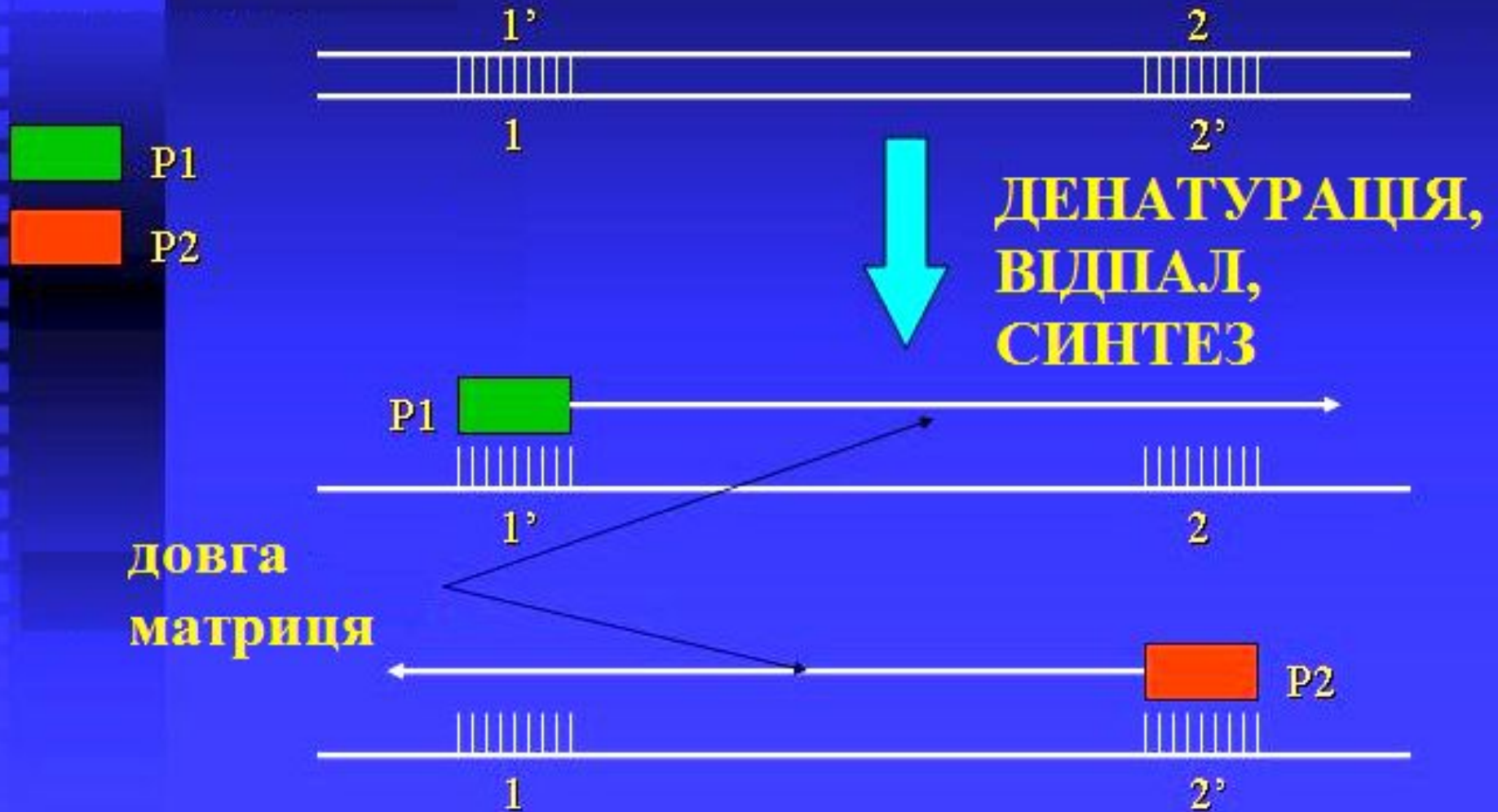


**Лабораторна робота
„ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ З
ВИКОРИСТАННЯМ
ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТ-
СИСТЕМ”**

Принципи ПЛР. Перший раунд.



Принципи ПЛР. Другий раунд.

