



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”.

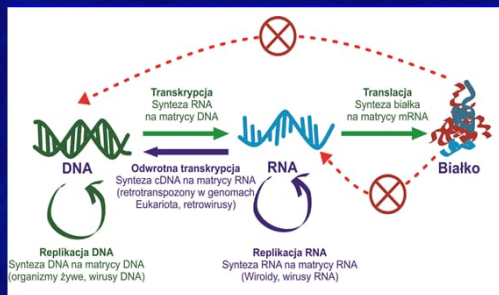
Wersja Watsona jest uproszczeniem i stanowi tylko jedną z możliwości przepływu informacji.

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



2. Replikacja DNA in vivo

1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. **Replikacja DNA in vivo**
 - Zasady replikacji DNA
 - Etapy replikacji DNA
3. Reakcja PCR
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR
4. Sekwencjonowanie DNA
 - Metoda Maxama-Gilberta
 - Metoda Sangera
 - Metody NGS
5. Wybrane techniki biologii molekularnej



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.



Plemniki i sporofity u *Peltia*.

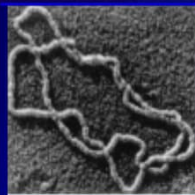
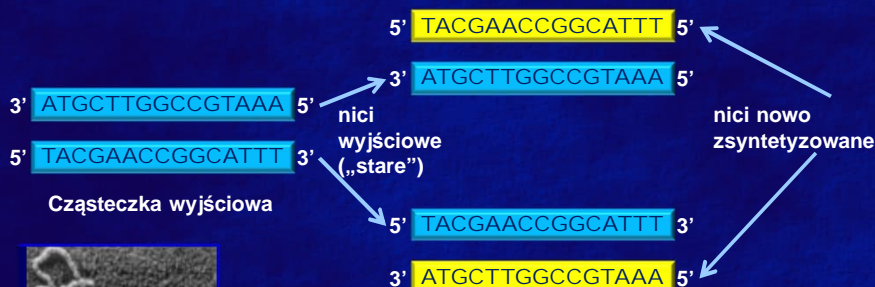
Replikacja zachodzi w komórkach somatycznych. Poprzedza mitozę i jest podstawą rozwoju i wzrostu organizmów.

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.



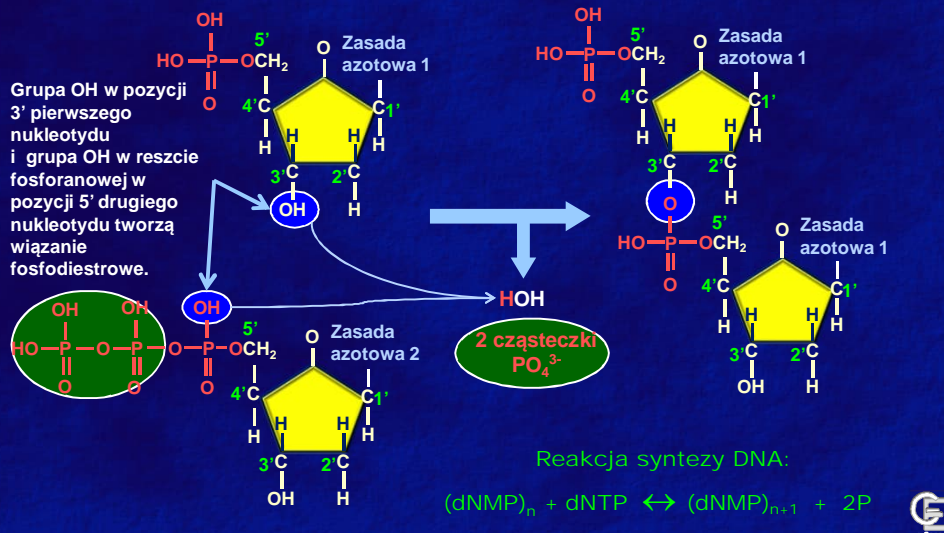
Replikujący plazmid *Salmonella typhimurium*

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



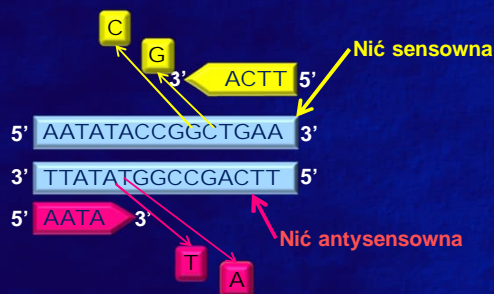
2. Replikacja DNA: kierunek

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



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 „górna 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'.

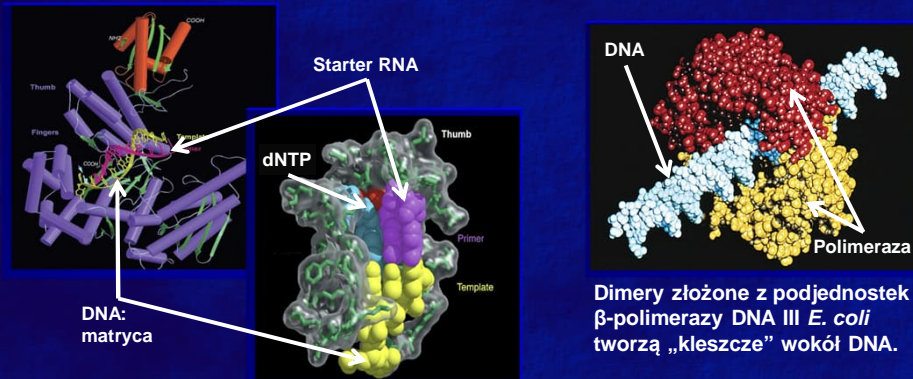
```

ORIGIN
1  ctccggagac  cctccggaga  gacagcaatga  gtagctgaat  gtcggggcgc  gtagcggatc
61  tgcctcgtct  cgtatcgtttg  atcgagacac  tctcggggcg  acacotagct  gtagcaagct
121  tccggaccgc  tccagagccc  tccagtttgt  gacacagggg  agggcaagtc  cgtcgttgag
181  ggcaccaggg  tgcacagagg  ccgggcaagc  agggggagc  gttccggaga  tggctgtctg
241  tttcaaggag  gttctcaaca  aggagcttgt  acagggagat  ggtcaaaaga  gaccagcttg
301  cgtcaagccc  ttttgggaaa  aatgctaggg  ttgggtggca  agtctactagg  tccac
    
```

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').

