

Полимеразная цепная реакция в “реальном времени”

Подготовили: Степанова М.С
Степанова Д.С
Лагуткина А.А.

DNA is a long molecule, called a polynucleotide (helpful to remember that it contains the genetic information of all known living organisms and some viruses). The main role of DNA molecules is the long-term storage of information. DNA is often compared to the long-term storage of blueprints, or a recipe, or a code, since it contains the instructions needed to construct other components of cells, such as proteins, and RNA molecules. The DNA segments that carry this genetic information are called genes, but other DNA sequences have structural purposes, or are involved in regulating the use of this genetic information.

Chemically, DNA consists of two long polymers of simple units called nucleotides, with backbones made of sugars and phosphate groups joined by ester bonds. These two strands run in opposite directions to each other and are therefore said to be antiparallel. Attached to each sugar is one of four types of molecules called bases. It is the sequence of these four bases along the backbone that encodes information. This information is read using the genetic code, which specifies the sequence of the amino acids within proteins. The code is read by copying stretches of DNA into the related nucleic acid RNA, in a process called transcription.

Within cells, DNA is organized into long structures called chromosomes. These chromosomes are duplicated before cell division in a process called DNA replication. Eukaryotic organisms (animals, plants, fungi, and protists) store most of their DNA inside the cell nucleus and some in their organelles, such as mitochondria or chloroplasts. In contrast, prokaryotes (bacteria and archaea) store their DNA only in the cytoplasm. Within the chromosomes, chromatin proteins such as histones compact and organize DNA. These complex structures provide the transcription platform for other proteins, helping control which parts of the DNA are transcribed.

random]plasmid

DNA is a long molecule, called a polynucleotide (helpful to remember that it contains the genetic information of all known living organisms and some viruses). The main role of DNA molecules is the long-term storage of information. DNA is often compared to the long-term storage of blueprints, or a recipe, or a code, since it contains the instructions needed to construct other components of cells, such as proteins, and RNA molecules. The DNA segments that carry this genetic information are called genes, but other DNA sequences have structural purposes, or are involved in regulating the use of this genetic information.

Chemically, DNA consists of two long polymers of simple units called nucleotides, with backbones made of sugars and phosphate groups joined by ester bonds. These two strands run in opposite directions to each other and are therefore said to be antiparallel. Attached to each sugar is one of four types of molecules called bases. It is the sequence of these four bases along the backbone that encodes information. This information is read using the genetic code, which specifies the sequence of the amino acids within proteins. The code is read by copying stretches of DNA into the related nucleic acid RNA, in a process called transcription.

Within cells, DNA is organized into long structures called chromosomes. These chromosomes are duplicated before cell division in a process called DNA replication. Eukaryotic organisms (animals, plants, fungi, and protists) store most of their DNA inside the cell nucleus and some in their organelles, such as mitochondria or chloroplasts. In contrast, prokaryotes (bacteria and archaea) store their DNA only in the cytoplasm. Within the chromosomes, chromatin proteins such as histones compact and organize DNA. These complex structures provide the transcription platform for other proteins, helping control which parts of the DNA are transcribed.

Although the B-DNA form is most common under the conditions found in cells, it has a well-defined conformation but a fairly relaxed DNA conformation (36) that occur at the high hydration level present in living cells. These corresponding X-ray diffraction patterns are characteristic of disordered helix.

Compared to B-DNA, the A-DNA form is a wider, right-handed helix, with a shallow, wide minor groove and a narrower, deeper major groove. The A form is produced under non-physiological conditions in partially hydrated samples of DNA, while in the cell it may be produced in hybrid regions of DNA and RNA strands. In the A-DNA form, the bases have been modified by methylation may undergo a larger change in conformation and affect the

PCR Real-time.

Среди разновидностей методов ПЦР одним из наиболее современных является ПЦР в реальном времени.

В его основе лежит принцип детекции продуктов непосредственно в ходе процесса амплификации.

