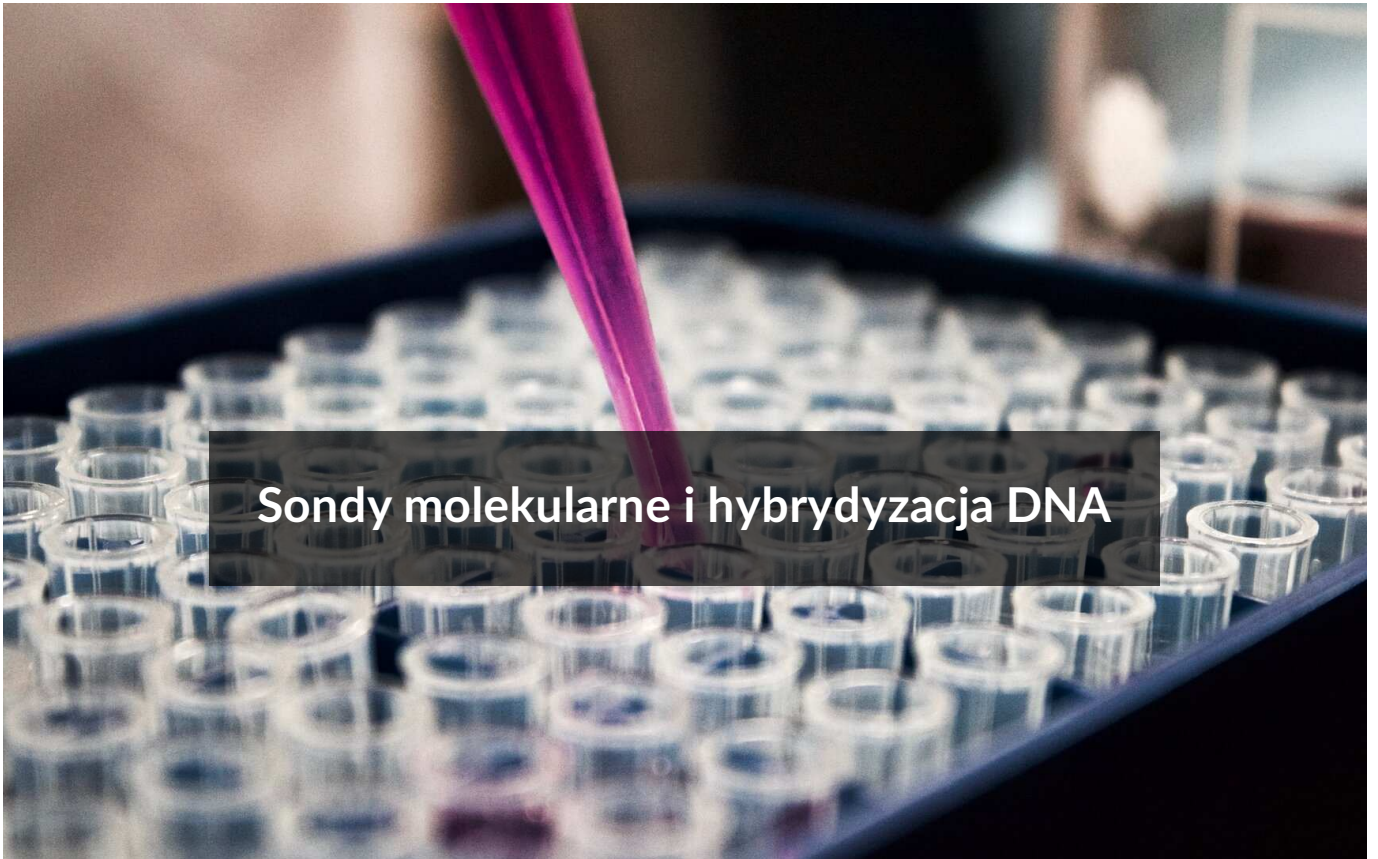




Sondy molekularne i hybrydyzacja DNA

- [Wprowadzenie](#)
- [Przeczytaj](#)
- [Film samouczek](#)
- [Sprawdź się](#)
- [Dla nauczyciela](#)



Sondy molekularne i hybrydyzacja DNA

Probówki Eppendorfa charakteryzują się dużą wytrzymałością mechaniczną i wysoką odpornością chemiczną, co sprawia, że są podstawowymi naczyniami reakcyjnymi używanymi w biologii molekularnej.

