

Ćwiczenie C06

Replikacja *in vivo* i *in vitro*

Replikacja DNA *in vivo*

Technika PCR

Odmiany techniki PCR

Kornelia Polok

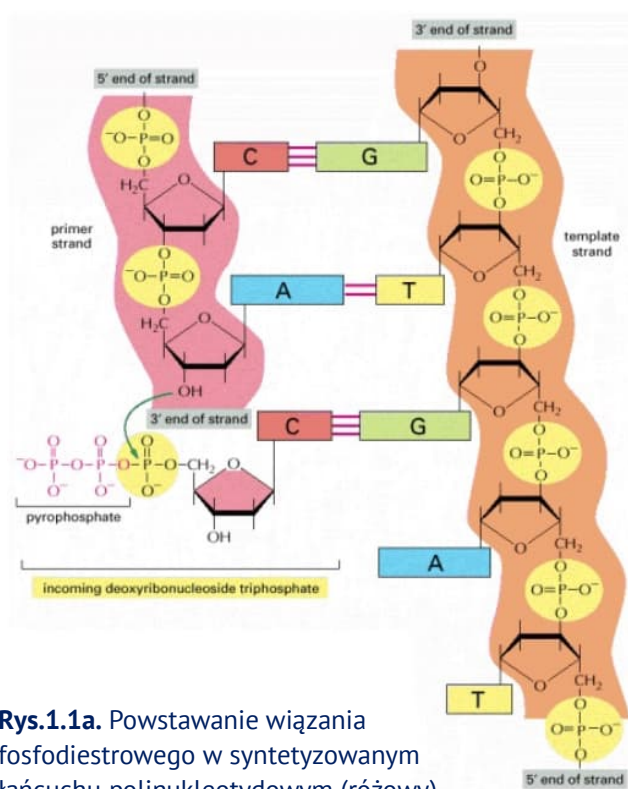
1. Replikacja DNA

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 obu kierunkach, synteza nowej nici zachodzi w kierunku 5' do 3' na nici o orientacji przeciwej.

1.1. Chemizm replikacji DNA

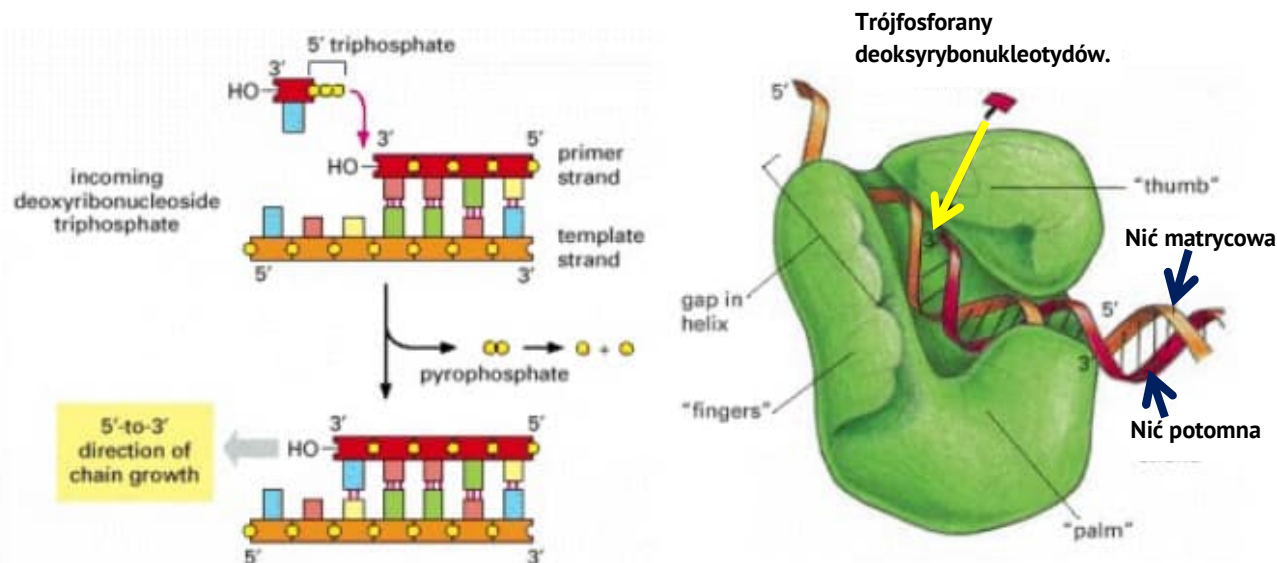


Przyłączenie deoksyrybonukleotydu do końca 3' łańcucha polinukleotydowego i utworzenie wiązania fosfodiesterowego jest podstawową reakcją umożliwiającą syntezę DNA. **Wiązanie fosfodiesterowe** powstaje w wyniku połączenia dwóch grup hydroksylowych przez grupę fosforanową (Rys. 1.1a). W kwasach nukleinowych wiązanie to powstaje przez połączenie grupy hydroksylowej w pozycji 3' pentozy z grupą hydroksylową grupy fosforanowej w pozycji 5' pentozy. Energia do powstania wiązania fosfodiesterowego jest dostarczana przez rozbite dwu- i trójfosforanów nukleotydów.



