

Wstęp teoretyczny

Techniki badań molekularnych, oparte na metodach analizy materiału genetycznego, w tym głównie na technice PCR, znajdują praktyczne zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, między innymi takich jak: diagnostyka chorób (genetycznych, infekcyjnych i nowotworowych, w tym ocena ryzyka zachorowania na nowotwory), diagnostyka sanitarna, medycyna sądowa (ustalenie ojcostwa, ustalanie pochodzenia śladów krwi, włosów i innych materiałów biologicznych), transplantologia.

Oznaczanie płci wykorzystywane jest w medycynie sądowej, w badaniach śladów krwi, oraz w diagnostyce preimplantacyjnej, w badaniach embrionów. Badania te wykonuje się w celu określenia ryzyka chorób związanych z płcią. Wykorzystuje się w tym celu technikę FISH (ang. Fluorescent In-Situ Hybridization) oraz technikę PCR (ang. Polymerase Chain Reaction). W technice FISH wykorzystuje się sondy specyficzne dla chromosomu X i Y, np. sondę wiążącą się specyficznie do sekwencji repetytywnych (pHY10) występujących w liczbie ok. 3000 kopii na chromosomie Y. W technice PCR poddawane są amplifikacji regiony chromosomów X i Y, które są dla nich charakterystyczne lub wykazują polimorfizm sekwencji w zależności od położenia, np.: regiony repetytywne na chromosomie Y, geny *zfx* and *zfy* (analiza połączona z analizą restrykcyjną), gen SRY na chromosomie Y.

Technika PCR, opracowana w 1983 r. przez Karla Mullisa (Nagroda Nobla 1993), umożliwia powielenie wybranego fragmentu DNA dzięki cyklicznym zmianom temperatury i działaniu termostabilnej polimerazy DNA (np. polimeraza Taq). Pozwala to na uzyskanie nawet ponad miliarda kopii specyficznej sekwencji z pojedynczej cząsteczki DNA. Kluczowe znaczenie ma dobór odpowiednich starterów, które decydują o specyficzności reakcji.

Amplifikacja fragmentu genu SRY metodą PCR

Znaczenie genu SRY

Gen **SRY** (ang. *Sex-Determining Region Y*) znajduje się na ramieniu krótkim chromosomu Y, w regionie **Yp11.3**, tuż przy granicy obszaru pseudoautosomalnego (PAR). Jego położenie sprawia, że podczas mejozy może dochodzić do nieprawidłowego crossing-over, co czasem prowadzi do przeniesienia SRY na chromosom X. W takiej sytuacji u osoby płci męskiej (fenotypowo) występuje kariotyp żeński (46,XX SRY(+)).

SRY koduje **czynnik transkrypcyjny** zawierający konserwatywny motyw HMG-box (High Mobility Group), który wiąże się z DNA i aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za różnicowanie gonady w kierunku jądra. Najważniejszym celem działania SRY jest aktywacja genu SOX9, pełniącego kluczową rolę w dojrzewaniu komórek Sertolego oraz inicjacji kaskady prowadzącej do wytwarzania AMH (hormonu antymüllerskiego) i zahamowania rozwoju przewodów Müllera. Wzmocniona ekspresja SRY około 7. tygodnia rozwoju zarodkowego jest pierwszym sygnałem do różnicowania się gonady w jądro.

Współdziałanie SRY i SOX9 jest niezbędne do prawidłowego różnicowania płci męskiej. Wysoki poziom ekspresji SOX9 stabilizuje decyzję rozwojową, a jego aktywność może być dodatkowo wzmacniana przez inne czynniki (np. SF1). Z kolei nadekspresja genu DAX1, zlokalizowanego na chromosomie X, może przeciwdziałać funkcji SRY i prowadzić do zahamowania różnicowania jąder, co klinicznie objawia się zjawiskiem „sex reversal”, czyli wspomnianą sprzecznością między fenotypem, a kariotypem, co do płci (przykład odwrotny do wspomnianego: 46,XY z fenotypem żeńskim).

