

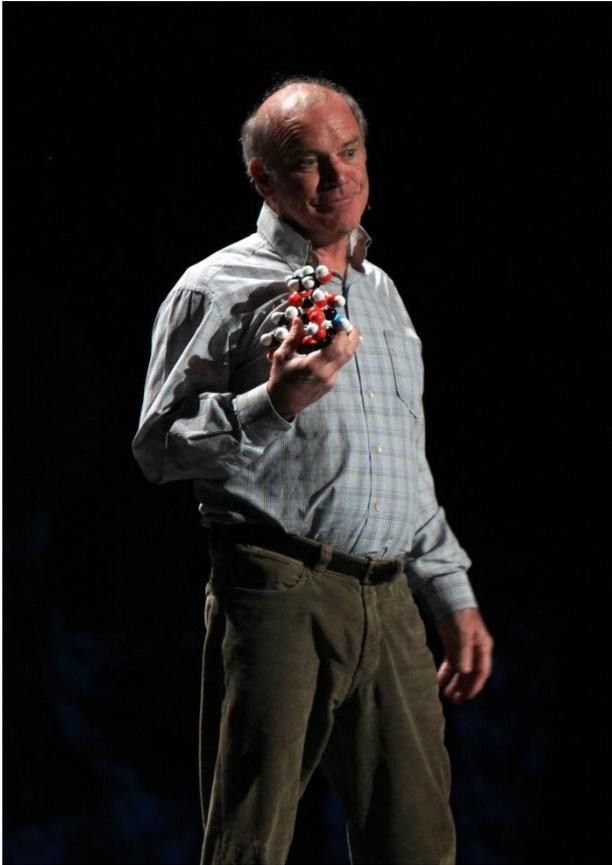
Полимеразная цепная реакция

Мингазова Алёна

ЭКП-1-18НМ

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

История



- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была изобретена в 1983 году американским биохимиком **Кэри Муллисом**. Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.
- В 1993 году Кэри Муллис получил за это **Нобелевскую премию по химии**.

Проведение ПЦР

- Метод основан на **многократном избирательном копировании определённого участка ДНК** при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*).
- 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. (Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований).

Компоненты реакции

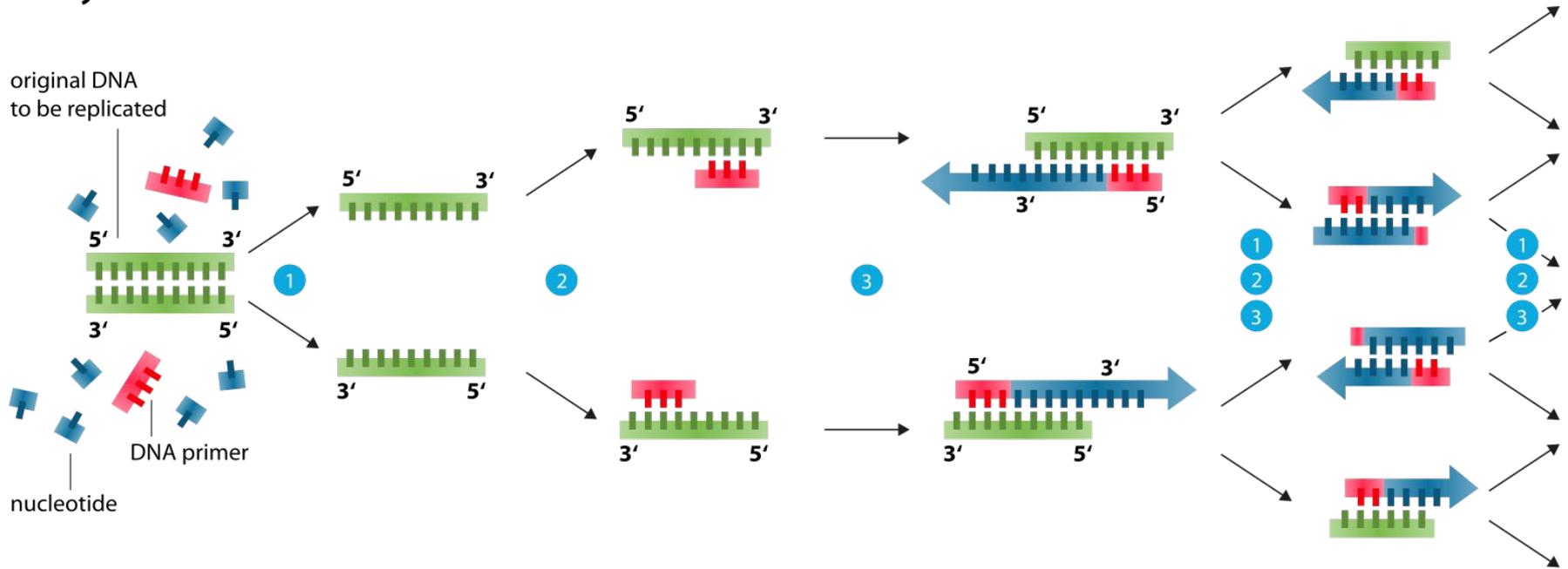
Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- **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), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза), *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза) и другие.
- **Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- **Ионы Mg^{2+}** , необходимые для работы полимеразы.
- **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют **высококипящее масло**, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление **пирофосфатазы** может увеличить выход ПЦР-реакции.

Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

Денатурация

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин, 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 мин для полной денатурации матрицы и праймеров.

ОТЖИГ

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы **праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей**.

Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается **на 5 градусов меньше, чем температура плавления праймеров**. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимеразы уже успевают синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °C и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60—72 °C.

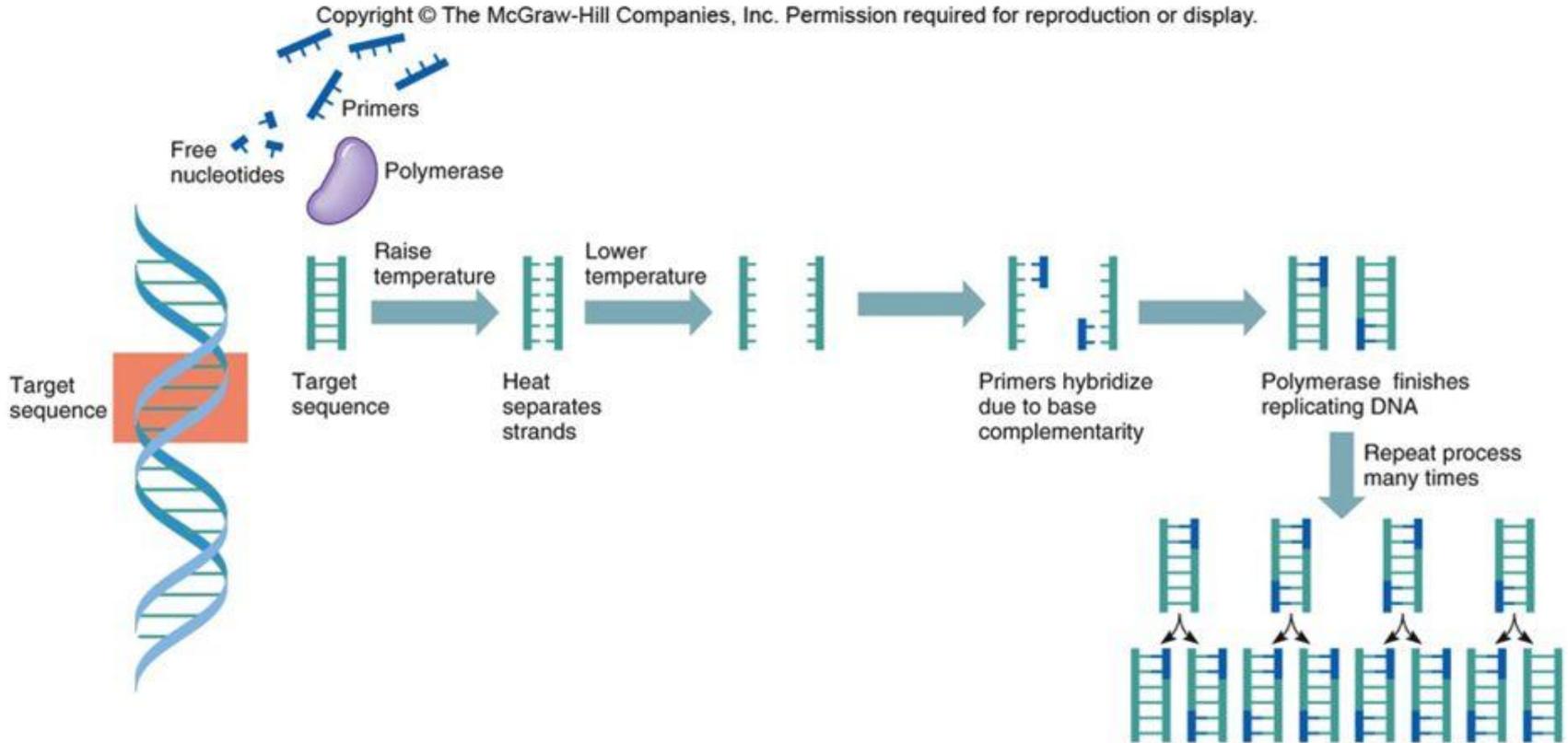
Элонгация

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 °C**. 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 мин.

PCR

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Использование ПЦР

ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах.

- **Криминалистика**
- **Установление отцовства**
- **Медицинская диагностика**
- **Персонализированная медицина**
- **Клонирование генов**
- **Секвенирование ДНК**
- **Мутагенез**