

3. Wstęp teoretyczny

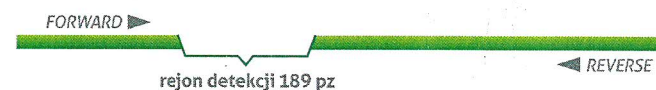
Diagnostyka molekularna, oparta o metody analizy materiału genetycznego (w tym na technice PCR), znajduje praktyczne zastosowania w wielu dziedzinach medycyny między innymi takich jak: diagnostyka chorób uwarunkowanych genetycznie, chorób infekcyjnych, wczesne wykrywanie nowotworów (ocena ryzyka zachorowania), diagnostyka sanitarna, diagnostyka w medycynie sądowej (ustalanie ojcostwa, do ustalania pochodzenia śladów krwi, włosów itp.), transplantologia. Oznaczanie płci wykorzystywane jest w medycynie sądowej w badaniach śladów krwi oraz w diagnostyce preimplantacyjnej w badaniach embrionów – gdzie 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. 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 jako amplifikacji poddawane są różne rejony charakterystyczne dla chromosomów X i Y, czy też wykazujące się polimorfizmem w sekwencji w zależności od położenia na poszczególnych chromosomach, np.: rejony repetytywne na chromosomie Y, geny *zfx* and *zfy* (analiza połączone z analizą restrykcyjną), gen *sry* na chromosomie Y.

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie izolacji genomowego DNA oraz przeprowadzenie reakcji PCR na wyizolowanych matrycach w celu oznaczenia płci badanego DNA. Detekcja oparta jest na amplifikacji fragmentu genu amelogeniny, który charakteryzuje się polimorfizmem w zależności od lokalizacji na chromosomach płciowych X i Y. Wielkości amplifikowanych fragmentów w przypadku DNA mężczyzny wynoszą 977 oraz 788 pz, w przypadku DNA kobiety 977 pz. Amelogenina jest głównym białkiem macierzy pozakomórkowej w zawiązku zęba. Sekwencje kodujące amelogeninę obecne są na krótkim ramieniu chromosomu X oraz blisko centromeru na chromosomie Y. Homologia sekwencji X i Y genu amelogeniny z obu chromosomów płci wynosi ok. 90%, a główna różnica to 189-cio nukleotydowa delecja na chromosomie Y w porównaniu do chromosomu X.

Produkt PCR z chromosomu X – 977 pz



Produkt PCR z chromosomu Y – 788 pz



Rysunek 1. Schemat amplifikacji fragmentu genu amelogeniny

Technika PCR wynaleziona została w 1983 roku przez Karla Mullis'a i współpracowników, za którą otrzymali nagrodę Nobla w 1993 roku. Technika PCR opiera się na prowadzeniu reakcji łańcuchowej polimerazy DNA, która pozwala na powielenie dowolnie wybranego fragmentu DNA o specyficznej sekwencji nukleotydów. Możliwe jest to dzięki zastosowaniu termostabilnego enzymu (polimerazy DNA), wyizolowanego np. z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*, czy *Pyrococcus woesei* pozwalając na wielokrotne ogrzewanie mieszaniny nawet do 95°C bez utraty aktywności. Reakcja PCR pozwala na amplifikację specyficznych sekwencji DNA spośród złożonej mieszaniny. Możliwe jest zaprojektowanie starterów umożliwiających amplifikację pojedynczego locus spośród całego genomu DNA. Jeśli startery wiążą się do więcej niż jednego locus, w wyniku amplifikacji może powstać więcej niż jeden produkt. Dla 1 cząsteczki stanowiącej matrycę możliwe jest uzyskanie ponad 1 biliona kopii. Dlatego też, aby próbka nie była zanieczyszczona innym DNA lub wcześniej uzyskanymi amplikonami, należy zastosować odpowiednie środki ostrożności (zamieszczone w instrukcji).

Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej niezbędne są następujące składniki, mające wpływ na czułość, specyficzność oraz wydajność amplifikacji:

- matryca DNA, zawierająca powielaną sekwencję;
- termostabilna polimeraza DNA;
- bufor do reakcji PCR i sole magnezu, zapewniające odpowiednie warunki buforowe dla działania polimerazy;
- równomolowa mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP);
- startery (ang. primers), czyli krótkie odcinki oligonukleotydowe umożliwiające amplifikację konkretnego locus.

Literatura:

1. Akane A, Shiono H, Matsubara K, Nakahori Y, Seki S, Nagafuchi S, Yamada M, Nakagome Y. *Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods*. Forensic Sci Int. 1991; 49: 81-8.
2. Yokoi T, Sagisaka K. *Sex determination of blood stains with a recombinant DNA probe: comparison with radioactive and non-radioactive labeling methods*. Forensic Sci Int. 1989; 41: 117-24.
3. Chong SS, Kristjansson K, Cota J, Handyside AH, Hughes MR. *Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences*. Hum Mol Genet. 1993; 2: 1187-91.
4. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. *Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification*. Nature. 1990; 344: 768-70.
5. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. *Dual fluorescent in situ hybridisation for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei*. Hum Genet. 1992; 89: 18-22.