ДЕНАТУРАЦІЯ
ВІДПАЛ, СИНТЕЗ



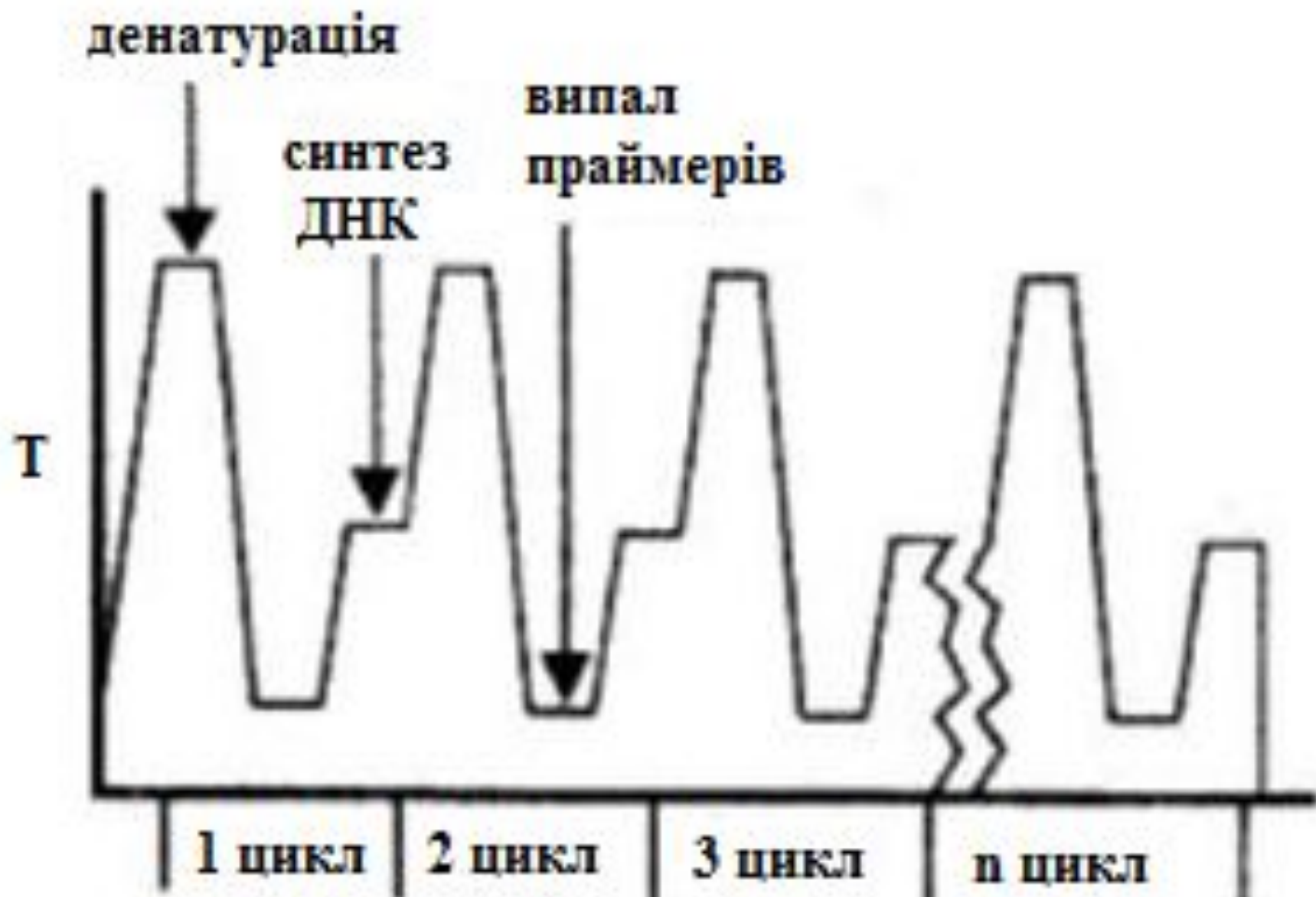
короткі
матриці



Стадії ПЛР

- Денатурація (94°C):
 - Розділення ниток матриці ДНК;
- Гібридизація (відпал) праймерів на матриці (40-65°C):
 - Праймери є затравками для подальшого синтезу за участі ДНК-полімераз;
- Синтез комплементарних ланцюгів (72°C).

СХЕМА ЦИКЛІВ ПЛР



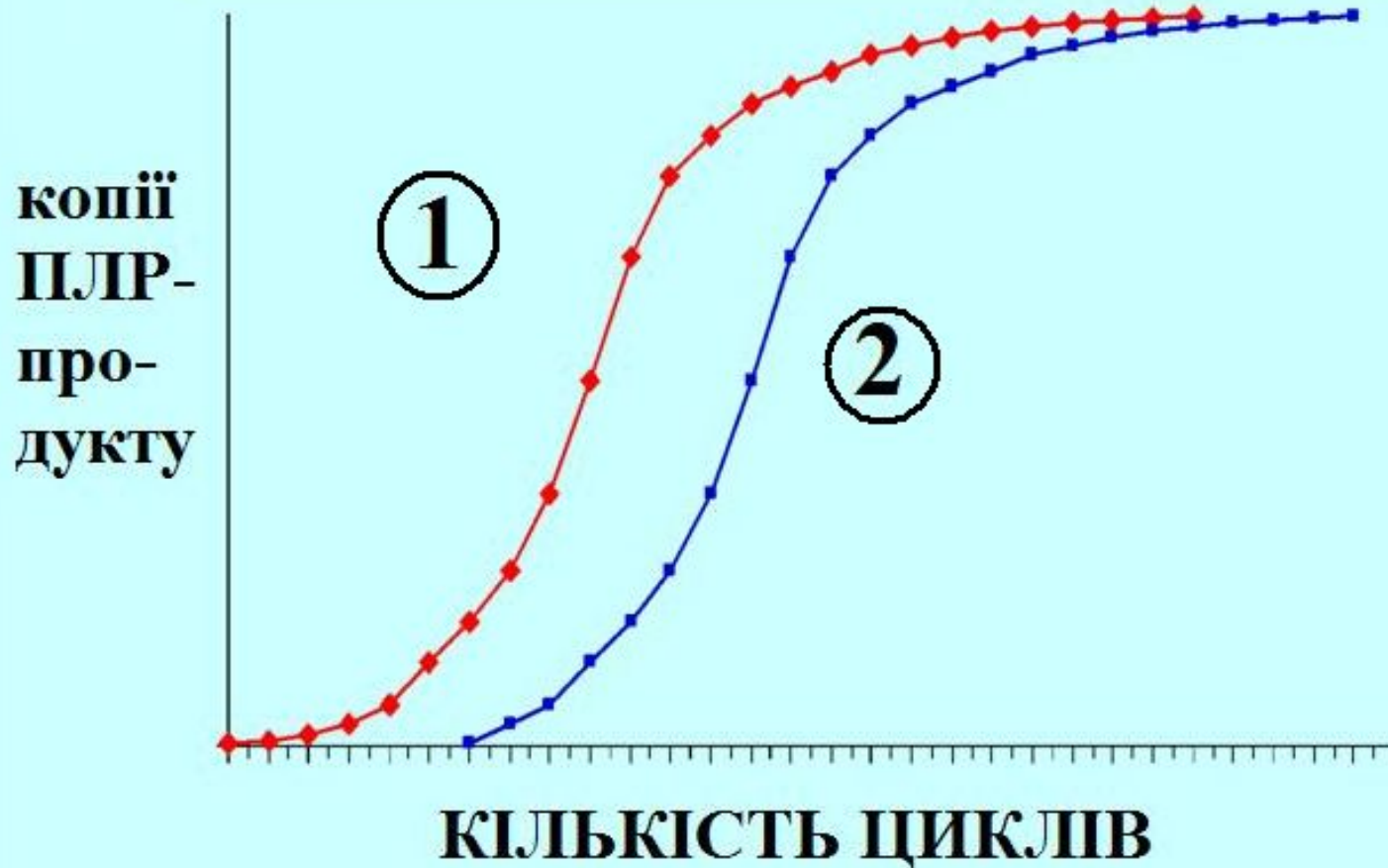
Основні принципи ПЛР:

Узагальнення

- ❑ Ампліфікація необхідного фрагмента ДНК відбувається між двома праймерами (праймери входять до складу ПЛР-продукту);
- ❑ Ампліфікацію проводять протягом 30-40 циклів (для клонування – бажано не більше 28 циклів);
- ❑ Кожний цикл складається з трьох основних температурних режимів (але може бути і два, наприклад - 94 °C і 67 °C);
- ❑ В реакції використовують термостабільні ДНК-полімерази;
- ❑ За 30 циклів відбувається збільшення копій заданого фрагмента ДНК в 1 000 000 000 разів;
- ❑ Кінетика накопичення продукту ПЛР-реакції характеризується виходом на «плато».