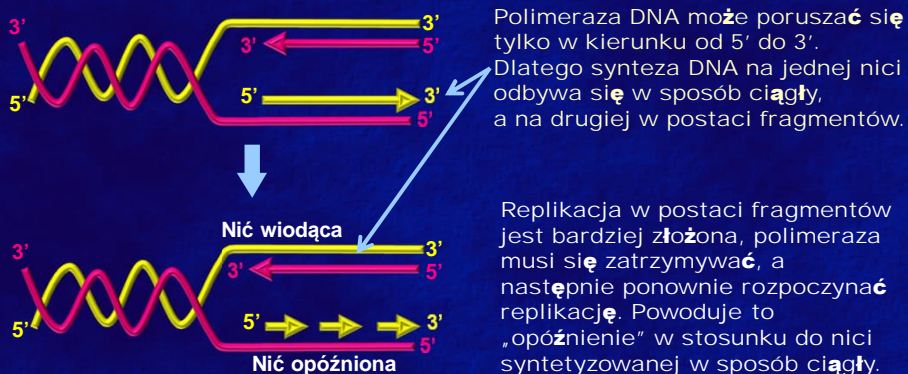


Polimerazy DNA nie mają zdolności katalizowania reakcji przyłączania nukleotydów do końca 5'. Ma to konsekwencje w sposobie replikacji obu nici DNA.



2. Replikacja DNA: fragmenty Okazaki

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

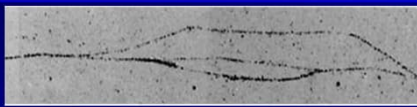
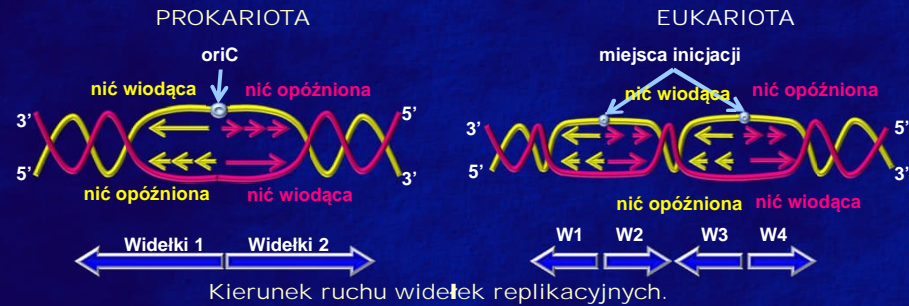


Niść wiodąca DNA to niść replikowana w sposób ciągły. Niść opóźniona to niść replikowana w postaci fragmentów.

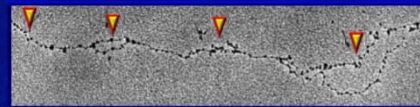


2. Replikacja DNA: widełki replikacyjne

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



Widelki replikacyjne u *Escherichia coli*.



Widelki replikacyjne u drożdży.

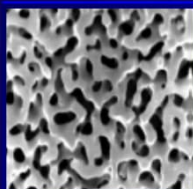
Replikacja kończy się, gdy widełki poruszające się w przeciwnych kierunkach spotykają się.



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 przyczepione.



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.

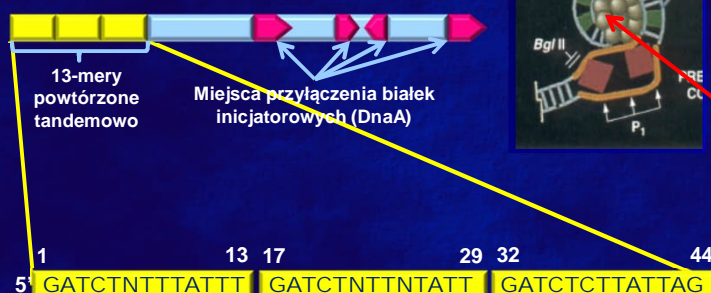
Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem stałego podłoża może być prowadzona w którymkolwiek kierunku (5'→3' lub 3'→5') ze względu na odpowiednią modyfikację nukleotydów. Najczęściej prowadzi się ją w kierunku 3'→5'.



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, 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).



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

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.



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, 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	?

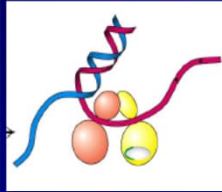
Widelki replikacyjne Prokariota poruszają się szybciej. Czas replikacji całego genomu jest krótszy u Eukariota ze względu na wiele widłek replikacyjnych.



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, inicjacja

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

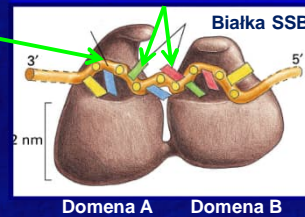
- Helikazy: rozdzielają nici DNA poprzez hydrolizę wiązań wodorowych przy pomocy ATP.
- Białka SSB: stabilizują jednoniciowe fragmenty DNA.
- Topoizomerazy (np. gyraza) usuwają superskręty z DNA i umożliwiają działanie polimerazy. DNA musi wykonać pełen obrót (360°) co 10 nukleotydów.



Przyłączenie podjednostek helikazy do DNA i zerwanie wiązań wodorowych.

Zasady azotowe

Szkielet cukrowo-fosforanowy



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

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



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, inicjacja

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



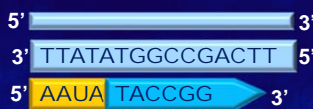
↓ Prymaza (polimeraza RNA)



5' AAUA 3'OH ← Wolna grupa OH na końcu 3'

Starter RNA

↓ Polimeraza DNA



Starter RNA DNA

Rolę starterów w procesie replikacji *in vivo* pełnią krótkie fragmenty RNA o długości 10-60 nukleotydów.



Struktura krystaliczna prymazy człowieka



Usunięcie starterów RNA i dosyntetyzowanie powstałych luk przez polimerazę DNA, a następnie połączenie przy pomocy ligazy.



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, 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.



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, 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 fragmentów 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.



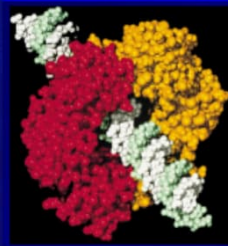
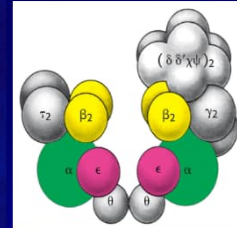
3. Etapy replikacji DNA *in vivo*: elongacja

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 egzozonukleazy 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.



