

Ćwiczenie 11

Symulacja procesu replikacji. Projektowanie reakcji PCR (ustalanie stężeń i profilu termicznego)

Prof. dr hab. Roman Zieliński

1. Symulacja procesu replikacji

1.1. Pytania i zagadnienia

1.1.1. Wymień etapy replikacji *in vivo*.

1.1.2. Jakie składniki chemiczne i enzymy są niezbędne do przeprowadzenia replikacji.

1.1.3. Kiedy zachodzi replikacja DNA w komórkach.

1.2. Ćwiczenia

1.2.1. Obejrzyj symulację replikacji (replikacja 1) lub na stronie:

<https://cooper7e.sinauer.com/animation0701.html>

1.2.2. Opisz przedstawione etapy.

- Jakie enzymy uczestniczą w poszczególnych etapach replikacji?
- Dlaczego możliwa jest synteza DNA na obu niciach jednocześnie?
- Z czego wynika opóźnienie na jednej z nici?

1.2.3. Szybkość replikacji wynosi 800 nukleotydów na sekundę. Ile będzie trwała replikacja genomu składającego się z 1.5 mln. par zasad?

1.2.3. za 1 pkt. na ćwiczeniach lub samodzielnie (decyzja prowadzącego).

1.3. Problemy

1.3.1. U Prokariota występuje jedno miejsce początku replikacji. Czy można wyróżnić miejsce początku replikacji u Eukariota?

1.3.2. O czym może świadczyć udział RNA w replikacji DNA?

1.3.3. Mechanizm replikacji jest podobny u Prokariota i Eukariota. Jednakże enzymy uczestniczące w replikacji znacznie się różnią pomiędzy bakteriami i Eukariota, natomiast enzymy Archaea i Eukariota są podobne. Jak wytłumaczyć te zależności? Jak mogła przebiegać ewolucja mechanizmu replikacji?

2. Projektowanie reakcji PCR (stężenia i profil termiczny).

2.1. Pytania i zagadnienia

- 2.1.1. Na podstawie wiadomości z I semestru (Reakcja PCR) proszę przypomnieć etapy reakcji PCR. Jak długo trwają poszczególne etapy?
- 2.1.2. Jakie składniki są niezbędne do reakcji PCR? Jakie stężenia tych składników na ogół się stosuje?

2.2. Ćwiczenia

- 2.2.1. Proszę ustalić warunki termiczne reakcji PCR, której celem jest amplifikacja fragmentu genu *KatG* przy pomocy specyficznych starterów o podanej sekwencji i temperaturze topnienia:

- KatG2-F: 5'GCG GGG TTA TCG CCG ATG3', T_m = 53.9°C
- KatG2-R: 5'GCC CTC GAC GGG GTA TTT C3', T_m = 54.2°C

L.p.	Etap	Temperatura	Czas
1			
Liczba cykli:			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.	Zakończenie	4°C	∞

- 2.2.2. Proszę zaprojektować reakcję PCR dla 12 szczepów *Mycobacterium tuberculosis*, przyjmując, że amplifikację przeprowadzimy w dwóch próbach z każdego szczepu.

- Ile łącznie prób należy przeanalizować?
- Jakie składniki należy uwzględnić dla każdej próby?
- W jakiej objętości przeprowadzimy reakcję?
- Jakie powinno być stężenie poszczególnych składników w próbce?
- Jak kolejno będziemy przygotowywać mieszaninę reakcyjną?

Na podstawie powyższych pytań i przy pomocy danych z wykładu o reakcji PCR oraz wskazówek prowadzącego proszę ustalić stężenie poszczególnych składników w pojedynczej próbce i wpisać je do tabeli.

Liczba prób =

L.p.	Składnik	Stężenie w próbie	Roztwór podstawowy	Ilość w próbie [μl]	Ilość dla prób [μl]
1.	H ₂ O				
2.	Bufor: 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM Tris-HCl	1x	20 x stężony		
3.	MgCl ₂	1.5 mM	25 mM		
4.	Wzmacniacz (betaine)	1 X	10 x stężony		
5.	Nukleotydy: dNTP (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)	200 μM	10 mM		
6.	Startery: Starter 1 (Forward) Starter 2 (Reverse)	1 μM 1 μM	20 μM 20 μM		
7.	Polimeraza DNA, Tfl lub Taq	1 U	1U/ μl		
8.	DNA	60 ng	20 ng/ μl		
Objętość próby:				20 μl	

Uwaga:

1. Roztwór podstawowy to roztwór jakim dysponujemy, np. mamy MgCl₂ o stężeniu 25 mM, bufor o stężeniu 20 x itd.
2. Należy określić ile każdego z tych roztworów podstawowych należy pobrać aby otrzymać 20 μl roztworu o stężeniu podanym dla próby, np. stężenie MgCl₂ w próbie ma być 1.5 mM, bufor o stężeniu 1 x itd.

5 pkt: prawidłowe wypełnienie tabeli w odniesieniu do ilości każdego składnika w próbie oraz ilości każdego składnika w całkowitej liczbie prób.

2.3. Problemy

- 2.3.1. Proszę porównać replikację *in vivo* z reakcją PCR? Jakie elementy są podobne a jakie różne?

ROZWIĄZANIE

Liczba prób = 24 + 1 (na straty) = 25

L.p.	Składnik	Stężenie w próbce	Roztwór podstawowy	Ilość w próbce [μl]	Ilość dla 25 prób [μl]
1	H ₂ O			9,4	235
2.	Bufor: 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM Tris-HCl	1x	20 x stężony	1	25
3.	MgCl ₂	1.5 mM	25 mM	1,2	30
4.	Wzmacniacz (betaine)	1 X	10 x stężony	2	50
5.	Nukleotydy: dNTP (dATP + dCTP + dGTP + dTTP)	200 μM	10 mM	0,4	10
6	Startery: Starter 1 (Forward) Starter 2 (Reverse)	1 μM 1 μM	20 μM 20 μM	1 1	25 25
7.	Polimeraza DNA, Tfl lub Taq	1 U	1U/ μl	1	25
8.	DNA	60 ng	20 ng/ μl	3	0*
Objętość próby:				20 μl	425

- DNA: w próbach mamy różne DNA, dlatego nie należy dodawać do mieszaniny reakcyjnej na 25 prób.
- Składniki dodajemy w takiej kolejności jak w tabeli, zaczynamy od wody, potem bufor itd. aż do punktu 7. Zastosowanie ma zasada, że zaczynamy od roztwory najmniej stężonego.
 - Woda i bufor zawsze na początku aby stworzyć środowisko dla pozostałych składników.
 - Polimeraza jest 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 na lodzie), co również uzasadnia jej dodanie na końcu.
- Po dodaniu polimerazy łączna objętość 425 μl (= 25 x 17 μl), rozdzielamy na 24 probówki po 17 μl (jeżeli zostanie nadmiar, bo liczyliśmy 25 μl, to nie rozdzielamy, zostawiamy, to była rezerwa aby nie zabrakło na próby).
- Do każdej probówki dodajemy 3 μl DNA każdorazowo biorąc inną próbę i zmieniając końcówkę pipety.
- Probówki zamykamy i wkładamy do termocyklera.