

### **Źródła pozyskiwania DNA do badań molekularnych, wady i zalety różnych strategii.**

Najpierw wnioskowano o genetyce populacji po cechach fenotypowych, zwrócono uwagę na polimorfizm białek. Obecnie bada się DNA, które może być pozyskane praktycznie z każdego rodzaju materiału biologicznego.

**Izolacja DNA**, podobna jest bez względu na jego źródło:

- fizyczne rozdrobnienie materiału (krojenie, rozcieranie);
- chemiczne rozbitcie struktur komórkowych (inkubacja w buforze lizującym błonę komórkową, z dodatkiem enzymu trawiącego białka najczęściej proteiny K);
- kilkukrotne oczyszczanie ekstraktu DNA z pozostałości trawienia i lizy oraz struktur komórkowych;
- wyizolowane DNA przechowywane jest w postaci zamrożonej, lub suszonej.

Ocena ilości i jakości wyizolowanego DNA

#### **Dobre, jakościowe DNA:**

- jest wysokocząsteczkowe (powyżej 20 tys. par zasad);
- występuje w ekstrakcie w dużym stężeniu (stężenie od 5 ng/μl);
- brak czynników uniemożliwiających dalsze analizy (inhibitorów np. fenol, chloroform, detergenty, barwniki roślinne, egzo i endogenne nukleazy, mocznik);
- brak kontaminacji obcym DNA;

#### **Ocena ilości i jakości DNA:**

- spektrofotometria – główna metoda, mierzenie adsorpcji światła przy określonych długościach fali pozwala oszacować stężenie i poziom zanieczyszczenia ekstraktu DNA białkami oraz fenolem. Przy długości fali 260nm – pokazuje ile jest DNA, a np. 280 nm pokazuje jakie jest zanieczyszczenie fenolem;
- elektroforeza na żelach agarozowych – pozwala ocenić integralność (stopień pofragmentowania) wyizolowanego DNA, czy warto w ogóle go używać. DNA wędruje sobie na żelu, w polu elektrycznym, od – do +, szeregując się w zależności od wielkości cząsteczek;
- trawienie enzymami restrykcyjnymi i analiza elektroforetyczna produktów;

Strategie zbioru prób do analiz genetycznych. Metodę dobieramy w zależności od badanego zagadnienia, zależy też jakie to zwierzęta, czy można je łapać i czy jest to trudne.

#### **Metoda destrukcyjna:**

- wymaga uśmiercenia zwierzęcia;
- stosowana w analizach białkowych markerów molekularnych (allozymy); w analizach DNA mitochondrialnego przed pojawieniem się PCR; w przypadku bezkręgowców;
- pobrane fragmenty tkanek (okazy) przechowywane są w alkoholu (75-96%) lub zamrażane (-20 lub -72st.c);
- ma tą zaletę, że organizm jest dostępny również po przeprowadzeniu badania.

### **Metoda niedestrukcyjna (półinwazyjna):**

- nie wymaga uśmiercania zwierzęcia;
- pobierane są fragmenty tkanek, pióra, krew, wymaz z jamy ustnej, a nawet wymazy z wierzchu świeżo złożonych jaj;
- etycznie poprawniejsza, można też przy okazji obejrzyć zwierzę, morfologię, masę, etc., zaobrazkować;
- czasami trudno pobrać materiał, np. krew, wymaga dobrego przechowywania, ale obecnie służą do tego specjalne karty, na których zasuszone krople krwi można przechowywać łatwo i długo. Są też specjalne strzykawki pozwalające łatwo pobierać krew, z czynnikiem przeciwkrzepliwym.

### **Metoda nieinwazyjna:**

- nie wymaga kontaktu ze zwierzęciem, więc stosowana do takich, które trudno schwytać, np. duże ssaki morskie (na wieloryby opracowano kusze z gąbkami ścierającymi nabłonek), które prowadzą skryty tryb życia, zwykle łatwiej zaobserwować ślady zwierzęcia w terenie niż samo zwierzę, można mieć materiał z wielu osobników;
- źródło DNA to np.: odchody, sierść, mocz, pióra, komórki wnętrza jamy ustnej pozostawione na pożywieniu, wylinki, skorupki jaj, szkielety w wyplwkach ptaków drapieżnych; można zastawiać specjalne grzebyki na sierść, wabiki, etc.

