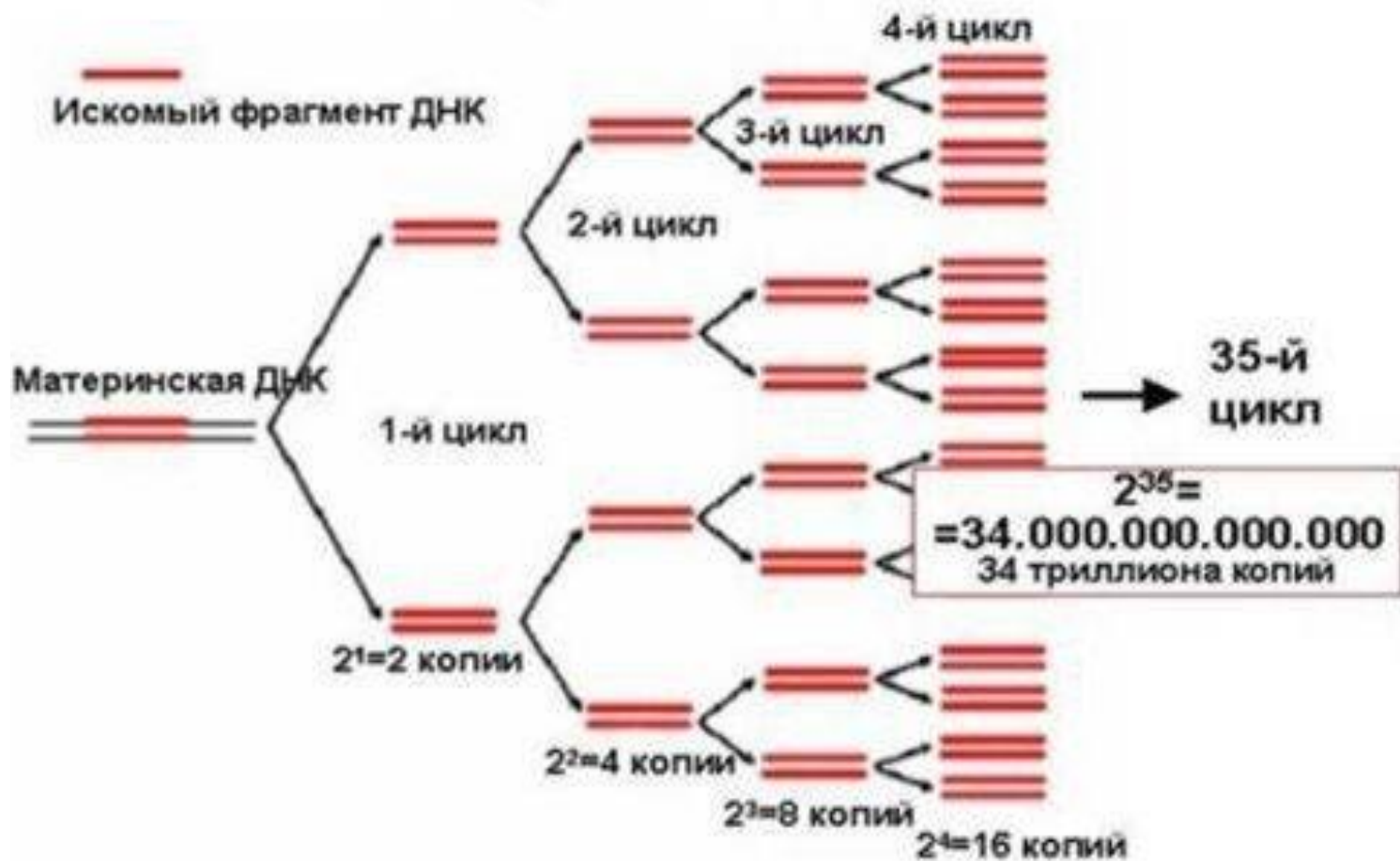


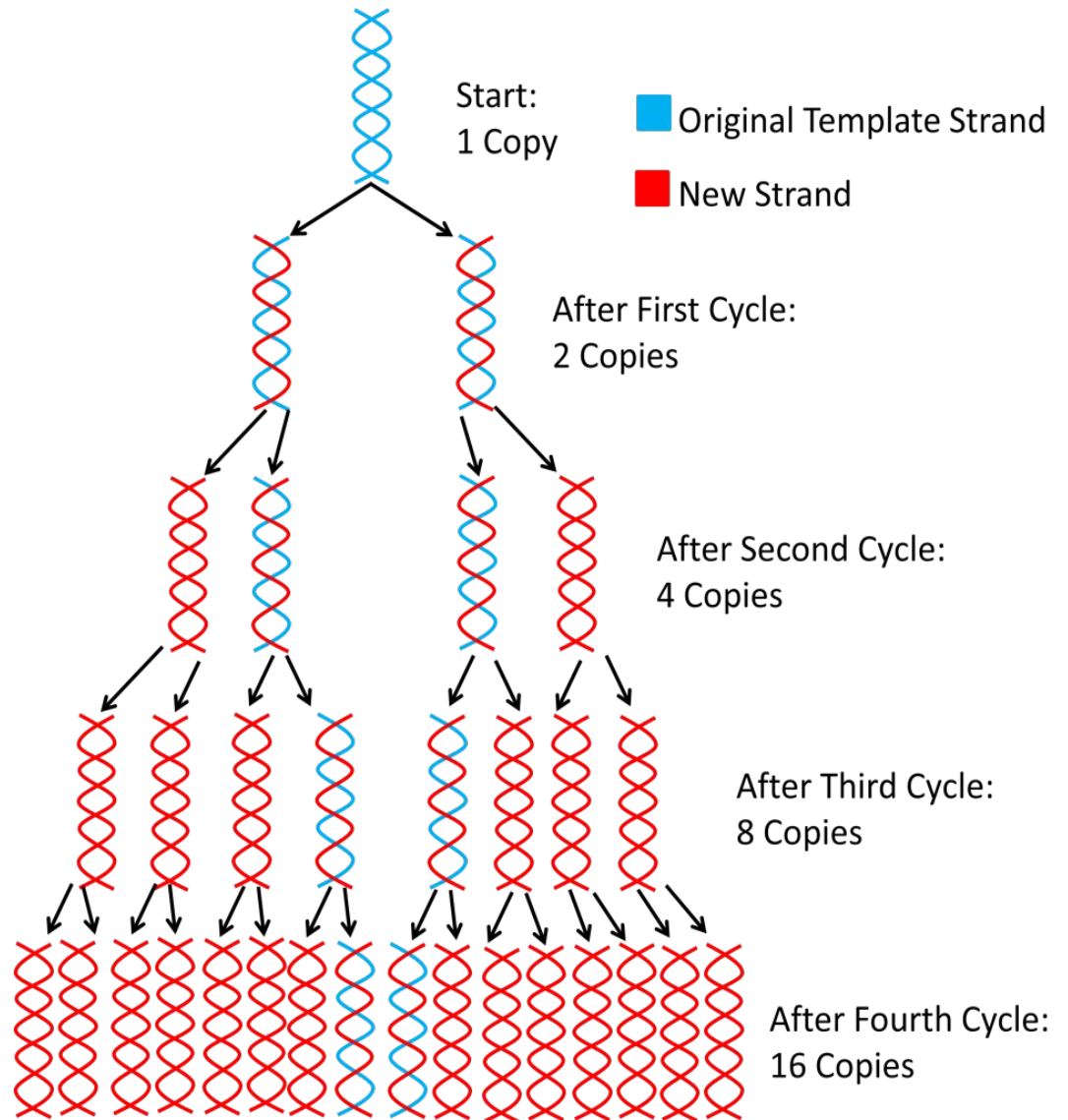
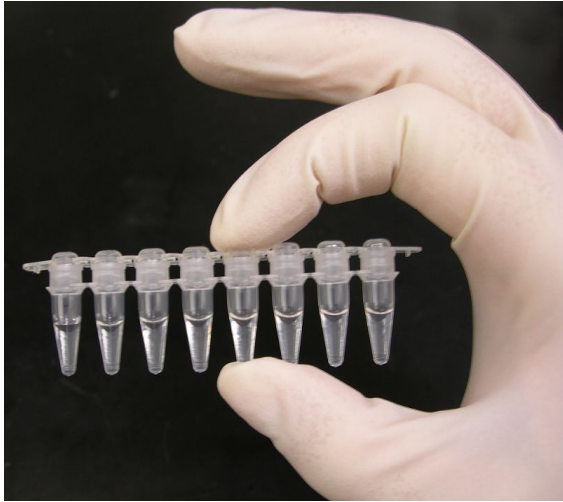


Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

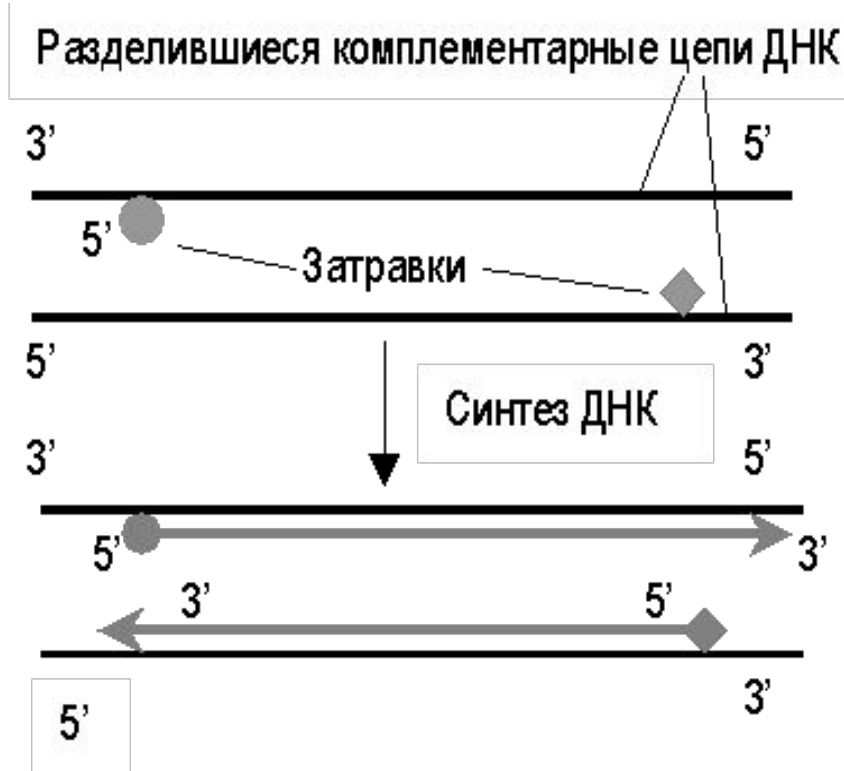
Метод ПЦР –
это эффективный способ за
небольшой промежуток времени
увеличить количество
специфической
последовательности ДНК в
миллионы раз