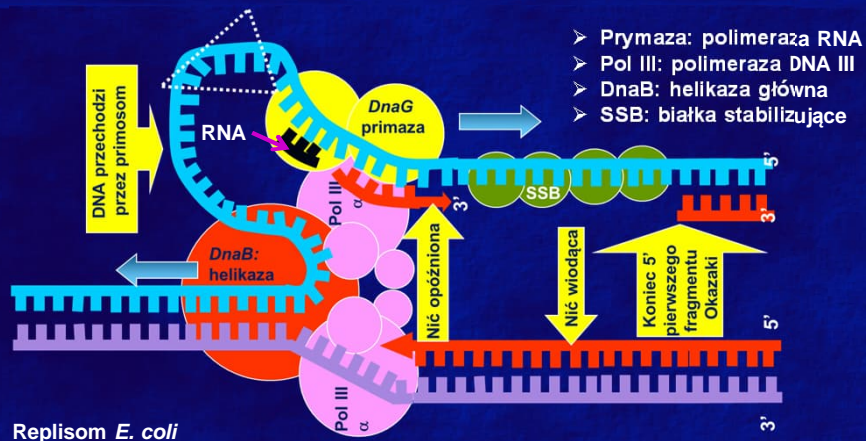
„Ślizgający się zacisk” – otacza nić DNA i umożliwia przemieszczanie się holoenzymu polimerazy III.

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



2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, elongacja

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



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

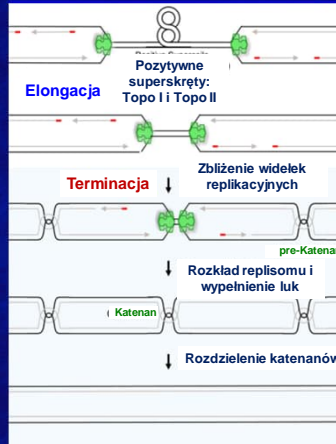


2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, terminacja

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 oddysocjuje od DNA.
- Wypełnianie 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 topolizomerazy. Dysocjacja replisomu zapobiega kolejnej rundzie replikacji.

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

Dewar i Walter 2017

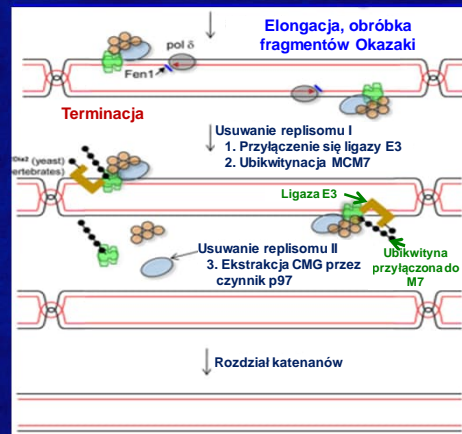


2. Replikacja DNA *in vivo*: etapy, terminacja

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

Elementy terminacji replikacji u Eukariota

- Dysocjacja kompleksu CMG helikazy, która składa się z białka Cdc45, kompleksu GINS 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 rozdzielenia katenanów jest obecność kondensyn i wrzeciona podziałowego.



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

Dewar i Walter 2017



2. Replikacja DNA *in vivo*

1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. Replikacja DNA *in vivo*
 - Zasady replikacji DNA
 - Etapy replikacji DNA
3. **Reakcja PCR**
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR
4. Sekwencjonowanie DNA
 - Metoda Maxama-Gilberta
 - Metoda Sangera
 - Metody NGS
5. Wybrane techniki biologii molekularnej



3. 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 temperatury zgodne z zadanym schematem.



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



Współczesny model z gradientem temperaturowym i grzejącą pokrywą.

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

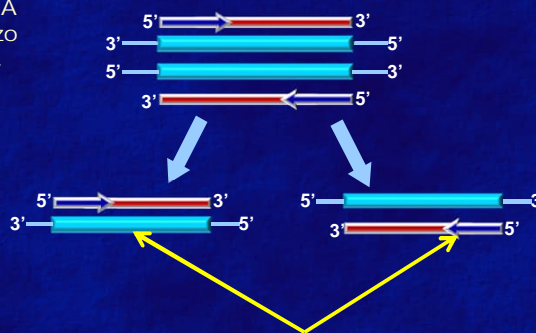


3. Reakcja PCR: liczba kopii

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).



3. 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.



3. Reakcja PCR: czas i temperatura

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

- Wstępna denaturacja: wstępne rozplecenie 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.



3. 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 50 mM Tris-HCl, dostarczany z polimerazą jako roztwór 10x lub 20x stężony.
- MgCl_2 : 1,5-2,0 mM, kofaktor polimerazy, podnosi specyfikę reakcji.

Objętość

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



3. 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.



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

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

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

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

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



3. 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'
- Starter 2: 5'CGATTCCG3'



3. 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.

3. Reakcja PCR: typy

Modyfikacje reakcji PCR zależą od wykorzystanej matrycy, starterów oraz sposobu wizualizacji produktów reakcji.

Reakcja PCR

- Standardowa: matrycą jest DNA.
 - Sekwencja amplifikowana jest znana: PCR sekwencji unikalnych.
 - Sekwencja amplifikowana NIE jest znana: markery skanujące genom.
- Ilościowa (qPCR, Real time): matrycą jest DNA. Odczyt w czasie rzeczywistym, mierzy się ilość produktu PCR na podstawie fluorescencji barwników dołączonych do sondy/starterów.
- RT-PCR: matrycą jest RNA: odwrotna transkryptaza przekształca RNA w cDNA, który jest amplifikowany według standardowej procedury.

2. Replikacja DNA in vivo

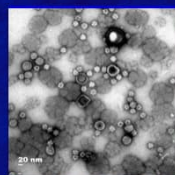
1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. Replikacja DNA *in vivo*
 - Zasady replikacji DNA
 - Etapy replikacji DNA
3. Reakcja PCR
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR
4. **Sekwencjonowanie DNA**
 - Metoda Maxama-Gilberta
 - Metoda Sangera
 - Metody NGS
5. Wybrane techniki biologii molekularnej



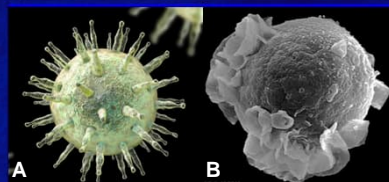
4. Sekwencjonowanie DNA: Maxam-Gilbert

Sekwencjonowanie DNA: ustalenie kolejności nukleotydów w cząsteczce DNA.

