

Ćwiczenie 7/8

Reakcja PCR i jej wykorzystanie. Symulacja reakcji PCR. Projektowanie doświadczeń.

Prof. dr hab. Roman Zieliński

1. Reakcja PCR i jej wykorzystanie

1.1. Pytania i zagadnienia

- 1.1.1. Na czym polega reakcja PCR: reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)?
- 1.1.2. Jakie są niezbędne składniki reakcji PCR?

1.2. Ćwiczenia

1.2.1. Dana jest sekwencja: 5'AATGCGGCTACCTATGCAAAA3'

- Proszę narysować na schemacie replikację cząsteczki DNA o podanej sekwencji. Ile cząsteczek DNA uzyskamy w wyniku jednorazowej replikacji?
- Ile cząsteczek DNA uzyskamy jeżeli przeprowadzimy PCR cząsteczki DNA o powyższej sekwencji, przy czym reakcję będziemy prowadzili przez 35 cykli a w mieszaninie wyjściowej będzie tylko jedna cząsteczka DNA o podanej sekwencji?

1.2.2. Proszę podzielić się na 5 grup.

- Każda z grup opisuje jeden etap reakcji PCR, ale nie wymienia nazwy. Etap, który grupa opisuje zostanie uzgodniony z prowadzącym. W opisie można uwzględnić temperatury, czasy, odczynniki biorące udział oraz ogólną charakterystykę procesu.
- Następnie każda z grup przedstawia co dzieje się podczas danego etapu reakcji PCR. Zadaniem pozostałych osób jest odgadnięcie przedstawianego etapu.

1.3. Problemy

- 1.3.1. Czy reakcję PCR można nazwać replikacją *in vitro*? Uzasadnij odpowiedź.
- 1.3.2. Zastanów się, dlaczego reakcja PCR umożliwiła znaczący postęp w badaniach nad genomami, a przede wszystkim ich sekwencjonowaniem. Czy bez reakcji PCR byłoby możliwe sekwencjonowanie genomów na skalę jaką obserwuje się obecnie?

2. Symulacja reakcji PCR. Projektowanie starterów.

2.1. Pytania i zagadnienia

- 2.1.1. Jakie warunki muszą być spełnione przez dobry starter?
- 2.1.2. Ile starterów potrzeba aby zamplifikować gen o długości 1500 bp?
- 2.1.3. Ile par starterów należy zaprojektować aby gen o długości 1500 bp zamplifikować we fragmentach o długości kolejnych fragmentów, 250 bp, 400 bp, 850 bp. Podaj miejsca (numery), w których powinny być zaprojektowane startery?

2.2. Ćwiczenia

- 2.2.1. Poniżej podano sekwencję pewnego genu.