Кінетика накопичення продукту ПЛР-реакції характеризується виходом на «плато»

Крива накопичення продукту ПЛР



Основні причини виходу ПЛР на «плато»

- ❑ Виснаження субстратів (дНТФ і праймерів);
- ❑ Зниження активності полімерази;
- ❑ Накопичення інгібіторів полімерази (пірофосфатів і ДНК-дуплексів);
- ❑ Неповна денатурація ДНК при високій концентрації продуктів ПЛР.

Режим ампліфікації в методичному посібнику до лабораторної роботи

Температура	Тривалість	Кількість циклів
94° C	1 хв	1
94° C	5 с	5
64° C	5 с	
67° C	5 с	
94° C	1 с	40
64° C	5 с	
67° C	5 с	
10° C	зберігання	

Режим ампліфікації лабораторної роботи

Температура	Тривалість	Кількість циклів
94° C	1 хв	1
94° C	5 с	5
67° C	15 с	
94° C	1 с	40
67° C	15 с	
10° C	зберігання	

Склад реакційної суміші для проведення ПЛР [Каталог фірми „Fermentas” (life sciences; molecular biology) за 2008-2009 рр.]

Реактив	Робоча концентрація
10× буферний розчин для Taq-полімерази (Tris-HCl, pH = 8,0-8,8; KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄)	1×
Суміш дезоксинуклеотидів (dNTP), концентрація кожного виду нуклеотиду 2 мМ	0,04-0,2 мМ кожного (зазвичай -0,2 мМ)
Водний розчин MgCl ₂ (найчастіше, вихідна концентрація становить 25 мМ)	1-4 мМ
Зразок ДНК (загалом - МАТРИЦІ)	10 пг - 1 мкг
Прямий (forward) праймер	0,1-1 мкМ (зазвичай-0,4)
Зворотній (reverse) праймер	0,1-1 мкМ (зазвичай-0,4)
Вода градації „nuclease-free”	до 50/25 мкл
Taq-полімераза	1,25 Од/50мкл

Полімерази в ПЛР

ДЕЯКІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДНК-ПОЛІМЕРАЗ

Полімерази	Час напів-життя при 95С (хв)	Швидкість полімеризації/помилки
Taq	40	1000 пар/хв; помилки: 1/2,6 x 10(-5) нт за цикл
Tth	20	
Pfu	120	200-400 пар/хв; помилки: 1/2,6x10(-6) нт за цикл
Vent	400	
Deep Vent	1300	
Pwo	120 при 100С	

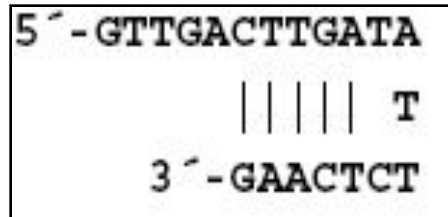
Полімерази в ПЛР

ДЕЯКІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДНК-ПОЛІМЕРАЗ

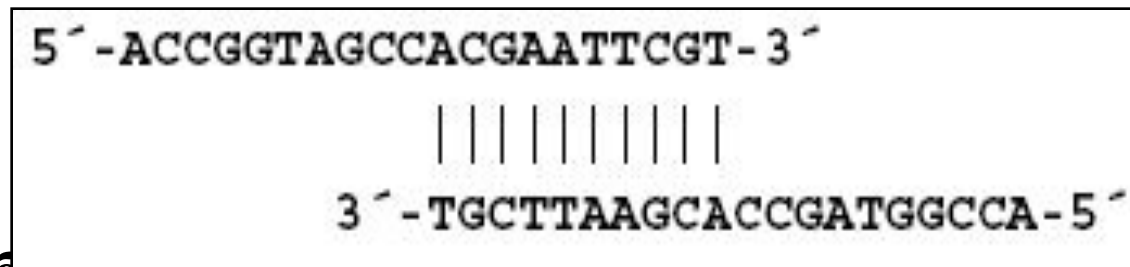
Полімерази	Екзонуклеазна активність 5'-3'	Екзонуклеазна активність 3'-5'	Добудовування 3'-кінців
Taq	+	-	A-он
Tth	+	-	A-он
Pfu	-	+	blunt ends
Vent	-	+	blunt ends
Deep Vent	-	+	blunt ends
UTma	-	+	blunt ends
Pwo	-	+	blunt ends

Вимоги до будови праймерів

- ❑ Довжина праймерів 18-30 нуклеотидів (за виключенням праймерів для клонування);
- ❑ GC-склад 40-60%, близький до GC-складу матриці (виключення-праймери для клонування);
- ❑ Різниця в температурах відпалу не більше 5°C;
- ❑ Не можуть утворювати шпильок на 3'-кінці:



- ❑ Не можуть утворювати димерів за 3'-кінцями:



- ❑ Бажано, щоб на 5'-кінці був або гуаніновий, або цитидиновий нуклеотид.

Праймери для клонування

ПОСЛІДОВНІСТЬ	НАЗВА
ATG↓AATTC gtagctagcg ataatcacgtact g	"Protein"- EcoRI -F
ATTC↓TCGAG cctagacct tgatgcgttgacta c	"Protein"- XhoI -R

Праймери для клонування

ПОСЛІДОВНІСТЬ

НАЗВА

ATG↓**AATTC****ACCCATGGAAC**
AAAAA**CTCATCTCAGAAGA**
GGATCTGgcataccaatagggt
ataaacttag

"Protein"-
EcoRI -
Kozak-Start
Myc-F

ATTC↓**TCGAG**ttgcaatcgctg
cgggtcaactactg

"Protein"-
XhoI-Stop-R

Універсальні праймери

- ❑ Якщо використовуються праймери з наукових статей – часто необхідно оптимізувати умови ПЛР під наявні прилади і реактиви!!!
- ❑ Існують т.з. „універсальні” праймери – їх можна знайти у відповідних базах даних, зокрема PubMed:

- ▶ Баркодинг: COI (Folmer et al., 1994
 - ▶ HCO2198 TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA
 - ▶ LCO1490 GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
- ▶ Simon 1991, 1994 – universal primers for arthropods