Źródło: Wikimedia Commons, domena publiczna.

Rozwój technik biologii molekularnej sprawił, że obecnie wiele chorób rozpoznawanych jest jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych. Możliwość wykrycia mutacji w genach pozwala bowiem na ich wczesną identyfikację i postawienie diagnozy. W tym celu wykorzystywane są głównie metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i hybrydyzacji DNA.

Twoje cele

- Wyjaśnisz, na czym polega denaturacja i renaturacja kwasów nukleinowych.
- Scharakteryzujesz typy hybrydyzacji.
- Omówisz znaczenie sondy molekularnej w badaniach genetycznych.

Przeczytaj

DNA – budowa i właściwości

Materiałem genetycznym większości organizmów jest DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*). Zbudowany jest on z dwóch nici (łańcuchów) polinukleotydowych tworzących strukturę podwójnej helisy. Struktura ta utrzymywana jest dzięki obecności wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi obu nici. Więcej informacji na temat budowy DNA znajdziesz w e-materiale [DNA jako nośnik informacji genetycznej](#).

Stabilizacja wiązań wodorowych zależy m.in. od stężenia soli oraz pH środowiska. Wahania tych parametrów mogą powodować destabilizację wiązań wodorowych. Natomiast wysoka temperatura (~95°C) jest głównym czynnikiem powodującym pękanie wiązań wodorowych. W konsekwencji dochodzi do separacji obu nici kwasu nukleinowego (dwuniciowego DNA). Proces rozdzielenia podwójnej nici kwasu nukleinowego określa się mianem **denaturacji** lub topnienia. Temperatura topnienia zależy od liczby par G-C: im jest ich więcej, tym temperatura musi być wyższa. Na denaturację wiązań wodorowych wpływa również obecność niektórych substancji chemicznych, takich jak [formamid](#).

Obniżenie temperatury lub usunięcie substancji denaturującej z badanej próby powoduje łączenie się komplementarnych jednoniciowych nici DNA w procesie zwanym **renaturacją**.

Ważne!

Temperatura, w jakiej 50% DNA ulega denaturacji, nazywa się temperaturą topnienia DNA (T_m).

Renaturacja – proces, podczas którego dochodzi do odtworzenia pierwotnie dwuniciowej struktury – stanowi jeden z przykładów hybrydyzacji. **Hybrydyzacja** to określenie używane do opisanego spontanicznego łączenia się nukleotydów różnych kwasów nukleinowych. W wyniku tego procesu może dojść do tworzenia się połączeń między pojedynczymi niemi: DNA-DNA, RNA-RNA lub DNA-RNA. Zarówno szybkość łączenia się, jak i stabilność powstałych odcinków zależą od długości fragmentów oraz podobieństwa sekwencji nukleotydów. Powstawanie stabilnych struktur dwuniciowych możliwe jest wtedy, gdy istnieją komplementarne odcinki kwasów nukleinowych o długości kilkunastu nukleotydów.

Zjawisko łączenia się komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych zostało wykorzystane w biologii molekularnej w **technice zwanej hybrydyzacją**. Polega ona na przyłączaniu wyznakowanych fragmentów kwasów nukleinowych do komplementarnych sekwencji. Takie wyznakowane izotopami lub chemicznie odcinki kwasów nukleinowych to **sondy molekularne**.

Sondy molekularne

Sondy molekularne mogą stanowić krótkie **oligonukleotydy** lub długie fragmenty kwasów nukleinowych. Ważną cechą sond molekularnych jest ich **znakowanie**, czyli przyłączenie określonych substancji (tzw. znaczników), które umożliwiają ich detekcję oraz wykrycie komplementarnych do nich fragmentów kwasów nukleinowych. Wcześniej sondy molekularne znakowane były głównie radioaktywnymi izotopami (^{32}P , ^{35}S , ^{14}C), jednak związane z nimi zagrożenia, powodujące niedogodności w pracy laboratoryjnej, doprowadziły do wynalezienia metod znakowania nieradioaktywnego. W tym celu wykorzystuje się **fluorofory** – substancje o zdolności do fluorescencji. Wśród nich wyróżnić można takie związki jak **fluoresceina**, **rodamina** czy **cyjaniny**.



