

Tabela 10**Emisja pyłu w pomieszczeniach zajmowanych przez bydło, w niektórych krajach Europy; dane z 2008 roku (Dämmgen i wsp. 2009)**

Kraj	Emisja pyłu (kg/stanowisko/rok)	
	PM ₁₀	PM _{2,5}
Belgia	0,28	0,06
Czechy	0,36	0,00
Dania	0,16	0,10
Francja	0,09	0,03
Niemcy	0,21	0,14
Polska	0,40	0,01
Szwajcaria	0,13	0,02
Wlk. Brytania	0,04	0,01

dów. Wielkość emisji pyłu w pomieszczeniach dla bydła w niektórych krajach europejskich podano w tabeli 10.

Produkcja mleka jest bardzo energochłonna. Według badań przeprowadzonych w FAL (2000), zużycie energii elektrycznej w przeliczeniu na jedną krowę o masie ciała 500 kg wynosi w ciągu roku 263 kWh. Obejmuje to zużycie energii na oświetlenie, sprzątanie, wietrzenie, karmienie, dój, schładzanie mleka i inne. Podczas produkcji 1 MWh energii elektrycznej w klasycznej elektrowni opalanej węglem kamiennym emitowane jest 937 kg CO₂, 7,8 kg SO₂, 3,2 kg NO_x i 0,2 kg CO (Grzybek 2005). Przy spalaniu gazu ziemnego lub ropy naftowej ilość emitowanych gazów jest mniejsza.

W artykule nie opisano problemu emisji metanu i innych gazów związanych z kompleksową produkcją pasz dla bydła. Wymaga to osobnego opracowania, w tym bowiem zakresie wykonano wiele ciekawych badań (Bachmaier i wsp. 2008, Brundsch i wsp. 2008, Butterbach-Bahl i Kiese 2008). Przedstawione w skrócie zagadnienia, związane z produkcją mleka i emisją do

atmosfery metanu i innych gazów, skłaniają do zadania pytania: jak należy prowadzić chów krów, mając na uwadze emisję gazów cieplarnianych. W chwili obecnej odpowiedź nie jest znana. Należy sądzić, że w najbliższych latach opracowane zostaną nowe technologie chowu bydła, których celem będzie ograniczenie emisji gazów mających wpływ na zmiany klimatyczne.

Trzeba pamiętać, że duże ilości gazów cieplarnianych uwalniane są do atmosfery w procesie erupcji wulkanów, podczas pożarów lasów oraz sztormów na oceanach i morzach. Do atmosfery emitowane są inne gazy z przemysłu oraz spaliny z sektora motoryzacyjnego, które są bardziej szkodliwe dla środowiska. Przykładowo perfluorometan (CF₄) wykazuje 5700 razy wyższy efekt cieplarniany niż dwutlenek węgla, zaś dla sześciofluorku siarki (SF₆) równoważnik dwutlenku węgla (CO₂-eq) wynosi 22 200. Podobne działania wykazują ferony (CF₂Cl, CFCI₃, CF₃Cl). Obecność wymienionych związków jest związana z działalnością człowieka.

Ociepleniu klimatu zawsze towarzyszy wzrost zawartości gazów cieplarnianych w atmosferze. Największy udział ma para wodna, w mniejszych ilościach występują: dwutlenek węgla, metan, tlenki azotu i ozon. W ciągu ostatnich 400 tysięcy lat – jeszcze bez udziału człowieka – zawartość CO₂ w powietrzu, jak tego dowodzą rdzenie lodowe z Antarktydy, już czterokrotnie była zbliżona, a nawet wyższa od obecnej (Kopeć 2010). Nie wyklucza się, że wzrost ilości gazów cieplarnianych jest w pewnej części związany z działalnością człowieka. Nieuzasadnione jest jednak podejmowanie radykalnych i ogromnie kosztownych działań gospodarczych zmierzających do redukcji emisji wybranych gazów cieplarnianych. Lobbying, inspirowany przez zainteresowanych, prowadzi do stwierdzenia: „nie ma problemu, należy problem stworzyć”.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Justyna Jarczak¹, Brygida Ślaska²

¹Institut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

²Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Rok 1983 był przełomowy w naukach biochemicznych i molekularnych. Wtedy to Kary B. Mullis, wraz ze współpracownikami z Cetus Corporation w Emeryville w Kalifornii, stworzył i opisał przebieg łańcuchowej reakcji polimerazy – PCR (ang. *Polimerase Chain Reaction*) [8]. Od tego roku świat nauki dzieli historię na „przed PCR” i „po PCR”. Mullis, urodzony 28 grudnia 1944 r. w niewielkiej miejscowości Lenoir w Północnej Karolinie i wychowany na farmie, po 10 latach od swojego odkrycia zdobył Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.