>rpgip1

```
60   ACTACGCTCTCATCCCAAACCCAAAATCATGATGGACTTCAAGCTCTTCTCCCTAACCCCT
120  TCTCTTCTCCACAATCCTTACCCCAGCTCTCTCCGAGCTCTGTAACCCTAAAGACAAAAA
180  GGTGCTCTTCGAAATCAAGACAGCCTTCAACAACCCCTACATTTTATCCTCATGGAAATC
240  CGACGCCGACTGCTGTACCGACTGGTACTGCGTCGAGTGTGATCCCACCACCCACCGCAT
300  CAACTCCCTCACCATCTTACCGACAACAACCTCACCGGCCAAATCCCCGCCCAAGTCGG
360  AACTTGGCGTACCTAGAAAACCTCGAGCTCCGCAAGCTCCCCATCTCACTGGTCCAAT
420  CCAGCCCTCCATCGCCAAGCTTAAACATCTCAAGATGCTCAGGCTCAGCTGGAACGGCCT
480  CTCAGGTTTCACTCCCTGACTTCATCAGCCAGCTCAAGAACCTCACATTCTCGAACTCAA
540  CTTCAACAAATTCAGTGGCTCCATCCCCAGCTCGCTTTCTCAGCTACCCAATTGGGAGC
600  CCTTCATCTAGATCGCAACCAGCTCACAGGTCAAATTCCTAGCTCATTTCGGAAAATTCGT
660  TGGCACCGTCCGGCTCTCTTCTCTCCACAACCAGCTCACAGGAAAATCCCAACCTC
720  ATTTGCTAACATGAATTCGACCAAATAGACTTGTACGCAACAAGCTCGAAGGCGACGC
780  GTCTGTAATATTCGGTTTGAACAAGACCACCCAGATTGTGGATCTGTGAGGAACATGCT
840  GGAATTTGATCTGTCCAAGTGGTGTTCGACCAGCTTGAAGACCGTGGACTTGAACCA
900  TAACAGCATCACGGGGAGTATTCGGGCACAGTTGACCCAATTGGATGATTTGGTGTGTT
960  CAATGTGAGCTACAACAGGTTGTGTGGTAAGATTCCGGTGGGTGGGAAGTTGCAGAGCTT
1020 GGACACCACGTCGTATTTCCATAACCGGTGCCTTTGCGGTGCTCCCCTCCCAAGTTGCAA
1080 GTAATGGACGCCGGAACGAATAGTAATAGTTTGGTATTGTAAAGGTGTTTCCTAAACAG
1140 CGTGGCTTGATTGCTTCAAGCAAATAAGCAAATACGTTTGACTTTCATAAACATTGGGTTT
1200 AATTAATGTAGGTCCAACAATCGACCACAAATTAGGCATTTTGTATGGATAAGCTATCAG
1252 AATAAAGAACTCACTATATGAATTGTTTGCTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Zaprojektuj do podanej sekwencji 20-nukleotydowe startery tak aby zamplifikować w miarę możliwości cały gen?

- A: Podaj sekwencje obu starterów od 5' do 3', przy czym jako starter nr 1 przyjmij ten, który dotyczy początku genu.
- B: Dla każdego ze starterów pokaż na schemacie, do którego fragmentu genu są komplementarne (środek genu można pominąć, wystarczy narysować końce).
- C: Czy oba zaprojektowane startery mają >50% G+C?

2.2.2. Ustal temperaturę przyłączania starterów dla reakcji PCR sekwencji rPGIP1 z wykorzystaniem zaprojektowanych starterów.

- A: Oblicz temperaturę topnienia dla wyznaczonych starterów na podstawie następującego wzoru:

$$T_m = 59.92 + 41 \frac{\sum(G+C)}{\text{długość startera}} - 600 / \text{długość startera}$$

- B: Jaka jest różnica temperatur topnienia dla wyznaczonych starterów?
- C: Czy możliwe jest ustawienie temperatury przyłączenia wyznaczonych starterów tak aby była ona zbliżona do temperatury topnienia obu starterów (+/- 5°C)? Uzasadnij odpowiedź.
- D: Wyznacz drugi ze starterów (starter nr 2) tak aby jego sekwencja zawierała >50% G+C. Najlepiej aby starter nr 2 zawierał tyle samo G+C jak starter nr 1..
- E: Jaka jest temperatura topnienia nowo wyznaczonego startera?
- F: Jaka będzie temperatura przyłączania starterów w reakcji PCR dla startera nr 1 i nowo wyznaczonego startera? Wynik zaokrąglij do jedności.

Samodzielne wykonanie 2.2.2: 4 punkty

3. Projektowanie doświadczeń z wykorzystaniem reakcji PCR

3.1. Pytania i zagadnienia

3.1.1. Jakie warunki muszą być spełnione aby możliwe było wykorzystanie reakcji PCR w:

- diagnostyce medycznej,
- epidemiologii,
- badaniach różnicowania populacji różnych gatunków, w tym populacji ludzkich.

3.1.2. Podaj przykłady wykorzystania reakcji PCR.

3.2. Ćwiczenia

3.2.1. Jaki typ reakcji PCR zastosujemy w następujących przypadkach (PCR specyficzny dla sekwencji unikalnych lub markery PCR skanujące genom)?

- A: podejrzenie choroby genetycznej uwarunkowanej jednogеноwo, przy czym sekwencja genu jest znana.
- B: analiza dróg rozprzestrzeniania się prątka gruźlicy.
- C: ocena oporności szczepów prątka gruźlicy na ryfampicynę i izoniazyd.
- D: ocena różnicowania szczepów *Borrelia burgdorferi*.

3.2.2. Zaprojektuj reakcję PCR, której celem jest analiza genu *KatG* prątka gruźlicy przy pomocy starterów:

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	∞

- Wyznacz czas i temperaturę poszczególnych etapów reakcji.
- Należy przeanalizować 30 szczepów. Ile probówek trzeba przygotować?