





Replikacja DNA

1. **Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat**
2. **Zasady replikacji DNA *in vivo***
 - Model semikonserwatywny
 - Kierunek replikacji
 - Fragmenty Okazaki
 - Widelki replikacyjne
3. **Etapy replikacji DNA *in vivo***
 - Inicjacja replikacji
 - Elongacja replikacji
 - Terminacja replikacji
4. **Reakcja PCR**
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR





1. Przepływ informacji genetycznej

Centralny dogmat biologii molekularnej opisuje przepływ informacji genetycznej pomiędzy biopolimerami (kwasy nukleinowe, białka).

Wersja I

F. Crick, 1958

„Gdy informacja genetyczna dostanie się do białka, nie może wrócić do kwasu nukleinowego”.

Oznacza to, że:

- przepływ informacji genetycznej jest możliwy pomiędzy kwasami nukleinowymi lub z kwasu nukleinowego do białka;
- przepływ informacji pomiędzy białkami lub od białka do kwasu nukleinowego nie jest możliwy.

Wersja II

J. Watson, 1965. Molecular biology of the gene.

„Przepływ informacji genetycznej następuje zawsze od DNA przez RNA do białka”.

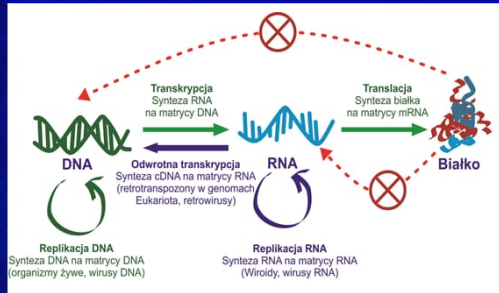
Wersja Watsona jest uproszczeniem i stanowi tylko jedną z możliwości przepływu informacji.

1. Przepływ informacji genetycznej

Centralny Dogmat w wersji Crick'a zakładał możliwość odwrotnej transkrypcji, czyli przepływu informacji od RNA do DNA.

Crick o Centralnym Dogmacie

- W 1970 r. odkryto odwrotną transkryptazę.
- Nature opublikował artykuł o rewizji Centralnego dogmatu.
- W odpowiedzi Crick wystosował list protestacyjny stwierdzając, że „o możliwości odwrotnej transkrypcji mówił już w 1957 r.
- W odniesieniu do słowa „dogmat” Crick stwierdził, że nie rozumiał właściwie jego znaczenia. Lepszym stwierdzeniem byłaby „centralna hipoteza. Pozwoliłoby to uniknąć wielu nieporozumień.



Centralny Dogmat Biologii Molekularnej na podstawie Crick'a (1956). Przepływ informacji z białka do kwasu nukleinowego nie jest możliwy. Według Crick'a przepływ informacji między kwasami nukleinowymi może odbywać się w dowolnym kierunku. Zielonymi strzałkami zaznaczono typowy kierunek przepływu informacji w komórce (DNA-RNA-białko). Strzałki granatowe pokazują dodatkowe możliwości.

Przepływ informacji pomiędzy białkami lub od białka do kwasu nukleinowego nie jest możliwy.

Cobb 2017



Replikacja DNA

1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. **Zasady replikacji DNA *in vivo***
 - Model semikonserwatywny
 - Kierunek replikacji
 - Fragmenty Okazaki
 - Widelki replikacyjne
3. Etapy replikacji DNA *in vivo*
 - Inicjacja replikacji
 - Elongacja replikacji
 - Terminacja replikacji
4. Reakcja PCR
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR



2. Replikacja DNA *in vivo*: definicja

Replikacja DNA to proces, w którym podwójna spirala DNA jest kopiowana i powstają dwie identyczne cząsteczki.

Replikacja DNA poprzedza mejozę i proces tworzenia gamet. Replikacja jest podstawą dziedziczenia: przekazywania cech potomstwu.



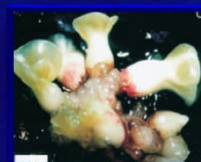
Pylek sosny na wodzie.



Pyłniki cebuli.



Różnicowanie kalusa u *Lolium temulentum*.



Somatyczne embriony u bawelny.

Replikacja zachodzi w komórkach somatycznych. Poprzedza mitozę i jest podstawą rozwoju i wzrostu organizmów.



Plemniki i sporofity u *Pellia*.

U Prokariota 500-1000 par zasad jest replikowane w ciągu sekundy. U Eukariota tempo replikacji jest 10-krotnie niższe i wynosi 50 par zasad na sekundę.



2. Replikacja DNA: semikonserwatywna

Replikacja jest semikonserwatywna co oznacza, że zsyntetyzowana kopia zawiera jedną nić wyjściową i jedną nową.



Replikujący plazmid *Salmonella typhimurium*

Każda z dwóch nici cząsteczki DNA jest matrycą do syntezy nowej nici. W wyniku replikacji jednej cząsteczki DNA powstają dwie cząsteczki potomne.



2. Replikacja DNA: semikonserwatywna

Wykorzystanie izotopu azotu N¹⁵ pozwoliło eksperymentalnie udowodnić semikonserwatywny mechanizm replikacji DNA.

E. coli: DNA z N¹⁵ → **Pożywka z N¹⁴**

Replikacja i podział I → 2 kopie, każda zawiera łańcuch z N¹⁵ i łańcuch z N¹⁴

Replikacja i podział II → 4 kopie, 2 mają łańcuch z N¹⁵ i łańcuch z N¹⁴, 2 mają łańcuchy tylko z N¹⁴

Izolacja DNA i wirowanie w gradiencie chlorku cezu pozwala rozróżnić niewielkie różnice w gęstości DNA.

DNA z N¹⁵ DNA z N¹⁵ i N¹⁴ DNA z N¹⁴
DNA z N¹⁵ i N¹⁴ DNA z N¹⁵ i N¹⁴

Fotografia pokazująca różnice w gęstości DNA w kolejnych pokoleniach po podziałach *E. coli* (Meselson i Stahl 1958).

Doświadczenie Meselsona i Stahla było pierwszym eksperymentalnym dowodem potwierdzającym strukturę opisaną przez Watsona i Crick'a oraz mechanizm replikacji DNA.

2. Replikacja DNA: kierunek

Wiązanie fosfodiesterowe łączy nukleotydy. Powstaje ono pomiędzy grupami OH w pozycji 3' i 5' pentozy w kolejnych nukleotydach.

Grupa OH w pozycji 3' pierwszego nukleotydu i grupa OH w reszcie fosforanowej w pozycji 5' drugiego nukleotydu tworzą wiązanie fosfodiesterowe.

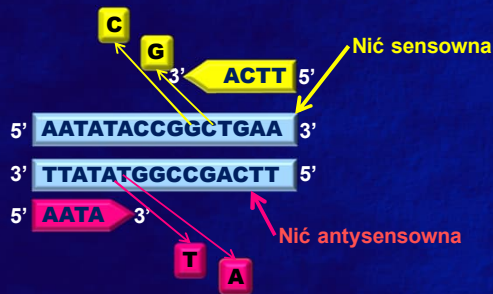
Zasada azotowa 1 Zasada azotowa 2

2 cząsteczki PO₄³⁻

Reakcja syntezy DNA:
(dNMP)_n + dNTP ↔ (dNMP)_{n+1} + 2P

2. Replikacja DNA: kierunek

Tworzenie wiązania fosfodiestrowego determinuje kierunek replikacji DNA *in vivo*: zawsze od końca 5' do końca 3' nowej nici.



