

I. Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (*polymerase chain reaction*)

Technika PCR rozwinęła się w drugiej połowie lat 80-tych XX wieku, a jej twórcami są K. Mullis oraz M. Smith, którzy w 1993 roku otrzymali za to Nagrodę Nobla. W ciągu kilku lat metoda ta stała się podstawową techniką naukową. Technika PCR jest teraz jednym z najważniejszych narzędzi w biologii molekularnej.

Bardzo ważnym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystywanie tej techniki do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. Dzięki amplifikacji (powielaniu) wybranych fragmentów DNA i analizie otrzymanego produktu można w krótkim czasie precyzyjnie określić np. pozycję systematyczną oraz filogenetyczną badanego organizmu. Najprostszym zastosowaniem PCR w diagnostyce medycznej jest wykazanie obecności lub nieobecności specyficznego fragmentu DNA. Technika ta dokonała przełomu w diagnostyce klinicznej m. in. ze względu na niewielką wymaganą objętość próbki materiału biologicznego i fakt, że nie wymaga zastosowania radioaktywnych izotopów.

Zasada metody

Technika łańcuchowej syntezy fragmentów DNA (PCR) pozwala na selektywną amplifikację wybranych regionów DNA w warunkach *in vitro* poprzez naśladowanie zjawiska replikacji DNA zachodzącego w żywej komórce. Wymaga ona jednoniciowej **matrycy DNA**, **dwóch starterów** (sekwencji oligonukleotydów komplementarnych do końców zdefiniowanej sekwencji matrycowego DNA), **trifosforanów dezoksynukleozydów** (trójfosforanów deoksynukleozydów) – **dNTP** oraz enzymu **polimerazy DNA**. Reakcje łańcuchowej polimerazy (syntezę nowej nici, komplementarnej do matrycy) przeprowadza się w termocyklerach. Zachodzi ona aż do wyczerpania się jednego ze składników reakcji albo przeprowadzenia zaprogramowanej liczby cykli. Syntezę wspomnianych starterów (ang. *primer*), można zamówić w wyspecjalizowanych firmach biotechnologicznych.

Konstrukcja starterów

Dwa startery muszą przyłączyć się do matrycy na obu końcach namnażanego regionu, co oznacza, że aby przygotować odpowiednie startery, konieczna jest znajomość przynajmniej skrajnych sekwencji. Samodzielne projektowanie starterów należy zatem rozpocząć od uzyskania z banku genów sekwencji wybranego fragmentu DNA. W wyborze sekwencji powinno się przestrzegać kilku zasad:

- primery powinny być komplementarne do sekwencji genomu zlokalizowanych wewnątrz regionów wysoce konserwatywnych,
- starter powinien mieć od 18 do 28 nukleotydów,
- stosunek zasad C+G do A+T powinien być jak najbliższy 50%,
- odległość pomiędzy końcem primera F a początkiem primera R nie powinna przekraczać 500 nukleotydów,
- należy upewnić się, czy nukleotydy starterów nie są do siebie komplementarne,
- nie powinny tworzyć struktur drugorzędowych, powinny być specyficzne dla pojedynczego *locus* w rodzinie genów (jeśli są niespecyficzne, wybrany fragment uzyskuje się dzięki zmodyfikowanej metodzie PCR, zwanej nested-PCR).

Zawartość par GC powinna stanowić 50-60% całej sekwencji, co ma związek m. in. z temperaturą topnienia T_m (*melting temperature*). **T_m jest to temperatura, przy której 50% sparowanych zasad w dsDNA ulega rozdzieleniu.** Poszczególne pary starterów powinny wykazywać podobną T_m , mieszczącą się w zakresie 55-72°C, co zapewnia powstawanie specyficzných produktów PCR.

Startery przyłączają się do matrycy na obu końcach namnażanego regionu i dają początek syntezie nowego, komplementarnego polinukleotydu, tworzonego w kierunku 5'-3' poprzez

kopiowanie matrycowego DNA w odwrotnym kierunku (3'-5'). Primery przyłączają się do obu nici, każdy z nich do innej – łącznie wyznaczają długość dwuniciowego fragmentu DNA, który będzie amplifikowany.

Mieszaninę podgrzewa się do 90°C w celu oddzielenia nowo powstałych nici od matrycowego DNA. W pierwszym i drugim cyklu reakcji PCR powstają niespecyficzne, długie łańcuchy DNA. W trzecim i następnych cyklach reakcja PCR tworzy łańcuchy specyficzne o długości zdeterminowanej przez startery, a ich ilość przyrasta w postępie geometrycznym.

Warunki reakcji PCR i jej przebieg

Do amplifikacji wybranego fragmentu DNA metodą PCR potrzebne są:

- jednoniciowa matryca DNA, którą otrzymuje się poprzez denaturację termiczną dwuniciowego DNA (dsDNA),
- startery (sekwencje oligonukleotydów komplementarnych do końców zdefiniowanej sekwencji DNA, odpowiadające za rozpoczęcie replikacji),
- dNTP (trifosforany dezoksynukleozydów),
- polimeraza DNA – wykorzystuje się wiele wersji tego enzymu; izoluje się go z bakterii termofilnych *Thermus aquaticus*, dzięki czemu jest on odporny na denaturację w wysokiej temperaturze.