Molecular Ecology (2005) 14, 891–899

doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02448.x

Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets

L. E. BLANKENSHIP and A. A. YAYANOS

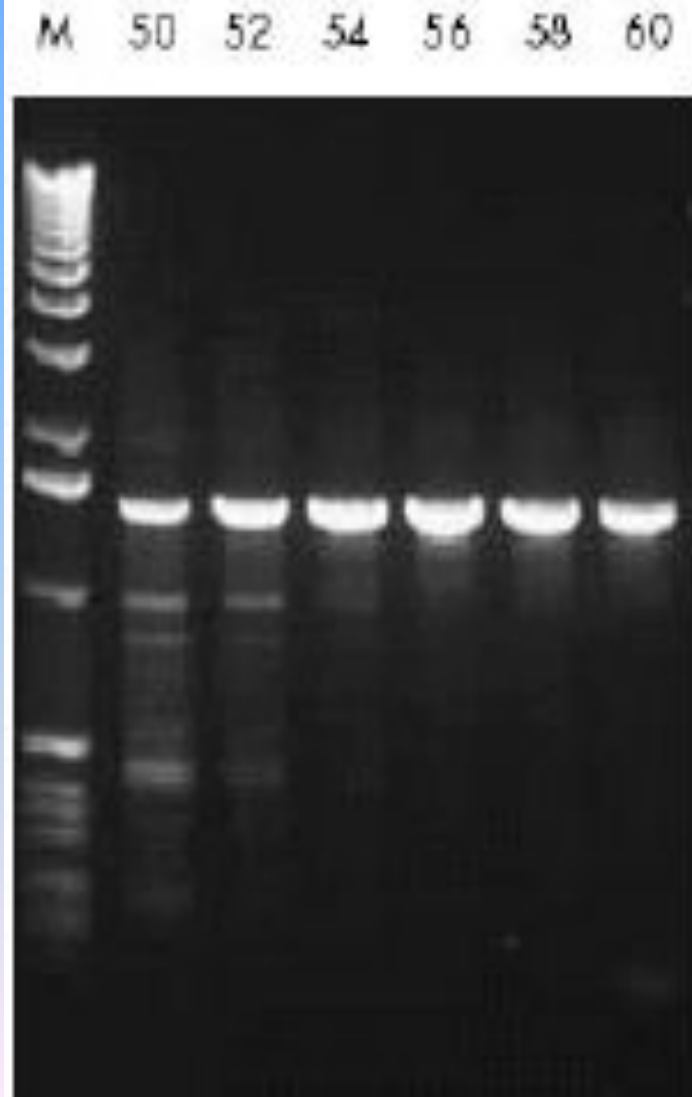
Marine Biology Research Division, Scripps Institution of Oceanography, 9500 Gilman Dr. 0208, La Jolla CA, 92093, USA

Оптимізація ПЛР

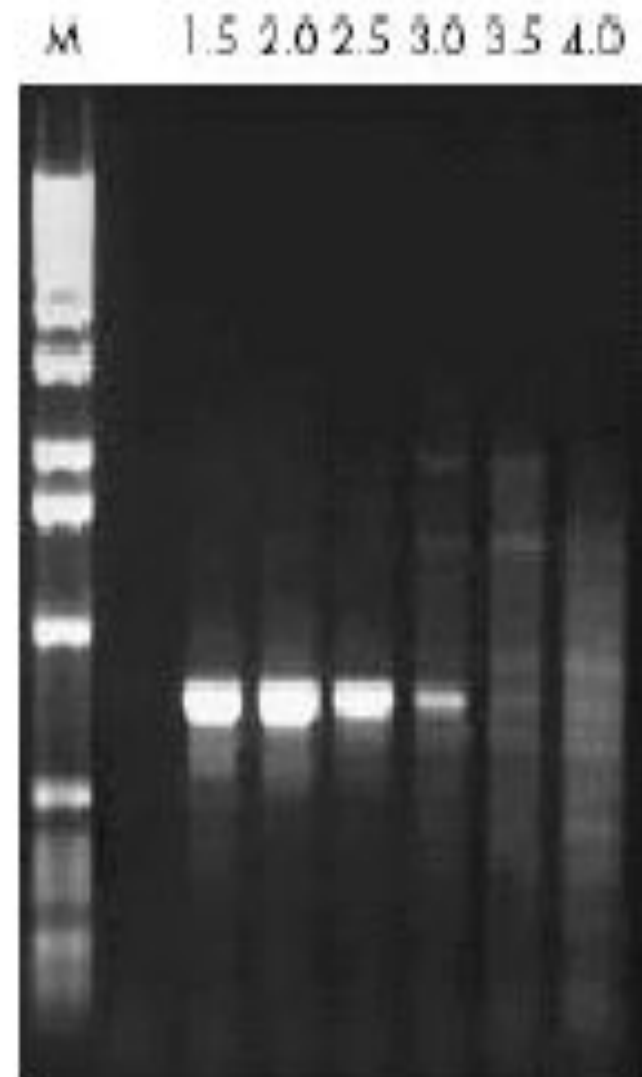
- ❑ Температурний профіль реакції;
- ❑ Тривалість окремих етапів реакції (в окремих випадках – збільшення тривалості відпалу і синтезу до 2 хвилин);
- ❑ Склад реакційної суміші:
 - концентрація іонів магнію;
 - концентрація праймерів;
 - концентрація полімерази;
 - додаткові сполуки (гліцерол, ДМСО, формамід, БСА та ін.);
- ❑ Робота з матрицею ДНК (переосадження (додаткова очистка), розведення, концентрування, вирізання з агарози фрагментів тощо);
- ❑ Використання інших праймерів;
- ❑ Проведення Nested (вкладеної) ПЛР;

