

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 (ustalanie 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.

I. Elektroforeza genomowego DNA

Rozdział elektroforetyczny należy prowadzić w 1% żelu agarozowym. Przed przystąpieniem do wykonania żelu należy przygotować 1x stężony bufor TAE przez 50-krotne rozcieńczenie buforu 50x TAE.

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

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

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

gdzie:

- C_1 - stężenie roztworu wyjściowego (50x),
- V_1 - objętość roztworu wyjściowego, którą należy pobrać,
- C_2 - stężenie roztworu końcowego (1x),
- 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 50x TAE**.
2. Przenieś do cylindra miarowego lub kolby.
3. Dopelnij wodą ultraczystą do objętości **250 ml**.
4. Dokładnie wymieszaj.

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

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

1. **Oblicz ilość agarozy:**
 - 1% oznacza 1 g agarozy / 100 ml roztworu.
 - Dla 50 ml należy odważyć **0,5 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 kuchenie mikrofalowej, aż agarozę całkowicie rozpuścisz i roztwór stanie się klarowny.
 - Uważaj, aby roztwór się nie zagotował i nie wykypiał.
4. **Dodanie barwnika:**
 - Po lekkim przestudzeniu (do ok. 60 °C) dodaj **5 µl bromku etydyny** (barwnika do wizualizacji DNA).
 - 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 mogło migrować 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 czystej probówki typu Eppendorf dodać 2 µl buforu obciążającego (6×) oraz 10 µl wyizolowanego genomowego DNA.
- Delikatnie wymieszać pipetą (nie worteksować).
- Z przygotowanej mieszaniny pobrać **5 µl** i nanieść do odpowiedniej studzienki w żelu agarozowym.

Bufor obciążający zawiera barwniki śledzące oraz substancję zwiększającą gęstość roztworu. Dzięki temu próbka łatwo opada na dno studzienki, a migrację barwnika można kontrolować podczas elektroforezy.

Rozdział należy prowadzić przez 0,5-1 h, przy napięciu ok. 5-10 V/cm. Po zakończonej elektroforezie żel należy analizować w świetle UV transiluminatora.

II. 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_Y). 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

antymüllerowskiego) i zahamowania rozwoju przewodów Müllera. Wzmoczona 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 karyotypem, 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 karyotypu 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. Składniki mieszaniny należy dodawać do próbki PCR (0,2 ml) w kolejności zamieszczonej w tabeli.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej próby badanej

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		
7	Matryca DNA	1,0		
	Razem	25,0		

Dodatkowo należy przygotować po **jednej reakcji na całą grupę (wg Tabeli 1)**:

- **Kontrola negatywna** – mieszanina PCR bez matrycy DNA (zamiast matrycy DNA należy dodać 1 µl wody ultraczystej),
- **Kontrola pozytywna z DNA kobiety** (zamiast badanego DNA należy dodać 1 µl DNA wzorca kobiety),
- **Kontrola pozytywna z DNA mężczyzny** (zamiast badanego DNA należy dodać 1 µl DNA wzorca mężczyzny).

Probówki z przygotowanymi mieszaninami reakcyjnymi należy umieścić w termocyklerze i ustawić profil temperaturowo-czasowy przedstawiony w Tabeli 2.

Tabela 2. Profil czasowo-temperaturowy – PCR fragmentu genu SRY

Etap	Temperatura	Czas trwania	
Początkowa denaturacja	95°C	3 min	35 cykli
Denaturacja	95°C	30 s	
Przylączenie 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

Rozdział elektroforetyczny należy przeprowadzić w 2% żelu agarozowym. Przed przystąpieniem do wykonania żelu należy przygotować 1x stężony bufor TAE.

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

- Odmierz **5 ml roztworu 50× TAE**.
- Przenieś do cylindra miarowego lub do kolby.
- Dopełnij wodą ultraczystą do objętości **250 ml**.
- 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 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 agarozy:

- Podgrzewaj mieszaninę w kuchenie 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 etydyny**).

- 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.
- 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

1. Do probówki typu Eppendorf odmierzyć **2 µl buforu obciążającego 6×**.
2. Dodać **10 µl produktu PCR**.
3. Delikatnie wymieszać pipetą (nie worteksować).
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.

Po zakończonej elektroforezie żel należy analizować w świetle UV transiluminatora.

Interpretacja wyników elektroforezy:

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

III. 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 do 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, która 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 wyłącznie 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.

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej

Kolejność	Składnik	Objętość [μl]	Master Mix [μl] 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/μl)	0,2	
7	Matryca DNA	1,0	
	Razem	25,0 μl	

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**.

Probówki z przygotowanymi mieszaninami reakcyjnymi należy umieścić w termocyklerze i ustawić profil temperaturowo-czasowy zamieszczony w Tabeli 4.

Tabela 4. Profil czasowo-temperaturowy – amplifikacja genu amelogeniny

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

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