

Полимеразная цепная реакция



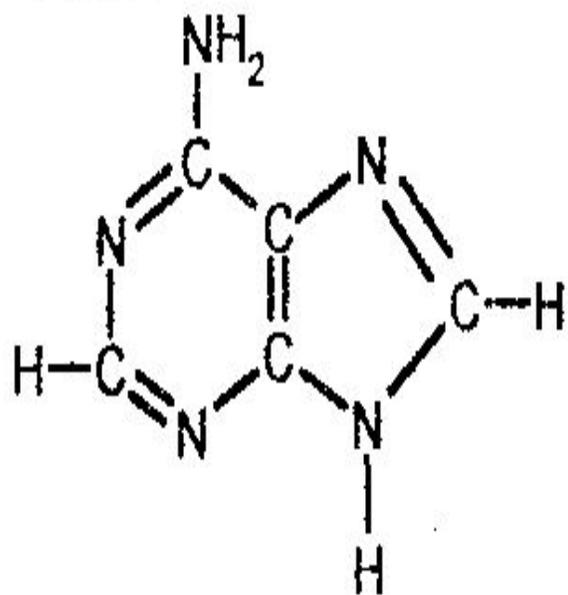
Антиген

- Любое чужеродное вещество для организма (белок, полисахарид, липополисахарид, гликопротеин, липопротеин, нуклеопротеин), которое заставляет вырабатывать антитела иммунной системой или производить другие формы иммунного ответа.
- **Свойства антигена:**
- Чужеродность, иммуногенность, специфичность.
- **По отношению к Т-лимфоцитам различают:** Т-зависимые и Т-независимые антигены.

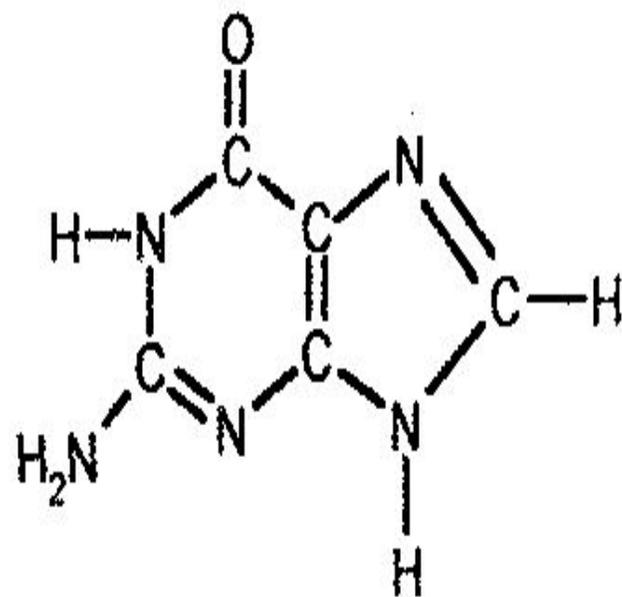
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)

- *Макромолекула, обеспечивающая хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. Содержит информацию о структуре различных РНК и белков.*
- *Состоит из двух поли нуклеотидных цепей.*
- *Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы.*
- *В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований: аденин, гуанин, тимин и цитозин. Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплиментарности: аденин соединяется только с тимином, гуанин — только с цитозином.*
- *Последовательности мономеров обеспечивают специфичность каждого белка.*

