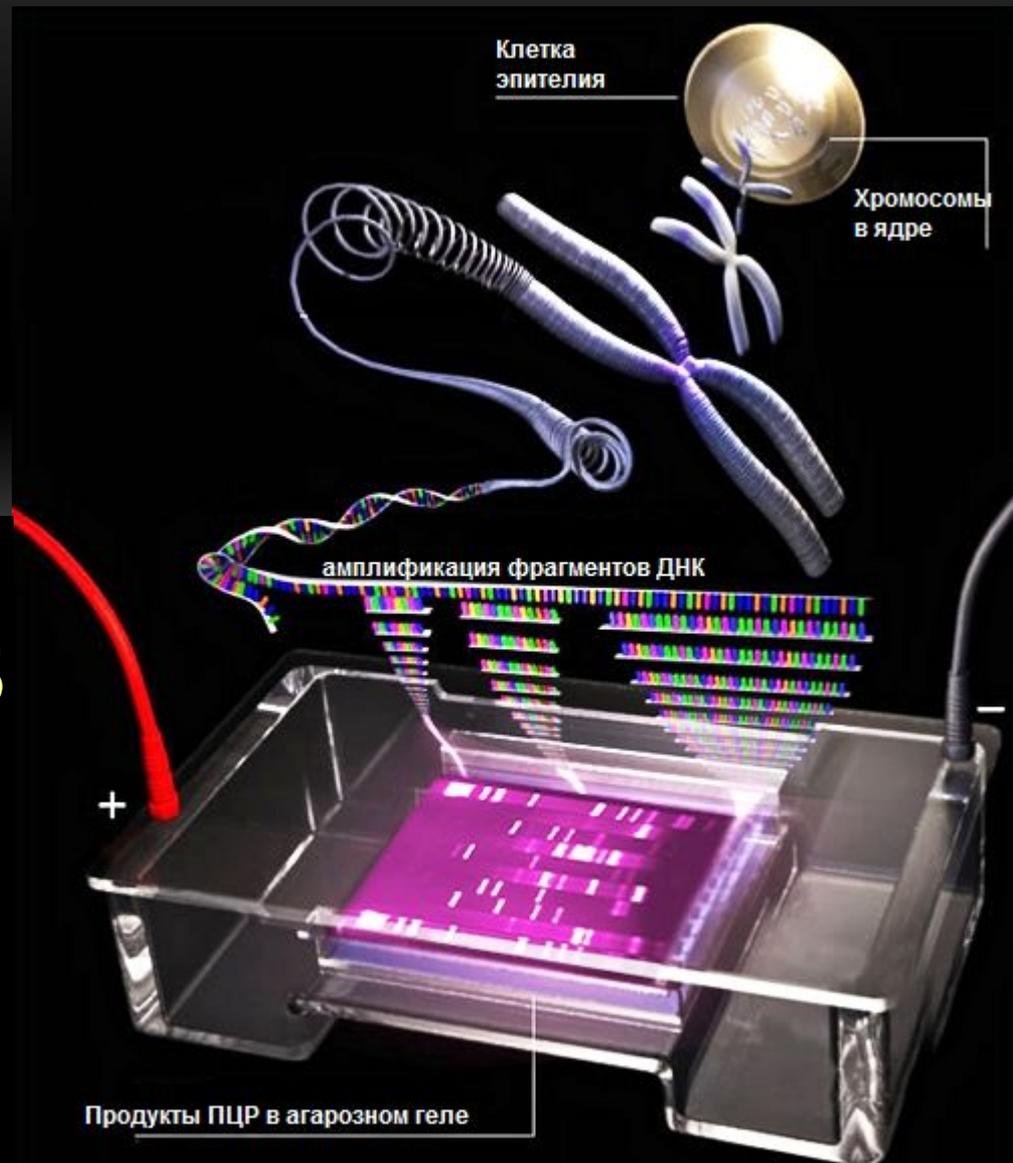


ПОЛИМЕРАЗНА Я ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ПЦР- ПРОДУКТОВ



План лекции

1. Общие сведения о ПЦР
2. Применение ПЦР
3. Стадии проведения ПЦР анализа
4. MasterMix и обзор некоторых его компонентов
 - Матрица
 - Праймеры
 - ДНК-полимеразы
5. Амплификаторы и требования к лабораториям
6. Условия проведения ПЦР
7. Схема ПЦР
8. Разновидности ПЦР
9. Особенности количественной ПЦР в реальном времени
10. Способы детекции результатов ПЦР
 - Гель-электрофорез

- **ПЦР** – **полимеразная цепная реакция**, [греч. polymeres — состоящий из многих частей, многообразный; лат. re- — приставка, обозначающая повторность действия, и actio — действие] — ферментативная реакция, осуществляемая *in vitro* с помощью термостабильной ДНК-полимеразы на матрице ДНК с использованием олигонуклеотидных ДНК-затравок (праймеров), комплементарных нуклеотидным последовательностям противоположных цепей ДНК на границах амплифицируемого участка
- **Амплификация** – увеличение числа копий ДНК
- **Ампликоны** – продукты ПЦР, синтезируемые в процессе амплификации копии ДНК-мишени
- **Отжиг** – присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени

Полимеразная цепная реакция

- ПЦР, *polymerase chain reaction* - PCR
- 1983 г. К. Мюллис (*Kary Mullis*, 1993 г. – Нобелевская премия по химии)
- в основе – принципы и механизмы естественной репликации ДНК
- позволяет амплифицировать (многократно увеличить количество копий, клонировать) *in vitro* фрагмент ДНК с известной последовательностью нуклеотидов
- амплификатор, термоциклер

Применение ПЦР

Используется:

- ◆ в диагностике инфекционных заболеваний
 - ◆ для определения генотипа организма
 - ◆ для изучения экспрессии генов и сравнения экспрессии разных аллелей
 - ◆ для идентификации личности
 - ◆ для установления родственных связей
 - ◆ в ветеринарии
 - ◆ в экспертизе продуктов питания
 - ◆ в молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследованиях (создание рекомбинантных ДНК, исследование мутагенеза клонированной ДНК, гибридизация с аллель-специфическими зондами и т.д.)
- с помощью ПЦР удалось амплифицировать фрагменты мтхДНК из ископаемых останков мозга человека возраста 7 тысяч лет

Стадии проведения ПЦР - анализа

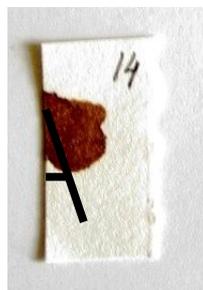
- 1. Выделение генетического материала из клинического образца
- 2. Амплификация специфического фрагмента ДНК
- 3. Детекция продуктов амплификации

MasterMix

- праймер R
- праймер L
- буфер 10x
- смесь dNTP
- матрица (ДНК)
- вода деионизированная
- ДНК-полимераза (Taq-полимераза)
- вазелиновое масло (?)

Общий объем 25-100 мкл

пригоден минимально обработанный исходный биологический материал, даже частично разрушенный (цельная кровь, пятна высохшей крови, смывы из ротовой полости, старые срезы тканей и т. д.)



Праймеры

- длина 18-30 п.н. (ДНК!)
- GC-состав $\approx 40\text{—}60\%$
- R- и L-праймеры не должны быть комплементарны друг другу
- t отжига более 55°C и менее 60°C желательно
- отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров
- 3'-конец - G или C, т.к. они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной

Полимеразы для ПЦР

- Taq – полимераза (*Thermus aquaticus*, обитают в горячих источниках), лишена 3'-экзонуклеазной активности
- Pfu-полимераза (*Pyrococcus furiosus*, «яростные огненные шарики», экстремально термофильные бактерии, до 103°C), обладает 3'-экзонуклеазной активностью, но медленно работает



- Для охлаждения и нагрева матрицы используются термоэлектрические **элементы Пельтье**:
 - точность регулирования температуры
 - бесшумность
 - хорошие массогабаритные показатели
 - высокая надежность
- каждый элемент имеет свой датчик температуры и свой терморегулятор → позволяет задавать необходимые температурные градиенты по матрице

Некоторые требования к лабораториям

Лаборатория в соответствии с этапами проведения анализа должна включать следующий набор последовательно расположенных самостоятельных рабочих зон (помещений) или отдельно выделенных рабочих зон в составе других функциональных помещений:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала (Рабочая зона 1);
- выделения нуклеиновых кислот (Рабочая зона 2 или «чистая» зона);
- проведения реакции амплификации (Рабочая зона 3);
- учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза (Рабочая зона 4-1);
- учета результатов (детекции) продуктов амплификации нуклеиновых кислот методом секвенирования и (или) на ДНК-чипах (Рабочая зона 4-2)

<http://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf>

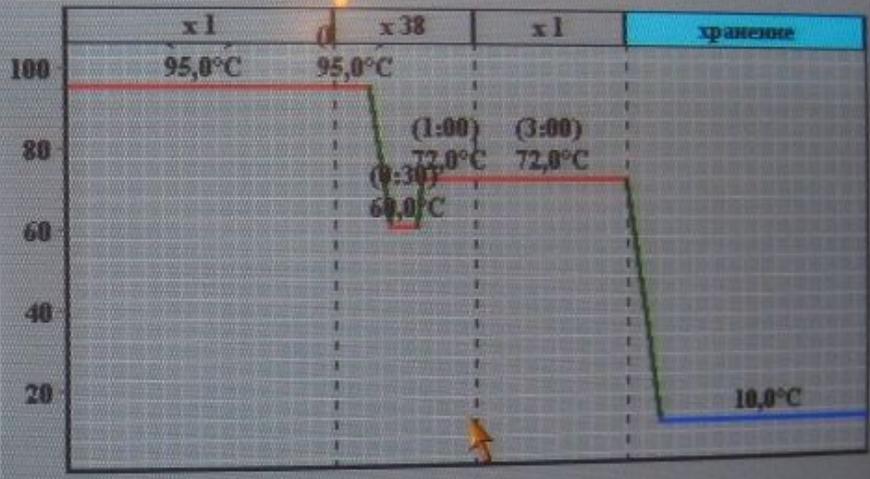


Каждый цикл ПЦР включает 3 этапа:

1. Денатурация (плавление)	t 92-94°C	30''
2. Отжиг с праймерами	t 50-60°C	30''
3. Полимериза ция (элонгация)	t 72°	1'



№ блока	Температура °C	мин	сек	Число циклов
1	95,0	5	0	1
2	95,0	0	40	38
	60,0	0	30	
	72,0	1	0	
3	72,0	3	0	1
	10,0			



