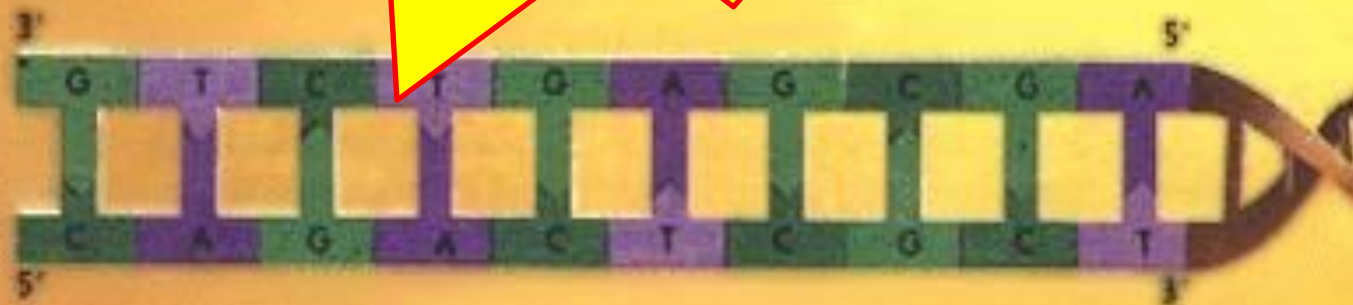
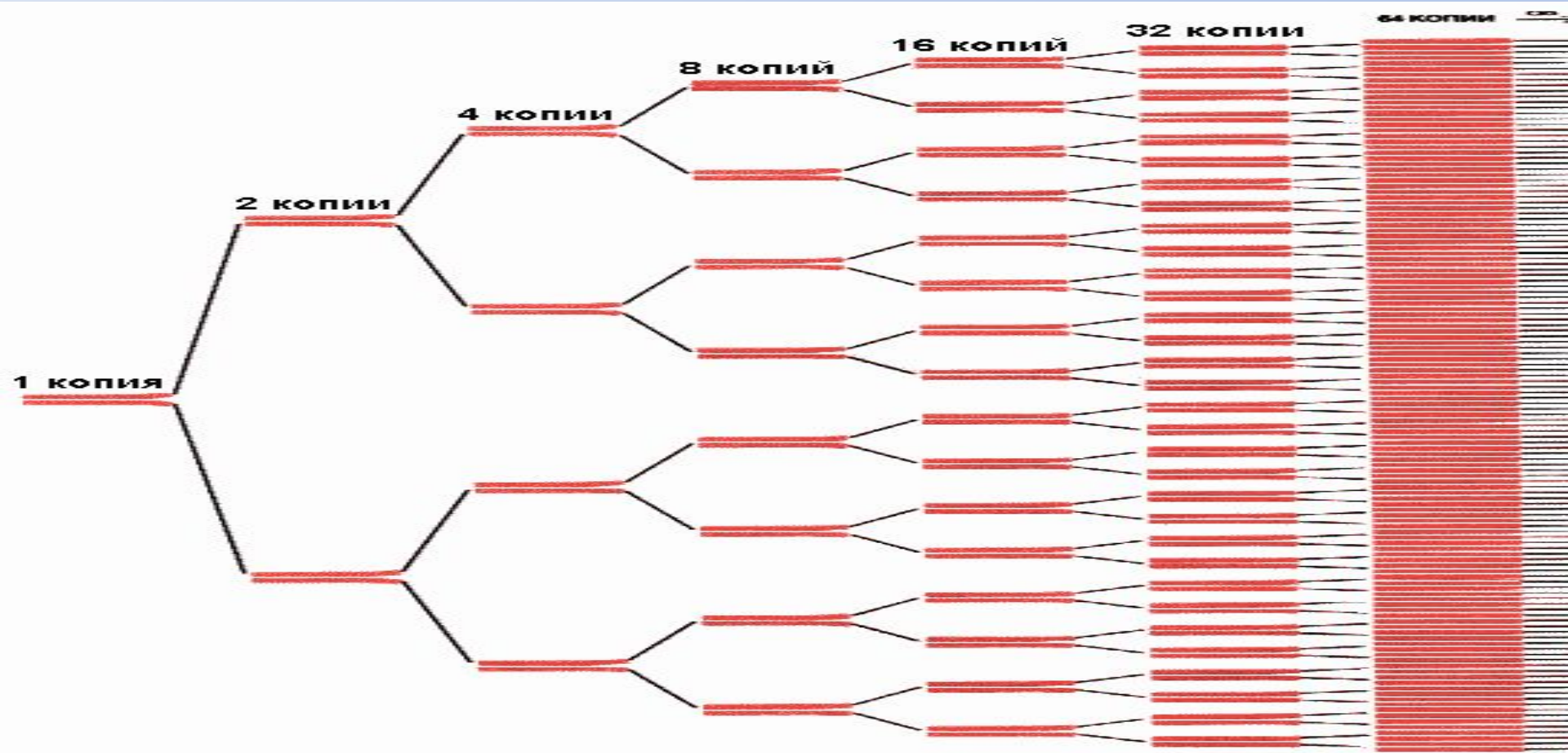


ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)



Полимеразная цепная реакция

Это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей



Полимеразная цепная реакция

Метод ферментативной наработки *in vitro* определённых, сравнительно коротких (до нескольких тысяч пар нуклеотидов), двуцепочечных фрагментов ДНК.

В основе реакции лежит механизм репликации молекул ДНК ферментом ДНК-



Изобретение ПЦР



В 1983 г. химик компании Cetus, **Кэри Маллис**, оптимизируя метод олигомерной рестрикции для идентификации точечных мутаций в ДНК, придумал как многократно увеличить количество копий определённого участка ДНК.

Kary Mullis, Лауреат Нобелевской премии 1993 г. по химии

Амплификатор

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С.

Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С.

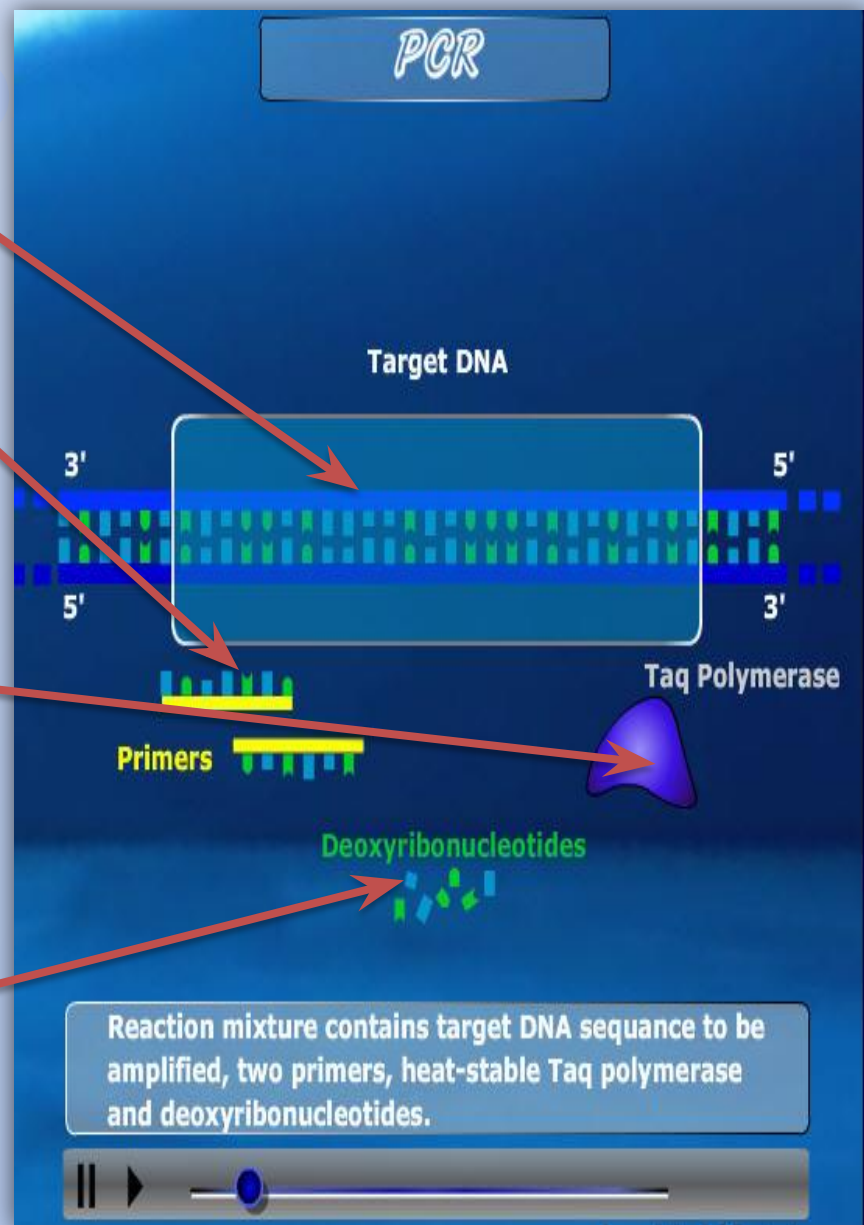


Для ПЦР

□ ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

□ Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

□ Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.



ПЦР осуществляется в ходе
трехэтапного циклического процесса:

✓ Денатурация

✓ Ренатурация

✓ Синтез

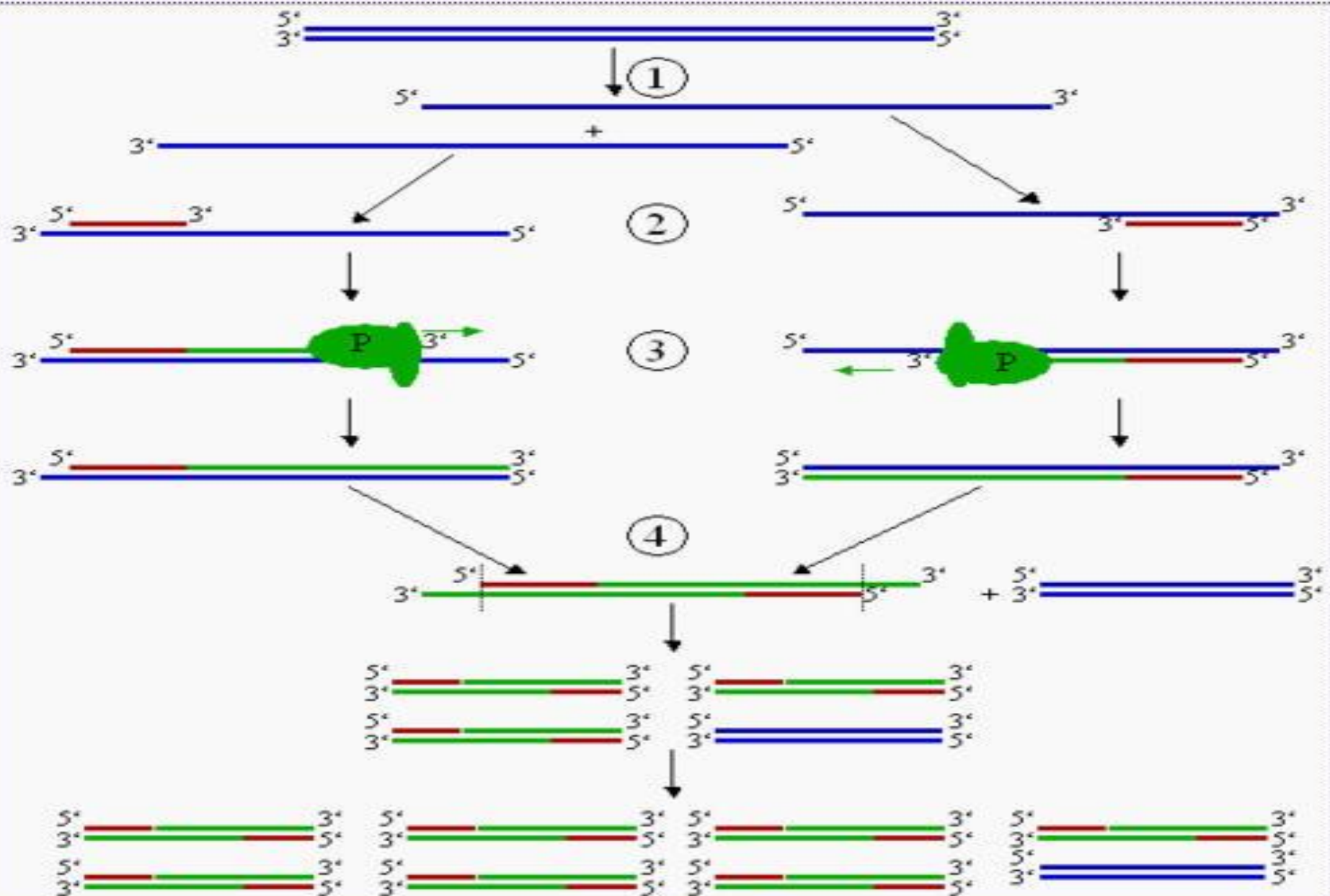
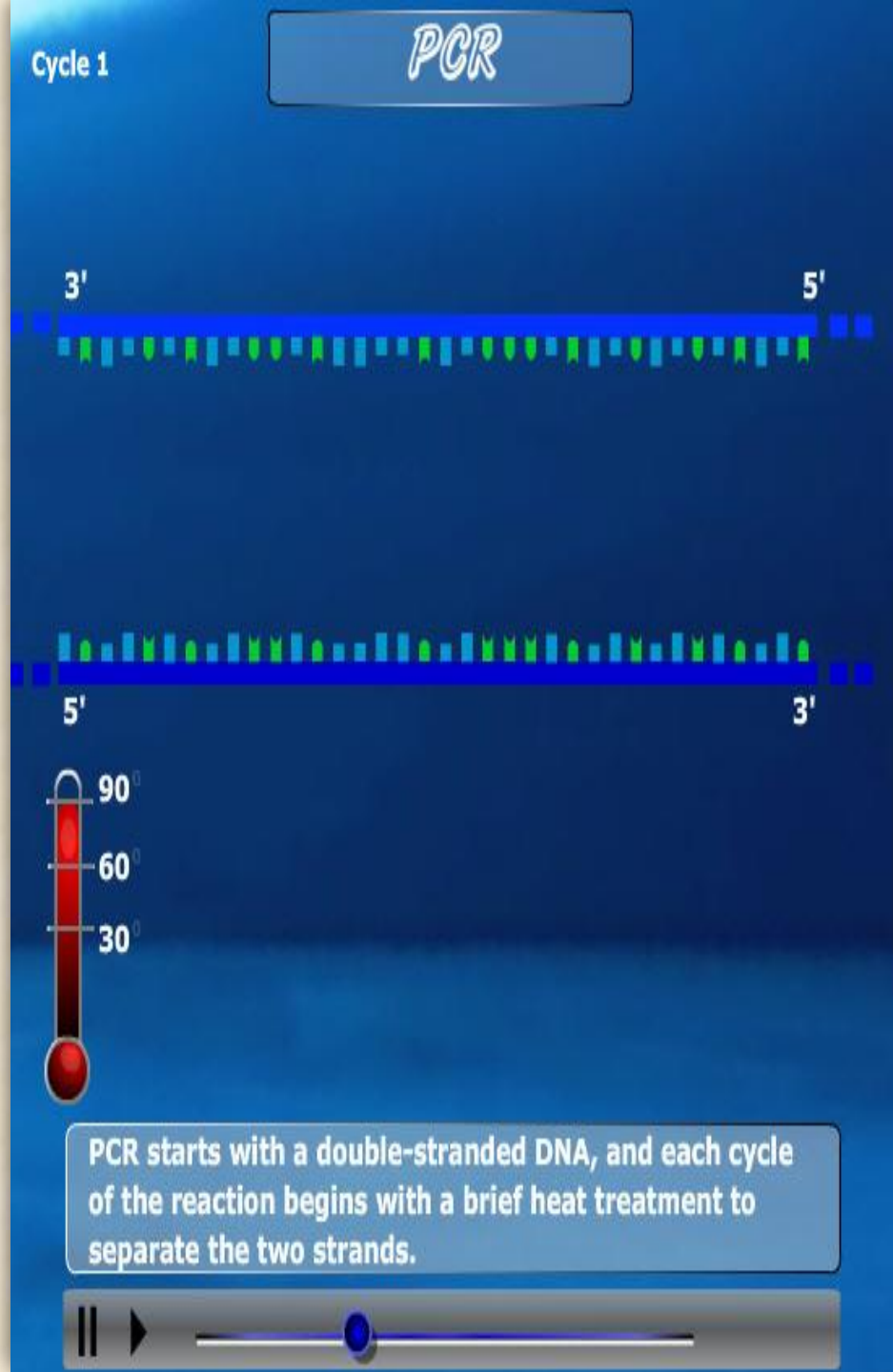


Рис. 2: Схематическое изображение первого цикла ПЦР. (1) Денатурация при 94—96°C. (2) Отжиг при 68 °C (например). (3) Элонгация при 72 °C (P=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

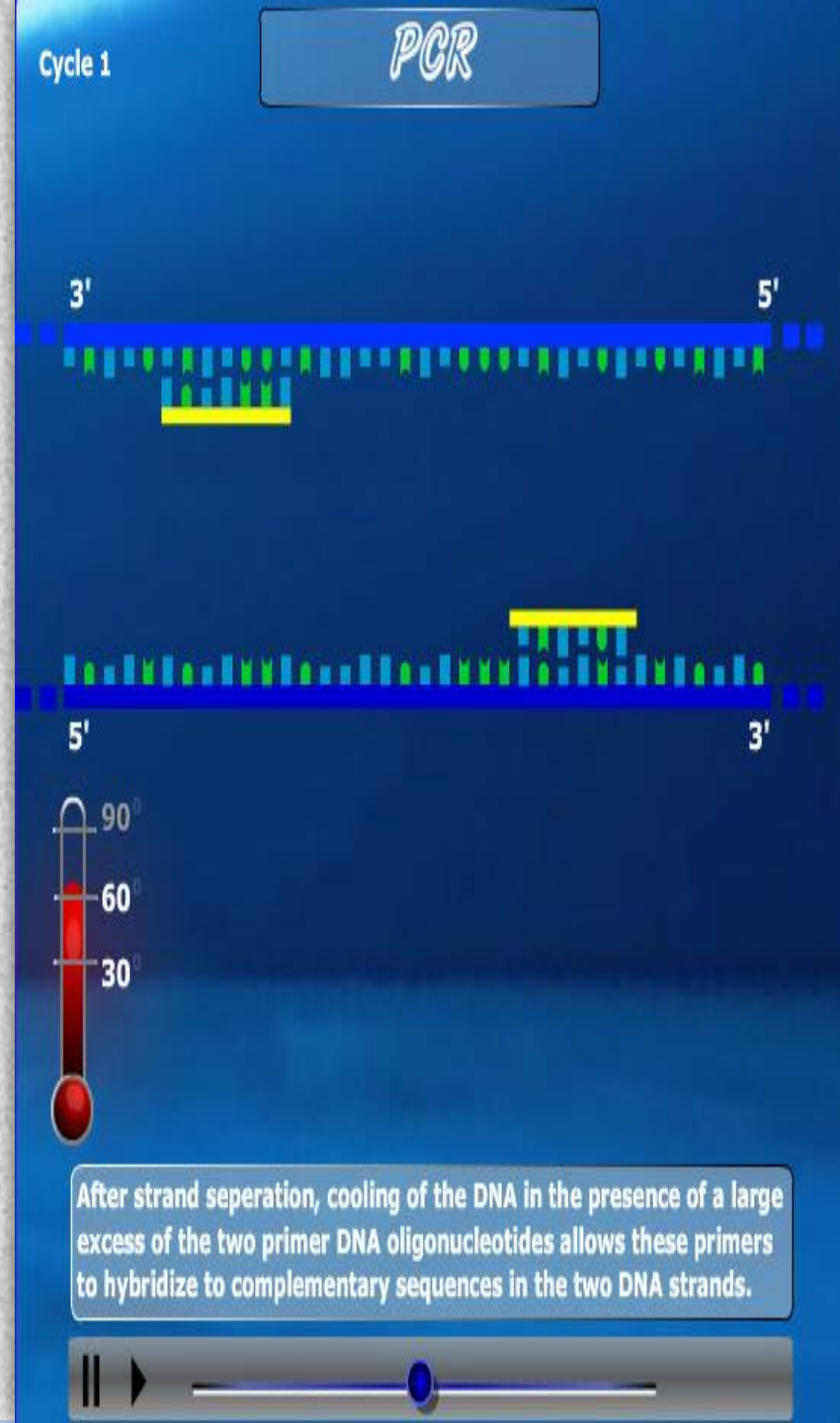
Денатурация

- Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°C (или до 98 °C, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 минут, чтобы цепи ДНК разошлись.
- Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК.
- Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется *горячим стартом*, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.



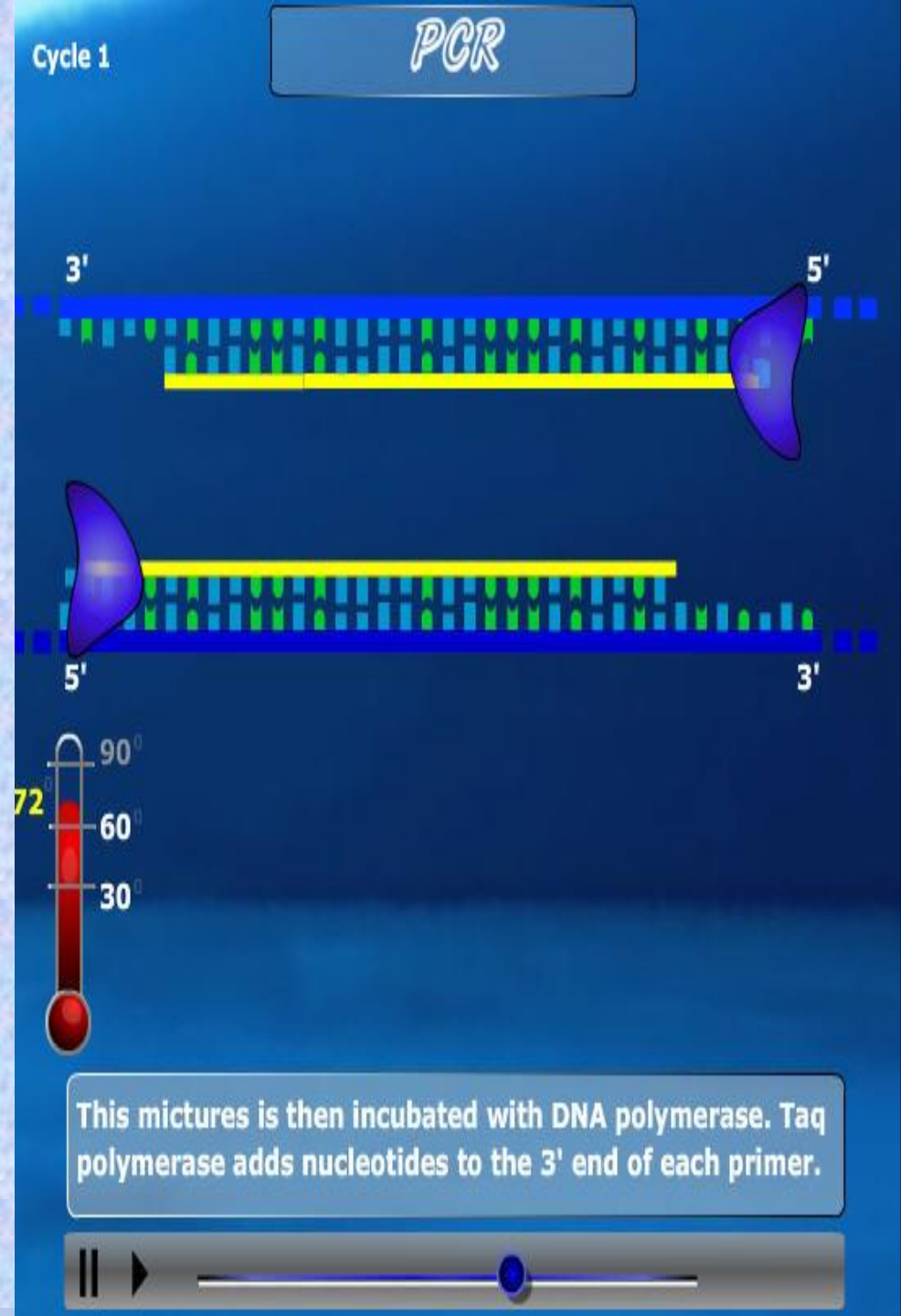
Ренатурация (Отжиг)

- Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*.
- Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 минут.
- Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).



Синтез (Элонгация)

- ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия *элонгации*.
- Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы.
- Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °C.