Оптимізація ПЛР

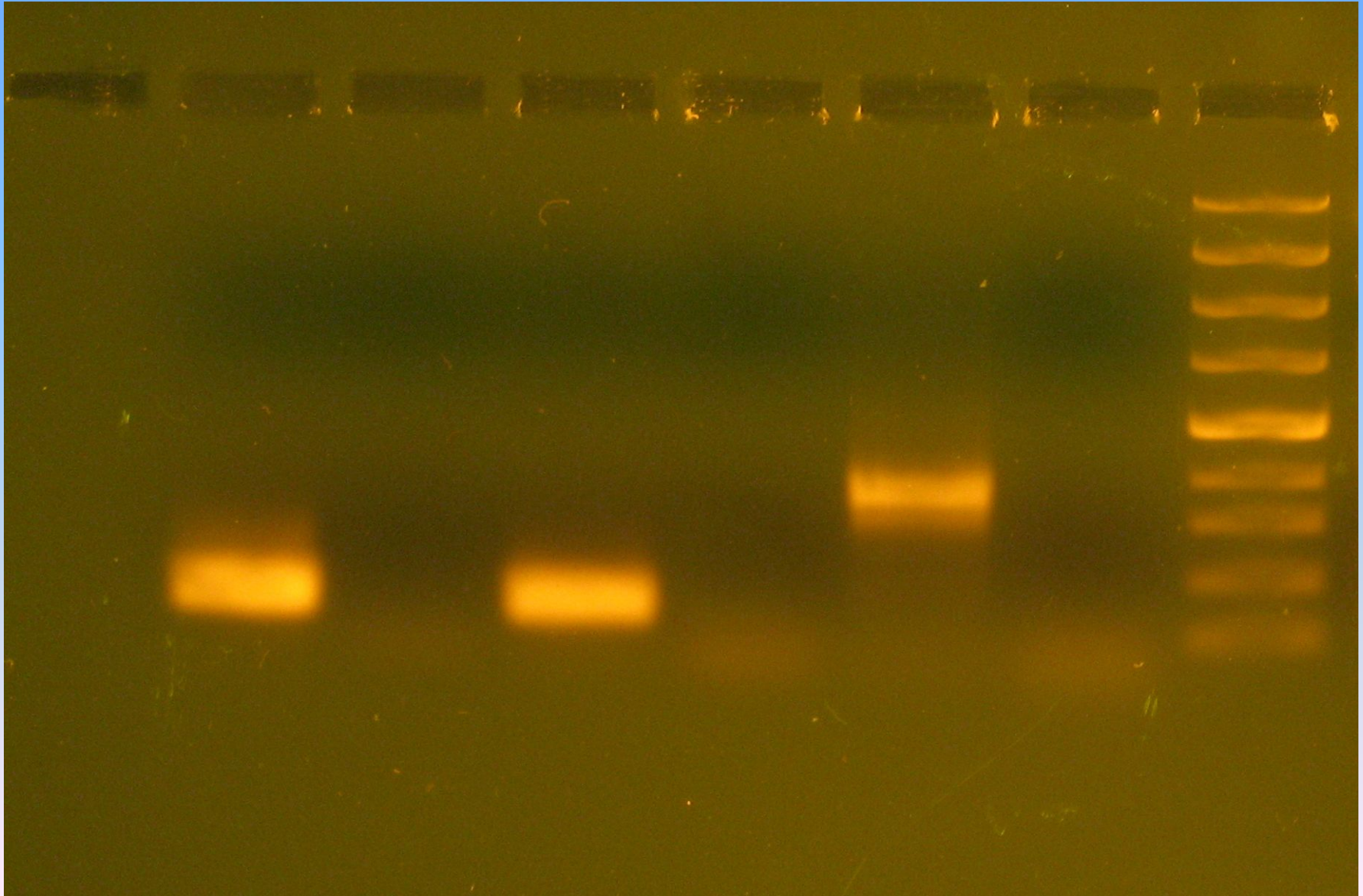
Підбір температури відпалу



Підбір концентрації іонів магнію

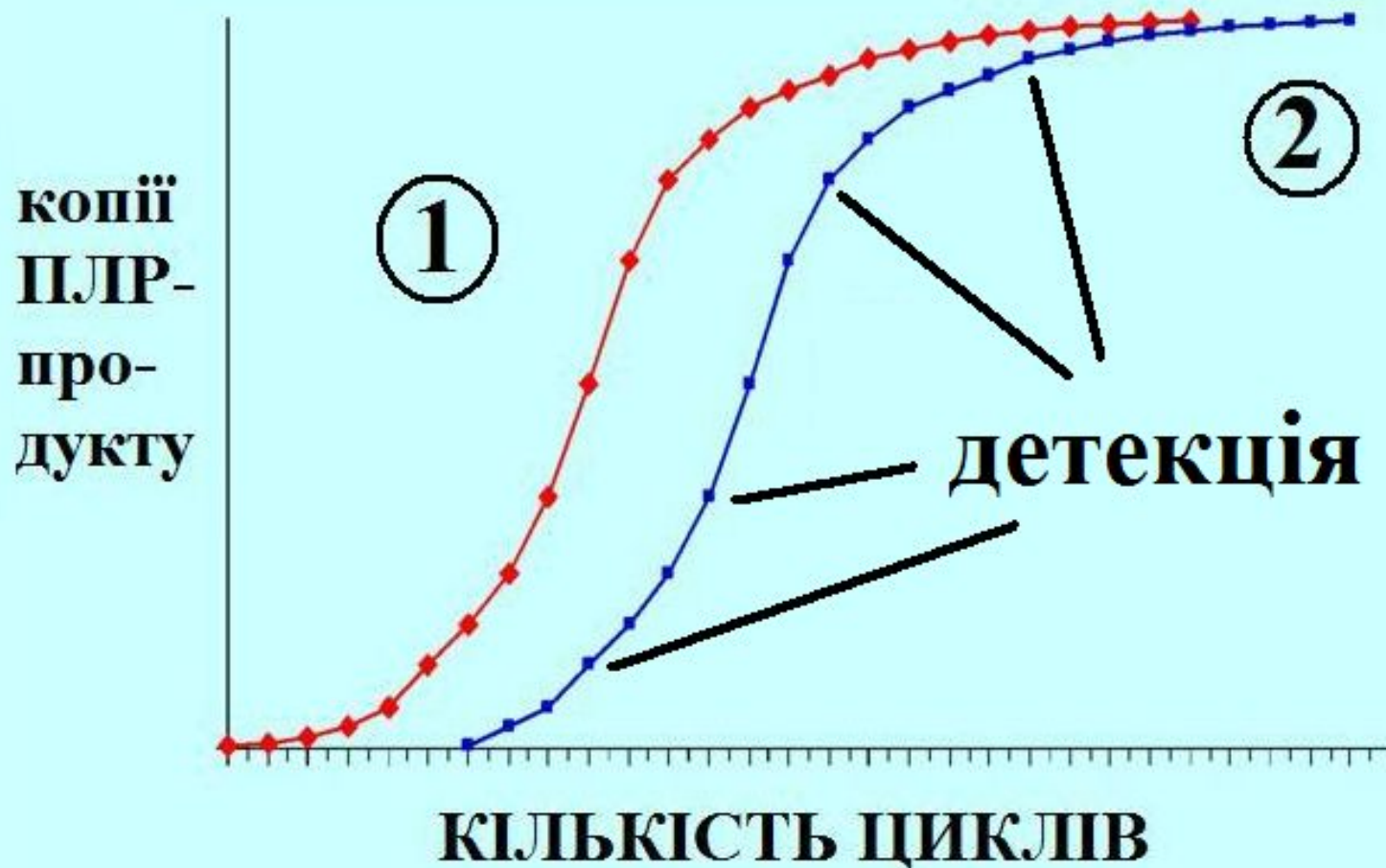


**Види детекції продуктів ПЛР.
Детекція продуктів ПЛР методом електрофорезу в
