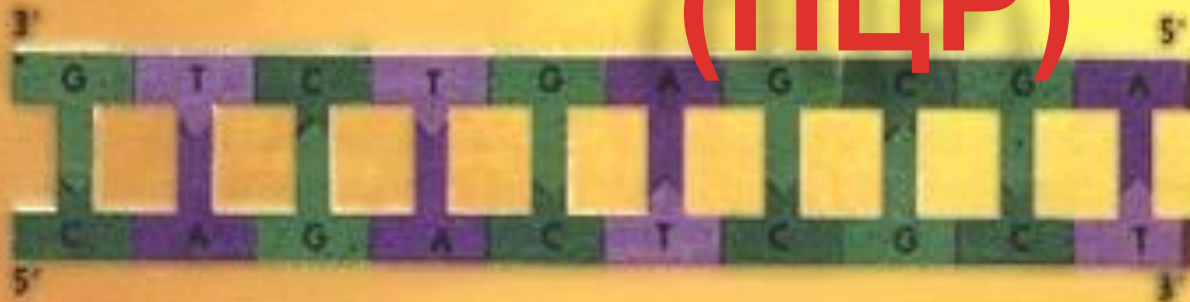
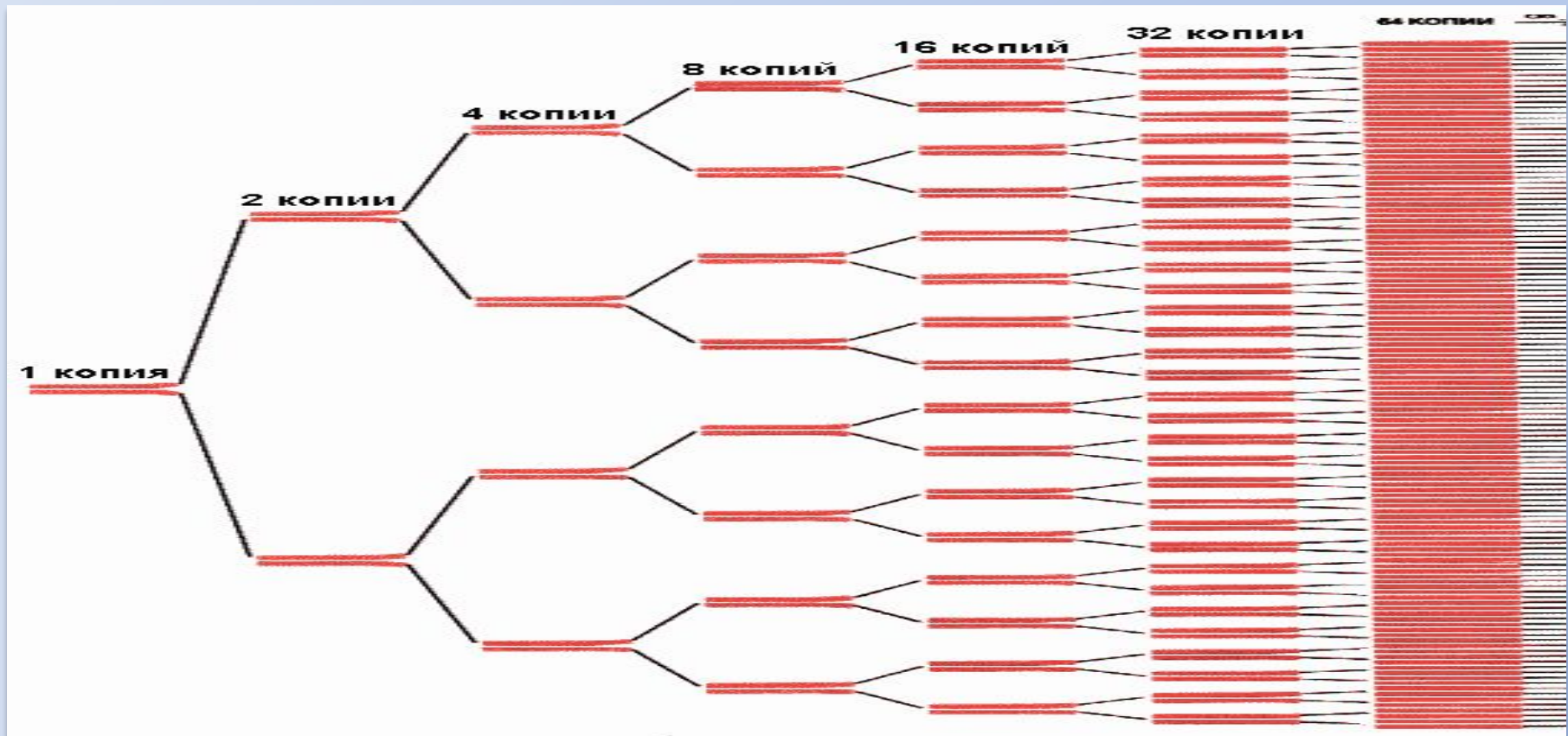