Wodne roztwory związków o zdolności do fluorescencji w świetle UV: czerwony – rodamina B, niebieski – chinina, fioletowy – chinina oraz rodamina 6G, żółty – rodamina 6G, zielony – fluoresceina.

Źródło: Maxim Bilovitskiy, Wikimedia Commons, licencja: CC BY-SA 4.0.

Dla zainteresowanych

Do znakowania sondy molekularnej wykorzystywane są enzymy. Znakowanie końca 5' kwasu nukleinowego przeprowadza się przy użyciu kinazy polinukleotydowej, natomiast

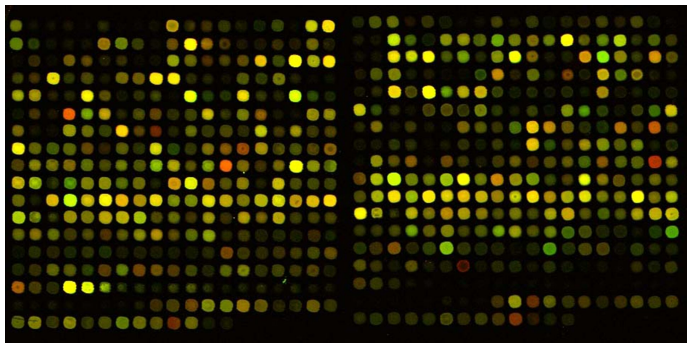
końca 3' – z pomocą terminalnej transferazy deoksynukleotydomowej.

Technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych

Jak wspomniano, sondy molekularne wykorzystywane są w technice zwanej hybrydyzacją. Reakcje hybrydyzacji mogą być przeprowadzane w różny sposób. Z tego względu wyróżnia się hybrydyzację typu *Southern blot* (metodą Southerna) oraz *northern blot*. Techniki te stanowią podstawowe narzędzia w badaniu pojedynczych genów. Do metod opartych na hybrydyzacji należy także fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, ang. *fluorescent in situ hybridization*), która służy do identyfikacji sekwencji DNA w chromosomach lub jądrach interfazowych.

Typ hybrydyzacji	Cel	Materiał	Typ analizy	Typ sondy	W
<i>Southern blot</i>	określenie lokalizacji lub wykrywanie obecności danej sekwencji DNA	wyzolowane DNA	DNA-DNA	sondy DNA znakowane izotopowo lub nieradioaktywnie	at n: re
<i>Northern blot</i>	identyfikacja określonej sekwencji RNA	wyzolowane RNA	RNA-DNA	sondy DNA znakowane radioaktywnie lub nieradioaktywnie	at n: re
Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	wykrywanie określonej sekwencji DNA	nienaruszone chromosomy, komórki	DNA-DNA	sondy DNA znakowane fluoroforami	m fi

Modyfikacją klasycznej hybrydyzacji jest metoda **mikromacierzy**, polegająca na rozmieszczeniu sond molekularnych na podłożu zwanym mikromacierzą (ang. *microarray*). Może to być płytka szklana lub plastikowa, na której nanoszone są



Fragment mikromacierzy dwukolorowej.

Źródło: Wikimedia Commons, sgn.cornell.edu, licencja: CC BY 2.5.

w regularnych odstępach sondy, różniące się sekwencjami. Do tych sond mogą przyłączać się cząsteczki DNA lub RNA, które będą wykazywały się wysokim stopniem komplementarności.

W przeciwieństwie do innych metod, w przypadku mikromacierzy znakowany jest materiał badany, a nie sondy.

Dzięki miniaturyzacji technika ta pozwala na jednoczesną analizę ekspresji wielu,

a czasami wszystkich genów w dwóch próbkach (np. pacjenta zdrowego i chorego). Materiał znajdujący się w obu próbkach znakowany jest różnymi barwnikami, tak aby możliwe było ich odróżnienie. Takie próbki kwasu nukleinowego hybrydują się z mikromacierzą. Cząsteczki wyznakowanego kwasu nukleinowego wiążą się do komplementarnych sekwencji sond na mikromacierzy.