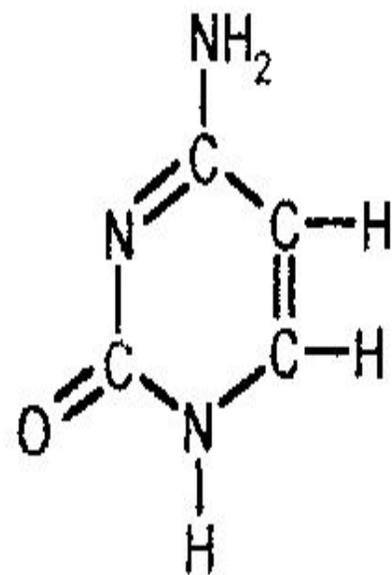
Аденин



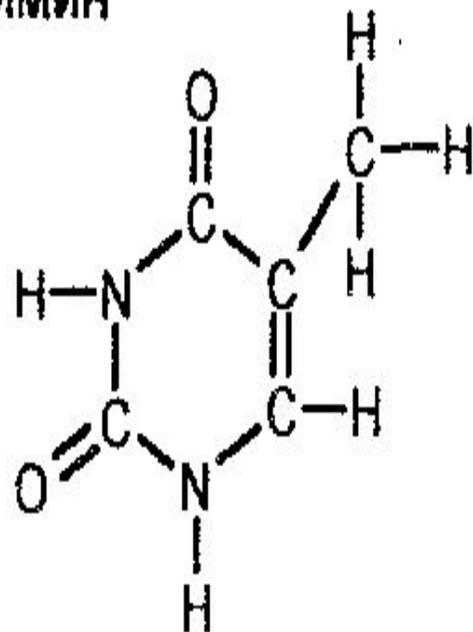
Гуанин

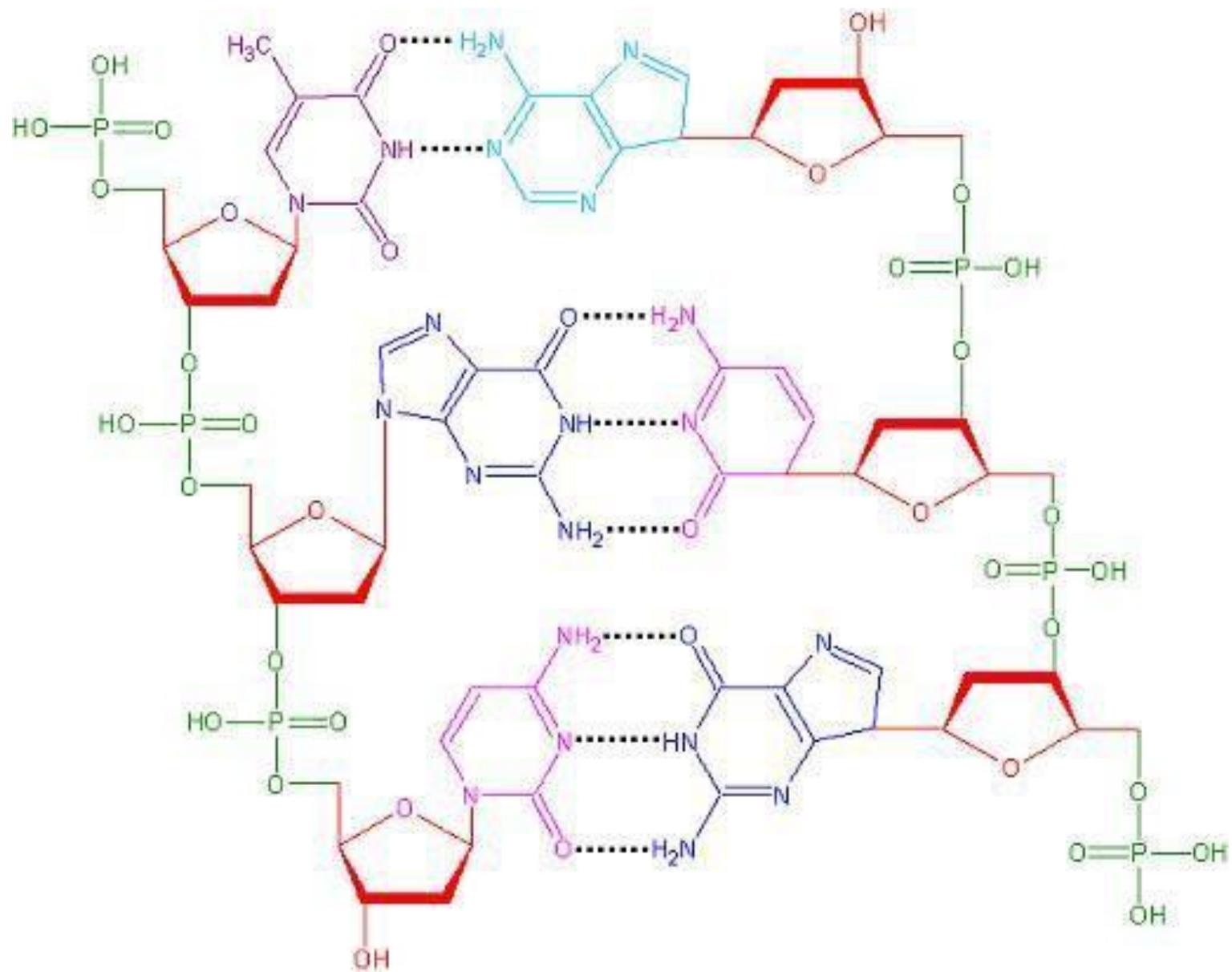


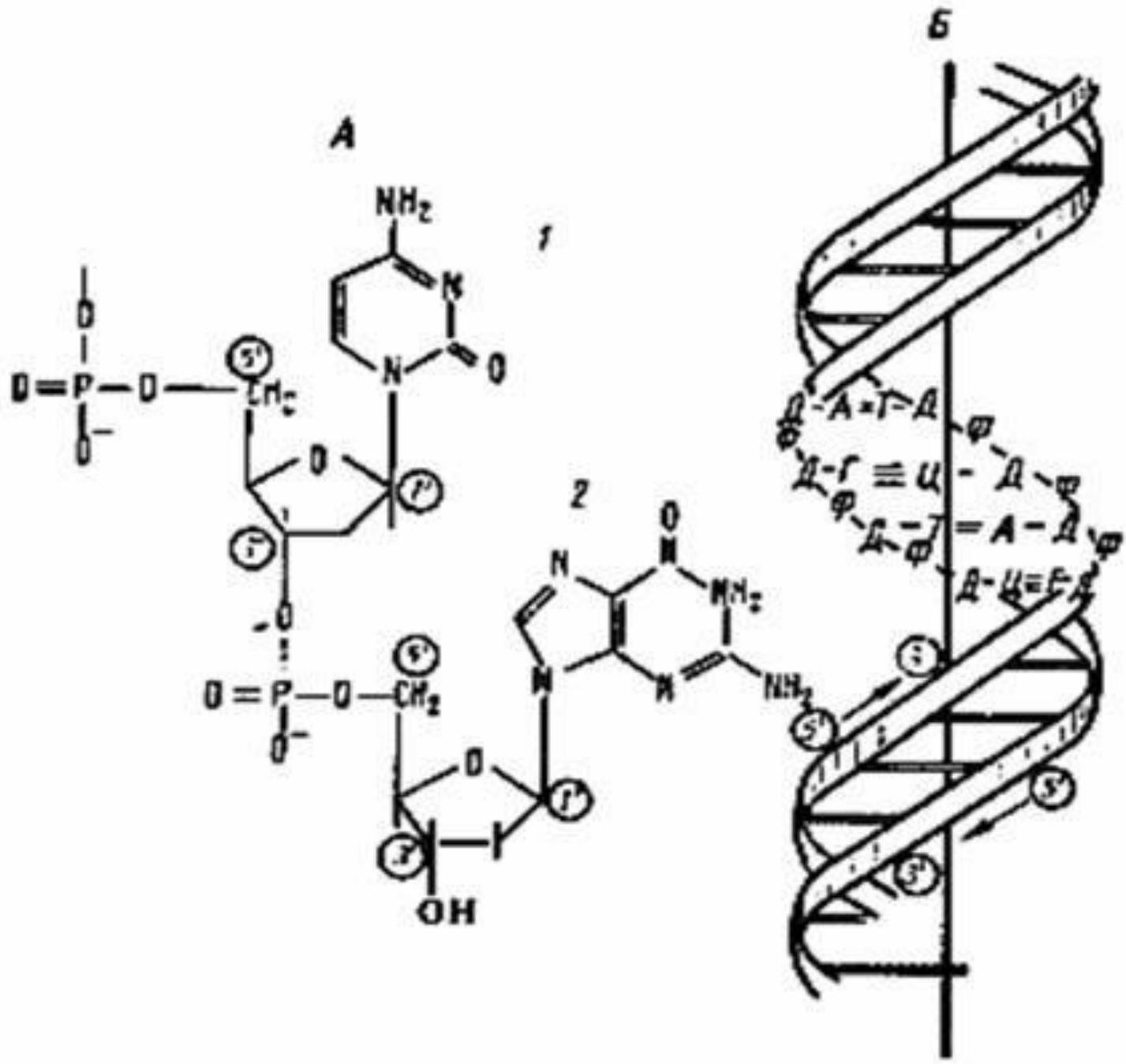
Цитозин

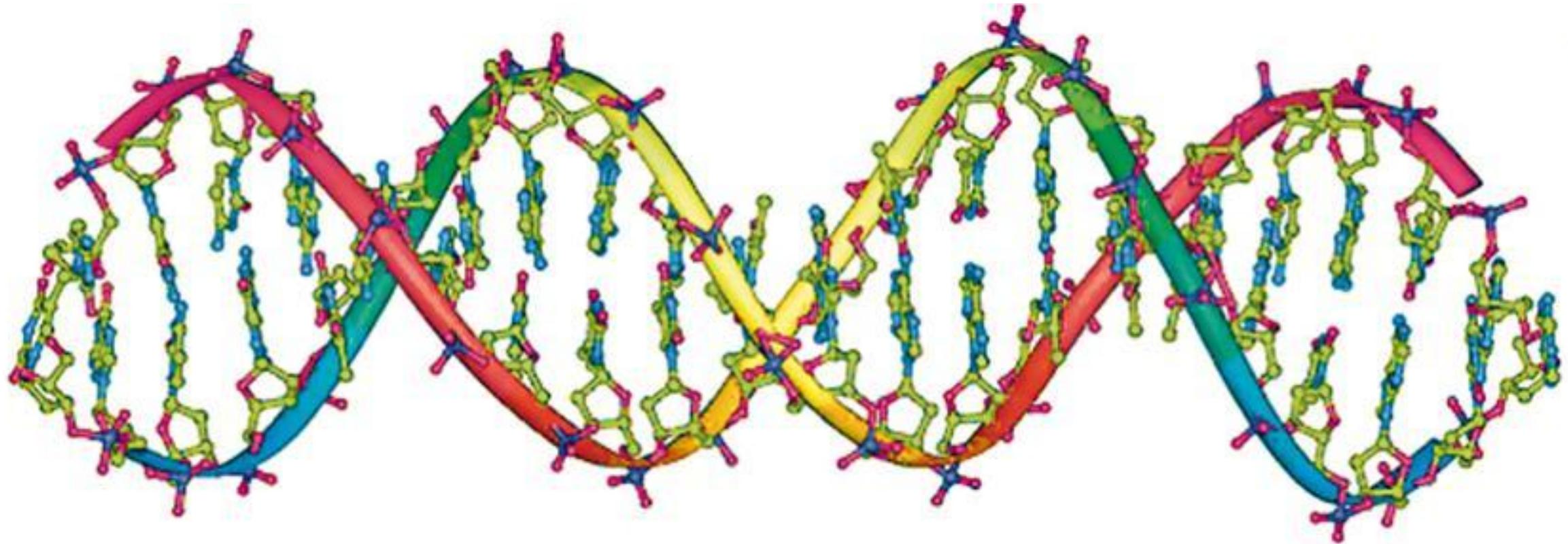


Тимин









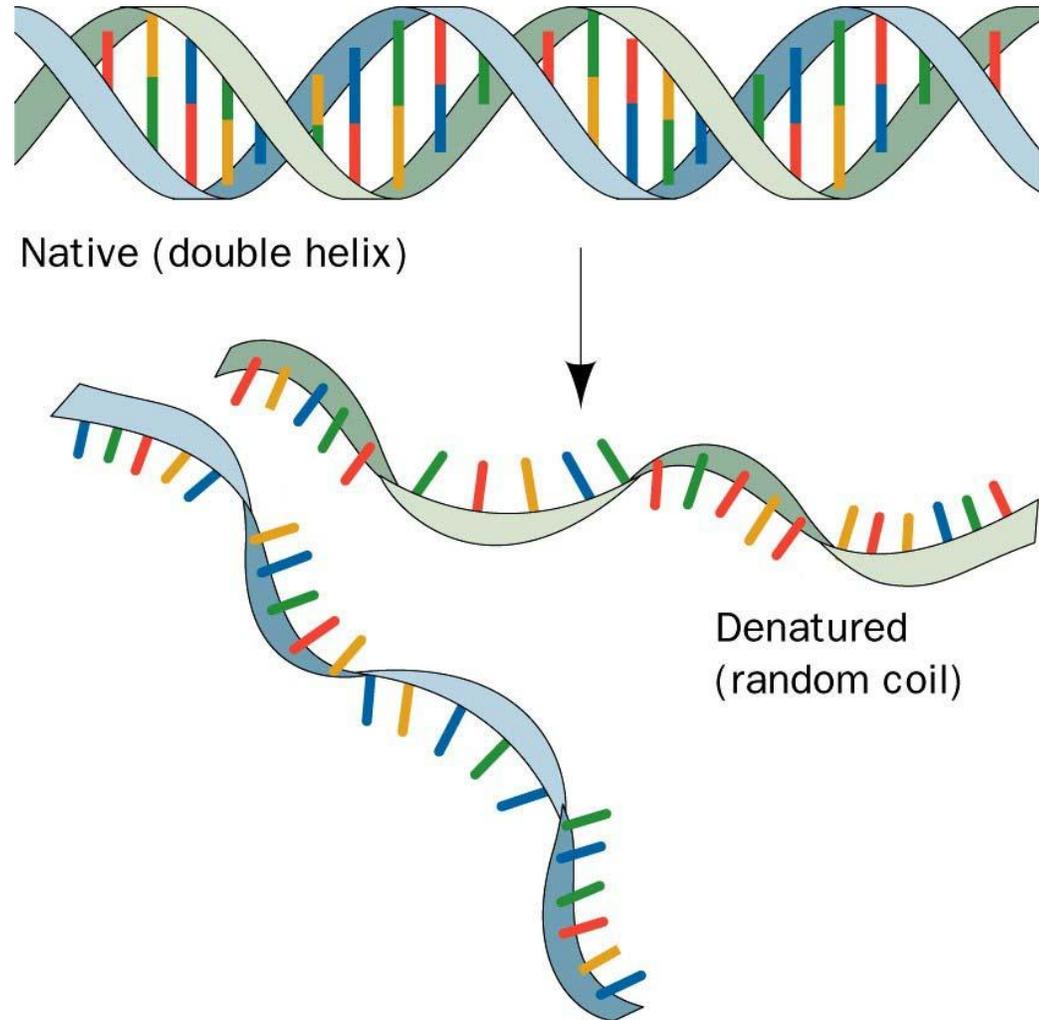
2 HM

Денатурация

Цепи ДНК удерживаются вместе благодаря водородным связям.

При увеличении температуры до 80-90 С или нарушении рН происходит разрушение водородных связей и двухцепочечная ДНК превращается в одноцепочечную – ДЕНАТУРАЦИЯ молекулы ДНК.