Состав реакционной смеси

Исследуемая ДНК

ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP)

ДНК-затравки (праймеры)

Буферный раствор с $MgCl_2$

Интеркалирующий краситель
(обычно SYBR Green)

ил

Флуоресцентно меченные
ДНК-зонды

«Горячий старт» -
активация
полимеразы,
размешивание
компонентов

93-96 °

1-10 минут

93-96 °

5-15
секунд

Разрушение
водородных связей
между цепями ДНК
(денатурация)

40-75 °

30 секунд

Гибридизация
праймеров на ДНК
(отжиг праймеров)

60-75 °

0-15
секунд

Синтез
комплементарных
цепей ДНК
(элонгация)

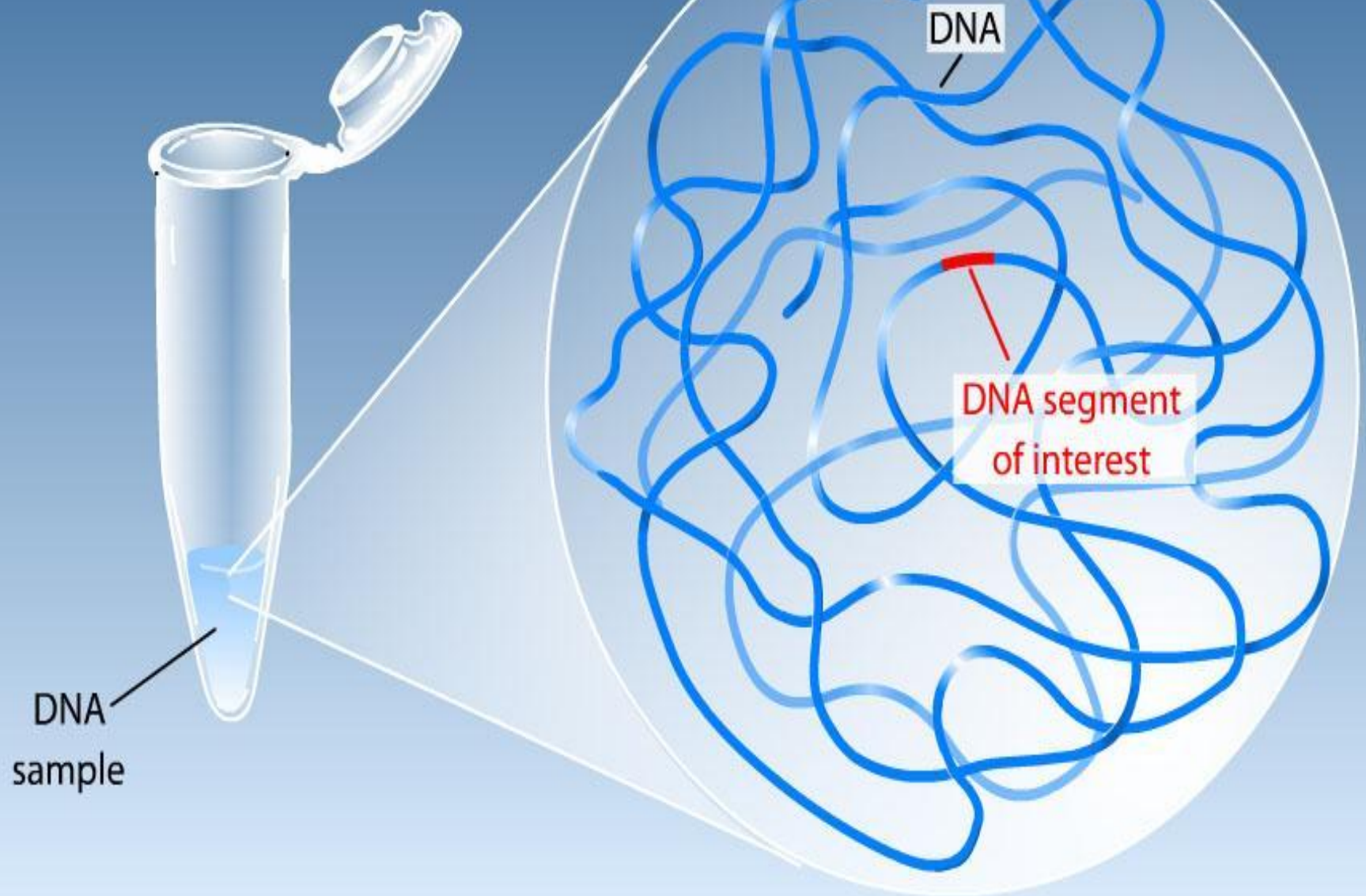


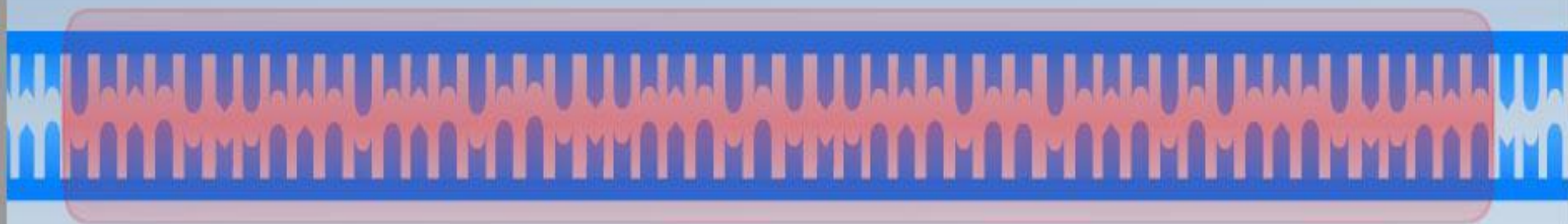
Полимеразная цепная реакция с
возможностью детекции
продукта в реальном времени
(RT-PCR).

Секвенирование по
Сенгеру

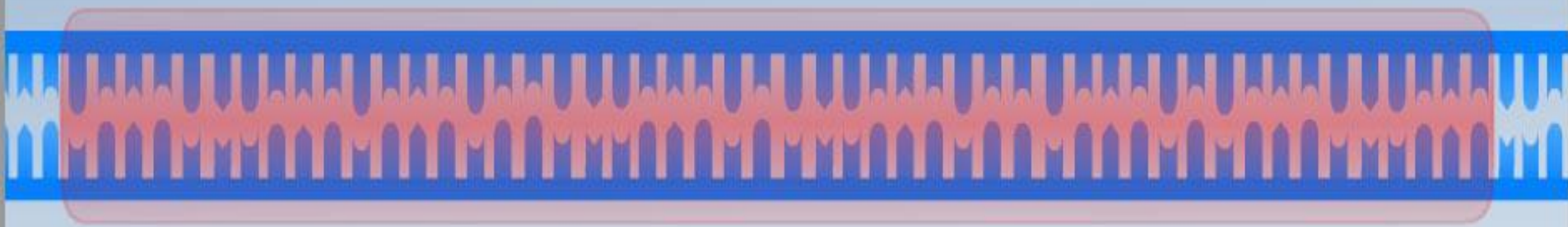


Polymerase Chain Reaction (PCR)





← Target DNA →

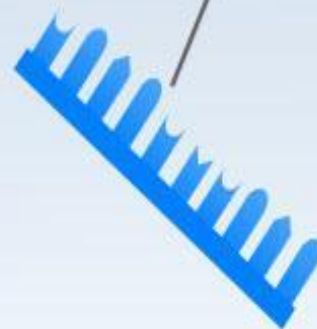
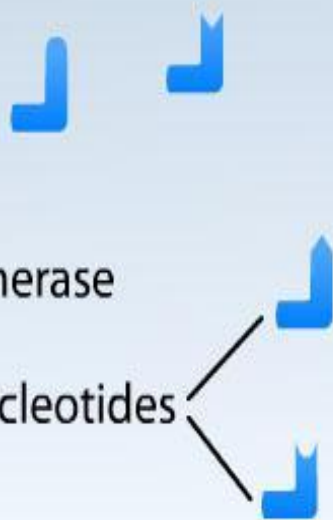