Nowa nić DNA jest syntetyzowana w kierunku 5'→3' na matrycy („stara nić”) o przeciwnej orientacji, czyli 3'→5'. Zapewnia to tworzenie kopii o niciach antyrównoległych (różna orientacja).

Przyjęto zasadę, że „górną nić” zapisuje się od końca 5'. Określa się ją jako nić sensowną. Nić sensowna ma taką samą sekwencję jak mRNA.

Sekwencje zdeponowane w bankach genów (np. NCBI) zawsze podane są od końca 5'.

```

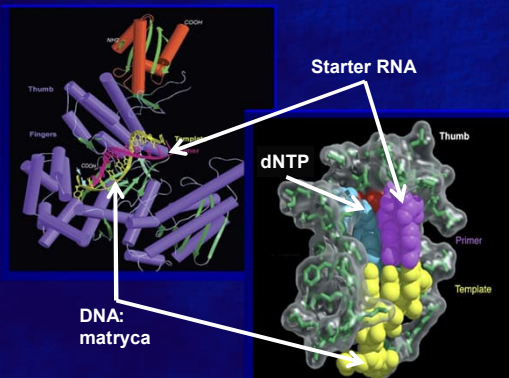
ORIGIN
1  ctccggagac  cctccggaga  gacagacatga  gtgagtgatc  gtccgggggc  gtcagggatc
61  tgcattgctt  tgcatagttt  atccagacaa  tctgctgggg  acaactagtt  gtcagagatc
121  tccggaccgc  tccagggccc  tccagtttgt  gacacagagc  aggcagatgc  ctatgtgtgc
181  ggcacacagg  tgcacagagg  cccggcaacc  agccggagc  gttccaggca  tgcgtgtgtg
241  tttaagagc  gttctcaaca  agagcttgt  acaggggat  gtcacaaaga  gacccagattg
301  ctgtaagccc  cttccggaaa  aatgctaggy  ttggtggcaa  cgtactactgy  tgcac
//
    
```

Zapis fragmentu sekwencji rDNA myszy w bazie NCBI.

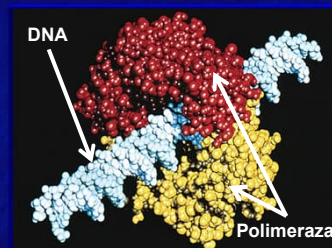


2. Replikacja DNA: kierunek

Replikacja DNA jest katalizowana przez polimerazy DNA, które dodają nukleotydy do końca 3' nowej nici (kierunek 5' do 3').



Model przestrzenny polimerazy DNA faga T7.



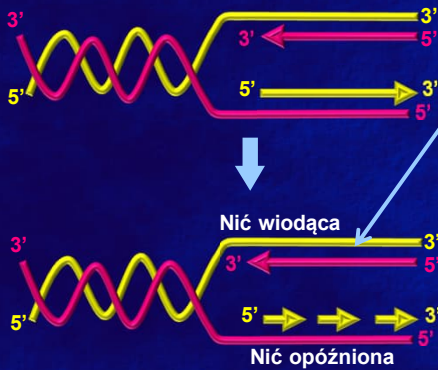
Dimery złożone z podjednostek β-polimerazy DNA III *E. coli* tworzą „kleszcze” wokół DNA.

Polimerazy DNA nie mają zdolności katalizowania reakcji przyłączania nukleotydów do końca 5'. Ma to konsekwencje w sposobie replikacji obu nici DNA.



2. Replikacja DNA: fragmenty Okazaki

Polimerazy syntetyzują DNA jednocześnie na obu niciach, ale łańcuch jest wydłużany w kierunkach przeciwnych.



Polimeraza DNA może poruszać się tylko w kierunku od 5' do 3'. Dlatego synteza DNA na jednej nici odbywa się w sposób ciągły, a na drugiej w postaci fragmentów.

Replikacja w postaci fragmentów jest bardziej złożona, polimeraza musi się zatrzymywać, a następnie ponownie rozpoczynać replikację. Powoduje to „opóźnienie” w stosunku do nici syntetyzowanej w sposób ciągły.

Niść wiodąca DNA to niść replikowana w sposób ciągły. Niść opóźniona to niść replikowana w postaci fragmentów.



2. Replikacja DNA: fragmenty Okazaki

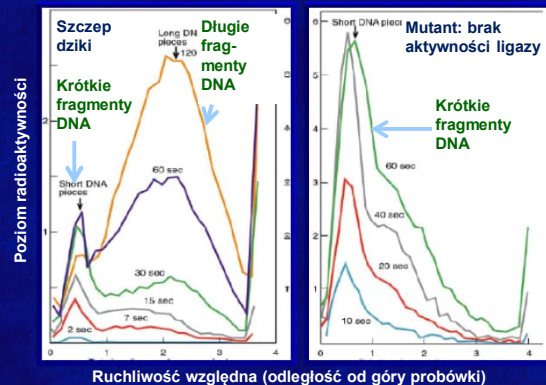
Fragmenty Okazaki, to krótkie fragmenty DNA syntetyzowane przez polimerazę DNA na nici opóźnionej, a następnie łączone.

Doświadczenie Okazaki:

- Komórki *E. coli* znakowano radioaktywnie w hodowli na pożywce przez krótki okres (10-600 s).
- Znakowane DNA wyizolowano i określono jego ruchliwość podczas wirowania w gradiencie sacharozy.
- Na podstawie ruchliwości określono długość fragmentów DNA.

Fragmenty Okazaki mają 1000-2000 nukleotydów u Prokariota i 100-200 u Eukariota.

Okazaki et al. 1968

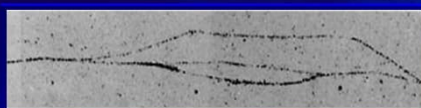
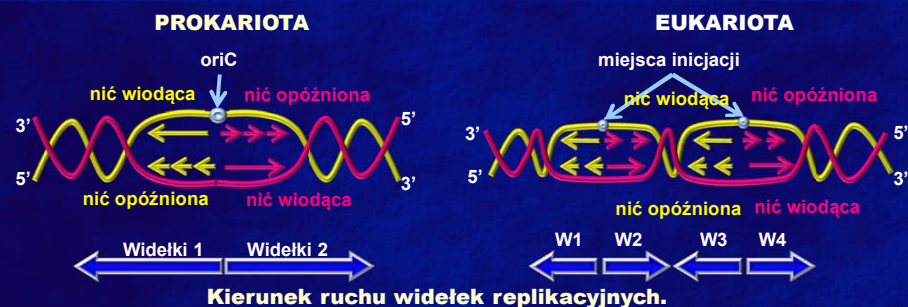


U szczepów dzikich (aktywna ligaza) krótkie fragmenty DNA pojawiały się tylko w początkowej fazie (do 30 s). U mutantów bez ligazy replikacja prowadziła głównie do krótkich odcinków DNA.

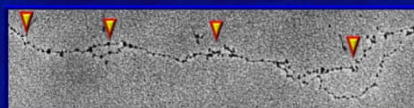


2. Replikacja DNA: widełki replikacyjne

Widełki replikacyjne poruszają się w dwóch kierunkach od miejsca inicjacji replikacji (model dwukierunkowy).



