



ПЦР

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

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

ВСТУПЛЕНИЕ

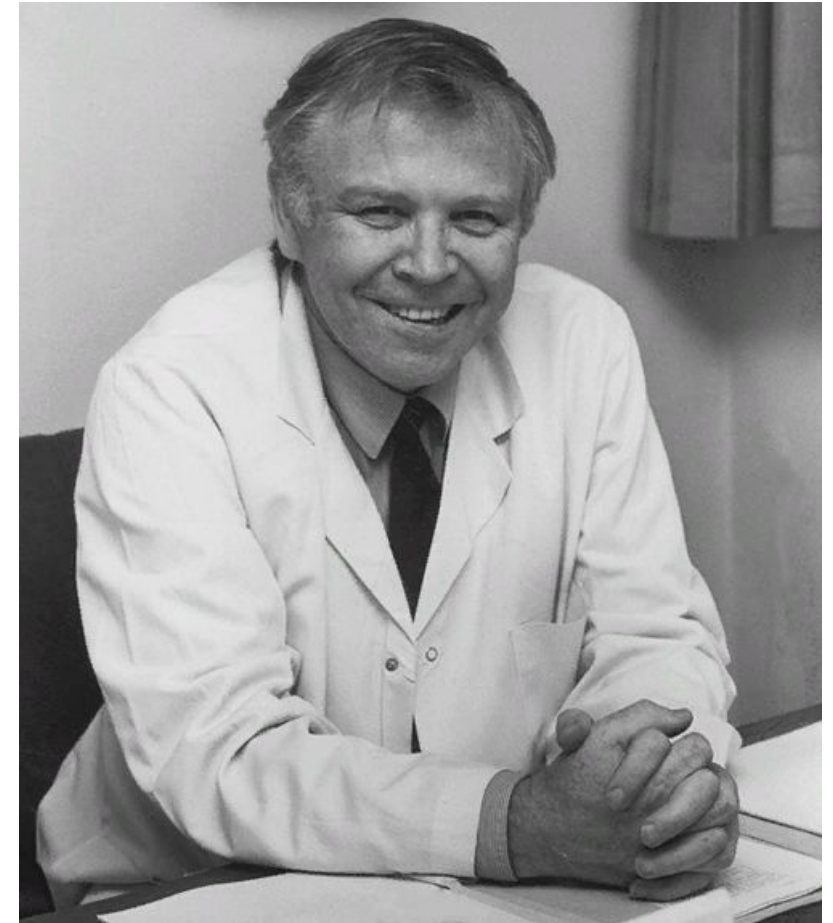
- Полимеразная цепная реакция почти для каждого из нас стала обыденностью, даже если этот каждый никогда и слов таких не слышал. Медицинские центры наперебой предлагают диагностировать у вас все мыслимые болезни с помощью «ПЦР-анализа». Но задумывались ли вы о том, что это за анализ? как там всё работает?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



1957

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

1971

1971

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

1983



1983

Американец Кэри Мюллис изобрел и протестировал метод ПЦР.