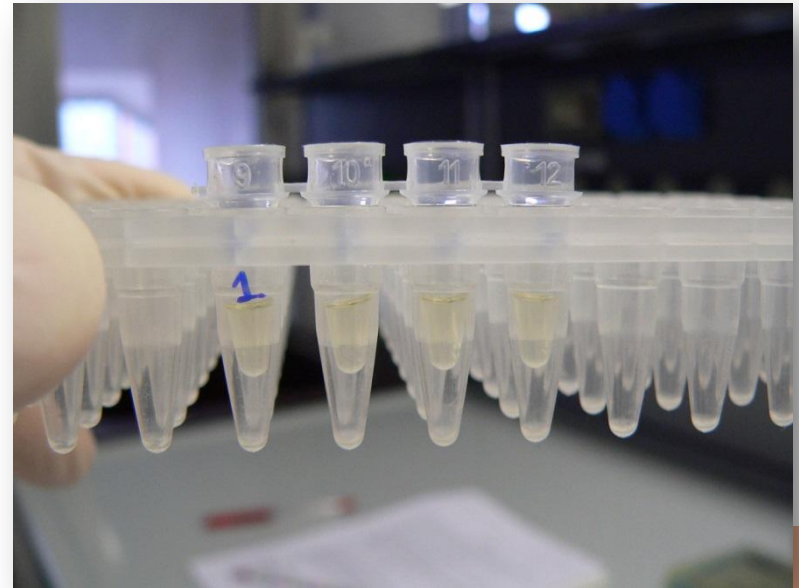
Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле.



Важнейшей чертой этого метода является синхронизация процессов регистрации и амплификации, что позволяет наиболее точно оценить кинетику протекающего процесса, зависящую от начального количества исследуемого материала.

PCR Real-time

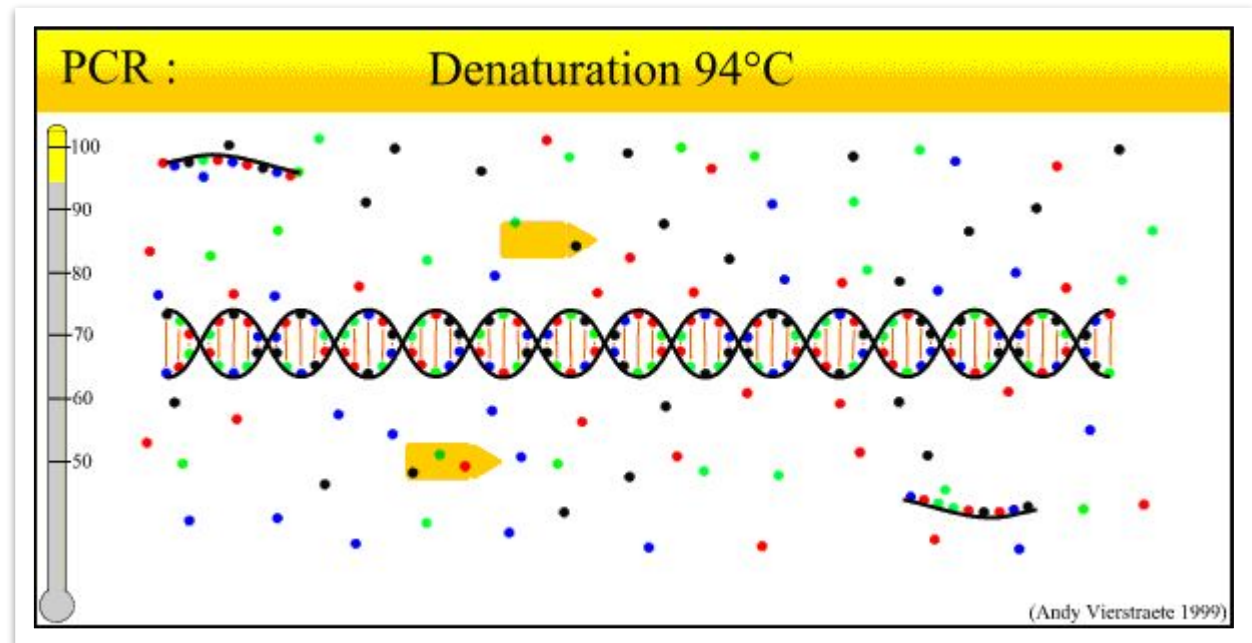
- ПЦР “в реальном времени” характеризуется возможностью проведения качественного и количественного анализа.
- Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.