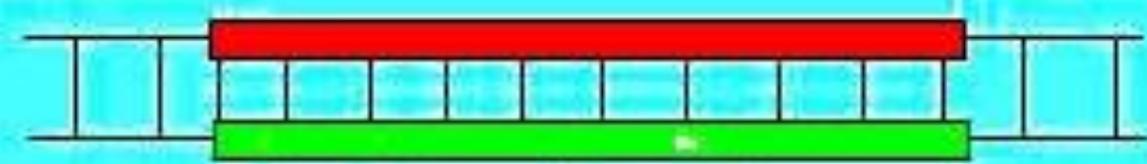
При нормализации температуры или рН расплетенные цепи сплетаются и обретают вид двойной спирали



ПЦР

- Метод основан на амплификации, т.е. увеличении копий специфического (маркерного) гена возбудителя.
- Для этого двунитиведную ДНК, выделенную из исследуемого материала, **денатурируют** (расплетают при нагревании около 90С) и **дистраивают** (при охлаждении – отжиге при 50С) к расплетенным нитям ДНК новые комплиментарные нити.
- **Дистраивание** (при 70С) новых комплиментарных нитей ДНК происходит при добавлении к искомым генам **праймеров** (затравки из коротких однонитевидных ДНК, комплиментарных 3-концам ДНК искомого гена), **ДНК-полимеразы и нуклеотидов**.
- 3-концы прамеров дистраиваются добавлением **термостабильной полимеразы** (Tag-полимеразы). Этот процесс называется **элонгацией**.
- В результате дистраивания комплиментарных нитей из одного гена образуются два.