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

Synteza DNA jest katalizowana przez polimerazę DNA zależną od DNA (Rys. 1.1b). Polimeraza dodaje nukleotydy do syntetyzowanej nici, przy czym przed wstawieniem, nukleotydy musi wytworzyć wiązanie wodorowe z nukleotydem na nici matrycowej. Tylko wówczas polimeraza rozpozna nukleotydy i katalizuje tworzenie wiązania fosfodiesterowego.



Rys.1.1b. Synteza DNA katalizowana przez polimerazę DNA.

Dokładność kopiowania DNA jest związana z korektorskimi właściwościami polimerazy DNA. Błędy w DNA występują z częstością 10^{-9} , 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.

Etapy korekty prawidłowości wstawienia nukleotydów (Rys. 1.1c):

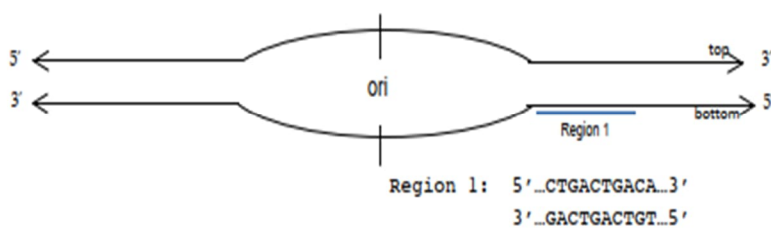
- przed inkorporacją nukleotydu, konformacja przestrzenna prawidłowo utworzonego wiązania wodorowego różni się nieznacznie od konformacji nieprawidłowo sparowanych zasad; to powoduje, że polimeraza ma większe powinowactwo do prawidłowo sparowanych zasad;
- po wstawieniu nieprawidłowego nukleotydu i utworzeniu wiązania kowalencyjnego, korekta następuje dzięki egzonukleolitycznym właściwości korektorskim 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} .
- Polimerazy DNA nie mają zdolności samodzielnego rozpoczynania 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 (hybrydyzować) z nicią DNA przez tworzenie wiązań wodorowych między rybonukleotydami i deoksyrybonukleotydami. Powstała cząsteczka to hybryda DNA/RNA.

1.2. Zadania



1.2.1. Na rysunku 1.2.1 przedstawiono miejsce rozpoczęcia replikacji. Podano także sekwencję regionu 1 na obu niciach.

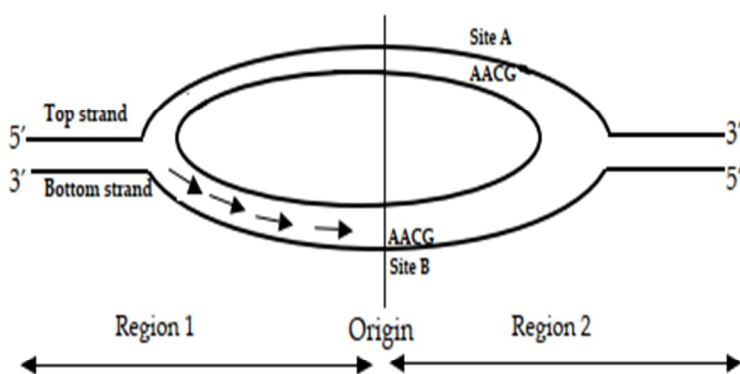
- A. Która z nici będzie matrycą do syntezy nici wiodącej, górna czy dolna? (1 punkt)
- B. Proszę podać sekwencję nici opóźnionej od końca 5', dla której matrycą będzie region 1. (1 punkt)



Rys.1.2.1. Widelki replikacyjne.

