

ПЦР

PCR Demo

1985

- Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.
 - **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.**
 - Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, CA 94608.

PCR: Polymerase Chain Reaction

- Позволяет синтезировать большое количество фрагментов ДНК *in vitro* в ходе циклического ферментативного синтеза ДНК
- Наиболее популярный и широко распространенный метод молекулярной биологии

-
- 1. простой
 - 2. высоко чувствительный
 - 3. воспроизводимый
 - 3. быстрый

- Высокая чувствительность*
- Высокая специфичность*
- Проста в исполнении*
- Нет необходимости в выделении или сложной очистке матричной ДНК*
- Возможность работы с практически любым биологическим материалом*

Почему полимеразная?

В реакции используется всего один фермент – ДНК полимераза

Почему цепная?

Продукты первой реакции становятся субстратом для второй реакции, продукты второй реакции – субстратом для третьей и так далее.

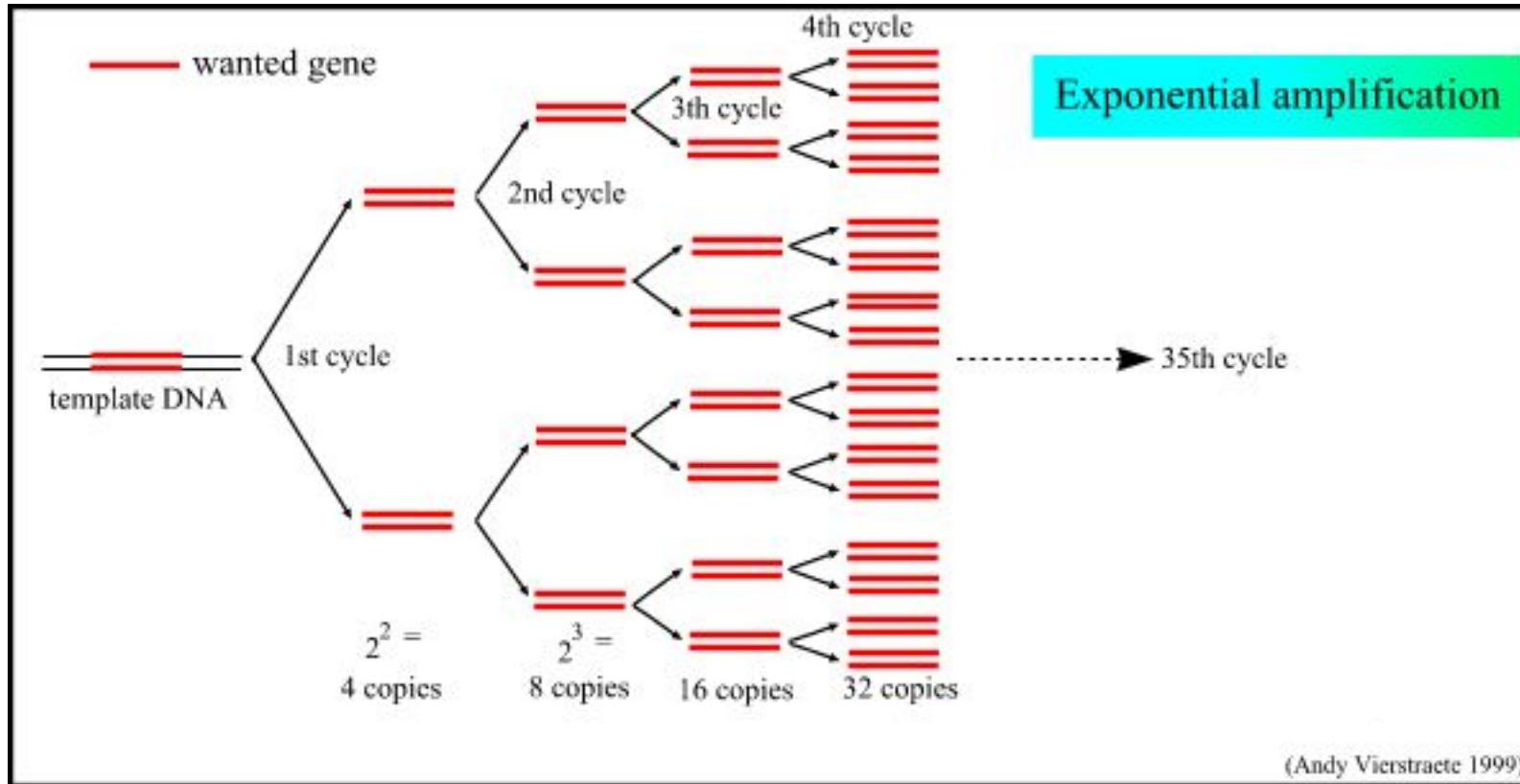
ПЦР

- Синтезирует большое количество ДНК(μg) из очень маленьких исходных количеств (fg) [количество исходной матрицы возрастает в миллиард раз]
- Способна амплифицировать 1 уникальный фрагмент ДНК, находящийся в смеси молекул ДНК [Геном человека можно представить как смесь из 12 миллионов фрагментов ДНК длиной 300 пар]

Lots of practical applications, virtually unlimited:

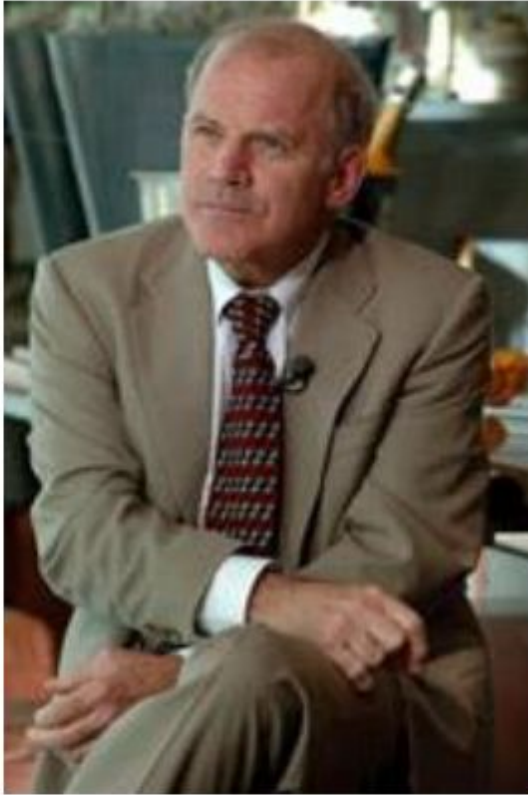
- ✓ **Amplify DNA for Cloning (PCR)**
- ✓ **Amplify DNA for sequencing without cloning (PCR)**
- ✓ **DNA sequencing reaction (PCR)**
- ✓ **Mapping genes and regulatory sequences**
- ✓ **Linkage analysis (identify genes for traits/diseases)**
- ✓ **Diagnose disease**
- ✓ **Pathogen screening**
- ✓ **Sex determination**
- ✓ **Forensic analysis**
- ✓ **Paternity/maternity (relatedness)**
- ✓ **Behavioral ecology studies (relatedness)**
- ✓ **Molecular systematics and evolution (comparing homologous sequences in different organisms)**
- ✓ **Population genetics (theoretical and applied)**
- ✓ **Physiological genetics (studying basis of adaptation)**
- ✓ **Livestock pedigrees (optimize breeding)**
- ✓ **Wildlife management (stock identification/assessment)**
- ✓ **Detection of Genetically Modified Food (GMOs)**

Exponential Amplification



30 cycles --- 1 billion copies in theory

1983 г. Kary B. Mullis изобрел метод ПЦР



1993 г. лауреат Нобелевской премии

Компоненты ПЦР реакции

- ДНК матрица
- Праймеры
- Термостабильная полимераза
 - Taq Polymerase
- dNTP
 - (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- PCR Buffer (mg^{++})
- Амплификатор



