Łańcuchowa reakcja polimerazy

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Wirtualne laboratorium (WL-I)
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela

Łańcuchowa reakcja polimerazy

Reakcja łańcuchowej polimerazy prowadzona jest w urządzeniach zwanych termocyklerami. Pozwalają one na cykliczną zmianę temperatury mieszaniny reakcyjnej, umożliwiając przy tym kolejne etapy namnażania DNA.

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

Często zdarza się, że naukowcy, prowadząc badania, dysponują jedynie drobnymi fragmentami DNA. Tak jest np. w przypadku niezwykle cennych i niepowtarzalnych próbek pochodzących z wykopalisk. Dzięki technice łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR) możliwe jest powielenie łańcuchów DNA w krótkim czasie. Technika ta zrewolucjonizowała badania naukowe i obecnie jest wykorzystywana m.in. w biotechnologii, medycynie, archeologii, a także kryminalistyce.

Twoje cele

- Omówisz przebieg łańcuchowej reakcji polimerazy.
- Przedstawisz istotę łańcuchowej reakcji polimerazy.
- Opiszesz składniki mieszaniny reakcyjnej.
- Wyjaśnisz znaczenie łańcuchowej reakcji polimerazy.
- Przeprowadzisz doświadczenie polegające na amplifikacji fragmentu DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy.

Przeczytaj

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) to technika powielania materiału genetycznego w postaci DNA w ilościach sięgających milionów, a nawet miliardów kopii. Podczas reakcji uzyskuje się niemal eksponencjalny wzrost liczby kopii DNA, których długość wynosi od kilkuset do kilku tysięcy par zasad (w specyficznych warunkach). Metoda reakcji PCR opiera się na wielokrotnym powtarzaniu określonych etapów, które zachodzą w różnych temperaturach, a każda zmiana temperatury wyznacza koniec danego etapu. Proces ten został opracowany w USA w 1983 r. przez zespół **Kary'ego Mullisa.** Mullis w 1993 r. otrzymał za PCR Nagrodę Nobla.

Łańcuchową reakcję polimerazy przeprowadza się w mieszaninie reakcyjnej o zdefiniowanym składzie.

Mieszaninę reakcyjną poddawaną reakcji PCR umieszcza się w probówkach Eppendorf.
źródło: Niharb, Flickr, licencja: CC BY-NC-ND 2.0)

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- matrycowe DNA,

- mieszanina nukleotydów (dNTP),
- startery,
- termostabilna polimeraza DNA,
- bufor,
- roztwór tRNA (opcjonalnie),
- wskaźniki informujące o przebiegu reakcji (głównie w modyfikacjach reakcji PCR).

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi **matrycowe DNA**, które posłuży jako podstawa do namnożenia określonego fragmentu. Może to być DNA genomowe wyizolowane z danego organizmu, plazmid, izolat DNA z próbki biologicznej o nieznanej sekwencji czy wcześniej uzyskany fragment DNA.

Przed użyciem danej próbki jako matrycy w reakcji PCR warto określić jej stężenie oraz czystość. Zbyt duże stężenie DNA matrycowego może wpłynąć negatywnie na przebieg reakcji. Ten sam skutek może wywołać zanieczyszczenie próbki odczynnikami chemicznymi, które zostały zastosowane podczas izolacji materiału genetycznego.

W zależności od celu wykorzystania reakcji PCR projektuje się odpowiednie **startery (primery)**, które pozwalają na wyznaczenie końców powielanej sekwencji DNA i umożliwiają przyłączenie enzymu – **polimerazy DNA**. Startery to krótkie sekwencje DNA, zawierające zazwyczaj ok. 20 nukleotydów (w zależności od zastosowania techniki PCR liczba nukleotydów w starterach może być inna). Aby powielić fragment DNA, niezbędne są dwa startery, określane jako przedni (ang. *forward*) oraz wsteczny (ang. *reverse*). Starter przedni jest identyczny z sekwencją powielaną, a starter wsteczny to odcinek do niej komplementarny.