Общая схема ПЦР



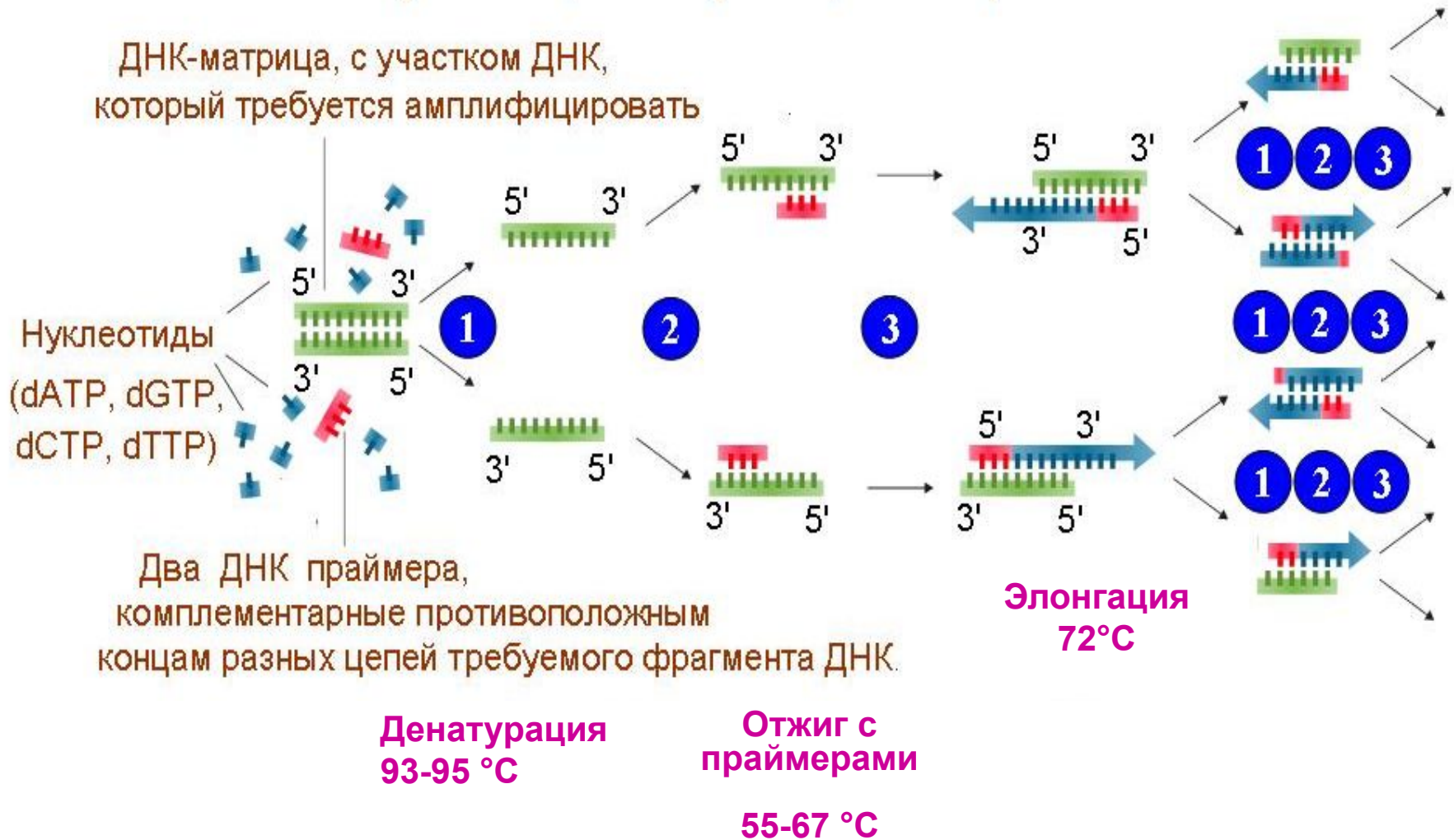


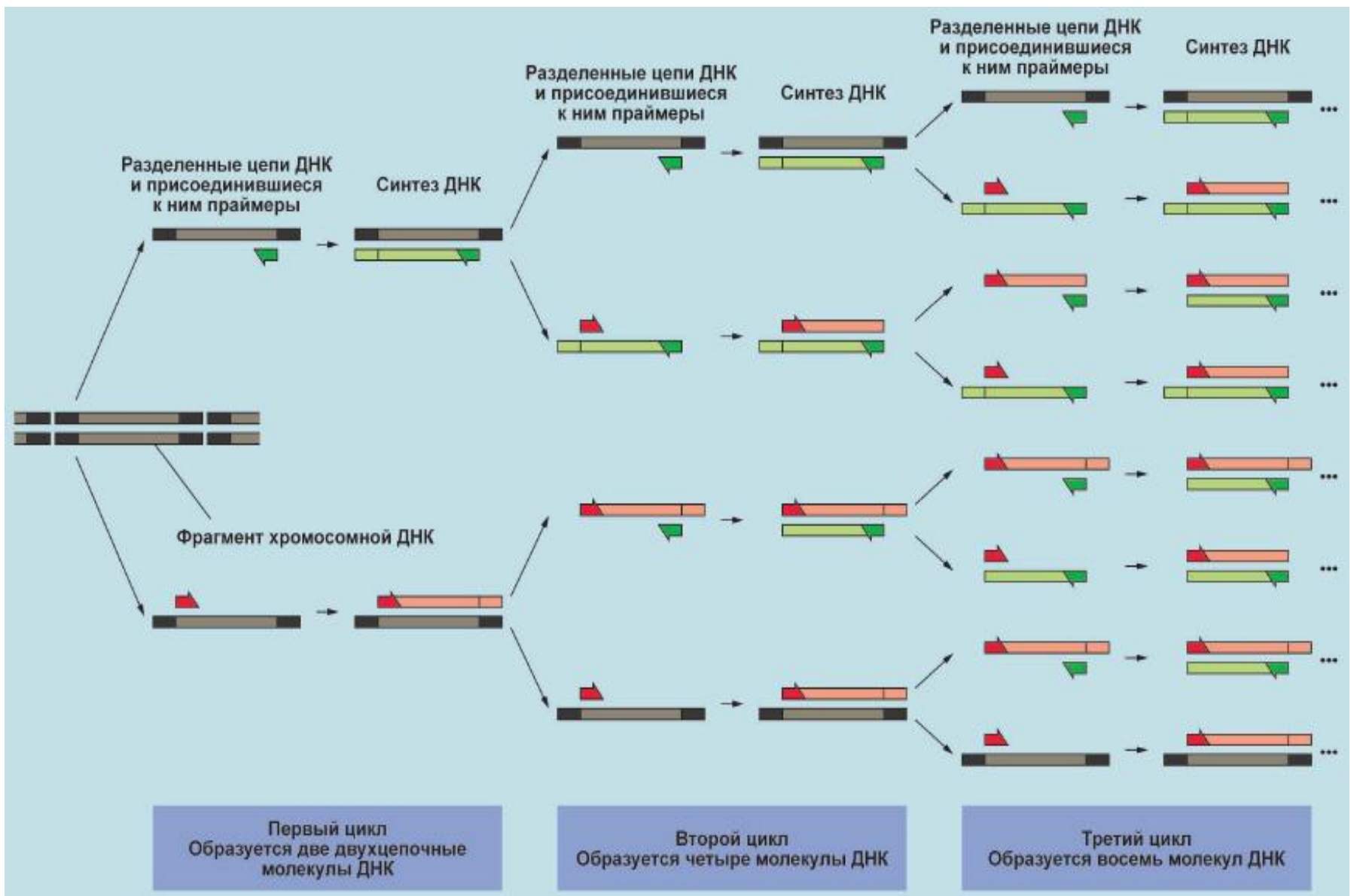
Что нужно для осуществления ПЦР ?



- *Специфическая последовательность ДНК (ДНК-мишень) длиной от 100 п.н. до 35 т.п.н.;*
- *Два синтетических олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих ДНК-мишень и ориентированных в направлении 5'→3' в ее сторону. После отжига праймеры гибридизуются с противоположными нитями ДНК, причем их 3'-гидроксильные концы должны быть ориентированы навстречу друг другу;*
- *Термостабильная ДНК-полимераза (Таг-полимераза);*
- *Четыре dNTP*

Полимеразная цепная реакция - ПЦР





Стандартная ПЦР осуществляется автоматически в термоциклере

- Смена типа реакции задается изменением температуры реакционной смеси:
 - 95 (0,5 мин)
 - 55 (1,5 мин)
 - 72°C (1 мин)

ПЦР осуществляется в одной пробирке, содержащей:

- около 1 мкг ДНК,
- 20 пикомолей каждого праймера,
- по 50 мкмоль каждого dNTP;
- две единицы термостабильной Таq ДНК-полимеразы.