1988

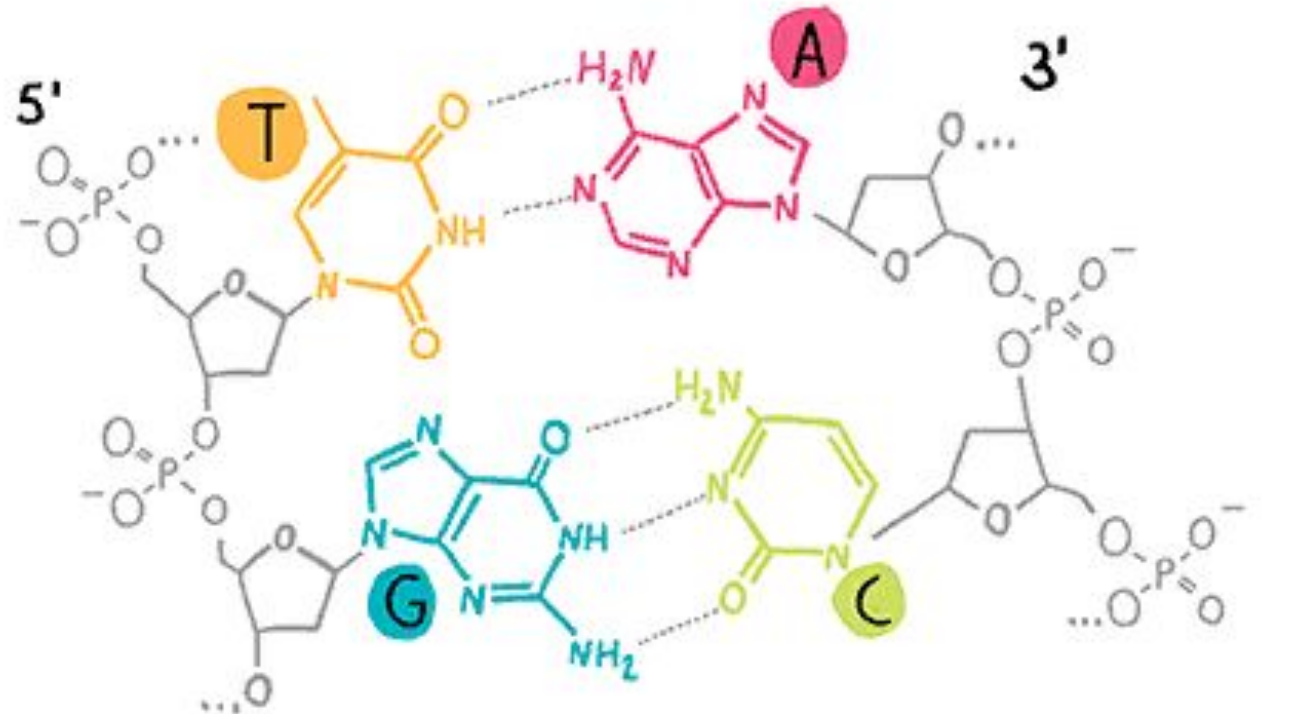


1988

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

1992

1993



ДЕЗОКСИРИБОЗА

АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ

ОСТАТОК
ФОСФОРНОЙ
КИСЛОТЫ

- аденин
- тимин
- гуанин
- цитозин

КОМПОНЕНТ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ - I

- **Анализируемая ДНК.** Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, 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), *Pyrrococcus furiosus* (Pfu-полимераза) и *Pyrrococcus 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).

