

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Чуреков Никита Максимович 340

История

- ◎ Искусственный синтез ДНК с использованием праймеров был описан еще в **1971** г.
- ◎ В **1983** г. Kary Mullis предложил метод, обеспечивающий накопление (амплификацию) синтезируемого фрагмента ДНК, получивший название полимеразная цепная реакция (Нобелевская премия по химии 1993 г).
- ◎ Принцип реакции опубликован в **1985** г

Основные достоинства ПЦР

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

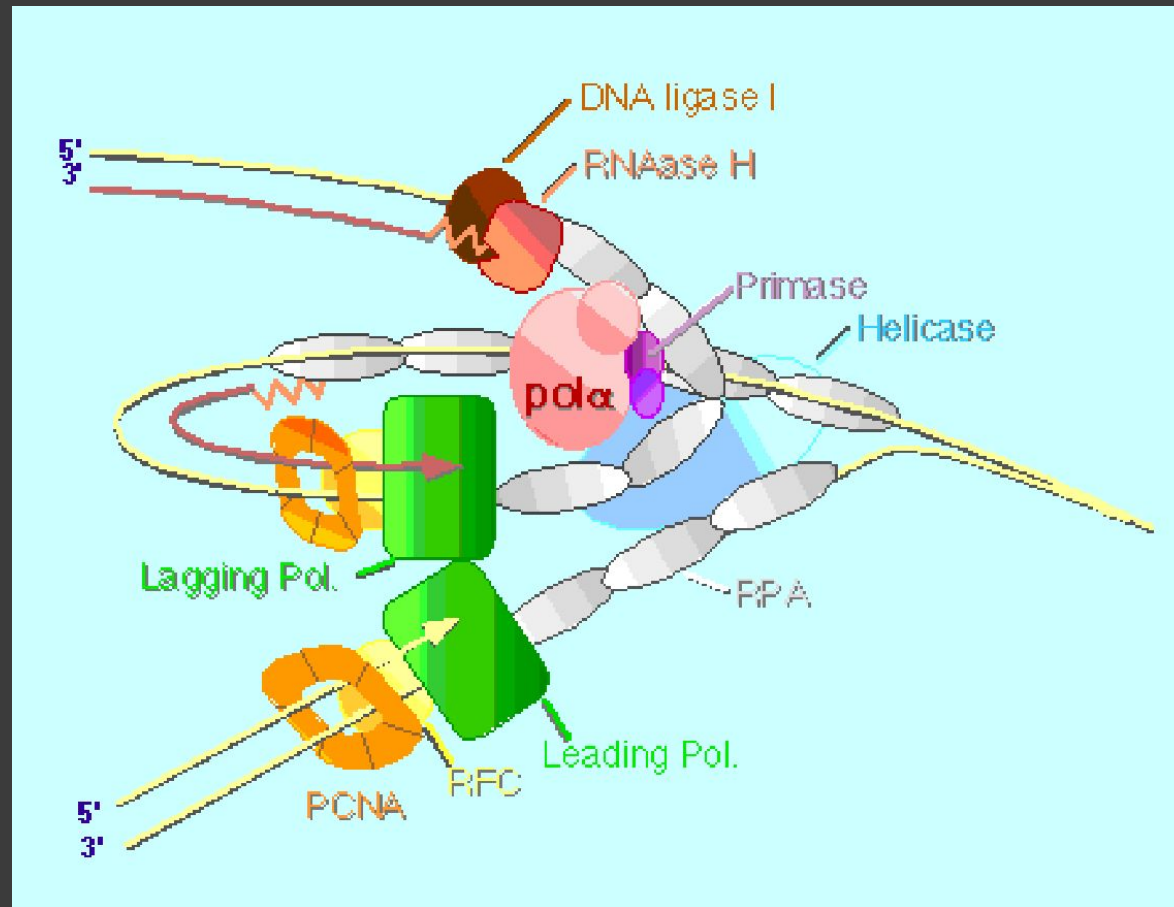
Значение для современной науки и медицины

- ◎ Решение самых различных научных задач
- ◎ Генотипирование организмов
- ◎ Диагностика инфекционных заболеваний
- ◎ Диагностика генетических заболеваний и генетической предрасположенности
- ◎ Установление родства, идентификация личности
- ◎ Анализ древних останков, криминалистика
- ◎ Детекция ГМО