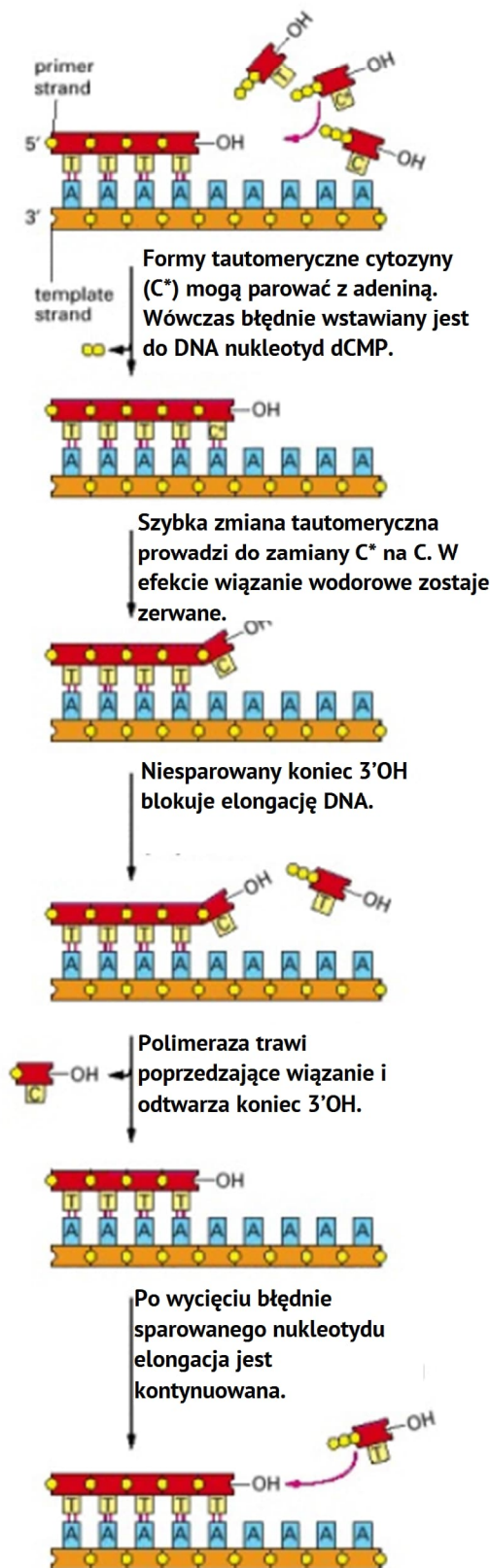
1.2.2. Na rysunku pokazano schemat replikacji bakteryjnego DNA kolistego.

- A. Która z nici, dolna czy górna jest matrycą do syntezy nici wiodącej w regionie 2. (1 punkt)
- B. Z którym miejscem, A, B łączy się starter 5'UUGC3'? (1 punkt)
- C. Która nić w regionie 2 nie będzie powielona, jeżeli przed rozpoczęciem replikacji nie będzie obecna polimeraza RNA? (1 punkt)



Rys.1.2.2. Replikacja bakteryjnego DNA.

1.2.3. Szybkość replikacji wynosi 800 par zasad na sekundę. Ile będzie trwała replikacja genomu składającego się z 1.5 mln par zasad? Proszę podać czas w minutach.



Rys.1.1c. Właściwości korekcyjne polimerazy DNA.

2. Reakcja PCR

2.1. Przebieg reakcji PCR

➔ 2.1.1. Podstawy teoretyczne

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

Reakcja PCR składa się z szeregu pojedynczych reakcji zwanych **cyklami**. W każdym cyklu ilość cząsteczek DNA się podwaja. Reakcja PCR służy do namnożenia DNA, który później można poddać analizie, np. sekwencjonowaniu. 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. Reakcja PCR z zastosowaniem uniwersalnych starterów nie wymaga znajomości sekwencji docelowych.

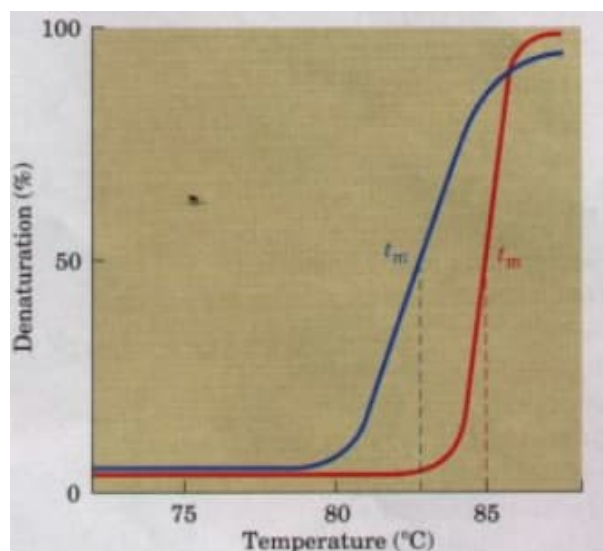
Reakcja PCR wykorzystuje właściwości fizykochemiczne DNA, które zależą od temperatury.

Struktura helikalna DNA ulega destabilizacji wraz ze wzrostem temperatury. Powyżej pewnej temperatury krytycznej, zwanej **temperaturą topnienia**, nici DNA ulegają całkowitej separacji i występują jako fragmenty jednoniciowe. Jest to wynikiem zerwania wiązań wodorowych. Poniżej temperatury 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 umożliwi 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. 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.