Thermus aquaticus

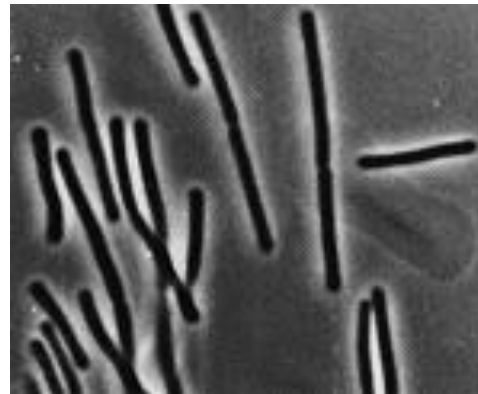


Термостабильные ДНК полимеразы

- Поскольку в ходе ПЦР смесь регулярно подвергается воздействию высокой температуры, необходимо использовать термостабильную ДНК полимеразу
- Taq DNA полимеразу впервые выделили из бактерии *Thermus aquaticus* в 1976
- Taq обладает максимальной ферментативной активностью при 72°C - 80 °C, и слабо активна при комнатной температуре



**Hot water bacteria:
Thermus aquaticus
Taq DNA polymerase**

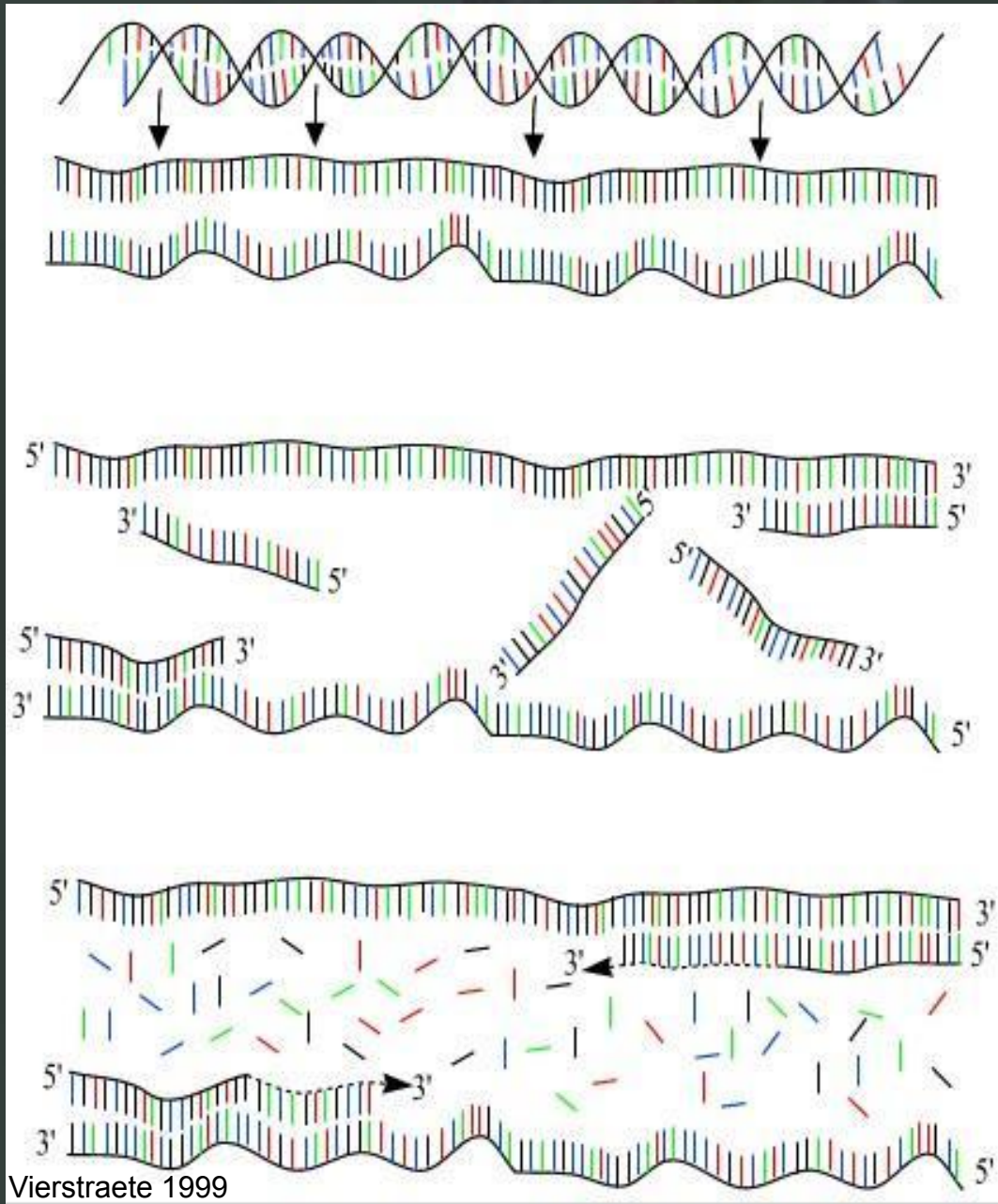


**Taq DNA polymerase was purified from
the hot springs bacterium *Thermus aquaticus* in 1976
Taq has maximal enzymatic activity
at 75 °C to 80 °C, and substantially reduced
activities at lower temperatures.**



Hoffman-La Roche bought the PCR and Taq patents for \$330 million in 1989

Roche против Promega: В 1992 году Цетус продала права на метод и патент на использование Taq-полимеразы компании Хофман-Ла Рош за 300 млн долларов. Однако оказалось, что Taq-полимераза была охарактеризована советскими биохимиками А. Калединым, А. Слюсаренко и С. Городецким в 1980 году, а также за 4 года до этой советской публикации, то есть в 1976 году, американскими биохимиками Alice Chien, David B. Edgar и John M. Trela. В связи с этим компания Promega пыталась в судебном порядке заставить Рош отказаться от исключительных прав на этот фермент. В 2005 году срок действия патента истек.



Step 1:
Denaturation
dsDNA to ssDNA

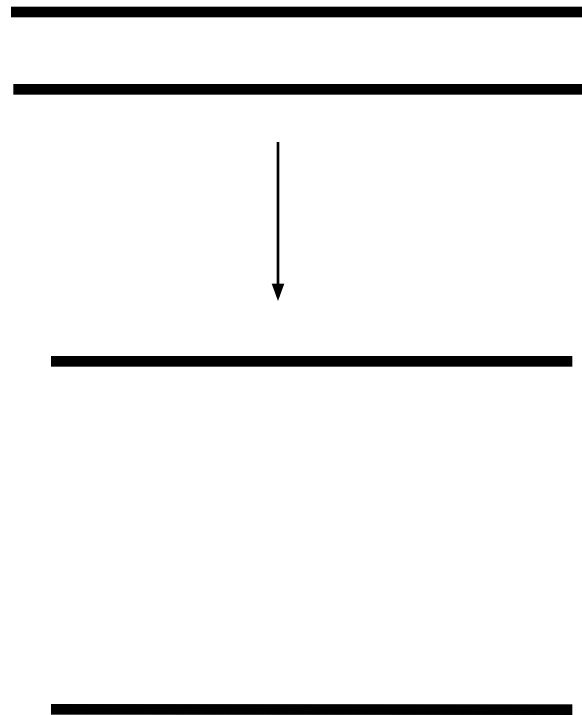
Step 2:
Annealing
Primers onto template

Step 3:
Extension
dNTPs extend 2nd strand

Vierstraete 1999

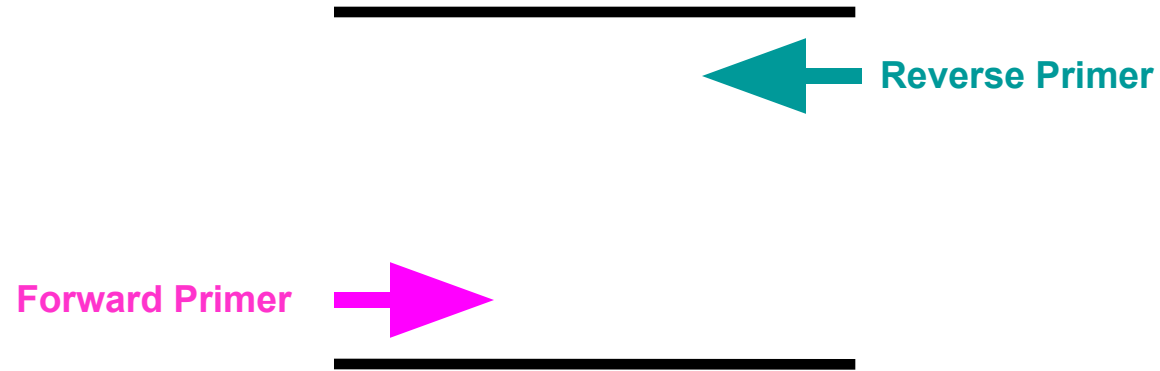
extension products in one cycle serve as template in the next