Widełki replikacyjne u *Escherichia coli*.



Widełki replikacyjne u drożdży.

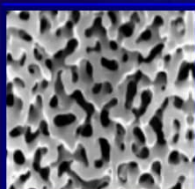
Replikacja kończy się, gdy widełki poruszające się w przeciwnych kierunkach spotykają się.



2. Replikacja DNA: przemysł

Na skalę przemysłową syntetyzowane są krótkie fragmenty DNA, np. oligonukleotydy do reakcji PCR, sekwencjonowania itd.

Synteza oligonukleotydów prowadzona jest na stałym podłożu, do którego są one kowalently przyłączone.



CPG: pory szklane o średnicy 50 nm, IDT technologies.



Syntetyzer oligonukleotydów, Fisher Chemicals.





Specjalnie przygotowany polistyren może być wykorzystany jako trwałe podłoże do syntezy oligonukleotydów.

Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem stałego podłoża może być prowadzona w którymkolwiek kierunku ($5' \rightarrow 3'$ lub $3' \rightarrow 5'$) ze względu na odpowiednią modyfikację nukleotydów. Najczęściej prowadzi się ją w kierunku $3' \rightarrow 5'$.



Replikacja DNA

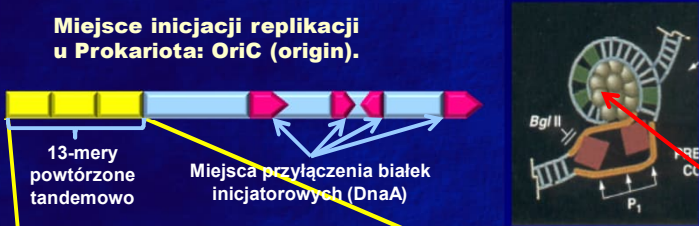
1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. Zasady replikacji DNA *in vivo*
 - Model semikonserwatywny
 - Kierunek replikacji
 - Fragmenty Okazaki
 - Widelki replikacyjne
3. **Etapy replikacji DNA *in vivo***
 - Inicjacja replikacji
 - Elongacja replikacji
 - Terminacja replikacji
4. Reakcja PCR
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: inicjacja

Replikon to odcinek DNA, który jest replikowany z jednego miejsca inicjacji replikacji. Miejsce inicjacji jest bogate w pary AT.

Miejsce inicjacji replikacji u Prokariota: OriC (origin).



13-mery powtórzone tandemowo

Miejsca przyłączenia białek inicjatorowych (DnaA)


Kompleks DnaA i ATP destabilizuje wiązania wodorowe w 13-merach, co pozwala na przyłączenie kolejnych białek i rozpoczęcie replikacji.

1 13 17 29 32 44

5' **GATCTNTTATT** **GATCTNTTNTATT** **GATCTCTTATTAG**

Sekwencja 13-merów w OriC u *Escherichia coli*.

U bakterii występuje jedno miejsce inicjacji replikacji – cały chromosom jest replikonem. U Archaea i Eukariota jest wiele miejsc inicjacji replikacji – wiele replikonów.



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: inicjacja

U Eukariota inicjacja może zachodzić w różnym czasie w poszczególnych miejscach.

Organizm	Liczba replikonów	Długość replikonu [kbp]	Prędkość replikacji [bp/s]
<i>Escherichia coli</i> (bakteria)	1	4 200	830
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (drożdże)	500	40	60
<i>Drosophila melanogaster</i> (muszka owocowa)	3 500	40	45
<i>Xenopus laevis</i> (płaz)	15 000	200	10
<i>Mus musculus</i> (mysz)	25 000	150	40
<i>Vicia faba</i> (bób)	35 000	300	?

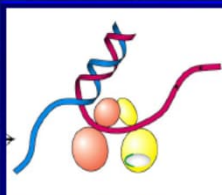
Widelki replikacyjne Prokariota poruszają się szybciej. Czas replikacji całego genomu jest krótszy u Eukariota ze względu na wiele widełek replikacyjnych.

3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: inicjacja

Replikacja może zajść tylko, gdy nici DNA w podwójnej helisie są rozplecione na skutek zerwania wiązań wodorowych.

- **Helikazy:** rozdzielają nici DNA poprzez hydrolizę wiązań wodorowych przy pomocy ATP.
- **Białka SSB:** stabilizują jednoniciowe fragmenty DNA.
- **Topoizomerazy** (np. gyraza) usuwają superskręty z DNA i umożliwiają działanie polimerazy. DNA musi wykonać pełen obrót (360°) co 10 nukleotydów.

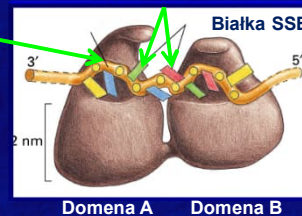
Przyłączenie pierwszego monomeru białek SSB do nici DNA promuje przyłączenie następnych tak, że w krótkim czasie cała nić jest pokryta białkami SSB.



Przyłączenie podjednostek helikazy do DNA i zerwanie wiązań wodorowych.

Zasady azotowe

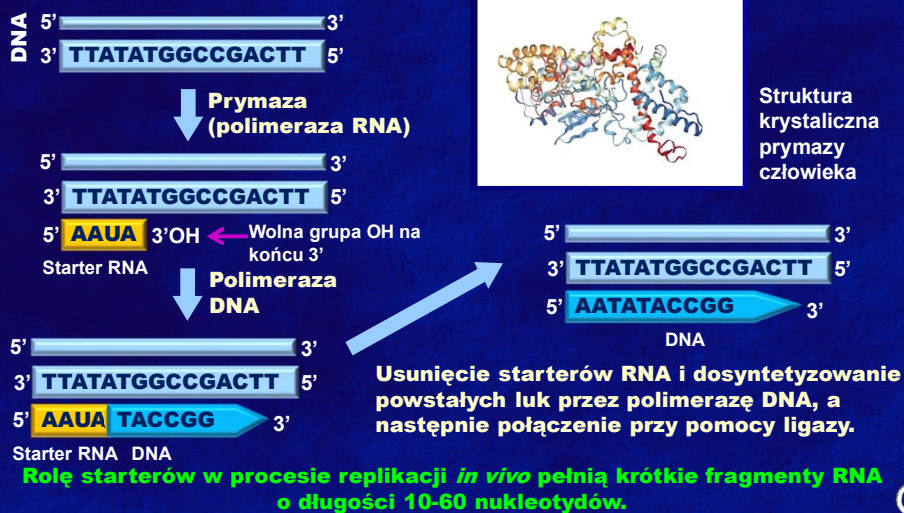
Szkielet cukrowo-fosforanowy



Helikazy uczestniczą we wszystkich procesach, gdzie niezbędne jest rozplecenie nici kwasów nukleinowych. U Eukariota stanowią one 1% wszystkich genów.

3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: inicjacja

Polimerazy DNA nie mogą inicjować syntezy DNA *de novo*. Mogą jedynie dodawać nukleotydy do już istniejących nici.



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

U bakterii występuje kilka polimeraz DNA (I, II i III), które pełnią różne funkcje.