Основные этапы ПЦР в реальном времени.

Процедура аналогична процедуре проведения классической ПЦР, то есть присутствуют все стадии реакции:

- плавление или денатурация двуцепочечных ДНК при температуре 94-95С
- отжиг праймеров
- элонгация при температуре 72С



Особенности проведения ПЦР в реальном времени.

Отличительной особенностью является добавление в состав :

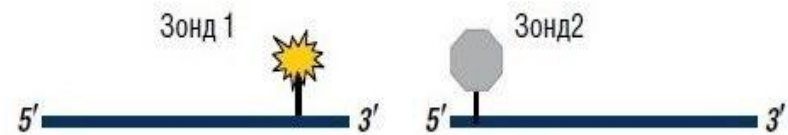
- 1.реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами флуоресцентных меток (зондов).

Флуоресцентный зонд - олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3'-конце зонда находится флуоресцентная молекула-флуорофор, а на 5'-конце расположена молекула-“гаситель” флуоресценции.



Особенности проведения ПЦР в реальном времени.

- 2. использование флуоресцентных красителей, интеркалирующих в двуцепочечные молекулы ДНК
- 3. использование двух зондов, на 3' и 5' концах которых находятся флуорофоры.



Подходы ПЦР в реальном времени

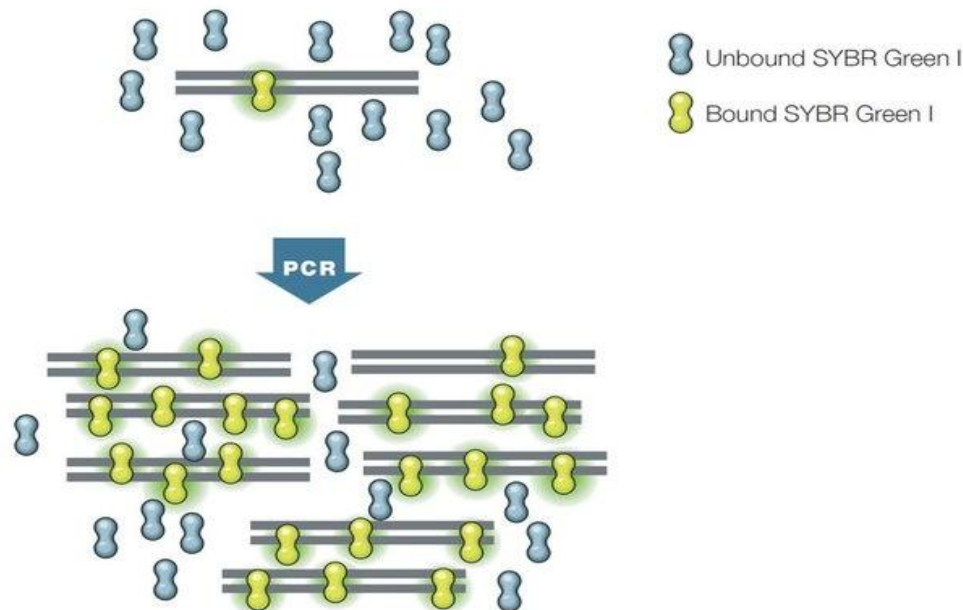
Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют следующие наиболее распространенные подходы:

- 1.интеркалирующие флуоресцентные агенты, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двухцепочечной ДНК
- 2.использование меченных олигонуклеотидных проб, комплиментарных участку продукта полимеразной реакции.

1. Применение интеркалирующих флуоресцентных агентов. Принцип SYBR Green.

В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто используют SYBR Green.

Особенностью красителя является его способность образовывать комплекс только с двухцепочечной молекулой ДНК, которая существует в процессе полимеразной цепной реакции только на стадии отжига(праймер-матрица ДНК) и элонгации(ампликон).



