów. Typowa reakcja PCR polega na zastosowaniu dwóch starterów, które łączą się komplementarnie z sekwencją DNA, którą chcemy powielić. Startery umożliwiają polimerazie DNA rozpoczęcie wydłużania komplementarnej nici DNA. Dlatego typowa reakcja PCR wymaga znajomości sekwencji, którą chcemy powielić. Niektóre odmiany reakcji PCR wykorzystują tzw. uniwersalne startery i pozwalają na namnożenie wielu sekwencji rozpoznawanych przez starter w genomie. Są to tzw. markery DNA oparte o reakcję PCR. Zakłada się, że taki uniwersalny starter przyłącza się do obu nici matrycy DNA w niezbyt dużej odległości. Reakcja PCR z zastosowaniem uniwersalnych starterów nie wymaga znajomości sekwencji docelowych. O szerokim zastosowaniu PCR decyduje szybkość i stosunkowa prostota reakcji w porównaniu z innymi procedurami molekularnymi. Reakcja PCR jest bardzo czuła. Pozwala ona na namnożenie nawet pojedynczej cząsteczki DNA. Z drugiej strony czułość PCR sprawia, że reakcja ta wymaga dużej precyzji w oczyszczaniu materiału biologicznego, optymalizacji stężeń składników oraz temperatury poszczególnych etapów. Wszystkie wymienione czynniki mogą wpływać na specyfikę reakcji i nieznaczne odstępstwa od warunków optymalnych mogą prowadzić do błędnych wyników.

### ➔ 2.2. Składniki wykorzystywane w PCR

#### 2.2.1. Matryca

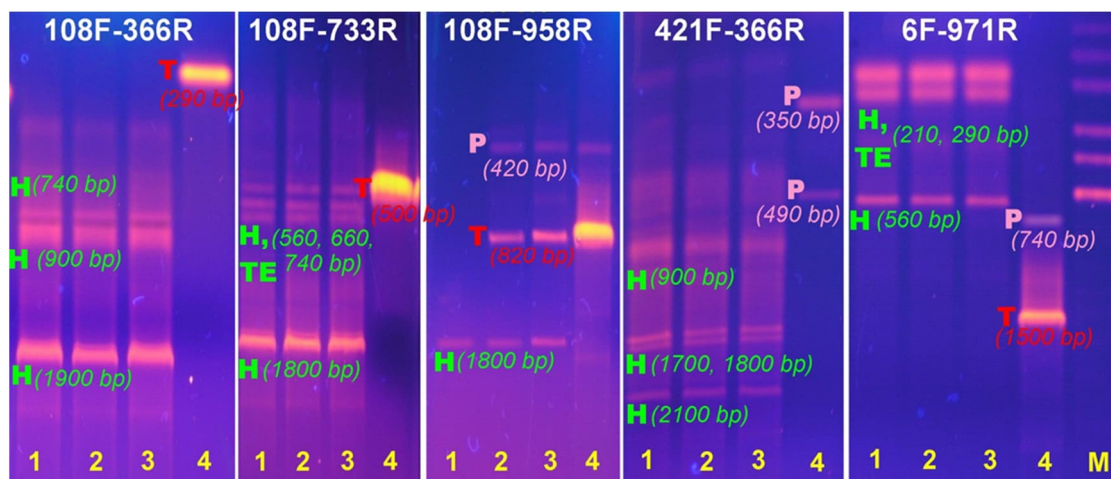
**Matryca: to DNA, który podlega namnożeniu.** Można wykorzystać dowolne DNA: genomowe, organellowe, wirusowe, plazmidowe, kosmidowe itd. Na ogół w reakcji bierze udział  $10^4$ - $10^5$  cząsteczek DNA, co oznacza ilości rzędu 10-100 ng. Nie określa się stężenia matrycy, jednakże zbyt duża ilość może prowadzić do inhibicji reakcji w związku ze zbyt dużym stężeniem zanieczyszczeń (Rys. 2.1.1) Z kolei zbyt mała ilość powoduje niespecyficzny przebieg reakcji.

Teoretycznie technika PCR pozwala na powielenie nawet jednej cząsteczki DNA. Dzięki temu można wykorzystać DNA pochodzące ze śladów kopalnych. Z drugiej strony czułość reakcji PCR wymaga dużej precyzji przy analizie materiału genetycznego, gdyż każde zanieczyszczenie może prowadzić do błędnych wyników. Jeżeli badana próba zawiera materiał genetyczny różnego pochodzenia, to każdy materiał się może namnożyć. Startery zaprojektowane dla



**Rys. 2.2.1a.** Wpływ ilości DNA na efektywność amplifikacji w reakcji PCR (dane własne).

danej sekwencji nie rozwiązują problemu, gdyż sekwencje homologiczne występują u różnych organizmów (Rys. 2.2.1b). Tym samym warunkiem prawidłowego przeprowadzenia reakcji PCR jest czysty materiał genetyczny. W przeciwnym razie zamiast namnożyć DNA poszukiwanej sekwencji, namnożymy każdą sekwencję podobną. W diagnostyce prowadzi to do otrzymania wyników fałszywie pozytywnych, które mogą pociągnąć określone konsekwencje prawne.



**Rys. 2.2.1b.** Przykład wpływu obecności różnego materiału genetycznego na amplifikację. Obecność sekwencji homologicznych do transgeny u roślin GMO powoduje amplifikację homologów zamiast lub obok transgeny pomimo zastosowania specyficznych starterów (dane własne).

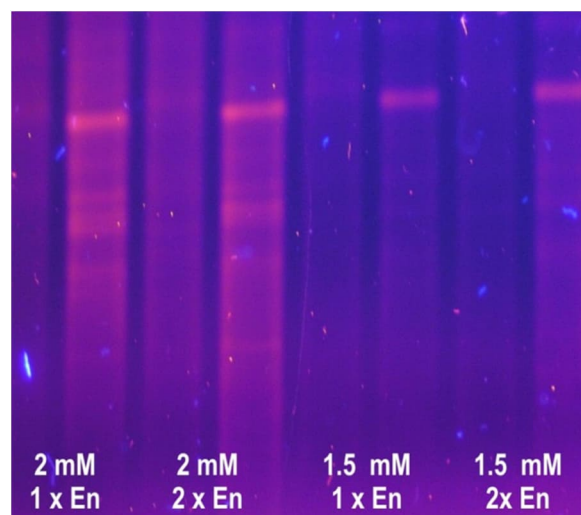
1. Kontrola, 2. PGIP, 3. PGIP x VSR, 4. Plazmid. M. Marker masowy.

**Warunkiem prawidłowego przeprowadzenia reakcji PCR jest czysty materiał genetyczny.**

### 2.2.2. Bufory

W technice PCR wykorzystuje się składniki niezbędne do aktywności polimerazy, zapewniające optymalne pH reakcji i zwiększające siłę jonową.

- Tris-HCl, pH w temperaturze pokojowej wynosi 8,3, w temperaturze 72°C (temperatura elongacji) pH spada do 7,2, które jest bliskie optimum dla polimerazy DNA.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dostarcza jednowartościowych kationów zwiększających siłę jonową roztworu, alternatywnie może być dodany KCl.
- $\text{MgCl}_2$ , dostarcza dwuwartościowych kationów  $\text{Mg}^{2+}$  niezbędnych do aktywności polimerazy. Stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosi 1-5 mM, przy czym im wyższe stężenie  $\text{MgCl}_2$  tym mniejsza specyficzność reakcji. Generalnie 1-2 mM.



**Rys. 2.2.2.** Wpływ stężenia  $\text{MgCl}_2$  oraz betainy (En) na specyfikę PCR. Obniżenie stężenia  $\text{MgCl}_2$  do 1,5 mM zmniejsza liczbę niespecyficznych produktów widocznych jako „tło” (dane własne).

- Detergenty, np. Triton-X, Tween 20, betaina w stężeniach 0,1-0,5% wykorzystywane są w celu minimalizacji absorpcji polimerazy DNA na ściankach probówki. Przykładowo, betaina zawiera rozdzielone grupy funkcyjne o ładunku dodatnim i ujemnym. Występuje w postaci jonu obojnego. W układach biologicznych betaina pełni funkcję osmolitów – cząstek, które wpływają na lepkość i siłę jonową roztworów wodnych. W technice PCR betaina zwiększa efektywność amplifikacji, ale może także wpływać na zmniejszenie specyfiki reakcji (Rys. 2.2.2).

