



METODY MOLEKULARNE STOSOWANE W TAKSONOMII

AUTOR: MAGDALENA DUDEK

Taksonomia jest nauką, której głównym celem jest badanie, opisywanie oraz klasyfikacja organizmów. W oparciu o różnice i podobieństwa łączy się organizmy niższej taksonomicznie rangi w coraz to wyższej jednostki (np. gatunki w rodzaju, rodzaje w rodziny itd.), dążąc do opracowania **hierarchicznego systemu klasyfikacji organizmów**.

Od zarania dziejów taksonomia opierała się na łatwo obserwowalnych przesłankach. Początkowo były to dane morfologiczne, z czasem istotne okazały się także wyniki badań anatomicznych czy też cytologicznych. Obecnie coraz większą rolę w klasyfikacji organizmów odgrywają również nauki eksperymentalne. Liczne badania potwierdziły dużą przydatność wyników takich badań w rozwiązywaniu problemów taksonomicznych. Współczesna taksonomia korzysta z doświadczeń wielu dziedzin biologii, takich jak genetyka, cytologia, ekologia, biogeografia czy biologia molekularna.

Naukowcy dążą do tworzenia systemów klasyfikacyjnych, które odzwierciedlają **filogenezę**, czyli pokrewieństwo danej grupy organizmów. Uzyskanie tego jest możliwe dzięki badaniom prowadzonym na materiale genetycznym (sekwencje DNA) przy wykorzystaniu technik biologii molekularnej.

Co trzeba zrobić aby system klasyfikacji badanej grupy organizmów pokazywał ich pokrewieństwo a nie tylko podobieństwo? Krok pierwszy zanim przystąpisz do badań filogenetycznych to wybór odpowiedniej sekwencji DNA (jednej lub lepiej kilku) z genomu. Sekwencję taką nazywamy markerem molekularnym.

Wybór markera molekularnego do badań taksonomicznych

Pierwszym krokiem badań jest odpowiedni wybór markera molekularnego do analizy. Markery molekularne to odcinki kwasów nukleinowych o znanej sekwencji nukleotydów. Mogą to być sekwencje kodujące (geny) lub też przerywniki między genowe.

Jest to jeden z ważniejszych etapów. Dobór zbyt zmiennej sekwencji może uniemożliwić właściwe dopasowanie analizowanych fragmentów DNA. Natomiast analiza zbyt konserwatywnych (czyli mało zmiennych) markerów może nie dostarczyć żadnych informacji na temat powiązań filogenetycznych w obrębie badanej grupy.

Pod pojęciem zmienności mam na myśli różnice w obrębie sekwencji DNA danego markera. Dlatego też jego wybór zależy od rangi taksonomicznej badanej grupy organizmów. Decyzję



o wyborze markera do naszych badań należy podjąć po przeprowadzeniu wstępnych badań pilotażowych.

W taksonomii molekularnej roślin do badań wykorzystać można informacje zapisane w genomach: chloroplastowym (cpDNA), jądrowym oraz mitochondrialnym (mtDNA).

Najczęściej wybierane markery:

a) sekwencje chloroplastowe (cpDNA)

- ***rbcL*** – gen o długości ~1 500 par zasad, kodujący dużą podjednostkę karboksylazy rybulozo- 1,5-bisfosforanu (RUBISCO), kluczowego enzymu w fotosyntezie; ze względu na pełnioną funkcję gen ten jest niezwykle silnie konserwatywny ewolucyjnie; używany jest w filogenezie na wyższych poziomach taksonomicznych takich jak: rodzina, rząd czy klasa,
- ***matK*** – marker o długości ~1 500 par zasad, położony wewnątrz intronu zlokalizowanego w obrębie genu ***trnK*** (tRNA dla lizyny); u większości roślin sekwencja ta występuje w postaci niefunkcjonalnego pseudogenu co warunkuje jej szybkie tempo ewolucji, najszybsze spośród wszystkich markerów chloroplastowych; ***matK*** używany jest do badań na poziomach takich jak: rodzaj, plemię czy rodzina,