Historia powstania PCR

Aby poznać dokładną historię opracowania metody PCR trzeba cofnąć się do lat 50. ubiegłego wieku. Artur Kornberg rozpoczął wtedy badania nad replikacją DNA. Wyniki badań dotyczące sposobu reprodukcji kwasu DNA w komórkach bakteryjnych i odtworzenie tego procesu w warunkach laboratoryjnych sprawiły, że w roku 1959 otrzymał Nagrodę Nobla z dziedziny medycyny. Ważne miejsce, pośrednio związane z powstaniem PCR, to znajdujący się w Stanach Zjednoczonych Park Narodowy Yellowstone – to tutaj w latach 60. ubiegłego wieku Thomas Brock prowadził badania nad bakteriami żyjącymi w gorących źródłach i gejzerach, zdolnymi przetrwać skrajnie trudne warunki środowiska i temperaturę dochodzącą do 80°C. Naukowcom udało się wyizolować Gram-ujemną bakterię, niezdolną do poruszania się i nie wytwarzającą przetrwalników, najczęściej występującą w formie kulistej, której głównym środowiskiem życia są wody termalne, gorące źródła oraz oceaniczne kominy hydrotermalne. Nazwano ją *Thermus aquaticus* [2]. Następnym krokiem było odkrycie enzymu, bez którego niemożliwe byłoby

przeprowadzenie procesu PCR. Jest to polimeraza DNA *Taq* pochodząca z bakterii *Thermus aquaticus* – termostabilny enzym tolerujący bardzo wysokie temperatury [3]. Enzym ten jest zdolny replikować 1000 par zasad w czasie poniżej 10 sekund w temperaturze 72°C. W roku 1971 zespół naukowców pod kierunkiem Kjell'a Kleppe odkrył proces bardzo zbliżony w przebiegu do PCR i mimo że nie opublikował żadnych znaczących wyników, jego badania stały się podstawą późniejszej pracy Mullis'a. Kleppe w trakcie swoich badań doszedł do wniosku, że musi istnieć system dwóch sekwencji starterowych (ang. *primer*), które mogą zapoczątkowywać proces replikacji specyficznego fragmentu DNA. Twierdził mianowicie, że: „można mieć nadzieję na uzyskanie 2 struktur będących kompleksem nici matrycowej i odpowiedniego dla niej primera. Proces ten mógłby prowadzić do naprawczej replikacji DNA, pod warunkiem dodania polimerazy DNA. W rezultacie możliwe byłoby otrzymanie 2 potomnych molekuł. Możliwe byłoby także powtórzenie całego cyklu, pod warunkiem dodania świeżej dawki enzymu” [7]. Już w kilka lat po odkryciu PCR okazało się możliwe przeprowadzanie analiz tą metodą z użyciem niewielkich ilości DNA, pochodzących przykładowo z pojedynczego włosa, pojedynczej komórki jajowej lub plemnika. Obecnie do wykonania badań wystarcza śladowa obecność DNA w materiale. W początkach istnienia PCR długość analizowanego fragmentu kwasu deoksyrybonukleinowego wynosiła zaledwie 6 kpz, w tej chwili są to fragmenty kilkakrotnie większe, o długości nawet ponad 40 kpz [12].

Przebieg reakcji PCR

Cząsteczka kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) od dziesiątków lat, praktycznie od czasu jej odkrycia, fascynowała naukowców wielu dziedzin. Odkrycie kodu genetycznego i potwierdzenie faktu, że to geny w dużej mierze odpowiadają za funkcjonowanie żywych organizmów, zainspirowało biologów do nowych analiz tej cząsteczki. Wynalezienie łańcuchowej reakcji polimerazy spowodowało ogromny przełom w nauce. Usprawniło i przyspieszyło badania naukowe oraz otworzyło drzwi do rozwiązywania tych najbardziej skomplikowanych, trudnych i zarazem ważnych, nurtujących ludzkość problemów.