Репликация ДНК in vivo

Новая
цепь

Новая
цепь



Матричная
цепь

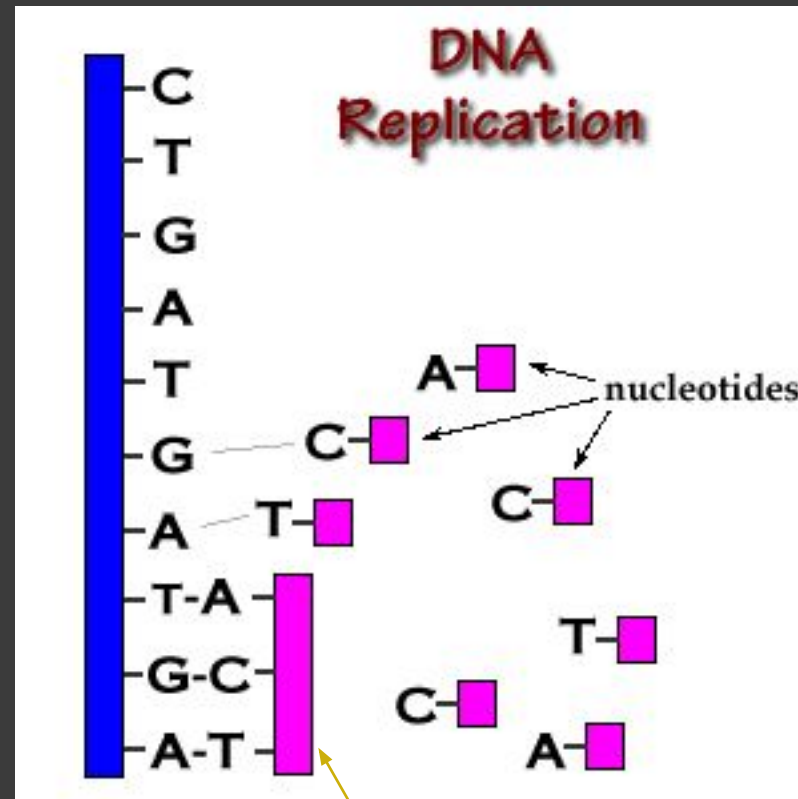
I. Разделение цепей (денатурация)



95°C

II. Отжиг праймеров

III. Синтез ДНК (удлинение цепи)



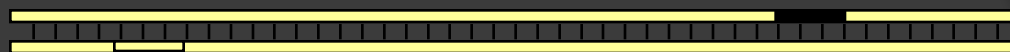
Праймер

Стадии ПЦР

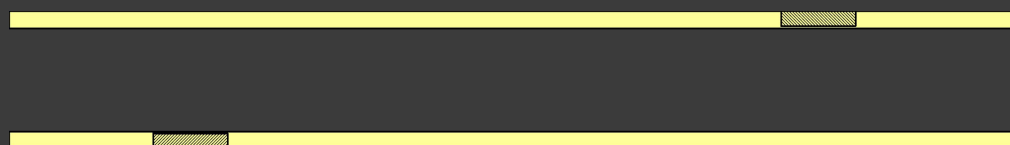
- ◎ Денатурация (94°C)
 - Обеспечивает разделение нитей ДНК
- ◎ Гибридизация (отжиг) праймеров на матрице (45-65°C)
 - Формирует структуры узнаваемые ДНК-полимеразой
- ◎ Синтез (удлинение) цепи (72°C)
 - Происходит синтез комплементарных цепей и удваивает число молекул ДНК мишени

Схема ПЦР

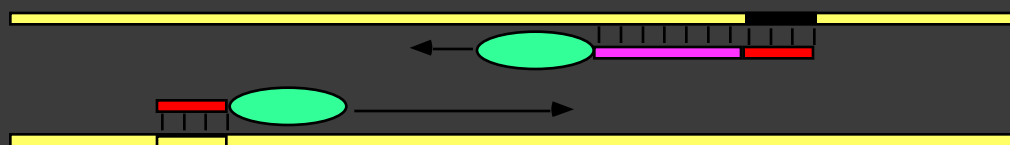
1 копия
(матрица)