Как достигается эффект умножения специфической последовательности ДНК ?

Путем многократного повторения трех последовательных реакций:

- Денатурация ДНК-мишени

Реакционную смесь, содержащую вышеперечисленные компоненты выдерживают при температуре **95°C**;

- Ренатурация

Температуру смеси медленно понижают до **~55°C**, при этом происходит **связывание праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-мишени**;

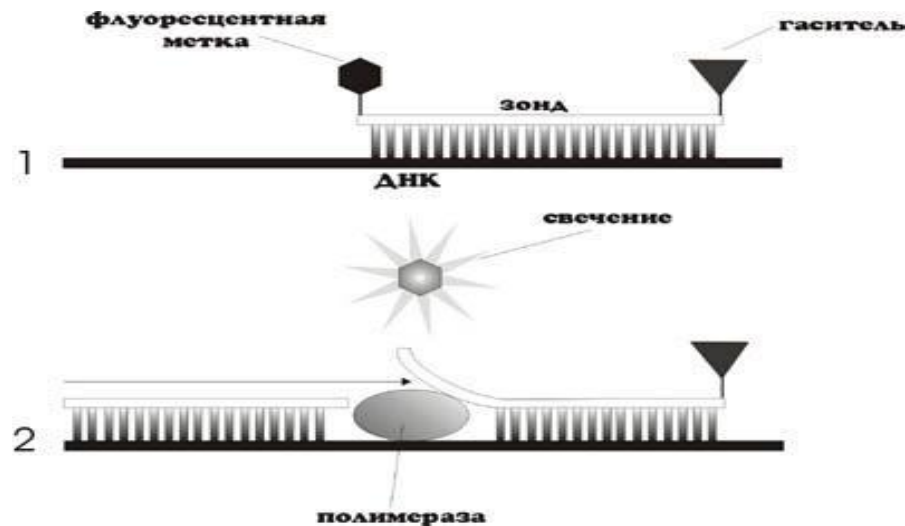
- Синтез ДНК

Температуру повышают до **~72°C**, начинается **синтез комплементарных цепей ДНК, иницируемый 3'-гидроксильными группами праймеров**.

Как работает ПЦР в реальном времени?