Istotą łańcuchowej reakcji polimerazy jest specyficzna amplifikacja (powielanie) *in vitro* wybranych odcinków DNA. W efekcie uzyskuje się dużą liczbę kopii interesującego badacza fragmentu, potrzebną do dalszych badań. Niedługo minie 30 lat od wynalezienia tej metody, w tym czasie sposób jej wykonywania bardzo się zmienił. Z bardzo prostej metody wykonywanej przy niewielkim użyciu zaawansowanego sprzętu, aż do wysoko rozwiniętej techniki, gdzie stosuje się skomplikowane procedury i najnowocześniejszy sprzęt. Tym, co nie zmienia się od lat jest skład mieszaniny reakcyjnej, czyli wszystkie substraty, bez których reakcja ta nie może zachodzić. Każdy z nich jest niezwykle ważny i ma do spełnienia specyficzną rolę w procesie amplifikacji.

Pierwszym i podstawowym składnikiem jest matryca DNA. Izolacja DNA może odbywać się z materiałów różnego pochodzenia. Mogą to być żywe lub martwe tkanki roślinne, w tym przypadku największym problemem jest obecność polisacharydów, często hamujących enzymy stosowane w pracach z DNA.

Mogą to być żywe oraz martwe tkanki zwierzęce (krew, fragmenty skóry, włosów, organów), wydzieliny (ślina, łzy, moczu) czy wymazy, np. pochodzące z jamy ustnej. W przypadku materiałów zwierzęcych największym problemem jest obecność białek. Eliminuje się je za pomocą enzymów proteolitycznych oraz fenolu. W badaniach DNA pochodzącego z krwi, w celu zwiększenia wydajności analizy, w pierwszych jej etapach usuwa się nie zawierające jąder komórkowych erytrocyty. Matryca nie może być zdegradowana ani zanieczyszczona. Obecnie stosowane metody oczyszczania DNA mają na celu przede wszystkim uzyskanie wysokocząsteczkowego DNA, nie zawierającego białek i inhibitorów enzymów [12].

Szczególnego znaczenia nabiera oczyszczanie w trakcie analiz tzw. DNA starożytnego (ang. *ancient DNA*, aDNA), czyli materiału genetycznego pochodzącego ze znalezisk paleontologicznych, materiałów archeologicznych, a także eksponatów muzealnych. We wszystkich przypadkach są to próby liczące setki, tysiące, a nawet miliony lat. W swojej pracy Hofreiter i wsp. [5] podają obszerną charakterystykę materiału genetycznego tego typu. Lata działania wielu różnych czynników środowiskowych sprawiają, że DNA pochodzące z prób tego typu jest bardzo zdegradowane i zanieczyszczone. Objawia się to ogromną jego fragmentacją, do cząstek wielkości 100-500 par zasad. Dobłą jakość próbek można natomiast uzyskać z materiałów zakonserwowanych w niskiej temperaturze (północne rejony Eurazji – miejsca występowania wiecznej zmarzliny), materiałów przez wieki znajdujących się w jaskiniach, gdzie utrzymuje się swoisty mikroklimat bądź też materiałów przez długi czas zalegających w osadach bagiennych z ograniczonym dostępem mikroorganizmów. Ustalono, że maksymalny czas, jaki cząsteczka DNA może przetrwać w geosferze, wynosi od 50 tysięcy do nawet 1 miliona lat.

Największą wartość przedstawia DNA pobrane z zębów i włosów. W przypadku zębów szkliwo, a włosów keratyna, zapewniają idealną ochronę przede wszystkim przed drobnoustrojami i tym samym przed zanieczyszczeniem obcym materiałem genetycznym. Odchody czy też niestrawione resztki pokarmowe również stanowią istotne źródło dla pozyskania DNA ich gospodarza. Próbkę do badań pobierać można również z naczyń, przedmiotów codziennego użytku lub broni. W badaniach starożytnego DNA najczęściej wykorzystywane jest mitochondrialne DNA (mtDNA) lub w przypadku roślin – chloroplastowe (chlDNA). Duża liczba mitochondriów w pojedynczej komórce sprawia, że liczba mtDNA jest w nich ogromna. Mitochondrialne DNA jest replikowane przez całe życie i u większości zwierząt jest przekazywane potomstwu niemal wyłącznie w linii żeńskiej. Jest ono ponadto wysoko polimorficzne, ze względu na duże tempo występowania w nim mutacji, na które wpływ mają prawdopodobnie uboczne produkty metabolizmu oddechowego oraz mniej efektywny od jądrowego mechanizm jego naprawy. Jedną z cech mtDNA, dzięki której jest on często wykorzystywany w badaniach genetycznych, jest jego niewielki rozmiar, a tym samym łatwość i prostota w wykonywaniu badań. Umożliwia to ponadto opracowanie uniwersalnych starterów amplifikujących różne fragmenty mtDNA u wielu kręgowców i bezkręgowców, co oznacza, że bardzo często udaje się uzyskać informację gene-

