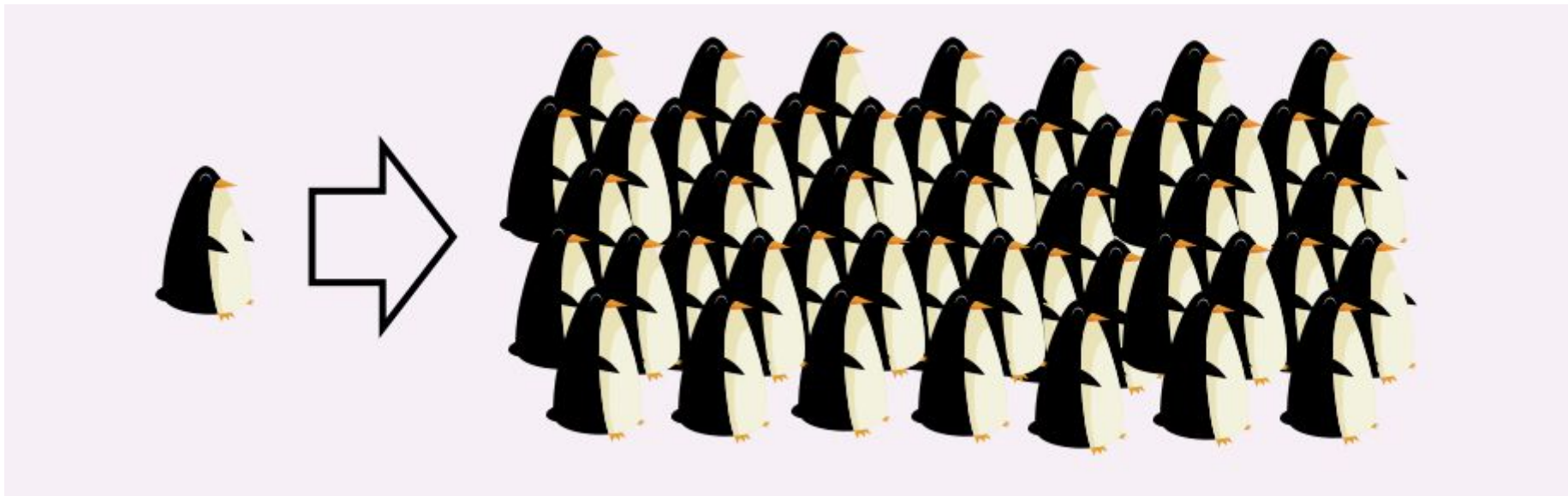


**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Выполнил: студент группы 4201 Денисов Артемий

# ПЦР

- Помимо [амплификации](#) ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение [мутаций](#), сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для [установления отцовства](#), для [клонирования генов](#), выделения новых [генов](#).
- **Амплификация** ([лат.](#) *amplificatio* — усиление, увеличение), в [молекулярной биологии](#) — процесс образования дополнительных копий участков хромосомной [ДНК](#), как правило, содержащих определённые [гены](#).



# Особенности метода ПЦР

- высоко **специфичен** (выявляет конкретного возбудителя)
- высоко **чувствителен** (выявляет единичные копии НК возбудителя)
- сокращено серологическое окно (ВГС: для ИФА период окна от 2 недель до 6 месяцев, РНК для ПЦР-анализа появляется в первую неделю после инфицирования)
- возможность диагностики на разных стадиях заболевания
- возможность **одновременного** анализа на предмет выявления нескольких возбудителей
- универсальность (широкий спектр клинических проб для анализа, а также минимальный объем, необходимый для исследования)
- простота и быстрота исполнения



# Основные принципы ПЦР

- Амплификация фрагмента происходит между двумя праймерами
- Амплификацию проводят в течение 30-40 циклов
- Каждый цикл состоит из смены температурных режимов
- В реакции используют термостабильные ДНК-полимеразы
- За 30 циклов происходит умножение амплифицируемого фрагмента ДНК в 1 000 000 000 раз
- Кинетика ПЦР характеризуется выходом на «плато»

# Проведение ПЦР

- Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты [ДНК](#) при помощи [ферментов](#) в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах ([репликации](#)), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки [ДНК](#). В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов.

# Компоненты реакции

- ДНК-матрица, содержащая необходимый участок ДНК.
- Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза) и другие.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции.

---

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции.

# Праймер

- Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.
- **Праймер** — короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, комплементарный ДНК- или РНК-мишени; служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы. Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца.

# Амплификатор

- ПЦР проводят в *амплификаторе* — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения амплифицированных молекул при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .





# Ход реакции

- Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий.
- **Денатурация**
- **Отжиг**
- **Элонгация**

# Программа ПЦР

Температурный режим обеспечивается программируемым термостатом (термоциклер, амплификатор)



# Денатурация

- Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С на 0,5—2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (*денатурацией*), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

# Отжиг

- Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*. Время стадии отжига — 30 секунд, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °С и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60—72 °С.