b) sekwencje jądrowe

- **nrDNA** – stanowią dużą rodzinę genów jądrowych kodujących rybosomalne białka oraz rRNA (budujące podjednostki rybosomy), charakteryzują się one dużą powtarzalnością oraz tandemowym rozmieszczeniem w genomie; najczęściej używanym markerem nrDNA są regiony **ITS** (Internal Transcribed Spacer, wewnętrzny transkrybowany przerywnik); są to dwie sekwencje niekodujące rozdzielające geny dla małej i dużej podjednostki rybosomy, transkrypty ITS biorą udział w dojrzewaniu rybosomy, nie są jednak włączane w jego strukturę, brak znaczącej funkcjonalności warunkuje szybkie tempo ewolucji tych sekwencji, przez co używane są w filogenezie na niskich poziomach taksonomicznych, jak rodzaj, gatunek a nawet populacja,
- **niskokopijne geny jądrowe** (np. ***Xdh*** jest to gen kodujący dehydrogenazę ksantynową, która jest odpowiedzialna za regulację metabolizmu puryn; pomimo konserwatywności jakim się charakteryzuje z powodzeniem stosowany nawet na niższych poziomach taksonomicznych takich jak: rodzina,

c) sekwencje mitochondrialne (mtDNA)

- geny mtDNA były dotychczas szerzej wykorzystywane w systematyce zwierząt, niemniej genom mitochondrialny roślin również zawiera sekwencje potencjalnie używane w badaniach filogenetycznych; dotychczas używane i najlepiej poznane to ***cox1*** i ***atpA***,



należą one do genów konserwatywnych, ich bardzo wolne tempo ewolucji pozwala na wykorzystywanie w badaniach na poziomach rodziny, rzędu czy klasy.

Co trzeba zrobić w laboratorium aby uzyskać sekwencje DNA (wybranego markera molekularnego) dla badanej grupy organizmów? Do tego celu wykorzystuje się podstawowe techniki biologii molekularnej, takie jak: izolacja genomowego DNA, technika PCR, sekwencjonowanie DNA.

Izolacja DNA

Izolacja (ekstrakcja) DNA to proces mający na celu otrzymanie czystego genomowego DNA z tkanki roślinnej. Genom jest to całość informacji zawartej w komórce. Do izolacji najczęściej wykorzystuje się fragmenty liści (suchą lub świeżą masę roślinnej) ale można też wykorzystywać kwiaty lub owoce.

Głównym celem izolacji jest uzyskanie wysokiej jakości i czystości materiału biologicznego. Istnieje wiele procedur izolacji DNA, wybór odpowiedniej metody zależy m. in. od: przeznaczenia naszego izolatu (PCR, klonowanie), rodzaju materiału z jakiego przeprowadzamy izolację (tkanka, organ, hodowla komórkowa) czy pochodzenia materiału (roślinne, zwierzęce, bakteryjne, wirusowe).

Niezależnie od zastosowanej procedury większość metod opiera się na kilku podstawowych i niezmiennych etapach.

ETAPY IZOLACJI DNA

Etap 1. Przygotowanie materiału biologicznego do izolacji (oczyszczenie, homogenizacja, zawieszenie w buforze).

Etap 2. Dezintegracja i liza komórek oraz uwolnienie DNA do roztworu, w którym jest on rozpuszczalny i zabezpieczony przed degradacją.

- rozbicie ściany i błony komórkowej
- uwolnienie DNA i innych komponentów wewnątrzkomórkowych do roztworu
- inaktywacja enzymów nukleolitycznych

Etap 3. Oddzielenie kwasu nukleinowego od pozostałych komponentów komórkowych:

- dysocjacja kompleksów DNA – białko
- oddzielenie DNA od innych rozpuszczalnych komponentów komórkowych

Etap 4. Zagęszczenie preparatu DNA i usunięcie zanieczyszczeń małowcząsteczkowych (uzyskanie roztworu DNA o pożądanej czystości i gęstości).