tyczną gatunku bez wcześniejszej wiedzy o sekwencji jego genomu. Inną równie ważną cechą jest brak rekombinacji tego genomu. Jeżeli pominiemy mutacje, możemy stwierdzić, że potomstwo ma dokładnie taki sam genom mitochondrialny jak matka. Dzięki temu możemy poznać historię każdej populacji wiele pokoleń wstecz. Niemniej ważny w przypadku badań kopalnych jest fakt, że genom mitochondrialny jest zazwyczaj dużo lepiej zachowany niż genom jądrowy. Analizie poddaje się najczęściej fragmenty genu kodującego cytochrom b, geny podjednostek rybosomowych oraz oksydazy cytochromowej [4].

Czynności związane z procesem optymalizacji PCR, czyli doбором odpowiednich ilości poszczególnych składników mieszaniny restrykcyjnej opisali Innis i Gelfand [6]. Jednym z czynników wpływających na przebieg reakcji PCR jest polimeraza *Taq*. Sposób działania tego enzymu polega na wbudowywaniu do nici matrycowej poszczególnych nukleotydów, zgodnie z zasadą komplementarności. Polimeraza działa jedynie w kierunku od końca 3' do końca 5', czyli synteza nowej nici odbywa się zawsze w kierunku odwrotnym. Standardowo stosowane stężenie wyjściowe tego enzymu w mieszaninie reakcyjnej wynosi 0,5-5 jednostek/ μ l. Optymalny zakres działania polimeraz to 68-72°C, a szybkość reakcji 30-100 nukleotydów na sekundę. Różne rodzaje polimeraz różnią się między sobą wydajnością, dokładnością i zdolnością sprawdzania syntetyzowanych fragmentów DNA. Błąd wbudowania nieprawidłowego, niekomplementarnego nukleotydu w zależności od rodzaju polimerazy może wynosić 1/10 000 – 1/100 000 nukleotydów. O ile dokładność polimerazy nie ma istotnego znaczenia w badaniach wielkości produktów PCR, w przypadku wykrywania polimorfizmów i mutacji punktowych jest ona niezwykle ważna. Należy podkreślić, że nadmiar enzymu w mieszaninie reakcyjnej zawsze będzie prowadził do powstania niespecyficznego produktu reakcji, a zbyt mała ilość polimerazy sprawi, że produkt w ogóle nie zostanie uzyskany. Ze względu na jej wrażliwość na zmiany temperatury producenci zalecają przechowywanie jej w temperaturze -20°C i wyjmowanie tylko na czas dodawania do reakcji. Polimeraza *Taq* jako enzym wymaga odpowiednich warunków do działania, obecności buforu dla polimerazy działającego w pH 8,3-8,8 oraz jonów magnezu występujących w postaci $MgCl_2$. Magnez jest zasadniczym kofaktorem dla polimerazy DNA oraz katalizuje przebieg reakcji. Jony magnezu są wiązane nie tylko przez enzym, ale również wchodzi w kompleks z matrycą, starterami i wolnymi nukleotydami (dNTP). Dokładność amplifikacji jest proporcjonalna do stężenia magnezu, które średnio wynosi 1,5 mM. Zapewnienie odpowiednich warunków dla działania polimerazy to z kolei rola buforu, w skład którego wchodzi 50 mM KCl i 10 mM Tris-HCl. Zapewnia on siłę jonową oraz jest odpowiedzialny za buforowanie wydajności reakcji. Koncentracja buforu wpływa ponadto na temperaturę topnienia starterów i stąd na proces ich przyłączania [13].

