ПЦР

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia

ВСТУПЛЕНИЕ

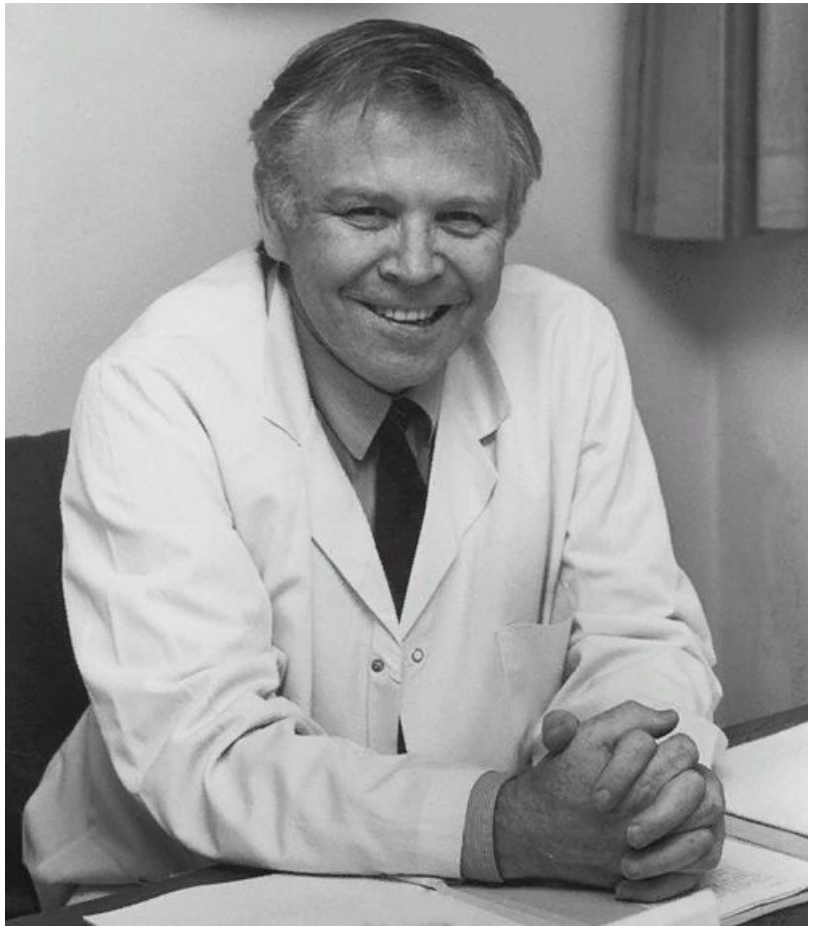
- Полимеразная цепная реакция почти для каждого из нас стала обыденностью, даже если этот каждый никогда и слов таких не слышал. Медицинские центры наперебой предлагают диагностировать у вас все мыслимые болезни с помощью «ПЦР-анализа». Но задумывались ли вы о том, что это за анализ? как там всё работает? для чего применяют ПЦР? Нет? А мы вам всё равно об этом расскажем...

ОТКРЫТИЕ ПОЛИМЕРА

- 1957 г. Американец Артур Корнберг впервые выделил из бактерий Escherichia coli фермент, который назвал ДНК-полимеразой. Статьи с описанием работы он отправил в Journal of Biological Chemistry, где их отвергли... из-за названия фермента: рецензенты считали, что нужно использовать более точный термин «полидезоксирибонуклеотидполимераза». Однако в 1958 году в журнале сменился главный редактор, и статьи наконец увидели свет. А уже в 1959 году Артура Корнберга удостоили Нобелевской премии по физиологии и медицине.

МЕТОДИКА СИНТЕЗА ПРАЙМЕРОВ

- 1971 г. Норвежский биохимик Хьелль Клеппе предложил метод, очень похожий на ПЦР. С 1968 по 1970 годы Клеппе работал в Университете Висконсина, в лаборатории Хара Гобинда Кораны — нобелевского лауреата 1968 года за расшифровку генетического кода. Именно в лаборатории знаменитого индийца чуть раньше разработали методики синтеза олигонуклеотидных **праймеров** — «затравок», необходимых для работы ДНК-полимеразы.



АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНОВ

- 1983 г. Руководитель лаборатории синтеза ДНК в Cetus Corporation (США) Кэри Мюллис апрельской ночью ехал вдоль побережья из Сан-Франциско в Мендосино, в свой загородный дом. И тут (по словам Мюллиса) его озарило: он ясно представил процесс амплификации (преумножения) генов, который позже получит название полимеразной цепной реакции.
- В 1993 году Кэри Мюллис стал лауреатом Нобелевской премии по химии за изобретение ПЦР. Его награждение — до сих пор больной вопрос для норвежского научного сообщества, где первооткрывателем метода считают Хьелля Клеппе.

1957 1971 1983 1988 1992 1993

1957

Американец Артур Корнберг выделил из бактерий *Escherichia coli* фермент ДНК-полимеразу.

1971

Норвежец Хьелль Клеппе опубликовал в *Journal of Molecular Biology* статью, в которой описал метод, очень похожий на ПЦР.

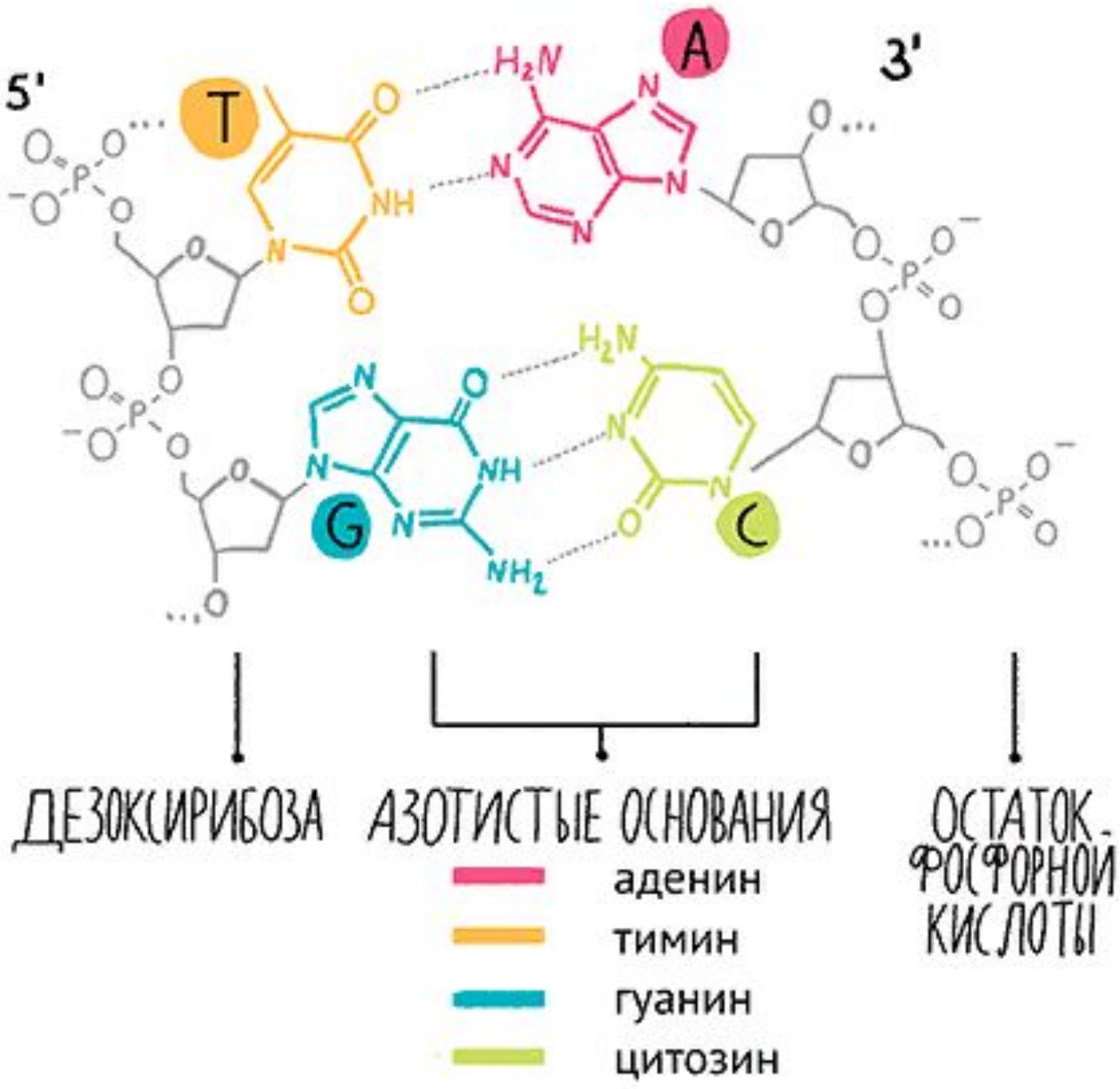
1983

Американец Кэри Мюллис изобрел и протестировал метод ПЦР.