- 1970: pierwsze sekwencje DNA otrzymano przy pomocy chromatografii.
- 1975: zastąpienie chromatografii elektroforezą w żelu poliakrylamidowym.
- 1977: A. Maxam i W. Gilbert opublikowali metodę sekwencjonowania przez chemiczną degradację.
- 1977: A. Coulson i F. Sanger: metoda terminacji łańcucha.
- 1977: zsekwencjonowano bakteriofaga ϕ X174, 5,5 kb.
- 1984: zsekwencjonowano wirusa Epstein-Barra, 170 kb.



Kolonia bakteriofaga ϕ X174, pierwszej zsekwencjonowanej cząstki DNA.



A. Wirus Epsteina-Barra. B. limfocyty B uwalniające wirusa. Jeden z najpowszechniejszych wirusów u ludzi. Zakażenie jest na ogół bezobjawowe.

Sekwencjonowanie umożliwia poznanie struktury i funkcji genów, struktury genomów oraz ewolucję organizmów żywych.



4. Sekwencjonowanie DNA: Maxam-Gilbert

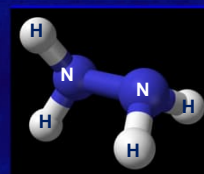
Metoda chemicznej degradacji Maxama-Gilberta: swoiste cięcie DNA w miejscu występowania specyficznego zmodyfikowanego nukleotydu.

Reakcje chemiczne w metodzie Maxama-Gilberta

- Modyfikacja zasady azotowej:
 - dGMP – metylacja przez siarczan dwumetylu;
 - dGMP + dAMP – depurynacja przez kwas mrówkowy;
 - dCMP + dTMP – hydroliza przez hydrazynę
 - dCMP – hydroliza przez hydrazynę w 1,5 M NaCl.
- Piperydyna degraduje wiązanie fosfodiesterowe i glikozydowe w nukleotydzie ze zmodyfikowaną zasadą.



Piperydyna: związek organiczny, cykliczna amina drugorzędowa.



Hydrazyna: związek nieorganiczny zbudowany z 2 grup aminowych, substancja silnie trująca.

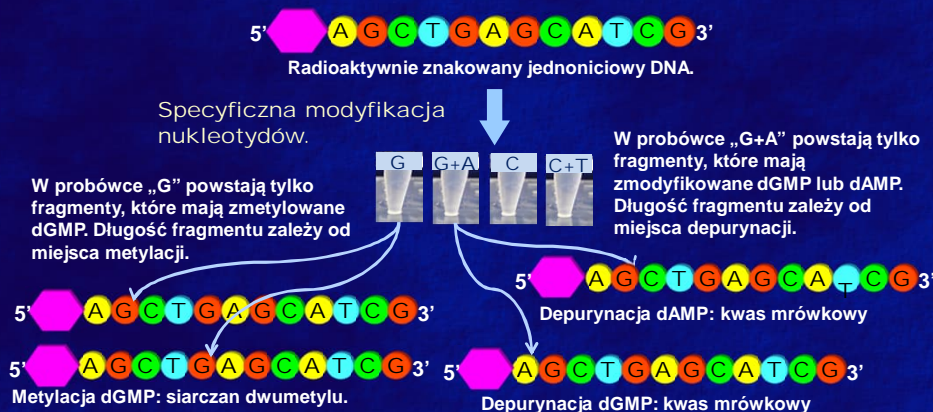
Metoda Maxama-Gilberta nie wymagała poprzedniego namnożenia DNA (klonowania). Dopiero wprowadzenie PCR ograniczyło wykorzystanie tej metody do analizy miejsc wiązania DNA z białkami.

DNA przeznaczony do sekwencjonowania jest znakowany radioaktywnie na końcu 5' za pomocą P^{32} . Pozwala to wykryć produkty reakcji przez autoradiografię.



4. Sekwencjonowanie DNA: Maxam-Gilbert

Znakowany radioaktywnie DNA jest poddawany serii czterech reakcji, każda jest specyficzna dla jednego nukleotydu.

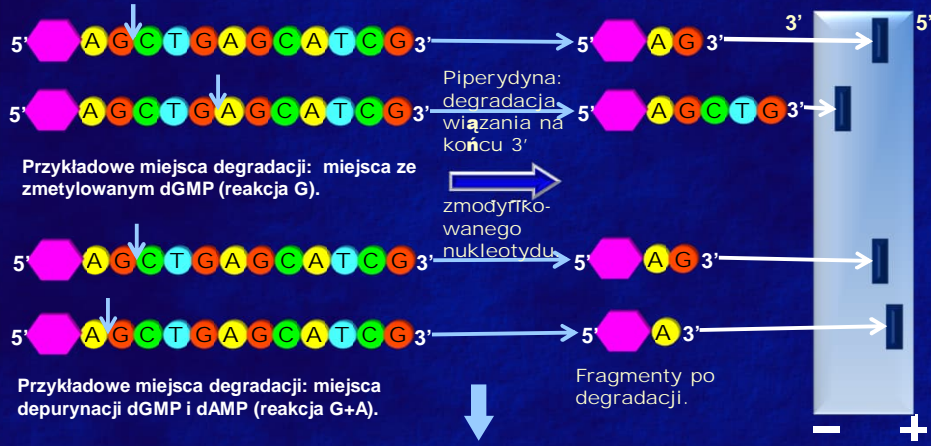


Stężenie składników jest tak dobrane aby jedna modyfikacja przypadała na jedną cząsteczkę DNA.