← Target DNA →



Taq polymerase

Nucleotides

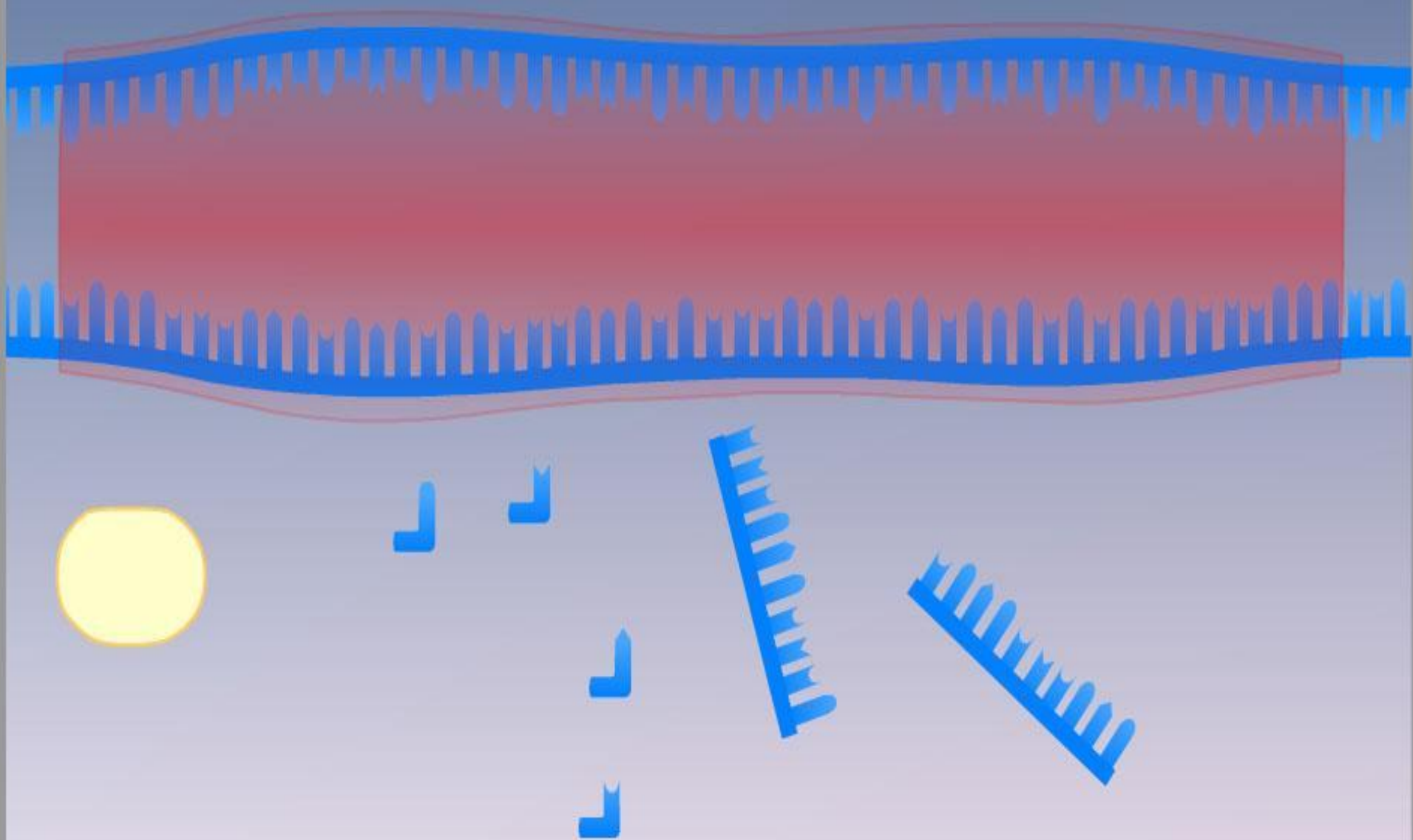


Primers

95 ° C

Denature DNA

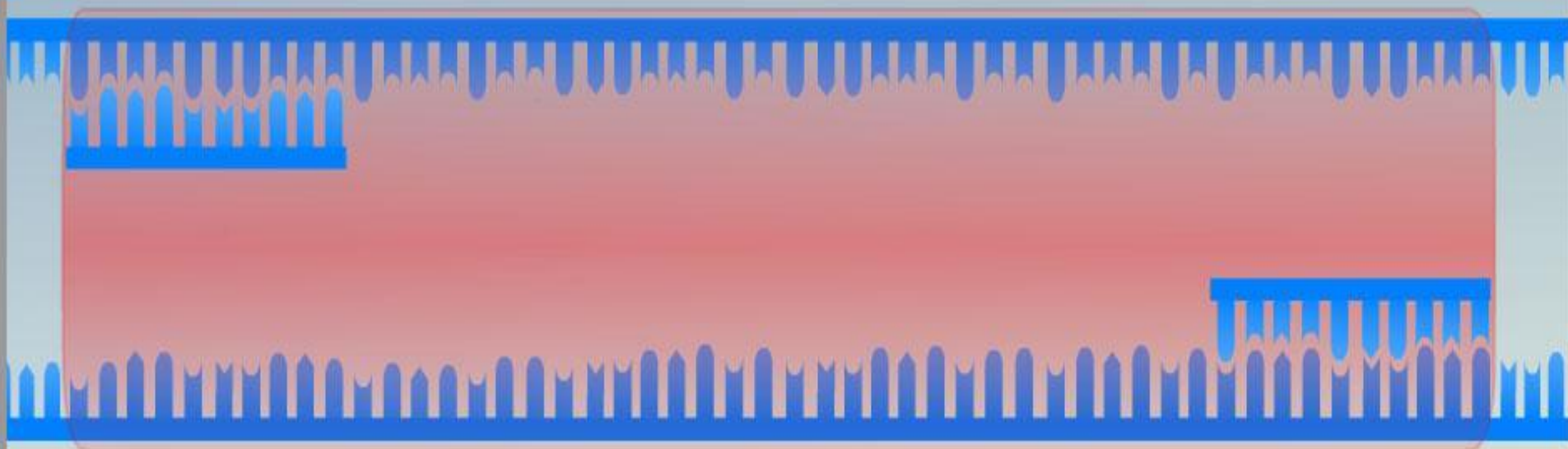
Cycle 1



60 ° C

Anneal Primers

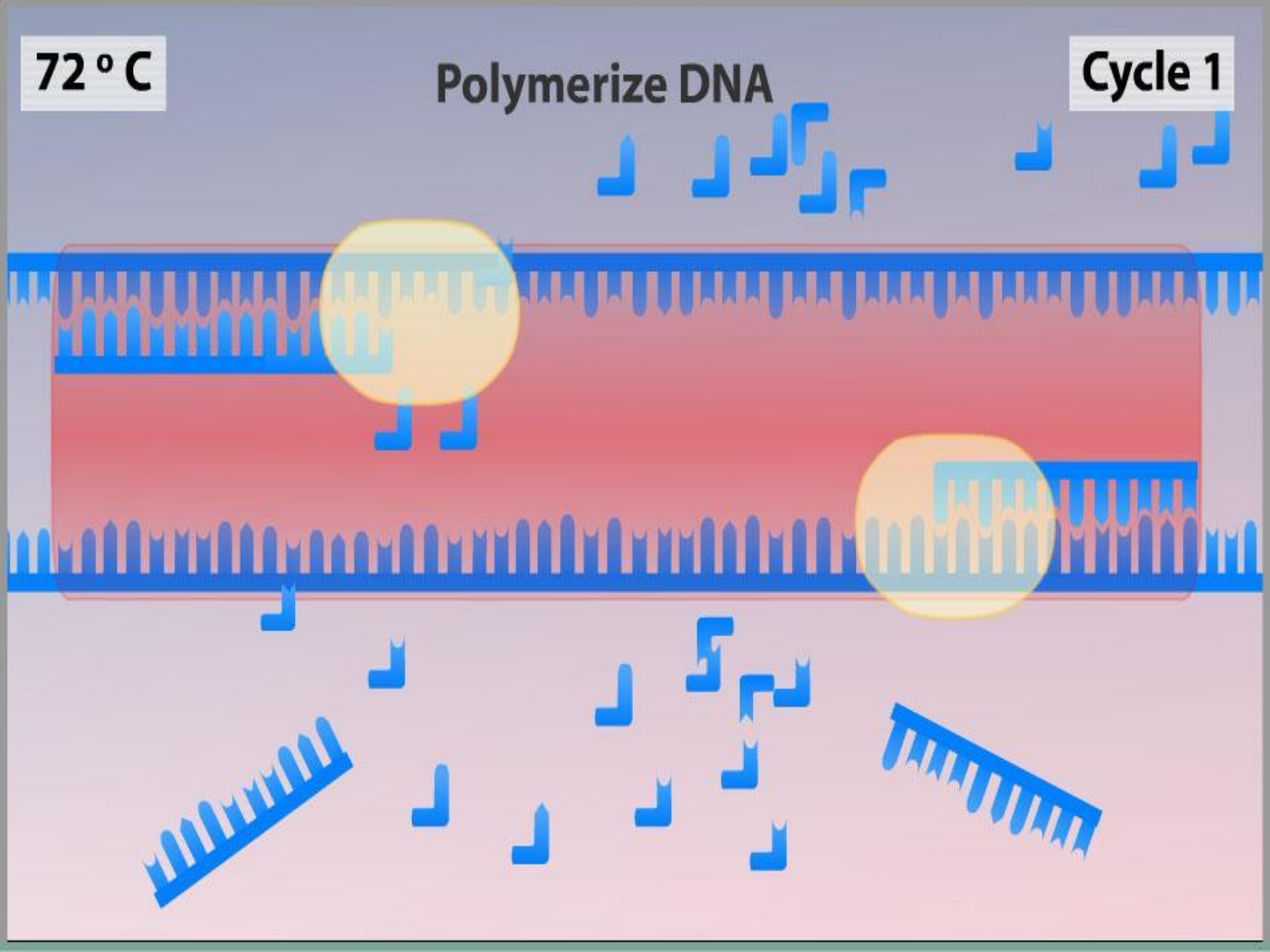
Cycle 1



72 ° C

Polymerize DNA

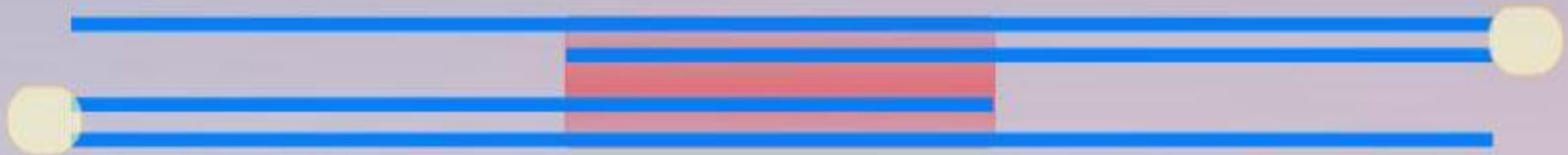
Cycle 1



72 °C

2 Copies of Target DNA

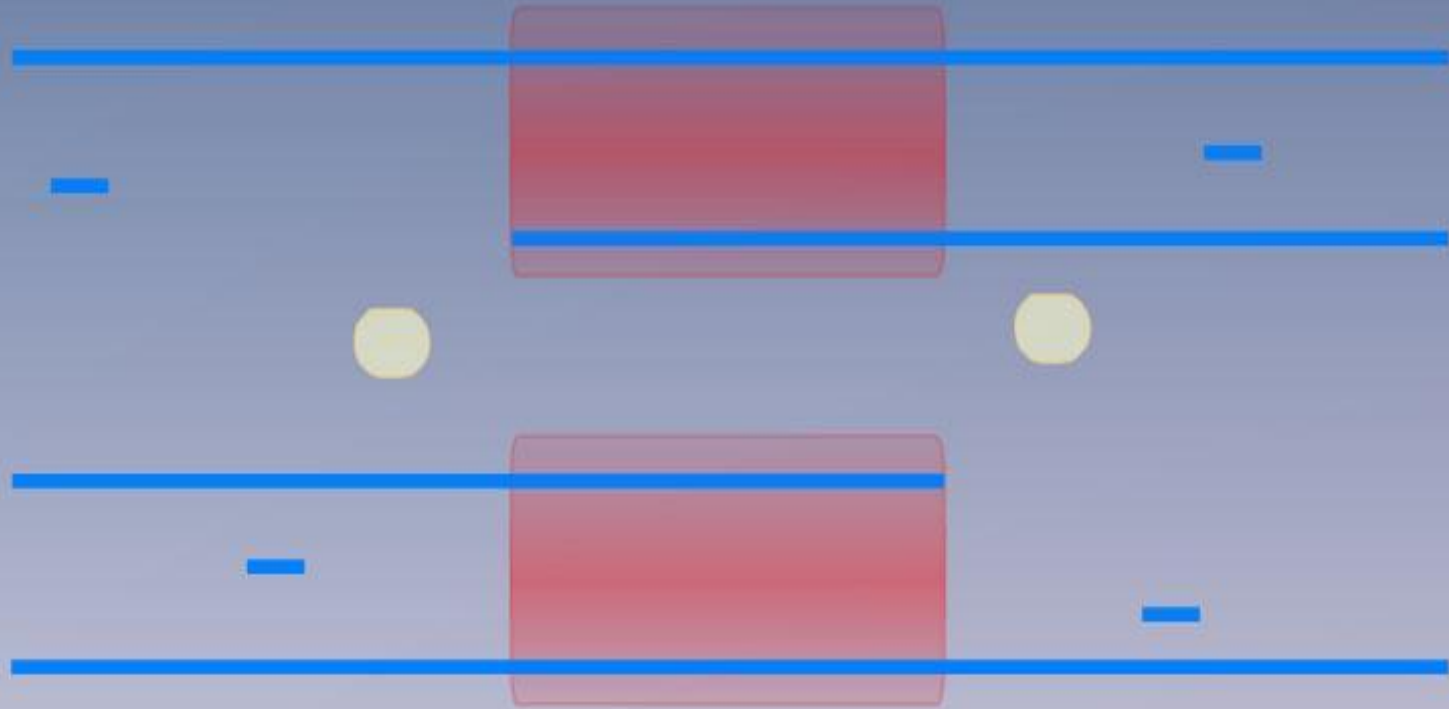
Cycle 1



95 ° C

Denature DNA

Cycle 2

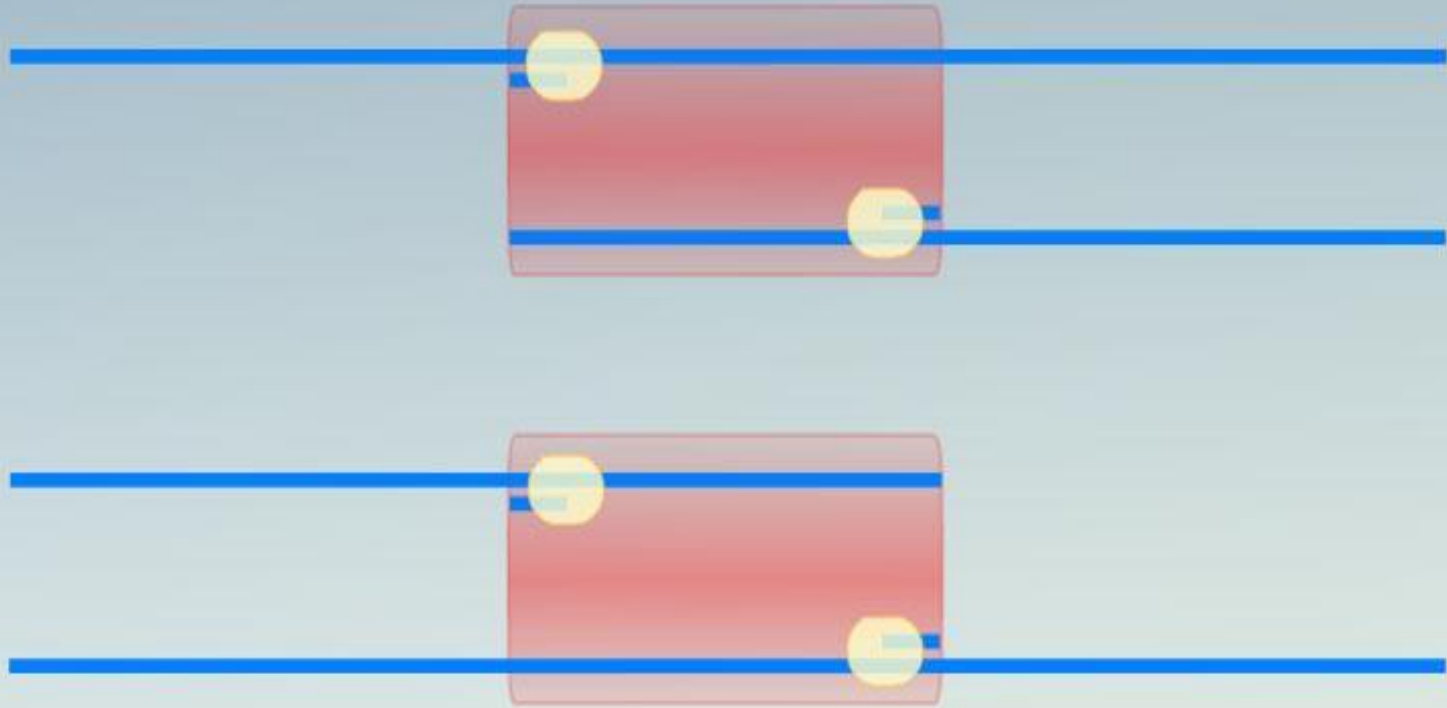


Primers

60 °C

Anneal Primers

Cycle 2



72 °C

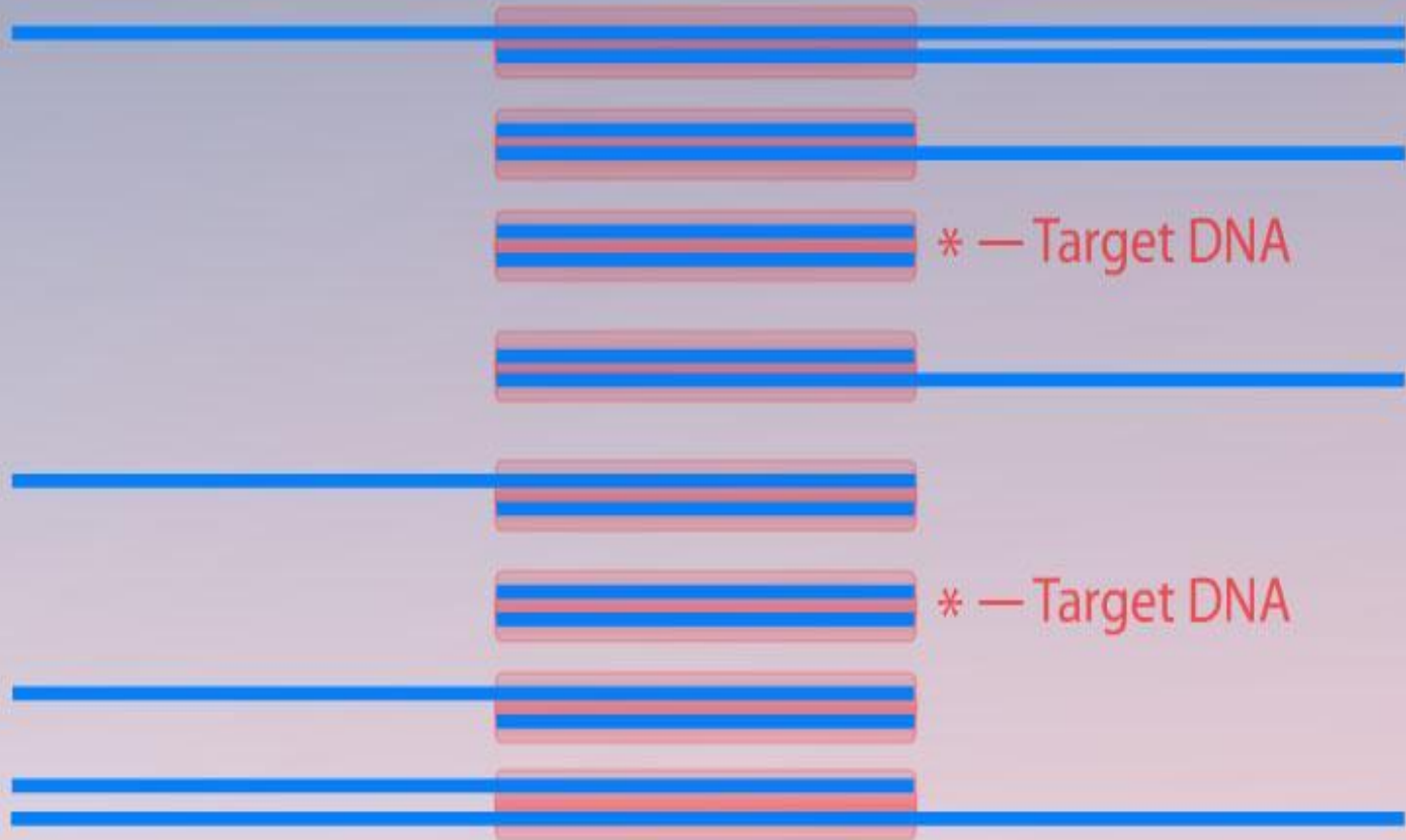
Polymerize DNA

Cycle 2



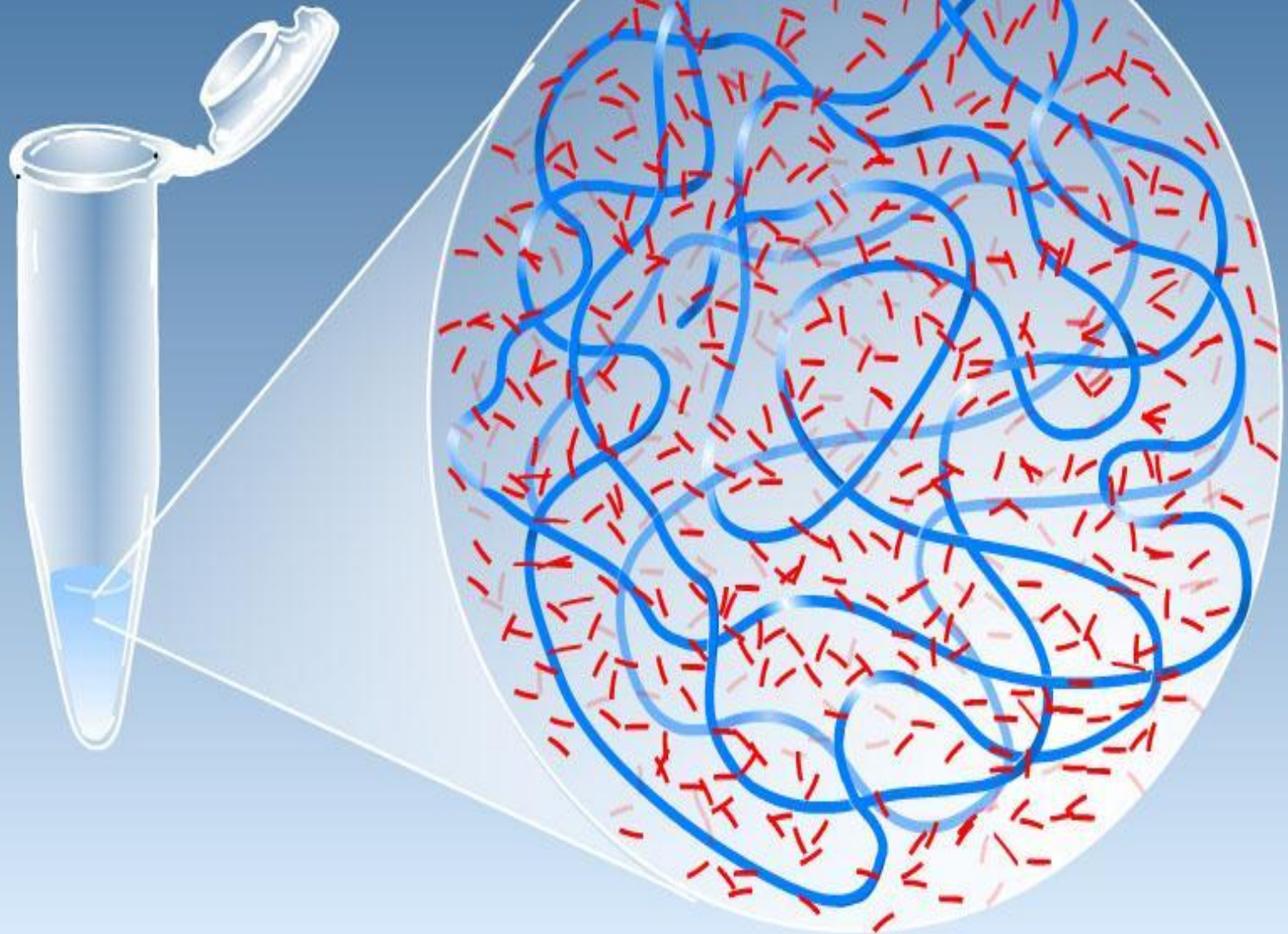
8 Copies of Target DNA

Cycle 3



33,554,432 Copies of Target DNA

Cycle 25



Технология «ПЦР-чип»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping
genes

Genomic
DNA
control

Reverse
transcription