### 2.2.3. Trójfosforany nukleotydów. dNTPs

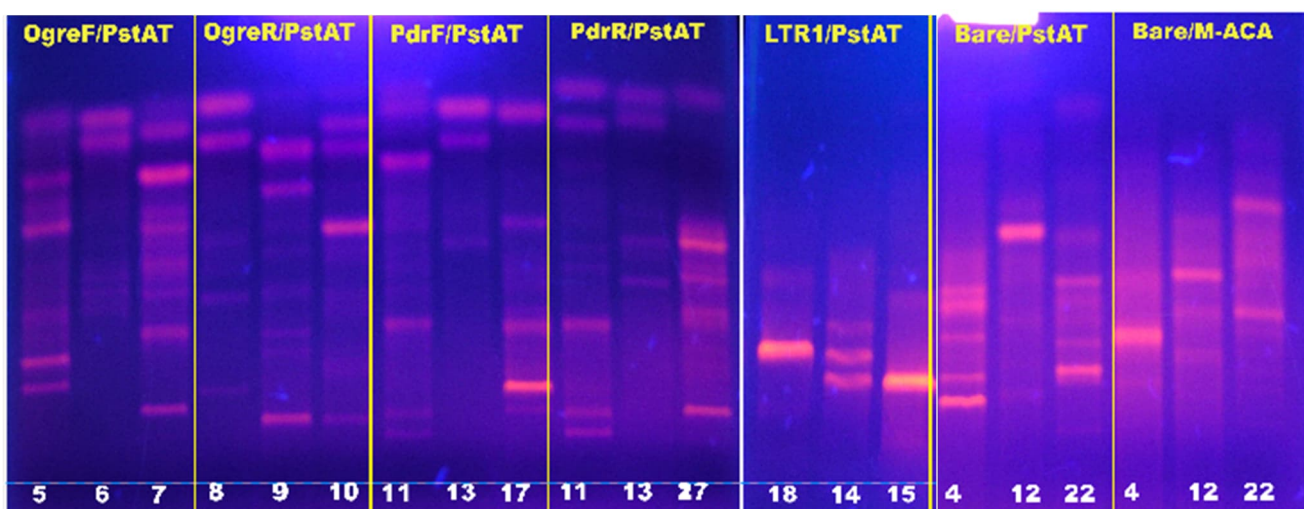
Trójfosforany nukleotydów są składnikami niezbędnymi do syntezy DNA, zarówno *in vivo* jak *in vitro*. W skład DNA wchodzi monofosforany, jednakże do syntezy niezbędne są trójfosforany, gdyż reszty fosforanowe dostarczają energii niezbędnej do tworzenia wiązania fosfodiesterowego.

W technice PCR wykorzystuje się trójfosforany nukleotydów odporne na wysoką temperaturę z okresem półtrwania około 40 cykli. Stężenie każdego z trójfosforanów nukleotydów mieści się między 50-250  $\mu\text{M}$ , najczęściej stosuje się 200  $\mu\text{M}$ , które pozwala syntetyzować między 25-6,5  $\mu\text{g}$  DNA (Baumforth 1999). Zbyt wysokie stężenie trójfosforanów nukleotydów prowadzi do niespecyficznego reakcji.

Trójfosforany dostarczane są w postaci oddzielnych roztworów wodnych, dATP, dCTP, dGTP i dTTP. Przed przystąpieniem do zakładania reakcji sporządza się jeden roztwór zawierający wszystkie cztery trójfosforany nukleotydów. Trójfosforany nukleotydów mogą być znakowane radioaktywnie, fluorescencyjnie, mogą być modyfikowane (np. w sekwencjonowaniu) w zależności od specyfiki reakcji.

### 2.2.4. Startery

Startery projektuje się tak, aby flankowały region, który ma być amplifikowany. Najczęściej wykorzystuje się dwa startery, które są komplementarne do fragmentów danej sekwencji. Startery te określa się mianem Forward i Reverse, ale należy pamiętać, że nazewnictwo jest umowne i faktyczne przyłączenie starterów do matrycy może być inne. Jeżeli wykorzystujemy jeden starter to zakładamy, że przyłącza się on na obu niciach w bliskiej odległości.



**Rys. 2.2.4a.** Wykorzystanie różnych kombinacji starterów do amplifikacji sekwencji transpozonowych u pijawek (dane własne).

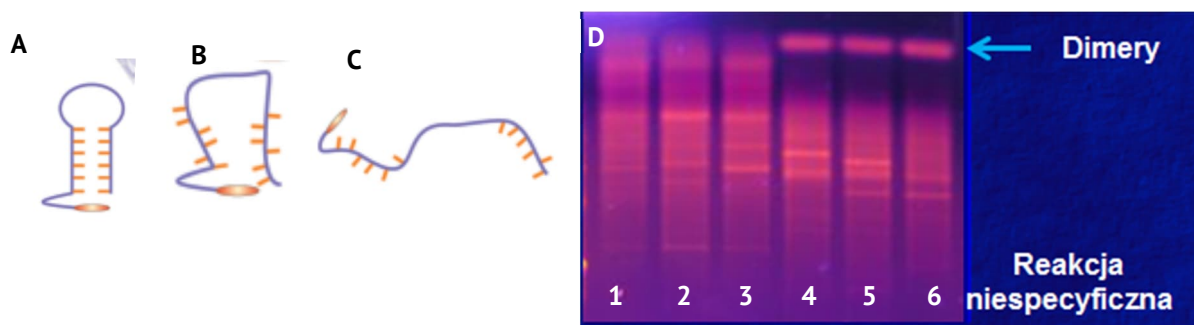


Stężenie starterów mieści się w zakresie 0,3-1  $\mu\text{M}$  dla reakcji standardowej. W niektórych odmianach PCR stosuje się niższe lub wyższe stężenia.

**Starter: krótkie, jednoniciowe oligonukleotydy DNA, komplementarne do matrycy, które umożliwiają inicjację replikacji *in vitro*, czyli amplifikacji. Startery mają 10-30 nukleotydów, najczęściej około 20 nukleotydów. Najczęściej wykorzystujemy dwa różne startery, które flankują fragment docelowy. Istnieją jednak reakcje, w których wykorzystuje się tylko jeden typ startera. Wówczas taki starter przyłącza się do sekwencji komplementarnych na obu niciach.**

Aby reakcja była specyficzna startery muszą być odpowiednio zaprojektowane.

- Długość starterów powinna mieścić się między 10-30 nukleotydów.
- Startery powinny zawierać 50-60% zasad G+C. Startery z większą liczbą zasad G+C tworzą stabilniejsze wiązania z matrycą.
- Powinno się unikać ciągów złożonych z więcej niż trzy takie same zasady.
- Startery nie powinny być komplementarne względem siebie. Komplementarność starterów względem siebie prowadzi do powstawania dwuniciowych struktur, które stanowią konkurencyjną matrycę w trakcie PCR i w efekcie reakcja nie jest specyficzna.
- Startery nie powinny tworzyć struktur drugorzędowych, a także nie powinny tworzyć dimerów zarówno w obrębie danego startera (homodimery) oraz pomiędzy różnymi starterami (heterodimery)

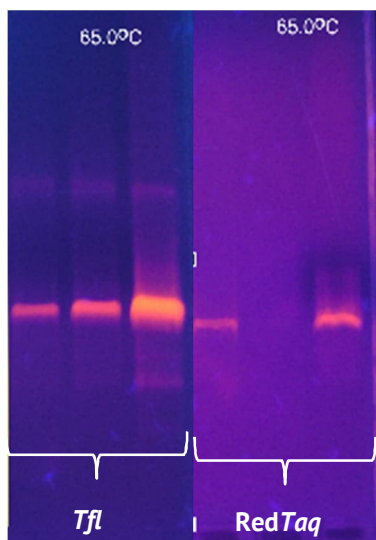


**Rys. 2.2.4b.** Struktury drugorzędowe starterów. A. Szpilka do włosów powstaje w temperaturze poniżej optymalnej. B. Struktura pośrednia, może powstać w temperaturze optymalnej i wówczas uniemożliwia amplifikację. C. Jednoniciowa struktura, powstaje w temperaturze powyżej optymalnej. D. Obraz dimerów na żelu agarozowym (ścieżki 4, 5, 6), które powstały w wyniku amplifikacji starterów (dane własne).

- Startery powinny być komplementarne do matrycy, zwłaszcza na końcu 3'. Brak komplementarności na końcu 3' uniemożliwia przyłączenie startera i nieefektywną amplifikację. Czasami projektuje się startery, które w części środkowej nie są komplementarne do matrycy. Wykorzystuje się je, jeżeli sekwencja jest wysoce zmienna lub jeżeli chcemy amplifikować sekwencje u innych gatunków niż ten, z którego pochodzi fragment DNA użyty do projektowania starterów. Z kolei koniec 5' czasami wykorzystuje się aby wprowadzić miejsca restrykcyjne, gdy produkt PCR jest wykorzystywany w klonowaniu.

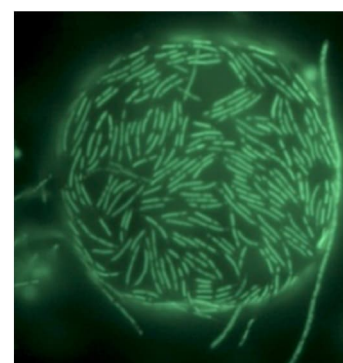
### 2.2.5. Termostabilne polimerazy DNA

W technice PCR wykorzystywane są polimerazy, które tolerują wysokie temperatury (do 95°C). Są to tzw. polimerazy termostabilne, które pochodzą z bakterii żyjących w ciepłych źródłach. Najczęściej stosuje się polimerazę z *Thermus aquaticus* (*Taq*) i *Thermus flavus* (*Tfl*). Oba mikroorganizmy należą do Archaea, klasy Deinococci.