#### Wady:

- mała ilość DNA;
- znaczy stopień degradacji DNA;
- złożone procedury izolacji i analizy;

### **Odchody jako źródło DNA**

- DNA pochodzi głównie z komórek nabłonkowych jelit;
- brak etapu fizycznej dezintegracji próby;
- w trakcie 2-3 h płukania komórki gospodarza przechodzą do roztworu;
- procedura izolacji wymaga zastosowania dodatkowego etapu usuwania inhibitorów;

### **Czynniki utrudniające analizę DNA wyizolowanego z odchodów:**

- degradacja DNA – rozpad DNA na bardzo małe fragmenty, przez czynniki degradujące enzymatyczne (te wg. badań oddziałują najsilniej – egzo i endogenne nukleazy), mikrobiologiczne, abiotyczne, etc.;
- wiek próby – im dłużej leży, tym niższa jakość, co zależy też od pory roku, wilgotności. U nas zimą zbiór jest korzystniejszy i łatwiej znaleźć;
- kontaminacja obcym DNA;
- procedury laboratoryjne są bardziej skomplikowane, czasochłonne i kosztowne.

Metody takie stosowano między innymi do badania zjawiska wieloojcostwa u szympanów. Trudno u nich ocenić ojcostwo bez badań molekularnych. Mają one różne strategie rozrodcze. Stwierdzono, że:

- ojcami potomstwa były samce z badanej grupy (nie z innych „plemion”),

- choć istniał związek między pozycją samca w hierarchii i sukcesem rozrodczym, różne strategie rozrodu umożliwiają przystępowanie do niego wielu samcom,
- choć większość samic skutecznie unikała rozrodu z krewnymi, to zdarzyło się jedno potomstwo samicy ze swoim synem będącym wysoko w hierarchii,
- nie wykazano napływu genów z innych grup.

Dostęp do prób DNA jest możliwy dzięki metodzie PCR (reakcji łańcuchowej polimerazy), opracowanej przez Mullisa, w połowie lat 80'. Dzięki niej można wyodrębnić z ekstraktu i namnożyć dowolny fragment DNA.

### **Metoda PCR:**

Ekstrakt DNA + startery komplementarne, flankujące interesującą nas sekwencję + polimeraza i sprzęt, czyli termocykler. 3 etapy: denaturacja DNA żeby uzyskać 1-niciowe DNA, następnie hybrydyzacja ze starterami i wreszcie polimeraza syntetyzuje komplementarne DNA. Po kilku cyklach ma się mnóstwo tego fragmentu DNA. Aby cykle zachodziły trzeba manipulować temperaturą, żeby zachodziła kolejno denaturacja, hybrydyzacja i polimeryzacja.

Teraz najlepszą metodą jest Real-Time PCR gdzie można na bieżąco obserwować, co się dzieje w czasie cykli.

### **Podsumowanie:**

- stosowane obecnie metody izolacji DNA umożliwiają wykorzystanie w genetycznych badaniach z zakresu ekologii wszystkich materiałów biologicznych;
- uzyskany ekstrakt powinien charakteryzować się dużą zawartością DNA o wysokiej masie cząsteczkowej oraz brakiem inhibitorów i obcego DNA;
- podstawową metodą oceny stężenia DNA jest spektrofotometria;
- podstawową metodą oceny integralności DNA jest elektroforeza na żelach agarozowych;
- istnieje wiele odmian reakcji PCR, różniących się składem mieszaniny reakcyjnej, przebiegiem reakcji i strategią konstruowania starterów;
- metody PCR dzieli się na specyficzne (prowadzące do uzyskania konkretnego produktu, wyodrębnienie konkretnego fragmentu genu) i niespecyficzne (RAPD i AFLP – anonimowe losowo amplifikujące się fragmenty porównuje się między osobnikami. Nie wybierają one konkretnego osobnika więc nie nadają się przy metodzie nieinwazyjnej).