Ważnym parametrem stosowanych starterów jest ich temperatura topnienia (Tm). Parametr ten posłuży do ustalenia temperatury przyłączania starterów do matrycy w czasie reakcji.

Prosty wzór, pozwalający na obliczenie Tm startera, to:
Tm = [2 °C x (A + T) + 4 °C x (G + C)],
gdzie A+T oznacza sumę adenin i tymin w sekwencji, a G + C to suma guanin i cytozyn.

Obecność starterów pozwala na przyłączenie do kompleksu DNA-starter **polimerazy DNA**. Jest to enzym, który odpowiada za katalizowanie syntezy DNA na matrycy DNA (polimeraza DNA zależna od DNA). W przypadku reakcji PCR używa się termostabilnych polimeraz DNA, które nie ulegają denaturacji w wysokich temperaturach. Jest to szczególnie ważna cecha –

denaturację DNA w reakcji PCR osiąga się przez ogrzanie mieszaniny do temperatury 95–98°C. Do polimeraz opornych na działanie wysokiej temperatury zalicza się polimeraza *Taq* wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus*. Polimeraza *Taq* osiąga optimum swojej aktywności w przedziale 75–80°C, lecz najczęściej stosowana temperatura w etapie wydłużania (gdy polimeraza jest aktywna) to 72°C. Podczas syntezy nowych nici DNA polimeraza zużywa **nukleotydy**, które dostarczone są w postaci mieszaniny. Mieszanina ta często opisywana jest jako dNTP (trifosforany deoksynukleotydów), a w jej skład wchodzą: dATP, gGTP, dCTP oraz dTTP, odpowiadając kolejno: nukleotydowi adeninowemu, guaninowemu, cytozynowemu i tyminowemu. Trifosforany deoksynukleotydów dostarczane są do mieszaniny reakcyjnej w nadmiarze, a przy nieudanej reakcji PCR można zaobserwować ich obecność po analizie elektroforetycznej w postaci charakterystycznej „chmury".

Do prawidłowej pracy polimerazy niezbędne jest zapewnienie odpowiednich warunków, czemu służy dodanie do mieszaniny reakcyjnej **buforu**. Każda polimeraza do reakcji PCR ma przypisany do siebie bufor, który zawiera np. niezbędne do aktywności enzymu jony. Ponadto bufor odpowiada za zapewnienie odpowiedniego pH mieszaniny reakcyjnej. Dla prawidłowego działania polimerazy *Taq* niezbędne są jony magnezu (Mg^{2+}). Częstym składnikiem buforów są także barwniki, które pozwalają na śledzenie migracji DNA w czasie elektroforezy. Całość przygotowanej mieszaniny powinna mieścić się w zakresie 10–50 µL – końcową objętość próbki uzyskuje się przez dodanie **ultraczystej wody laboratoryjnej**.

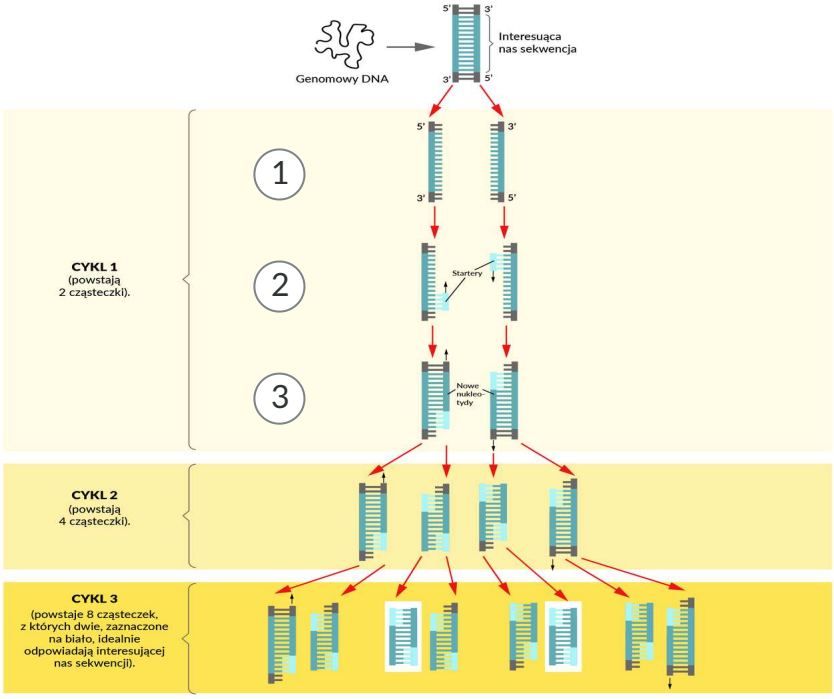
Komercyjnie dostępne są mieszaniny do reakcji PCR, które zawierają wszystkie niezbędne niezmienne składniki reakcji oprócz DNA matrycowego oraz starterów. Każda z mieszanin opatrzona jest opisem wykorzystanej w niej polimerazy oraz zalecanych warunków przeprowadzania reakcji. Mieszaniny te wymagają rozcieńczenia wodą, gdyż przygotowane są w formie zatężonej. Pozwala to na dodanie różnych ilości matrycowego DNA oraz starterów w zależności od ich stężenia.