Mutacje w genie SRY, jego delecje lub translokacje mogą powodować zaburzenia rozwoju płciowego (**ZRP**), ang. Disorders of Sex Development (DSD). Mogą one prowadzić do takich fenotypów jak:

- **zespół Swyera (46,XY; gonadal dysgenesis)** – brak prawidłowej funkcji SRY, rozwój gonad żeńskich mimo kariotypu XY,

- **XX-mężczyźni (46,XX; testicular DSD)** – obecność genu SRY na chromosomie X wskutek nieprawidłowego crossing-over i tym samym rozwój jąder i penisa,
- **XX-hermafrodyty (46,XX; ovotesticular DSD)** – rzadsze, związane z mozaikowością lub mutacjami innych genów (np. SOX9) (obecność gonad obu płci, płeć niejednoznaczna).

SRY ma zatem **decydujące znaczenie dla inicjacji różnicowania płci męskiej**, ale nie działa w izolacji – jego funkcja zależy od współpracy z innymi genami regulatorowymi (SOX9, DAX1, WT1, SF1, WNT4). Zaburzenia w ekspresji któregośkolwiek z tych elementów mogą skutkować niezgodnością pomiędzy płcią chromosomalną a fenotypową (**sex reversal**).

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej do PCR

Każdy zespół przygotowuje mieszaniny reakcyjne zgodnie z poniższą tabelą.

Dodatkowo należy przygotować po **jednej reakcji na całą grupę**:

- **Kontrola negatywna** – mieszanina PCR bez matrycy DNA (sprawdzenie czystości odczynników),
- **Kontrola pozytywna z DNA kobiety**,
- **Kontrola pozytywna z DNA mężczyzny**.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej

Kolejność	Składnik	Objętość [μl]	Master Mix [μl] dla ____ próbek*	Uwagi
1	Woda ultraczysta	19,7		Dodaj na początku, aby ułatwić pipetowanie małych objętości.
2	10× bufor I (z Mg^{2+})	2,5		Zapewnia optymalne pH i stężenie jonów Mg^{2+} dla działania polimerazy.
3	dNTP Mix (10 mM)	0,6		Zawiera mieszaninę wszystkich 4 deoksyrybonukleotydów.
4	Starter SRY forward (5 μM)	0,5		Sekwencja specyficzna dla genu SRY.
5	Starter SRY reverse (5 μM)	0,5		Komplementarny do drugiej nici.
6	RUN polimeraza (5 U/μl)	0,2		Dodawaj jako ostatni składnik, na lodzie , delikatnie wymieszaj.
7	Matryca DNA	1,0		Zwykle dodawana osobno do każdej próbki po rozdzieleniu mastermixu.
	Razem	25,0		

* Zawsze przygotuj master mix dla jednej reakcji więcej (lub z 5% nadmiarem w przypadku większej liczby reakcji) w celu wyrównania strat przy pipetowaniu.

Tabela 2. Profil czasowo temperaturowy – PCR fragmentu genu SRY

Etap	Temperatura	Czas trwania	
Początkowa denaturacja	95°C	3 min	
Denaturacja	95°C	30 s	35 cykli
Przyłączanie starterów	56°C	20 s	
Elongacja	72°C	20 s	
Końcowa elongacja	72°C	5 min	
Przechowywanie (hold)	8°C	bez limitu	

Detekcja produktów PCR

Przygotowanie buforu TAE (1×) z roztworu stężonego 50×

Do przygotowania **250 ml buforu 1× TAE** z roztworu stężonego **50× TAE** stosuje się wzór:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

gdzie:

- C_1 - stężenie roztworu wyjściowego (50×),
- V_1 - objętość roztworu wyjściowego, którą należy pobrać,
- C_2 - stężenie roztworu końcowego (1×),
- V_2 - objętość końcowa (250 ml).

$$50 \times V_1 = 1 \times 250$$

$$V_1 = \frac{250}{50} = 5 \text{ ml}$$

Przygotowanie:

1. Odmierz **5 ml roztworu 50× TAE**.
2. Przenieś do cylindra miarowego lub kolby.
3. Dopełnij wodą ultraczystą do objętości **250 ml**.
4. Dokładnie wymieszaj.

Otrzymany bufor 1× TAE jest gotowy do przygotowania żelu agarozowego oraz prowadzenia elektroforezy.