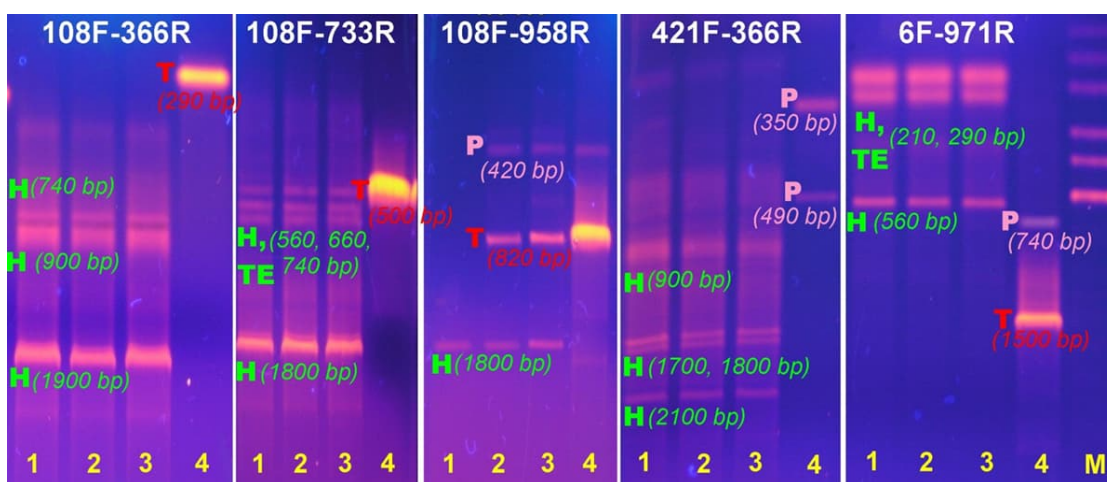
Temperatura topnienia: temperatura, w której 50% nici DNA występuje w postaci zdenaturowanej (pojedyncze nici) i 50% w postaci podwójnej helisy.



Rys. 2.1.1a. Zależność denaturacji DNA wirusowego (niebieska linia) i bakteryjnego (czerwona) od temperatury. W temperaturze bliskiej 100°C prawie cały DNA jest zdenaturowany.

Reakcja PCR jest bardzo czuła. Pozwala ona na namnożenie nawet pojedynczej cząsteczki DNA. Cecha ta jest szczególnie przydatna, gdy dysponujemy małą ilością materiału genetycznego, np. DNA 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 danej sekwencji nie rozwiązują problemu, gdyż sekwencje homologiczne występują u różnych organizmów (Rys. 2.1.1b). 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.

Warunkiem prawidłowego przebiegu reakcji PCR jest czysty materiał biologiczny.

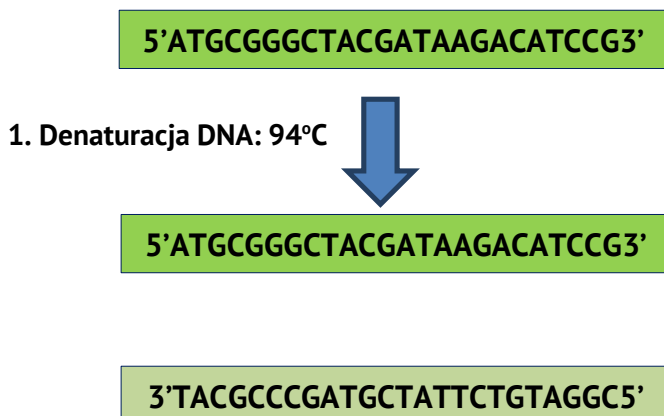


Rys. 2.1.1b. Przykład wpływu obecności różnego materiału genetycznego na amplifikację. Obecność sekwencji homologicznych do transgeny u roślin GMO powoduje amplifikację homologów zamiast lub obok transgeny pomimo zastosowania specyficznych starterów.

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

2.1.2. Etapy reakcji PCR

- **Denaturacja, 94-95°C:** jest to przekształcenie dwuniciowej cząsteczki DNA w jednoniciową. Ma ona na celu rozdzielenie nici DNA tak, aby umożliwić przyłączenie się



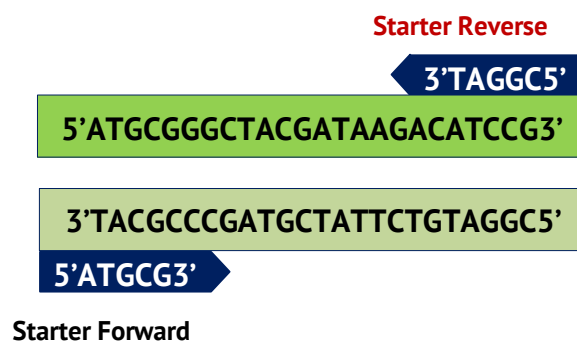
Rys. 2.1.2a. Denaturacja fragmentu DNA o sekwencji, ATGCGGGCTACGATAAGACATCCG. Sekwencję zawsze zapisujemy od 5' do 3'. Ponieważ jest to DNA, musimy dopisać nić komplementarną o odwrotnej polarności, czyli od 3' do 5'. W ten sposób uzyskamy odcinek DNA, który będzie powielany w reakcji PCR.

starterów oraz polimerazy DNA. W warunkach naturalnych nici DNA są rozdzielane za pomocą helikaz i topoizomeraz, a stabilizują je białka SSB. W reakcji PCR rozdzielanie nici odbywa się przez inkubację w wysokiej temperaturze, tj. 94-95°C. W tej temperaturze DNA występuje w postaci pojedynczych nici.