**Rys. 2.2.5b.** Porównanie amplifikacji genów rDNA przy pomocy polimerazy *Tfl* i *RedTaq* (dane własne).

Archeonty te po raz pierwszy zidentyfikowano w Parku Yellowstone w źródłach o temperaturze 53-86°C, a następnie ich obecność potwierdzono w 53 różnych lokalizacjach. Optimum dla polimerazy DNA pochodzącej z tych archeontów to 72°C, a więc jest to temperatura elongacji. Jednakże wytrzymują one również temperaturę 94-95°C, co umożliwia przeprowadzenie wielu cykli reakcji namnażania DNA bez dodawania polimerazy w każdym cyklu. Geny polimerazy DNA pochodzące z Archaea wklonowano do *Escherichia coli*. Dostępne na rynku termostabilne polimerazy DNA powstają w genetycznie zmodyfikowanej *E. coli*. Polimeraza *Taq* nie ma właściwości korektorskich w kierunku 3'→5'. Prowadzi to do błędnego wstawiania zasad z częstością 1/9000 nukleotydów. Polimeraza *Tfl* posiada zdolności korektorskie, co zwiększa specyfikę reakcji. Wykorzystuje się 0,5-2U na reakcję



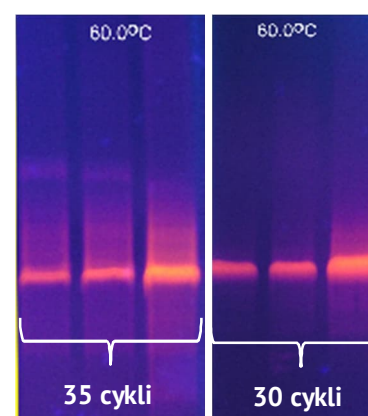
**Rys. 2.2.5a.** Kolonia *Thermus aquaticus*.

(najczęściej 1U na reakcję).

## ➔ 2.3. Etapy PCR

**Technika PCR składa się z szeregu pojedynczych reakcji zwanych cyklami.** W każdym cyklu ilość cząsteczek DNA się podwaja. Liczba cykli waha się między 20 a 46 i zależy od rodzaju matrycy oraz powielanej sekwencji. Im większy genom tym więcej cykli i dłuższe czasy poszczególnych etapów są potrzebne do namnożenia sekwencji. Dla sekwencji unikalnych, które występują w niewielu kopiach lub zgrupowane są w pobliżu, liczba cykli nie powinna przekraczać 30-35 dla dużych genomów, gdyż zbyt duża liczba cykli prowadzi do amplifikacji zanieczyszczeń i homologów (Rys 2.3a). Liczba cykli 40-46 jest stosowana tylko do amplifikacji sekwencji, które występują w wielu miejscach genomu (np. transpozony).

Technika PCR wykorzystuje właściwości fizyko-chemiczne DNA, które zależą od temperatury. Struktura helikalna DNA ulega destabilizacji wraz ze wzrostem temperatury. Powyżej pewnej temperatury krytycznej, zwanej temperaturą topnienia, nici DNA ulegają całkowitej separacji i występują w postaci jednoniciowych fragmentów. Jest to wynikiem zerwania wiązań wodorowych. Poniżej temperatury



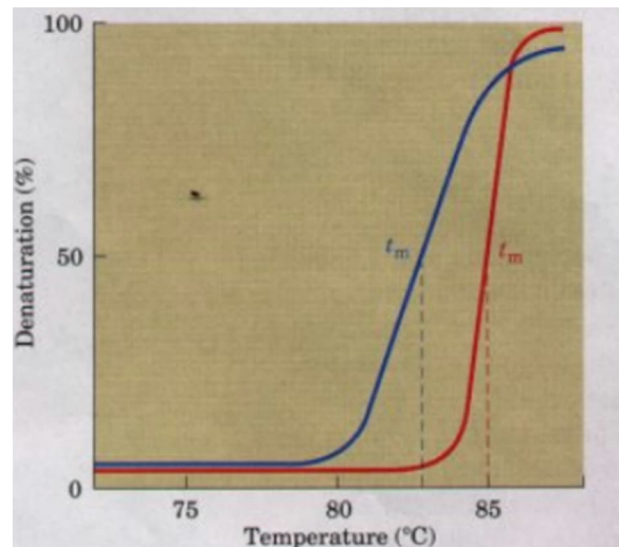
**Rys. 2.3a.** Wpływ liczby cykli na amplifikację genów rDNA u sosny (duży genom) (dane własne).

topnienia występuje spektrum możliwości, od lokalnych fragmentów jednoniciowych do całkowitego splecenia DNA.

W zależności od temperatury mieszaniny, DNA może występować:

- w postaci częściowo zdenaturowanej, co umożliwia dostęp starterów i polimerazy,
- całkowicie zdenaturowanej,
- w postaci podwójnej spirali.

Manipulując temperaturą reakcji możemy doprowadzać do namnożenia DNA lub nie. Temperatura topnienia jest różna dla poszczególnych typów DNA, zależy od zawartości GC (Rys. 2.3b). Dlatego nie ma jednolitej, standardowej temperatury dla reakcji PCR. Dla każdej matrycy i każdego typu starterów musi ona być na nowo optymalizowana. Ponadto manipulując temperaturą mieszaniny możemy regulować specyfiką reakcji.

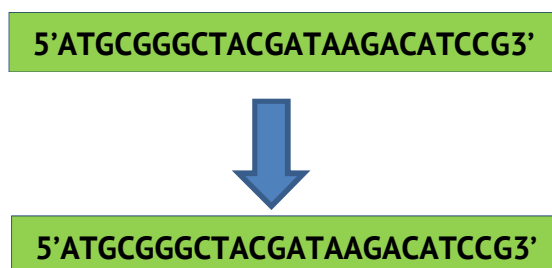


**Rys. 2.3b.** Zależność denaturacji DNA wirusowego (niebieska linia) i bakteryjnego (czerwona) od temperatury. W temperaturze bliskiej 100°C prawie cały DNA jest zdenaturowany.

**Temperatura topnienia: temperatura, w której 50% nici DNA występuje w postaci zdenaturowanej (pojedyncze nici) i 50% w postaci podwójnej helisy.**

### 2.3.1. Denaturacja

Denaturacja przebiega w temperaturze, 94-95°C. Etap ten najczęściej trwa 30-60 s. Dodatkowo projektuje się wstępną denaturację, która trwa 3-5 minut. Polega ona na przekształceniu



**Rys. 2.3.1.** Denaturacja fragmentu DNA o sekwencji, ATGCGGGCTACGATAAGACATCCG. Sekwencję zawsze zapisujemy od 5' do 3'. Ponieważ jest to DNA, musimy dopisać nić komplementarną o odwrotnej polarności, czyli od 3' do 5'. W ten sposób uzyskamy odcinek DNA, który będzie powielany w reakcji PCR.

#### 1. Denaturacja DNA: 94°C



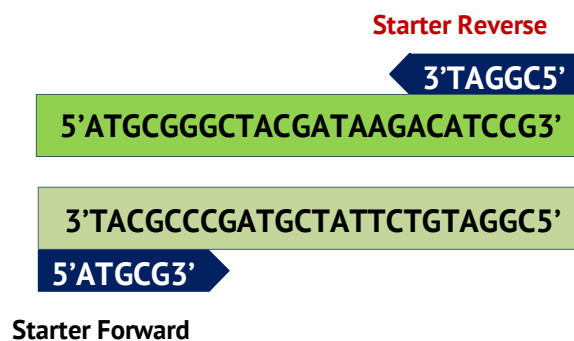
dwuniciowej cząsteczki DNA w jednoniciową. Celem denaturacji jest rozdzielanie nici DNA tak, aby umożliwić przyłączenie się starterów oraz polimerazy DNA. W warunkach naturalnych nici DNA są rozdzielane za pomocą helikaz i topoizomeraz, a stabilizują je białka SSB. W reakcji PCR

rozdzielenie nici odbywa się przez inkubację w wysokiej temperaturze, tj. 94-95°C. W tej temperaturze DNA występuje w postaci pojedynczych nici.

### 2.3.2. Przyłączanie starterów, annealing

**Annealing** jest to proces przyłączania starterów do matrycy DNA. Przebiega w temperaturze 36-70°C. Najczęściej trwa około 30-60 s. Dla sekwencji unikalnych zakres temperatur najczęściej mieści się między 50-65°C. Polimeraza DNA nie ma możliwości przeprowadzania syntezy *de novo*. Potrafi ona jedynie dołączać nukleotydy do już istniejącego łańcucha. W komórkach replikacja rozpoczyna się od syntezy krótkich odcinków RNA za pomocą polimerazy RNA (prymazy). Dopiero do tych odcinków polimeraza DNA dobudowuje nukleotydy. W reakcji PCR nie można wykorzystać RNA, gdyż jest to cząsteczka niestabilna, która w temperaturach >37°C ulega rozkładowi. Dlatego w reakcji PCR wykorzystuje się krótkie odcinki DNA, które pełnią podobną funkcję jak fragmenty RNA w replikacji *in vivo*.

### Annealing, czyli przyłączanie starterów: 36-70°C



**Rys. 2.3.2a.** Przyłączanie starterów do sekwencji ATGCGGGCTACGATAAGACATCCG. Dla uproszczenia pokazano startery 5-nukleotydowe. W rzeczywistości stosuje się 20-25 nukleotydowe. Startery przyłączają się zgodnie z zasadą komplementarności. Amplifikacji ulega sekwencja oflankowana starterami. Pojęcia starter Forward i Reverse są umowne, ułatwiają porozumiewanie się. Układ Forward i Reverse jest zachowany tylko w przypadku, gdy znany jest produkt genu. Wówczas można jednoznacznie ustalić nić sensowną i nić antysensowną. Jeżeli produkt genu nie jest znany, to nić sensowna nie jest znana. Może zdarzyć się, że nicią sensowną (koduującą) jest nić 3' do 5'. Wówczas starter Reverse funkcjonuje jako Forward i *vice versa*.