controls

Positive
PCR controls

Анализ
экспрессии
и 84 генов
за один
раз

1. DNA Digestion.



Mix DNA +
Digestion Buffer



Split into 4 Fractions

Add Enzyme:		Mock	Sensitive	Dependent	Double
Methylation Sensitive		-	+	-	+
Methylation Dependent		-	-	+	+



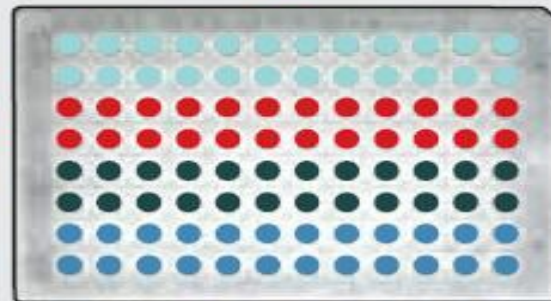
37°C (6 hr - overnight)



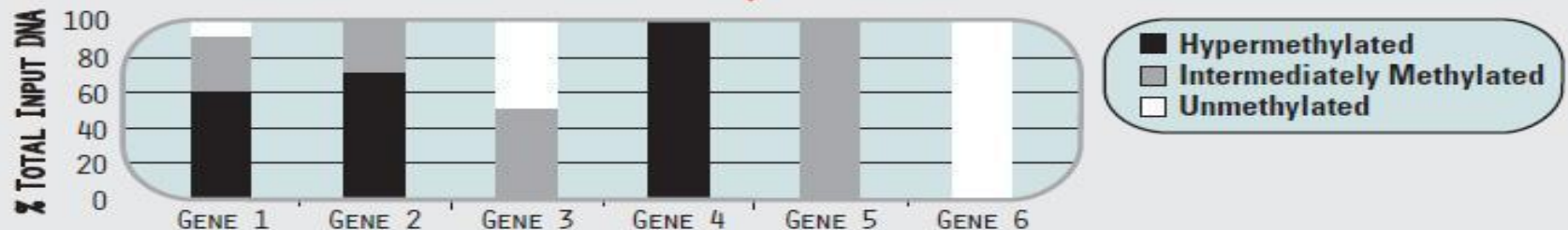
RT² SYBR® Green qPCR Master Mix

2. Real-Time PCR.

Mock
Sensitive
Dependent
Double



3. Data Analysis.



Постгеномная Эра

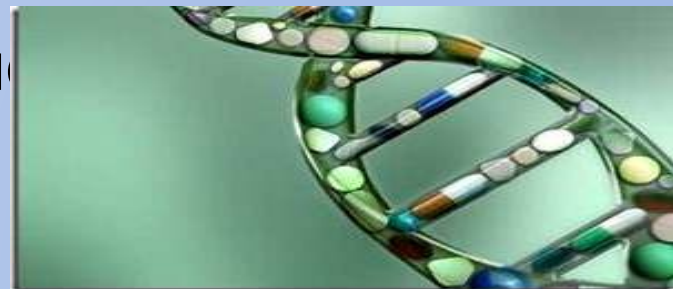
- 26 июня 2000 года было объявлено о расшифровке генома человека.
- На данный момент известны геномы множества организмов.
- Геном человека, других организмов, последовательности отдельных генов находятся в свободном доступе в интернете.
- Коммерческий синтез олигонуклеотидов качественен, быстр и доступен по цене.