Polimerazy <i>E. coli</i>	DNA pol I	DNA pol II	DNA pol III
Struktura	Monomer	Monomer	Heteromultimer
Liczba cząsteczek w komórce	400	100	10
Prędkość (bp/s)	16-20	2-5	250-1000
Locus	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i> , <i>dnaN</i> , <i>dnaX</i> , <i>dnaQ</i> , <i>dnaT</i>
Funkcja	Synteza DNA Naprawa DNA	Naprawa DNA	Replikacja

Wszystkie polimerazy mogą przyłączać nukleotydy tylko do wolnej grupy OH na końcu 3' oligonukleotydowego startera.

3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

Co najmniej 15 różnych polimeraz DNA występuje u Eukariota. Należą one do 5 rodzin białkowych o ograniczonym podobieństwie.

Polimerazy ssaków	α (I)	δ (II)	ϵ (III)	β	γ
Rodzina	B	B	B	X	A
Lokalizacja	Jądro	Jądro	Jądro	Jądro	Mito-chondria
Funkcja	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Inicjacja ➢ Synteza frag-mentów Okazaki 	Elongacja, synteza nici wiodącej	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Elongacja ➢ Naprawa DNA 	Naprawa DNA	Replikacja mitochondrialnego DNA
Aktywność egzonukleazy (3'→5')	Nie	Tak	Tak	Nie	Tak

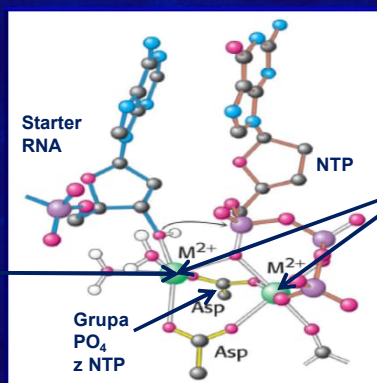
Polimerazy należące do rodziny B odpowiadają za replikację chromosomów, polimerazy rodziny A są podobne do polimeraz bakteryjnych i odpowiadają za replikację i naprawę DNA w mitochondrium.



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

Jony metalu, magnezu lub manganu, są niezbędne do działania polimeraz DNA.

Jon metalu (M^{2+} - magnez lub mangan) współdziała z wolną grupą OH na końcu 3' startera.



Oba jony M^{2+} współdziałają z grupą PO_4 z trójfosforanu nukleotydowego (NTP). Grupa PO_4 „rozciąga” się między jonami metalu i tworzy „most”.

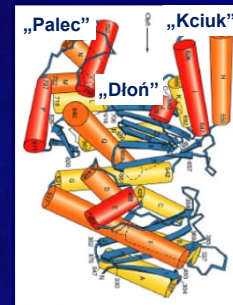
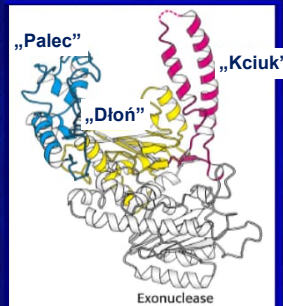
Brak jonów metalu uniemożliwia elongację DNA. Dlatego niezbędnym składnikiem buforów do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) są jony metalu, najczęściej magnezu (Mg).



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

Wszystkie bakteryjne polimerazy DNA będące monomerami mają podobną strukturę przestrzenną: „kciuk-dłoń-palec”.

- Polimeraza DNA I posiada właściwości korektorskie dzięki aktywności egzonukleazy w kierunku 5'→3' oraz 3'→5'.
- Polimeraza DNA I *E. coli* składa się z fragmentu Klenowa oraz małej domeny.
- Fragment Klenowa to domena odpowiedzialna za syntezę DNA.
- Mała domena odpowiedzialna jest za aktywność egzonukleazy w kierunku 5'→3'.



Struktura polimerazy DNA I u *E. coli*.

Fragment Klenowa to polimeraza DNA I *E. coli* pozbawiona małej domeny, czyli właściwości egzonukleazy w kierunku 5'→3'. Jest to jeden z pierwszych enzymów wykorzystywanych w replikacji *in vitro*.



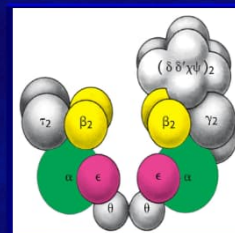
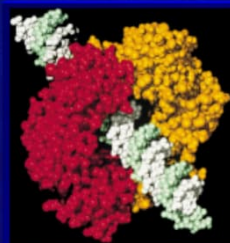
3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

Polimeraza DNA III *E. coli* jest odpowiedzialna za wydłużanie łańcucha DNA. Jest to holoenzym zbudowany z 10 podjednostek.

Holoenzym polimerazy DNA III:

- α - podjednostki polimerazy, odpowiadają za ciągłą syntezę DNA (elongację);
- ϵ - podjednostki o funkcji egzonukleazy w kierunku 3'→5', odpowiadają za właściwości korektorskie;
- $\delta 2$ - zapobiega oddzieleniu polimerazy od DNA,
- $\beta 2$ - tworzy „ślizgający się zacisk”.

Model holoenzymu polimerazy DNA III składa się z dwóch dimerów.



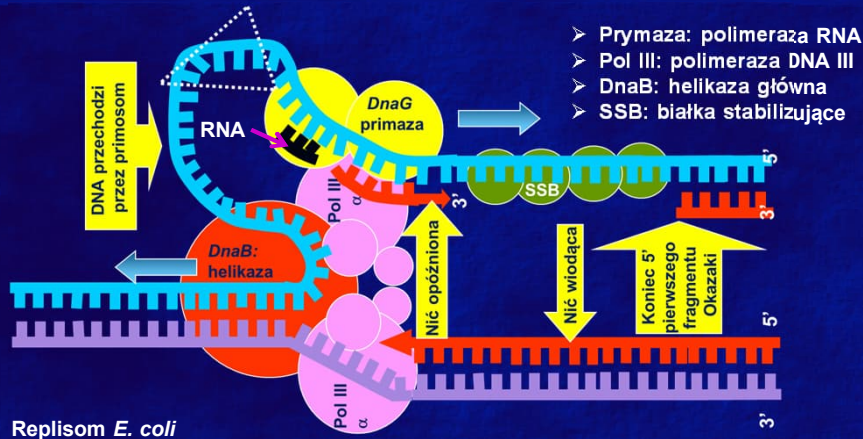
„Ślizgający się zacisk” – otacza nici DNA i umożliwia przemieszczanie się holoenzymu polimerazy III.

Holoenzym polimerazy DNA III *E. coli* tworzą dwa asymetryczne dimery, jeden dla nici wiodącej i jeden dla nici opóźnionej.



3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

Replisom: wielobiałkowy kompleks, który prowadzi replikację DNA od miejsca inicjacji replikacji.



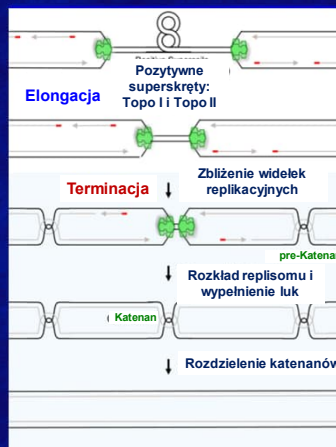
Replisom obejmuje białka rozplatające DNA (helikazy, SSB, topoizomerazy), syntetyzujące startery (prymaza: polimeraza RNA), polimerazę DNA III oraz usuwające startery RNA (RNazaH) i łączące fragmenty DNA (ligazy).