Шаг1. Денатурация ДНК



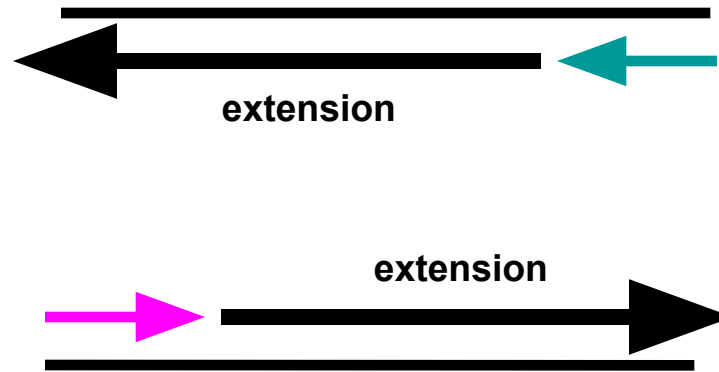
95 °С, этот цикл имитирует работу хеликазы в клетке

Шаг 2. Гибридизация или отжиг праймеров



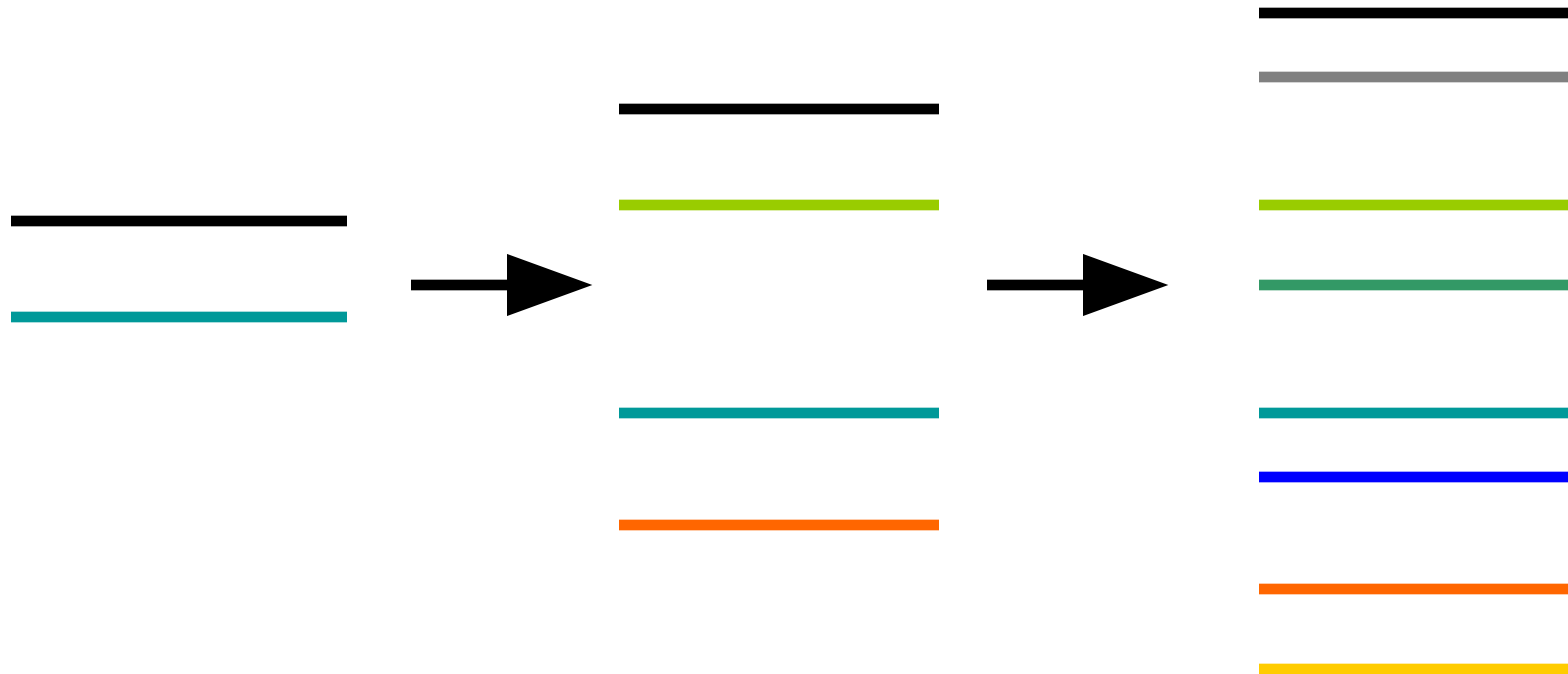
Праймеры связываются с комплементарными им последовательностями на ДНК. Праймеры выбираются так, чтобы один был комплементарен одной цепи ДНК на одном конце амплифицируемого участка, а другой был комплементарен другой цепи ДНК на другом конце амплифицируемого участка

Шаг 3. Удлинение



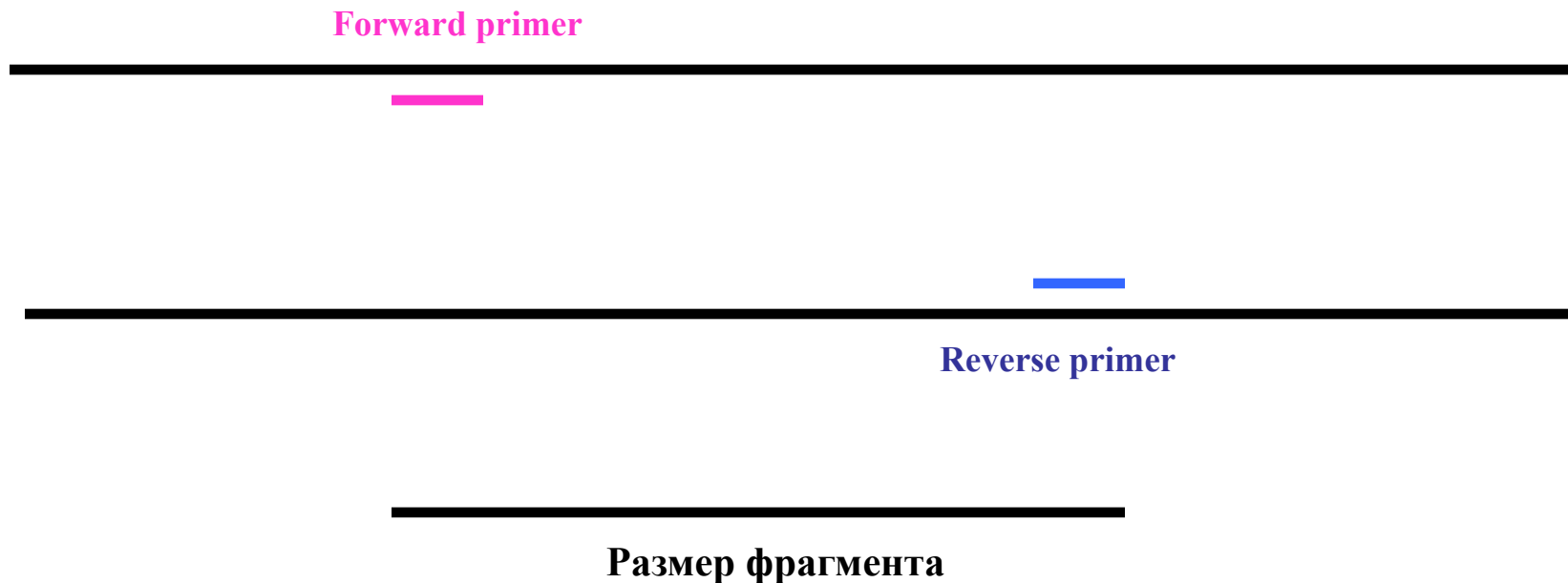
ДНК полимераза удлиняет праймер в 5'-3' направлении, присоединяя нуклеотиды (А-Т, С-Г)