Polimerazę wyizolowaną z *T. aquaticus* nazywa się, od nazwy bakterii, polimerazą *Taq*.

Uzyskanie jednoniciowej matrycy DNA, a następnie namnożenie wybranego fragmentu DNA obejmuje 3 etapy (rysunek):

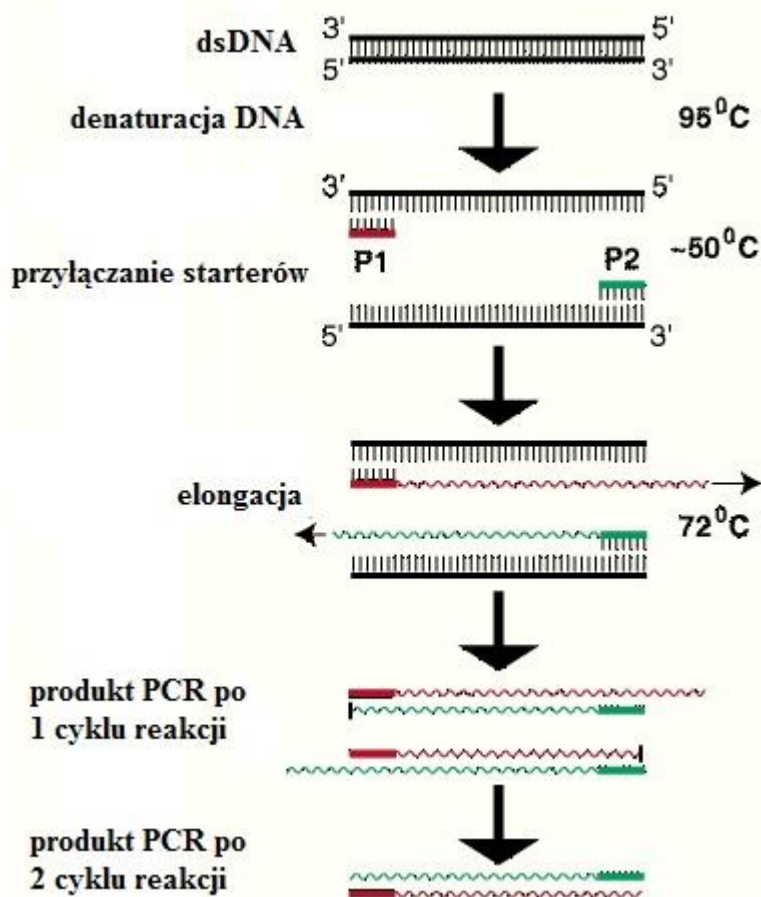
- 1) **denaturację**, czyli rozdzielenie podwójnej nici DNA,
- 2) **przyłączanie starterów** do miejsca komplementarnego na matrycy DNA (tzw. *annealing*),
- 3) **wydłużanie startera (elongacja)** poprzez dołączanie dNTP od końca 3'-OH przez polimerazę DNA.

Ad.1 Denaturacja DNA:

- wstępna, trwająca 2-5 min w temperaturze 93-95°C, mająca na celu oczyszczenie preparatu z resztek proteaz,
- właściwa, trwająca zazwyczaj 30 s w temperaturze 93°C; czas denaturacji dupleksu DNA zależy od rodzaju próbek i termocyklera oraz od długości amplifikowanych fragmentów (krótsze są denaturowane łatwiej).

Ad.2 Przyłączanie starterów do miejsca komplementarnego do matrycy DNA w temp. 37-72°C przez 20-40 sekund. Zbyt wysoka temperatura uniemożliwia przyłączanie starterów, zbyt niska powoduje przyłączanie niespecyficzne (startery hybrydują z wieloma miejscami w genomie o tylko częściowej komplementarności). Temperatura hybrydyzacji jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na specyficzność reakcji PCR i zależy głównie od budowy starterów - im więcej par GC w stosunku do par AT, tym temperatura jest wyższa. Innymi czynnikami wpływającymi na temp. przyłączania się starterów to ich długość, skład buforu reakcyjnego (stężenie matrycy i primerów). W praktyce laboratoryjnej najlepiej jest ustalać temperaturę hybrydyzacji doświadczalnie przy użyciu termocyklera z gradientowym blokiem grzewczym.

Ad.3 Wydłużanie starterów (elongacja) – proces ten katalizowany jest przez polimerazę DNA i przeprowadza się go w temperaturze 72°C przez 20-40 sekund (zależy od długości amplifikowanych fragmentów). Wydajność syntezy rośnie wraz ze wzrostem temperatury, aż do optimum w 72-75°C. Optymalna temperatura syntezy produktu zależy od pochodzenia termostabilnej polimerazy.