1988

Первое упоминание о ПЦР с обратной транскрипцией в журнале *Science*.

3'
5'


5'
3'
T
A
G
C
ДЕЗОКСИРИБОЗА
АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ
ОСТАТОК ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ
аденин
тимин
гуанин
цитозин

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ - 1

- Анализируемая ДНК. Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазмида, хромосома или геном клетки полностью. Для грубой оценки сойдет даже суспензия клеток. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка.

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ - 2

- **Праймеры -** искусственно синтезированные короткие цепочки нуклеотидов (15–30 штук), комплементарные выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3´- и 5´-концы.

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ - 3

- Нуклеотиды. А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты — четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ.

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ -4

- ДНК-полимераза. Фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3´-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: Thermus aquaticus (Taq-полимераза), Pyrococcus furiosus (Pfu-полимераза) и Pyrococcus woesei (Pwo-полимераза). Первая — самая производительная, а две другие — более точные.

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ - 5

- Буфер. Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного pH, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер — ДМСО (диметилсульфоксид), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.

ДНК

ПРАЙМЕРЫ

НУКЛЕОТИДЫ

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА

РАСТВОР

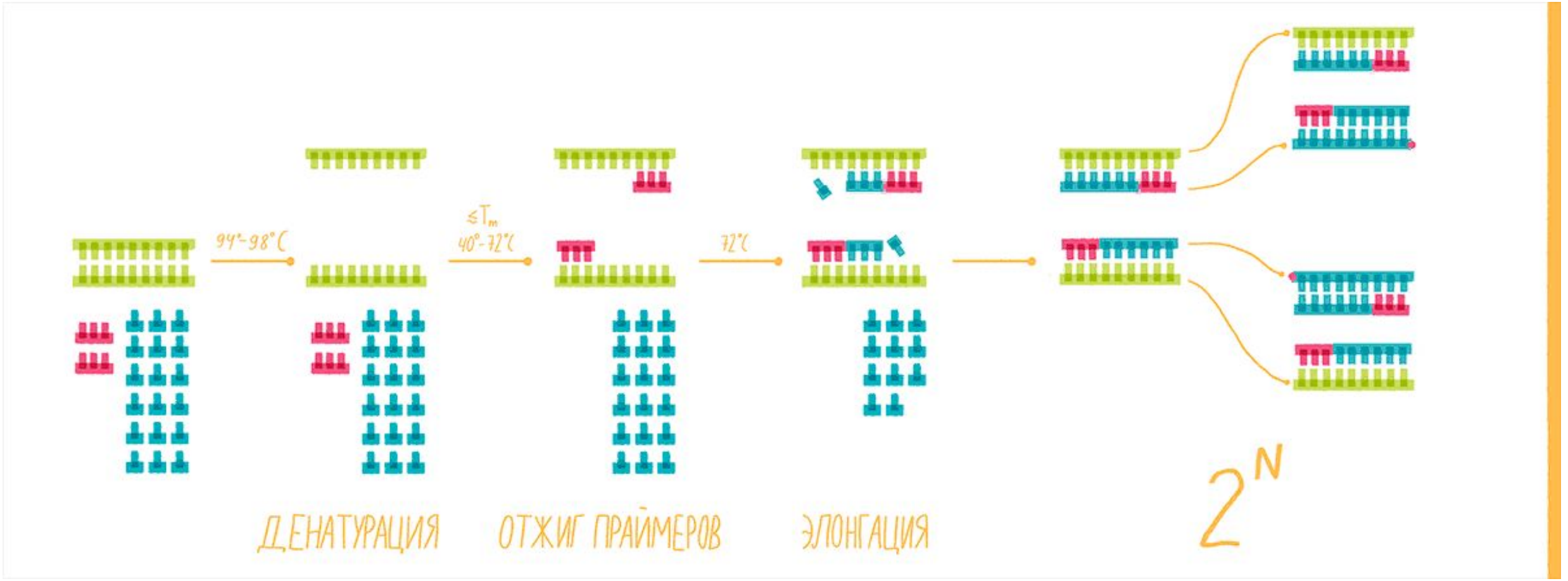
КАК ПРОВЕСТИ ПЦР

- Все компоненты смешивают в нужном объеме деионизованной воды в специальных пробирках для ПЦР и помещают в амплификатор (или ПЦР-циклер).