Technika PCR

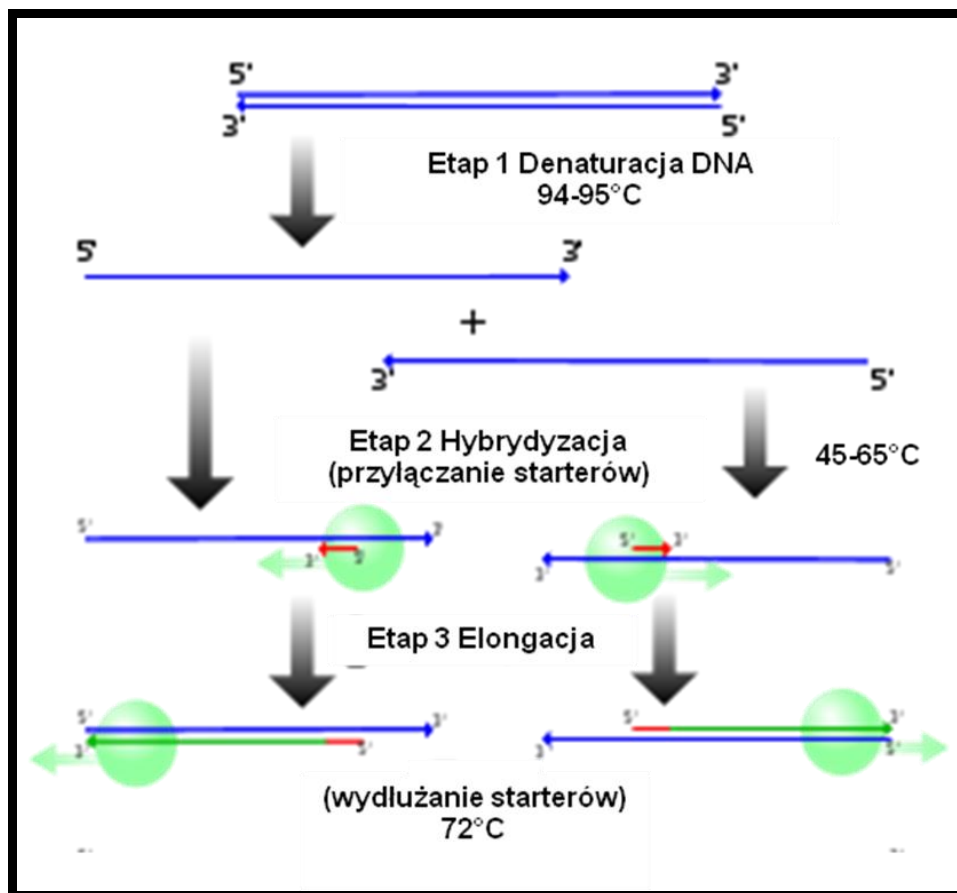
PCR (Polimerase Chain Reaction, Reakcja Łańcuchowa Polimerazy) jest podstawową i powszechnie stosowaną w biologii molekularnej techniką pozwalającą na amplifikację (powielenie) wybranego fragmentu DNA *in vitro*. Obecnie reakcja jest w pełni zautomatyzowana i przeprowadza się ją w urządzeniu zwanym termocyklerem, które pozwala na selektywną kontrolę jej warunków.

Podstawowym założeniem reakcji PCR jest możliwość wielokrotnego powielenia konkretnej sekwencji z użyciem jako matrycy całego genomowego DNA. Możliwe jest to dzięki zastosowaniu krótkich, jednoniciowych fragmentów DNA zwanych primerami (starterami) w obecności enzymu polimerazy oraz wolnych nukleotydów.

W reakcji używa się primerów komplementarnych do sekwencji flankujących amplifikowany fragment. Amplifikacji podlega segment DNA położony między regionami o znanej sekwencji nukleotydowej. Nowe kopie powielonej sekwencji DNA syntetyzowane są w serii cykli. Każdy cykl składa się z następujących etapów:

- **Denaturacja matrycowego DNA** – zachodzi w temperaturze 94-95 stopni C, w obecności dNTP (trójfosforany A, T, G i C) oraz dużego nadmiaru oligonukleotydów (primerów). W tym etapie dwuniciowy DNA ulega dysocjacji do pojedynczych nici dając tym samym możliwość przyłączenia się primerów w następnym etapie.
- **Przylączenie primerów (hybrydyzacja)** – startery przyłączają się do sekwencji homologicznych w matrycowym DNA, co następuje po ochłodzeniu mieszaniny do 45-65 stopni Celcjusza.
- **Wydłużanie primerów (elongacja)** – polimeraza przyłącza się do matrycy i następuje wydłużenie primerów, zachodzi to w temperaturze 72 stopni C, co w rezultacie pozwala na syntezę fragmentu DNA. Po zakończeniu etapu wydłużania następuje wzrost temperatury powyżej 90 stopni C i zachodzi ponowna denaturacja.