Przygotowaną mieszaninę reakcyjną umieszcza się w małych probówkach, zwanych także PCR-ówkami. Probówki te są następnie wkładane do termocyklera. Urządzenia tego rodzaju wyposażone są w bloki grzejne, które odpowiadają za ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej do odpowiedniej temperatury. Ponad komorą z blokiem grzejnym znajduje się zamykana pokrywa z funkcją grzania. Ustawienie wysokiej temperatury pokrywy pozwala zapobiec parowaniu mieszaniny i skraplaniu się na wieczku PCR-ówki. Termocykler ma także oprogramowanie, na którym można ustalić przebieg reakcji PCR, liczbę cykli oraz wartość temperatury i czas trwania poszczególnych etapów.

Przebieg PCR

Reakcja PCR składa się z trzech etapów:

- denaturacji,
- przyłączania,
- elongacji.



1

Denaturacja

Mieszanina reakcyjna zostaje podgrzana do 95°C. W tej temperaturze dochodzi do denaturacji matrycowego DNA. Rozerwaniu ulegają wiązania wodorowe i helisa ulega rozpleceniu. Efektem tego jest otrzymanie jednoniciowych fragmentów DNA, do których mogą przyłączyć się sekwencje starterów. Działanie wysoką temperaturą na DNA trwa ok 15 sekund.

2

Przyłączanie (hybrydyzacja; ang. annealing)

Temperatura mieszaniny ulega obniżeniu do 40°C – 60°C, w zależności od obliczonej temperatury topnienia starterów. Startery samoistnie odnajdują komplementarne sekwencje na jednoniciowych fragmentach DNA. Dodatek nadmiaru starterów do mieszaniny zapewnia wysokie prawdopodobieństwo przyłączenia tych sekwencji do nici matrycowych, w porównaniu do połączenia pojedynczych nici DNA w helisę. Dzięki utworzonemu

kompleksowi DNA-starter możliwe jest przyłączenie polimerazy DNA. Etap hybrydyzacji trwa około 20 sekund.

3

Elongacja

Temperatura mieszaniny ustawiana jest w zakresie optimum działania enzymu, który został użyty w reakcji, np. 72°C dla polimerazy Taq. Dzięki stworzonej w etapie annealingu strukturze dwuniciowej (DNA-starter) możliwe jest rozpoczęcie pracy przez polimerazę, która syntetyzuje komplementarną nić przy użyciu dostarczonych do mieszaniny dNTP. Etap ten to właściwa synteza DNA prowadząca do jego zwielokrotnienia. Czas trwania wydłużania zależny jest od wydajności użytej polimerazy (ilości dobudowywanych nukleotydów do nowej nici w jednostce czasu) oraz wielkości spodziewanego produktu.