- Добавить строку
- Удалить строку
- Добавить блок
- Удалить блок

Тип блока

- Цикл
- Пауза
- Хранение



Имя программы: GENOMIC

Объем рабочей смеси = 25 мл

Тип регулирования

- регулирование по матрице (M)
- точное активное регулирование (P)
- быстрое активное регулирование (F)

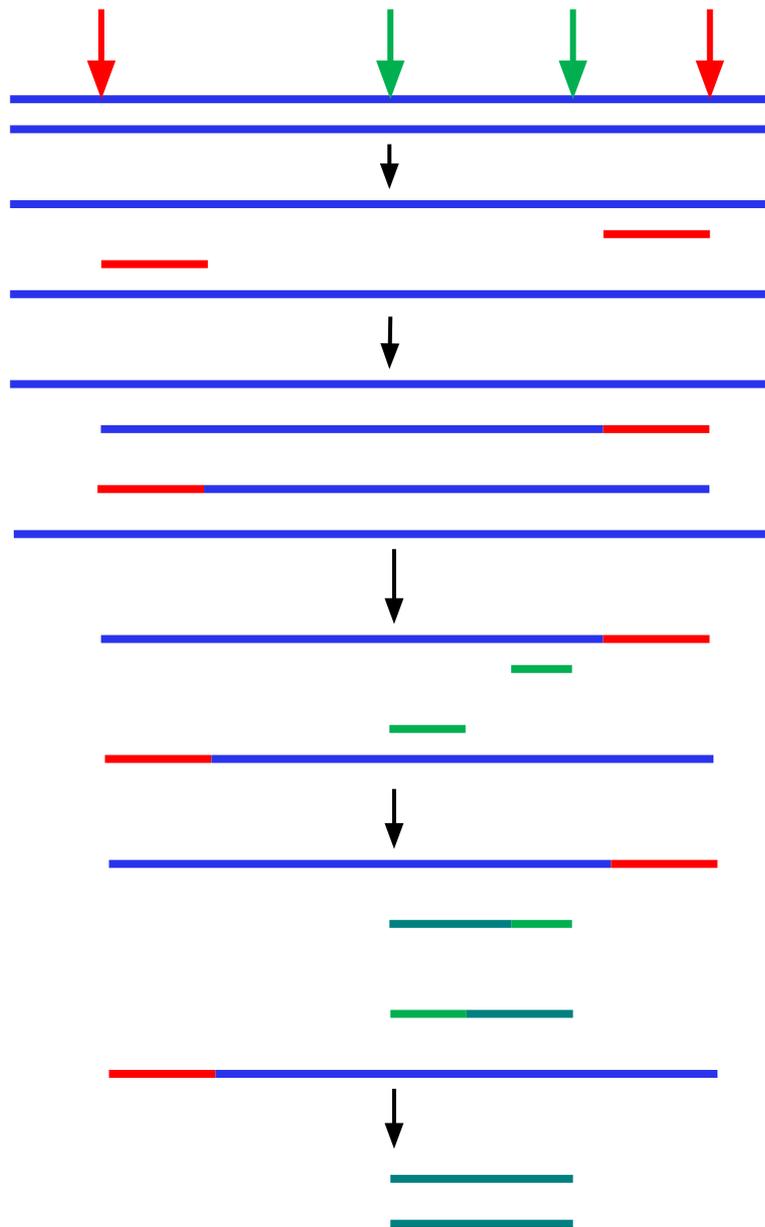
- с каждым циклом ПЦР количество ампликонов увеличивается экспоненциально (приближается к зависимости 2^n , где n — число циклов). За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается $\approx 10^8$ молекул ампликона
- выход всех других продуктов реакции увеличивается по линейной зависимости

Разновидности ПЦР

- **RT-PCR** (Reverse Transcription PCR, ПЦР с обратной транскрипцией). Для изучения экспрессии генов. РНК → ДНК → ПЦР
- **Ассиметричная ПЦР** (Assimetric PCR) – для амплификации преимущественно одной цепи; используют разные количества праймеров
- **ПЦР длинных фрагментов** (Long-range PCR) для амплификации фрагментов более 10 т.п.н. Используют две полимеразы (Taq и Pfu)
- **«Вложенная» ПЦР**, гнездовая (Nested PCR) – с использованием второй пары праймеров, с помощью которой амплифицируется фрагмент полученного ранее ампликона