Przygotowanie 50 ml 2% roztworu agarozy w buforze 1× TAE

1. **Oblicz ilość agarozy:**
 - 2% oznacza 2 g agarozy / 100 ml roztworu.
 - Dla 50 ml:

$$2 \text{ g} \times \frac{50}{100} = 1,0 \text{ g}$$

- Należy odważyć **1,0 g agarozy**.

2. **Przygotowanie roztworu:**
 - Odmierz **50 ml buforu 1× TAE**.
 - Wsyp do zlewki lub kolby odważoną ilość agarozy.

- Dodaj bufor i wymieszaj.
- 3. **Rozpuszczanie:**
 - Podgrzewaj mieszaninę w kuchence mikrofalowej (kilka krótkich cykli po 20–30 s), aż agarozę całkowicie rozpuścisz i roztwór stanie się klarowny.
 - Uważaj, aby roztwór się nie zagotował i nie wykipiał.
- 4. **Dodanie barwnika:**
 - Po lekkim przestudzeniu (do ok. 60 °C) dodaj **5 µl** ilość barwnika do wizualizacji DNA (**bromek etydyny¹**).
 - Wymieszaj ostrożnie, aby uniknąć powstawania pęcherzyków powietrza.
- 5. **Wlewanie do formy:**
 - Wlej roztwór agarozy na sanki ograniczone klinami (w komorze elektroforetycznej). Następnie umieść grzebień po właściwej stronie (zastanów się jaki ładunek ma DNA i po której stronie zamocować grzebień, aby DNA umieszczone w dołkach utworzonych przez grzebień migrowało przez żel).
 - Pozostaw w temperaturze pokojowej na około 15–20 minut do zestalenia.
- 6. **Gotowy żel:**
 - Usuń grzebień oraz kliny, a następnie zalej komorę elektroforetyczną buforem 1× TAE tak, aby żel był całkowicie przykryty.

Przygotowanie próbek do naniesienia na żel agarozowy

Do produktów reakcji PCR należy dodać bufor obciążający (6×), który zawiera barwniki śledzące oraz substancję zwiększającą gęstość roztworu. Dzięki temu próbka łatwo opada na dno studzienki, a migrację barwnika można kontrolować podczas elektroforezy.

Procedura:

1. Do probówki typu Eppendorf odmierzyć **2 µl buforu obciążającego 6×**.
2. Dodać **10 µl produktu PCR**.
3. Delikatnie wymieszać pipetą (nie wortexować).
4. Z przygotowanej mieszaniny pobrać **5 µl** i nanieść do odpowiedniej studzienki w żelu agarozowym.

Do dołków w żelu należy nanieść:

- kontrolę negatywną
- kontrolę pozytywną z DNA kobiety
- kontrolę pozytywną z DNA mężczyzny
- marker wielkości DNA (DNA ladder)
- próbki badane.

Interpretacja wyników elektroforezy:

- U **kobiet**: brak prążka – brak produktów amplifikacji fragmentu genu SRY.
- U **mężczyzn**: obserwowany jest **pojedynczy prążek** odpowiadający fragmentowi genu SRY (~93 pz).

¹ **Bromek etydyny (EtBr)** jest barwnikiem fluorescencyjnym, który interkaluje pomiędzy pary zasad DNA, umożliwiając wizualizację produktów PCR w świetle UV. Dzięki temu można łatwo ocenić obecność i wielkość fragmentów DNA po elektroforezie. Jest to jednak związek **mutagenny i potencjalnie kancerogenny**, dlatego należy obchodzić się z nim bardzo ostrożnie – zawsze pracować w rękawiczkach, unikać kontaktu ze skórą oraz stosować odpowiednie procedury utylizacji odpadów.

Identyfikacja płci na podstawie analizy genu amelogeniny

Znaczenie analizy genu amelogeniny

Określanie płci techniką biologii molekularnej jest jednym z podstawowych zastosowań biologii molekularnej, szczególnie w medycynie sądowej, analizie próbek zdegradowanych, diagnostyce prenatalnej oraz badaniach genetycznych w archeologii. Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod jest analiza polimorfizmu genu **amelogeniny (AMEL)** – genu kodującego białko, amelogeninę, uczestniczące w tworzeniu szkliwa zębowego.