Принцип метода направленной амплификации (1-ый цикл)



Денатурация

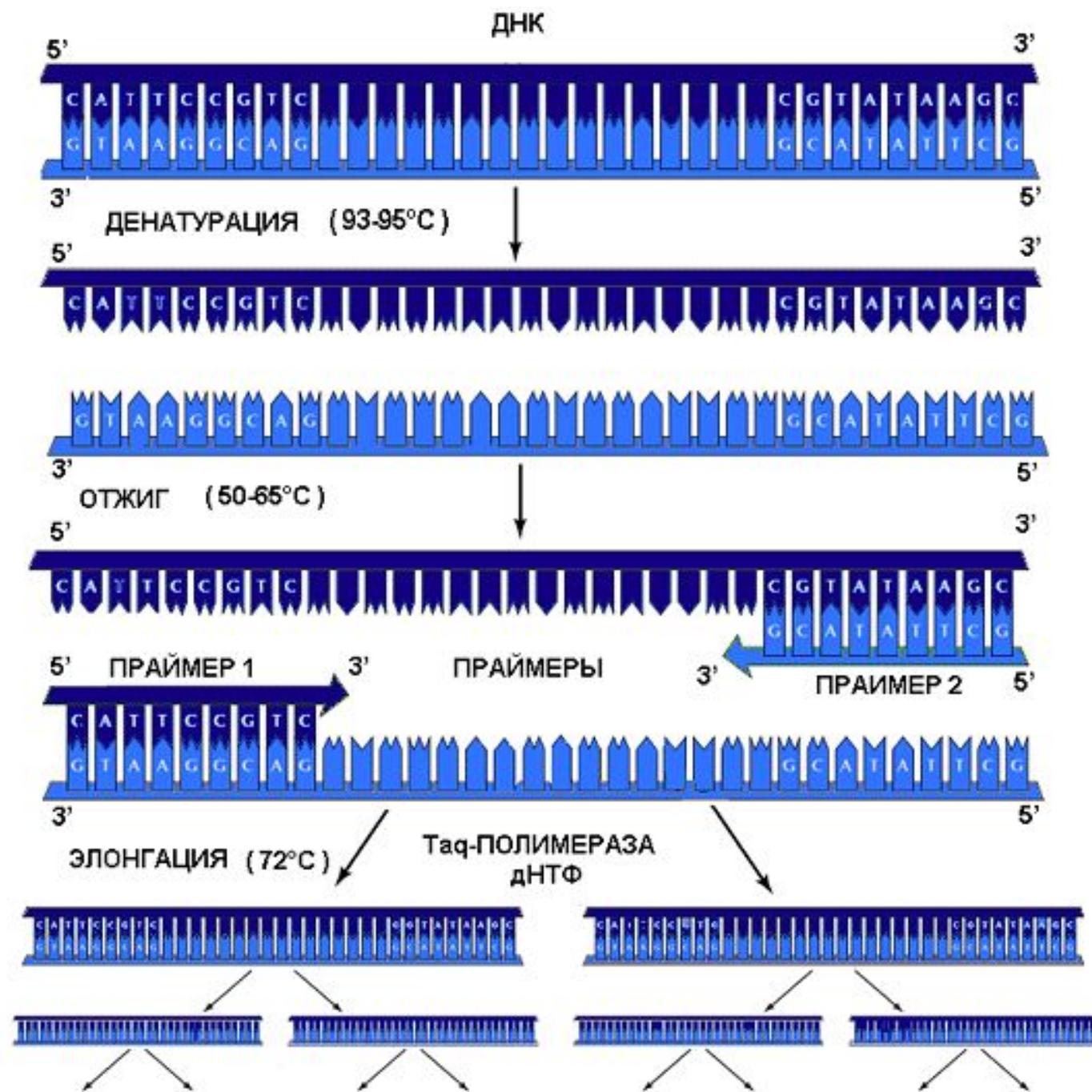


95°



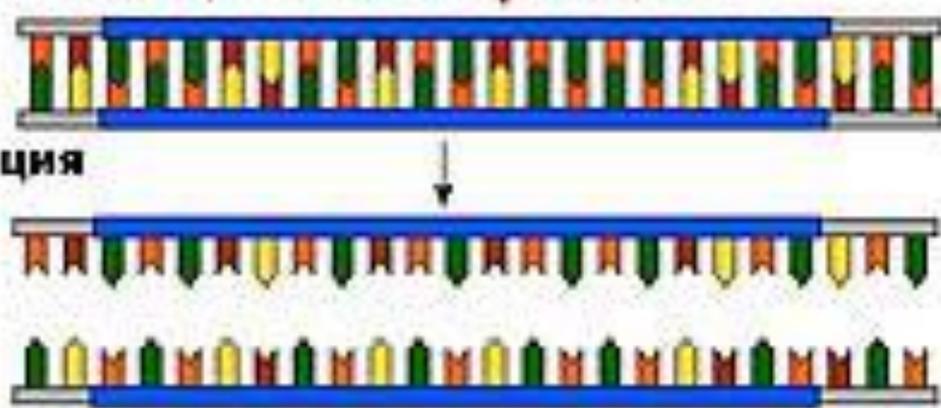
Присоединение
праймеров





1-ый цикл амплификации

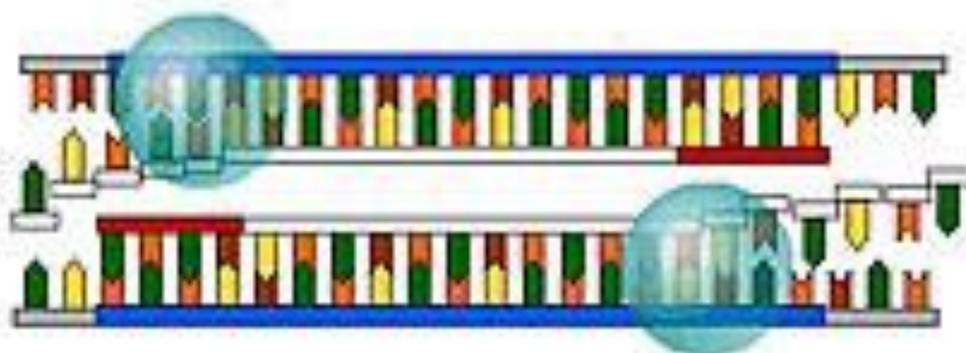