3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: terminacja

Terminacja replikacji u Prokariota zachodzi, gdy widełki replikacyjne poruszające się w przeciwnych kierunkach spotykają się.

Procesy zachodzące podczas terminacji replikacji DNA

- Stres topologiczny wynikający z rozplecenia części DNA, za widełkami powstają pozytywne superskręty.
- Spotkanie się widełek replikacyjnych.
- Replisom oddysocjowuje od DNA.
- Wypełniane są luki w nici opóźnionej.
- Rozdzielenie katenanów: układ co najmniej dwóch niepowiązanych cząsteczek chemicznych.



Model terminacji replikacji DNA. Zbyt duża liczba pozytywnych superskrętów może zahamować replikację. Superskręty te likwidowane są przez topoizomerazy. Dysocjacja replisomu zapobiega kolejnej rundzie replikacji.

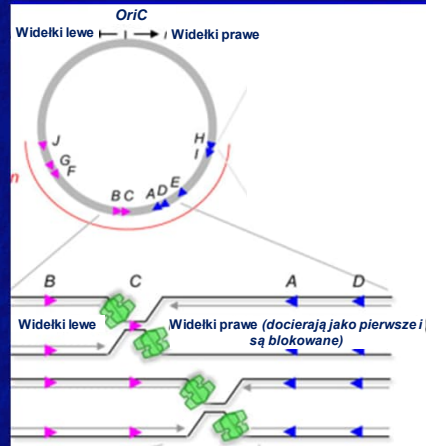
Terminacja replikacji składa się z unikalnych procesów związanych z rozkładem replisomu oraz rozdzieleniem potomnych cząsteczek DNA.

3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: terminacja

Terminacja replikacji u *E. coli* zachodzi w regionie terminacyjnym, zawierającym 10 miejsc terminacji, *ter*.

Zakończenie replikacji u *E. coli*

- Do obszaru terminacji przyłącza się białko *Tus*, które stanowi barierę dla widetek replikacyjnych.
- Widelki prawe docierają jako pierwsze, przechodzą przez pierwsze pięć miejsc *ter* (granatowe: H, I, E, D, A) i zostają zablokowane w miejscu C (różowe).
- Widelki lewe przechodzą przez pięć miejsc J, G, F, B i C (różowe) i zostają zablokowane w miejscu A.
- Sekwencje *ter* składają się z 26 bp z 13-nukleotydowym konserwatywnym rdzeniem.



Gen *tus* kodujący białko *Tus* zlokalizowany jest 11 bp w dół od sekwencji *terB*. Kompleks *Tus-terB* blokuje replikację u *E. coli*.

Dewar i Walter 2017

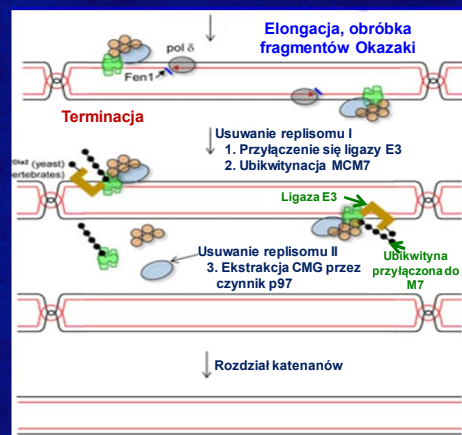


3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: terminacja

U Eukariota replikacja kończy się, gdy dochodzi do spotkania widetek replikacyjnych z dwóch sąsiadujących replisomów.

Elementy terminacji replikacji u Eukariota

- Dysocjacja kompleksu CMG helikazy, która składa się z białka *Cdc45*, kompleksu *GIN5* i sześciu *ATPaz* utrzymujących minichromosomy (*MCM2-MCM-7*).
- Ubikwitynacja *MCM7* jest warunkiem niezbędnym do dysocjacji helikazy *CMG*.
- Pozostałe białka replisomu oddysocjują pasywnie na skutek usunięcia helikazy *CMG*.
- Warunkiem rozdziału katenanów jest obecność kondensyn i wrzeciona podziałowego.





Na ogół terminacja replikacji u Eukariota nie jest zależna od specyficznych sekwencji.

Dewar i Walter 2017



Replikacja DNA

1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. Zasady replikacji DNA *in vivo*
 - Model semikonserwatywny
 - Kierunek replikacji
 - Fragmenty Okazaki
 - Widelki replikacyjne
3. Etapy replikacji DNA *in vivo*
 - Inicjacja replikacji
 - Elongacja replikacji
 - Terminacja replikacji
4. **Reakcja PCR**
 - Zasady i etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR




4. Reakcja PCR: definicja


Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) to „replikacja *in vitro*”, która umożliwia uzyskanie milionów kopii fragmentów DNA.

PCR
(ang. **polymerase chain reaction**)

- Składniki niezbędne do PCR:
 - DNA, które jest matrycą dla replikacji;
 - startery: krótkie fragmenty DNA, które inicjują reakcję;
 - nukleotydy: budulec dla nowo powstałego łańcucha DNA;
 - enzym – termostabilna polimeraza DNA prowadząca replikację.
- Termocykler umożliwia szybkie zmiany temperatur zgodne z zadanym schematem.



Jeden z pierwszych modeli termocyklorów




Współczesny model z gradientem temperaturowym i grzejną pokrywą.



Model pozwalający na analizę w czasie rzeczywistym (real time).

PCR polega na powtarzaniu cykli ogrzewania i ochładzania mieszanej reakcyjnej w celu manipulowania temperaturo-zależnymi procesami: denaturacją DNA i replikacją prowadzoną przez enzym.

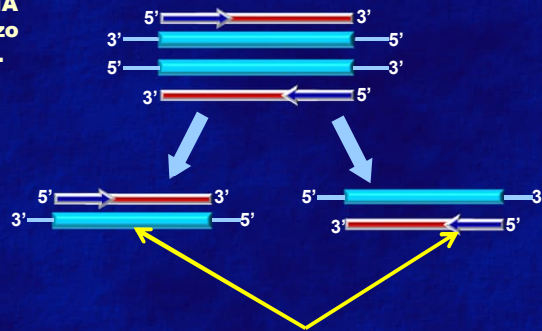


4. Reakcja PCR: liczba kopii

W wyniku pojedynczego cyklu PCR z każdej cząsteczki DNA powstają dwie nowe cząsteczki DNA. Rutynowo przeprowadza się 25-40 cykli.

Liczba kopii danej sekwencji DNA w reakcji PCR rośnie wykładniczo według wzoru 2^n (n: liczba cykli).

Cykl	Liczba kopii
1	2
2	4
3	8
10	1 024
20	1 048 576
30	1 073 741 824



Powstałe cząsteczki DNA są matrycami w następnym cyklu

W reakcji PCR wykorzystuje się odporną na wysoką temperaturę polimerazę z *Thermus aquaticus* (Taq) lub z *T. flavus* (Tfl).



4. Reakcja PCR: etapy

Reakcja PCR obejmuje denaturację DNA, przyłączenie starterów (annealing) i syntezę nowych nici DNA (elongacja).