агарозному гелі.**



Детекція ПЛР продукту впродовж ампліфікації під час ПЛР в реальному часі

Крива накопичення продукту ПЛР

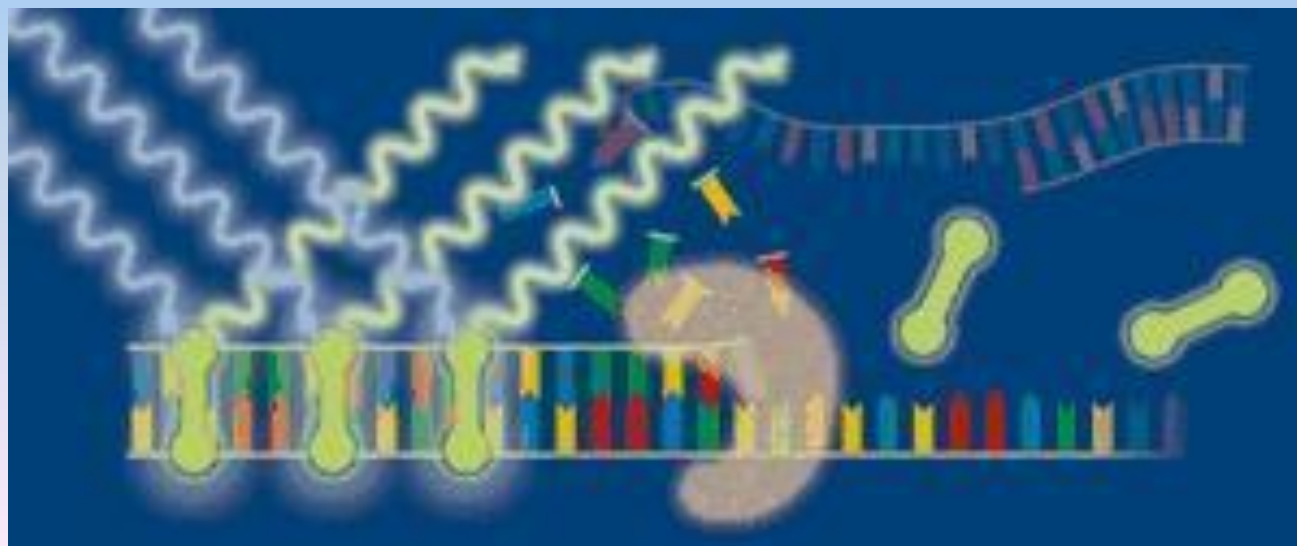
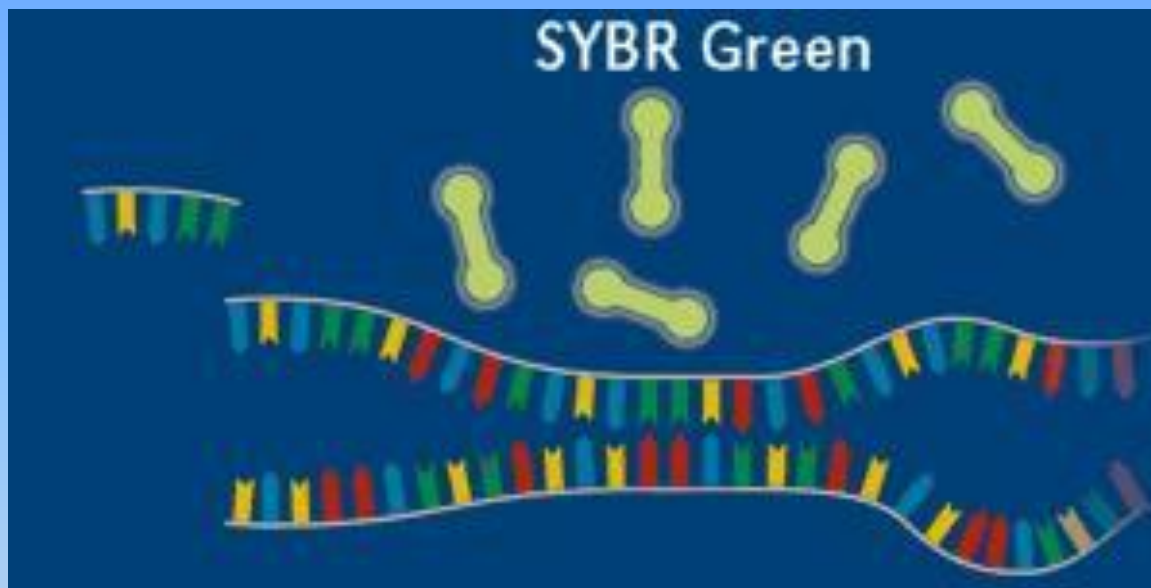


ПЛР в реальному часі (Real-time PCR)