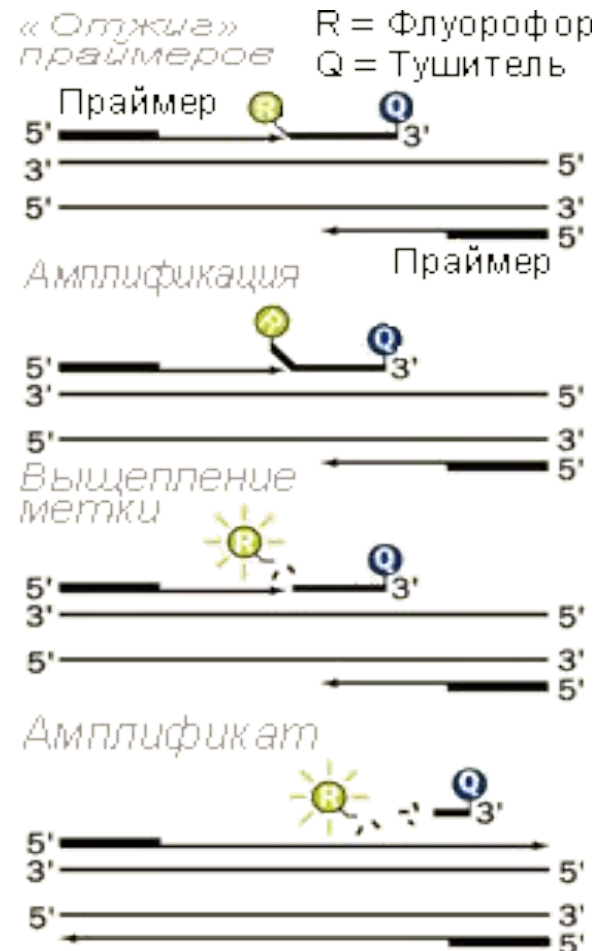
PCR real time

- ПЦР в реальном времени использует *TaqMan систему*, контролирующую кинетику ПЦР непосредственно в ходе амплификации с использованием *резонансного тушения флуоресценции*.
- Для детекции используется *зонд, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента*. Зонд несет *флуорофор и тушитель флуоресценции*,
- Когда флуорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. *В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК,*

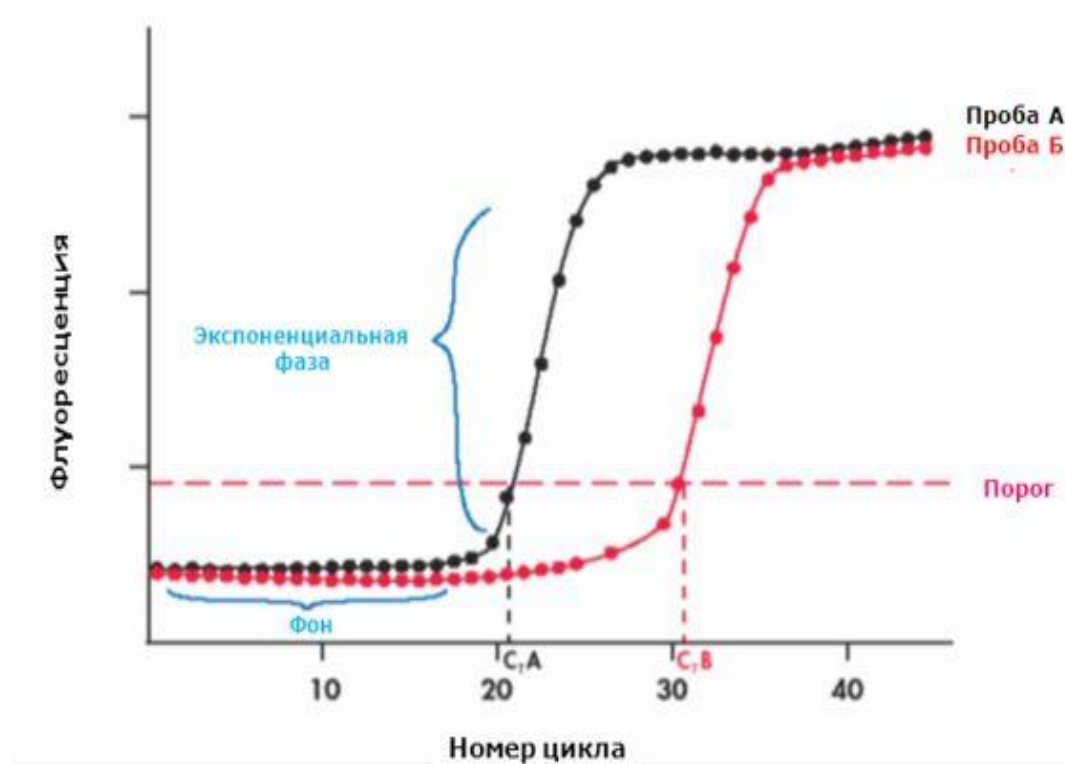


PCR real time

- Во время **стадии элонгации** Таг-полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и **при достижении зонда** **начинает расщеплять зонд** благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности.
- При этом происходит **разъединение флуоресцентной метки и гасителя**, что приводит к **увеличению детектируемого свечения**.
- Очевидно, что **чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение**