1-ый этап
Денатурация
93-95°C



2-ый этап
Отжиг праймеров
50-65°C



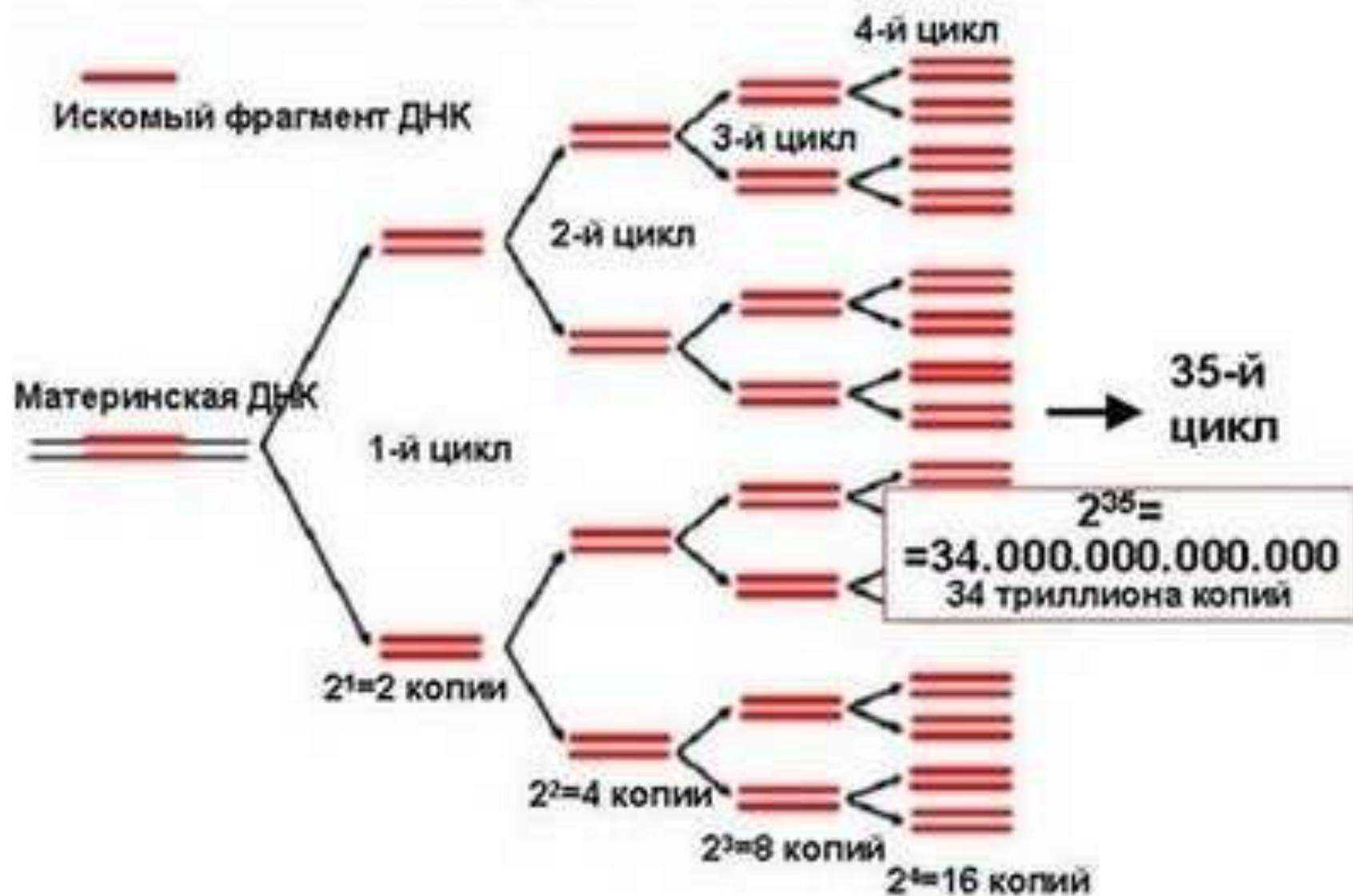
3-ий этап
Синтез цепи ДНК
72°C



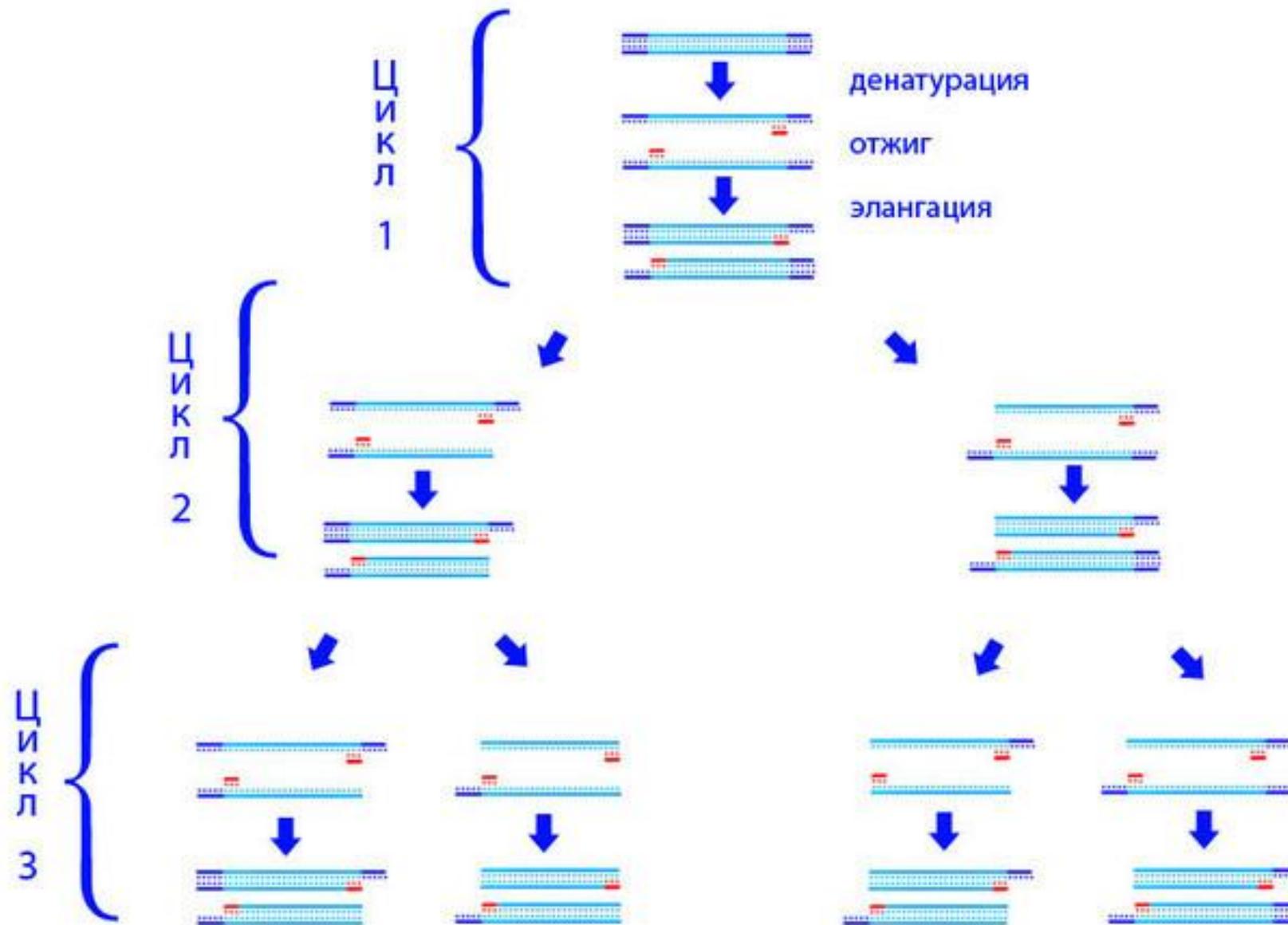
ПЦР

- Этот цикл копирования генов, состоящий из **денатурации, отжига, элонгации**, многократно повторяется при заданных температурных режимах.
- Продукты ПЦР отделяют с помощью гель=электрофореза и выявляют с помощью добавленного бромида этидия, который флюоресцирует в УФ-лучах.