Przebieg reakcji PCR.
Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Wszystkie trzy etapy powtarzane są cyklicznie ok. 25–35 razy. Z każdym kolejnym cyklem zwiększa się ilość matrycy, na bazie której syntezowane są nowe odcinki DNA. Efektem tego jest niemal eksponencjalny wzrost liczby kopii DNA, którego końce wyznaczone zostały sekwencjami starterów. Nie jest jednak zalecane nadmierne powtarzanie cykli ze względu na wzrastające prawdopodobieństwo błędów wynikających z nieprawidłowej pracy polimerazy.

Po zakończeniu ustalonej liczby cykli przeprowadza się elongację kończącą. Etap ten zachodzi w tych samych warunkach, co zwykła elongacja, lecz wydłuża się czas jej trwania. Zapewnia to polimerazie, która syntezuje wszystkie nieskończone wcześniej fragmenty DNA, odpowiedni czas działania. Cały proces może trwać kilka godzin.

Ostatnim etapem, który można ustawić w programie termocyklera, to chłodzenie. Temperatura bloku grzejnego spada wtedy do 4°C, dzięki czemu pozostawione w aparaturze DNA nie ulega szybkiej degradacji.

Zalety i wady PCR

Zalety
• szybkość reakcji, • niskie koszty,

- wysoka czułość – wykrywa pojedynczą cząsteczkę DNA,
- specyficzność; pozwala na powielanie jednego, określonego odcinka DNA (pod warunkiem doboru odpowiednich starterów).

Wady

Wykorzystanie PCR

Możliwość szybkiego powielenia materiału genetycznego w reakcji PCR umożliwia jej wykorzystanie w wielu dziedzinach. Jest jednym z podstawowych narzędzi w biotechnologii; służy m.in. do namnażania genów, tworzenia konstruktów do delecji lub nadekspresji genów, genotypowania, wykrywania mutacji czy identyfikacji mikroorganizmów. Modyfikacja reakcji PCR (qRT-PCR – ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy) pozwala na analizę ekspresji genów oraz na powielenie DNA z bezcennych i niepowtarzalnych próbek, np. pochodzących z wykopalisk archeologicznych.

W medycynie reakcja PCR znalazła zastosowanie w diagnostyce chorób (poprzez wykrywanie genów organizmów patogennych), także prenatalnie, onkologii (analiza profili ekspresji genów związanych z procesami nowotworzenia), transplantologii (wykrywanie zakażenia cytomegalowirusem), czy ustalaniu rodzicielstwa.

Technika PCR to także przydatne narzędzie w walce z przestępczością. Analiza śladów DNA pozostawionych na miejscu przestępstw pozwala na wykluczenie lub wskazanie potencjalnego sprawcy (przez analizę porównawczą namnożonych w reakcji PCR krótkich sekwencji tandemowych), a także ustalenie tożsamości osób zaginionych lub odnalezionych zwłok.

Słownik

denaturacja DNA

separacja dwuniciowej helisy DNA na fragmenty jednoniciowe; zachodzi dzięki zerwaniu wiązań wodorowych na skutek działania wysokiej temperatury; proces odwracalny

elongacja

synteza komplementarnej nici DNA na bazie DNA matrycowego przez polimerazę DNA

przyłączanie, hybrydyzacja

(ang. *annealing*) proces przyłączania sekwencji starterowych do jednoniciowego DNA matrycowego, w wyniku tworzy się kompleks DNA-starter

PCR

ang. *polymerase chain reaction*; reakcja łańcuchowej polimerazy; technika laboratoryjna biologii molekularnej pozwalająca na powielanie wybranego odcinka DNA *in vitro*

temperatura topnienia

temperatura, w której połowa z nici DNA występuje w postaci jednoniciowej; temperatura równowagi pomiędzy stanem dwuniciowym a jednoniciowym DNA, umożliwiająca przyłączenie sekwencji starterowej do pojedynczych nici

termocykler

urządzenie laboratoryjne służące do przeprowadzenia reakcji PCR, zaopatrzone w blok grzejny, w którym umieszcza się probówki z mieszaniną reakcyjną; zapewnia optymalną temperaturę dla każdego z etapów reakcji, zdefiniowaną we wcześniej zaprogramowanych ustawieniach

termostabilna polimeraza

enzym syntetyzujący wydłużanie nici DNA o podwyższonej oporności na wysoką temperaturę (95°C), w której nie ulega denaturacji

trifosforany deoksyrybonukleozydowe

zmodyfikowane nukleozydy zbudowane z trzech reszt kwasu fosforowego połączonych dwoma wiązaniami wysokoenergetycznymi

Wirtualne laboratorium (WL-I)

Laboratorium 1

Przeprowadź doświadczenie w laboratorium. Rozwiąż problem badawczy i zweryfikuj hipotezę. Zapisz uzyskane wyniki w formularzu, a następnie ustal wnioski.