# Элонгация

- ДНК-полимераза [реплицирует](#) матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5'- к 3'-концу. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы *Taq* и *Pfu* наиболее активны при 72 °С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию *финальной элонгации*, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 минут.
- Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».



# Схема ПЦР

1 копия  
(матрица)



Денатурация

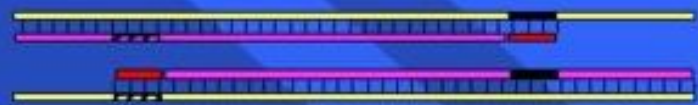


Отжиг праймеров  
Синтез

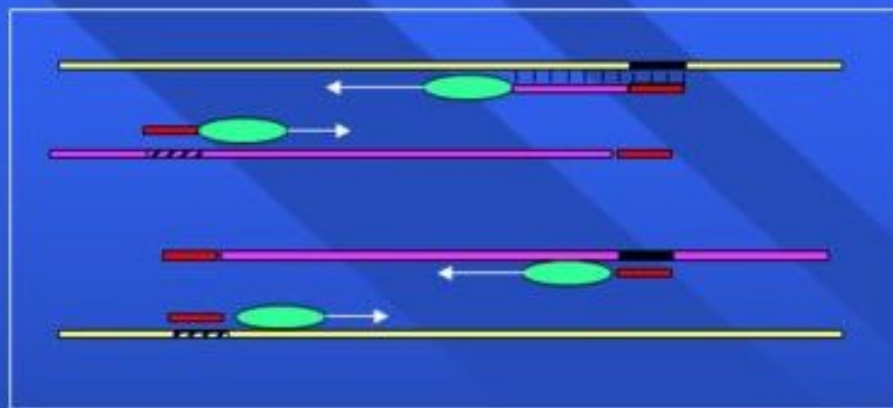


2 копии



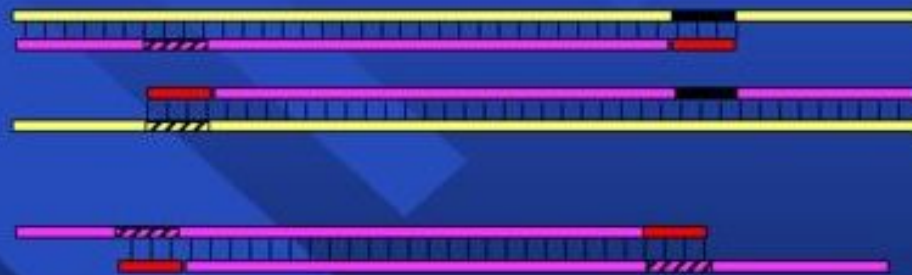


Продукты после 1-го цикла реакции



Денатурация  
Отжиг  
Синтез

Продукты после 2-го цикла  
реакции



Продукт ПЦР

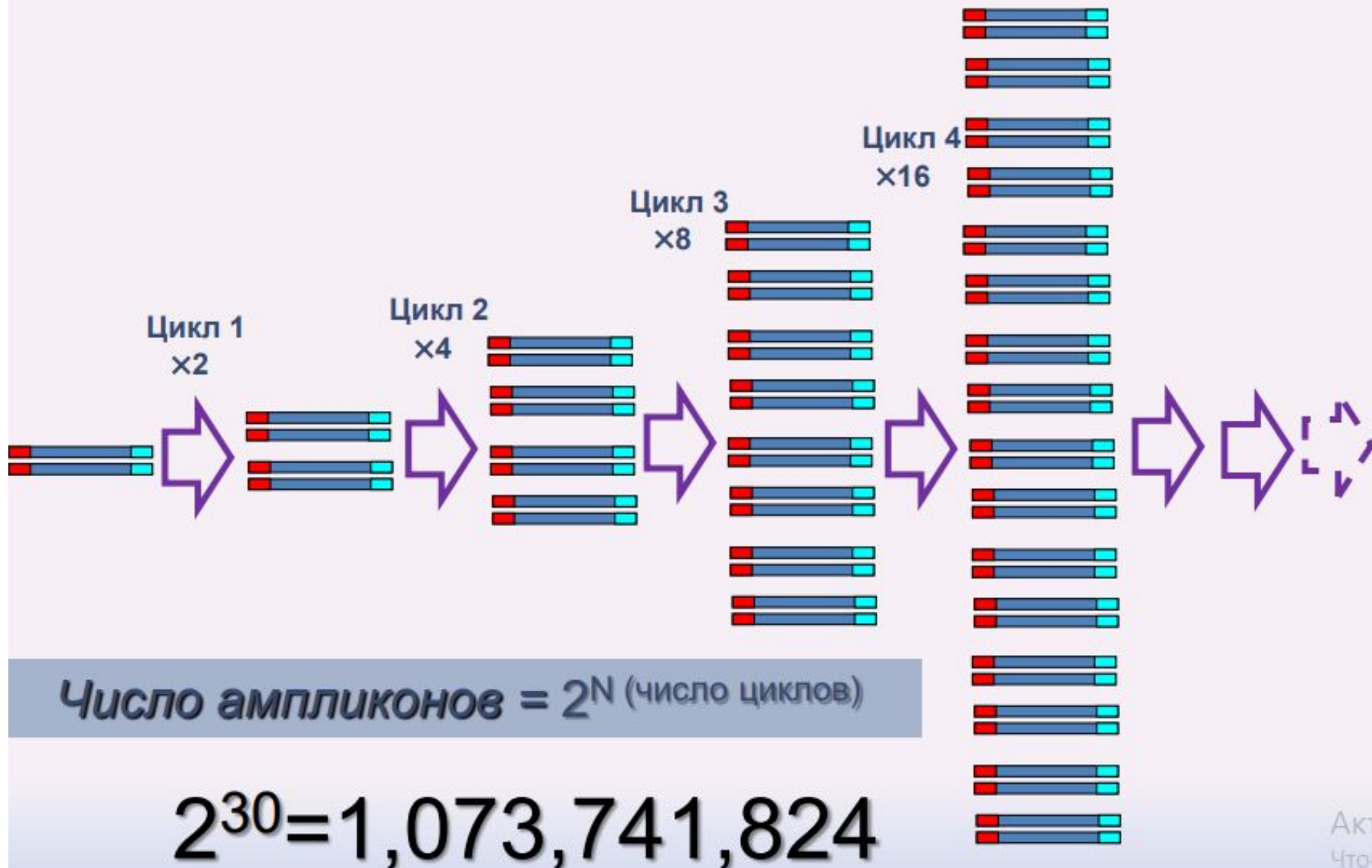


# Основные причины выхода на «плато»

- истощение субстратов (дНТФ и праймеров)
- падение активности реактантов (дНТФ и фермента)