Startery, to kolejny element niezbędny do prawidłowego przebiegu reakcji PCR. Są to krótkie, jednoniciowe łańcuchy DNA o standardowej długości od 15 do 35 par zasad. Cechą starterów, która zapewnia specyficzność amplifikacji jest ich

komplementarność do badanej sekwencji. Ich sekwencje są dobrane w taki sposób, że na zasadzie komplementarności wiążą się z określonymi odcinkami DNA nici matrycowych na obu końcach sekwencji, którą chcemy skopiować [4]. Ważny jest dobór stężenia starterów. Rahman i wsp. [10] podają, że za odpowiednie uznaje się 0,1-0,5 μ M. Zbyt niska koncentracja starterów wpływa na uzyskanie bardzo niewielkiej ilości produktu lub jego całkowity brak. Nadmiar starterów prowadzi natomiast zwykle do powstania niespecyficznego produktu. Poszczególne pary starterów powinny wykazywać podobną temperaturę topnienia, która mieści się w zakresie 55-72°C. Dla każdej pary konieczne jest ustalenie odpowiedniej temperatury przyłączania [6]. Jeżeli temperatura jest zbyt niska amplifikują się niespecyficzne fragmenty DNA, uwidaczniające się na żelu w postaci „drabinki” wielu prążków. Gdy temperatura jest zbyt wysoka, amplifikacja pożądanego produktu i czasami jego czystość jest zaburzona z powodu słabego przyłączania starterów.

Ostatnim składnikiem reakcji PCR są trifosforany deoksyrybonukleozydów – potocznie nazywane wolnymi nukleotydami (dNTP). Są to nukleozydy adeniny, cytozyny, guaniny i tyminy (dATP, dCTP, dGTP oraz dTTP). Ich stężenie wyjściowe wynosi na ogół 5-10 μ M (mikromol), natomiast stężenie w reakcji powinno wzrastać do 20-200 μ M. Trzeba uwzględnić, że po 30 cyklach reakcji tylko 50% nukleotydów występuje nadal jako dNTP, gdyż następuje rozkład nukleotydów, który bardzo często jest przyczyną braku ostatecznego produktu [12].

Mając tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną można przystąpić do właściwej amplifikacji metodą PCR. Jest ona przeprowadzana w termocyklerach – urządzeniach wyposażonych w blok grzejny z otworami na próbki. Urządzenie zapewnia zmiany temperatury zgodnie z ustalonym wcześniej programem. Niektóre nowoczesne termocyklery posiadają kilka bloków grzejnych, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzanie kilku reakcji równocześnie, z których każda może być prowadzona w innych warunkach. Oprogramowanie wielu współczesnych termocyklorów pozwala ponadto na szeroką manipulację warunkami temperaturowymi, umożliwiając m.in. prowadzenie reakcji PCR w gradiencie temperatur. Przebieg PCR wymaga bardzo wysokich temperatur, które powodują parowanie mieszaniny reakcyjnej. Parowanie w czasie trwania reakcji PCR może prowadzić do wzrostu stężeń składników, zwłaszcza starterów. Podwyższone stężenia starterów prowadzą, o czym wspomniano wcześniej, do powstania niespecyficznego, niezamierzonych zdarzeń ich wiązania, a to następnie do błędnych wyników badań. Ciągłe prowadzone są prace usprawniające działanie termocyklorów, polegające m.in. na dodawaniu elementów zapobiegających parowaniu mieszaniny reakcyjnej. Stosowane są na przykład teflonowe poduszeczki, których elastyczna forma dopasowuje się do wszystkich powszechnych płytek do PCR, probówek i pasków do PCR, co prowadzi do równomiernego nacisku i nagrzewania oraz zapobiega parowaniu.

Łańcuchowa reakcja polimerazy polega na cyklicznym powtarzaniu się 3 kolejnych etapów: denaturacji, przyłączania starterów i elongacji. W czasie denaturacji, kiedy temperatura

wzrasta do około 95°C, pękają wiązania wodorowe stabilizujące podwójną helisę DNA i cząsteczka kwasu rozpada się na 2 pojedyncze łańcuchy. W kolejnym etapie temperatura zostaje obniżona do takiej, jaka jest odpowiednia do przyłączenia poszczególnej pary starterów. Etap ten nazywany jest przyłączaniem lub hybrydyzacją komplementarnych sekwencji starterowych do matrycy. Polega na wiązaniu się starterów z matrycą, kończy się natomiast utworzeniem kompleksów starter-matryca. Ostatni etap to elongacja, czyli właściwa synteza DNA, polegająca na wbudowywaniu komplementarnych nukleotydów przy udziale polimerazy. Proces ten odbywa się w temperaturze 72°C. Typowa reakcja PCR obejmuje 30 cykli. W każdym cyklu dochodzi do podwojenia wyjściowej liczby matryc, a po 30 cyklach reakcji liczba matryc wzrasta do $n=2^{30}=107\ 474\ 824$.