идентифицируема
я
последовательнос
ть
первая пара
праймеров

вторая пара
праймеров



Первый раунд
ПЦР

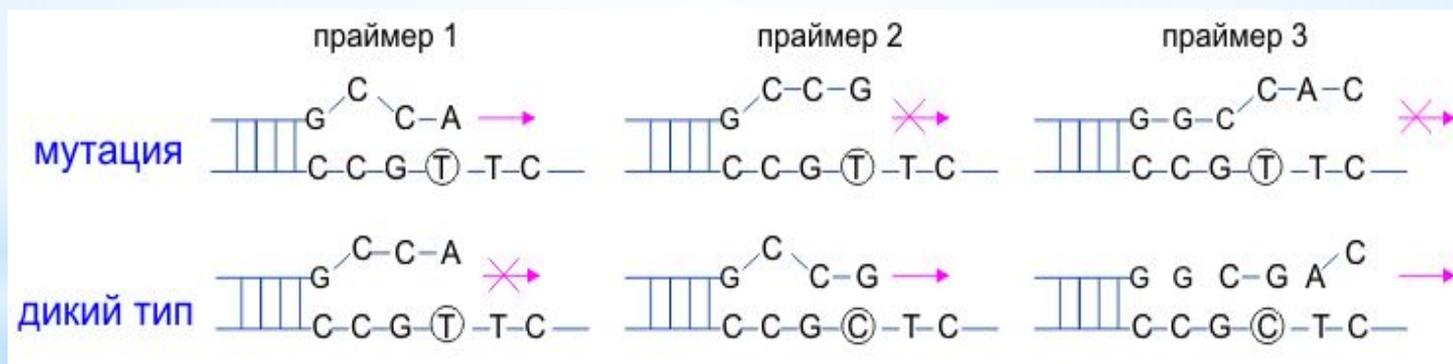
Второй раунд
ПЦР

Разновидности ПЦР

- **Hot start PCR** (ПЦР с «горячего старта»). В одном из вариантов метода сначала ДНК-полимеразу и реакционную смесь разделяют легкоплавким физическим барьером (напр., воском); → при нагревании пробирки переход ДНК-полимеразы в реакционную смесь происходит при температуре около 55 °С. Позволяет избежать удлинения неспецифически севших праймеров, повышает специфичность реакции
- **Multiplex PCR** – при использовании нескольких пар праймеров одновременная амплификация нескольких фрагментов
- **Количественная ПЦР** в реальном времени (Quantitative real-time PCR) с использованием флуоресцентно меченых атомов, позволяющая отслеживать количество нарабатываемого продукта в каждом цикле ПЦР в реальном времени

Разновидности ПЦР

- **ПЦР с аллель-специфическими праймерами** – позволяет находить небольшое число мутантных ДНК на фоне большого числа молекул дикого типа. Для детекции мутантной ДНК используют АС-праймеры, полностью комплементарные только мутантным последовательностям, что обеспечивает амплификацию только мутантной ДНК, а ДНК дикого типа в реакцию не вступает. Возможно обнаружение нескольких десятков или сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа .



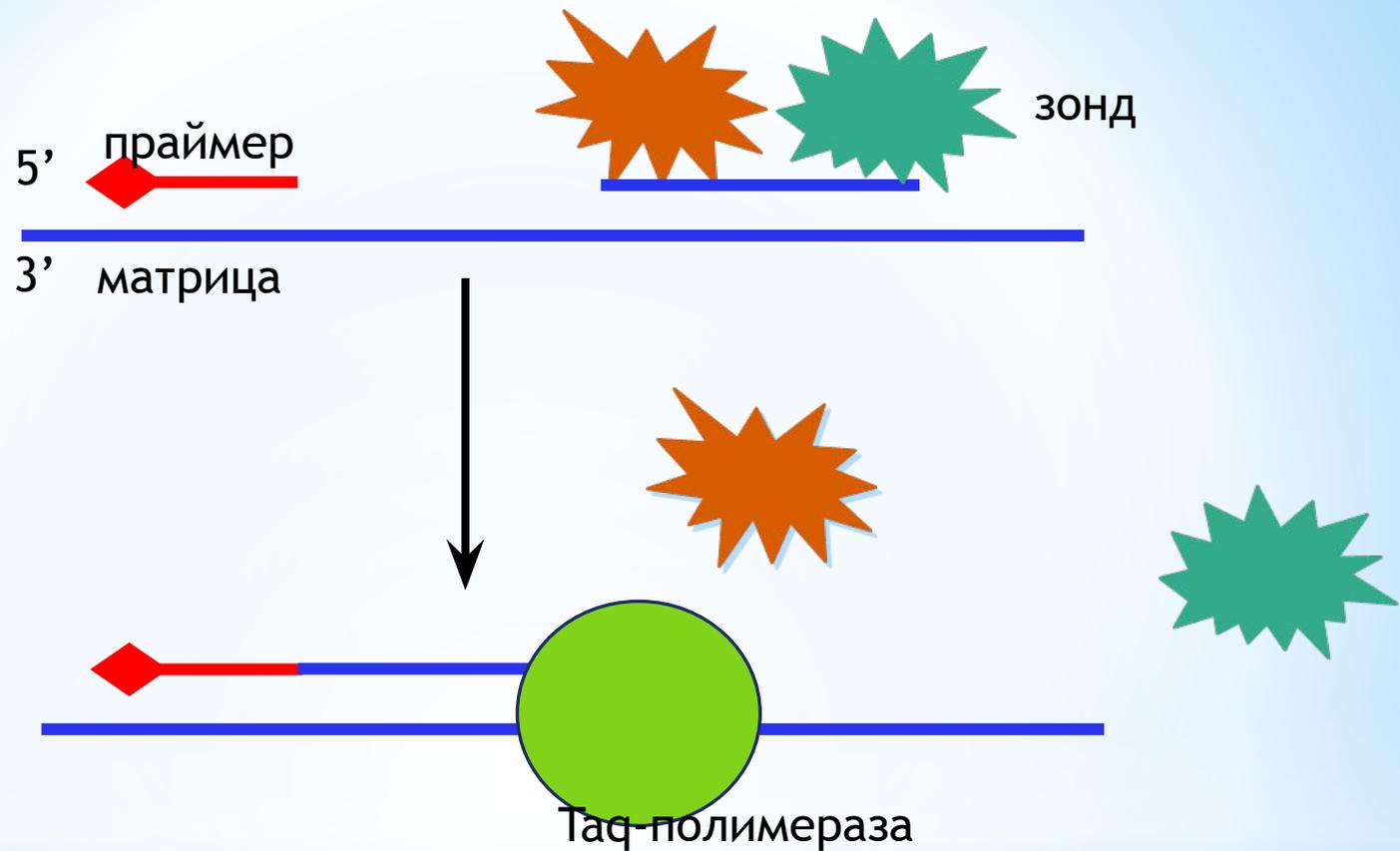
Real-Time PCR

- Real-Time PCR (ПЦР-РВ) позволяет детектировать продукты ПЦР непосредственно в ходе амплификации через стенки или крышку закрытой пробирки
- два основных подхода к детекции результатов:
 - ✓ с помощью интеркалирующих красителей - **низкоспецифичный**
 - ✓ на основе флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов – **высокоспецифичный**
- Низкоспецифичная детекция продуктов амплификации за счет увеличения флуоресценции интеркалирующего красителя при образовании комплекса с двуцепочечной ДНК. Самый популярный краситель - **SYBR Green I** (чувствительный флуоресцентный индикатор двухцепочечной ДНК). Но: любая двуцепочечная ДНК!!! Вероятность регистрации ложноположительного результата

- высокоспецифичная детекция: используется флуоресцентный зонд – олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента + флуоресцентная молекула и молекула-«гаситель». Из-за близости последних энергия переходит на «гаситель» по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии



- в силу близости флуорофора и «гасителя» энергия, поглощенная флуорофором, переходит на «гасителя»; при этом сигнал флуоресценции отсутствует



В процессе синтеза новой цепи Taq-полимераза расщепляет зонд. Расстояние между флуорофором и «гасителем» увеличивается → тушение флуоресценции невозможно. Появляется сигнал.

Преимущества ПЦР «в реальном времени»

- слияние во времени процесса амплификации и детекции результатов
- снижение риска контаминации при оценке результатов
- автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов
- возможность оценки кинетики процесса
- высокая специфичность реакции
- возможность количественной оценки исходной ДНК-матрицы
- упрощение требований к организации ПЦР-лаборатории (не требуется другого оборудования для детекции результатов ПЦР)
- регистрация и учет данных в электронном формате и т.д