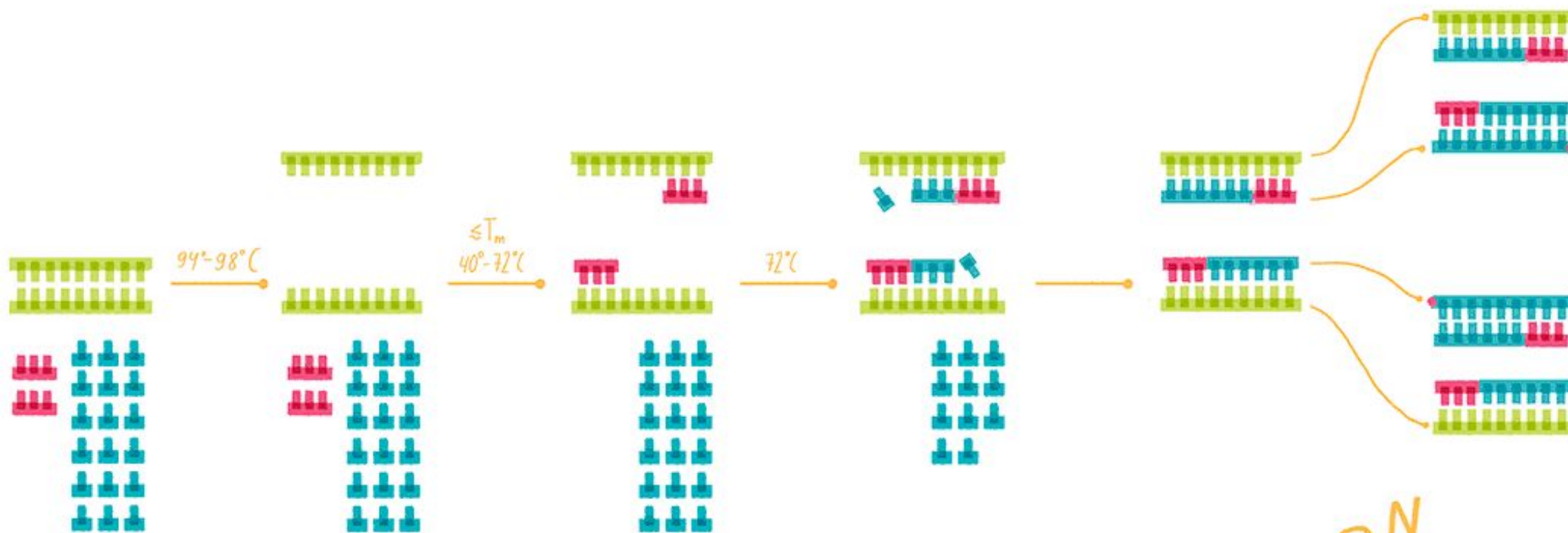


б



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.