- Следующий цикл начинается с денатурации ДНК, синтезированной в предыдущем цикле



Размер ДНК фрагмента, синтезированного в ПЦР зависит от расстояния между праймерами

- ПЦР амплифицирует фрагмент ДНК, находящийся между двумя праймерами
- Если последовательность генома известна, можно выбрать любые праймеры и с помощью ПЦР синтезировать любой фрагмент ДНК этого организма

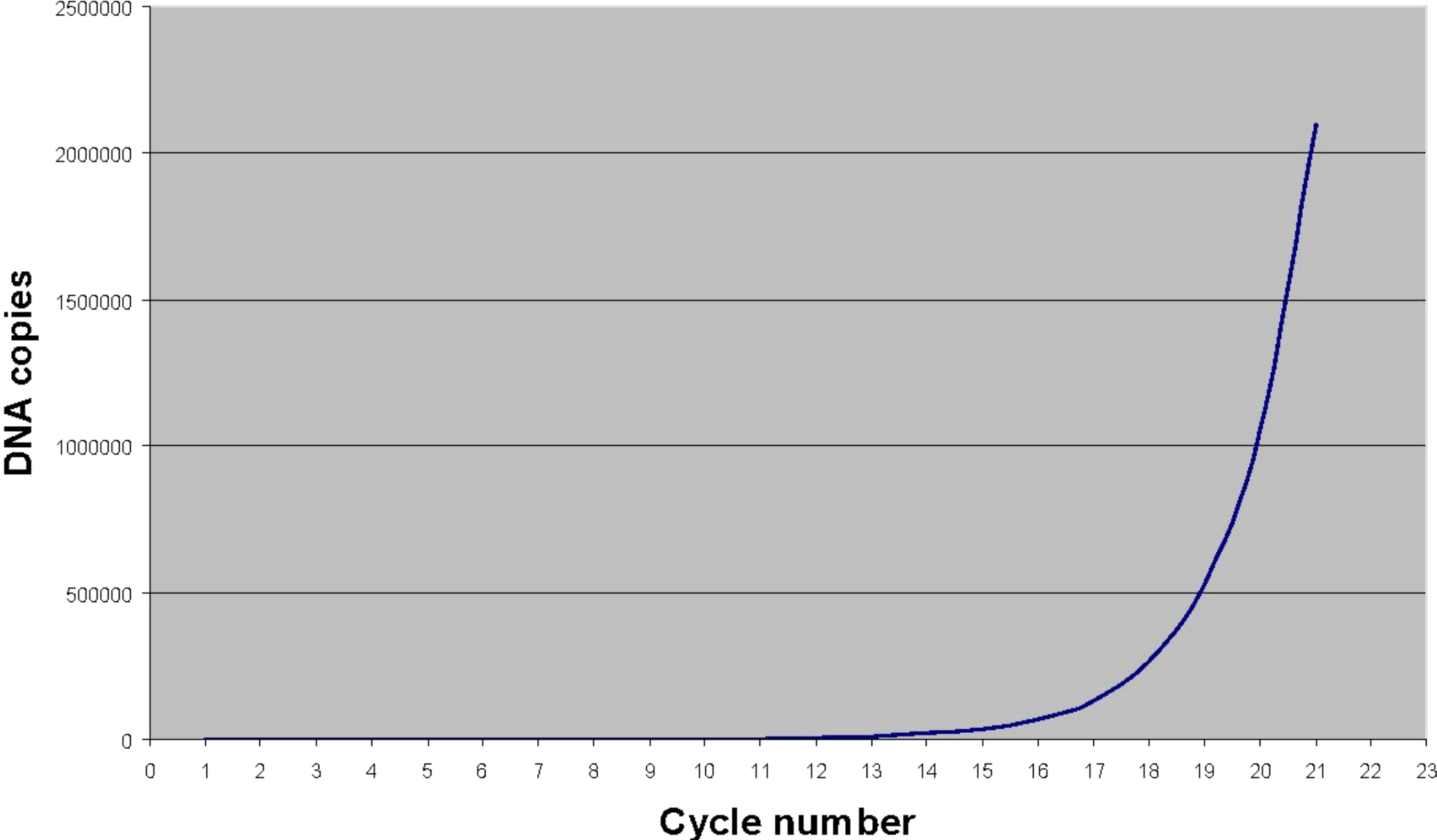


Фрагмент ДНК между праймерами удваивается каждый цикл ПЦР

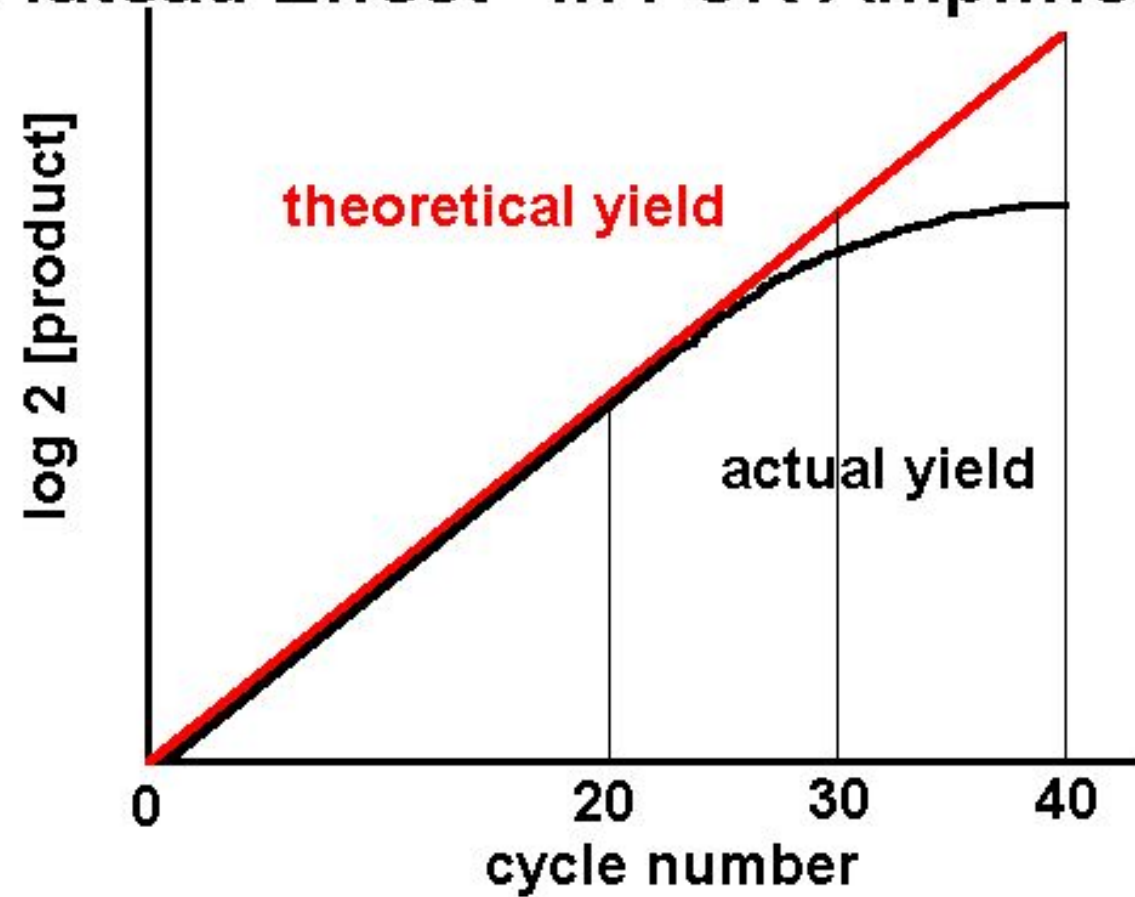
Например, после 5 циклов ПЦР с одной молекулы ДНК образуется 2^5 (64) копий выбранного участка.