ПОЛИМЕРАЗНА Я ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)



Полимеразная цепная

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



Амплификат

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР и последующего хранения амплифицированных молекул при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$..



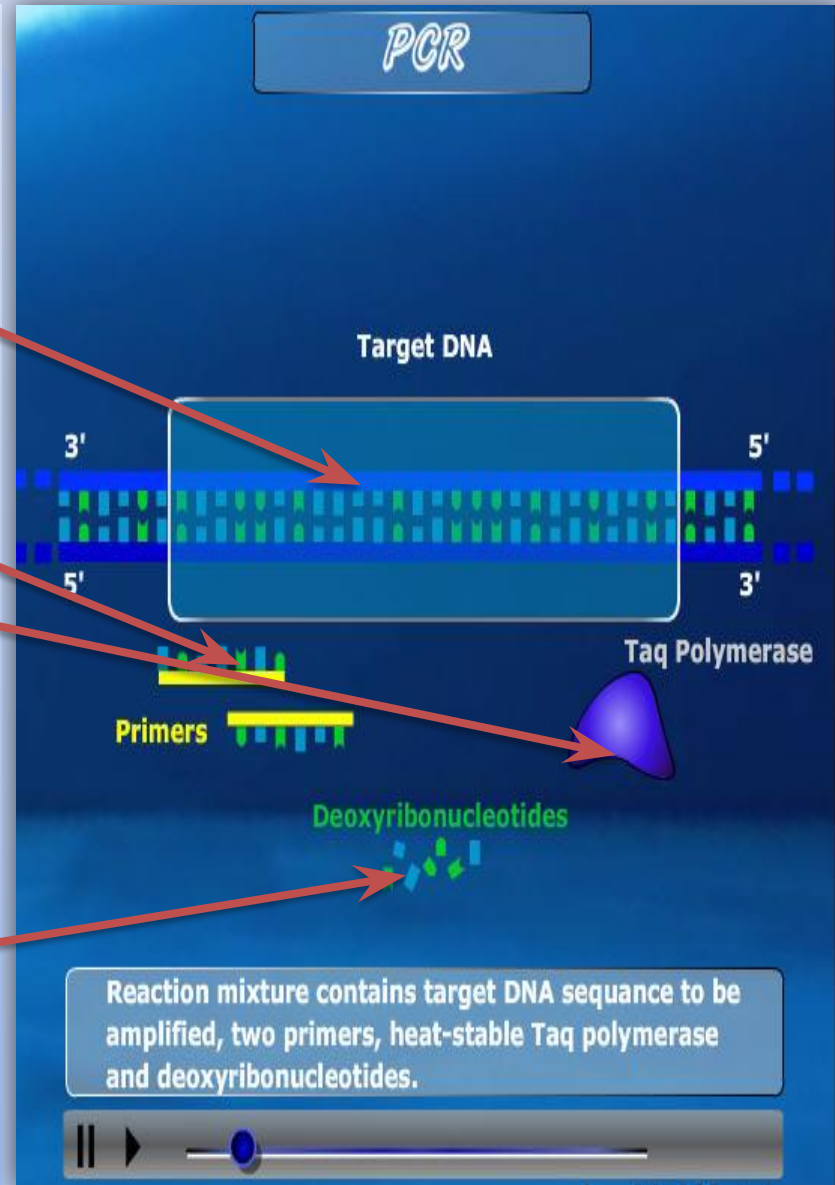