Temat: Amplifikacja fragmentu DNA metodą PCR

Problem badawczy: Czy badana próbka zawiera DNA o szukanym fragmencie?

Hipoteza 1: W badanej próbie jest obecne DNA o danej sekwencji.

Hipoteza 2: W badanej próbie nie występuje DNA o tej sekwencji.

Sprzęt laboratoryjny:

- probówki Eppendorfa
- termocykler
- pipeta automatyczna
- kuweta z lodem
- aparat do elektroforezy

Materiały

- bufor 10x stężony (odpowiedni dla danej polimerazy) zawierający 15 mM $MgCl_2$
- nukleotydy dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; mieszanina nukleotydów o stężeniu 10 mM każdy)
- startery: 10 M każdy
- matryca (np. DNA plazmidowy, całkowity genomowy DNA)

- woda destylowana sterylna
- polimeraza *Taq*

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

Analiza doświadczenia: *Amplifikacja DNA metodą PCR*.

Problem badawczy: Czy badana próbka zawiera DNA o szukanym fragmencie?

Hipoteza 1: W badanej próbie jest obecne DNA o danej sekwencji.

Hipoteza 2: W badanej próbie nie występuje DNA o tej sekwencji.

Wyniki

Wnioski

Weryfikacja hipotezy

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:

Ćwiczenie 1

Połącz etap łańcuchowej reakcji polimerazy z jego opisem.

Hybrydyzacja	Zachodzi w 95°C, wiązania wodorowe ulegają rozerwaniu, a helisa rozpleceniu.
Elongacja	Startery odnajdują komlementarne sekwencje DNA.
Denaturacja	Właściwa synteza DNA, dochodzi do zwielokrotnienia materiału genetycznego.

Ćwiczenie 2

Zaznacz wszystkie niezbędne składniki mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR.

- [ ] Roztwór mRNA
- [ ] Termostabilna polimeraza DNA
- [ ] Matrycowe DNA
- [ ] Odpowiednio skonstruowane startery
- [ ] Bufor
- [ ] Trójfosforany deoksyrybonukleozydów

Ćwiczenie 3

Ułóż w kolejności etapy reakcji PCR.

- Powstanie matryc.
- Rozerwanie wiązań wodorowych i rozplecenie helisy.
- Zwielokrotnienie DNA.
- Podwyższenie temperatury do 72°C.
- Przyłączenie starterów do komplementarnej sekwencji DNA.
- Podgrzanie mieszaniny reakcyjnej do 95°C.
- Obniżenie temperatury do 40–60°C.

Ćwiczenie 4

Oceń prawdziwość stwierdzeń.

Stwierdzenie	Prawda	Fałsz
Łańcuchowa reakcja polimerazy wykorzystywana jest do powielania próbek DNA oraz RNA.	○	○
Startery używane w PCR to fragmenty DNA o długości ok. 100 nukleotydów.	○	○
W wyniku podgrzania mieszaniny reakcyjnej do 95°C dochodzi do denaturacji DNA.	○	○

Ćwiczenie 5

Wskaż wszystkie zalety PCR.

- [ ] Jest specyficzna, tzn. można nią powielić jeden konkretny fragment DNA z wielu różnych obecnych w próbce.
- [ ] Pojawia się hamujące działanie wysokiego stężenia matrycy.
- [ ] Występuje możliwość zmiany sekwencji nukleotydowej przez polimerazę.
- [ ] Jest to szybka i tania reakcja.
- [ ] Ma wysoką czułość.