Преимущества и недостатки SYBR

Green

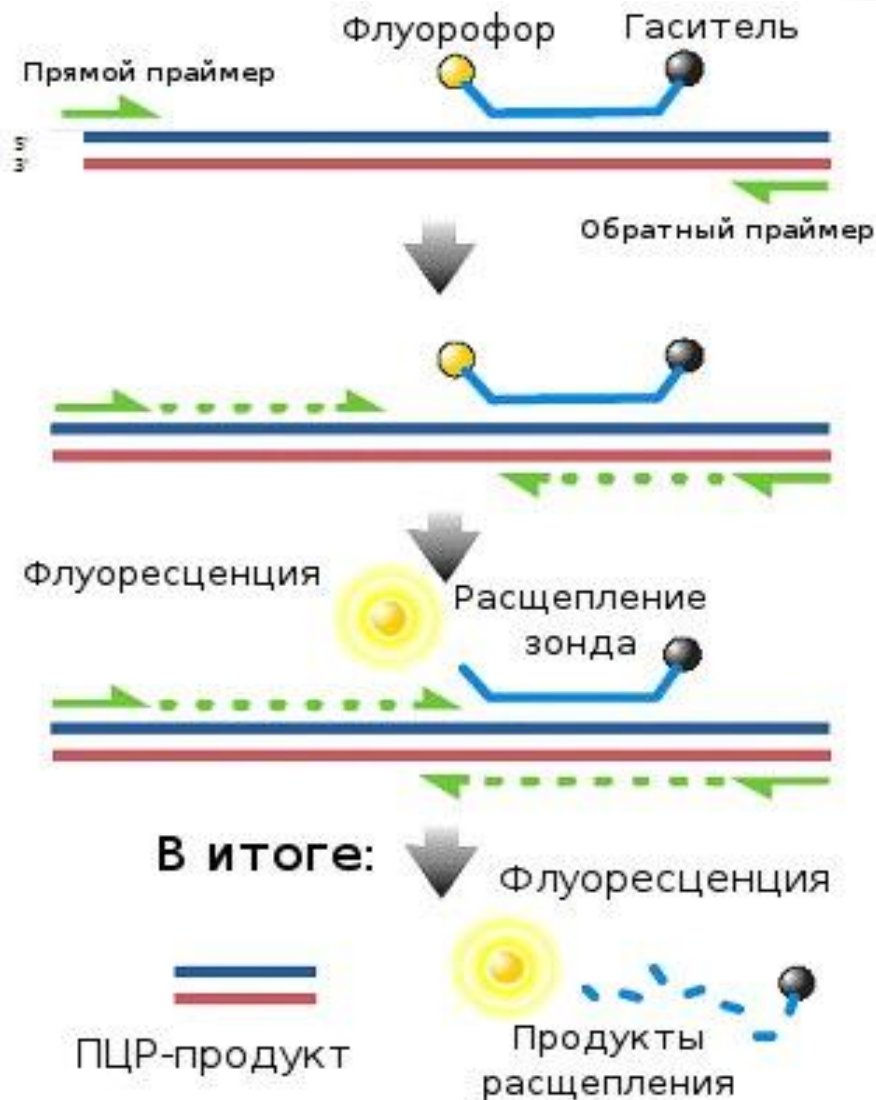
- Преимущества:
 - является наиболее дешевым и простым в исполнении
 - позволяет оптимизировать протекание реакции амплификации
- Недостатки:
 - высокие требования к специфичности реакции.
 - отсутствие контроля специфичности образовавшегося продукта
 - можно работать только с одной реакцией в одной реакционной смеси



2. Использование меченых лигонуклеотидных проб.

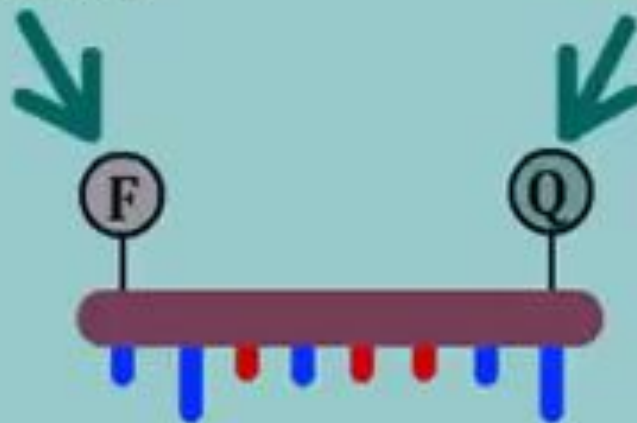
TaqMan протокол.