Если в реакцию берется 1 молекула ДНК проводят 40 циклов. В итоге должно получиться 2^{40} (1099511627776) копий выбранного участка

DNA copies vs Cycle number



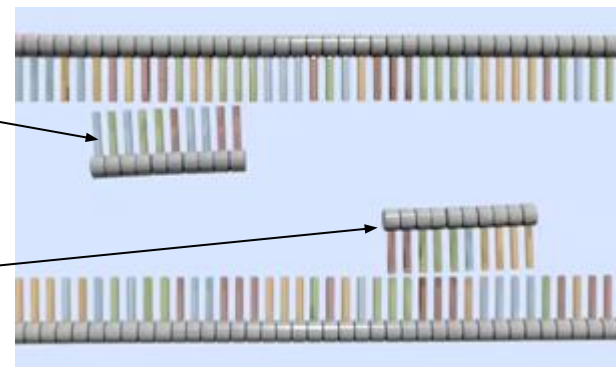
"Plateau Effect" in PCR Amplification



More about Primers

- PCR primers are short, single stranded DNA molecules (15-40 bp)
- They are manufactured commercially and can be ordered to match any DNA sequence
- Primers are sequence specific, they will bind to a particular sequence in a genome
- DNA polymerase requires primers to initiate replication

301	TAAGTGGATG	GGCTATATAC	ACAAAAGACA	ACAGCATAAG	AATGGCTCC
351	AAAGGAGATG	TTTTTGTTCAT	AAGAGAACCT	TTCATATCAT	GTTCTCACTT
401	GGAATGCAGA	ACCTTTTTTC	TGACCCAAGG	CGCTCTATTA	AATGACAAAC
451	ATTCAAATGG	GACCGTAAAG	GACAGAAGTC	CTTATAGGGC	CTTAATGAGC
501	TGCTCTCTAG	GTGAAGCTCC	GTCCCCATAC	AATTCAAAAGT	TCGAATCAGT
551	TGCATGGTCA	GCAAGCGCAT	GCCATGATGG	CATGGGCTGG	TTACAATCG
601	GAATTTCTGG	TCCAGACAAT	GGAGCTGTGG	CTGTAATAAA	ATACAACGGA
651	ATAATAACTG	GAACCATAAA	AAGTTGGA	AAGCAATAT	TAAGAACACA
701	AGAGTCCGAA	TGTGTCTGTA	TGAACGGGTC	ATGTTTCACC	ATAATGACCG
751	ATGGCCCGAG	TAATAAGGCC	GCCTCGTACA	AAATTTTCAA	GATCGAAAAG
801	GGGAAGGTTA	CTAAATCAAT	AGAGTTGAAT	GCACCCAATT	TCTATTATGA
851	GGAATGCTCC	TGTTACCCAG	ACACTGACAT	AGTGATGTGT	GTATGCAGGG
901	ACAACTGGCA	TGGTTCAAAT	CGACCTTGGG	TGTCITTTAA	TCAAAACITG
951	GATTATCAAA	TAGGATACAT	CTGCAGTGG	GTGTTTGGTG	ACAATCCCGG
1001	TCCCGAAGAT	GGAGAGGGCA	GCTGCAATCC	AGTGACTGTT	GATGGAGCAA
1051	ACGGAGTAAA	AGGGTTTTCA	TACAAATATG	GTAATGGTGT	TTGGATAGGA
1101	AGGACCAAAA	GTAACAGACT	TAGAAAAGGGG	TTTGAGATGA	TTTGGGATCC
1151	TAATGGATGG	ACAAATACCG	ACAATGATTT	CTCAGTGAAA	CAGGATGTTG
1201	TAGCAATAAC	TGATTTGGTCA	GGGTACAGCG	GAAGTTTCGT	CCAACATCCT
1251	GAGTTAACAG	GATTGGACTG	TATAAGACCT	TGCTTCTGGG	TTGAGTTAGT
1301	CAGAGGGCTG	CCTAGAGAAA	ATACAACAAT	CTGGACTAGT	GGGAGCAGCA
1351	TTTCTTTTTG	TGGCGTTAAT	AGTGATACTG	CAAACGGTC	TTGGCCAGAC
1401	GGTGTGAGT	TGCCGTTTAC	CATTGACAAG	TAGTTCGTTG	AAAAAATC





www.dnalc.org

Специфичность праймеров

- Молекула ДНК состоит из 4 оснований - А,С,Г,Т
- Вероятность нахождения в какой-либо позиции каждого основания 0.25 (1/4)
- Вероятность определенной последовательности нуклеотидов рассчитать очень просто:

Событие	Вероятность
А	$0.25 = 0.25$
А,Т	$0.25 \times 0.25 = 0.0625$
А,Т,А	$0.25 \times 0.25 \times 0.25 = 0.015625$
А,Т,А,Г,Г	$(0.25)^5 = 0.0009765$
А,Т,А,Г,Г,Т,Т,Т,А,А,С	$(0.25)^{11} = 0.000002384$
А,Т,А,Г,Г,Т,Т,Т,А,А,С,С,Т,Г,Г,Т	$(0.25)^{16} = 0.0000000002384$

Поэтому весьма маловероятно, что конкретная последовательность праймера из 16 оснований встретится в геноме больше 1 раза (1 случай примерно на 4 миллиарда оснований). По мере увеличения размера праймера шансы на то, что найдет комплементарную последовательность где-то еще, кроме своей ДНК-мишени ничтожны.





ПЦР и болезни

- Праймеры могут быть подобраны так, что будут связываться и амплифицировать только определенные варианты генов или мутации в генах. Это возможность лежит в основе генетического консультирования и используется как часть диагностических тестов.
- Некоторые заболевания могут быть легко диагностированы с помощью ПЦР

Диагностические возможности метода ПЦР огромны, с его помощью можно выявить самые разные инфекции. Чаще всего ПЦР-метод применяют для диагностики:

ВИЧ;

герпеса;

хламидиоза, уреаплазмоза, гарднереллеза, микоплазмоза и трихомониаза;

кандидоза;

гепатитов;

моновуклеоза;

лиштериоза;

цитомегаловируса;

туберкулеза;

вируса папилломы человека;

клещевого энцефалита;

хеликобактериоза;