- Annealing (przyłączanie starterów), 36-70°C:** jest to proces przyłączania starterów do matrycy DNA. 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*.

Startery: krótkie odcinki DNA wykorzystywane w reakcji PCR w celu rozpoczęcia reakcji namnażania DNA *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.

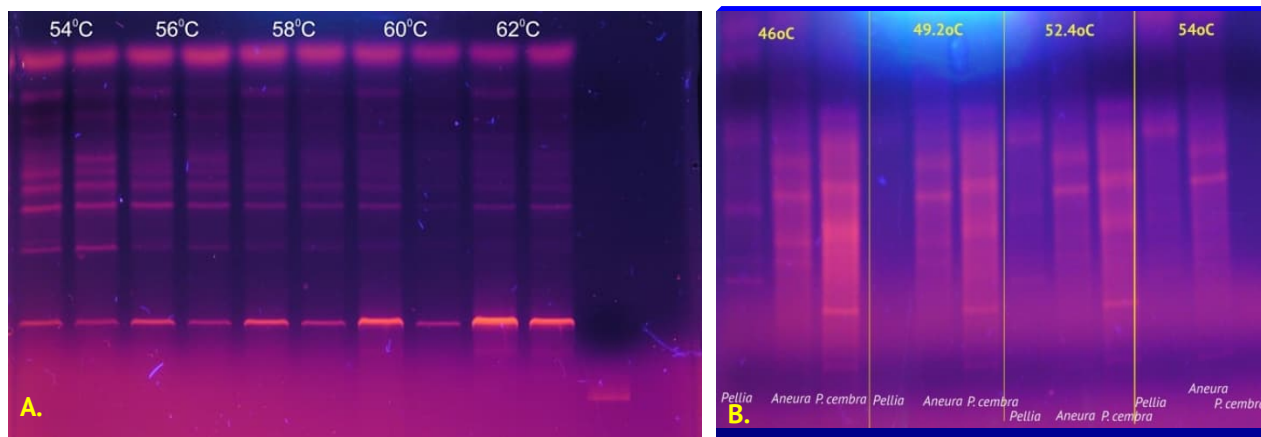
Annealing, czyli przyłączanie starterów: 36-70°C



Rys. 2.1.2b. 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 utalić nić sensowną i nić antysensowną. Jeżeli produkt genu nie jest znany, to nić sensowna nie jest znana. Może zdarzyć się, że nicią sensowną (kodującą) 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 zwijania 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.**

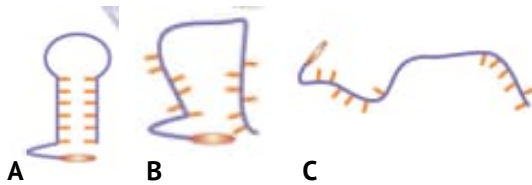
- Powyżej temperatury topnienia starter się nie przyłączy i będzie występował w postaci jednoniciowego fragmentu. Uniemożliwi to przeprowadzenie reakcji PCR nawet w sytuacji, gdy odpowiednia matryca znajdzie się w mieszaninie reakcyjnej.
 - Poniżej temperatury topnienia, ze względu na szybką renaturację 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 reakcji PCR.
- Różna specyfika reakcji PCR w zależności od temperatury annealingu 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 annealingu umożliwi połączenie z fragmentami komplementarnymi np. w 70%. Dzięki temu możliwe jest zamplifikowanie genu homologicznego u gatunku A. Wykorzystywane jest to w analizach filogenetycznych.



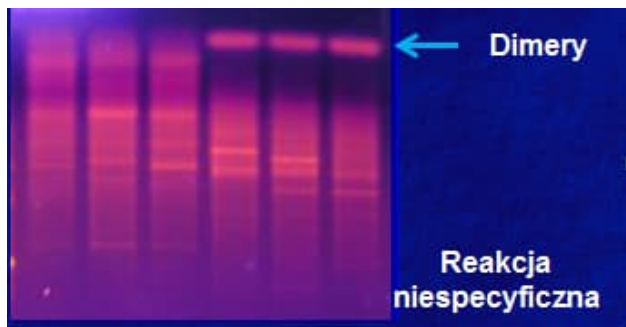
Rys. 2.1.2c. A. Wpływ temperatury annealingu na amplifikację genu *KatG* u sosny. W amplifikacji wykorzystano startery komplementarne do *KatG* pochodzącego z *M. tuberculosis*. B. Wpływ temperatury na amplifikację genu NAD u różnych gatunków.