Всё это предоставляет современным исследователям
огромное, неизведанное поле для
творчества,

базовыми инструментами в котором являются
ПЦР и секвенирование, в различных

Контроль качества ПЦР

- Проверка соответствия праймеров рекомендуемым параметрам, при их дизайне;
- Подбор стабильного референсного гена;
- Контроль качества и количества выделенной нуклеиновой кислоты;
- Контроль эффективности обратной транскрипции;
- Контроль наличия геномной ДНК в РНК-пробе;
- Отрицательный контроль (загрязнение растворов);
- Контроль параметров E и α ;
- Оценка специфичности ПЦР анализом кривой плавления продукта реакции;
- Калибровка инструментов
нормализация по RO



Рекомендуемые параметры праймеров:

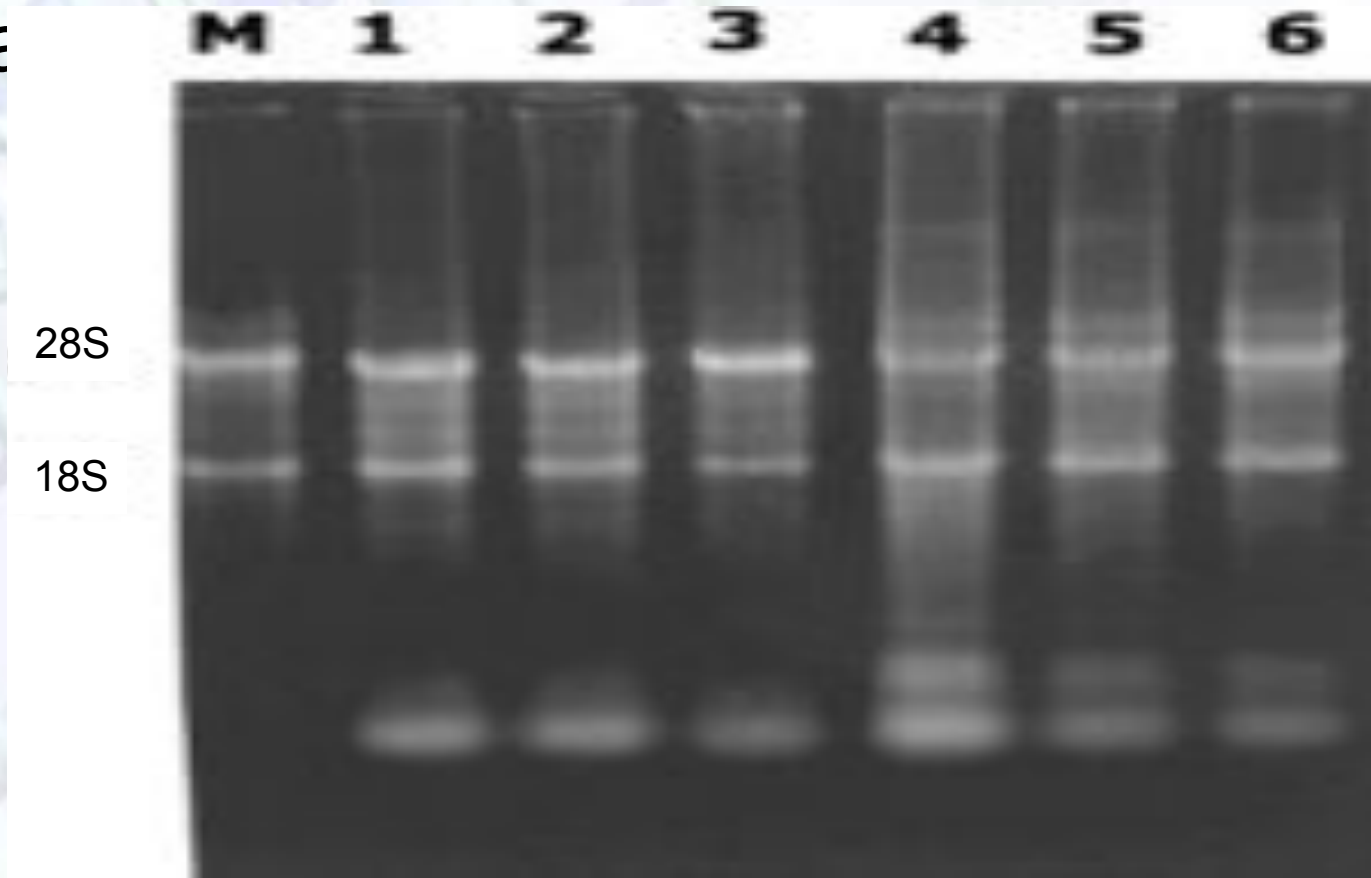
- Длина 18-22 осн.
- Температура плавления 52-60°C
- Содержание GC: 40-60%
- Вторичные структуры:
 - Шпильки: $\Delta G > -2$ ккал/моль на 3'-конце и $\Delta G > -3$ ккал/моль - внутренние
 - Гомодимеры: $\Delta G > -5$ ккал/моль
 - Гетеродимеры: $\Delta G > -5$ ккал/моль

Рекомендуемые параметры праймеров:

- Повторы:
 - не более 4 динуклеотидных повтора
 - Не более 4 одинаковых нуклеотидов подряд
- Повторы:
- Минимум G/C на 3' конце праймеров (не более трех из пяти последних нуклеотидов)
- Отсутствие кросс-гомологичности к другим последовательностям в геноме объекта (проверяется в

Контроль качества выделенной РНК

- Основной критерий – при элеткрофорезе должны быть чётко различимы 18S и 28S субъединицы рибосома



Различия в коэффициентах α

$$F = \alpha N$$

α – это коэффициент пропорциональности между накоплением молекул продукта реакции (N) и увеличением флюоресцентного сигнала (F)

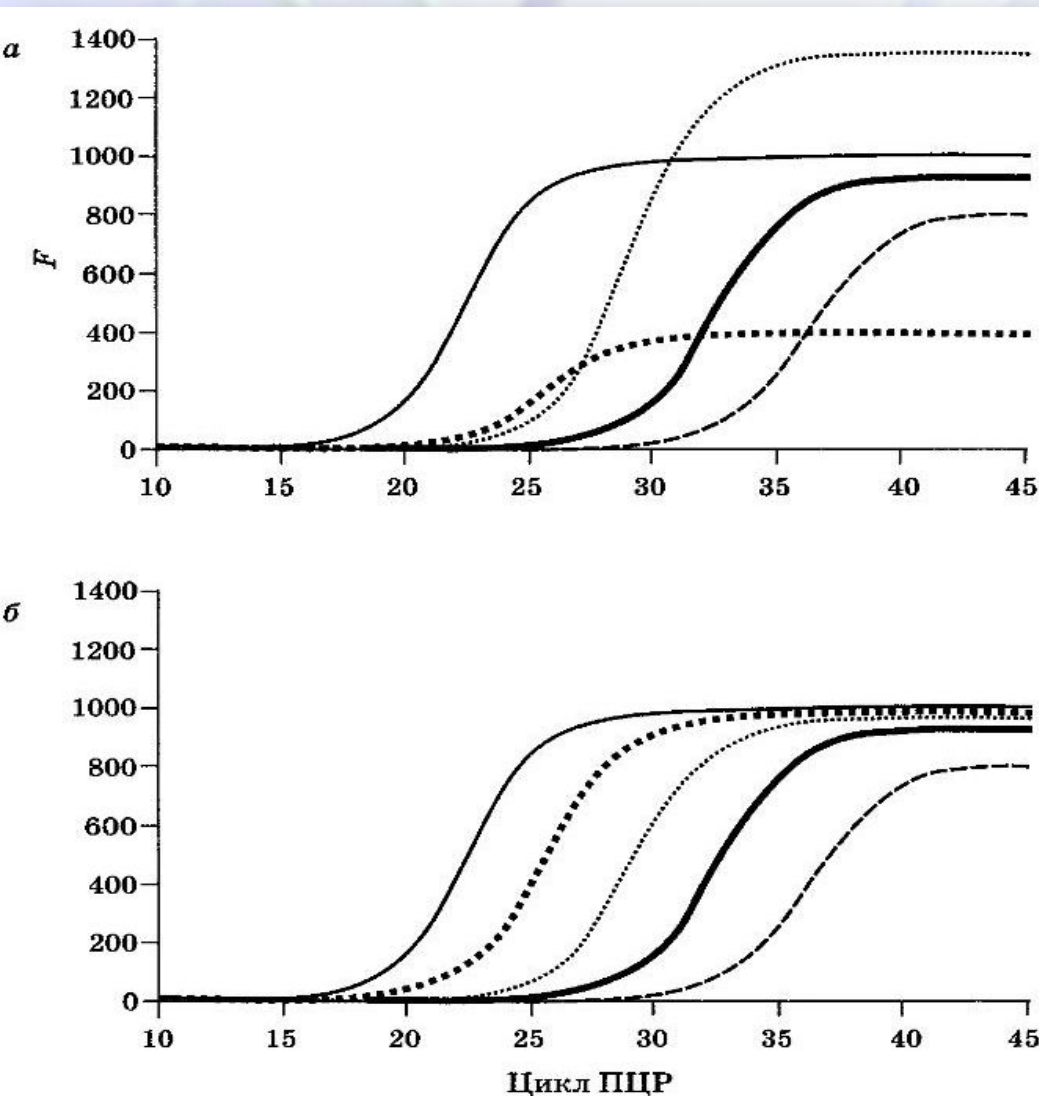


Рис. 7.10. Пример графиков накопления ДНК до (а) и после (б) нормировки коэффициентов α

Переменная и постоянная фоновая флюоресценция



Эффективность реакции

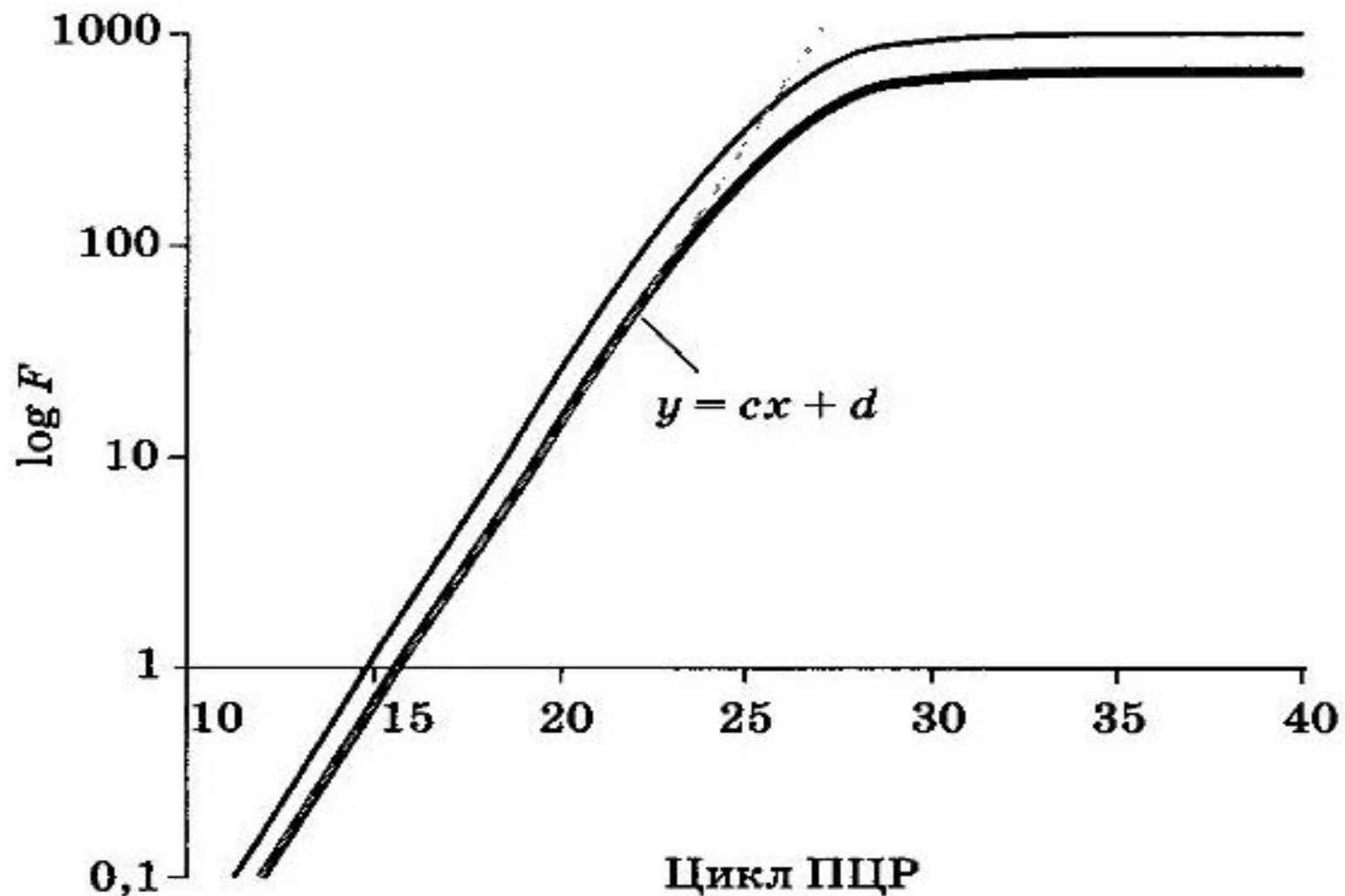


Рис. 7.6. Аппроксимация прямого участка графика накопления ДНК, изображенного в логарифмическом масштабе, в прямую