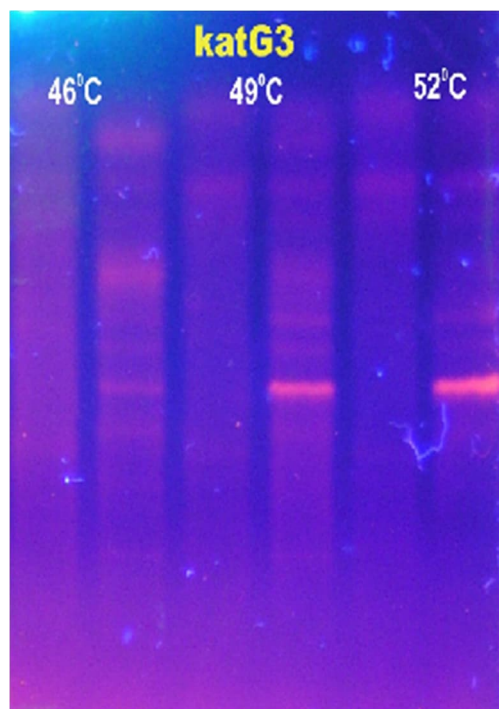
- W trakcie annealingu dochodzi także do renaturacji DNA matrycowego, czyli procesu ponownego łączenia się i związania nici DNA. Proces zależy od temperatury i pH.
- Warunkiem rozpoczęcia reakcji namnażania DNA przez polimerazę jest połączenie się startera z fragmentem komplementarnym na matrycy DNA. Stabilność i specyfika tego połączenia zależy od temperatury. Optymalną temperaturą jest temperatura topnienia fragmentu, który ma się przyłączyć do matrycy.
- Powyżej temperatury topnienia starter się nie przyłączy i będzie występował w postaci jednoniciowego fragmentu. Uniemożliwi to przeprowadzenie PCR nawet w sytuacji, gdy odpowiednia matryca znajdzie się w mieszaninie reakcyjnej.
- Poniżej temperatury topnienia, ze względu na szybką renaturację matrycy, starter przyłączy się do jednoniciowych fragmentów matrycy, które są częściowo komplementarne, np. w 50%, 60%, 80% itd. Dlatego temperatura annealingu jest podstawowym wyznacznikiem specyfiki PCR.

Różna specyfika techniki PCR w zależności od temperatury anelingu może być wykorzystana w badaniach. Przykładowo, jeżeli chcemy zamplifikować gen u organizmu A, ale tego genu nie znamy, natomiast znana jest sekwencja genu u gatunku B, to możemy zaprojektować startery na podstawie gatunku B. Następnie możemy przeprowadzić PCR w temperaturze poniżej temperatury optymalnej wyznaczonej przez temperaturę topnienia. Startery mogą się przyłączyć do najbardziej podobnego fragmentu DNA matrycowego. Obniżenie temperatury anelingu umożliwia połączenie z fragmentami komplementarnymi np. w 70%. Dzięki temu możliwe jest zamplifikowanie genu homologicznego u gatunku A. Wykorzystywane jest to w analizach filogenetycznych.

Konieczność wykorzystania starterów w reakcji PCR powoduje, że aby ją przeprowadzić musimy znać sekwencję, którą chcemy namnożyć. Aby ten warunek ominąć wykorzystuje się czasami pojedynczy, losowo skomponowany starter. Wówczas, jeżeli taki starter znajdzie sekwencje komplementarne w niewielkiej odległości (1000–4000 par zasad) to możemy fragment oflankowany takim starterem namnożyć. W ten sposób ujawniamy tzw. markery skanujące genom. Innym sposobem ominięcia tej niedogodności jest cięcie DNA matrycowego enzymami restrykcyjnymi i przyłączenie specjalnie przygotowanych oligonukleotydowych odcinków zwanych adapterami do miejsc cięcia. W ten sposób wykrywa się miejsca insercji transpozonów.

### 2.3.3. Elongacja

Elongacja, czyli wydłużanie łańcucha DNA, za pomocą polimerazy DNA. Reakcja przebiega w 72°C. Czas trwania to 60-150 s. Dłuższe czasy wykorzystuje się w dużych genomach i przy dłuższych produktach reakcji. Ponadto projektuje się wydłużanie końcowe, które trwa 5-10 minut. Jest to właściwa replikacja *in vitro*. Elongację może przeprowadzić każda polimeraza DNA (np. fragment Klenowa z *E. coli*). Jednakże warunkiem przeprowadzenia reakcji i dostępu do DNA jest rozplecenie nici (denaturacja), które odbywa się w temperaturze 94°C. W tej temperaturze większość polimeraz, które są białkami ulega denaturacji i tym samym dezaktywacji. Aby przeprowadzić reakcję PCR, taką polimerazę należałoby dostarczać w każdym cyklu po denaturacji, co oczywiście nie jest praktyczne.



**Rys. 2.3.2b.** Wpływ temperatury anelingu na amplifikację DNA pijawek przy pomocy starterów dla genu katalazy-peroksydazy (dane własne).

### 3. Elongacja, czyli wydłużanie łańcucha, 72°C



**Rys. 2.3.3.** Polimeraza DNA dołącza nukleotydy do starterów i wydłuża łańcuch DNA.

## 2.4. Projektowanie PCR

W pliku DBP.txt podano sekwencję ludzkiego genu kodującego białko wiążące witaminę D (gen *DBP*). Proszę zaprojektować PCR, którego celem jest amplifikacja możliwie najdłuższego fragmentu genu *DBD* w populacji ludzkiej na podstawie poniżej podanych danych oraz informacji zawartych w protokole.



### 2.4.1. Wybór starterów

- Startery powinny amplifikować możliwie najdłuższy fragment genu.
- Każdy ze starterów będzie zawierał >50% par G+C.
- Startery będą porównywalnej długości.
- Maksymalna liczba tych samych zasad w jednym ciągu wynosi 3.
- Sekwencja starterów podana jest od końca 5'.
- Startery należy zaznaczyć graficznie względem analizowanej sekwencji.

### 2.4.2. Ustalanie temperatury przyłączania starterów

- Temperatura przyłączania starterów decyduje o specyfice reakcji. Powinna ona być jak najbliższa temperaturze topnienia starterów. Temperatura topnienia jest taką temperaturą, w której połowa starterów w mieszaninie jest zdenaturowana.
- W technice PCR wykorzystujemy dwa startery, co oznacza, że musimy dobrać temperaturę przyłączania starterów tak, aby była ona jak najbliższa do temperatury topnienia obu starterów. Jeżeli temperatura topnienia będzie zbyt wysoka wówczas startery się nie przyłączą i nie powstaną produkty reakcji PCR. Z kolei zbyt niska temperatura powoduje przyłączanie się starterów do sekwencji, które nie są w pełni komplementarne. W efekcie reakcja jest niespecyficzna tzn. amplifikowane są wszystkie sekwencje, które są oflankowane sekwencjami częściowo komplementarnymi do starterów.
- Temperaturę topnienia należy obliczyć dla każdego startera osobno, a następnie należy je porównać i wybrać jak najbardziej zbliżoną do obu starterów. Przyjmuje się, że temperatura topnienia pomiędzy starterami nie powinna się różnić o więcej niż 5°C. Testuje się najczęściej 2-3 temperatury w zakresie wyznaczonym przez startery.
- Jeżeli różnica temperatur pomiędzy starterami jest zbyt duża (>5°C) wtedy projektuje się nowe startery.

- A. Na podstawie wzoru podanego na wykładzie proszę obliczyć temperaturę topnienia obu starterów. Dla  $\log Na^+$  proszę przyjąć wartość  $\log 0,05 = -1,3$ .
- B. Czy startery te umożliwiają ustalenie temperatury annealingu? Jeżeli tak, to proszę podać wartości temperatur, które należy przetestować.



### 2.4.3. Liczba cykli, czas trwania i temperatury poszczególnych etapów.

- A. Proszę podać liczbę cykli, która byłaby optymalna dla amplifikacji ludzkiego genu *DBP*.
- B. Proszę podać czasy i temperatury poszczególnych etapów.
- C. Proszę podać całkowity czas PCR uwzględniając liczbę cykli w punkcie A oraz czasy w punkcie B.



### 2.4.4. Liczba prób

Celem jest analiza zróżnicowania genu *DBP* w 5 populacjach ludzkich. Z każdej populacji należy pobrać 20 prób. Proszę podać całkowitą liczbę prób, którą należy uwzględnić w PCR.

## 2.4.5. Stężenia i sporządzanie mieszaniny reakcyjnej.



Proszę podać stężenia poszczególnych komponentów PCR. Proszę skorzystać z informacji w protokole i tabeli 2.4.5.

Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosi między 10-50  $\mu\text{l}$  w zależności od potrzeb i typu reakcji. Mieszaninę sporządza się z tzw. roztworów podstawowych, w których stężenie poszczególnych składników jest znacznie wyższe niż to wymagane w reakcji. Mieszaninę reakcyjną sporządza się dla wszystkich prób łącznie dodając składniki, które są identyczne w każdej próbie. Następnie rozdziela się mieszaninę na próby i do każdej próby dodaje się składniki, które są różne. Najczęściej jest to matryca DNA.

Pomimo wykorzystania precyzyjnych pipet, podczas odmierzenia poszczególnych składników i rozdzielania prób występuje niewielki błąd pomiaru, który przy dużej liczbie prób może spowodować, że zabraknie mieszaniny na kilka probówek. Aby taka sytuacja nie miała miejsca należy sporządzić około 10% więcej mieszaniny niż wynika to z liczby prób. Ilość mieszaniny z uwzględnieniem strat najprościej jest obliczyć dodając do obliczonej liczby prób wartość odpowiadającą 10% prób.