б

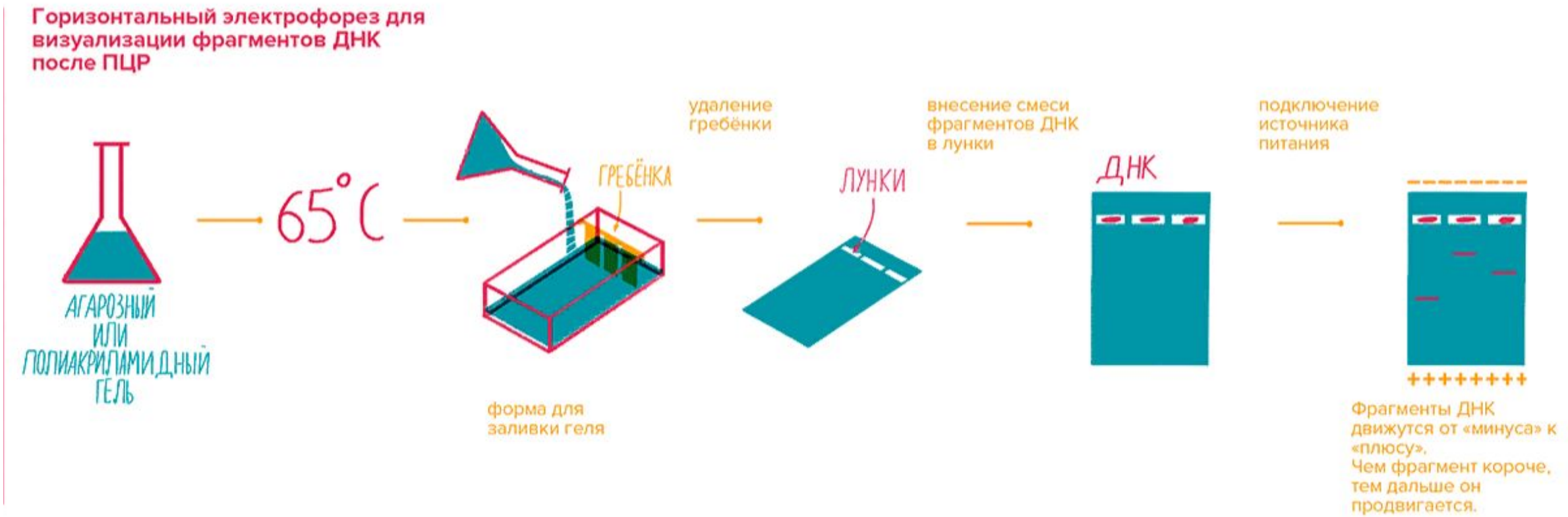
ЦЕЛЬ ПЦР

- Цель ПЦР — получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определенной длины (обычно не более 2–3 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.). Для этого проводят 20–30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из трех этапов.