4. Sekwencjonowanie DNA: Maxam-Gilbert

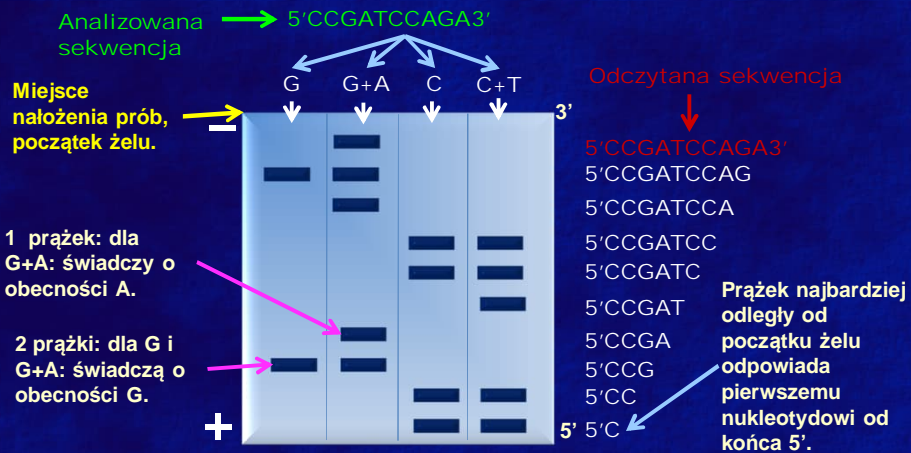
DNA jest degradowany przez piperydynę w miejscach, w których znajdują się zmodyfikowane nukleotydy.



W wyniku 4 specyficznych reakcji powstają fragmenty DNA o różnej długości, które rozdzielane są na żelu poliakrylamidowym.

4. Sekwencjonowanie DNA: Maxam-Gilbert

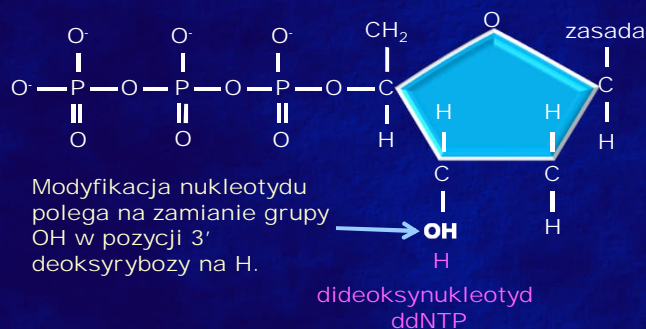
Fragmenty rozdzielone na żelu ujawnia się za pomocą autoradiografii, przy czym odczyt rozpoczyna się od końca 5'.



Fragmenty od końca 5' są najkrótsze, więc znajdują się najdalej od początku żelu - miejsca nałożenia prób.

4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

Metoda sekwencjonowania Sangera polega na terminacji syntezy DNA w pozycji, w której został wbudowany zmodyfikowany nukleotyd.



Wstawienie dideoxynukleotydu do syntetyzowanego łańcucha DNA uniemożliwia przyłączenie następnego nukleotydu, w efekcie synteza łańcucha ulega zakończeniu – terminacji.



4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

Pierwszym etapem sekwencjonowania metodą Sangera jest powielenie DNA przy pomocy PCR.



Znana sekwencja DNA, na podstawie której projektuje się starter.

Fragment, który chcemy sekwencjonować.

Denaturacja



Przyłączenie startera



Polimeraza *Taq* rozpoczyna syntezę fragmentu, który chcemy sekwencjonować przyłączając nukleotydy do startera.

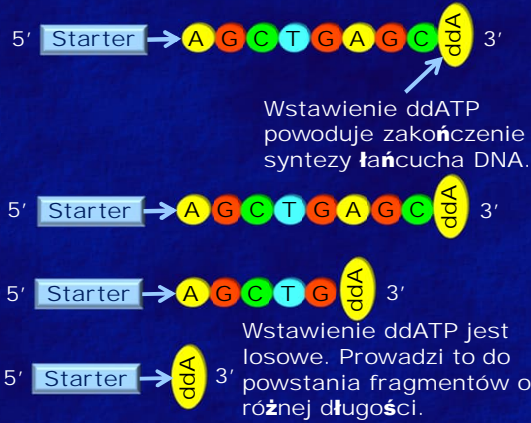


4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

Sekwencjonowanie fragmentu DNA wymaga przeprowadzenia 4-rech specyficznych reakcji PCR, po jednej dla nukleotydów z A, C, G, T.

W reakcji PCR specyficznej dla adeniny, A uczestniczą:

- matryca – sekwencjonowany DNA;
- starter komplementarny do znanej sekwencji;
- termostabilna polimeraza DNA;
- deoksynukleotydy – dATP, dCTP, dGTP, dTTP (podobnie jak w typowej reakcji PCR);
- dodatkowo dideoksynukleotyd ddATP, znakowany izotopowo lub fluorescencyjnie.

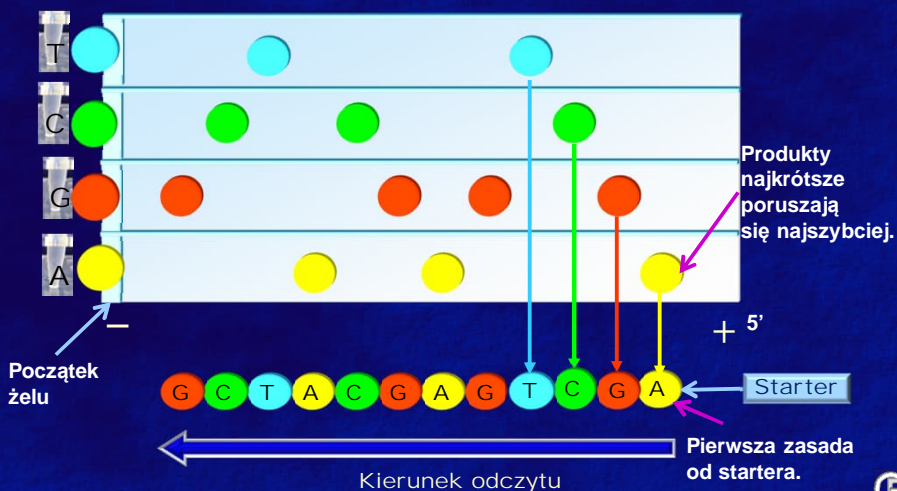


W reakcji PCR specyficznej dla adeniny uczestniczy dideoksynukleotyd ddATP, w reakcji dla cytozyny – ddCTP, guaniny – ddGTP, tyminy – ddTTP.



4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

Produkty reakcji PCR z dideoksynukleotydami (ddNTP) rozdziela się na żelu poliakrylamidowym.



4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

Metoda Sangera umożliwia sekwencjonowanie fragmentów DNA wklonowanych do wektora lub namnożonych w PCR.

Metoda Sangera w połączeniu z PCR

- Sekwencjonowane są fragmenty do 1000 bp.
- Wykorzystuje się tylko jeden starter.
- Aby uniknąć przyłączenia startera do sekwencji homologicznych w genomie, do sekwencjonowania wykorzystuje się:
 - fragmenty wklonowane do wektora, np. plazmidu;
 - produkty reakcji PCR.
- Starter przyłącza się tylko do jednej nici.