- **Roztwór podstawowy** to roztwór, którym dysponujemy, np. mamy  $\text{MgCl}_2$  o stężeniu 25 mM, bufor o stężeniu 20 x itd.
- Należy określić ile każdego z roztworów podstawowych podanych w tabeli 2.4.5 należy pobrać, aby otrzymać 20  $\mu\text{l}$  roztworu o stężeniu podanym dla próby, np. stężenie  $\text{MgCl}_2$  w próbie ma być 1,5 mM, bufor o stężeniu 1 x itd.
- Objętość mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby wynosi **20  $\mu\text{l}$** .

**Tabela 2.4.5. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla PCR z wykorzystaniem genu *DBP*.**

L.p.	Składnik	Stężenie w próbie	Roztwór podstawowy	Ilość w próbie [ $\mu\text{l}$ ]	Ilość dla prób [ $\mu\text{l}$ ]
1	$\text{H}_2\text{O}$				
2.	<b>Bufor:</b> 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 50 mM Tris-HCl		20 x stężony		
3.	$\text{MgCl}_2$		25 mM		
4.	<b>Wzmacniacz</b> (betaine)		10 x stężony		
5.	Nukleotydy: <b>dNTP</b> (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)		10 mM		
6	Startery: DBP-F DBP-R		20 $\mu\text{M}$ 20 $\mu\text{M}$		
7.	Polimeraza DNA, <i>Tfl</i>		1U/ $\mu\text{l}$		
8.	DNA		20 ng/ $\mu\text{l}$		
<b>Objętość próby:</b>				<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>	

### 3. Odmiany techniki PCR

➔ Reakcja PCR zasadniczo zawsze obejmuje te same etapy. Różnice pomiędzy poszczególnymi reakcjami dotyczą temperatury annealingu, czasów poszczególnych etapów i liczby cykli. Temperatura annealingu zależy od wykorzystywanych starterów, natomiast czasy poszczególnych etapów i liczba cykli związane są z długością analizowanego fragmentu, liczbą spodziewanych fragmentów oraz wielkością genomu. Im dłuższy fragment ma być namnożony, tym dłuższy czas etapu elongacji i liczba cykli. Natomiast im większy genom tym dłuższy czas annealingu i liczba cykli. Przy czym zbyt długie czasy i liczby cykli zwiększają prawdopodobieństwo reakcji niespecyficzej. Przykładowo, 45 cykli dla fragmentu wirusa o długości 200 par zasad to zdecydowanie za dużo. Namnożą się wszystkie zanieczyszczenia w próbie, powstaną dimery lub reakcja będzie niespecyficzna. Wystarczyłoby 25 cykli w przypadku genomu wirusowego. Natomiast w celu namnożenia 1000 par zasad z genomu człowieka (3,2 miliardów bp) potrzeba 35 cykli. Z kolei dla identyfikacji miejsc insercji transpozonów w dużych genomach należy wykorzystać około 45 cykli ze względu na bardzo dużą liczbę amplifikowanych fragmentów.

Pojęcie odmian reakcji PCR często odnosi się nie do samej reakcji, ale sposobu wykrywania produktów reakcji oraz rodzaju użytej matrycy.

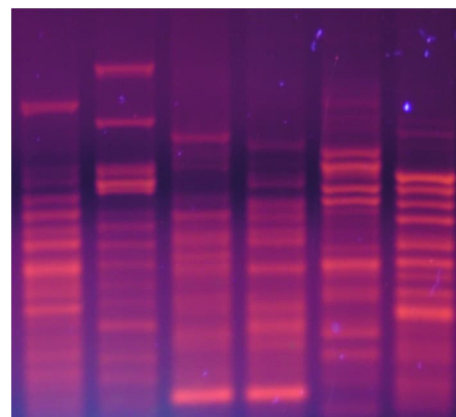
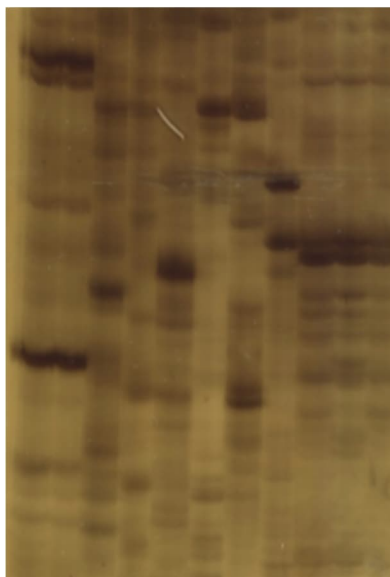
#### ➔ 3.1. Standardowa technika PCR

Jest to reakcja PCR, w której matrycą jest DNA genomowe lub plazmidowe, natomiast produkty reakcji wykrywa się za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym.

Alternatywnie możliwy jest odczyt jako „piki” w sekwenserach. Jest to reakcja jakościowa, która odczytuje obecność lub brak danego fragmentu.

Reakcja taka jest

najczęściej stosowana w badaniach nad genomami, badaniach ewolucyjnych. Standardowy PCR w połączeniu z sekwencjonowaniem wykorzystywany jest w diagnostyce chorób genetycznych.



**Rys. 3.1.** Miejsca insercji transpozonów pokazane na żelu poliakrylamidowym (po lewej) i agarozowym (po prawej) (dane własne).



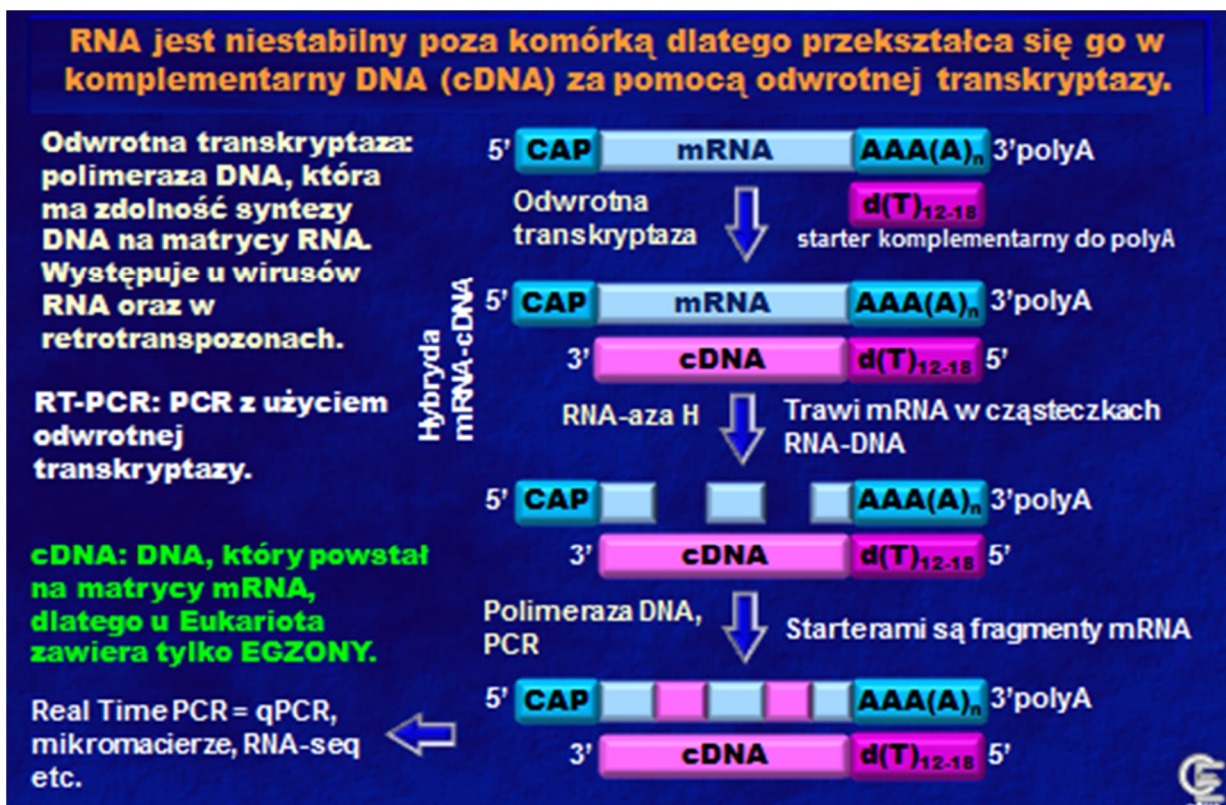
### ➔ 3.2. RT-PCR

Technika PCR pozwala na powielenie tylko i wyłącznie DNA. Tymczasem w badaniach nad ekspresją genów wykorzystuje się RNA. Również niektóre wirusy zawierają RNA. Wykorzystanie RNA w PCR nie jest możliwe ponieważ:

- RNA jest niestabilne i podczas zmian temperatury się rozpadnie;
- Polimerazy RNA syntetyzują RNA na matrycy DNA, a więc nie mają możliwości syntezy RNA na matrycy RNA. Oznacza to, że nie można ich wykorzystać w PCR zamiast polimerazy DNA.

Aby móc wykorzystać reakcję PCR do analizy RNA, należy RNA przekształcić na DNA. Dokonuje się tego za pomocą enzymu, odwrotnej transkryptazy. Jest to polimeraza DNA, RNA zależna. Wykorzystywana jest ona przez retrowirusy. U Eukariota odwrotna transkryptaza jest wykorzystywana do syntezy telomerów. Retrotranspozony stanowiące 50-90% genomu Eukariota również zawierają odwrotną transkryptazę. U człowieka podwyższoną aktywność odwrotnej transkryptazy obserwuje się np. w komórkach nabłonka chorych na łuszczycę. Proces przekształcenia RNA w DNA nosi nazwę odwrotnej transkrypcji (RT, ang. reverse transcription). W wyniku odwrotnej transkrypcji otrzymujemy DNA, który nosi nazwę cDNA (complementary DNA) ze względu na komplementarność jednej z nici do RNA.