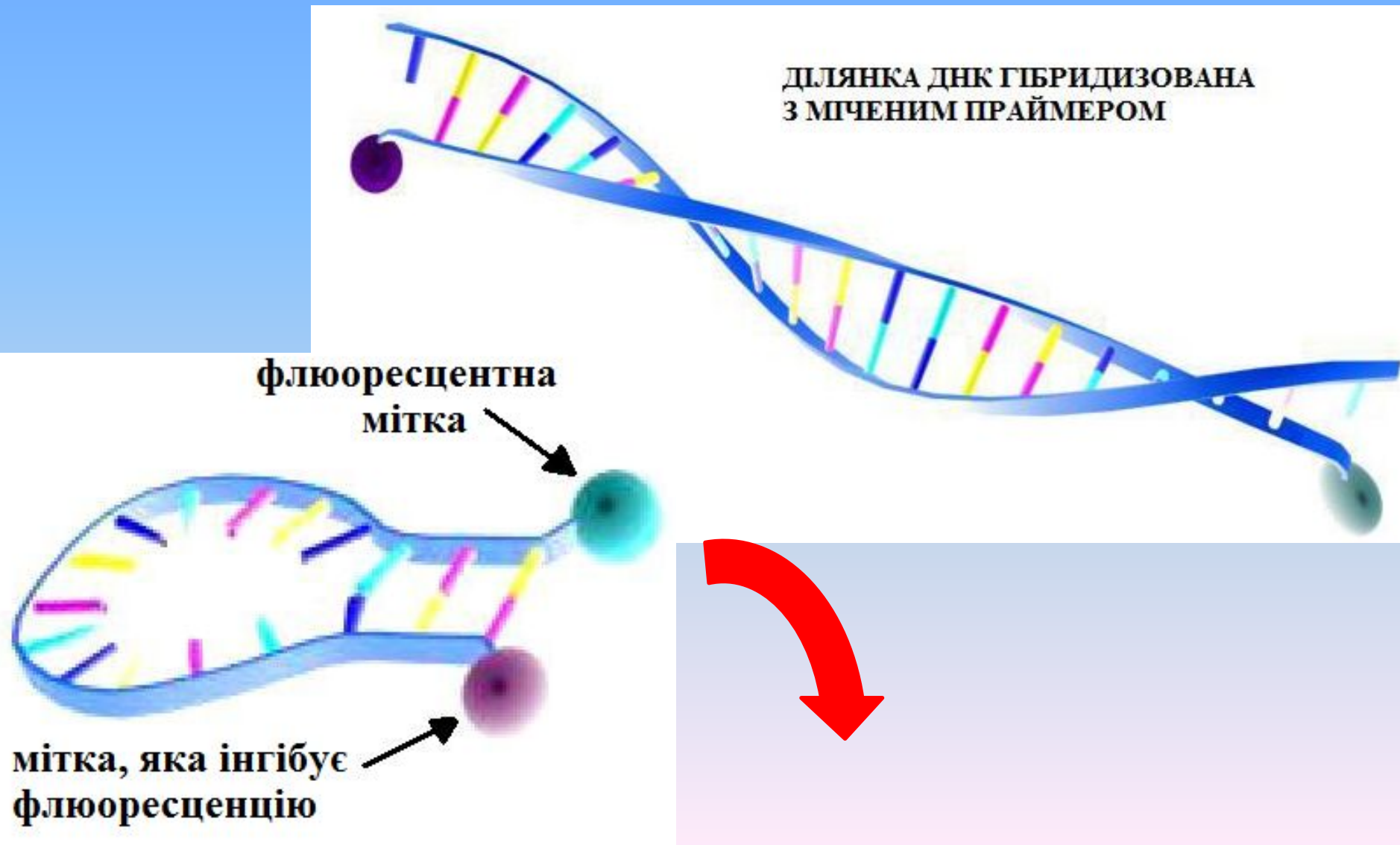
- ❑ **За допомогою інтеркалюючих барвників (SYBR Green тощо);**
- ❑ **За допомогою гібридизаційних зондів (проби Taqman);**
- ❑ **За допомогою праймерів мічених флюоресцентними мітками Fam, Hex, Cy5, Rox тощо.**

ПЛР в реальному часі.

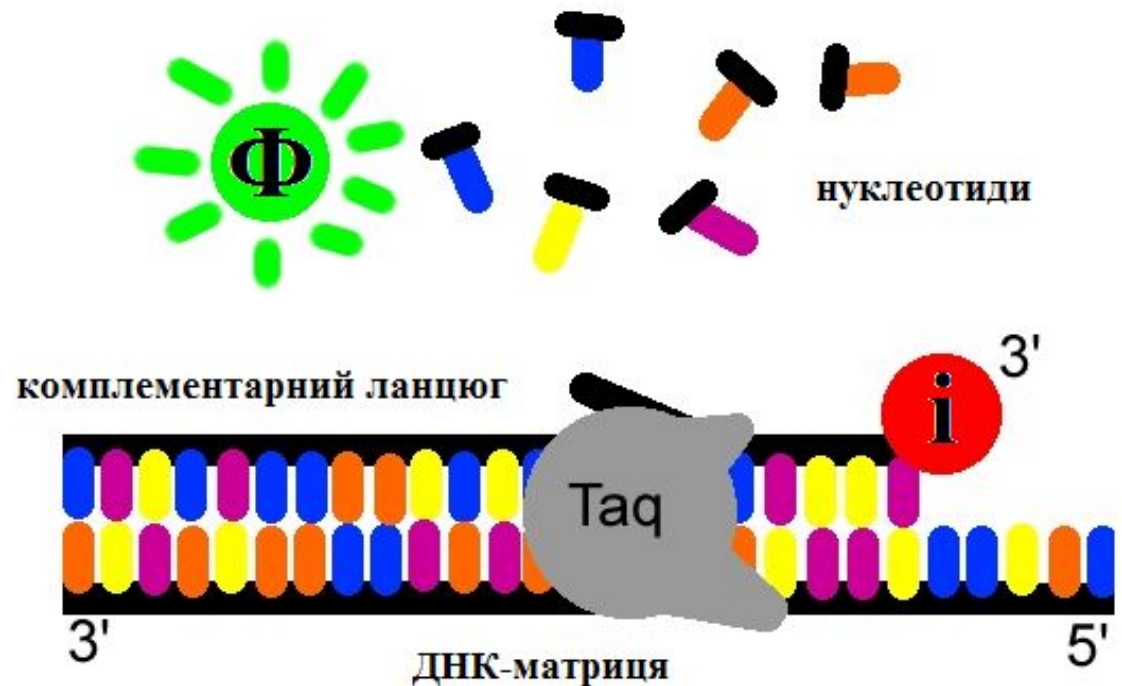
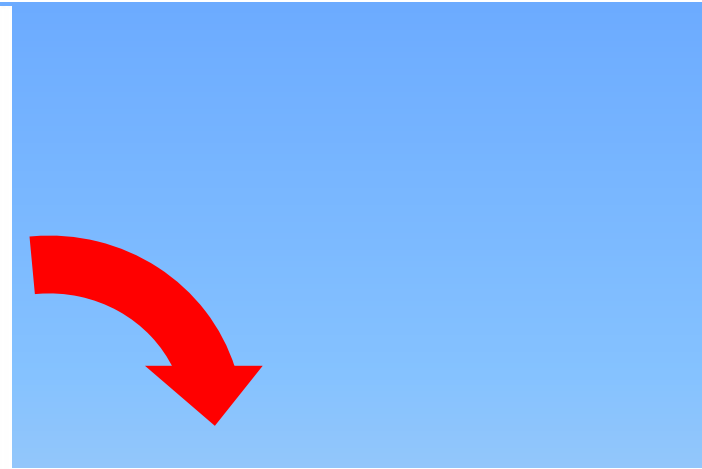
Низькоспецифічна детекція результатів ПЛР за допомогою інтеркалюючого барвника SYBR Green.