- 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.

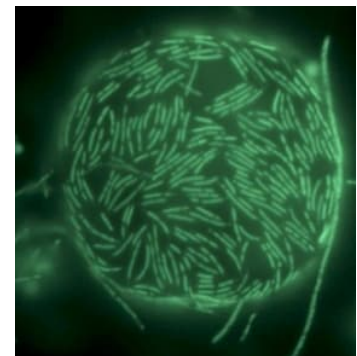
- ▶ Na proces annealingu wpływa także struktura starterów. Startery z większą liczbą zasad GC tworzą stabilniejsze wiązania. Dlatego dobrze zaprojektowane startery powinny mieć co najmniej 50% zasad GC. Ponadto startery nie powinny tworzyć struktur drugorzędowych, a także nie powinny tworzyć dimerów zarówno w obrębie danego startera (homodimery) oraz pomiędzy różnymi starterami (heterodimery).



Rys. 2.1.2d. 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.



- **Elongacja: czyli wydłużanie łańcucha DNA, za pomocą polimerazy DNA, 72°C.** 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. Dlatego stosuje się polimerazy, które tolerują temperaturę 94°C. Są to tzw. polimerazy termostabilne, które pochodzą z bakterii



Rys. 2.1.2d. Kolonia *Thermus aquaticus*.

3. Elongacja, czyli wydłużanie łańcucha 72°C




Rys. 2.1.2e. Polimeraza DNA dołącza nukleotydy do starterów i wydłuża łańcuch DNA.

żyjących w ciepłych źródłach. Najczęściej stosuje się polimerazę z *Thermus aquaticus* i *Thermus flavus*. Oba mikroorganizmy należą do Archaea, klasy Deinococci. Bakterie 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

polimerazy DNA z tych bakterii 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*.

2.2. Projektowanie reakcji PCR

2.2.1. Ustalanie temperatury przyłączania starterów

- 
- Startery przyłączają się do sekwencji komplementarnych. Odległość między starterami nie może być zbyt duża. Typowe polimerazy bez problemu amplifikują sekwencje do 4 000 par zasad. Polimerazy specjalnie przygotowane mogą amplifikować odcinki do 10 000 par zasad. Warunki reakcji należy tak dobrać aby startery przyłączyły się jedynie do sekwencji komplementarnych.
 - Temperatura przyłączania starterów decyduje o specyficy reakcji. Powinna ona być jak najbliższa temperaturze topnienia starterów. Temperatura topnienia jest taką temperaturą, w której połowa starterów w mieszaninie jest zdenaturowana.
 - W reakcji 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.

2.2.2. Poniżej podana jest para starterów komplementarna do odcinka genu *KatG* u *M. tuberculosis*.



- ▶ **KatG3-F:** 5'AAC GGC TGT CCC GTC GTG3' (starter Forward)
- ▶ **KatG-R:** 5'GTC GTG GAT GCG GTA GGT G3' (starter Reverse)

- Na podstawie wzoru podanego na wykładzie proszę obliczyć temperaturę topnienia obu starterów. Dla $\log Na^+$ proszę przyjąć wartość $\log 0,05 = -1,3$
- Czy startery te umożliwiają ustalenie temperatury annealingu? Jeżeli tak, to proszę podać wartości temperatur, które należy przetestować.
- Zakładając, że każdy etap będzie trwał 1 minutę, proszę podać temperatury i czas poszczególnych etapów reakcji PCR z wykorzystaniem starterów KatG3.
- Proszę podać całkowity czas trwania reakcji PCR dla KatG3, jeżeli wykonamy 30 cykli, wstępna denaturacja będzie trwała 3 minuty, a końcowa elongacja 7 minut.

3. Odmiany reakcji 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 próbce, powstaną dimery lub reakcja będzie niespecyficzna. Wystarczyłoby 25 cykli w przypadku genomu wirusowego. Natomiast w celu namnożenia 1000 par zasad z genomu sosny (20 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 reakcja 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.