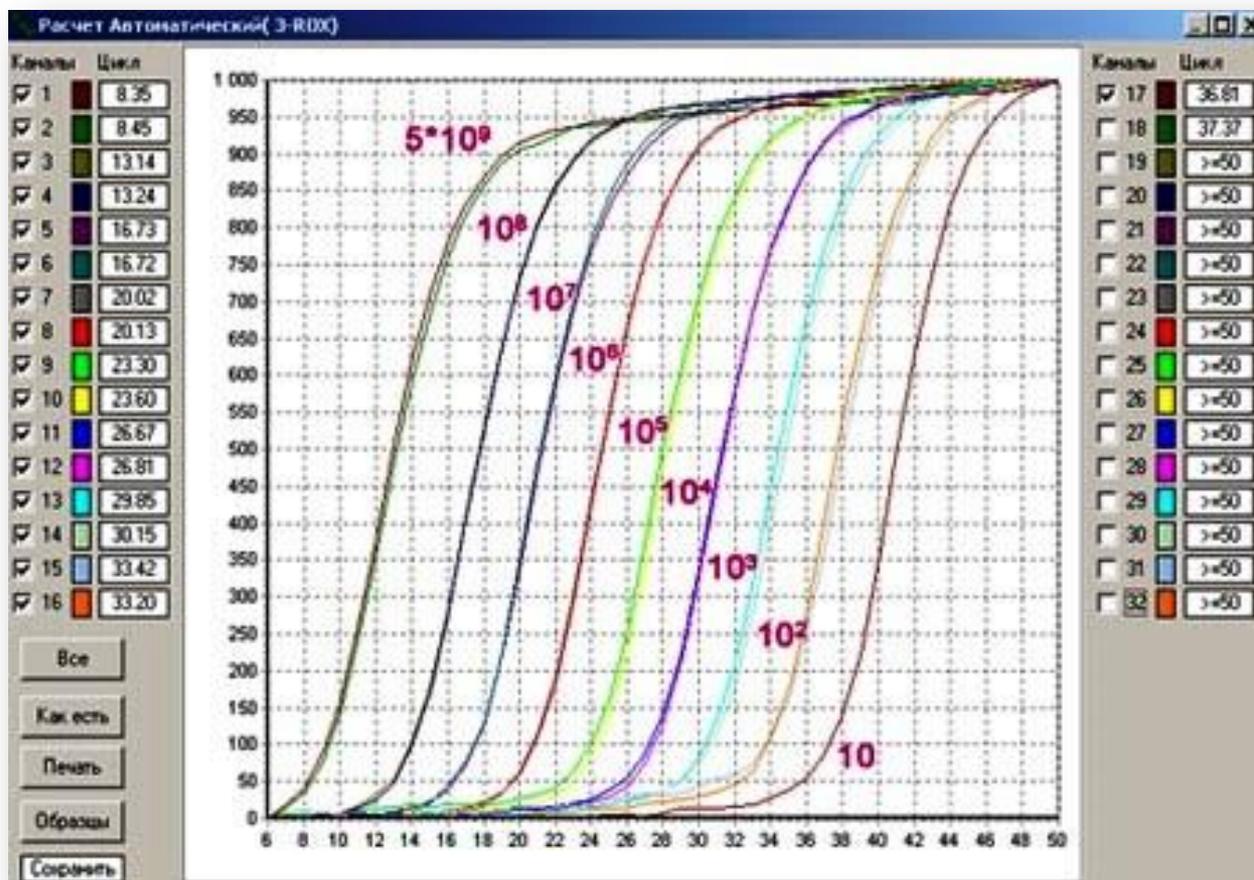
SAMSUNG

A-E02

BIO-RAD

CFX96[®] Real-Time System

C1000 Touch[™]
Thermal Cycler



<http://www.ld.ru/PCR/ilist-4314.html>

ПЦР в модификации FLASH

Метод ПЦР с детекцией по "конечной точке" (FLASH - Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization) также:

1. позволяет учитывать результаты ПЦР не открывая пробирки, непосредственно после проведения ПЦР, что блокирует возможность загрязнения ПЦР-лаборатории ампликонами
2. исключает стадии анализа продуктов ПЦР методом электрофореза

Но: регистрация флуоресценции при FLASH-детекции происходит по "конечной точке" - "end-point detection" на детекторе флуоресценции, который регистрирует флуоресцентное свечение реакционной смеси в пробирках непосредственно после проведения ПЦР.

<http://www.id.ru/PCR/flash-pcr.html>

http://www.helicon.ru/catalog/detail.php?IBLOCK_ID=4&SECTION_ID=22&ELEMENT_ID=1820



Другие способы детекции результатов ПЦР

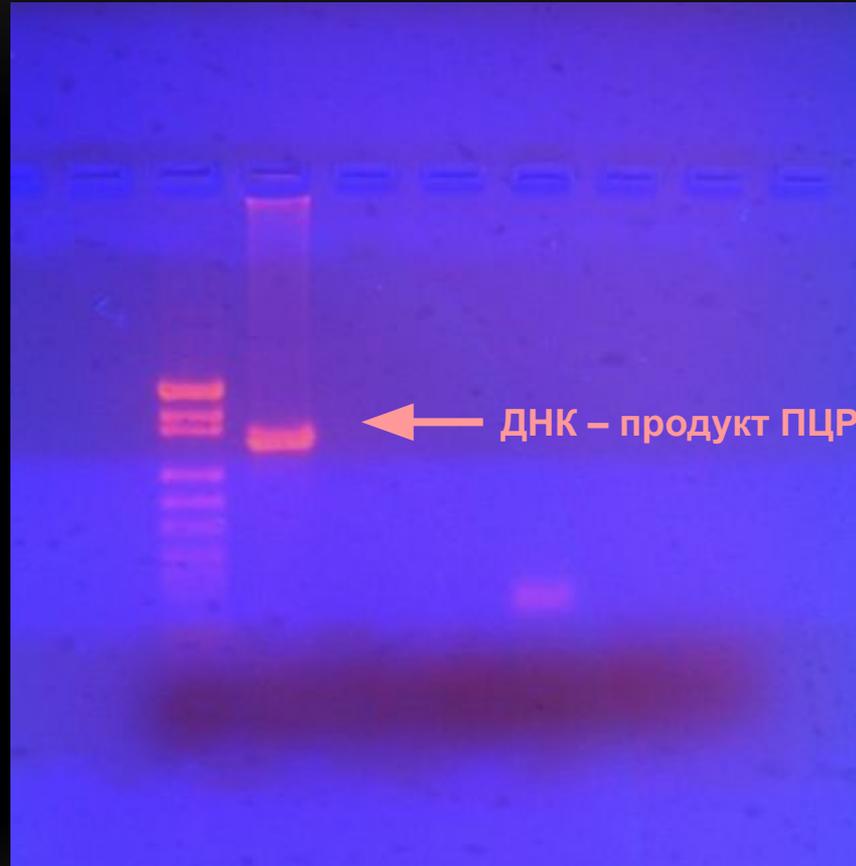
с использованием метода гель-электрофорез

- гели: агарозный (0,7-2%) и полиакриламидный (ПААГ. 10%)
- агарозный гель позволяет идентифицировать фрагменты до 2 т.п.н. (2 т.н.) и более
- ПААГ используют для детекции фрагментов 500 п.н. и меньше