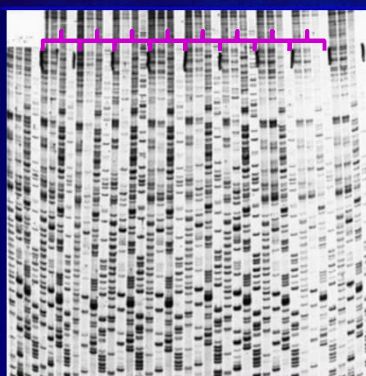
W kolejnym cyklu PCR, matrycą ponownie jest tylko jedna nić DNA - 3'→5' (niebieska). Na jej matrycy powstanie jedna potomna cząsteczka DNA. W efekcie przyrost produktu PCR jest liniowy, a nie wykładniczy jak w klasycznym PCR. Przykładowo, w dwóch cyklach PCR powstają dwie potomne cząsteczki DNA zamiast czterech.

W metodzie Sangera z PCR wykorzystuje się tylko jeden starter. Przyrost produktów reakcji jest liniowy, a nie wykładniczy jak w klasycznym PCR.

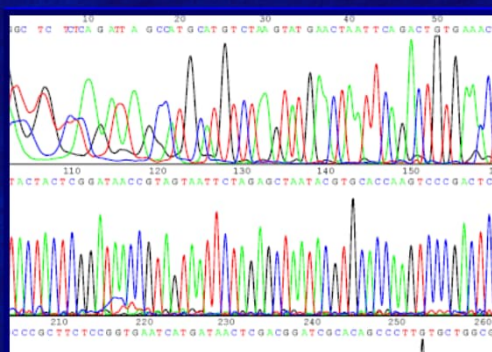


4. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

W automatycznych sekwenserach dideoksynukleotydy znakowane są fluorescencyjne i odczytywane w programie komputerowym.



Autoradiogram otrzymany w wyniku manualnego sekwencjonowania i znakowania izotopowego. Dla każdej próby są 4 ścieżki odpowiadające reakjom dla A, C, G, T.



Chromatogram otrzymany w wyniku sekwencjonowania automatycznego i znakowania fluorescencyjnego. Każdemu nukleotydowi odpowiada inny kolor, np. zielony dla A. Zielony „pik” oznacza, że w tym miejscu jest A, niebieski C itd.



4. Sekwencjonowanie DNA: NGS

NGS (Next Generation Sequencing): platformy umożliwiające równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów z jednej próby.

Korzyści NGS

- Obniżenie kosztów i czasu trwania analizy.
- Umożliwia identyfikację wielu genów i elementów regulatorowych, sekwencjonowanie całych genomów.

Ograniczenia NGS

- Generowane są krótkie fragmenty, max, 250 bp.
- Błędy w sekwencjonowaniu wariantów strukturalnych, homologicznych regionów i sekwencji powtarzalnych.
- Nie rozróżnia izoform transkryptów.

Techniki NGS wymagają amplifikacji DNA w celu otrzymania dużej liczby kopii matrycy.



System Genexus oparty o technikę Ion Torrent. Metoda polega na pomiarze pH, które zmienia się po uwolnieniu jonów wodorowych w wyniku reakcji przyłączenia dNTP do DNA.



System NovaSeq 6000: sekwencjonowanie do 6 billionów zasad (6×10^{12}). Wykorzystuje sekwencjonowanie przez syntezę (SBS) – sekwencja odczytywana jest na podstawie sygnału fluorescencyjnego otrzymanego z sondy połączonej z wbudowywanym nukleotydem.

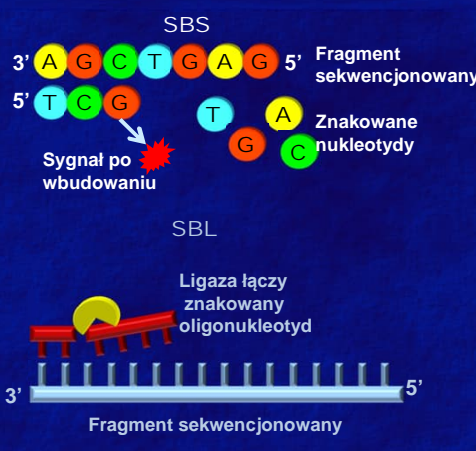
4. Sekwencjonowanie DNA: NGS

Metody NGS wykorzystują sekwencjonowanie przez syntezę (SBS) lub sekwencjonowanie przez ligację (SBL).

Chemizm metod NGS

- Sekwencjonowanie przez syntezę (SBS):
 - wykorzystuje polimerazę DNA;
 - polega na wstawieniu fluorescencyjnie znakowanego nukleotydu do łańcucha i odczytaniu sygnału.
- Sekwencjonowanie przez ligację (SBL):
 - wstawiane są krótkie, fluorescencyjnie znakowane nukleotydy;
 - Łączenie fragmentów przez ligazę i odczyt sygnału.

Metody NGS wymagają nadal optymalizacji w odniesieniu do dokładności i długości odczytywanych fragmentów.



SBS
3' A G C T G A G 5' Fragment sekwencjonowany
5' T C G T A Znakowane nukleotydy
Sygnał po wbudowaniu

SBL
Ligaza łączy znakowany oligonukleotyd
3' 5' Fragment sekwencjonowany

Kriishna et al. 2019



2. Replikacja DNA in vivo

1. Przepływ informacji genetycznej: Centralny dogmat
2. Replikacja DNA *in vivo*
 - Zasady replikacji DNA
 - Etapy replikacji DNA
3. Reakcja PCR
 - Etapy PCR
 - Projektowanie PCR
 - Typy PCR
4. Sekwencjonowanie DNA
 - Metoda Maxama-Gilberta
 - Metoda Sangera
 - Metody NGS
5. Wybrane techniki biologii molekularnej

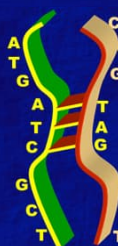


5. Techniki: hybrydyzacja

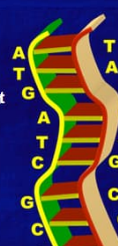
Hybrydyzacja: zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur na skutek parowania komplementarnych zasad.