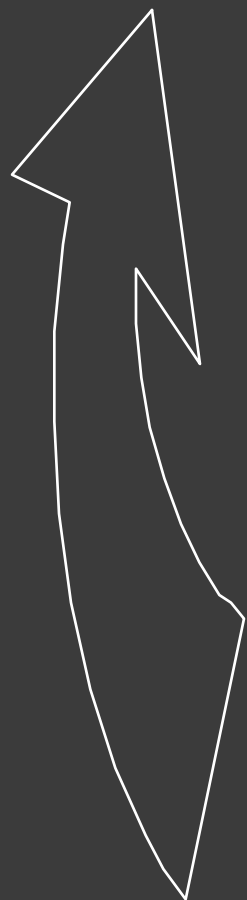
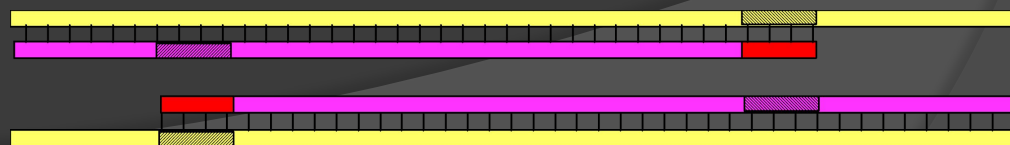
Денатурация



Отжиг праймеров
Синтез

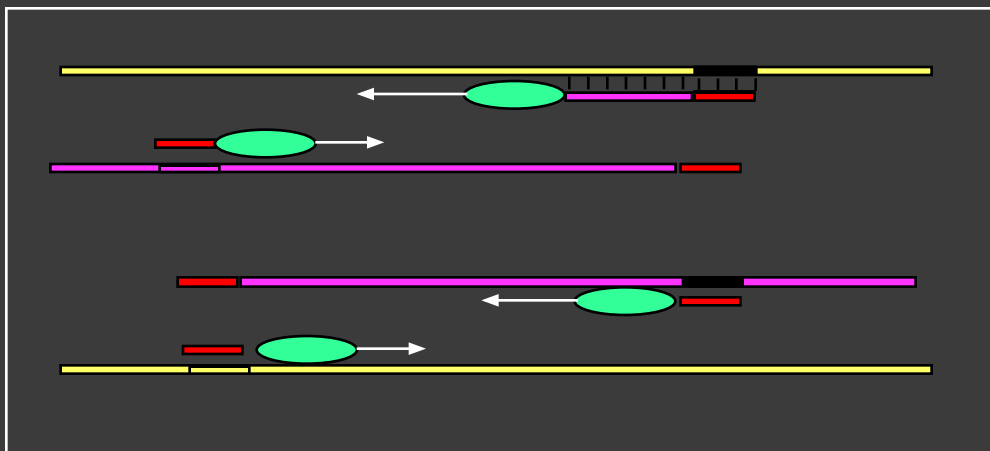


2 копии





Продукты после 1-го цикла реакции



Денатурация
Отжиг
Синтез



Продукты после 2-го цикла
реакции

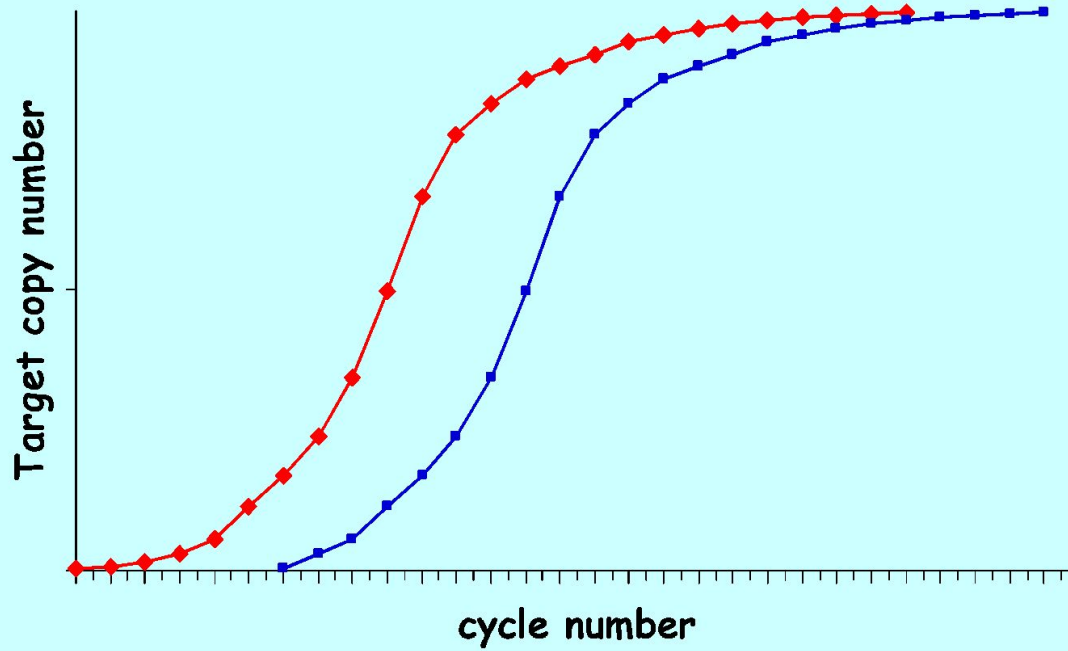
Продукт ПЦР



Основные 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»