Odczyt mikromacierzy wykonywany jest za pomocą metody obrazowania umożliwiającej ilościowy pomiar sygnału fluorescencyjnego. Intensywność sygnału dla poszczególnych sond mikromacierzy jest proporcjonalna do ilości w próbce kwasu nukleinowego o danej sekwencji związanego z sondą. W przypadku braku różnic w ekspresji genów widoczna barwa będzie wypadkową obu znaczników. Przewaga jednego z kolorów świadczy o większej ekspresji w próbce zawierającej barwnik o danej fluorescencji.

Gdzie wykorzystywana jest technika hybrydyzacji?

Technika hybrydyzacji wykorzystywana jest w diagnostyce nowotworów oraz chorób zakaźnych i o podłożu genetycznym (m.in. fenyloketonurii, hemofilii). W badaniach naukowych metody oparte na hybrydyzacji stosuje się w celu analizy struktury kwasów nukleinowych, identyfikacji sekwencji powtórzonych oraz śledzenia aktywności komórek. Hybrydyzacja DNA pozwala również na określenie pokrewieństwa ewolucyjnego, a także identyfikację żywności genetycznie zmodyfikowanej. Co więcej, metoda ta jest wykorzystywana do monitorowania zmian środowiska, w tym określania bioróżnorodności mikroorganizmów.

Słownik

autoradiografia

metoda obrazowania substancji promieniotwórczych

cyjanina

związek chemiczny emitujący fioletowe światło fluorescencyjne

fluoresceina

organiczny związek emitujący zielonożółte światło fluorescencyjne

formamid

organiczny związek należący do amin stosowany jako rozpuszczalnik

oligonukleotydy

fragment kwasu nukleinowego o długości od kilkunastu do kilkudziesięciu nukleotydów

rodamina

organiczny związek emitujący czerwone światło fluorescencyjne

sonda DNA znakowana fluorochromem

fragment jednoniciowego DNA znakowany substancjami o zdolnościach

fluorescencyjnych; fluorochromy absorbują promieniowanie o określonej długości fali,

a następnie emitują falę o innej długości fali

Trwa wczytywanie danych..

Sondy molekularne i hybrydyzacja DNA

Film dostępny pod adresem </preview/resource/R1KtqOLtmTtH9>

Sondy molekularne i hybrydyzacja DNA.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., Inga Wójtowicz, licencja: CC BY-SA 3.0.

Film opisuje sondy molekularne i zjawisko hybrydyzacji DNA.

Polecenie 1

Polecenie 2

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

Ćwiczenie 1



Zaznacz poprawne dokończenie zdania.

Denaturacja DNA polega na...

- usunięciu wiązań fosfodiestrowych z dwuniciowego DNA w wyniku działania wysokiej temperatury lub substancji denaturującej.
- rozdzieleniu dwuniciowego DNA w wyniku działania wysokiej temperatury lub substancji denaturującej.
- usunięciu wiązań nukleozydowych z dwuniciowego DNA w wyniku działania wysokiej temperatury lub substancji denaturującej.
- połączeniu dwuniciowego DNA w wyniku działania wysokiej temperatury lub substancji denaturującej.

Ćwiczenie 2



Wskaż twierdzenia zawierające fałszywe informacje.

- Temperatura topnienia DNA jest tym większa, im więcej zawiera on par G-C.
- Temperatura topnienia to temperatura, w której 50% DNA ulega denaturacji.
- Spontaniczne łączenie się pojedynczych nici DNA występuje tylko pomiędzy DNA-DNA.
- Renaturacja polega na rozdzieleniu dwuniciowego DNA w wyniku destabilizacji wiązań wodorowych.

Ćwiczenie 3



Podane terminy połącz z ich definicjami.

Znaczniki

Związki chemiczne wiążące się z określoną substancją i umożliwiające jej identyfikację.

Sondy molekularne

Substancje umożliwiające identyfikację określonej substancji poprzez jej barwienie lub fluorescencję.