**нажми на
картинку**

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

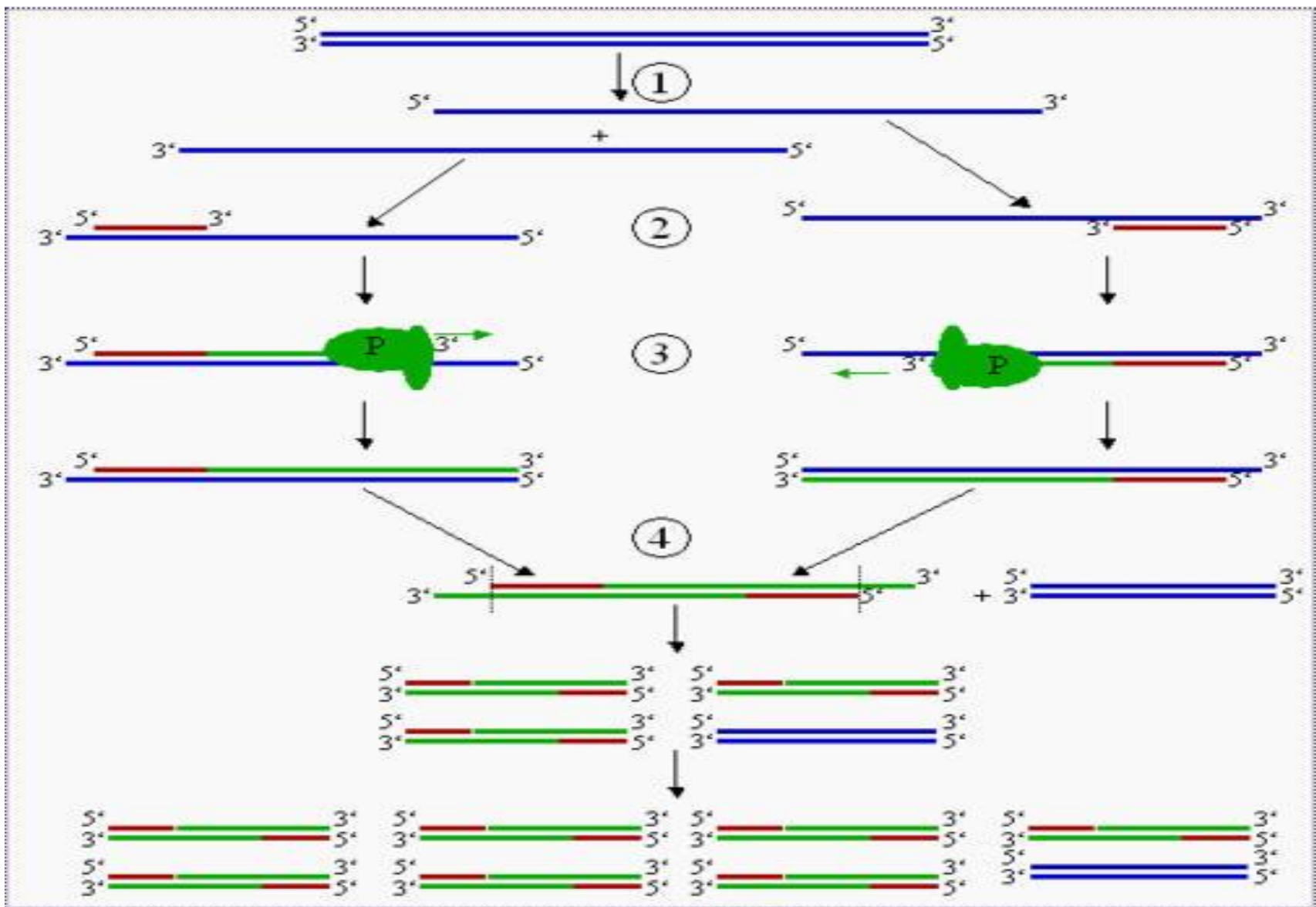
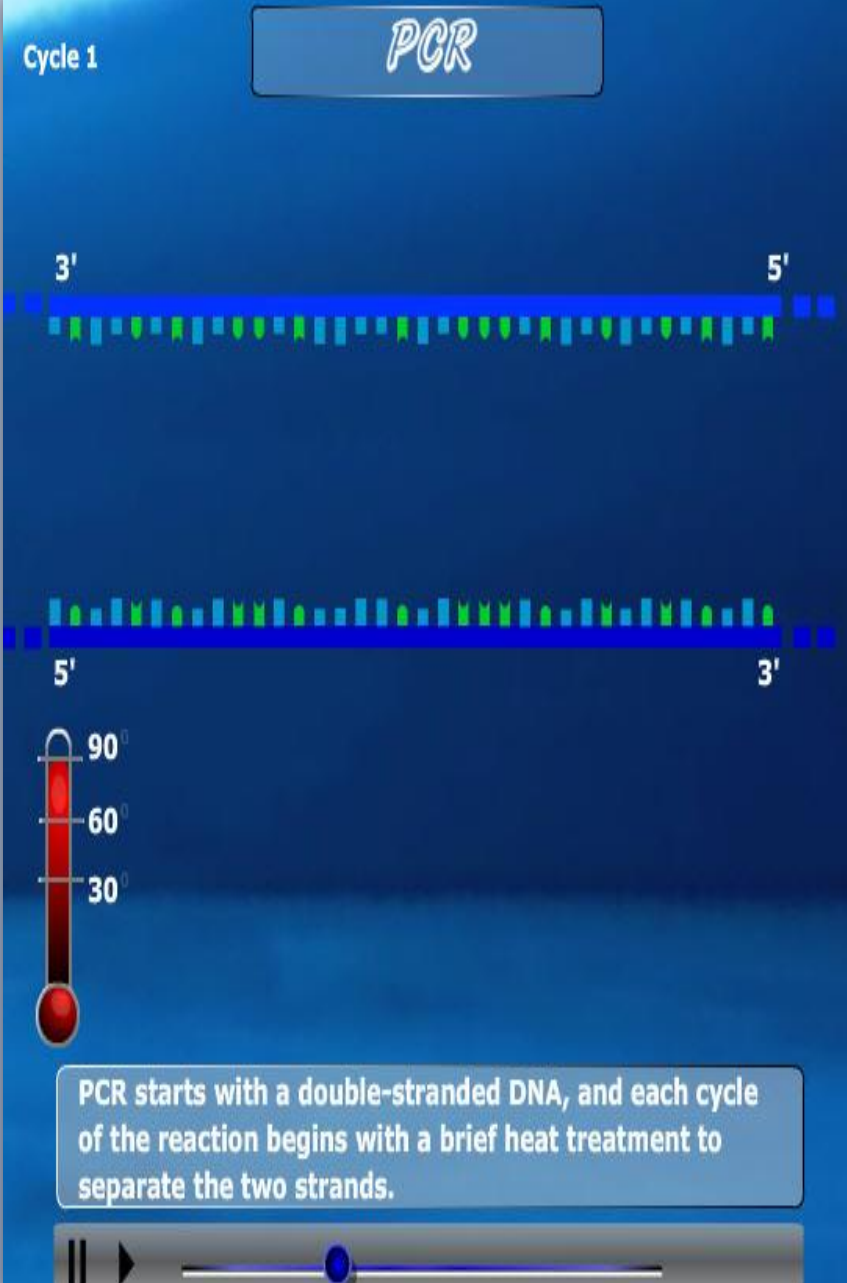


Рис. 2: Схематическое изображение первого цикла ПЦР. (1) Денатурация при 94—96°C. (2) Отжиг при 68 °С (например). (3) Элонгация при 72 °С (P=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

Денатурация

- Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до **94—96 °С** (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин., 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 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется **горячим стартом**, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.