PCR real time ПЦР в реальном времени

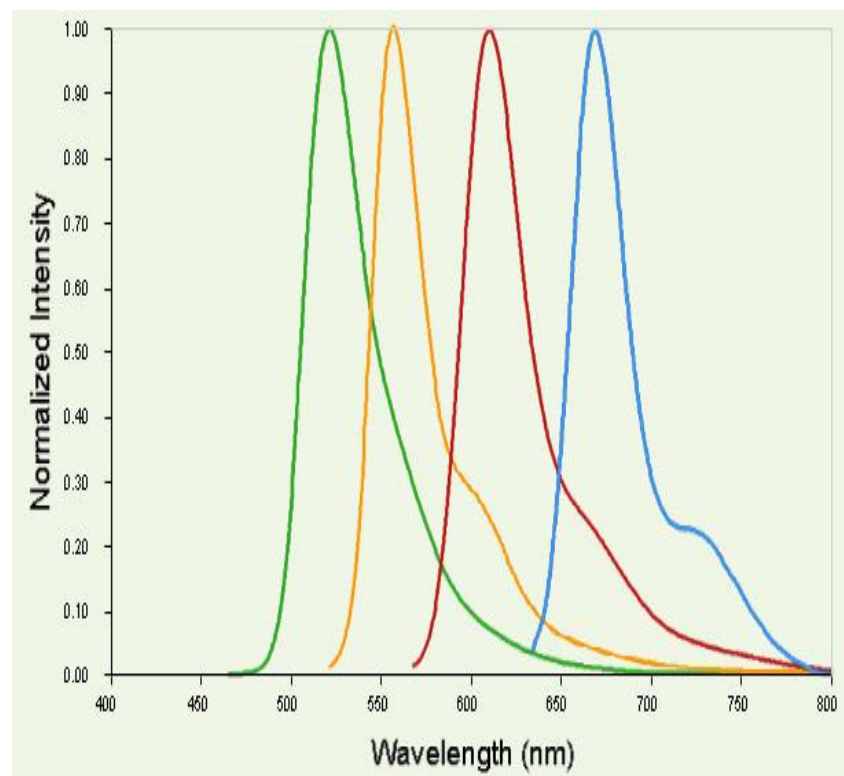


«Мультиплексные» варианты ПЦР в реальном времени (multiplex Real-Time PCR).

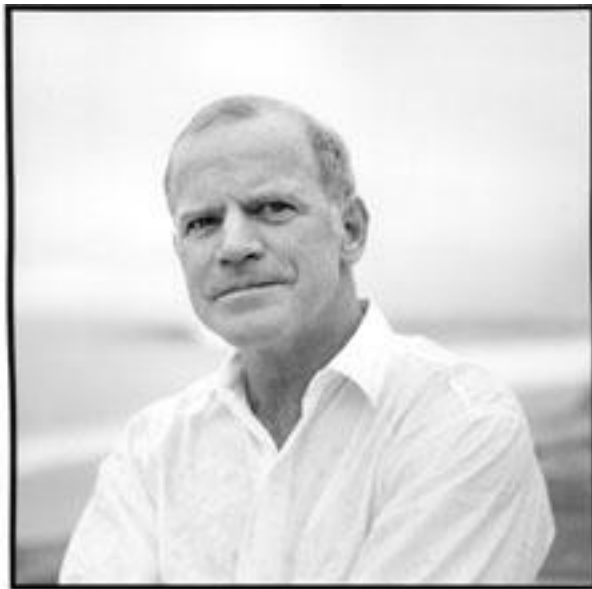
В современных вариантах ПЦР в "реальном времени" используют одновременно **несколько флуоресцентных зондов**, меченных разными флуоресцентными красителями.

Это позволяет детектировать в одной пробирке **одновременно несколько продуктов ПЦР**.

Во многих современных приборах для ПЦР в "реальном времени" предусмотрены варианты **детекции нескольких флуоресцентных красителей одновременно**. Детекция флуоресцентного сигнала от каждого красителя происходит в определенном для него диапазоне.



Нобелевская премия по химии 1993



Получил
К.Б. Мюллис
(Kary B. Mullis)
За разработку
метода
полимеразной
цепной реакции