Fluorofory

Wysoka temperatura, sole metali ciężkich lub wahania pH środowiska powodujące destabilizację i rozerwanie wiązań wodorowych.

Czynniki denaturujące

Substancje o zdolności do fluorescencji.

Ćwiczenie 4



Oceń, czy podane stwierdzenia są prawdziwe czy fałszywe.

Stwierdzenie	Prawda	Fałsz
Technika hybrydyzacji DNA wykorzystywana jest do identyfikacji obecności specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Powstawanie stabilnych struktur dwuniciowych możliwe jest wtedy, gdy istnieją komplementarne odcinki kwasów nukleinowych o długości kilku nukleotydów.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fluorofory łączą się z określonymi substancjami, umożliwiając ich identyfikację.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Technika hybrydyzacji wykorzystywana jest m.in. do wykrywania fenyloketonurii.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ćwiczenie 5



Typ hybrydyzacji	<i>Southern blot</i>	<i>Northern blot</i>	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)
Typ analizy	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Typ sondy	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

RNA-DNA

sondy DNA znakowane radioaktywnie

DNA-DNA

sondy DNA znakowane fluoroforami

sondy DNA znakowane izotopowo

DNA-DNA

Ćwiczenie 6



Uzupełnij tekst, wstawiając w puste miejsca odpowiednie wyrażenia.

polega na oddzieleniu od siebie dwóch nici DNA w wyniku zerwania wiązań . Proces ten zachodzi pod wpływem działania temperatury. temperatury powoduje nici DNA.

wodorowych

Obniżenie

niskiej

fragmentacja

nukleozydowe

Denaturacja DNA

wysokiej

połączenie

wzrost

fosfodiesterowe

wzrost

Ćwiczenie 7



Wyjaśnij, w jaki sposób fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* może stanowić narzędzie diagnostyczne.

Ćwiczenie 8



„Rak brodawkowy tarczycy, najczęstszy histotyp raka tarczycy, został po raz pierwszy przeanalizowany techniką mikromacierzy w roku 2001, kiedy grupa z laboratorium prof. de la Chapelle z Columbus, Ohio, opublikowała analizę 8 guzów i 8 tkanek zdrowych pobranych od tych samych chorych. W wyniku tej analizy wytypowano około 50 genów, z wyróżnieniem genów ulegających nadekspresji i wyciszeniu w tkankach raka (...). Te ostatnie zostały przeanalizowane nieco szerzej w kolejnej publikacji pod kątem ich znaczenia w transformacji nowotworowej komórki pęcherzykowej tarczycy. W odniesieniu do genów hamowanych autorzy największe znaczenie przypisali genowi *CITED1*, który był jednym z genów po raz pierwszy wiązanych z rakiem brodawkowym tarczycy przez to właśnie badanie”.

Barbara Jarzab, Elżbieta Gubała, Dariusz Lange, *Mikromacierze DNA i profil ekspresji genów raka brodawkowego tarczycy*, „Endokrynologia Polska” 2005, t. 56, nr 3, s. 293–301.

Na podstawie tekstu o analizie profili ekspresji genów raka brodawkowego tarczycy oraz własnej wiedzy wyjaśnij, jakie zastosowanie mogą mieć mikromacierze w terapiach przeciwnowotworowych.

Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan

Przedmiot: Biologia

Temat: Sondy molekularne i hybrydyzacja DNA

Grupa docelowa: uczniowie III etapu edukacyjnego – kształcenie w zakresie podstawowym i rozszerzonym

Podstawa programowa:

Zakres podstawowy

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

VIII. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

- 4) przedstawia zastosowania wybranych technik inżynierii genetycznej w medycynie sądowej, kryminalistyce, diagnostyce chorób;

Zakres rozszerzony

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

XV. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

- 4) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (hybrydyzacja DNA, analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);
- 5) przedstawia zastosowania wybranych technik inżynierii genetycznej w medycynie sądowej, kryminalistyce, diagnostyce chorób;

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- kompetencje obywatelskie;
- kompetencje cyfrowe;
- kompetencje osobiste, społeczne i w zakresie umiejętności uczenia się;
- kompetencje matematyczne oraz kompetencje w zakresie nauk przyrodniczych, technologii i inżynierii.