1. Denaturacja: rozplecenie nici DNA, temp. 94°C.



Powielany fragment – matryca DNA

2. Annealing: przyłączenie starterów, temp. 36-70°C.



Startery to jednoniciowe oligonukleotydy (10-25 bp), komplementarne do danego fragmentu DNA, umożliwiają przyłączenie polimerazy DNA

3. Elongacja (amplifikacja): wydłużanie łańcucha DNA, temp. 72°C.



Polimeraza DNA syntetyzuje nowy łańcuch komplementarny do matrycy wykorzystując nukleotydy zawarte w mieszaninie reakcyjnej.

Specyfika reakcji zależy od temperatury przyłączania starterów, zbyt niska – starter przyłącza się do sekwencji niekomplementarnych, zbyt wysoka – starter się nie przyłącza.



4. Reakcja PCR: czas i temperatura

Czas prowadzenia poszczególnych etapów waha się od 30 s do 150 s. Najdłuższy jest czas elongacji.

- Wstępna denaturacja: wstępne rozplcenie nici DNA: 94°C przez 3-5 min. Jednorazowo, nie powtarza się w kolejnych cyklach.

30-45 cykli obejmujących:

- denaturację: 94°C przez 30-60 s w zależności od metody;
- annealing, czyli przyłączanie starterów: 36-70°C w zależności od temperatury topnienia starterów przez 30-60 s w zależności od metody;
- elongacja, czyli wydłużanie łańcucha: 72°C przez 60-150 s w zależności od metody.

Końcowe procesy po zakończeniu wszystkich cykli:

- końcowe wydłużanie: pozwala „dosyntetyzować” końcowe fragmenty DNA, 72°C przez 5-10 min. w zależności od długości amplifikowanych sekwencji.
- 4°C: ustawia się po zakończeniu wszystkich reakcji, pozwala na pozostawienie prób w termocyklerze po zakończeniu reakcji.



4. Reakcja PCR: składniki

Do przeprowadzenia reakcji PCR niezbędna jest matryca DNA oraz elementy niezbędne do przeprowadzenia reakcji.

Matryca DNA

- Matrycą jest DNA, który wyizolowany został z organizmu.
 - Do reakcji dodaje się 10-100 ng w zależności od metody.
- ### Startery
- Startery są niezbędne do zainicjowania reakcji replikacji *in vitro*.
 - Są to krótkie, jednoniciowe odcinki DNA (10-25 bp).
 - Startery projektuje się na podstawie sekwencji, która będzie amplifikowana.
 - Startery powinny zawierać >50% zasad z GC.
 - Stężenie starterów wynosi 0.3-1 μM

dNTP (nukleotydy)

- Nukleotydy: ATP, GTP, CTP, TTP niezbędne do tworzenia DNA. Stężenie każdego wynosi 200 μM.
- Polimeraza DNA: 0,5-2,0 U polimerazy Taq (*Thermus aquaticus*) lub Tfl (*T. flavus*).

Bufory

- Bufor dla polimerazy: 20 mM (NH₄)₂SO₄ i 50 mM Tris-HCl, dostarczany z polimerazą jako roztwór 10x lub 20x stężony.
- MgCl₂: 1,5-2,0 mM, kofaktor polimerazy, podnosi specyfikę reakcji.

Objętość

- 10-50 μl, uzupełnia się wodą do ostatecznej objętości.



4. Reakcja PCR: projektowanie

Temperatura topnienia DNA to temperatura, w której połowa cząsteczek jest zdenaturowana.

Temperatura przyłączania starterów (annealing) zależy od temperatury ich topnienia. Dlatego projektując warunki reakcji PCR należy zacząć do określenia temperatury topnienia starterów.

Testowanie warunków przyłączania starterów na ogół zaczyna się od $T_m \pm 5^\circ\text{C}$.

Projektując startery należy je tak dobrać, aby ich temperatury topnienia nie różniły się znacząco.

5' — **AGCTAAGGCCTAGCGTAGCCT** — 3'

- Liczba nukleotydów: 21
- Liczba nukleotydów z G+C: 12
- Procent G+C: 57%

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log \text{Na}^+) + 41 \frac{\sum \text{G+C}}{\text{długość}} - 600/\text{długość}$$

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log 0,05) + 41 \times 12/21 - 600/21$$

$$T_m = 81,5 + 16,6 (-1,3) + 23,43 - 28,57$$

$$T_m = 54,78 \approx 55^\circ\text{C}$$

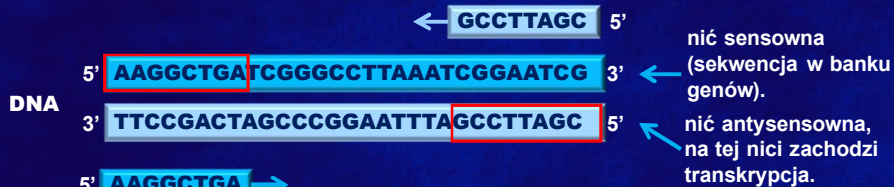


4. Reakcja PCR: projektowanie starterów

Aby powielić cały gen należy zaprojektować startery na jego początek i koniec.

W bazach danych zawsze podawane są sekwencje nici sensownych od końca 5' do 3'.

Starter 2 (reverse): komplementarny do sekwencji nici sensownej



Starter 1 (forward): identyczny jak sekwencja nici sensownej.

Sekwencje starterów podaje się od końca 5' do 3':

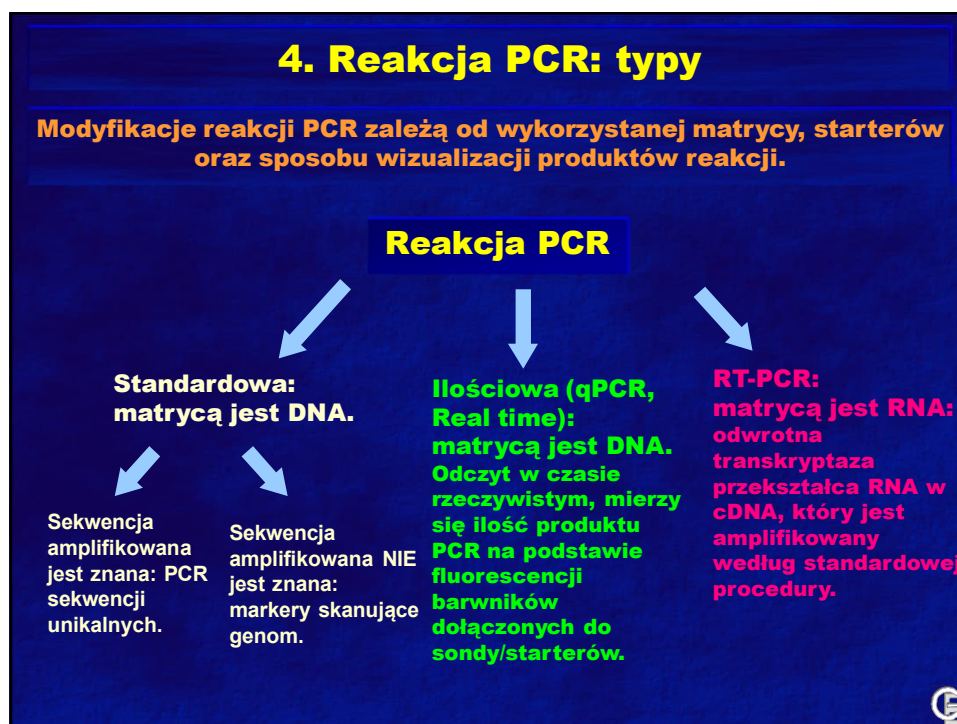
- Starter 1: 5'AAGGCTGA3'
- Starter2: 5'CGATTCCG3'