Powstanie niespecyficznego produktu widocznego w żelu w postaci „drabinki” zbudowanej z licznych prążków, otrzymanie prążka słabo widocznego lub rozmazanego bądź też całkowity brak produktu mogą być spowodowane błędami popełnionymi podczas przeprowadzania amplifikacji. W tabeli zestawiono najczęściej popełniane błędy dotyczące poszczególnych czynników reakcji oraz wykonywania doświadczenia. Poszczególne błędy można eliminować, dbając m.in. o dobór odpowiednich stężeń. Dotyczy to przede wszystkim koncentracji enzymu i jonów magnezu. Brak produktu może być spowodowany również nieodpowiednią temperaturą przyłączania starterów. W przypadku, gdy produkt PCR stanowi wiele prążków warto rozważyć zwiększenie temperatury przyłączania lub dokonać sprawdzenia procesu ich projektowania i składu. Jeżeli w żelu widoczny jest produkt PCR w postaci rozmazanego prążka można zmienić ilość enzymu, zmniejszyć ilość $MgCl_2$, wydłużyć czas denaturacji lub zredukować ogólną liczbę cykli [13].

Tabela

Najczęściej spotykane błędy popełniane podczas przeprowadzania reakcji PCR i ich następstwa

CZYNNIK	BŁĄD	SKUTEK
Polimeraza <i>Taq</i>	Nadmiar	Produkt niespecyficzny
	Zbyt mała ilość	Brak produktu
	Błędne wprowadzenie nukleotydu	Niepełna wierność w odtwarzaniu sekwencji komplementarnej
Matryca	Zanieczyszczenie	Brak produktu
	Degradacja	Inny produkt o krótszej sekwencji,
Startery	Nieodpowiednia ilość	Brak produktu
	Nieodpowiednia temperatura przyłączania	Produkt niespecyficzny
Błędy laboratoryjne	Błędne rozcieńczenie DNA	Brak produktu
	Błędy w opisywaniu próbek	Produkt niespecyficzny
	Niestosowanie rękawiczek	
	Niesterylność końcówek i próbek	

Zastosowanie metody PCR

Opracowanie metody PCR przez ponad 30 lat zmieniało świat nauki. Znalazła ona swoje zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in. w naukach medycznych, biologicznych, weterynaryjnych, leśnych, rolniczych czy nawet prawniczych.

W medycynie coraz powszechniej metoda PCR stosowana jest do wykrywania różnego typu zakażeń u pacjentów. Przykładowo dla pacjentów immunosupresyjnych, czyli osób poddanych przeszczepom lub leczonych z powodu chorób nowotworowych, szczególne zagrożenie niesie zakażenie wirusem cytomegalii (CMV). Takie zakażenie może stanowić bezpośrednie zagrożenie życia, dlatego konieczne jest wczesne wykrycie tego wirusa. Siennicka i wsp. [11] prowadzili badania na temat przydatności różnych wariantów PCR do wykrywania wirusa cytomegalii w próbkach krwi pacjentów z immunosupresją. Stosując którykolwiek wariant metody PCR wykryto zakażenie CMV u 15 spośród 19 badanych pacjentów, podczas gdy objawy sugerujące zakażenie CMV obserwowano jedynie u 7 osób. Jeszcze jeden przykład badań medycznych, gdzie stosowana może być metoda PCR, to identyfikacja bakterii. Szczególne znaczenie mają metody molekularne w epidemiologii, gdzie w krótkim czasie można ustalić źródło choroby, drogi jej przenoszenia oraz określić identyczność patogenów posiadających charakterystyczne sekwencje kwasów nukleinowych. W chwili obecnej badania oparte na metodzie PCR są w stanie zastąpić wiele klinicznych metod diagnostycznych, takich jak: typowanie fagowe, diagnostykę serologiczną, testy biochemiczne czy testy lekowności. W badaniach Wydmuch i wsp. [14] nad identyfikacją bakterii z rodzaju *Acinetobacter* okazało się, że jedynym źródłem pozwalającym w sposób jednoznaczny ocenić cechy charakterystyczne danego gatunku jest izolowany z niego materiał genetyczny poddawany dalszej analizie, np. metodą PCR.