Jeżeli w technice PCR wykorzystujemy cDNA zamiast DNA to taką reakcję oznaczamy symbolem RT-PCR. Jest to istotna informacja, gdyż oznaczenie RT-PCR pozwala stwierdzić, że otrzymany produkt PCR nie ma intronów, a także, że produkty RT-PCR dla danego genu mogą się różnić, gdyż materiałem wyjściowym były różne tkanki lub organy.

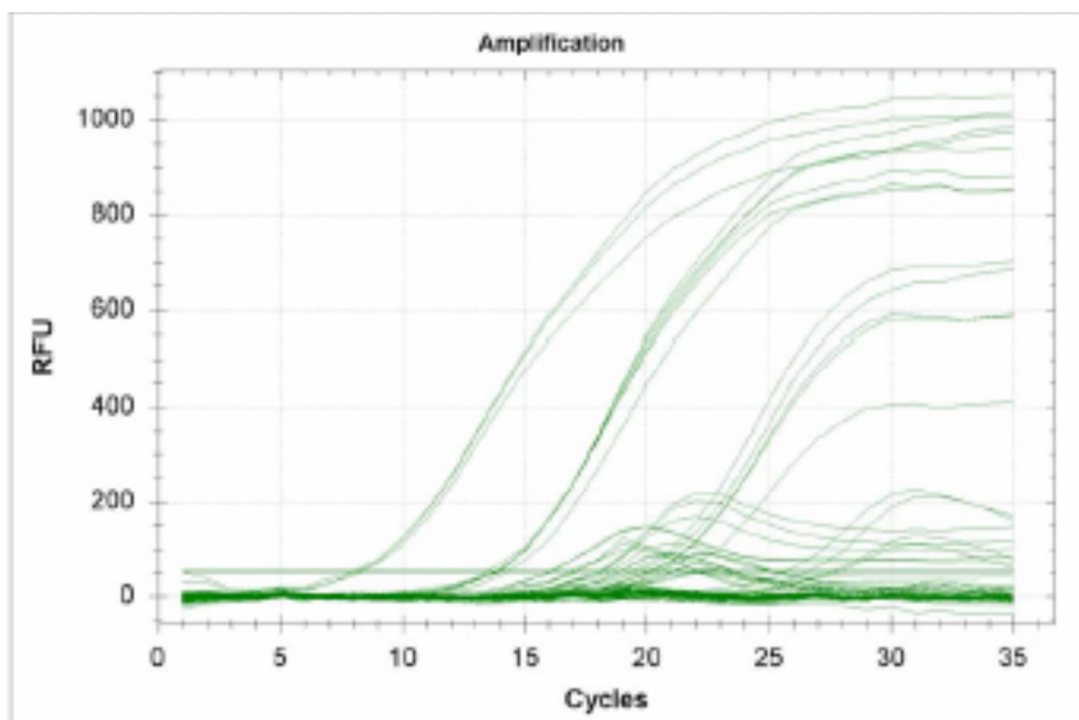


Rys. 3.2. Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji.

### ➔ 3.3. PCR w czasie rzeczywistym: qPCR, real-time PCR

PCR w czasie rzeczywistym różni się od standardowego PCR odczytem produktu, który jest dokonywany w komputerze, a nie na żelu. Odczytu można dokonać przez przyłączenie sondy fluorescencyjnej do startera lub produktu reakcji. Sonda to krótka sekwencja DNA, która połączona jest z barwnikiem emitującym sygnał świetlny na skutek pochłaniania światła UV. Sygnał świetlny jest wykrywany przez specjalne czujniki w głowicy termocyklera. Ponieważ reakcja jest ilościowa tzn. im więcej produktu, tym silniejszy sygnał, możliwe jest określenie ilości otrzymanego produktu. Z tego względu PCR w czasie rzeczywistym określa się mianem PCR ilościowego (qPCR, ang. quantitative PCR). Ponadto odczyt za pomocą sondy fluorescencyjnej w połączeniu z odpowiednim oprogramowaniem pozwala na śledzenie przyrostu ilości produktu podczas reakcji PCR. Stąd wynika nazwa – PCR w czasie rzeczywistym.

Główną zaletą qPCR jest odczyt ilości produktu, który jest skorelowany z wyjściową ilością cDNA/RNA. Tym samym qPCR umożliwia śledzenie ekspresji genów np. podczas działania stresu, w czasie choroby. Wykorzystywany jest on także w śledzeniu wirerii w chorobach wirusowych. Dodatkową korzyścią jest rezygnacja z pracochłonnych żeli.

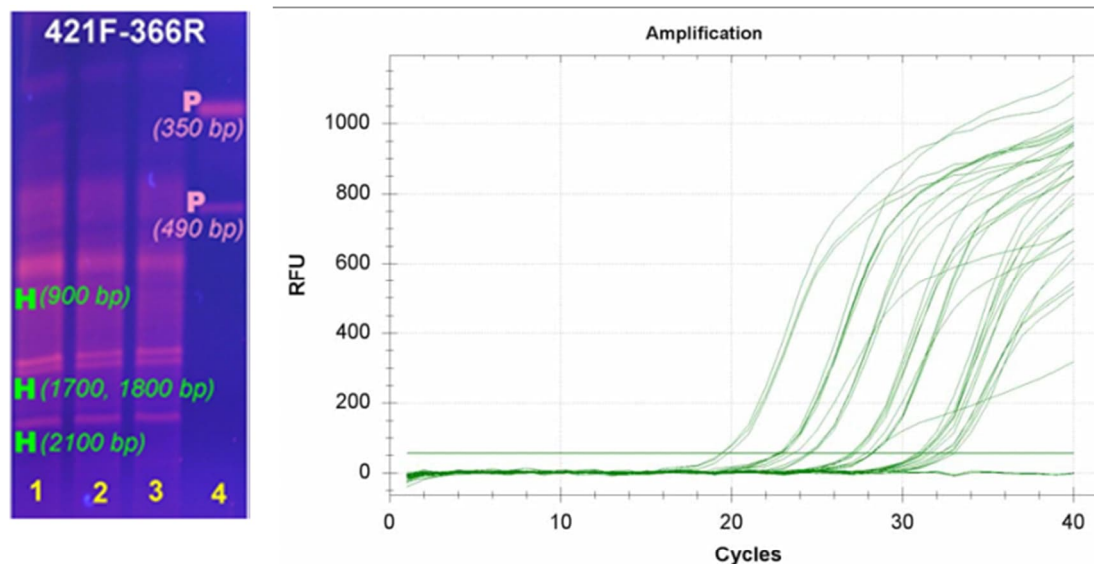


**Rys. 3.3a.** Wynik reakcji qPCR dla rDNA *Pinus*. Wykresy na różnej wysokości ukazują różną ilość produktu w próbach. Koreluje to z różną liczbą powtórzeń rDNA w poszczególnych próbach. W podanym przykładzie różnice były skorelowane z różną zawartością rDNA u różnych gatunków (dane własne).

PCR w czasie rzeczywistym podobnie jak standardowy PCR wymaga czystego materiału genetycznego, optymalizacji dla danych warunków, w tym bardzo dokładnego dobrania temperatury przyłączania starterów oraz liczby cykli. Ze względu na brak kontroli na żelu, zbyt krótkie produkty qPCR (np. 200 bp) mogą być trudne do odróżnienia od właściwego produktu (Rys. 3.3b). Ponadto qPCR jest bardzo wrażliwy na zanieczyszczenia obcym materiałem genetycznym również ze względu na brak kontroli na żelu. Analiza na żelu pozwala określić

długość amplifikowanych produktów, tym samym właściwy produkt jest łatwy do odróżnienia od dimerów czy homologów. W qPCR żel nie jest wykorzystywany i odróżnienie właściwego produktu od dimeru czy homologa jest prawie niemożliwe. Dlatego stosowanie qPCR w celach diagnostycznych zawsze powinno być połączone z kontrolą jakości matrycy, kontrolą produktu na żelu lub sekwencjonowaniem.

Obecnie rezygnuje się z qPCR na rzecz RNAseq – sekwencjonowania RNA jako metody bardziej wiarygodnej.



**Rys. 3.3b.** Wynik reakcji PCR i qPCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla genu *pgip1* z maliny wprowadzonego do *Pisum sativum*. 1. Kontrola, 2-3: rośliny transgeniczne, 4: *pgip1* w plazmidzie. Obecność *pgip1* u *P. sativum* potwierdzono hybrydyzacją Southern. Reakcja qPCR daje dla wszystkich prób wynik pozytywny, tymczasem tylko w przypadku plazmidu zastosowane startery dają właściwy produkt. W próbach 1-3 startery amplifikują homologi zamiast transgeny i nie różnicują pomiędzy roślinami transgenicznymi i kontrolą nie zawierającą transgeny (dane własne).

## 4. Literatura

- Barlett JMS, Stirling D. 2017. Methods in molecular Biology. PCR protocols. Totowa NJ: Humana Press.
- Baumforth KRN, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. 1999. The polymerase chain reaction. Clin Pathol Mol Pathol 52:1-10.
- Leonard AC, Mechali M. 2013. DNA replication origins. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013:5. Dostęp: doi: 10.1101/cshperspect.a010116.
- Recolin B, van der Laan S, Tsanov N, Maiorano D. 2014. Molecular mechanisms of DNA replication checkpoint activation. Genes 5:147-175. Dostęp: doi:10.3390/genes5010147
- Wages JM. 2005. Polymerase Chain Reaction. Elsevier.