Оценка специфичности ПЦР анализом кривой плавления продукта реакции

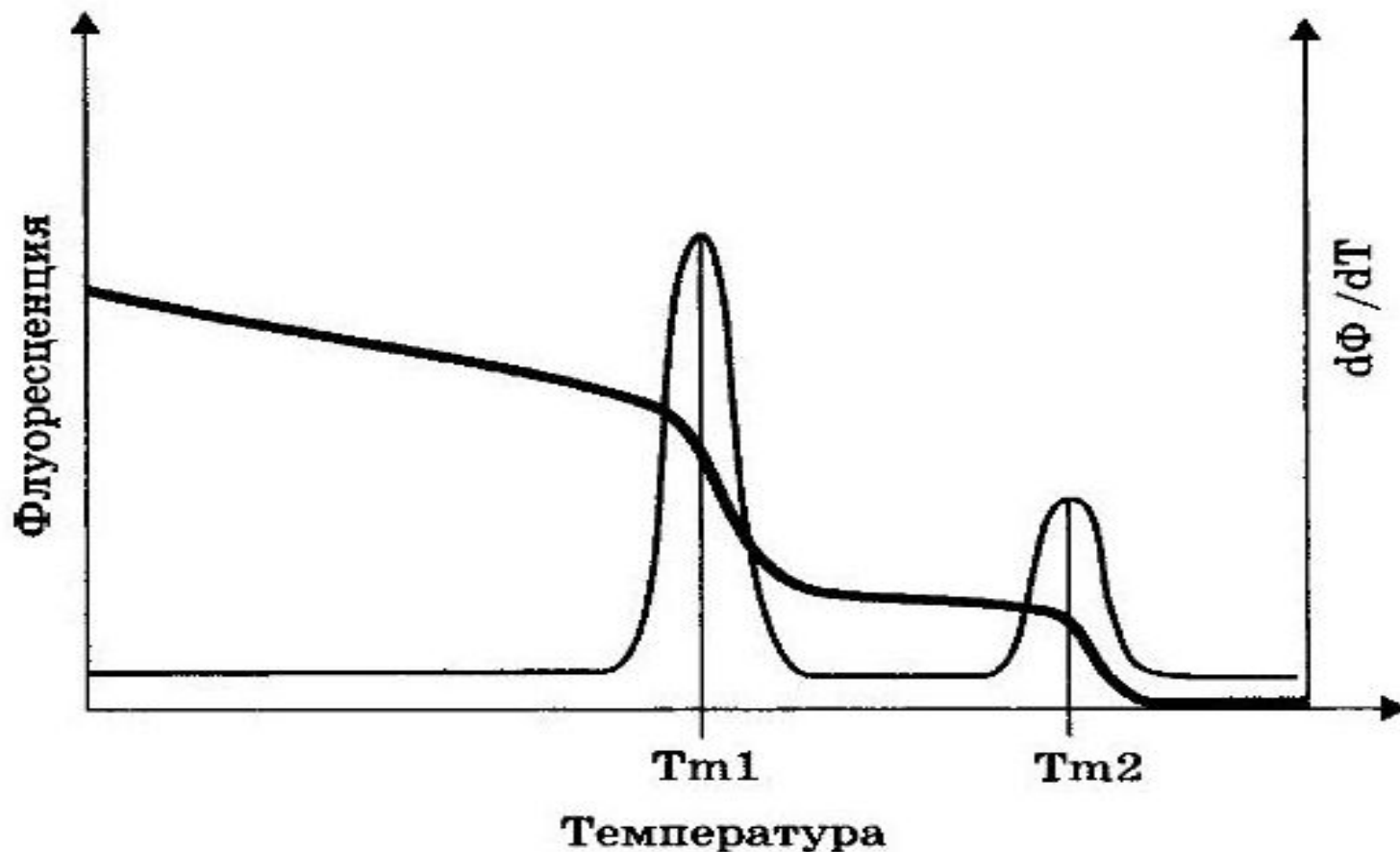


Рис. 4.4. Пример кривой плавления продуктов ПЦР (сплошная линия). Тонкой линией показан график первой производной. Значения максимумов первых производных обычно принимают за температуру плавления ампликонов (T_{m1} и T_{m2})

Analysis of Relative Gene Expression in Real-Time Quantitative PCR and

Kenneth J. Livak* and Thomas D. Schmittgen

*Applied Biosystems, Foster City, California 94404; and †Washington State University, Pullman, Washington 99164

The two most commonly used methods to analyze real-time, quantitative PCR experiments are absolute quantification and relative quantification. Absolute quantification determines the input copy number, usually by relating the P_{CT} to a standard curve. Relative quantification relates the P_{CT} of the target transcript in a treatment group to that of a sample such as an untreated control. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method is a convenient way to analyze the relative changes in gene expression from real-time quantitative PCR experiments. The purpose of this report is to present the derivation, assumptions, and applications of the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. In addition, we present the derivation and applications of two variations of the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method that are useful in the analysis of real-time, quantitative PCR data.

Elsevier Science (USA)

Key Words: reverse transcription polymerase chain reaction; quantitative polymerase chain reaction; relative quantification; real-time polymerase chain reaction; Taq Man.

Reverse transcription combined with the polymerase chain reaction (RT-PCR) has proven to be a useful method to quantify gene expression (1–3). Real-time PCR technology has been adapted to

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

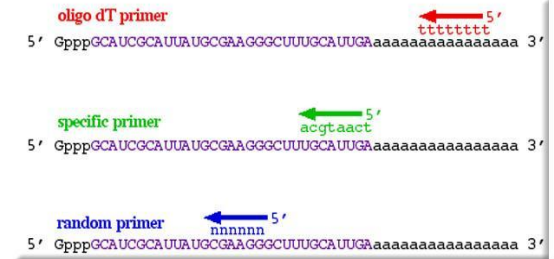
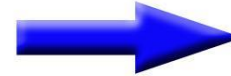
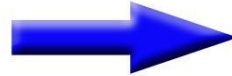


Прикладное применение ПЦР

- Анализ содержания ГМО в продуктах питания;
- Установление отцовства;
- Криминалистика:
 - «Генетические отпечатки пальцев»;
- В медицине:
 - Диагностика наследственных заболеваний;
 - Диагностика инфекционных заболеваний;
 - Контроль эффективности лечения;
 - Персонализированная медицина;

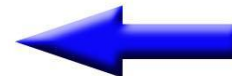


Анализ количества мРНК гена (qRT-PCR)



Тотальная РНК

Обратная транскрипция



Количественный ПЦР

**Комплементарная ДНК
(cDNA)**

Применение

ПЦР:

• КРИМИНАЛИСТИК

А

• УСТАНОВЛЕНИЕ
ОТЦОВСТВА

• МЕДИЦИНСКА
Я

ДИАГНОСТИК

А

• КЛОНИРОВАНИЕ
ГЕНОВ

• МУТАГЕН

ЕЗ



MALDI



microflex

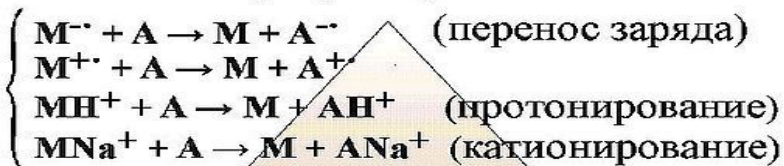


Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

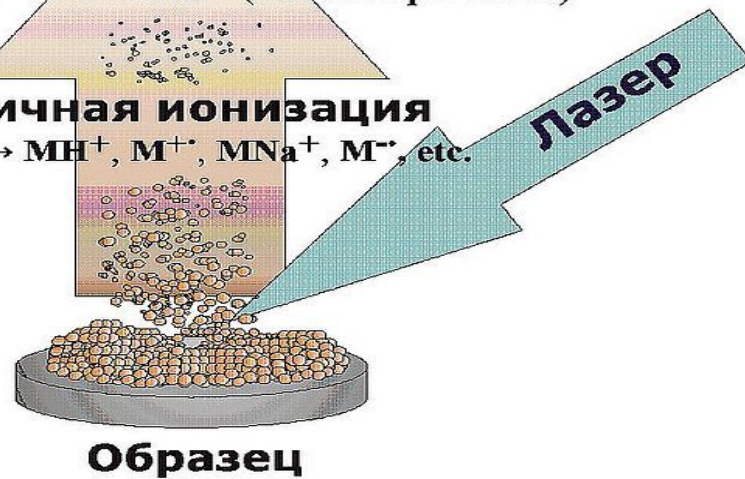
- МАЛДИ — (от англ. MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) — десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом.

Вторичная ионизация

Ион-молекулярные реакции:

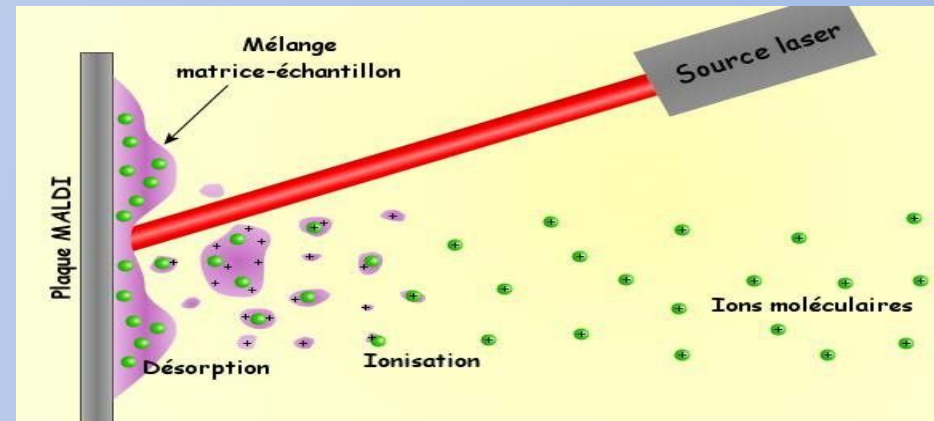
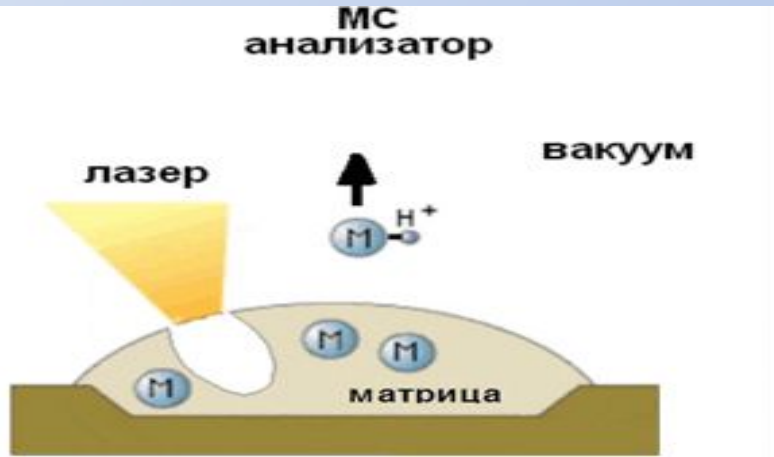


Первичная ионизация



Что такое матрица?

- Матрица представляет собой материал, свойства которого обуславливают понижение деструктивных свойств лазерного излучения и ионизацию анализируемого вещества. МАЛДИ масс-спектрометрия находит своё широкое применение для анализа нелетучих высокомолекулярных соединений (пептиды, белки, углеводы, олигонуклеотиды и др.)



Считается, что вещество, используемое в качестве матрицы, должно отвечать следующим основным требованиям:

- 1) обладать высоким коэффициентом экстинкции при длине волны лазерного излучения;
- 2) иметь способность к ионизации нейтральных молекул анализируемого вещества путём переноса заряда или заряженной частицы;
- 3) обладать хорошей растворимостью в растворителях, применяемых в процессе пробоподготовки;
- 4) быть химически инертным по отношению к анализируемому веществу;
- 5) иметь низкую летучесть и термическую устойчивость.