Gen amelogeniny występuje zarówno na **chromosomie X (AMELX)**, jak i na **chromosomie Y (AMELY)**. Sekwencje kodujące amelogeninę obecne są na krótkim ramieniu chromosomu X oraz blisko centromeru na chromosomie Y. Obie kopie tego genu są homologiczne w około 90%, jednak zawierają **strukturalne różnice w sekwencji nukleotydowej**, w tym **delecję 180 par zasad** genu AMELY. Ta delecja powoduje, że produkt PCR pochodzący z chromosomu Y ma **mniejszy rozmiar** niż ten z chromosomu X, co stanowi podstawę rozróżniania płci.

W technice PCR wykorzystuje się **uniwersalną parę starterów**, które wiążą się z konserwatywnymi fragmentami genu występującymi zarówno na chromosomie X, jak i Y, ale flankującymi region obejmujący wspomnianą delecję. W zależności od zastosowanej pary starterów, długości amplifikowanych fragmentów mogą się różnić, jednak zachowana zostaje charakterystyczna różnica długości między produktami AMELX i AMELY.

W niniejszym ćwiczeniu zastosowano parę starterów:

- **AMELF1:** ATCCTGGGCACCCTGGTTAT
- **AMELR1:** GGTGCAAACACTGTCCCTCA

Ta para starterów amplifikuje region genu amelogeniny dając:

- **Produkt o długości ~996 pz** – pochodzący z genu **AMELX** (obecny u obu płci),
- **Produkt o długości ~816 pz** – pochodzący z genu **AMELY** (obecny tylko u mężczyzn).

Dzięki temu możliwa jest jednoznaczna interpretacja wyników elektroforezy:

- U **kobiet (XX)**: obserwowany jest **pojedynczy prążek** odpowiadający fragmentowi AMELX (~996 pz),
- U **mężczyzn (XY)**: obserwowane są **dwa prążki** – jeden z AMELX (~996 pz) oraz drugi z AMELY (~816 pz).

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej do PCR

Każdy zespół przygotowuje mieszaniny reakcyjne zgodnie z poniższą tabelą.

Dodatkowo należy przygotować po **jednej reakcji na całą grupę**:

- **Kontrola negatywna** – mieszanina PCR bez matrycy DNA (sprawdzenie czystości odczynników),
- **Kontrola pozytywna z DNA kobiety**,
- **Kontrola pozytywna z DNA mężczyzny**.

✓ Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej

Kolejność	Składnik	Objętość [μ l]	Master Mix [μ l] dla ____ próbek*
1	Woda ultraczysta	19,7	
2	10× bufor I (z Mg^{2+})	2,5	
3	dNTP Mix (10 mM)	0,6	
4	Starter AMEL <i>forward</i>	0,5	
5	Starter AMEL <i>reverse</i>	0,5	
6	RUN polimeraza (5 U/ μ l)	0,2	
7	Matryca DNA	1,0	
Razem		25,0 μ l	

Zaleca się przygotowanie mastermixu z nadmiarem (~10%), aby zrekompensować ewentualne straty podczas pipetowania i uniknąć niedoboru przy ostatnich próbkach.

Tabela 4. Profil czasowo temperaturowy – amplifikacja genu amelogeniny

Etap	Temperatura	Czas trwania	
Początkowa denaturacja	95°C	3 min	30 cykli
Denaturacja	95°C	60 s	
Przyłączanie starterów	58°C	60 s	
Elongacja	72°C	60 s	
Końcowa elongacja	72°C	5 min	
Przechowywanie (hold)	8°C	bez limitu	

Aby uzyskać odpowiednią rozdzielczość uzyskanych produktów PCR, stosuje się **żel agarozowy o stężeniu 2%**, co umożliwi precyzyjne rozdzielenie produktów różniących się o 180 par zasad.

Detekcję produktów PCR przeprowadza się zgodnie z instrukcją zamieszczoną powyżej (detekcja produktów amplifikacji fragmentu genu SRY).