Wszystkie 3 etapy zachodzą cyklicznie przez zaprogramowaną ilość minut, tworząc **cykl reakcji**. Obejmuje on najczęściej 35 cykli (maksymalnie 40). Ich produktem jest zwiększona ilość cząsteczek DNA, wystarczająca do przeprowadzenia analizy.

Wydlużanie końcowe – zwykle po ostatnim cyklu reakcji PCR przeprowadza się przez 5-15 minut inkubację w 72°C w celu dokończenia niekompletnych syntez i pełnej hybrydyzacji jednoniciowych komplementarnych produktów. Po zakończeniu reakcji PCR próbki mogą być przechowywane w temperaturze 4°C, aż do czasu użycia ich do dalszej analizy.

Skład mieszaniny reakcyjnej

- **polimeraza DNA** – wydajność syntezy DNA przez polimerazę zależy od jej stężenia, a ponadto od: temperatury, stężenia jonów Mg^{2+} , struktury drugorzędowej matrycy i stężenia dNTP; szybkość syntezy zależy od temperatury reakcji i czasu półtrwania enzymu w danej temperaturze (zwiększając temperaturę, zmniejsza się czas półtrwania enzymu); dla większości reakcji optymalna ilość polimerazy *Taq* wynosi 0,5-2,5 jednostki w próbce o objętości 50µl na około 40 cykli; zbyt duże stężenie polimerazy może obniżyć specyficzność reakcji; Ze względu na wrażliwość enzymu na zamrażanie i odmrażanie zaleca się przechowywanie polimerazy w temperaturze -20°C oraz jej wyjmowanie tylko na czas pipetowania enzymu.

- **bufor reakcyjny** – zapewnia odpowiednie warunki dla działania polimerazy; w jego skład wchodzi: Tris-HCl (o stężeniu 10-50 mM), KCl (o stężeniu ok 50 mM), żelatyna (0,01%), $MgCl_2$ (o stężeniu 0,5-5 mM – czasami bufor nie zawiera $MgCl_2$, w takich przypadkach jest on dostarczany osobno w zestawie wraz z buforem oraz polimerazą). Jony Mg^{2+} związane są przez startery, matrycę, polimerazę i dNTP i wpływają na aktywność enzymu; dokładność

reakcji PCR jest proporcjonalna do stężenia wolnych jonów magnezu, a ich stężenie zależy od dNTP, PPI (difosforany) i EDTA.

- **trifosforany dezoksynukleozydów (dNTP)** – stężenie każdego z tych związków (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) powinno wynosić w reakcji 20-200 μM (stężenie wyjściowe wynosi 5-10 mM); wymagane jest stosowanie jednakowych stężeń wszystkich nukleotydów; optymalne stężenie dNTP zależy od długości amplifikowanego produktu oraz od stężeń jonów Mg^{2+} i startera; optimum pH dla dNTP wynosi 7,0; przechowuje je się w temperaturze -20°C .

- **startery** – komplementarne do amplifikowanej sekwencji, pojedynczoniciowe, o długości 18-28 nukleotydów; zapewniają specyficzność reakcji PCR; optymalne stężenie wynosi 0,1-0,5 μM .

Przygotowanie reakcji PCR – obliczenia

Do dobrania odpowiedniej ilości składników do reakcji PCR wykorzystuje się prosty wzór chemiczny:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

gdzie:

C_1 – stężenie (procentowe, molowe) roztworu wyjściowego ,

V_1 – objętość roztworu wyjściowego,

C_2 – stężenie roztworu docelowego,

V_2 – objętość roztworu docelowego.

Przykład:

Przygotowanie dNTP

roztwór wyjściowy:	5 mMol [C_1]
roztwór docelowy:	200 μMol [C_2]
objętość docelowa (cała objętość próby):	15 μl [V_2]
objętość wyjściowa (ile mamy pobrać roztworu, aby uzyskać 200 μMol w objętości 15 μl):	X μl [V_1]

należy pamiętać, że 1 mMol = 1000 μMol ,

więc 5 mMol = 5000 μMol

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$5000 \mu\text{Mol} \cdot X = 200 \mu\text{Mol} \cdot 15 \mu\text{l}$$

$$X = 0,6 \mu\text{l}$$

Reakcja PCR - zapobieganie kontaminacjom:

- poszczególne etapy analizy: a) przygotowanie próbek DNA, b) przygotowanie mieszaniny reakcyjnej oraz przebieg reakcji PCR, c) analizy produktów reakcji powinny być wykonywane w oddzielnych pomieszczeniach
- do każdego etapu reakcji powinno się zakładać nowe rękawiczki
- roztwory wykorzystywane do mieszaniny powinny być podzielone na małe porcje i przechowywane w wyznaczonych do tego rejonach zamrażarki
- blaty laboratoryjne powinny być utrzymane w czystości oraz okresowo przecierane środkami utleniającymi oraz naświetlane lampami UV (alkohol ma właściwości dezynfekcyjne ale nie niszczy DNA)