4. Reakcja PCR: termocykler



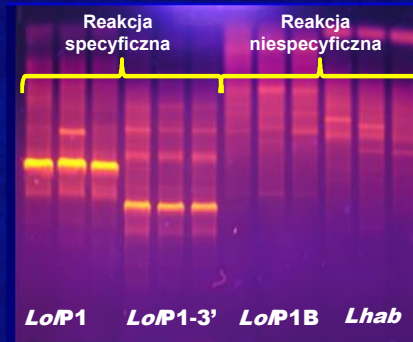
1. Próby przygotowane do reakcji PCR.
2. Umieszczenie prób w termocyklerze.
3. Programowanie warunków reakcji.
4. Reakcja PCR.
5. Rozdział prób na żelu agarozowym.
6. Obserwacja w świetle UV, dokumentacja.



4. Standardowe PCR – sekwencje unikalne

Reakcja PCR pozwala powielić określony, unikalny fragment genomu, pod warunkiem znajomości jego sekwencji.

- W reakcji PCR niezbędne są startery. Aby je zaprojektować konieczna jest znajomość sekwencji amplifikowanej.
- Reakcja PCR pozwala wykryć polimorfizm sekwencji unikalnych (genów) wynikający z mutacji w miejscach przyłączenia starterów.
- Jeżeli starter się przyłączy to zachodzi amplifikacja, a na żelu obserwujemy prążek.
- Jeżeli zaszła mutacja w miejscu przyłączenia, starter może się nie przyłączyć. Nie zachodzi amplifikacja. Nie obserwujemy prążka na żelu.
- Obecność prążka jest cechą dominującą. Heterozygoty mają prążek.



Produkty reakcji PCR na przykładzie alergenów pyłkowych i białka fotosystemu I.

PCR umożliwia wykrycie polimorfizmu sekwencji unikalnych, co znajduje zastosowanie w diagnostyce i badaniach genetyczno-ewolucyjnych.

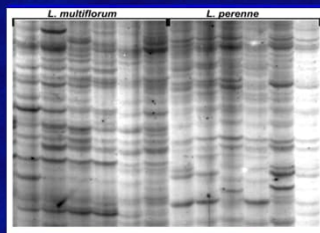


4. Standardowe PCR: skanowanie genomu

W markerach skanujących genom wykorzystuje się 10-15 nukleotydowe startery o losowych sekwencjach.

Startery o losowych sekwencjach

- Umożliwiają przeprowadzenie reakcji PCR, gdy nie jest znana sekwencja docelowa.
- Pozwalają uzyskać wiele produktów w pojedynczej reakcji PCR (fingerprint).
- Nadają się do analiz populacyjnych, ewolucyjnych i epidemiologicznych, w których wykorzystuje się wiele sekwencji.
- Wykorzystywane są w mapowaniu genomów.



Amplifikacja retrotranspononu typu *copia* u traw.

Produkty amplifikacji u pijawek otrzymane po zastosowaniu jednego, 10-nukleotydowego startera o losowo wybranej sekwencji.



W reakcji PCR ze starterami o losowo zaprojektowanych sekwencjach amplifikowane są fragmenty, które w bliskiej odległości (1000-5000 bp) mają sekwencje komplementarne do startera na obu niciach.

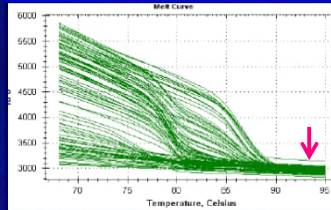


4. Reakcja PCR: ilościowa

Ilościowy PCR (qPCR, Real Time PCR) pozwala mierzyć ilość powstałego produktu w czasie rzeczywistym.

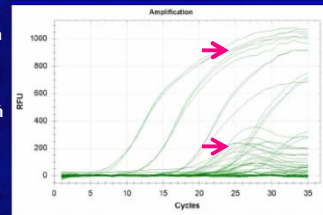
Procedura qPCR

- Barwniki fluorescencyjne wiążące się z DNA dodawane są do mieszaniny reakcyjnej lub wykorzystuje się znakowane fluorescencyjnie sondy/startery.
- Poziom fluorescencji jest mierzony w każdym cyklu.
- Poziom fluorescencji istotnie wzrasta jeżeli w mieszaninie jest dwuniciowy DNA.
- Przed właściwą reakcją należy upewnić się czy powstaje tylko specyficzny produkt.



Krzywa topnienia dla rDNA w granicach 60°C-95°C. Niski poziom fluorescencji w 95°C świadczy, że wszystkie produkty są zdenaturowane. Równomierny przebieg krzywej świadczy, że reakcja była specyficzna.

Różnice w poziomie fluorescencji w próbach świadczą o różnicach w ilości DNA, a tym samym świadczą o różnej liczbie powtórzeń rDNA w badanych próbach. Próby oznaczone strzałkami należą do różnych gatunków.



Reakcję qPCR wykorzystuje się do oceny liczby kopii niektórych sekwencji np. rDNA oraz do analizy ekspresji pojedynczych genów.



Zagadnienia 1-3

1. Przepływ informacji genetycznej

- Czy stwierdzenie, że przepływ informacji genetycznej zawsze występuje od DNA do RNA i białka jest prawidłowe?
- Jakie procesy są związane z pionowym przepływem informacji genetycznej?
- Jakie procesy obejmuje poziomy przepływ informacji genetycznej?
- Podaj z jakim typem przepływu informacji genetycznej jest związana replikacja, powstawanie gamet, transkrypcja, translacja.



2. Zasady replikacji: definicja

- Zdefiniuj replikację DNA.
- Gdzie i kiedy zachodzi replikacja? Podaj przykłady.
- Jaki proces genetyczny poprzedza wzrost i rozwój organizmów?

3. Zasady replikacji: semikonserwatywna

- Wyjaśnij na czym polega semikonserwatywny mechanizm replikacji.
- Jeżeli każdą z nici cząsteczki DNA oznaczymy jako A (AA cząsteczka dwuniciowa), a każdą z nowo syntetyzowanych nici oznaczymy jako B, to jak opiszemy cząsteczkę DNA powstałą w wyniku replikacji cząsteczki AA?
- Jaki pierwiastek wykorzystano do wykazania semikonserwatywnego mechanizmu replikacji?
- Dlaczego różnice w masie atomowej pomiędzy N^{14} i N^{15} mogły pomóc w udowodnieniu semikonserwatywnego mechanizmu replikacji?
- Na czym polegało doświadczenie Meselsona i Stahl'a?



Zagadnienia 4-5

4. Zasady replikacji: kierunek

- Pomiędzy którymi grupami OH powstaje wiązanie fosfodiesterowe łączące nukleotydy (pozycja C w pentozie)?
- W jakiej pozycji znajduje się wolna grupa OH na początku cząsteczki DNA, a w jakiej na końcu?
- Podaj kierunek replikacji DNA. Wyjaśnij z czego wynika taki kierunek?
- Jak zorientowana jest matryca, na której przebiega replikacja?
- Dzięki czemu zapewniona jest antyrównoległość łańcuchów DNA podczas replikacji?
- Do którego końca DNA polimeraza przyłącza nukleotydy, 5' czy 3'?
- Czy polimerazy DNA mogą prowadzić replikację w dowolnym kierunku?
- Co to jest nić sensowna?
- Jaka jest orientacja sekwencji DNA w bankach genów?