The diagram illustrates the denaturation step of PCR. At the top, it is labeled "Cycle 1" and "PCR". A double-stranded DNA molecule is shown with the top strand labeled 3' on the left and 5' on the right, and the bottom strand labeled 5' on the left and 3' on the right. The strands are represented by blue lines with green and cyan vertical bars representing base pairs. A thermometer on the left shows a temperature scale with markers at 30, 60, and 90 degrees. The red liquid in the thermometer is at the 90-degree mark. Below the DNA, a text box states: "PCR starts with a double-stranded DNA, and each cycle of the reaction begins with a brief heat treatment to separate the two strands." At the bottom, there is a play button and a progress slider.

Cycle 1

PCR

3' 5'

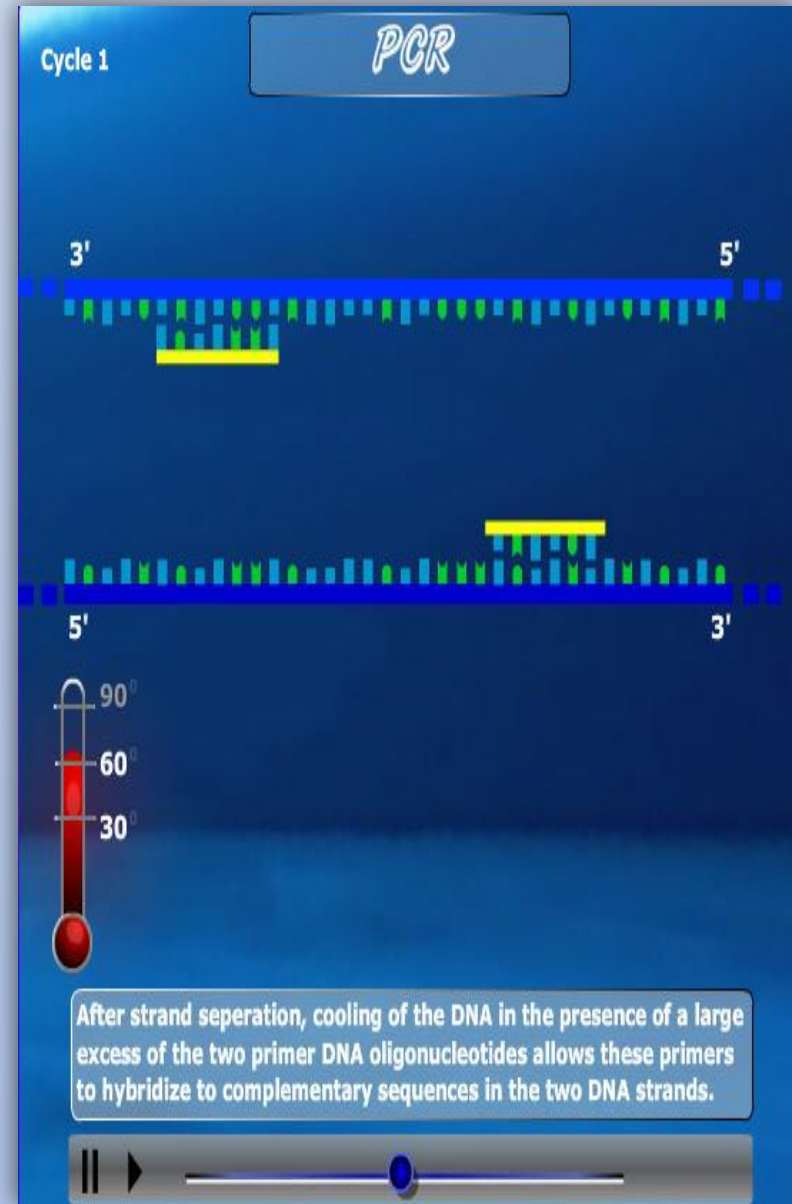
5' 3'

90°
60°
30°

PCR starts with a double-stranded DNA, and each cycle of the reaction begins with a brief heat treatment to separate the two strands.