коклюша

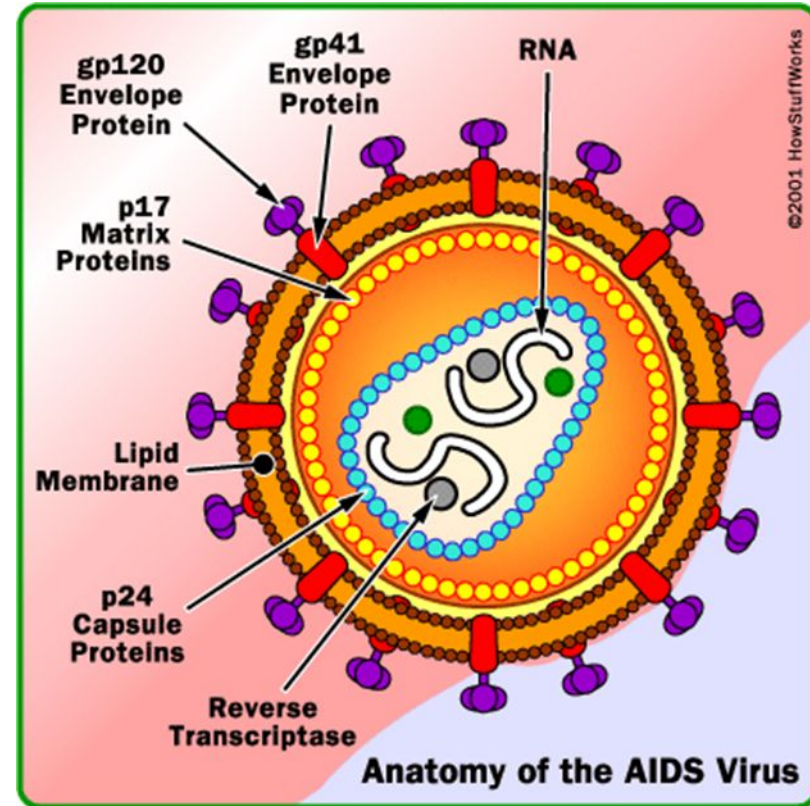
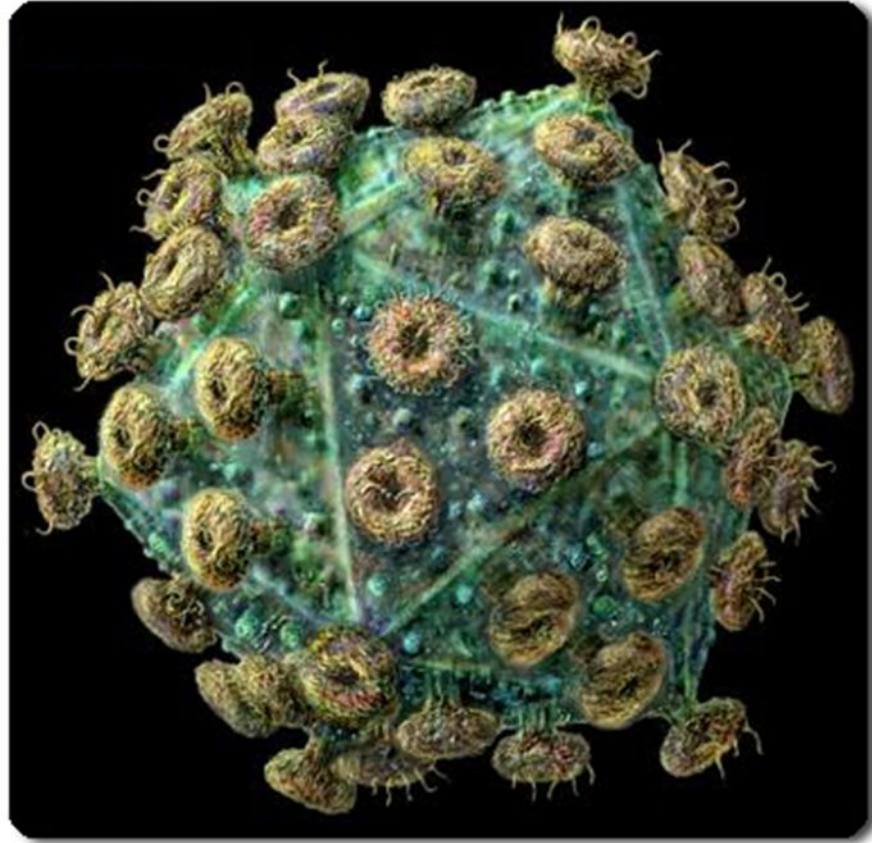
И т.д.

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

- HIV is a retrovirus that attacks the immune system.
- HIV tests rely on PCR with primers that will only amplify a section of the viral DNA found in an infected individual's bodily fluids.
Therefore if there is a PCR product, the person is likely to be HIV positive. If there is no PCR product the person is likely to be HIV negative.
- Protein detection based tests are available as well but all US blood is tested by PCR.

- ВИЧ-инфекция – болезнь, вызванная вирусом иммунодефицита человека – инфекционное хроническое заболевание, характеризующееся специфическим поражением иммунной системы, приводящим к медленному ее разрушению до формирования синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД).

СПИД – состояние, развивающееся на фоне ВИЧ-инфекции и характеризующееся появлением одного или нескольких заболеваний, отнесенных к СПИД-индикаторным.



Клетки мишени ВИЧ

Вирус избирательно действует только на те клетки организма, которые содержат на своей поверхности **CD4-рецепторы**. ВИЧ ищет клетки, имеющие CD4-рецепторы на поверхности, потому что именно этот протеин позволяет вирусу внедриться в клетку.

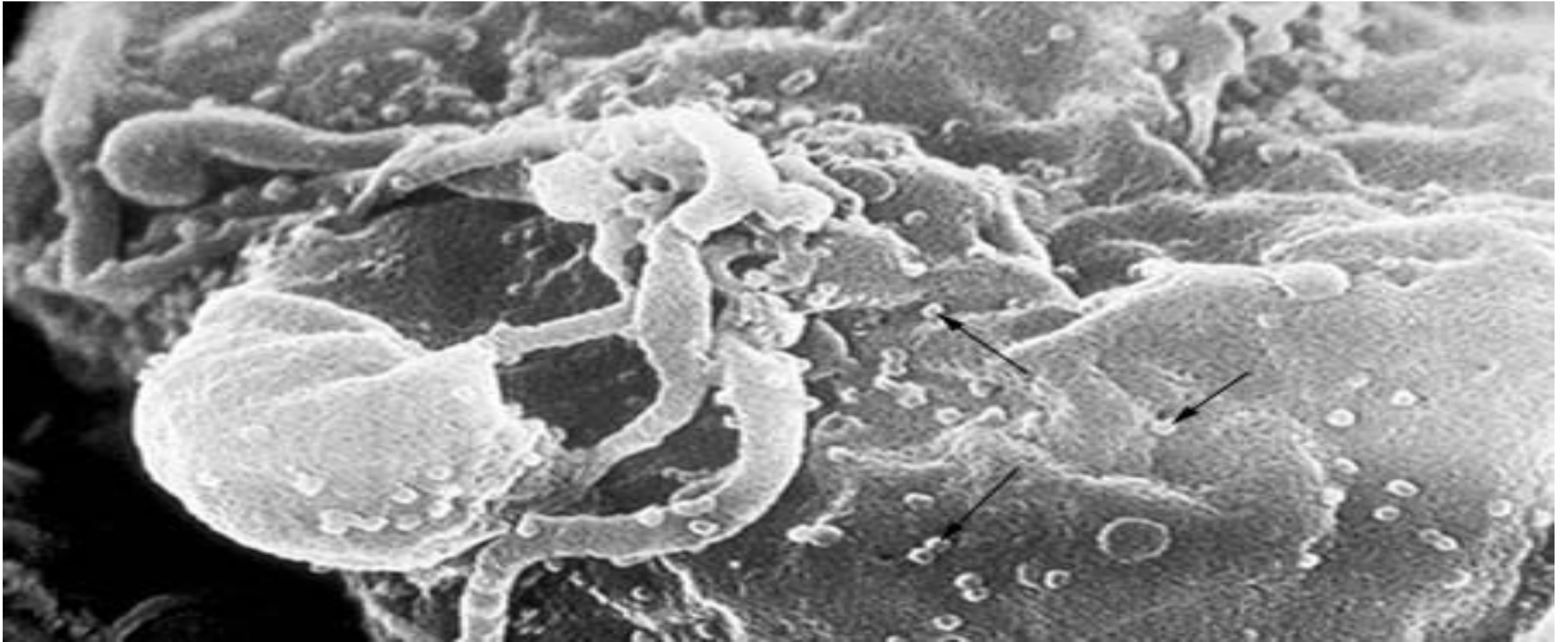
Многие виды клеток содержат на своей поверхности CD4-рецепторы, однако главная цель ВИЧ - Т-лимфоциты (Т4-лимфоциты, “Т-хелперы”).

Т4 – относятся к клеткам иммунной системы и ответственны за предупреждение иммунной системы о проникших в нее чужеродных агентах.