Każdy cykl składający się z powyżej opisanych 3 etapów powtarzany jest wielokrotnie (od 25 do 45 razy). Liczba cykli zależna jest od zakładanej ilości produktu jaką chcemy otrzymać. Im większa ilość cykli tym większa ilość kopii DNA, gdyż ich liczba wzrasta wykładniczo w każdym cyklu. Produktem reakcji jest dwuniciowy DNA którego końcami są końce 5' primerów o długości określonej przez odległość pomiędzy primerami a tzw. tępyimi końcami 3' (należy pamiętać że synteza nowej nici DNA zachodzi zawsze w kierunku 5' do 3').



Ryc. 1 Schemat jednego cyklu reakcji PCR

SKŁAD MIESZANINY REAKCYJNEJ

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi:

- bufor reakcyjny (zawierający min. $MgCl_2$)
- trójfosforany dNTP
- mieszaniny primerów
- termostabilna polimeraza DNA Taq
- próbka matrycowego DNA.

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA PRZEBIEG REAKCJI PCR

Przebieg amplifikacji zależy od wielu czynników. Do najważniejszych z nich należą min. stężenie jonów magnezy, stężenie dNTP, jakość wyjściowej matrycy DNA oraz temperatura przyłączania primerów i stopień ich komplementarności z matrycą.



- Jednym ze składników buforu reakcyjnego jest roztwór chlorku magnezu. Obecność jonów magnezu jest niezbędna, pierwiastek ten jest bowiem kofaktorem enzymu polimeraza i warunkuje jego aktywność.
- Ilość matrycy DNA jest teoretycznie dowolna niemniej końcowe stężenie powinno zawierać się w przedziale 200ng do 1μg. Jakość matrycy zależy od stopnia jej zdegradowania (fragmentacji) w wyjściowej próbce. Im krótsze są fragmenty DNA tym mniejsza wydajność amplifikacji.
- Temperatura przyłączania primerów zależy od ich długości, temperatury topnienia i specyficzności ich łączenia z matrycowym DNA. Primer powinien mieć długość od 16 do 30 nukleotydów, przy czym optymalna długość to 22-28. W zbyt niskiej temperaturze przyłączania primery mogą łączyć się z matrycą niespecyficznie tzn. w miejscach gdzie ich sekwencje wykazują się tylko częściową komplementarnością. Prowadzi to do powstania produktów niespecyficzných.
- Trifosforany dNTP czyli wolne nukleotydy są niezbędne w procesie syntezy nowej nici DNA, stanowią bowiem jej budulec. Ich stężenie w mieszaninie reakcyjnej jest również ściśle określone. W nadmiarze mogą one konkurować z polimerazą o jony magnezu a tym samym mogą obniżać jej aktywność.

CECHY „DOBRYCH” PRIMERÓW

Odcinki starterowe (PRIMERY) powinny:

- mieć długość 16-30 nukleotydów,
- być komplementarne do sekwencji flankujących amplifikowany region DNA,
- zawierać w swej sekwencji do 50% zasad G i C (guanina, cytozyna), ponieważ zasady te tworzą mocne potrójne wiązania między sobą dzięki czemu użyte primery dobrze zwiążą się z matrycą i nie odłączą się od niej w trakcie wzrostu temperatury przy przejściu do etapu wydłużania,
- końce 3' pary primerów nie powinny być ze sobą komplementarne, pozwala to uniknąć ich wzajemnej hybrydyzacji zamiast z matrycą DNA.

Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie DNA to technika umożliwiająca odczytanie sekwencji DNA czyli kolejności ułożenia par nukleotydów w cząsteczce DNA. Odczytu reakcji sekwencjonowania dokonuje się obecnie głównie za pomocą zautomatyzowanych sekwenatorów (płytkowych lub kapilarnych).



Proces ten polega na detekcji światła emitowanego przez znakowaną zasadę i odczytywaniu zakresu jej fluorescencji przez czytnik lasera.

Jedną z najczęściej stosowanych metod reakcji sekwencjonowania DNA jest metoda Sangera. Opiera się ona na przedwczesnej, kontrolowanej terminacji syntezy DNA, wynikającej z przypadkowego przyłączenia przez polimerazę DNA dideoksynukleotydów (analogi nukleotydów bez grupy -OH w pozycji 3'). Do reakcji dodaje się niewielką ilość trifosforanów dideoksynukleotydów (ddNTP), które są wbudowywane w DNA, ale ich dołączenie uniemożliwia dalsze wydłużanie nici. W ten sposób otrzymuje się fragmenty DNA o różnej długości zakończone specyficznym nukleotydem.