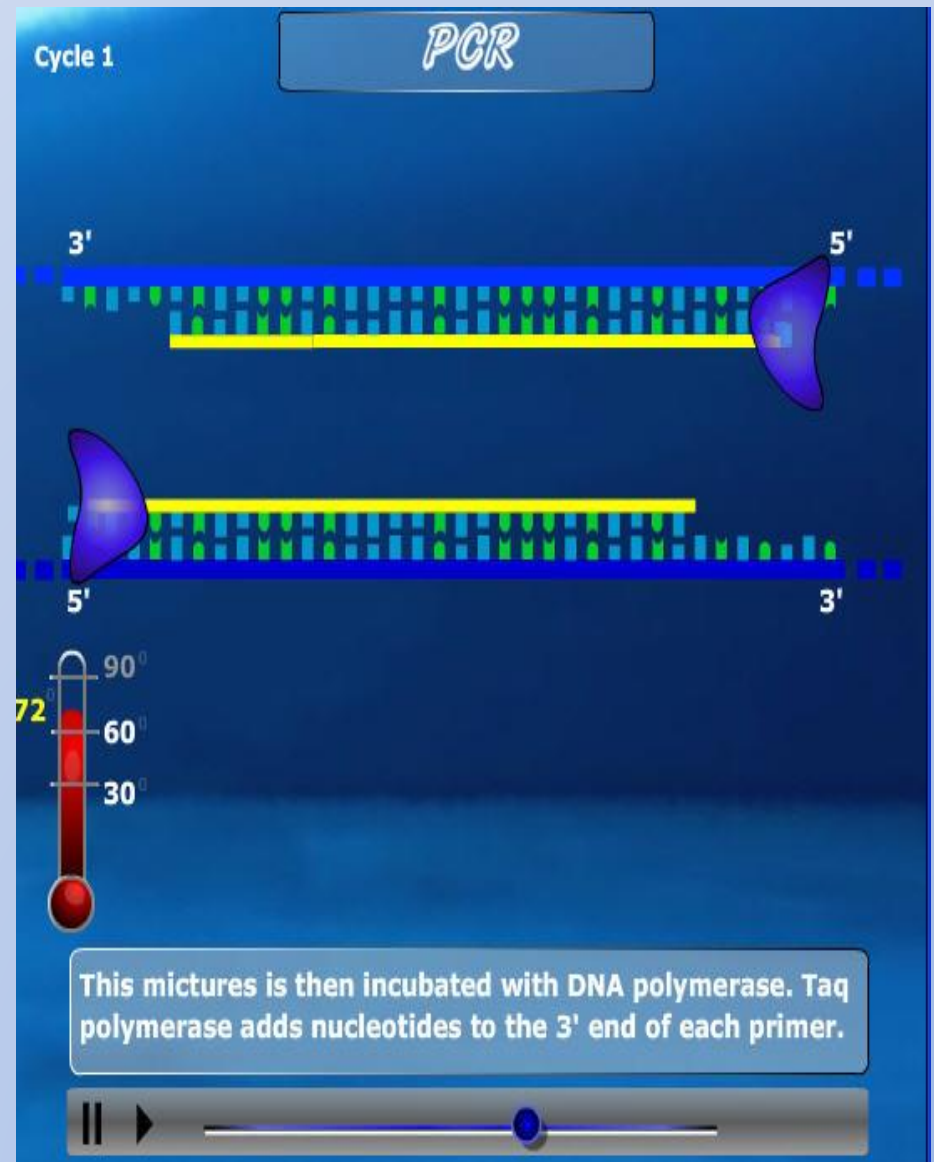
Ренатурация (Отжиг)

- 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 мин.
- 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.



Применение

• КРИМИНАЛИСТИК

• УСТАНОВЛЕНИЕ
ОТЦОВСТВА

• МЕДИЦИНСКАЯ
ДИАГНОСТИКА

• КЛОНИРОВАНИЕ
ГЕНОВ

• МУТАГЕН