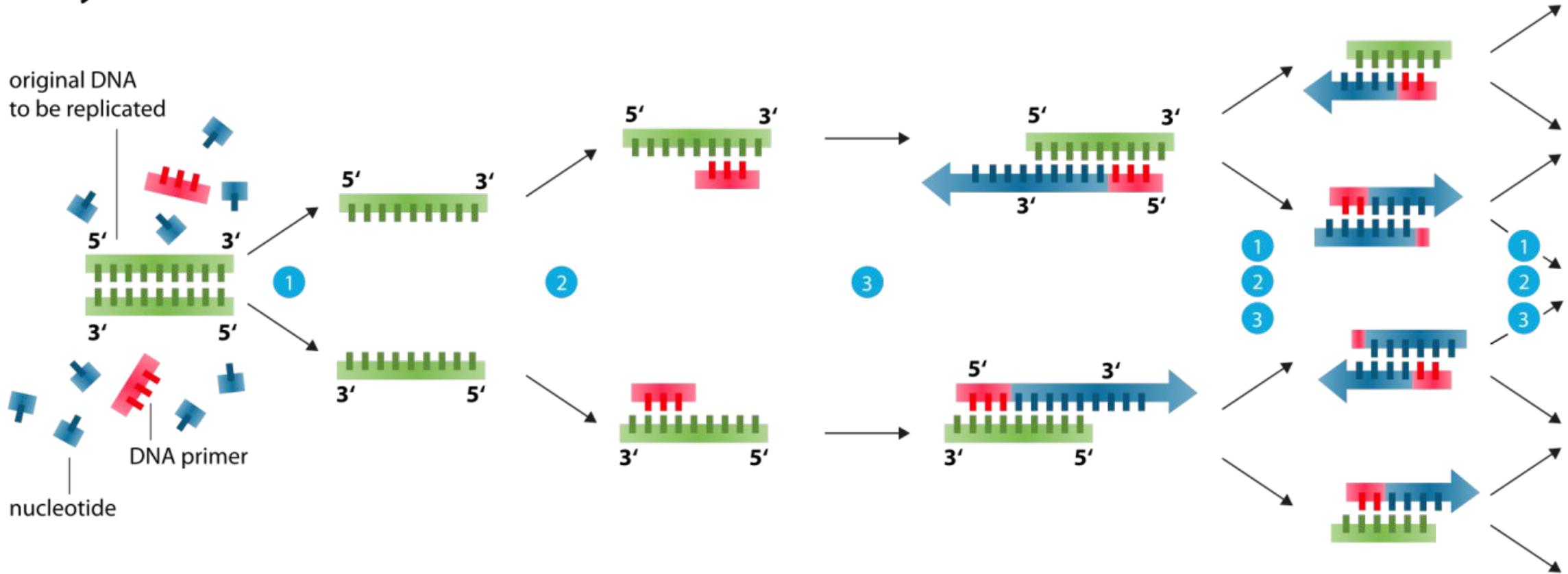
Общая схема ПЦР



Полимеразная цепная реакция

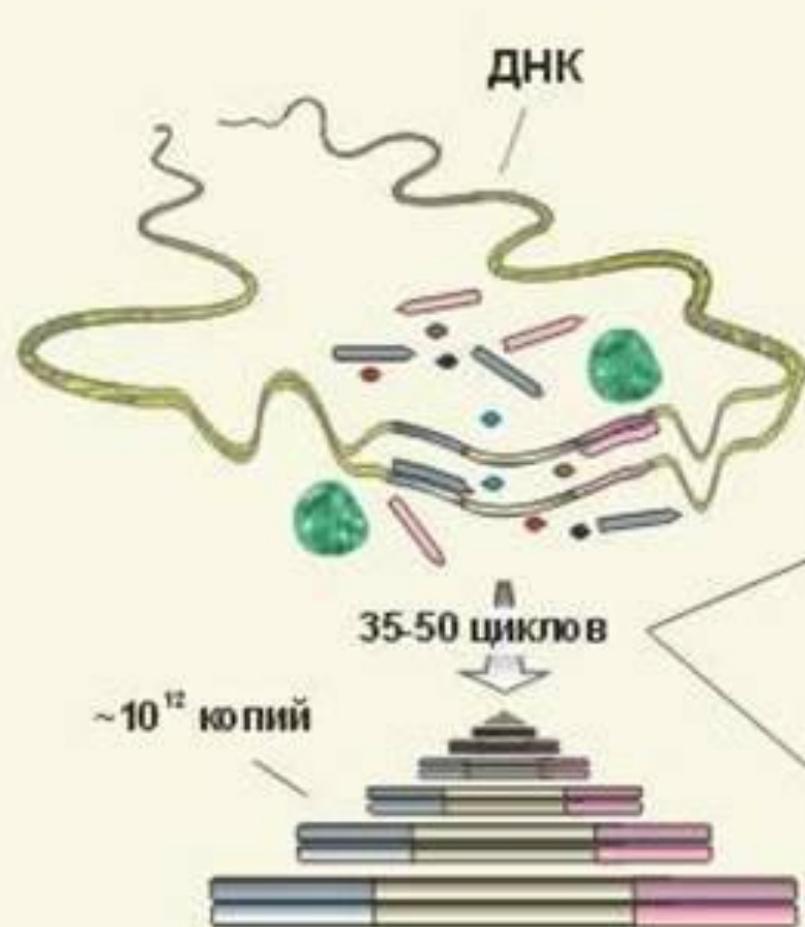


Polymerase chain reaction - PCR



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

Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)



The PCR Process