Ćwiczenie 6

Oblicz temperaturę topnienia dla startera o podanej sekwencji:

ATTGCATGAACGTACGGTAC

Ćwiczenie 7

Wyjaśnij, dlaczego polimeraza DNA używana w PCR musi być termostabilna.

Ćwiczenie 8

Podaj, w jakich sytuacjach metoda PCR może okazać się pomocna dla badaczy, i w jakich dziedzinach nauki znajduje zastosowanie.

Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan
Przedmiot: Biologia

Temat: Łańcuchowa reakcja polimerazy

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:

3) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

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);

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- 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):

- Omówisz przebieg łańcuchowej reakcji polimerazy.
- Przedstawisz istotę łańcuchowej reakcji polimerazy.
- Opiszesz składniki mieszaniny reakcyjnej.
- Wyjaśnisz znaczenie łańcuchowej reakcji polimerazy.

- Przeprowadzisz doświadczenie polegające na amplifikacji fragmentu DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- z użyciem komputera;
- ćwiczenia interaktywne;
- rozmowa kierowana;
- ćwiczenia laboratoryjne;
- 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;
- arkusze papieru, flamastry.

Przed lekcją:

1. **Przygotowanie do zajęć.** Nauczyciel loguje się na platformie i udostępnia uczniom e-materiał „Łańcuchowa reakcja polimerazy". Prosi uczestników zajęć o rozwiązanie ćwiczenia nr 1 (w którym należy zaznaczyć składniki mieszaniny reakcyjnej) oraz ćwiczenie nr 2 (w którym należy wskazać zdania fałszywe dotyczące tematu zajęć) z sekcji „Sprawdź się" na podstawie treści w sekcji „Przeczytaj".

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla zawartość sekcji „Wprowadzenie". Uczniowie wspólnie z nauczycielem omawiają cele lekcji i określają kryteria sukcesu.
2. **Wprowadzenie do tematu.** Nauczyciel prowadzi pogadankę, zadając pytania:
   – W jakim celu przeprowadza się łańcuchową reakcję polimerazy?

– W jakich sytuacjach metoda PCR może okazać się pomocna dla badaczy i w jakich dziedzinach nauki może ona znaleźć zastosowanie?

Faza realizacyjna:

1. **Mapa myśli.** Nauczyciel dzieli uczniów na grupy i rozdaje im arkusze papieru A1 oraz flamastry. Omawia zasady tworzenia mapy myśli: uczniowie mają na podstawie e-materiału w graficzny sposób uporządkować oraz zapisać informacje dotyczące składników mieszaniny reakcyjnej oraz przebiegu PCR. Nauczyciel kontroluje pracę grup, w razie potrzeby wyjaśnia wątpliwości uczniów. Po upływie wyznaczonego czasu chętne osoby prezentują mapy myśli wykonane przez swoją grupę.
2. **Praca z multimedium („Wirtualne laboratorium (WL-I)").** Uczniowie przeprowadzają doświadczenie w wirtualnym laboratorium dotyczące amplifikacji fragmentu DNA metodą PCR. Rozwiązują problem badawczy i weryfikują hipotezę. W formularzu zapisują uzyskane wyniki, a następnie formułują wnioski. Wybrane osoby przedstawiają swoje odpowiedzi na forum klasy.
3. **Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 7 (w którym mają za zadanie wyjaśnić, dlaczego polimeraza DNA używana w PCR musi być termostabilna) 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. Uczniowie wykonują ćwiczenie nr 5 (w którym mają za zadanie wskazać zalety PCR) z sekcji „Sprawdź się". Chętne osoby prezentują swoją odpowiedź.
2. Zalogowany na platformie nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji i cele zawarte w sekcji „Wprowadzenie". W tym kontekście podsumowuje omówione zagadnienia.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia nr 3 i 4 oraz 6 z sekcji „Sprawdź się".

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella", tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.
- „Encyklopedia szkolna. Biologia", red. Marta Stęplewska, Robert Mitoraj, Wydawnictwo Zielona Sowa, Kraków 2006.

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Nauczyciel może wykorzystać medium zamieszczone w sekcji „Wirtualne laboratorium (WL-I)" do podsumowania lekcji.