TaqMan PCR основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-пробы, меченные на 5'-конце флуоресцентным красителем, а на 3'-конце - фосфатной группой и гасителем флуоресценции. Пробы комплементарны участку амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.



**Fluorescent tag
conjugated to a
terminal base**

**Quencher tagged to
the terminal base at
the opposite end of
the probe**



Метод TaqMan преимущества и недостатки.

Преимущества:

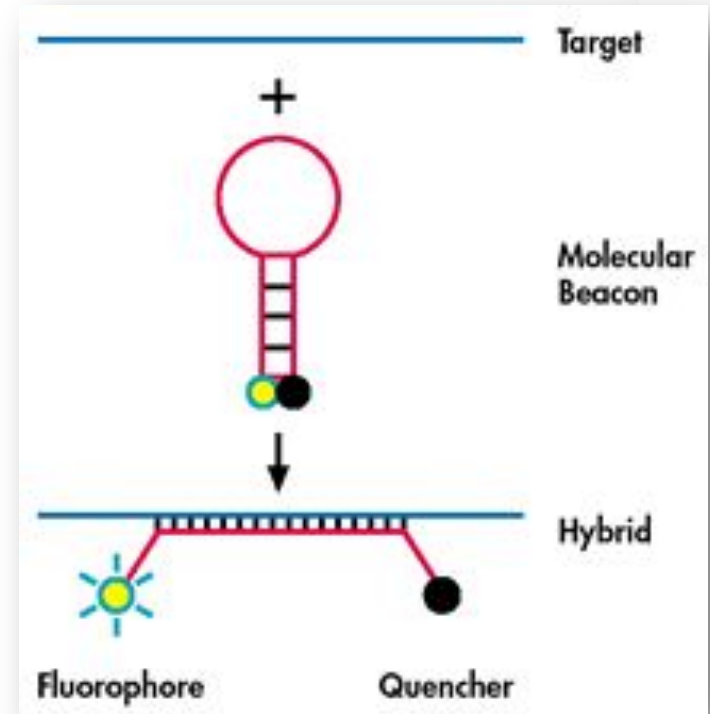
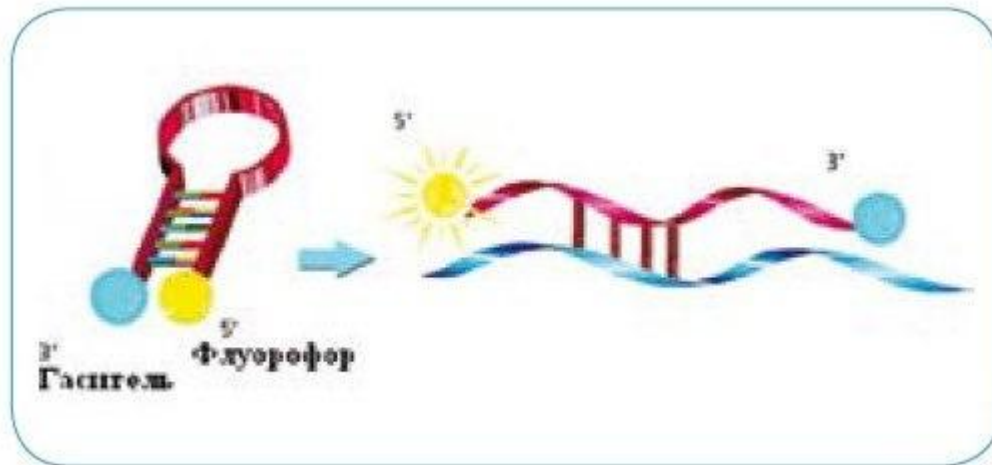
- возможность проведения нескольких количественных реакций в одной смеси.
- меньшие требования к специфичности реакции: репортерная флуоресценция будет генерироваться только при гибридизации пробы со специфическим PCR-продуктом.
- бóльшая точность при малых количествах субстрата



- Недостатки:
 - высокая стоимость по сравнению, к примеру, с SYBR Green.
 - существует значительно меньше возможностей оптимизации процесса в отличие от случая с применением интеркалирующих агентов.