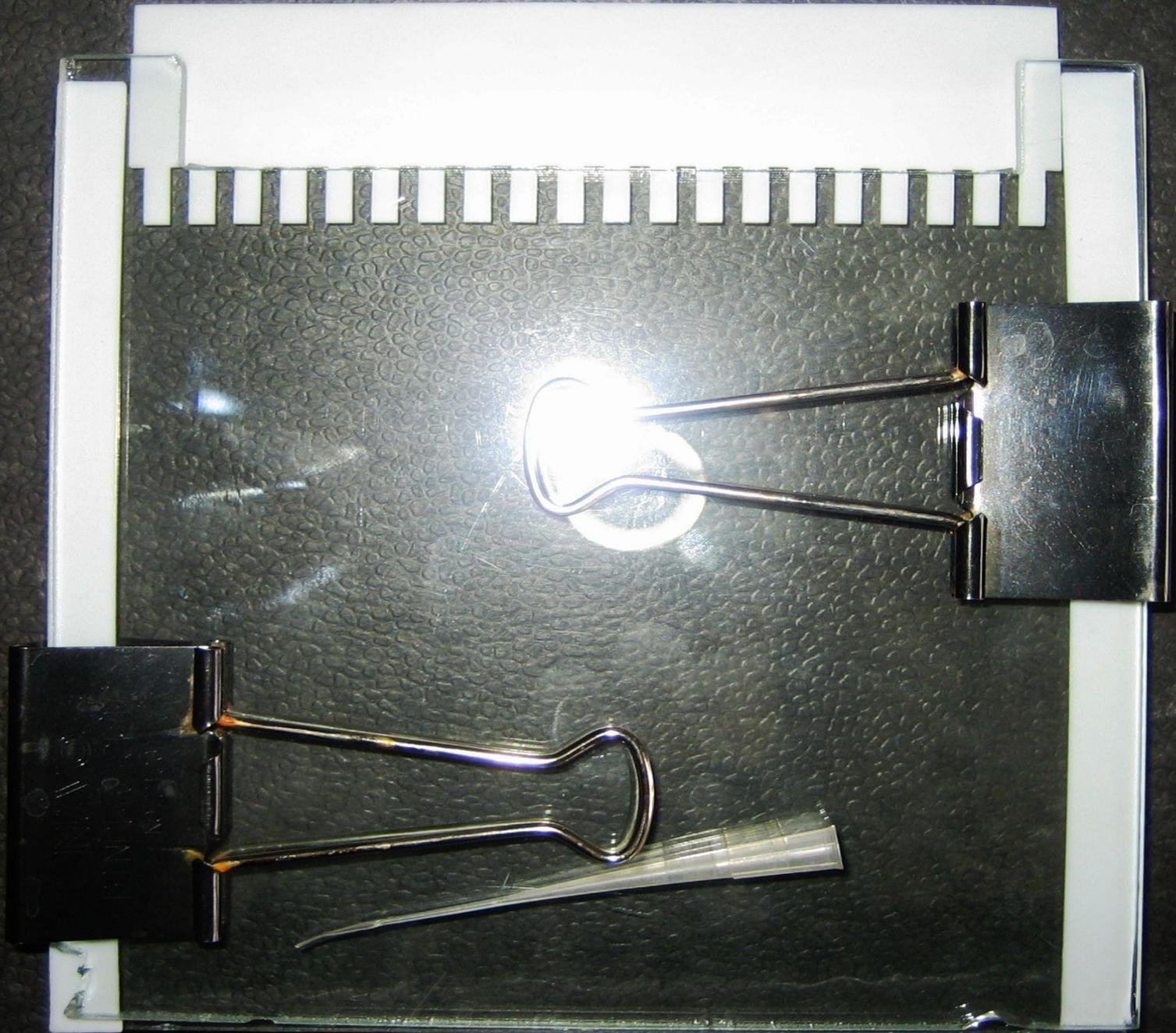


ГЕЛЬ - ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

лунки
и

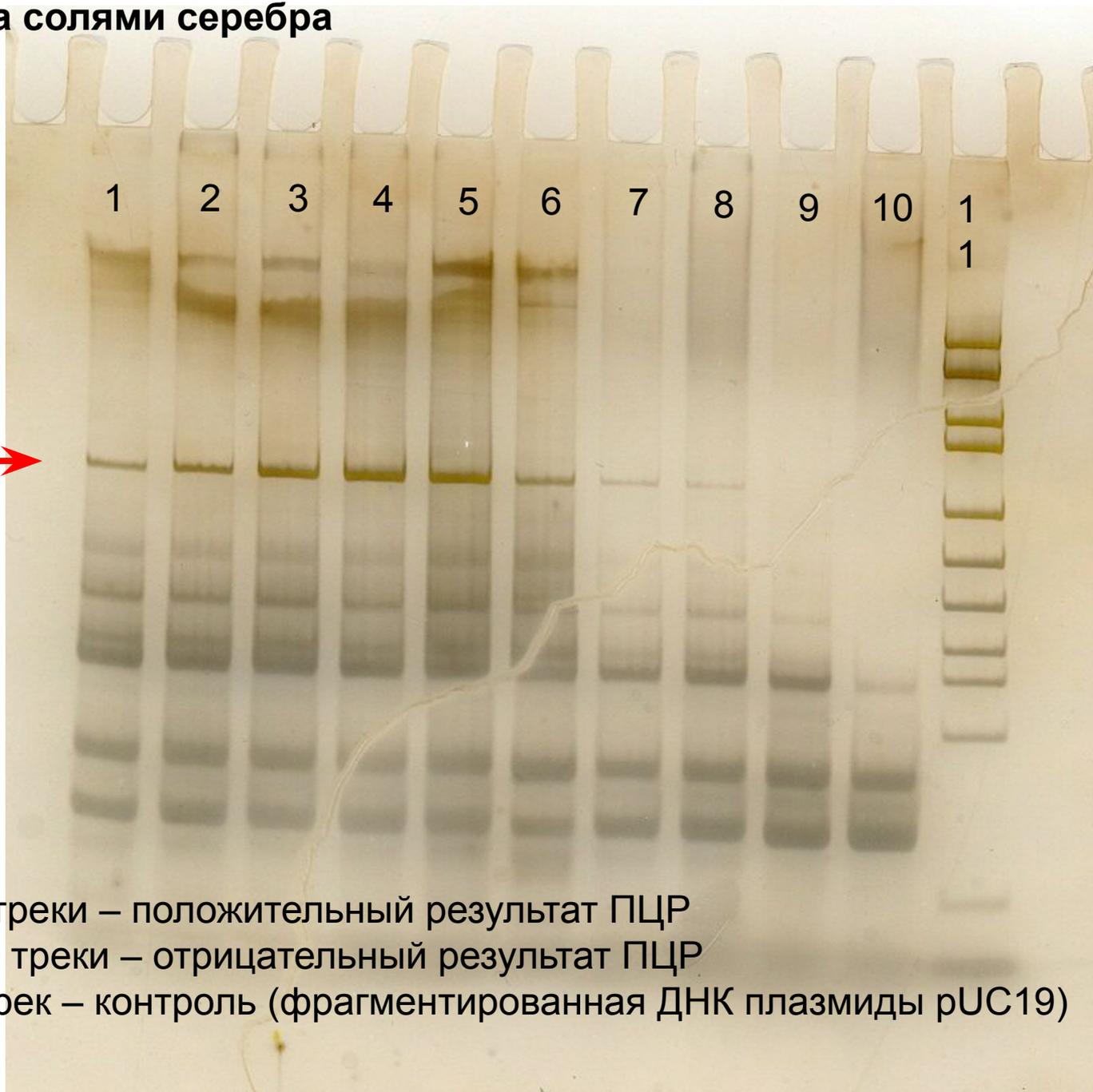


Агарозный гель, бромистый этидий

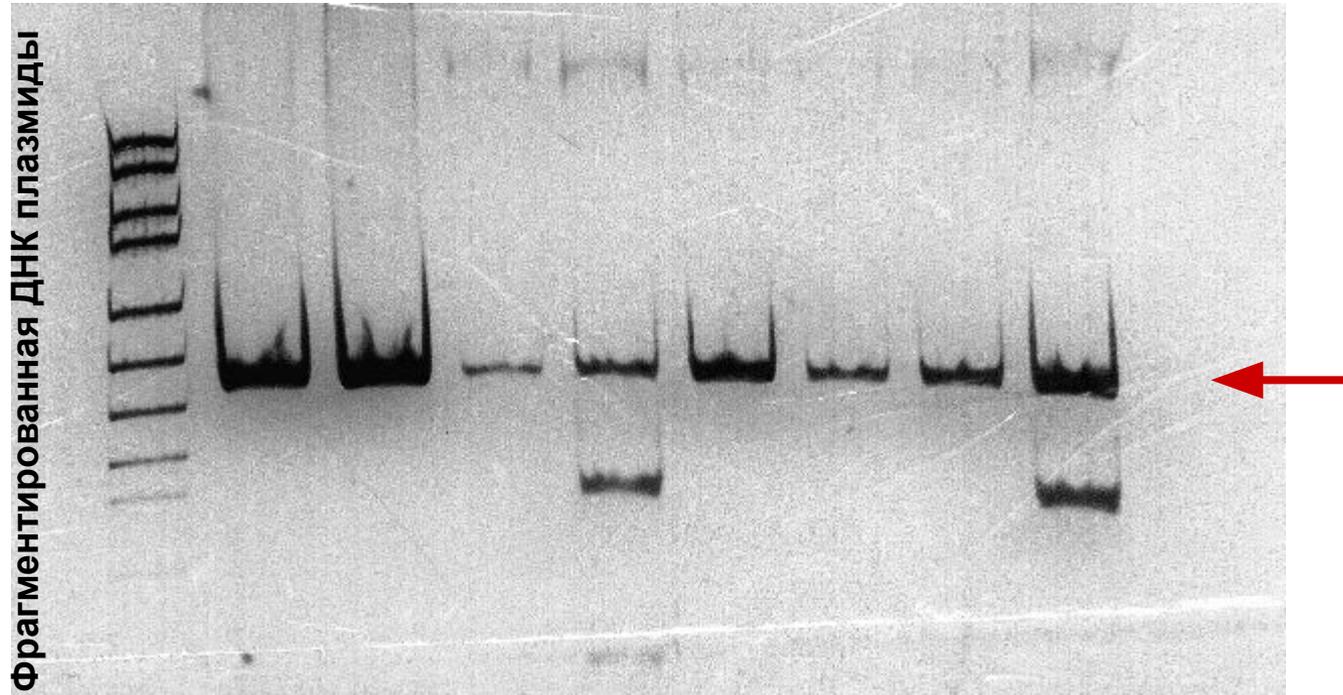




Окраска солями серебра



1-8 треки – положительный результат ПЦР
9-10 треки – отрицательный результат ПЦР
11 трек – контроль (фрагментированная ДНК плазмиды rUC19)



Полиакриламидный гель, окраска солями серебра

ПЦР: правила «хорошего тона»

«списаны» у Н.С.Мюге

- Всегда ставить отрицательный контроль (вода вместо ДНК)
- Ставить положительный контроль (с заведомо работающей ДНК)
- ПЦР-гигиена - не допускать попадания ПЦР-продукта в зону, где собирается реакция
- Иметь «свой» набор реактивов и праймеров, пипетки должны быть четко маркированы (до и после ПЦР разные комплекты)
- ПЦР продукты хранятся в отдельном холодильнике, и берутся другим комплектом рук

<http://www.youtube.com/watch?v=QVeVIM1yRMU>

<https://www.youtube.com/watch?v=IBi-d6jAKxQ>