ДЕНАТУРАЦИЯ

ОТЖИГ ПРАЙМЕРОВ

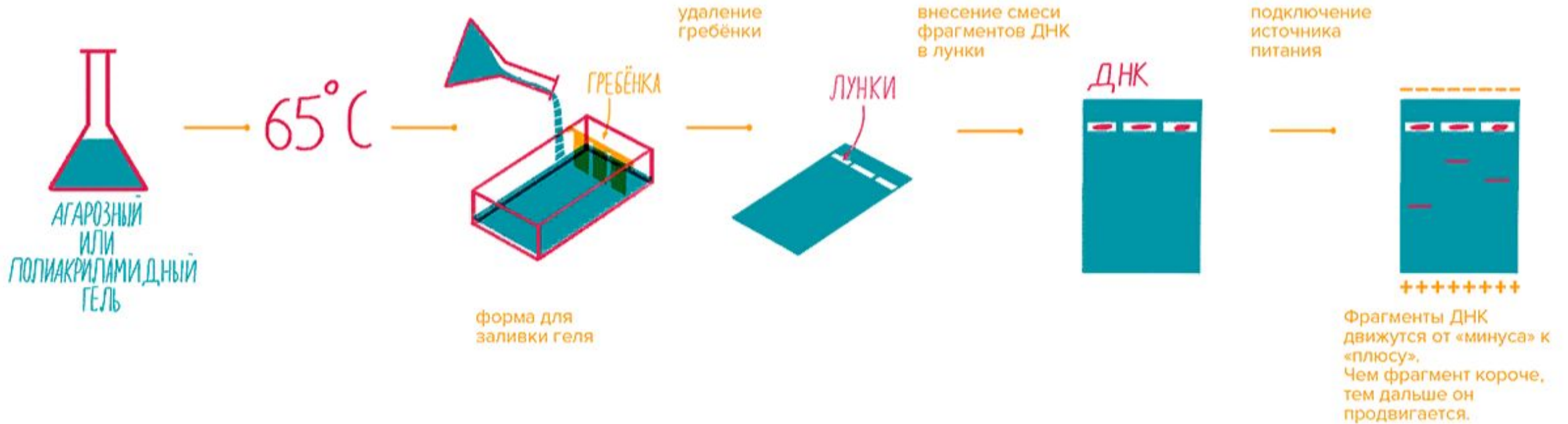
ЭЛОНГАЦИЯ

$$2^N$$

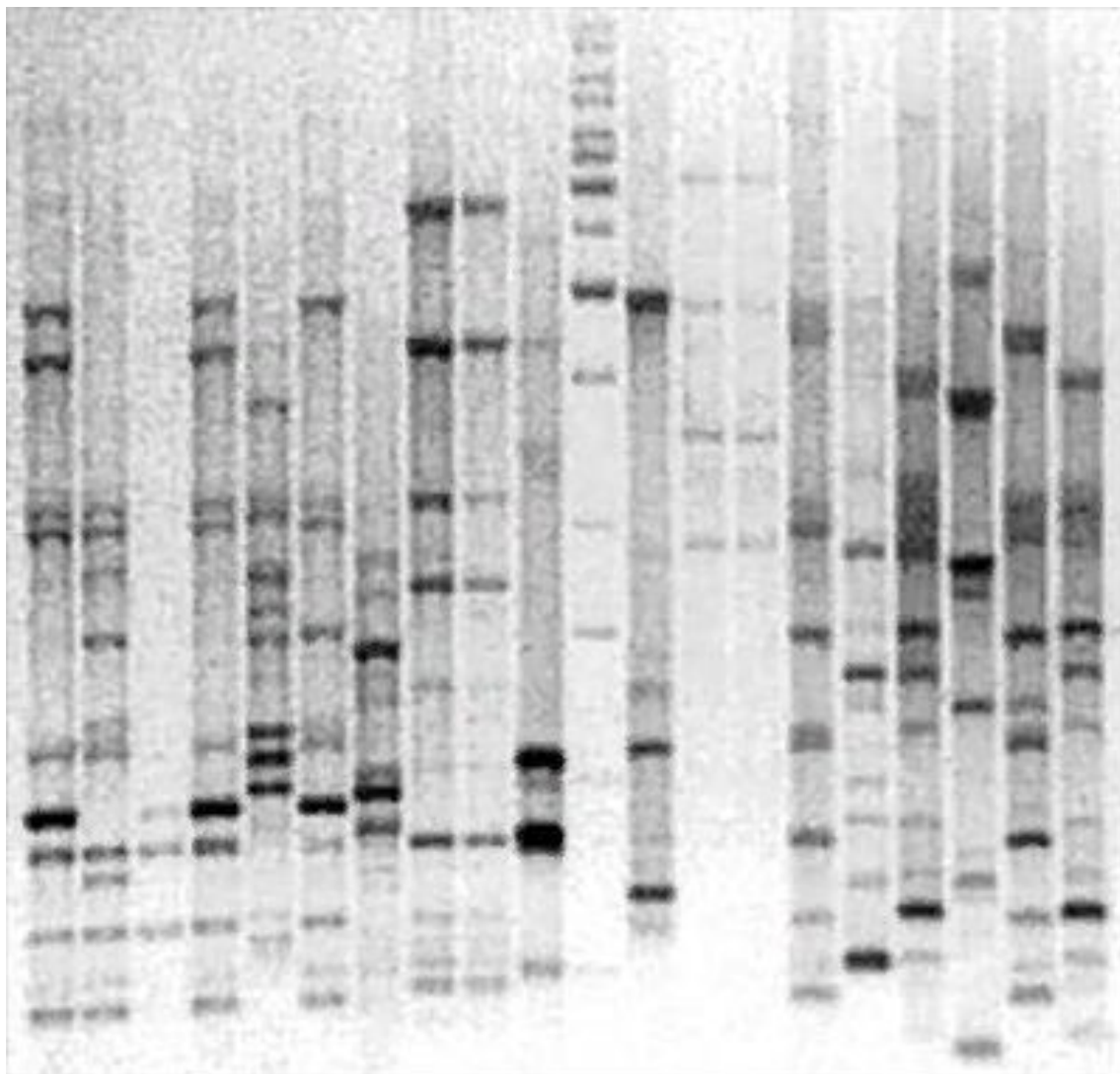
ЧТО В РЕЗУЛЬТАТЕ?

- 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.

Горизонтальный электрофорез для визуализации фрагментов ДНК после ПЦР



У ДНК отрицательный заряд, 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 ВОХ-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 полосы 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.