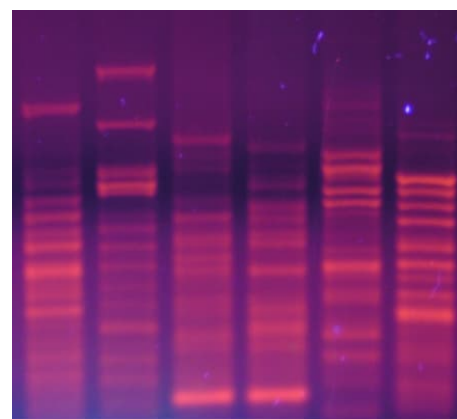
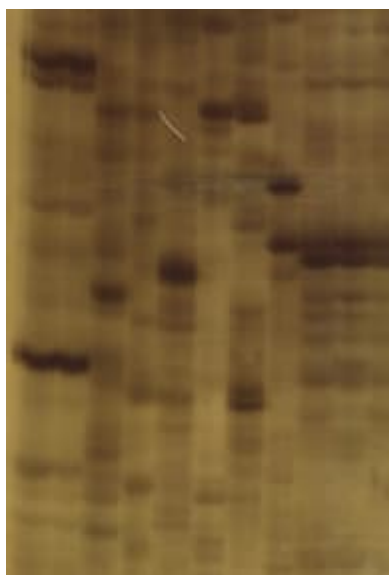
Alternatywnie możliwy jest odczyt jako „piki” w sekwenserach. Jest to

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.

3.2. RT-PCR

Reakcja 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:

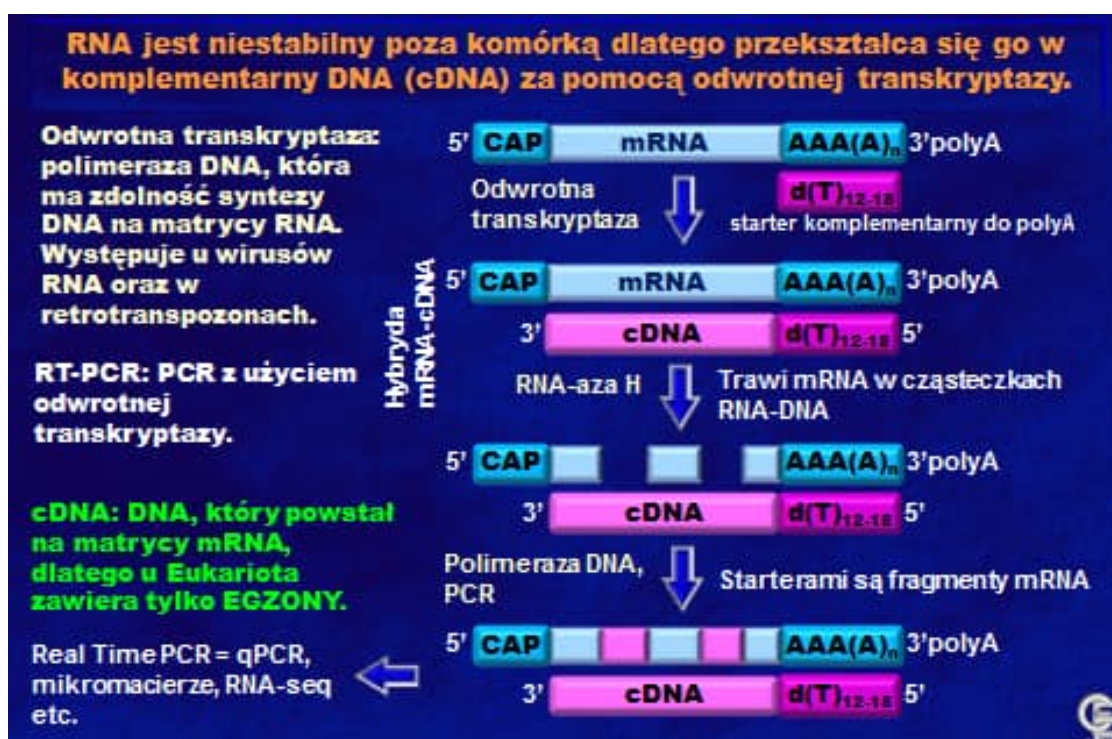
- RNA jest niestabilne i podczas zmian temperatury się rozpadnie;
- Polimerazy RNA syntetyzują RNA na matrycy DNA, a więc nie mają możliwości syntezy RNA na matrycy RNA.



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

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 (reverse transcription – RT).** W wyniku odwrotnej transkrypcji otrzymujemy DNA, który nosi nazwę cDNA (complementary DNA) ze względu na komplementarność jednej z nici do RNA.

Jeżeli w reakcji PCR wykorzystujemy cDNA zamiast DNA to taką reakcję oznaczamy jako 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.