PCR Amplification Curve



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.

Компоненты реакции

- Буфер (Tris-HCl, pH = 8,0-8,8; KCl)
- MgCl₂ (1-3 mM)
- Праймеры (0.4 мкМ каждого)
- dNTP (40-200 мкМ каждого)
- ДНК-полимераза (1 ед)
- Матрица (1 до 1000 нг)

Ферменты

Некоторые характеристики ДНК-полимераз

Полимеразы	Время полужизни при 95С (min)	Экзонуклеазная активность 5'-3' (+/-)	Экзонуклеазная активность 3'-5' (+/-)	Достройка 3'-концов
Taq	40	+	-	A-он
Tth	20	+	-	A-он
Pfu	120	-	+	blunt ends
Vent	400	-	+	blunt ends
Deep Vent	1300	-	+	blunt ends
UITma	50	-	+	blunt ends
Pwo	120 при 100С	-	+	blunt ends

Праймеры

- Длина праймеров 18-30 нуклеотидов
- GC-состав 45-55%, близок к GC-составу матрицы
- Разница в температурах отжига не более 5°C
- Не должны формировать шпилек на 3-конце
- Не должны формировать димеры по 3-концам

Оптимизация ПЦР

- ⦿ Температурный профиль реакции
- ⦿ Временной профиль реакции
- ⦿ Состав реакционной смеси