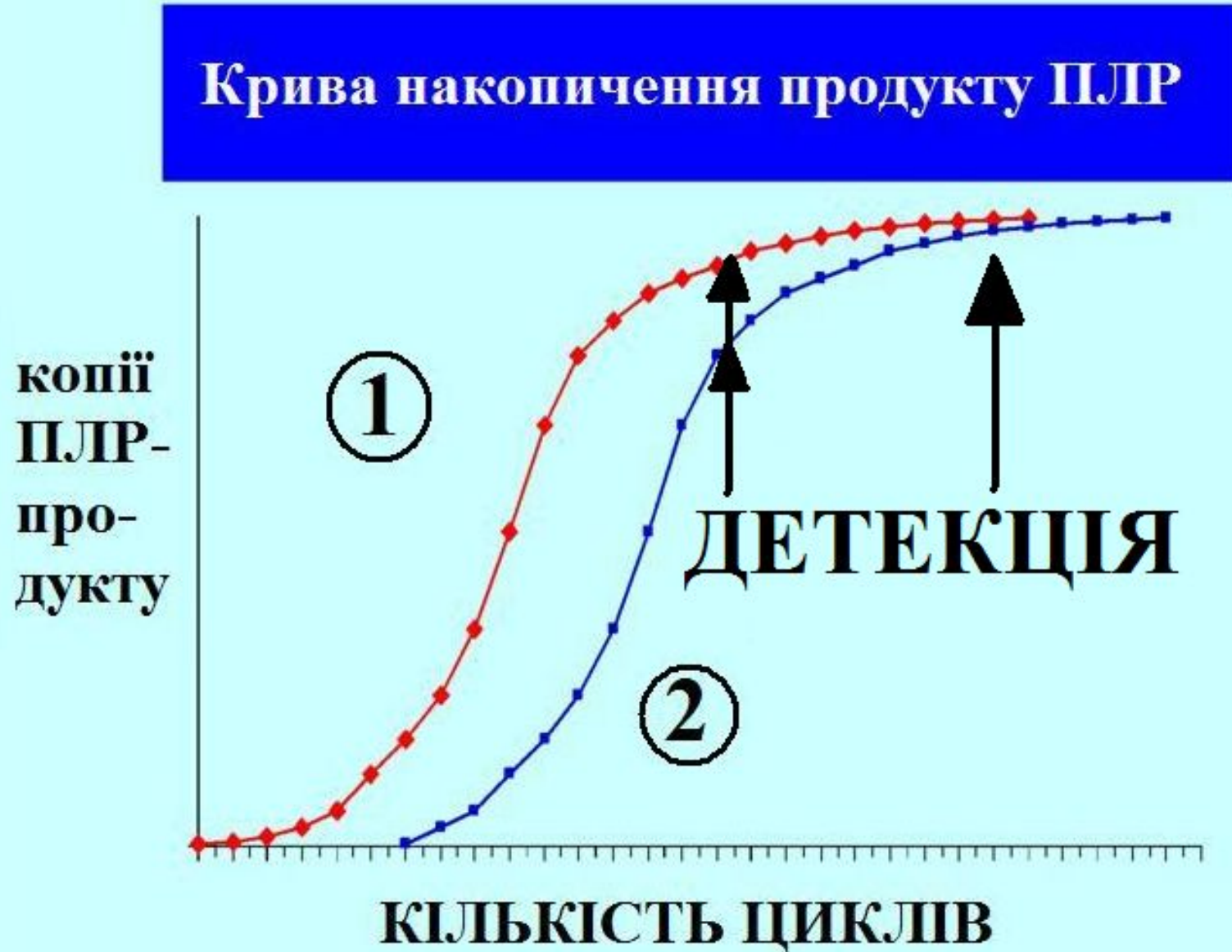
ПЛР в реальному часі. Детекція накопичення продукту за допомогою флюоресцентних міток ковалентно зв'язаних з праймерами.



ПЛР в реальному часі. Проба **Taqman**



Детекція ПЛР продукту за „кінцевою точкою”



Детекція продуктів ПЛР за „кінцевою точкою”.
Флюоресцентні барвники Fam і Hex. Внутрішній контроль в
діагностичній ПЛР.
Детекція K+ Toxoplasma gondii.



	Пробирка	Образец	Fam	Hex	Rox	Cy5
1	1/0		624	28		
2	2/0		692	35		
3	3/фон(Tox.go	фон	86	41		
4						
5						

Внутрішній контроль в ПЛР: РЕЗУЛЬТАТ ДІАГНОСТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВІРУСУ (CMV)

**ВНУТРІШНІЙ
КОНТРОЛЬ**



← 560 П.Н.

← 280 П.Н.

**ПРОДУКТ
АМПЛІФІКАЦІЇ
ДНК CMV**



Види ПЛР

- ❑ ПЛР з «гарячим» стартом (hot-start PCR);
 - ❑ Touchdown ПЛР;
 - ❑ Мультиплексна ПЛР;
 - ❑ Гніздова, або вкладена (nested) ПЛР;
 - ❑ ПЛР з оберненою транскрипцією (Reverse transcription PCR (RT-PCR));
- ТОЩО**

Види ПЛР

- ПЛР з «гарячим» стартом (hot-start PCR) (ПІДВИЩУЄ СПЕЦИФІЧНІСТЬ РЕАКЦІЇ):
 - Внесення полімерази після попередньої денатурації;
 - Або: активація інактивованої білками полімерази попереднім тривалим (10-15 хв) підвищенням температури;
 - Або: використання плавких розділювачів між полімеразою і матрицею.
- Touchdown ПЛР (зниження температури відпалу у кожному циклі, збільшення тривалості відпалу на кожному циклі, інколи – зменшення температури синтезу в циклах ПЛР);

Організація технологічного процесу при постановці ПЛР, або при діагностиці з використанням ПЛР

- ❑ Контамінація;**
- ❑ Організація лабораторії (робочих місць) за принципом ізольованих робочих зон;**
- ❑ Розділене використання обладнання при роботі з чистими розчинами і розчинами, які містять ДНК або ПЛР-продукти;**
- ❑ Обов'язкова постановка в кожному експерименті негативного і позитивного контролів;**
- ❑ Стокові розчини розділяти на аліквоти і періодично змінювати;**
- ❑ ПЛР-продукти зберігати в окремому холодильнику від реактивів.**