## Odpowiedzi

### 1. Podstawy replikacji DNA

#### 1.4. Zadania

##### 1.4.1. Widetki replikacyjne

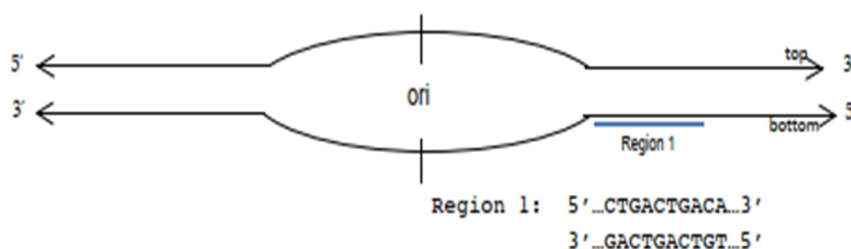
Na rysunku 1.4.1 przedstawiono miejsce rozpoczęcia replikacji. Podano także sekwencję regionu 1 na obu niciach.

**A.** Która z nici będzie matrycą do syntezy nici wiodącej w regionie 1, górna czy dolna?

- Dolna nić, ponieważ synteza odbywa się od 5' do 3', a kierunek replikacji w regionie 1 jest „od lewej do prawej”, zatem nić dolna ma orientację przeciwną do nici syntetyzowanej.

**B.** Proszę podać sekwencję nici opóźnionej od końca 5', dla której matrycą będzie region 1.

- Nić opóźniona będzie syntetyzowana na nici górnej od „prawej do lewej”, zatem nowa nić będzie miała sekwencję komplementarną do nici górnej, ale czytana „od końca”: 5'TGTCAGTCAG3'.



**Rys.1.4.1.** Widetki replikacyjne.

##### 1.4.2. Replikacja kolistego DNA bakteryjnego

Na rysunku 1.4.2. pokazano schemat replikacji bakteryjnego DNA kolistego.

**A.** Która z nici, dolna czy górna jest matrycą do syntezy nici wiodącej w regionie 2.

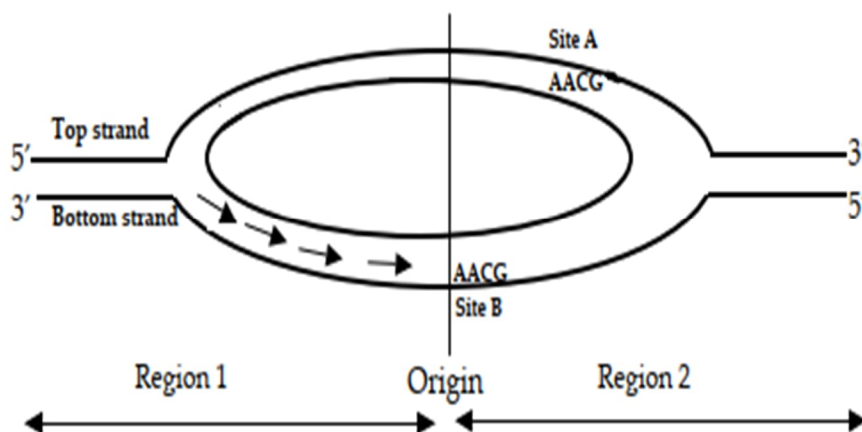
- Dolna nić. Kierunek replikacji jest od „lewej do prawej”, nić dolna ma orientację przeciwną do syntetyzowanej nici w regionie 2 (od 5' do 3').

**B.** Z którym miejscem, A, B łączy się starter 5'UUGC3'?

- Miejsce B ma komplementarną sekwencję do startera w odpowiedniej orientacji.

**C.** Która nić w regionie 2 nie będzie powielona, jeżeli przed rozpoczęciem replikacji nie będzie obecna polimeraza RNA?

- Żadna. Polimeraza DNA nie ma zdolności rozpoczynania replikacji. Musi istnieć starter RNA syntetyzowany przez polimerazę RNA. Jeżeli nie ma polimerazy RNA, to starter nie powstanie. Tym samym replikacja nie dojdzie do skutku.



**Rys.1.4.2.** Replikacja bakteryjnego DNA.

### 1.4.3. Czas trwania replikacji

Szybkość replikacji wynosi 500 par zasad na sekundę. Ile będzie trwała replikacja genomu składającego się z 3,5 mln par zasad? Proszę podać czas w minutach.

- 3,5 mln par zasad =  $3,5 \times 10^6$ .
- 500 par zasad =  $5 \times 10^2$ .
- Jeżeli w ciągu sekundy jest replikowane  $5 \times 10^2$  bp, to w ciągu x sekund jest replikowane  $3,5 \times 10^6$  bp.
- Stąd,  $3,5 \times 10^6 / 5 \times 10^2 = 0,7 \times 10^4$  sekund, czyli 7000 s, co daje 116,7 min.

## 2. Technika PCR

### 2.4. Projektowanie PCR

W pliku DBP.txt podano sekwencję ludzkiego genu kodującego białko wiążące witaminę D (gen *DBP*). Proszę zaprojektować PCR, którego celem jest amplifikacja możliwie najdłuższego fragmentu genu *DBP* w populacji ludzkiej na podstawie poniżej podanych danych oraz informacji zawartych w protokole.

#### 2.4.1. Wybór starterów

- Startery powinny amplifikować możliwie najdłuższy fragment genu.
- Każdy ze starterów będzie zawierał >50% par G+C?
- Startery będą porównywalnej długości.
- Maksymalna liczba tych samych zasad w jednym ciągu wynosi 3.
- Sekwencja starterów podana jest od końca 5'.

Startery należy zaznaczyć graficznie względem analizowanej sekwencji.

- Sekwencja w pliku pochodzi z NCBI i podana jest od końca 5'.
- Przyjmujemy, że jest to nić sensowna, a więc starter Forward będzie miał identyczną sekwencję jak sekwencja w bazie (kolor żółty na rysunku poniżej). Zlokalizowany on będzie na początku sekwencji.

► 5'TAG AGT TGG CTC TTG GAC AGG3'

- Starter Reverse będzie zlokalizowany w pobliżu końca podanej sekwencji i będzie do niej komplementarny (kolor czerwony na rysunku poniżej) i zapisany „od końca”

▶ **5'CTA CCA GAG AGT CTT GCA CGA3'**

- Startery najlepiej tak dobrać, aby miały jednakową długość i jednakową liczbę par G+C.
- Możliwe jest wyznaczenie różnych kombinacji.

```
GAATTCAGCCAAAGGGAAGTAAATTTAGATTTATAGTAATCAGGAAGTTGATCCTTGAACAAGATAGA
GTTGGCTCTTGGACAGGAAAGCTATCTCCTTGACCATATGGATTCCACTGGCCTTACAGAAATACTTGT
GCTTTGATCTGGCATAGGTATCTTTTTCCAAGTACTGGACTCTATTTTCTGAACCTAACACCCAAGGAT
TTTCAGTATAGATAGAAAATCTGACTAAACATGTAACCTAAATTTGGTTTACTGAAATTTTGATAGAC
TCTGCCATGTAGATAATCCTTGGCTACTGAGTTGATAATGAAGTTTTAAATCACTTATCTGCGGGACCC
TGGACACAGGGCTGTCTTTAAACTCTTCCACTGAGTTCCAATGGCCTCATTAGTTTCATTGACCTTCACA
GATATTATAAATTTGGAAAGCCAGTGGGAGAACGTGGCAATAACTAGAATAAGAGTAATAGGTGACATTA
ATCCATGTTACTATGTGATGGATGTTACCATGAGCCCTGCACCCAGATTACCTTAATTAACCTCATAGCA
ATGTTGTGTCAAATGTAAGTACTGAGTTATCACCACATTGCATATGAGGAAAATGAAACTTAGAGGGGTAAAAT
AAATTTCCAAGTTACACAGCTATGAAAGCTGAGTAGGGATTTGATTTTAGAGCATGTGTAACAACCTG
TACCTGACCATTTCTGAAAATAGGGCTACTGCAAAAACCAGGAGTGGAATCATCTAATTTCCAATGAAT
GATCTACCTATGACTCTTAGACAAGTCACAGAATTTACCCAGTGCTCAGTTCACCTCTTGAAAATGA
AGATGTTGGATTTTATGTCCTACAGGGCTCTCTGAGCTCTCAAATTACATGCCATAAAATATACTAGT
TGTAACCTATTAGTAGAAGGAGCTTTAAAATCACTGTAGGGAGTCCAAGATTTGCCACTAACTTTTTATG
ATTGGCAGTGGTGAGCCATTTAACCTCTCCAGTATTTGCCCTCACTTCAAAGTTATTTTTCATATATAT
GTCAGTGCTTCACAAAGTGCAATACAGCATAGAAATACAAAGTACTATGCCATCATCTAAAATAAGATTA
CTTCATAGCATCAGAATTATGGATTTAAAATATTATGTTGAATTTGGCTTCTCACTCTTTTTCCCTTTTA
CTTAGAACATCTGGTCTGCAATATTTTAAGGTAATGCTTATTTGTAGTAGATTTAAACAAAGAGAGGAAG
AGAGGTAAGACAGAGTTTCCGATTTTCCACTTACATATGAGAAAGGTGGGGTGTCCAAAGAAGACACAC
AGCCCTATACAGGGGAGAAAGGTGTGCGTACTAACATATTAAGTAACTTTAGTGAGGAACAGCAGTGG
AAAATAATCTATATACCTTGGCTCTTTTGCAGTTTGACAAAGTAAATGATTAAAATCTCTAGATTTTCC
ACTACAGTATCCCCAGGGTGTCTATTTACCTTGATTGATATTATTTTATCTCTTTTGGGCCAAAGATAAC
AGCCCTTGCTTCTGTGTTAATAATAATTCTGTGTTGCTTCTGAGATTAATAATTGATTAATTCATAGT
CAGGAATCTTTGTAAGAAAGGAAACCAATTACTTTTGGCTACCACTTTTACATGGTCACCTACAGGAGAGA
GGAGGTGCTGCAAGACTCTCTGGTAGAAAAATGAAGAGGGTCTGGTACTACTGCTTGCTGTGGCATTTG
GACATGCTTTAGAGAGAGGTAAGATTTCTTTTGTGTGACCATTTACAGGAATTC
```

**Rys.2.4.1.** Lokalizacja starterów dla ludzkiego genu *DBP*. Na żółto zaznaczono lokalizację startera forward, na czerwono – startera reversed.