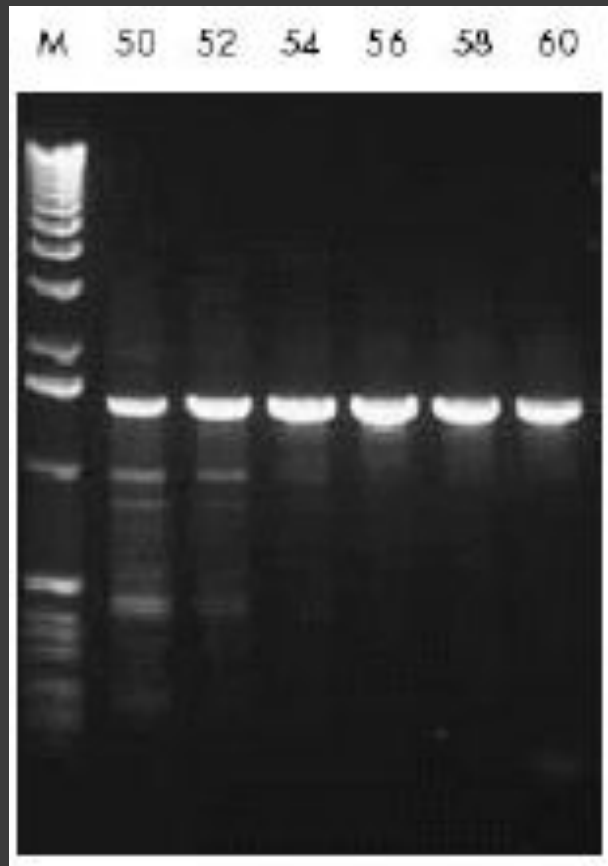
конц. ионов магния

конц. праймеров

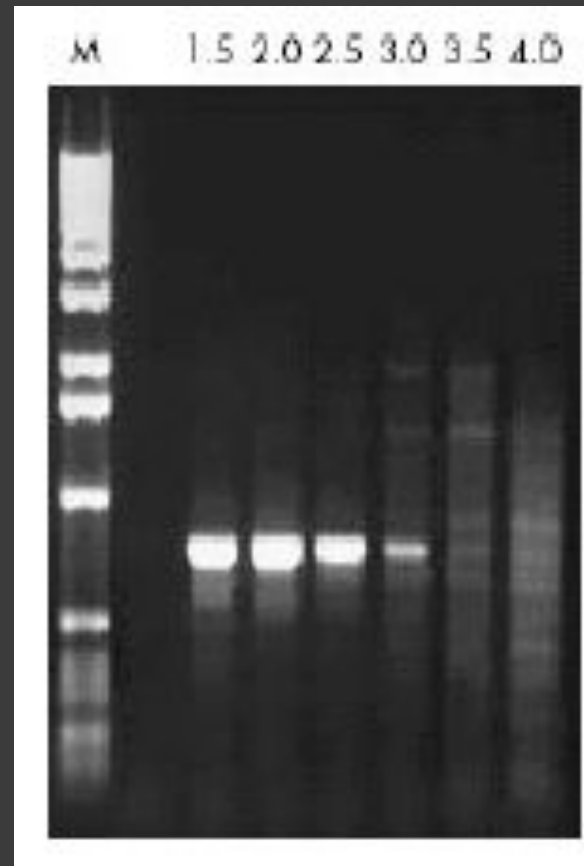
конц. полимеразы

добавки (глицерин, ДМСО, формамид, БСА и др.)

Подбор температуры отжига



Подбор концентрации ионов магния

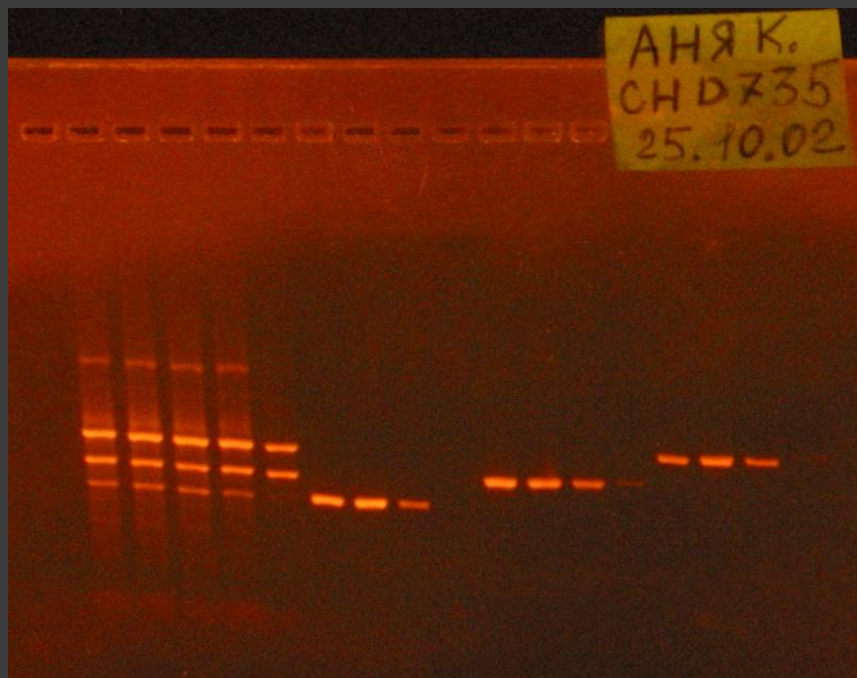


10 причин, по которым ПЦР неэффективно

- Плохой дизайн праймеров
- Неверная концентрация праймеров
- Слишком много dNTP или деградированные dNTP
- Не перемешанный раствор $MgCl_2$
- Неверная концентрация $MgCl_2$
- Наличие ингибиторов
- Плохое качество минерального масла
- Слишком много фермента
- Ошибки в программе амплификатора
- Недостаток или избыток матрицы

Оценка результатов реакции

- Электрофорез



- Гибридизация с зондами

Разновидности ПЦР

- ◎ ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR)
- ◎ Touchdown
- ◎ Мультиплексная
- ◎ Гнездовая (nested)
- ◎ In situ PCR
- ◎ Reverse transcriptase (RT-PCR)
- ◎ Real-time PCR (RT-PCR)

Другие методы амплификации

- ◎ Лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR)
- ◎ NASBA (nucleic acid sequence-based amplification)

Организация технологического процесса

- ◎ Контаминация
- ◎ Организация лаборатории (рабочих мест) по принципу изолированных рабочих зон
- ◎ Раздельное использование оборудования и принадлежностей при работе с чистыми растворами и растворами, содержащими ДНК или продукты ПЦР
- ◎ Обязательная постановка в каждом эксперименте отрицательного и положительного контролей
- ◎ Стоковые растворы разделять на аликвоты и периодически заменять