Produkty reakcji rozdziela się elektroforetycznie, co powoduje ich segregację pod względem wielkości. Obecnie odczyt sekwencji w metodzie Sangera został zautomatyzowany dzięki wykorzystaniu znakowanych fluorescencyjnie trifosforanów dideoksynukleotydów i pozwala na odczyt 300-1000 par zasad z jednej kapilary lub linii na żelu.

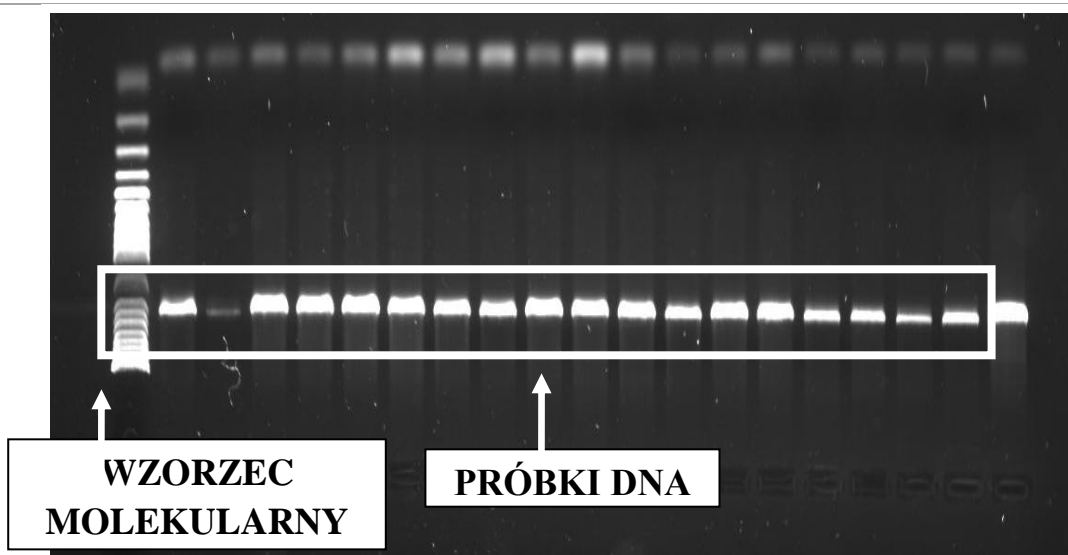
Elektroforeza na żelu agarozowym

Elektroforeza jest obecnie jedną z głównych metod identyfikacji i rozdzielania kwasów nukleinowych. Do rozdzielania dużych cząsteczek DNA stosuje się elektroforezę w żelu agarozowym. Natomiast do rozdzielania małych fragmentów DNA stosuje się elektroforezę w żelu poliakrylamidowym.

Elektroforeza żelowa jest metodą umożliwiającą rozdzielać makrocząsteczek obdarzonych ładunkiem elektrycznym poprzez ich migrację w polu elektrycznym. Przeprowadza się ją w aparatach umieszczonych poziomo. Próbkę umieszcza się w kieszoneczkach formowanych w żelu, włącza się źródło prądu i DNA/RNA może się przemieszczać poprzez żel w osobnych ścieżkach. Kwasy nukleinowe (DNA i RNA) dzięki swoim grupom fosforanowym naładowane są ujemnie, co powoduje, że migrują w żelu w kierunku dodatniego bieguna pola elektrycznego. Tempo przemieszczania się cząsteczek w żelu jest odwrotnie proporcjonalne do ich długości, tj. masy cząsteczkowej. Włączając do elektroforezy wzorzec (lader czyli drabina), czyli fragmenty DNA znanej wielkości, można dokładnie określić masę cząsteczkową nieznanymi fragmentów.

Proces elektroforezy można wykorzystać do:

- oceny jakości wyizolowanego DNA,
- weryfikacji produktów reakcji PCR,
- określenia stężenia DNA poprzez porównanie z molekularnym wzorcem masowym.



Ryc. 2 Elektroforeza na żelu agarozowym, weryfikacja produktów reakcji PCR

Literatura

Futuyma D. J. 2005. Ewolucja, Sinauer Associates

Stace C. A. 1993. Taksonomia Roślin i Biosystematyka, Press Syndicate of the University of Cambridge

Szwejkowska A., Szwejkowski J. 1992 Botanika, tom 1 Morfologia, PWN

Szwejkowska A., Szwejkowski J. 1992 Botanika, tom 2 Systematyka, PWN