Genetyka to kolejna dziedzina, gdzie zastosowanie znalazła metoda PCR. W 2003 roku, po 13 latach intensywnych badań, udało się zsekwencjonować ludzki genom. Projekt poznania ludzkiego genomu (*Human Genome Project*, HGP) był sponzorowany przez amerykański Departament ds. Energii i Narodowy Instytut Zdrowia. Naukowcy z wielu krajów zdołali zidentyfikować ponad 20 tys. genów znajdujących się w ludzkim DNA. Wyczyn ten ogłosili na wspólnej konferencji prasowej prezydent Stanów Zjednoczonych Bill Clinton i premier Wielkiej Brytanii Tony Blair, mówiąc: „*Bez wątpienia, jest to najważniejsza, najbardziej cudowna mapa, którą rodzajowi ludzkiemu udało się stworzyć (...). Uczymy się dziś języka, poprzez który Bóg stworzył świat. Zostajemy przeniknięci głębszym niż kiedykolwiek podziwem wobec złożoności, piękna i niezwykłości najświętszego daru Bożego*”.

W archeologii i paleontologii przy użyciu PCR prowadzi się badania nad wspomnianym wcześniej DNA „starożytnym”. Dzięki temu można analizować wpływ różnego rodzaju czynników, zwłaszcza środowiskowych, na pojawianie się i wymieranie wielu gatunków. Można prowadzić badania filogenetyczne pozwalające zrozumieć, w jaki sposób wydarzenia historyczne ukształtowały obecne rozmieszczenie genów, populacji i gatunków, moż-

na też próbować ustalać relacje genetyczne pomiędzy zwierzętami wymarłymi a ich współcześnie żyjącymi hipotetycznymi potomkami. Ponadto, dzięki prowadzonym badaniom nad aDNA można bliżej poznać antyczne kultury Etrusków, Indian prekolumbijskich, mieszkańców wysp czy Australijskich aborygenów. Można poznać ich sposób życia, rośliny które uprawiali, hodowane przez nich zwierzęta, a także migracje lub zasięg chorób zakaźnych, jak dżuma czy trąd. Przy wykorzystaniu metody PCR udało się m.in. potwierdzić tożsamość ostatniego cara Rosji Mikołaja I i jego rodziny, ostatniego króla Wikingów, a także „Człowieka z Cheddar”, którego szkielet znaleziono na początku XX wieku w grocie w miejscowości Cheddar w Anglii. Po wyizolowaniu mitochondrialnego DNA z zębów, naukowcom udało się poznać jego genetyczną mapę. Do ciekawych odkryć doszli także australijscy naukowcy z Uniwersytetu w Queensland. W roku 1991 we włoskich Alpach dwaj niemieccy alpinści odnaleźli szczątki człowieka zamrożonego w śniegach lodowca, nazwano go Otzi – człowiek z lodu. Zaczęto spekulować na temat przyczyny śmierci tego człowieka, pochodzącego najprawdopodobniej z Epoki Żelaza. Powstały teorie, że zmarł z powodu wychłodzenia oraz że mógł stać się ofiarą rytualnych obrzędów. Ze znalezionych przy nim strzał i noża pozyskano próbki krwi. Badania genetyczne pozwoliły stwierdzić, że krew znaleziona na narzędziach należała do co najmniej 4 różnych osobników. Użycie tych informacji w powiązaniu z wynikami ekspertyz medycyny sądowej pozwoliło naukowcom na zrekonstruowanie ostatnich chwil Otzi. Zasugerowano, że mógł zostać ciężko ranny w walce, co z kolei było bezpośrednią przyczyną jego śmierci.

Ewolucjonizm to kolejna dziedzina, gdzie wykorzystywana jest metoda PCR, przede wszystkim do dokładnego poznania procesów rządzących ewolucją. Na porównywaniu znanych sekwencji opiera się analiza nazywana zegarem molekularnym. Konstruowana jest ona dla różnych gatunków, w celu określenia podobieństwa dwóch sekwencji DNA. Wyniki analiz sugerują czas różnicowania się poszczególnych grup zwierząt. Sekwencje bardzo podobne różnicowały się najprawdopodobniej niedawno, natomiast te bardzo odmienne ewoluowały od bardzo długiego czasu. Adkins i wsp. [1] prowadzili badania na temat filogenezy gryzoni. Analizę oparli na różnych markerach molekularnych. Jednym z nich była sekwencja mtDNA odpowiedzialna za kodowanie 12SrRNA. Najwyższy wskaźnik zmienności był obserwowany właśnie dla tego fragmentu. Wyniki badań pozwoliły znaleźć odpowiedź na wiele pytań, między innymi, która grupa ssaków jest najbliższej spokrewniona z gryzoniami oraz pytań dotyczących ewolucji tej grupy zwierząt.