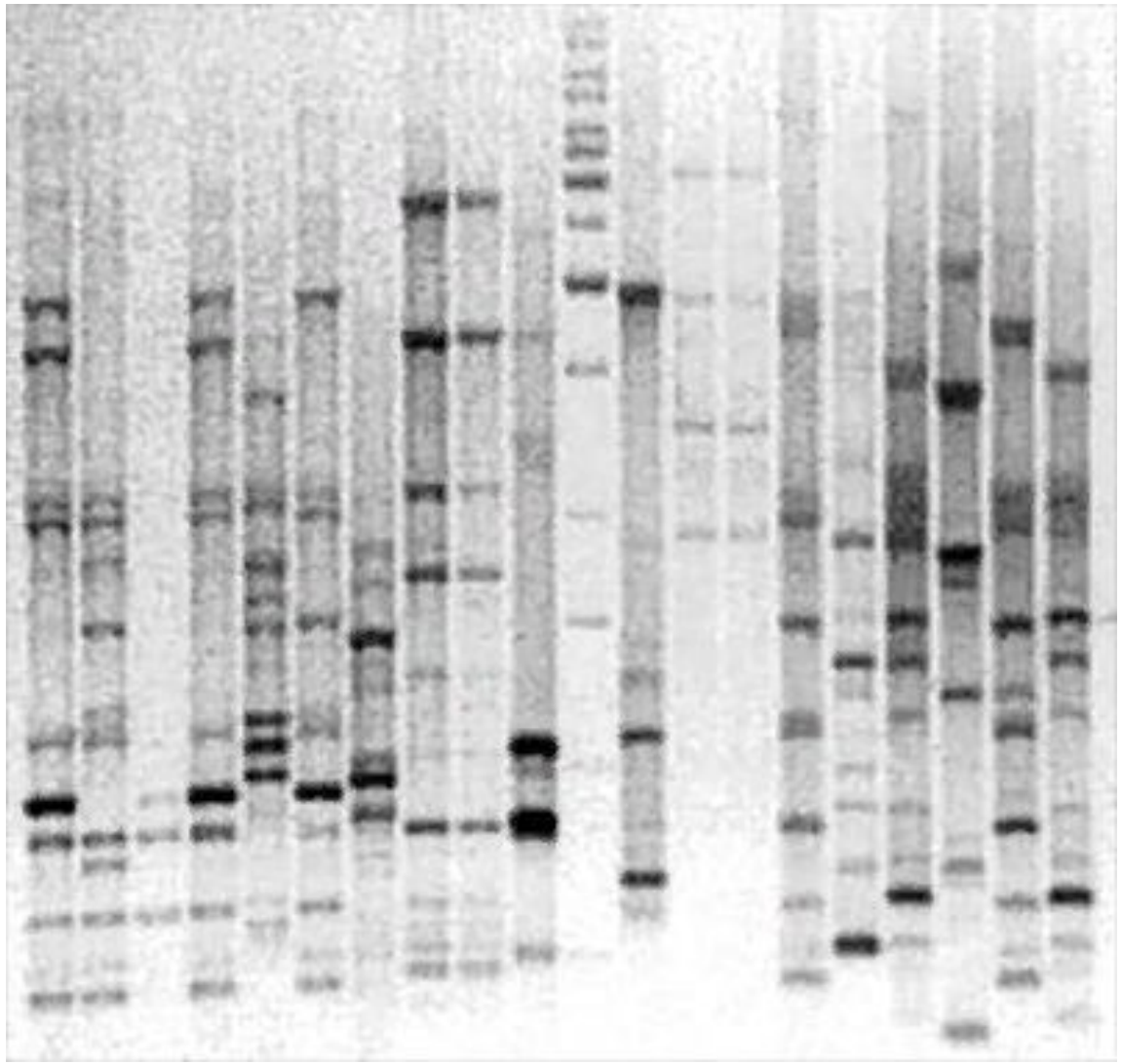

94°-98°C
≤Tm
40°-72°C
72°C
2N
ДЕНАТУРАЦИЯ
ОТЖИГ ПРАЙМЕРОВ
ЭЛОНГАЦИЯ

ЧТО В РЕЗУЛЬТАТЕ?

- Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально. После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив» можно увидеть невооруженным глазом — проведя гель-электрофорез.



У ДНК отрицательный электрозаряд, а потому она притягивается к положительному полюсу и меняет цвет, проходя через краситель — становится яркой. Если в изучаемом материале комплементарные праймеру участки отсутствуют, то и первые цепочки ДНК не будут выстроены, поскольку праймеру не за что будет зацепиться, чтобы выстроить двойную цепь. Следовательно, электрофорез ничего не сможет показать, цвета не будет.