Hybrydyzacja

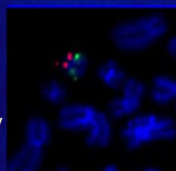
- Jest to zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia dwuniciowych struktur na skutek parowania komplementarnych zasad.
- Różnice w stabilności kwasów nukleinowych w różnych temperaturach wykorzystywane są w hybrydyzacji.
- Hybrydyzacja umożliwia wykrywanie sekwencji komplementarnych do sondy w materiale biologicznym.



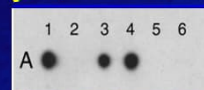
Jeżeli nici nie są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest niestabilna.



Jeżeli nici są komplementarne to cząsteczka mieszańcowa jest stabilna.



Sonda znakowana fluorescencyjnie umożliwia lokalizację komplementarnych sekwencji na chromosomach.



Sonda rDNA wykorzystywana do identyfikacji gatunków glonów.

Hybrydyzacja wykorzystywana jest w wielu procedurach laboratoryjnych, w tym identyfikacji fragmentów DNA, analizie ekspresji.

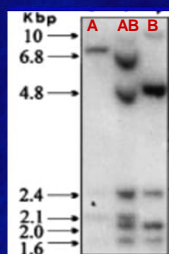


5. Techniki: hybrydyzacja

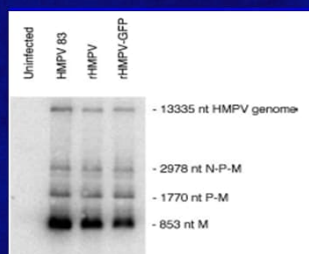
W wyniku hybrydyzacji mogą powstać hybrydy DNA-DNA, RNA-RNA oraz RNA-DNA.

Typy hybrydyzacji w zależności od cząsteczki docelowej (target)

- Hybrydyzacja Southern: sondy DNA są wykorzystywane do wykrycia docelowych fragmentów DNA. Sondy powinny mieć między 10-10 000 nukleotydów. Sondy krótkie hybrydują niespecyficznie.
- Hybrydyzacja Northern: sondy DNA lub RNA są wykorzystywane do wykrycia fragmentów docelowych RNA.
- Hybrydyzacja Western (immunoblotting): przeciwciała (sondy) są wykorzystywane do wykrycia białek.



Hybrydyzacja Southern wykorzystana do analizy genotypów. A: homozygota z jednym szybkim prążkiem w części górnej. B: heterozygota z dwoma prążkami. C: homozygota z jednym wolnym prążkiem.



Hybrydyzacja Northern wykorzystana do identyfikacji komórek ludzkich zakażonych wirusem RNA, HMPV. Prążek o długości 13335 odpowiada wielkości genomu HMPV. Prążek 2978 odpowiada ORF dla białka GFP (białko fluorescencyjne na zielono, gen reporterowy). Prążki 2978, 1770 i 853 odpowiadają odpowiednio genom N, P i M wirusa, genom N i P oraz genomu M.

W cytogenetyce hybrydyzacja umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach – hybrydyzacja *in situ*.

Biacchesi et al. 2004



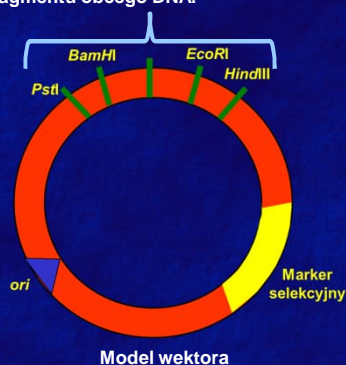
5. Techniki: wektory

Wektor: dwuniciowa cząsteczka DNA, zawierająca fragment obcego DNA i zdolna do autonomicznej replikacji w komórce gospodarza.

Cechy wektora

- Miejsce inicjacji replikacji, *Ori*.
- Polilinker (MCS – ang. Multiple Cloning Site).
- Marker selekcyjny: pozwala na szybką identyfikację gospodarza zawierającego wektor. Najczęściej wykorzystuje się geny oporności na antybiotyki.
- Gen reporterowy w wektorach ekspresyjnych.
- Elementy niezbędne do ekspresji, promotor i miejsce wiązania rybosomów (RBS) w wektorach ekspresyjnych.

Polilinker: miejsce cięcia enzymami restrykcyjnymi, umożliwia wstawienie fragmentu obcego DNA.



Model wektora

Wektory do klonowania umożliwiają wprowadzenie obcego DNA do komórek. Wektory ekspresyjne umożliwiają transkrypcję i translację.

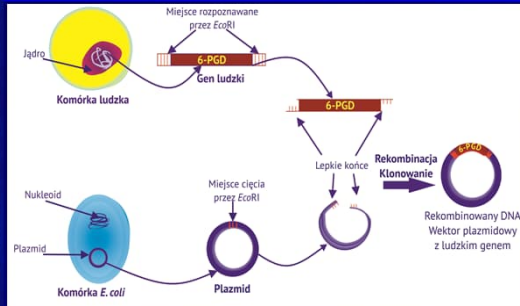


5. Techniki: wektory

Rekombinowane DNA: fragment DNA otrzymany w laboratorium przez połączenia fragmentów DNA z dwóch lub większej liczby źródeł.

Klonowanie molekularne

- Jest to metoda otrzymywania rekombinowanego DNA.
- Etapy klonowania:
 - izolacja DNA dawcy, np. człowieka i amplifikacja (PCR) analizowanej sekwencji;
 - cięcie sekwencji dawcy enzymami restrykcyjnymi, np. *EcoRI*;
 - cięcie wektora, np. plazmidu tym samym enzymem restrykcyjnym, np. *EcoRI*;
 - ligacja i wstawienie do komórek biorcy, np. *E. coli*.



Etapy klonowania molekularnego. Ludzki gen, 6-PGD jest wstawiany do wektora plazmidowego. Gen oraz plazmid przecinane są enzymami restrykcyjnymi w celu utworzenia lepkich końców. Część lepkich końców plazmidu tworzy chimery z genem ludzkim. Ligaza łączy końce, co prowadzi do wstawienia genu ludzkiego do plazmidu. Chimeryczny plazmid wprowadzany jest do *E. coli*, jest utrzymywany i namnażany.

Otrzymywanie rekombinowanego DNA jest możliwe ponieważ DNA ma taką samą strukturę u wszystkich organizmów. Różni się tylko sekwencją.