Ochrona środowiska i ekologia to dwie kolejne dziedziny, gdzie PCR i poznawanie genomów może być ważną częścią badań. Lepsze poznanie genomów pozwala na bardziej efektywną ochronę zagrożonych gatunków. Dodatkowo, znając sekwencję wybranych genów zagrożonych gatunków można przeciwdziałać kłusownictwu oraz nielegalnemu handlowi. Na podstawie sekwencji wybranego fragmentu mtDNA można identyfikować osobniki. Można też zidentyfikować populację, z której pochodzi upolowany osobnik, np. wtedy, gdy tylko niektóre populacje podlegają ochronie lub istnieje przypuszczenie, że osobnik pochodzi z prywatnego stada. Można także identyfiko-

wać konkretne gatunki, gdy na podstawie innych cech nie jest to możliwe. Międzynarodowy, nielegalny handel okazami dzikiej przyrody przynosi miliardy dolarów zysku rocznie i obejmuje setki milionów roślin i zwierząt. Ponieważ nielegalnie transportowane gatunki są często nie do rozpoznania po ich przetworzeniu na wyroby przeznaczone do sprzedaży, niezwykle trudno udowodnić zarzut nielegalnego handlu. Z tego powodu analizy molekularne z użyciem m.in. PCR są bardzo przydatną metodą identyfikacji gatunków [4].

W prawie i kryminalistyce PCR jest podstawą uzyskania „genetycznego odcisku palca”. Dzięki temu staje się możliwe ustalenie sprawcy przestępstwa na podstawie pozostawionych biologicznych śladów, a także ustalenie ojcostwa [9].

Przedstawione przykłady świadczą o różnym zastosowaniu techniki, jaką jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR). To tylko niewielka część możliwości, jakie stwarza ta metoda. Rozwój badań molekularnych, jaki ma miejsce obecnie, daje nadzieje na rozwiązanie wielu problemów nękających współczesnych ludzi.

Literatura: 1. Adkins R.M., Gelke E.L., Rowe D., Honeycutt R.L., 2001 – Molecular Biology and evolution 18, 777-791. 2. Brock T.D., Freeze H., 1969 – Journal of Bacteriology 98(1), 289-297. 3. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M., 1976 – Journal of Bacteriology 127(3), 1550-1557. 4. Freeland J.R., 2008 – Ekologia molekularna. Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa. 5. Hofreiter M., Serre D., Painer H.N., Kuch M., Paabo S., 2001 – Nature Reviews Genetics 2, 353-359. 6. Innis M.A., Gelfand D.H., 1990 – Optimization of PCR's. A Guide to Methods and Application. Academic Press, New York. 7. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorawa H.G., 1971 – J. Molecular Biology 56, 341-361. 8. Mullis K.B., Faloona F., 1987 – Methods Enzymol 155, 335-350. 9. Powledge T.M., 2004 – Advances in Physiology Education 28, 44-50. 10. Rahman M.H., Jaguish B., Khara P.D., 2000 – Plant Molecular Biology Reporter 18, 339-348. 11. Siennicka J., Trzcińska A., Litwińska B., Durlik M., Seferęńska I., Połczyńska G., Kańtoch M., 2000 – Medycyna doświadczalna i Mikrobiologia 52 (3), 283-293. 12. Słomski R., 2004 – Przykłady analiz DNA. Wyd. UP Poznań. 13. White B.A., 1997 – PCR Cloning Protocols From Molecular Cloning to Genetic Engineering. Human Press. 14. Wydmuch Z., Kępa M., Wojtyczka R., Idzik D., Pacha J., 2000 – Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia 52 (3), 267-273.



Zakład Deratyzacji „SZCZUROŁAP”

Wiesław i Jarosław Dobrzeńscy
ul. Graniczna 10
87-100 Toruń
tel. (56) 655-21-41 lub 654-65-47
tel. kom. 601-212-487

Wyniszczam całkowicie bytujące i dochodzące szczury, z gwarancją. Fermi, mieszalnie pasz, zakłady rolne, magazyny, bezpieczeństwo 100%. Metodę przedstawiłem w filmie „Szczurołap”.
Dla zainteresowanych wdrażamy HACCP.