Метод Molecular Beacons.

Molecular Beacons отличается от TaqMan тем, что концы пробы комплементарны друг другу. В свободном состоянии молекулярные маяки образуют «шпильку» (структуру, когда 5' и 3'-концы зонда гибридизуются между собой).



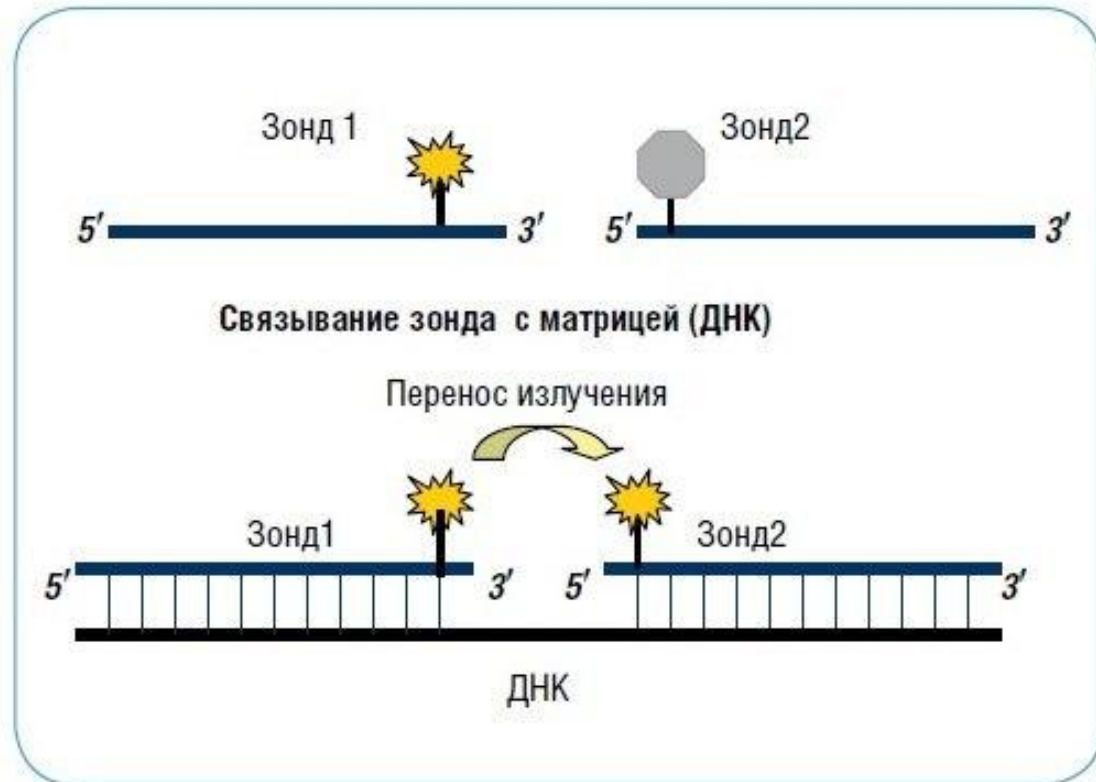
Флуорогенная шпилька - небольшая одноцепочечная молекула ДНК, которая в свободном состоянии способна образовывать вторичную структуру. При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается

Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии.

Метод LightCycler.

Принцип метода

заключен в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму, находящемуся на 5'-конце второго зонда, который происходит, если расстояние между двумя флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида.



Достоинства и недостатки метода LightCycler.

Технологий LightCycler стоят ощутимо дороже, и их осмысленно применять лишь в том случае, когда требуется крайне специфичная детекция лишь одного из образующихся PCR-продуктов .

Недостатками этого метода являются его высокая стоимость за счет использования двух зондов, а также достаточно сложная техника постановки.



Анализ результатов.