- накопление ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы
- конкуренция за реактанты неспецифическими продуктами или праймер-димерами
- концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации.

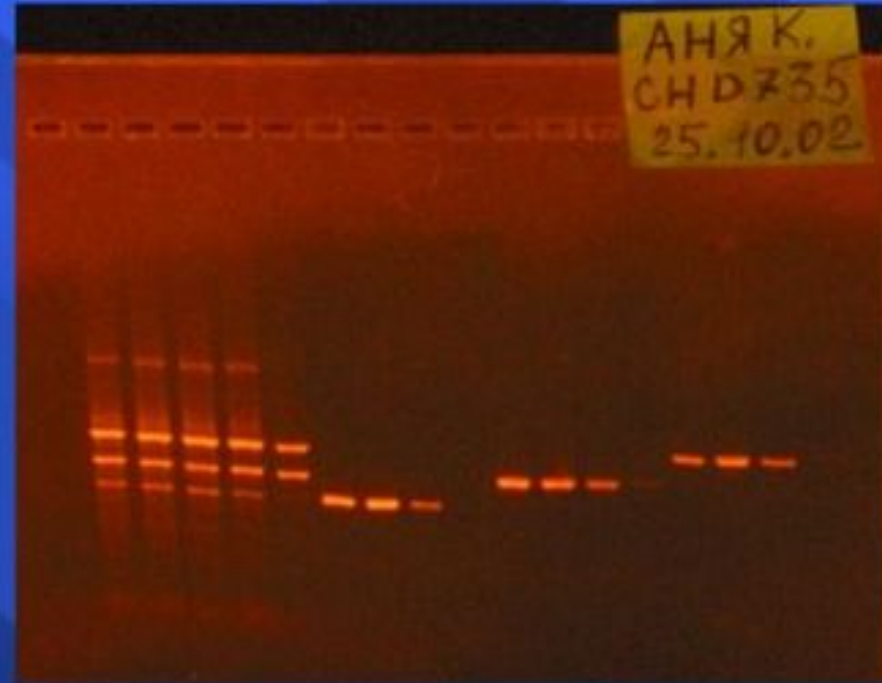


# Накопление продукта амплификации



# Оценка результатов реакции

- Электрофорез



- Гибридизация с зондами



# Варианты ПЦР

- RPA
- Вложенная ПЦР | | Nested PCR
- Инвертированная ПЦР
- ПЦР с обратной транскрипцией
- Асимметричная ПЦР
- Количественная ПЦР
- Ступенчатая ПЦР
- Метод молекулярных колоний
- ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК
- ПЦР длинных фрагментов

# Применение ПЦР

- ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах.
- **Криминалистика**
- **Установление отцовства**
- **Медицинская диагностика**
- **Клонирование генов**
- **Секвенирование ДНК**
- **Мутагенез**

Спасибо за внимание !