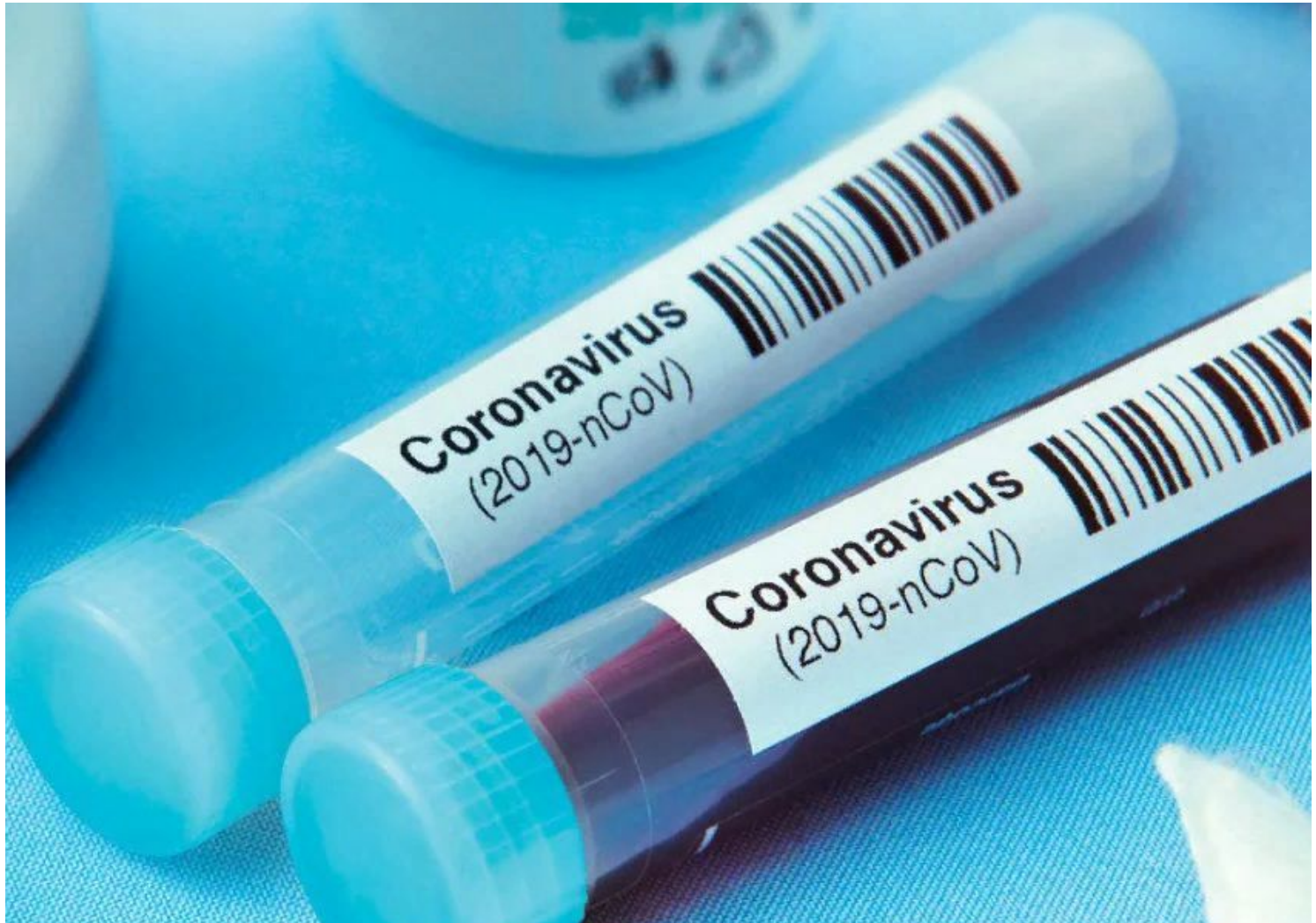


Метод BOX-ПЦР — один из видов геномной дактилоскопии. Он обладает высокой разрешающей способностью, позволяя различать бактерии на уровне штаммов: картина распределения амплифицированных фрагментов в геле уникальна для каждого штамма. Вертикальные дорожки — отдельные пробы, соответствующие разным бактериальным штаммам; горизонтальные полоски на каждой дорожке — фрагменты ДНК разной длины.

Полимеразная цепная реакция может идти исключительно на матрице ДНК, поэтому если у экспериментатора есть мРНК (матричная РНК, на основе которой строятся клеточные белки), то сначала ее надо как-то «переписать» в ДНК. Для этого применяют реакцию обратной транскрипции, в которой фермент обратная транскриптаза по матрице РНК строит комплементарную ДНК (кДНК). А потом с этой ДНК проводят обычную ПЦР, как описано выше.

ЗАДАЧКА ПРО ВИРУС – ВСЕ ВЕРНО?

- Коронавирус относится к РНК-содержащим
- Для анализа берут мазок из зева или кровь из вены



ЗАДАЧКА ПРО ВИРУС – ВСЕ ВЕРНО?

- Дублей может быть до 45. После этого снова расщепляют полимеразные цепочки. В этот момент на стадии обратного преобразования ДНК в РНК выявляют SARS-CoV-2 или другой вирус, который необходимо было обнаружить. Для этого применяют электрофорез, т. к. благодаря ему можно увидеть все размноженные копии ДНК.