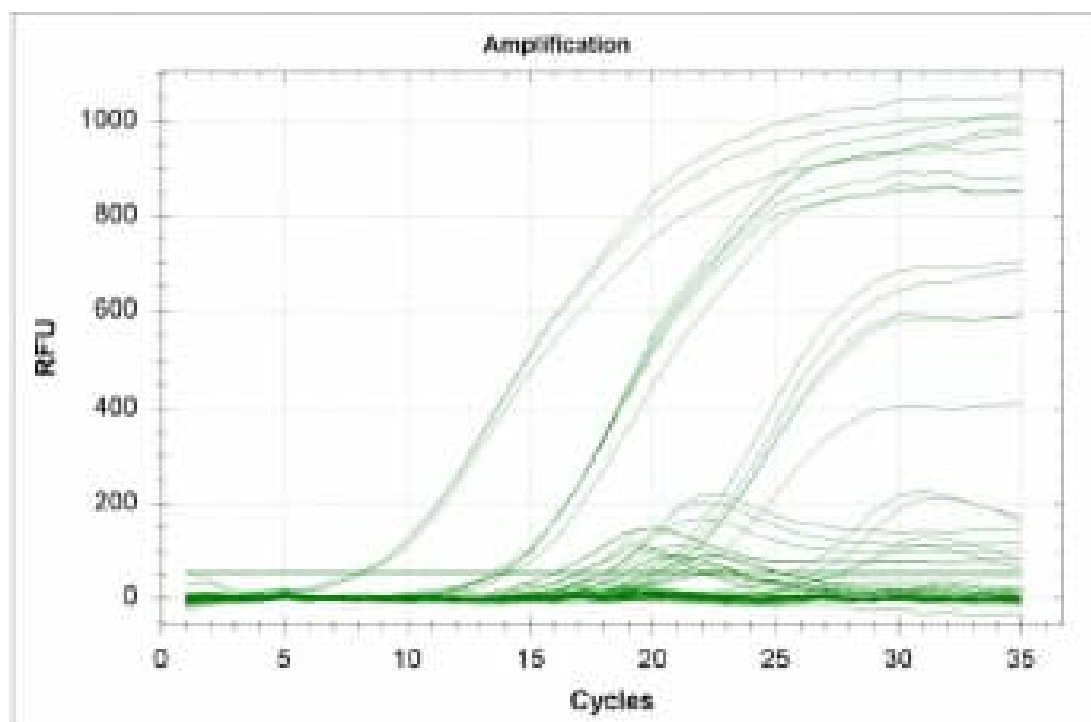


Rys. 3.2. Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji.

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 do startera lub produktu **sondy fluorescencyjnej**. Jest 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 jako PCR ilościowy (quantitative – qPCR). 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.

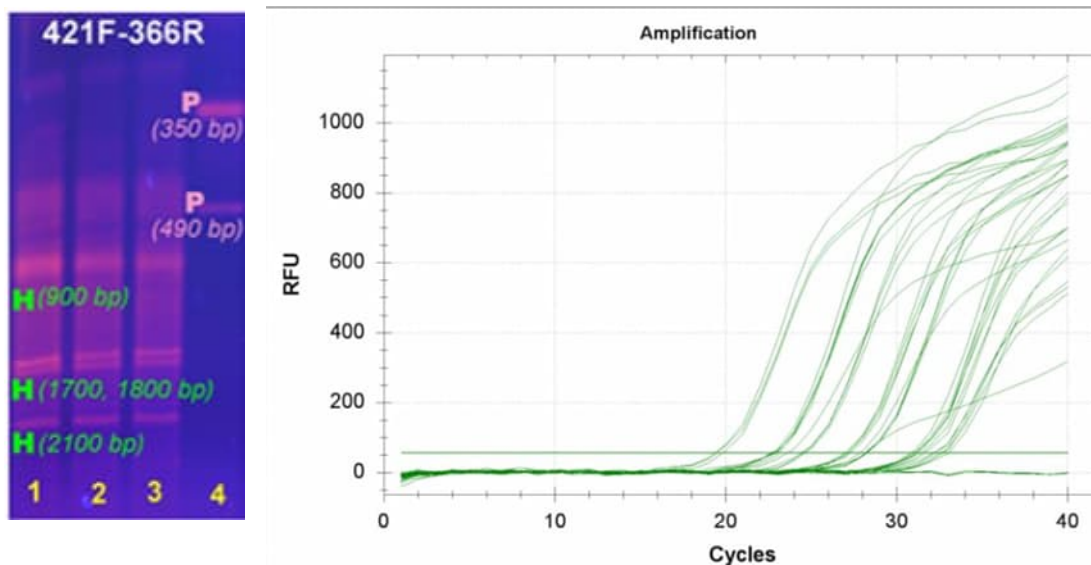


Rys. 3.3a. Wynik reakcji qPCR dla rDNA *Pinus*. Wykresy na różnej wysokości ukazują różną ilość produktu w próbach. Koreluje to z różną liczbą powtórzeń rDNA w poszczególnych próbach. W podanym przykładzie różnice były skorelowane z różną zawartością rDNA u różnych gatunków.

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 PCR (np. 200 pz) 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* w *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.

3.4. Wykorzystanie reakcji PCR



Na podstawie danych literaturowych proszę opisać po jednym przykładzie zastosowania reakcji PCR:

- w badaniach naukowych;
- w diagnostyce

Samodzielne wykonanie: 5 punktów

Termin: 15:12:2023. 23:59