Viral Replication

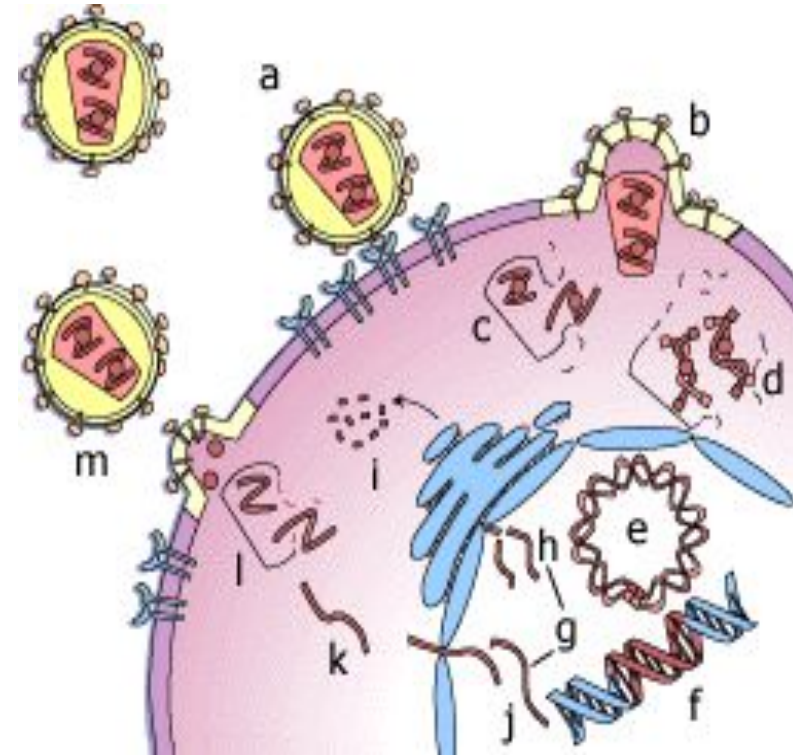
- First step, HIV attaches to susceptible host cell.
 - Site of attachment is the CD4 antigen found on a variety of cells
 - helper T cells
 - macrophages
 - monocytes
 - B cells
 - microglial brain cells
 - intestinal cells
 - T cells infected later on.

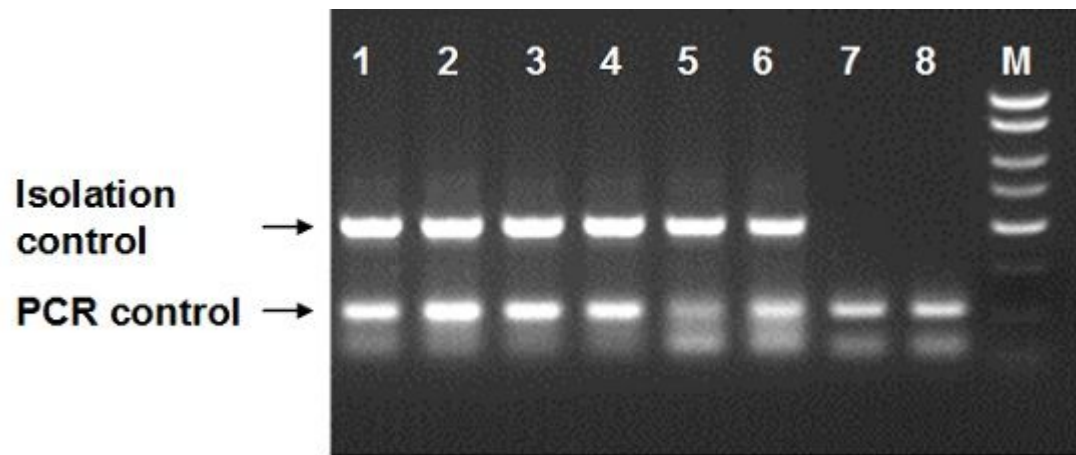
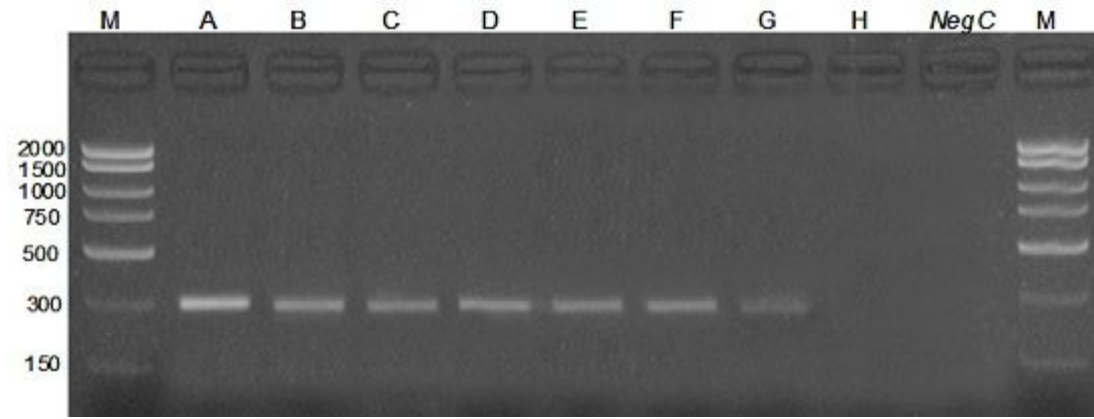
HIV (arrows) Infecting a T-lymphocyte



Life Cycle

- (a) HIV (red) attaches to two cell-surface receptors (the CD4 antigen and a specific chemokine receptor).
- (b) The virus and cell membrane fuse, and the virion core enters the cell.
- (c) The viral RNA and core proteins are released from the virion core and are then actively transported to the nucleus.
- (d) The viral RNA genome is converted into double-stranded DNA through an enzyme unique to viruses, reverse transcriptase (red dot).
- (e) The double-stranded viral DNA moves into the cell nucleus.
- (f) Using a unique viral enzyme called integrase, the viral DNA is integrated into the cellular DNA.
- (g) Viral RNA is synthesized by the cellular enzyme RNA polymerase II using integrated viral DNA as a template. Two types of RNA transcripts shorter spliced RNA (h) and full-length genomic RNA (j) are produced.
- (h) Shorter spliced RNAs are transported to the cytoplasm and used for the production of several viral proteins that are then modified in the Golgi apparatus of the cell (i).
- (j) Full-length genomic RNAs are transported to the cytoplasm (k).
- (l) New virion is assembled and then buds off.
- (m) Mature virus is released.

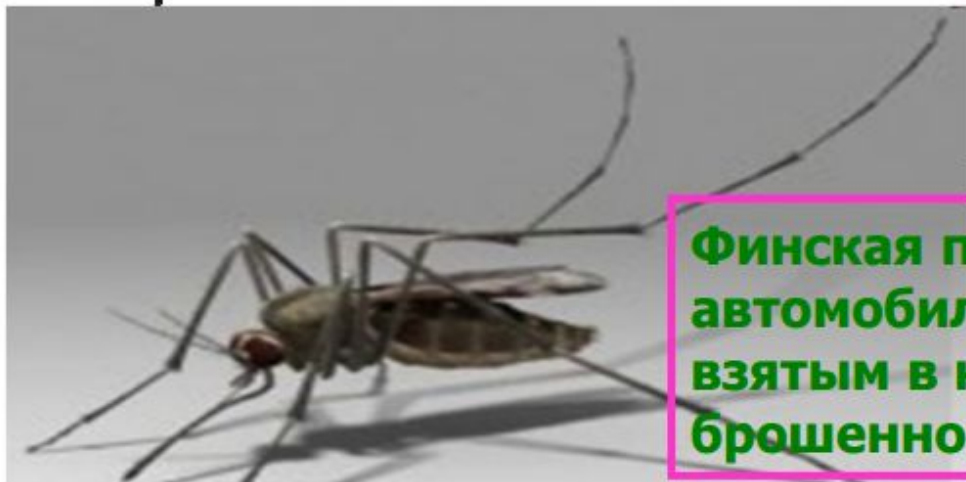




Применение ПЦР в криминалистике

- Установление родственных связей
- Идентификация личности, в том числе и частей тела (Всемирный торговый центр, войны, теракты). В прошлом году 300 в истории США заключенный был реабилитирован после того, как анализ ДНК показал, что он был признан виновным по ошибке.