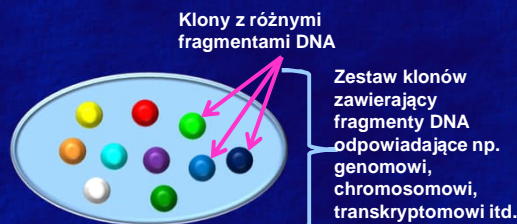


5. Techniki: biblioteka

Biblioteka: kolekcja fragmentów DNA, która jest przechowywana w populacji mikroorganizmów.

Biblioteki: charakterystyka

- Klon DNA: grupa osobników identyczna genetycznie.
- Różne klony powstają przez włączenie do wektora innego fragmentu DNA.
- Wektory są wprowadzane do komórek bakteryjnych lub drożdżowych, gdzie są namnażane.
- Każda komórka zawiera jeden konstrukt – wektor + insert.
- W zależności od typu fragmentów DNA wyróżnia się:
 - biblioteki genomowe;
 - biblioteki cDNA.



Biblioteki przechowywane w ultrazamrażarce (-70°C).



Wybór typu wektora do tworzenia biblioteki zależy od jej wielkości oraz wielkości fragmentu DNA, który może być wstawiony do danego wektora.

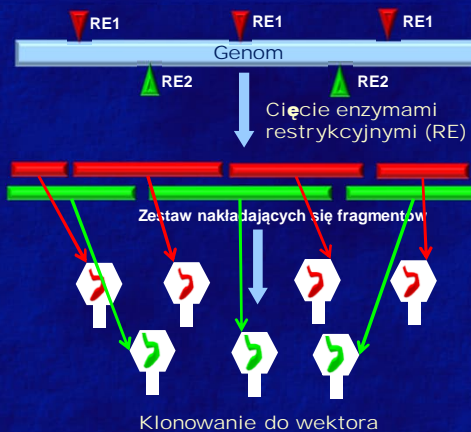


5. Techniki: biblioteka

Biblioteka genomowa: kolekcja klonów, która zawiera co najmniej jedną kopię każdej sekwencji DNA w genomie.

Cechy „dobrej” biblioteki genomowej

- Genom reprezentowany jest przez zestaw nakładających się fragmentów, które pozwalają na izolację każdej sekwencji genomu.
- Fragmenty do klonowania powinny być otrzymane w procedurze niezależnej od sekwencji (np. PCR) aby uniknąć odchylenia w kierunku niektórych sekwencji i wprowadzenia mutacji.
- Klonowane fragmenty powinny być stabilne, tzn. nie powinna zachodzić rekombinacja oraz zróżnicowana replikacja insertów w trakcie propagacji biblioteki.



Biblioteki genomowe są niezbędne do sekwencjonowania genomów, izolacji genów i analiz funkcjonalnych.

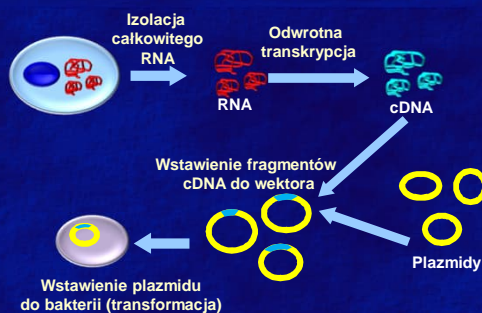


5. Techniki: biblioteka

Biblioteka cDNA: zawiera fragmenty DNA będące kopią RNA organizmu.

Konstrukcja biblioteki cDNA

- RNA jest przekształcane na cDNA za pomocą odwrotnej transkryptazy.
 - Do przekształcenia RNA z łańcuchem poly A wykorzystuje się startery komplementarne do polyA (oligo dT).
 - Jeżeli RNA nie ma polyA, startery są heksamerami o losowej sekwencji.
- Otrzymane fragmenty cDNA mają maksymalnie kilka kbp, dlatego do klonowania używa się plazmidy lub faga λ.



Fragmenty DNA w bibliotece cDNA nie zawierają intronów ponieważ powstają na bazie dojrzałego RNA (najczęściej mRNA).

Biblioteka cDNA odzwierciedla transkryptom w momencie tworzenia biblioteki. Dla danego organizmu może być wiele bibliotek cDNA.



5. Techniki: znaczenie

Metody molekularne w praktyce klinicznej wykorzystywane są do przewidywania wystąpienia chorób genetycznych.

Sekwencjonowanie w praktyce klinicznej

- Diagnostyka chorób genetycznych uwarunkowanych jednogenuowo – wykrywa się warianty skorelowane z chorobą.
- Diagnostyka aneuploidii.
- Sekwencjonowanie genomu w celu oszacowania występowania wariantów warunkujących chorobę u osób pochodzących z rodzin obciążonych genetycznie.
- Powszechne sekwencjonowanie genomów w populacji w celu przewidywania wystąpienia chorób i wczesnego ich leczenia.



Powszechne sekwencjonowanie genomów w populacji w celach prognostycznych stwarza zagrożenia związane z prywatnością

Krier et al. 2016



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 Stahla?



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 pełni 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 pełni 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 pełni 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 specyficy?
 - 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.



Zagadnienia: 17-18

17. Sekwencjonowanie DNA: metoda Maxama-Gilberta

- Jak definiujemy sekwencjonowanie DNA?
- Po co sekwencjonujemy DNA?
- Jakie wyróżniamy metody sekwencjonowania DNA?
- Dlaczego metoda Maxama-Gilberta początkowo była bardziej popularna od metody Sangera?
- Jakie reakcje chemiczne wykorzystywane są w metodzie Maxama-Gilberta?
- Jak wykrywane są produkty reakcji w metodzie Maxama-Gilberta?
- Proszę narysować na schemacie jak przebiega sekwencjonowanie DNA metodą Maxama-Gilberta?
- Na czym polega rola piperydyny w metodzie Maxama-Gilberta?
- Proszę przedstawić obraz na żelu fragmentu 5'AAATCCC AAGACCG A3' zsekwencjonowanego metodą Maxama-Gilberta?



18. Sekwencjonowanie DNA: metoda Sangera

- Na czym polega sekwencjonowanie DNA metodą Sangera?
- Co jest pierwszym etapem sekwencjonowania metodą Sangera?
- Jak zmodyfikowane są nukleotydy w metodzie Sangera?
- Proszę podać skład mieszaniny reakcyjnej dla sekwencjonowania metodą Sangera, w przypadku reakcji specyficznej dla nukleotydu adeninowego?



Centre for Evolution, Genomics and Biomathematics, e-Gene



polokkornelia@gmail.com

<https://www.matgen.pl>