Примеры МАЛДИ матриц

Название	Английское название (аббревиатура)	Растворители для матрицы	Типы исследуемых веществ
2,5-Дигидроксibenзойная кислота	2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHB)	Вода, этанол, метанол, ацетон, ацетонитрил, хлороформ, тетрагидрофуран	Пептиды, олигонуклеотиды, полисахариды, синтетические полимеры
2-(4-Гидроксифенилазо)-бензойная кислота	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)	Диоксан, ацетон, тетрагидрофуран, диметилформамид	Пептиды, белки, синтетические полимеры
α -циано-4-гидроксикоричная кислота	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Ацетон, водн. ацетонитрил, ТГФ, ДМФА, этанол	Пептиды, синтетические полимеры
Синапиновая кислота	Sinapic Acid	ТГФ, ДМФА	Пептиды, белки, липиды
Феруловая кислота	Ferulic Acid	ТГФ, ДМФА	Пептиды, белки
1,8,9-Антрацентриол	1,8,9-anthracentriol(Dithranol)	ТГФ, ДМФА, толуол, хлороформ, хлорбензол	Синтетические полимеры, липиды



Немного истории

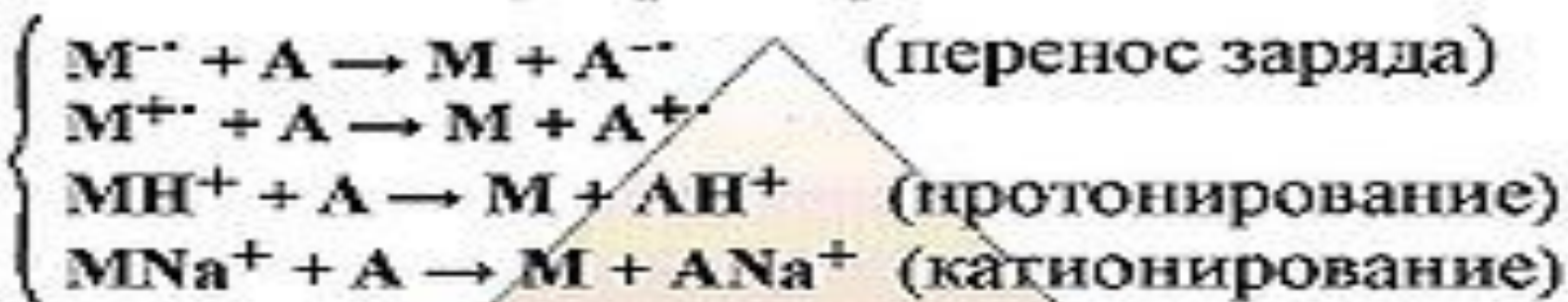


Коити Танака со
своей женой

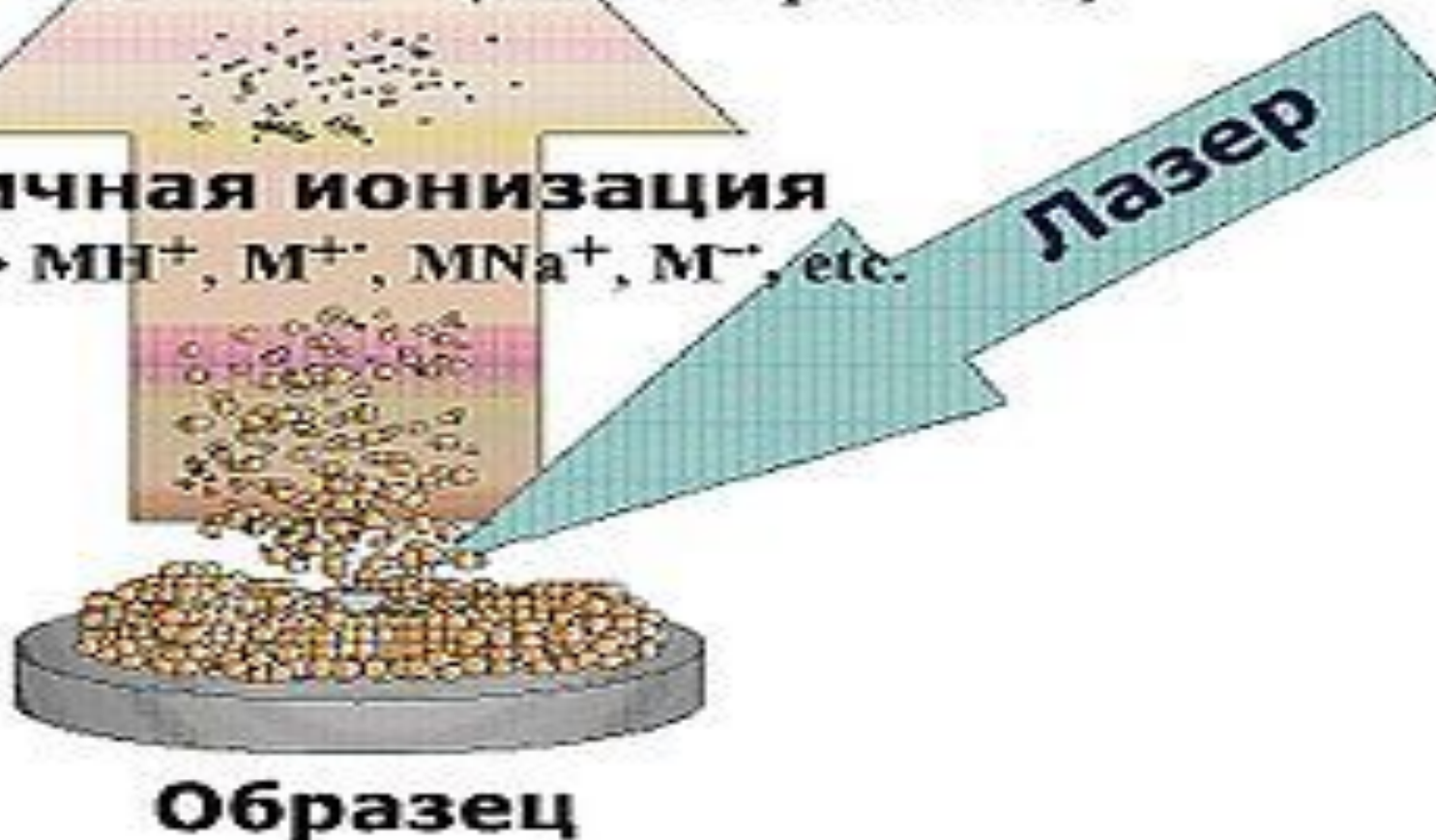
Впервые возможность применения матрицы для подавления фрагментации при анализе нелетучих органических соединений на примере белков и пептидов была продемонстрирована в 1987 году группой ученых в Германии (М. Karas and F. Hillenkamp). За открытие метода МАЛДИ японский инженер Коити Танака известной японской приборостроительной корпорации Shimadzu получил в 2002 году Нобелевскую премию.

Вторичная ионизация

Ион-молекулярные реакции:



Первичная ионизация



Схематическое представление механизма МАЛДИ

Механизм ионизации

- При облучении лазером с длительностью импульса несколько наносекунд и высокими величинами интенсивности излучения ($10^6 — 10^7$ Вт/см²) из образца, представляющего собой твердый раствор или смесь анализируемого вещества и матрицы, происходит выброс материала в виде микрочастиц. Такие частицы могут достигать размеров несколько сотен микрометров. Над поверхностью образца возникает область высокого локального давления — так называемый факел (от англ. *plume* — факел, шлейф, султан), который преимущественно состоит из нейтральных частиц. Вместе с тем, в нем присутствуют и заряженные частицы, доля которых по разным оценкам составляет $10^{-5}—10^{-3}$ от полного числа всех частиц. На начальном этапе образования факела его плотность близка к плотности вещества в конденсированном состоянии.
- С расширением факела (в первые наносекунды) происходит распад конгломератов вплоть до образования отдельных молекул или их фрагментов, а также заряженных (преимущественно матричных) частиц. Ионизацию молекул, происходящую непосредственно при выбросе материала из конденсированного состояния, принято рассматривать как *первичную*.
- В расширяющемся факеле происходят непрерывные соударения между частицами, в том числе возможны ион-молекулярные реакции между матричными заряженными частицами и молекулами анализируемого вещества, которые приводят к ионизации последнего. Такого рода ионизацию относят к *вторичной*.

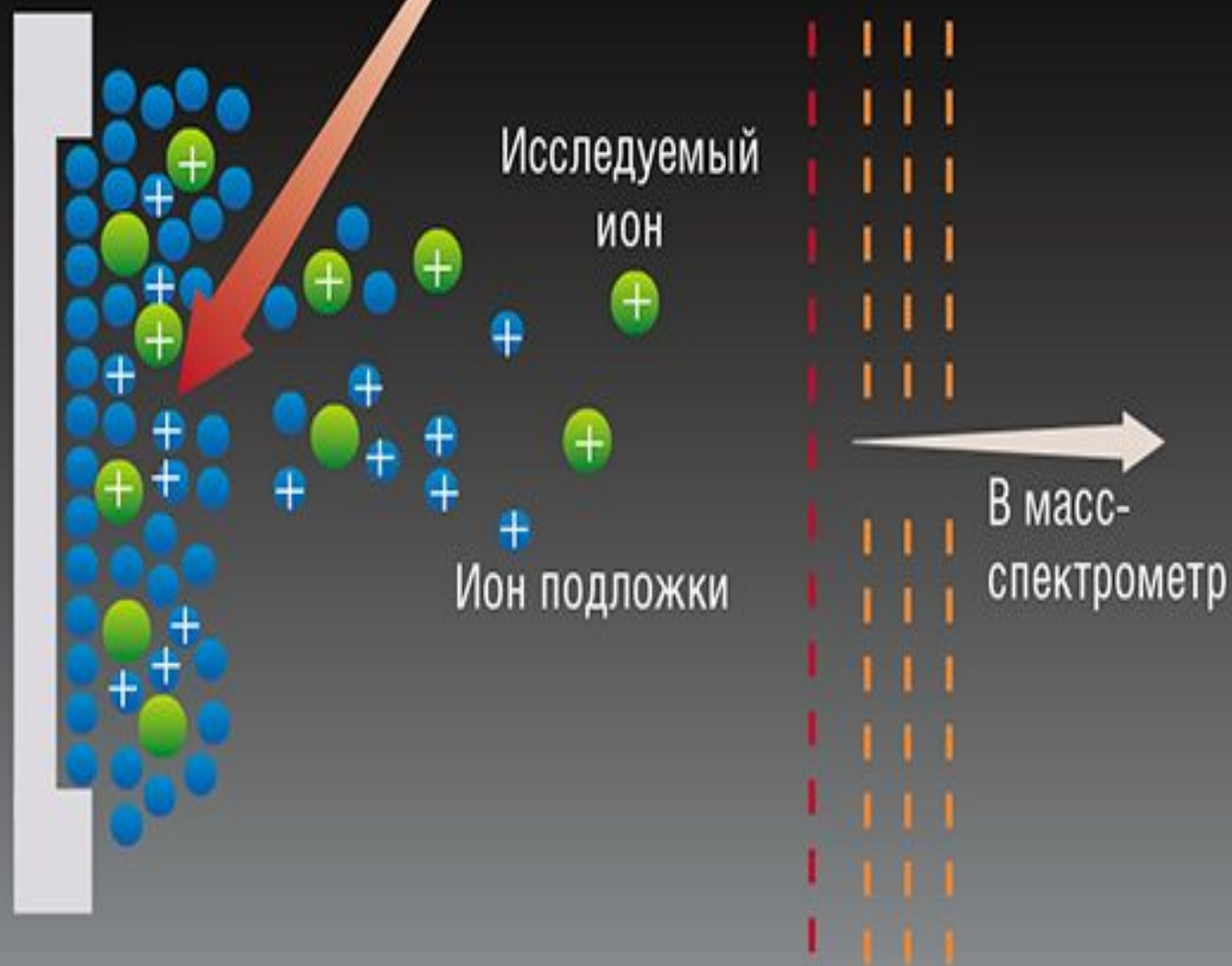
Применение MALDI

Диапазон применения МАЛДИ достаточно широк и охватывает многие классы химических соединений:

1. Биоорганические соединения (пептиды, белки, олигонуклеотиды, олигосахариды и т. п.);
2. Синтетические полимеры;
3. Органические комплексные соединения;
4. Высокомолекулярные материалы;
5. Синтетические дендримеры;
6. Фуллерены и др.

Лазерный импульс

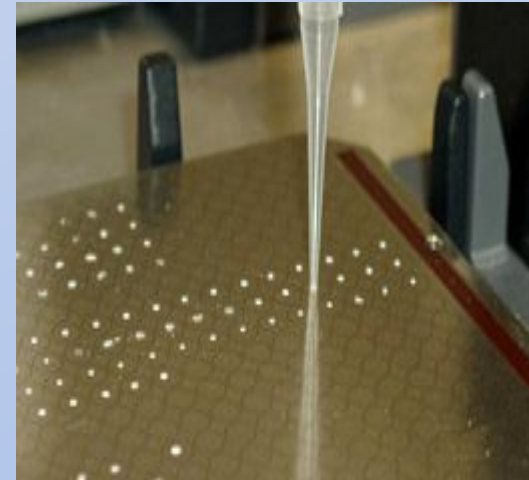
Ионная оптика: пластины с
ускоряющим напряжением



МАЛДИ масс-спектрометрия в медицине

С конца 2000-х технология MALDI-TOF начала применяться в практической медицине для быстрой идентификации видовой принадлежности.

Идентификация микроорганизмов основывалась на получении общего масс-спектра белков в диапазоне 1000-10000 Да и биоинформационного сравнения полученного спектра с базой данных референсных спектров.



Применение метода позволило значительно сократить затраты и время бактериологического анализа и увеличить его точность.

Система получила широкое распространение в мире. На начало 2015 года в мире используется более 1500 систем MALDI Biotyper. В России установлено более 80 систем.



Спасибо за внимание!