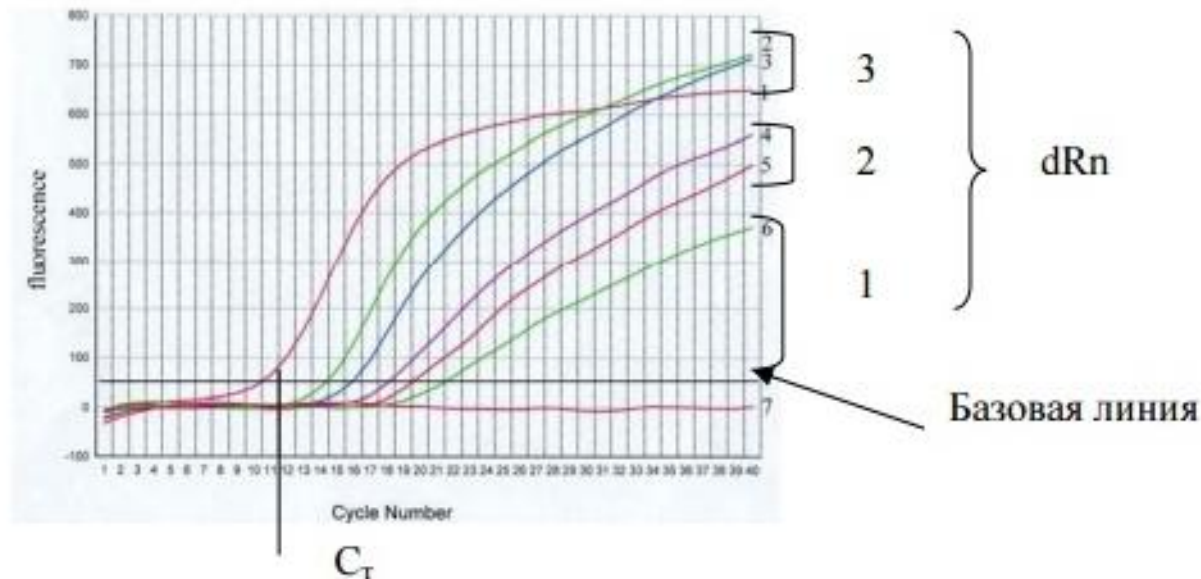
- Для анализа в режиме «реального времени» используют специальные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе реакции. При амплификации образца детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков:

1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);

2 – экспоненциальная амплификация;

3 – плато

(замедление процесса)



Применение методов РСР

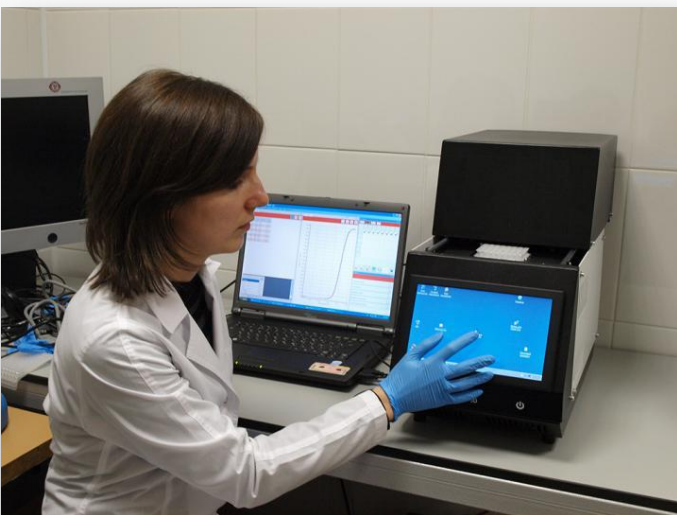
Real-time

- в медицине (для диагностики заболеваний) - в сфере биотехнологий (для определения содержания микроорганизмов в продуктах питания и растительных материалах; для детекции ГМО)
- для генотипирования вирусов и других патогенов человека и определения их количественного содержания
- для микробиологических работ в сфере безопасности продуктов питания
- для оценки качества вод (питьевых и сточных)
- для идентификации кишечной микрофлоры



Преимущества PCR Real-time.

- Основными достоинствами этого метода являются:
 - объединение этапов амплификации и детекции результатов
 - наличие специфического зонда, комплементарного внутреннему участку фрагмента
 - регистрация интенсивности флюоресценции
 - возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы
 - возможность проведения множественной ПЦР



Заключение

Создана научная и материально-техническая база для широкого внедрения в клиническую лабораторную диагностику новой генодиагностической технологии - количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

