

## Kopiowanie sekwencji DNA

Autor tekstu: **Bartosz Piekaruś**

**D**la biologii molekularnej rok 1983 był rokiem przełomowym. Wtedy właśnie Kary Banks Mullis opracował technologię umożliwiającą kopiowanie specyficznych sekwencji DNA.. To co dotychczas wymagało niejednokrotnie całych tygodni wyłożonej pracy stało się nagle dziecinnie proste i ogólnodostępne. Dzięki technice nazwanej PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) możliwy stał się ogromny, a co najważniejsze szybki postęp w takich dziedzinach jak: genetyka, paleontologia, medycyna, kryminalistyka i wielu innych.

Widząc jak wielkie znaczenie dla współczesnej nauki ma reakcja PCR, warto przyjrzeć się dokładniej na czym ona właściwie polega.

PCR jest metodą pozwalającą na wybiórcze powielenie danego fragmentu DNA. Niezwykle istotnym jest, iż przy jej stosowaniu nie jest konieczne oddzielenie powielanego fragmentu od reszty sekwencji. Polimeryzacja DNA następuje dzięki odpowiednio dobranym starterom. Są one dobierane w sposób umożliwiający powielenie jedynie fragmentu DNA znajdującego się między parą starterów „forward” i „reverse”.

PCR może trwać nawet kilka - kilkadziesiąt cykli, z których każdy składa się z następujących etapów:

### — Denaturacja

W jej trakcie dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych między niciami DNA. Temperatury denaturacji w poszczególnych cyklach są różne. Pierwsza denaturacja jest najdłuższa. Ma to na celu umożliwienie całkowitego rozdzielenia nici na całej długości cząsteczki. Temperatura z reguły jest zbliżona do ok. 95 °C. Zależy ona w głównej mierze od składu powielanego fragmentu oraz od wytrzymałości użytej polimerazy na wysokie temperatury. W przypadku fragmentów zawierających przewagę par C-G (cytozyna — guanina) do rozdzielenia nici należy użyć wyższej temperatury. Wymusza to użycie polimeraz termostabilnych. Średni czas denaturacji wynosi ok. 30 sekund.

### — Przyłączanie starterów (Annealing)

Przyłączanie starterów jest procesem wymagającym do prawidłowego przebiegu temperatury zdecydowanie niższej niż w przypadku denaturacji. Wynosi ona z reguły około 50 °C, tym samym jest niższa od wyliczonej temperatury topnienia starterów o ok. 3 — 5°C. Gdy startery mają różne temperatury topnienia, oczywiście wybierana jest ta niższa. Zbyt niska temperatura prowadzi do powstania niespecyficznych produktów, natomiast zbyt wysoka obniża wydajność reakcji.

Przyłączanie starterów przebiega według następującego schematu:

Starter F (forward) tworzy nić komplementarną do nici 3' — 5', natomiast starter R (reverse) do nici biegnącej od 5' do 3'.

### — Elongacja (Extension)

Wydłużanie łańcucha DNA zachodzi w temperaturze wyższej niż w przypadku wiązania primerów i odpowiedniej dla używanej polimerazy. Temperatura ta z dla najpopularniejszych polimeraz mieści się w granicach 70 — 80°C. W trakcie tego procesu wykorzystywane są deoksyrybonukleotydy dNTP w środowisku dwudodatnich jonów magnezu. Czas potrzebny na powielenie danego fragmentu nici DNA przez polimerazę oblicza się na podstawie długości badanego fragmentu. Na przykład dla polimerazy Taq przyjmuje się średnią prędkość elongacji rzędu 1000 nukleotydów na minutę. (Jest to połowa maksymalnej prędkości powielania w optymalnych warunkach).

Prawidłowy wynik reakcji PCR jest warunkowany odpowiednim doбором starterów, środowiska reakcji oraz czasu trwania poszczególnych jej etapów.

W skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR wchodzi następujące odczynniki:

— **matryca DNA** — cząstka DNA, która ma zostać powielona,

— **bufor** - tworzący środowisko reakcji, najczęściej 10 mM Tris-HCl

- **startery (R i F)** — jednoniciowe oligonukleotydy — łącząc się z fragmentem DNA umożliwiają jego powielenie polimerazie. Sekwencja starteru „forward” winna być zgodna z początkowym fragmentem DNA, starteru „reverse” komplementarna do końca fragmentu DNA. Użyte startery nie powinny zawierać ciągu puryn bądź pirymidyn. Ważny jest również brak odwróconych powtórzeń. Sekwencja starterów ponadto powinna być unikalna. Starter R nie

powinien być komplementarny do starteru F.

— **trifosforany nukleotydów (dNTPs)** — mieszanina równych ilości poszczególnych trifosforanów deoksyrybonukleotydów, z których syntezowane są nowe nici DNA.

— **jony dwudodatnie magnezu** — są wiązane przez DNA i grupy fosforanowe nukleotydów. Ponadto aktywiają polimerazę.

— **termostabilna polimeraza.**

**Bibliografia:**

B. Alberts: „Podstawy biologii komórki”

T.A.Brown: „Genomy”

**Bartosz Piekaruś**

Student biotechnologii na Politechnice Śląskiej. Finalista olimpiad: ekologicznej, chemicznej.

[Pokaż inne teksty autora](#)



(Publikacja: 18-08-2009)

[Oryginał.](http://www.racjonalista.pl/kk.php/s,6741) (<http://www.racjonalista.pl/kk.php/s,6741>)

Contents Copyright © 2000-2009 Mariusz Agnosiewicz

Programming Copyright © 2001-2009 Michał Przech

Autorem portalu Racjonalista.pl jest Michał Przech, zwany niżej Autorem.  
Właścicielami portalu są Mariusz Agnosiewicz oraz Autor.

Żadna część niniejszych opracowań nie może być wykorzystywana w celach komercyjnych, bez uprzedniej pisemnej zgody Właściciela, który zastrzega sobie niniejszym wszelkie prawa, przewidziane w przepisach szczególnych, oraz zgodnie z prawem cywilnym i handlowym, w szczególności z tytułu praw autorskich, wynalazczych, znaków towarowych do tego portalu i jakiegokolwiek jego części.

Wszystkie strony tego portalu, wliczając w to strukturę katalogów, skrypty oraz inne programy komputerowe, zostały wytworzone i są administrowane przez Autora. Stanowią one wyłączną własność Właściciela. Właściciel zastrzega sobie prawo do okresowych modyfikacji zawartości tego portalu oraz opisu niniejszych Praw Autorskich bez uprzedniego powiadomienia. Jeżeli nie akceptujesz tej polityki możesz nie odwiedzać tego portalu i nie korzystać z jego zasobów.

Informacje zawarte na tym portalu przeznaczone są do użytku prywatnego osób odwiedzających te strony. Można je pobierać, drukować i przeglądać jedynie w celach informacyjnych, bez czerpania z tego tytułu korzyści finansowych lub pobierania wynagrodzenia w dowolnej formie. Modyfikacja zawartości stron oraz skryptów jest zabroniona. Niniejszym udziela się zgody na swobodne kopiowanie dokumentów portalu Racjonalista.pl tak w formie elektronicznej, jak i drukowanej, w celach innych

niż handlowe, z zachowaniem tej informacji.

Plik PDF, który czytasz, może być rozpowszechniany jedynie w formie oryginalnej, w jakiej występuje na portalu. **Plik ten nie może być traktowany jako oficjalna lub oryginalna wersja tekstu, jaki zawiera.**

Treść tego zapisu stosuje się do wersji zarówno polsko jak i angielskojęzycznych portalu pod domenami Racjonalista.pl, TheRationalist.eu.org oraz Neutrum.eu.org.

Wszelkie pytania prosimy kierować do [redakcja@racjonalista.pl](mailto:redakcja@racjonalista.pl)