5. Zasady replikacji: fragmenty Okazaki

- Na ilu niciach jednocześnie polimeraza prowadzi replikację?
- Wyjaśnij pojęcia: nić wiodąca i nić opóźniona?
- Dlaczego jedna z nici DNA jest syntetyzowana w postaci fragmentów?
- Co to są fragmenty Okazaki?
- Narysuj schemat replikacji DNA z uwzględnieniem nici wiodącej i opóźnionej.



Zagadnienia 6-7

6. Zasady replikacji: widelki replikacyjne

- Jak poruszają się widelki replikacyjne?
- Kiedy kończy się replikacja?
- Co oznacza, że replikacja jest dwukierunkowa?
- Czy replikacja DNA na skalę przemysłową odbywa się tak samo jak w naturze?
- W jakim kierunku prowadzi się najczęściej replikację w procesach przemysłowych?



7. Inicjacja: początek replikacji

- Co to jest replikon?
- Który organizm ma więcej replikonów: prątek gruźlicy czy jęczmień; *Escherichia coli* czy człowiek?
- Co to jest miejsce OriC?
- Kto ma dłuższy replikon: człowiek czy bakteria?
- U którego organizmu widelki replikacyjne (replikacja) poruszają się najszybciej: *E. coli*, drożdże, żaba, człowiek?
- Czyj genom zostanie szybciej zreplikowany: *E. coli* czy drożdży? uzasadnij odpowiedź.
- Czy replikacja u Eukariota może zachodzić w wielu miejscach jednocześnie? Uzasadnij odpowiedź.
- W ilu miejscach jednocześnie zachodzi replikacja u prątka gruźlicy a w ilu u człowieka?



Zagadnienia 8-10

8. Inicjacja: denaturacja nici DNA

- Jakie procesy muszą poprzedzić syntezę DNA przez polimerazy DNA?
- Jaką funkcję pełni helikazy?
- Jaką funkcję pełni białko SSB?
- Które enzymy usuwają superskręty w DNA?
- Jak stabilizowana jest pojedyncza nić DNA (ssDNA) podczas replikacji?
- Co to są topioizomerazy?

9. Inicjacja: startery replikacji

- Czy polimerazy DNA mogą rozpoczynać syntezę łańcucha od nowa (*de novo*)?
- Dlaczego w replikacji uczestniczy polimeraza RNA (prymaza)?
- Jakie cząsteczki pełnią funkcję starterów w replikacji DNA?
- Jaka jest funkcja RNA w replikacji?

10. Elongacja: polimerazy DNA

- Ile polimeraz DNA występuje u bakterii?
- Czy wszystkie polimerazy DNA bakterii pełnią taką samą funkcję?
- Która bakteryjna polimeraza DNA odpowiada za replikację?
- Która polimeraza usuwa startery RNA?



Zagadnienia 11-13

11. Elongacja: polimerazy DNA cd.

- Ile polimeraz DNA występuje u Eukariota?
- U kogo jest więcej polimeraz DNA: człowieka czy drożdży, drożdży czy prątka gruźlicy, człowieka czy *E. coli*?
- Które polimerazy DNA Eukariota są podobne do polimeraz bakteryjnych?
- Która rodzina polimeraz DNA Eukariota odpowiada za replikację chromosomów?
- Jaką funkcję pełnią eukariotyczne polimerazy DNA należące do rodziny A, a jaką do rodziny B?

12. Elongacja: polimerazy DNA, jony metalu

- Jakie składniki nieorganiczne są niezbędne do działania polimeraz DNA?
- Jaka jest rola jonów magnezu i/lub manganu w replikacji?
- Dlaczego w mieszaninie reakcyjnej w reakcji PCR znajdują się jony magnezu?

13. Elongacja: polimerazy DNA, struktura

- Jak najprościej można opisać strukturę przestrzenną polimeraz DNA?
- Z czym związane jest pojęcie: „kciuk-dłoń-palec”?
- Z czym związana jest aktywność egzonuleazy polimeraz DNA?
- Co odpowiada za właściwości korektorskie polimeraz DNA?
- Co to jest fragment Klenowa?
- Jaki enzym był najwcześniej wykorzystywany w replikacji *in vitro*?



Zagadnienia 14-15

14. Elongacja: polimeraza DNA III

- Która polimeraza DNA jest odpowiedzialna za wydłużanie łańcucha u *E. coli*?
- Co oznacza, że polimeraza DNA III jest holoenzymem?
- Jaka cecha polimerazy DNA III umożliwia jednoczesną syntezę DNA na nici wiodącej i opóźnionej?
- Co oznacza pojęcie „ślizgający się zacisk”?
- Omów funkcje głównych podjednostek polimerazy DNA III.
- Które podjednostki polimerazy DNA III tworzą „ślizgający się zacisk”?
- Która podjednostka polimerazy DNA III odpowiada za elongację łańcucha?
- Dlaczego polimeraza DNA III nie odpada od nici DNA?



15. Elongacja: replisom

- Co oznacza pojęcie replisom?
- Jakie enzymy/białka wchodzi w skład replisomu *E. coli*?



Zagadnienia: 16

16. Reakcja PCR

- Na czym polega reakcja PCR?
- Proszę wymienić etapy reakcji PCR.
- Jak należy ustalić temperatury poszczególnych etapów reakcji PCR?
- Który z etapów reakcji PCR decyduje o jej specyfice?
- Jakie składniki są niezbędne do przeprowadzenia reakcji PCR?
- Proszę zaprojektować 10-nukleotydowe startery, które umożliwią powielenie fragmentu DNA zdeponowanego w NCBI:
AATGCGTAATGCCCGTAGTCGGTAAGGAATCATGCGCGCAAATCCC
GGGGATCCTGAAAA. Startery proszę zaprojektować tak aby objęły cały fragment.
- Stężenie roztworu podstawowego starterów PC1 i PC2 do reakcji PCR wynosi 20 μM . Proszę obliczyć ile μl każdego ze starterów należy użyć reakcji PCR jeżeli stężenie każdego startera w próbce wynosi 1 μM a objętość mieszaniny reakcyjnej wynosi 20 μl .
- Roztwory nukleotydów do reakcji PCR dostarczane są jako oddzielne roztwory o stężeniu 100 mM każdy. W celu przygotowania PCR rutynowo wykorzystuje się roztwór 10 mM, który zawiera wszystkie typy nukleotydów niezbędnych w reakcji PCR. Proszę podać jakie nukleotydy (proszę podać zapis symboliczny) i w jakich ilościach należy ze sobą zmieszać aby otrzymać 100 ml roztworu 10 mM. Ile wody użyjemy do sporządzenia tego roztworu?
- Wymień rodzaje reakcji PCR.
- Podaj przykłady zastosowania reakcji PCR.



**Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene**



polokkornelia@gmail.com

<https://www.matgen.pl>

**Centre for Evolution, Genomics
and Biomathematics, e-Gene**



prof.romanzielinski@gmail.com

<https://www.matgen.pl>