Cele operacyjne (językiem ucznia):

- Wyjaśniesz, na czym polega denaturacja i renaturacja kwasów nukleinowych.

- Scharakteryzujesz typy hybrydyzacji.
- Omówisz znaczenie sondy molekularnej w badaniach genetycznych.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- odwrócona klasa;
- z użyciem komputera;
- ćwiczenia interaktywne;
- praca z filmem samouczkiem;
- gwiazda pytań;
- gra dydaktyczna;
- mapa myśli.

Formy pracy:

- praca indywidualna;
- praca w parach;
- praca w grupach;
- praca całego zespołu klasowego.

Środki dydaktyczne:

- komputery z głośnikami, słuchawkami i dostępem do internetu;
- zasoby multimedialne zawarte w e-materiale;
- tablica interaktywna/tablica, pisak/kreda.

Przed lekcją:

1. Uczniowie zapoznają się z treścią w sekcji „Przeczytaj”.

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji oraz cele zajęć, omawiając lub ustalając razem z uczniami kryteria sukcesu.
2. **Wprowadzenie do tematu – gwiazda pytań.** Nauczyciel dzieli uczniów na 4-osobowe grupy, a następnie rozdaje im schematy gwiazdy pytań (zob. materiały pomocnicze). Objasnia uczniom, w jaki sposób powinni pracować ze schematem: na podstawie przeczytanego przed lekcją tekstu mają za zadanie odpowiedzieć na pytania widniejące na gwieździe.

Wybrani przez nauczyciela uczniowie kolejno prezentują wyniki prac swojego zespołu. Nauczyciel w razie potrzeby koryguje i uzupełnia informacje.

Faza realizacyjna:

1. **Praca z multimediami („Film samouczek”).** Uczniowie czytają polecenia do filmu samouczka zawartego w e-materiale, a następnie nauczyciel wyświetla multimediami. Po zapoznaniu się z filmem uczniowie, pracując w parach, wykonują polecenia. Chętne osoby przedstawiają rozwiązania na forum klasy. Pozostali uczniowie oceniają poprawność odpowiedzi. Ewentualne wątpliwości rozstrzyga nauczyciel.
2. **Praca w parach z treścią e-materiału.** Uczniowie na podstawie przeczytanego tekstu oraz informacji zawartych w medium w sekcji „Film samouczek” układają pytania do quizu dla innych par. Nauczyciel wraz z uczniami określa zasady rywalizacji i punktowania dobrych odpowiedzi (np. gra na czas lub na liczbę poprawnych odpowiedzi). Przeprowadzenie gry w klasie. Nauczyciel lub wybrany uczeń dba o prawidłowy przebieg quizu zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami. Nauczyciel ogłasza zwycięską parę.
3. **Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 7 („Wyjaśnij, dlaczego formamid jest substancją denaturującą DNA”) oraz ćwiczenie nr 8 („Wyjaśnij, dlaczego temperatura topnienia DNA zawierającego więcej par G-C jest wyższa niż tego, który zawiera więcej par A-T”) z sekcji „Sprawdź się”. Następnie w 4-osobowych grupach omawiają prawidłowe rozwiązanie. Po upływie wyznaczonego czasu wskazany przez nauczyciela przedstawiciel grupy prezentuje odpowiedź wraz z jej uzasadnieniem. Klasa ustosunkowuje się do niej. Nauczyciel udziela uczniom informacji zwrotnej.

Faza podsumowująca:

1. Klasa wspólnie wykonuje mapę myśli podsumowującą zajęcia.
2. Nauczyciel wyświetla treści zawarte w sekcji „Wprowadzenie” i na ich podstawie dokonuje podsumowania najważniejszych informacji przedstawionych na lekcji. Wyjaśnia także wątpliwości uczniów.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia od 1 do 6 z sekcji „Sprawdź się”.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella”, tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.

Załącznik 1. Gwiazda pytań.

Plik o rozmiarze 77.62 KB w języku polskim

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Uczniowie mogą przed lekcją zapoznać się z multimediami zamieszczonymi w sekcji „Film samouczek”, aby przygotować się do późniejszej pracy na zajęciach.