- Wyznaczone startery spełniają warunki >50% GC, mają taką samą długość i ciągi tych samych zasad nie przekraczają 3.

#### 2.4.2. Ustalanie temperatury przyłączania starterów

**A.** Na podstawie wzoru podanego na wykładzie proszę obliczyć temperaturę topnienia obu starterów. Dla  $\log Na^+$  proszę przyjąć wartość  $\log 0,05 = -1,3$

- Korzystamy ze wzoru:  
 $T_m = 81.5 + 16.6 (\log Na^+) + 41 \sum G+C/długość - 600/długość.$
- $\log Na^+ = 0,05$  zatem wzór przyjmuje postać:  
 $T_m = 81.5 + 16.6 (-1,3) + 41 \sum G+C/długość - 600/długość.$
- Po przeliczeniu wartości stałych otrzymujemy:  
 **$T_m = 59,92 + 41 \sum G+C/długość - 600/długość.$**

## ● Starter Forward

- ▶ Długość: 21 zasad
- ▶ Suma G+C = 11
- ▶  $T_m = 59,92 + 41 (11/21) - 600/21$
- ▶  $T_m = 59,92 + 21,48 - 28,58$
- ▶  $T_m = 52,82$

## ● Starter Reverse

- ▶ Długość: 21 zasad
- ▶ Suma G+C = 11
- ▶  $T_m = 52,82$

**B.** Czy startery te umożliwiają ustalenie temperatury annealingu? Jeżeli tak, to proszę podać wartości temperatur, które należy przetestować.

- Tak, ponieważ wartości  $T_m$  są identyczne dla obu starterów, a więc różnica między temperaturami topnienia starterów nie przekracza 5°C.
- Testujemy kilka temperatur w pobliżu temperatury wyznaczonej przez wzór. Wyznaczona temperatura topnienia wynosi 52,82°C, zatem należy przetestować temperatury w zakresie 52-54°C.

### 2.4.3. Liczba cykli, czas trwania i temperatury poszczególnych etapów.

**C.** Proszę podać liczbę cykli, która byłaby optymalna dla amplifikacji ludzkiego genu *DBP*.

- Gen ma 1805 bp. Startery zlokalizowano między pozycją 67 (początek startera forward) i 1706 (koniec starter reverse), co oznacza, że produkt amplifikacji będzie miał 1640 bp. Jest to typowa długość produktu PCR. Reakcja zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem genomowego DNA ludzkiego, który należy do dużych genomów. Amplifikacja dotyczy sekwencji unikalnej, zatem **maksymalna liczba cykli nie powinna przekroczyć 35**.

**D.** Proszę podać czasy i temperatury poszczególnych etapów.

- Wstępna denaturacja: 5 minut, 94°C.
- 35 cykli
  - ▶ Denaturacja: 1 minuta, 94°C.
  - ▶ Annealing: 1 minuta, 53°C (53°C jest najbliższe temperatury topnienia starterów, w warunkach rzeczywistych najpierw należy przetestować zakres 52-54°C).
  - ▶ Elongacja: 1,5 minuty, 72°C (wybieramy dłuższy czas elongacji, gdyż genom ludzki jest duży i potrzeba więcej czasu na całkowitą syntezę wszystkich fragmentów).
- Końcowa elongacja: 10 minut, 72°C (dłuższy czas ze względu na wielkość genomu).

**E.** Proszę podać całkowity czas PCR uwzględniając liczbę cykli w punkcie A oraz czasy w punkcie B.

- Czas pojedynczego cyklu w minutach to:  $1 + 1 + 1,5 = 3,5$  minuty.
- Dla 35 cykli otrzymujemy:  $35 \times 3,5$  minuty = 122,5 minuty.
- Czas wstępnej denaturacji i końcowego wydłużania to  $5$  minut +  $10$  minut = 15 minut.
- Całkowity czas PCR:  $122,5$  minuty +  $15$  minut =  $137,5$  minuty = **2 h 17 minut 30 sekund**.

## 2.4.4. Liczba prób

Celem jest analiza zróżnicowania genu *DBP* w 5 populacjach ludzkich. Z każdej populacji należy pobrać 20 prób. Proszę podać całkowitą liczbę prób, którą należy uwzględnić w PCR.

- 5 populacji po 20 prób = 100 prób.
- Dodatkowo należy uwzględnić kontrolę pozytywną (amplifikację ze znaną próbą, o której wiadomo, że daje silny sygnał w PCR, np. plazmid z wstawionym genem *DBP*) oraz kontrolę negatywną (próby bez DNA). Na każdą z kontroli przyjmujemy 5 prób.
- Całkowita liczba prób to 100 plus 10 prób kontroli, co daje **110 prób**.

## 2.4.5. Stężenia i sporządzanie mieszaniny reakcyjnej.

Proszę podać stężenia poszczególnych komponentów PCR. Proszę skorzystać z informacji w protokole i tabeli 2.4.5.

- Liczba prób wynosi  $110 \times 10\%$  przeznaczone na straty = czyli  $110 + 11 = 121$ .
- Bufor: generalnie stosujemy stężenie 1 x jako najbardziej optymalne.
- $MgCl_2$ : przyjmujemy 1,5 mM ponieważ im wyższe stężenie tym niższa specyficzność. Sekwencja jest unikalna i nie ma potrzeby podnoszenia stężenia  $MgCl_2$ .
- Wzmacniacz z betainą: stosujemy stężenie 1x.
- Nukleotydy: przyjmujemy najczęściej stosowane stężenie 200  $\mu M$ .
- Startery: przyjmujemy 0,5  $\mu M$ , gdyż sekwencja jest unikalna i nie występuje w dużej liczbie kopii w genomie.
- Polimeraza: przyjmujemy najczęściej wykorzystywaną ilość, czyli 1 U.
- Matrycowe DNA: przyjmujemy wartość przeciętną, 60 ng, ze względu na przeciętną objętość mieszaniny reakcyjnej.
- Zasady przygotowania mieszaniny reakcyjnej.
  - ▶ DNA: w próbach mamy różne DNA, dlatego nie należy dodawać DNA do mieszaniny reakcyjnej. Oczywiście w obliczeniach ilości składników na próbę uwzględniamy ilość DNA, gdyż musimy obliczyć ilość wody.
  - ▶ Składniki dodajemy w takiej kolejności jak w tabeli, zaczynamy od wody, potem bufor itd. aż do punktu 7.
  - ▶ Wodę i bufor zawsze dajemy na początku, aby stworzyć środowisko dla pozostałych składników.
  - ▶ Polimerazę dodajemy na końcu ponieważ zawieszona jest w glicerolu, który ma dużą gęstość i dlatego należy dodać tak aby jak najszybciej obniżyć stężenie glicerolu, który nie wpływa korzystnie na pozostałe składniki. Ponadto polimeraza jest wrażliwa na wzrost temperatury (reakcję przygotowujemy w temperaturze 4-10°C), co również uzasadnia dodanie jej na końcu.
  - ▶ Po dodaniu polimerazy łączna objętość **2057  $\mu l$  (= 121 x 17  $\mu l$ )**, rozdzielamy na 110 probówek po 176  $\mu l$  (jeżeli zostanie nadmiar, bo liczyliśmy 121 prób, to nie rozdzielamy, ale zostawiamy, gdyż to była rezerwa aby nie zabrakło na próby).
  - ▶ Do każdej probówki dodajemy 3  $\mu l$  DNA każdorazowo biorąc inną próbę i zmieniając końcówkę pipety.
  - ▶ Probówki zamykamy i wkładamy do termocyklera.



Tabela 2.4.5. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej dla PCR z wykorzystaniem genu <i>DBP</i> .					
L.p.	Składnik	Stężenie w próbce	Roztwór podstawowy	Ilość w próbce [μl]	Ilość dla prób [μl]
1.	H <sub>2</sub> O			10,4	1258,4
2.	<b>Bufor:</b> 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 mM Tris-HCl	1x	20 x stężony	1,0	121,0
3.	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	25 mM	1,2	145,2
4.	<b>Wzmacniacz</b> (betaina)	1x	10 x stężony	2,0	242,0
5.	Nukleotydy: <b>dNTP</b> (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)	200 μM	10 mM	0,4	48,4
6.	Startery: DBP-F DBP-R	0,5 μM 0,5 μM	20 μM 20 μM	0,5 0,5	60,5 60,5
7.	Polimeraza DNA, <i>Tfl</i>	1 U	1U/ μl	1,0	121,0
8.	DNA	60 ng	20 ng/ μl	3,0	
<b>Objętość próby:</b>				20 μl	<b>2057</b>