Совершенству нет предела



Финская полиция поймала автомобильного вора по образцам ДНК, взятым в крови комара, найденного в брошенной машине

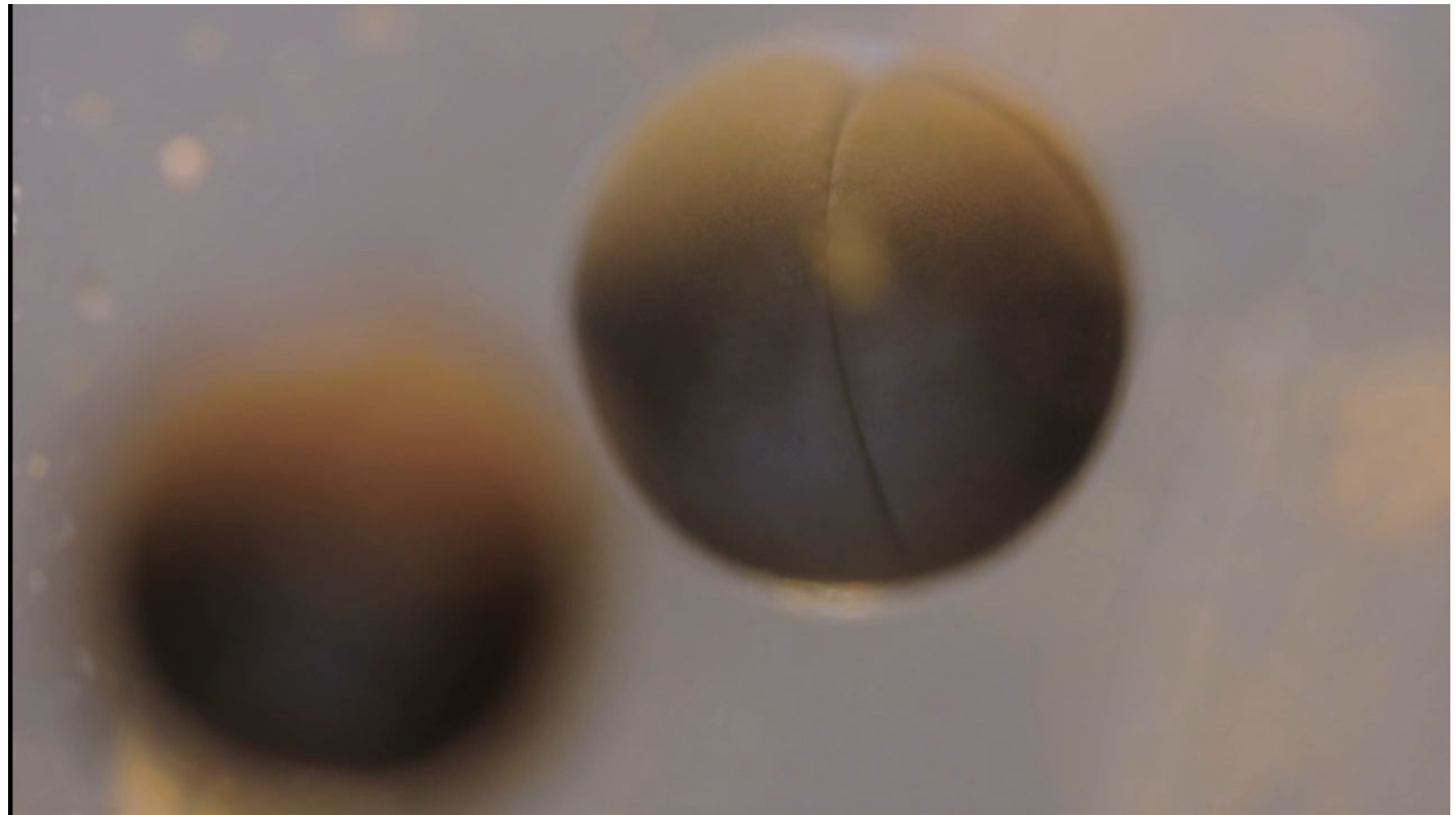
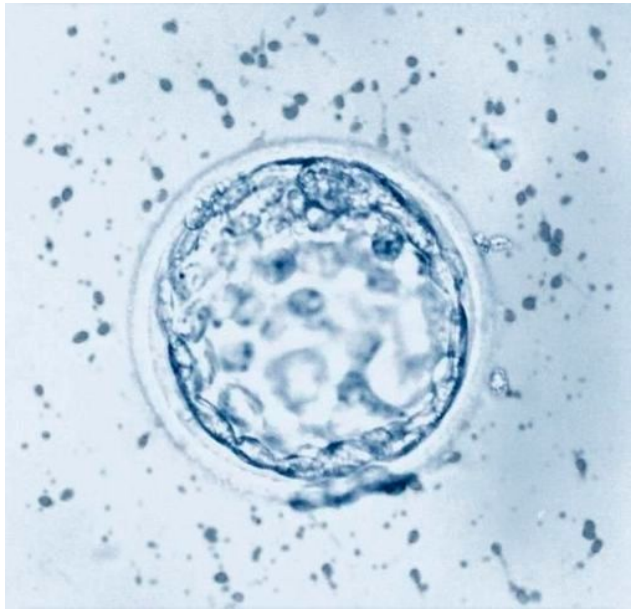
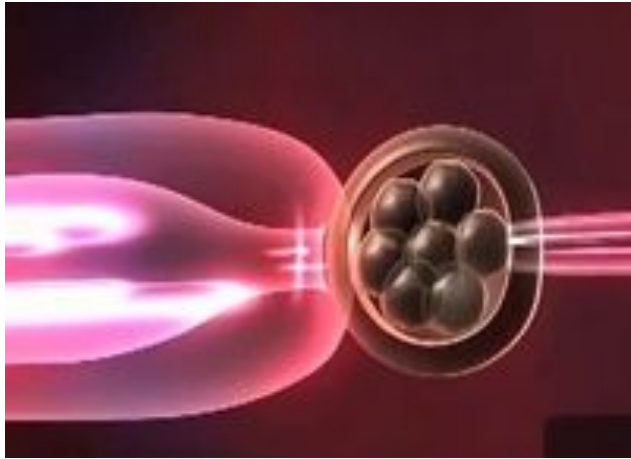
Обнаружив угнанную машину, полицейские увидели в салоне комара и предположили, что он может стать важной уликой. Образцы ДНК, полученные экспертами при анализе крови, которую выпило насекомое, совпали с данными, которые уже значились в полицейской картотеке.

Подозреваемый отрицает свою вину, утверждая, что ехал автостопом и случайно остановил машину, которая оказалась в розыске.

Это первый случай в истории криминалистики, когда дело раскрывают при помощи насекомого.

Предимплантационная генетическая диагностика (ПГД) дает возможность проводить генетические анализы эмбриону (дизайнерские дети)

- Впервые ПГД была проведена в Англии в 1989 г.
- Позволяет выявить более 100 заболеваний (в том числе онкомаркеры, предрасположенность к болезни Альцгеймера, диабету и т.д.), наследственные заболевания.
- может использоваться для выбора эмбриона, который будет совместимым донором стволовых клеток для лечения больного брата.



Оплодотворенные яйцеклетки подвергаются нормальному митотическому делению клеток в лаборатории до тех пор, пока не станут восьмиклеточными. На этом этапе одна или две из этих клеток берутся на анализ. ДНК из клеток выделяется и тестируется на наличие генетических нарушений.

- PGD может также использоваться для тестирования других признаков, таких как пол, цвет волос, поведение (дизайнерские дети), но эти тесты вызывают ряд этических проблем и не разрешаются во многих странах.
- Ранний и хорошо известный случай гендерного отбора имел место в 1996 году, когда Моник и Скотт Коллинз в Институте генетики и ЭКО в Фэйрфаксе, штат Вирджиния заказали девочку, так как их первые двое детей были мальчиками, и пара хотела иметь дочь в семье. Это был один из первых широко разрекламированных случаев ПГД, в котором выбор эмбриона выполнялся не для решения конкретных медицинских проблем, а чтобы удовлетворить желание родителей создать более сбалансированную семью.

Eye color

Hair color

Sex

Height

IQ/ Intelligence

Sexual Orientation

Down Syndrome

Cancer Predisposition

Alzheimer's Disease

Nearsightedness