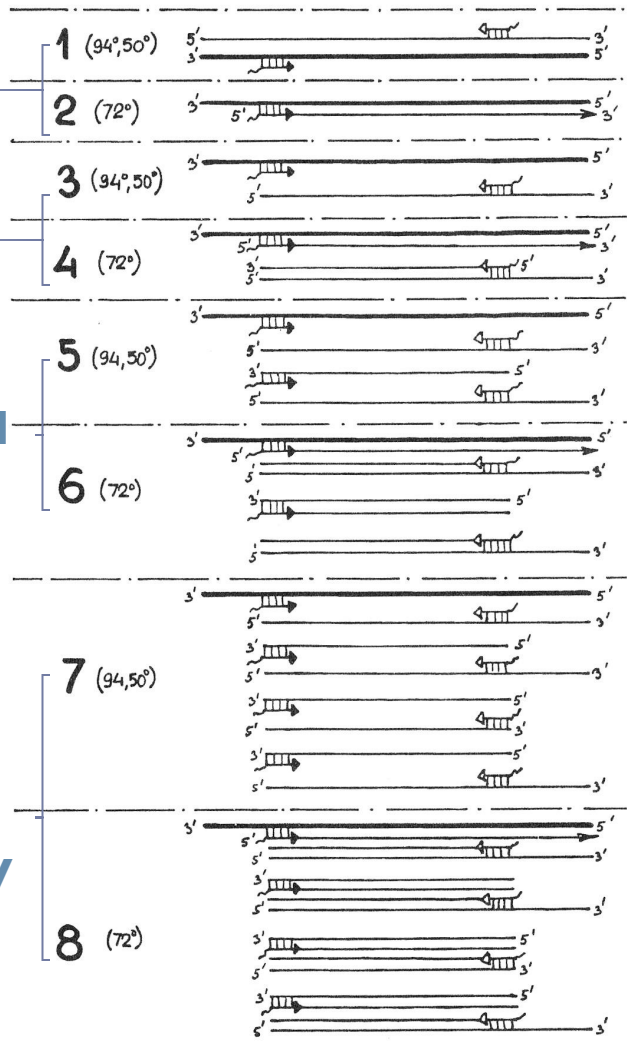
Критические компоненты и параметры ПЦР

ОБЩАЯ СХЕМА ПЦР



Принцип метода ПЦР заключается в следующем: в реакционную смесь вносят мДНК, дАТФ, дСТФ, дГТФ, дТТФ, ДНК-зависимую ДНК-полимеразу и два синтетических олигодезоксинуклеотидных праймера, фланкирующих исследуемый фрагмент мДНК. Реакционную смесь разогревают до температуры ~95°С , что приводит к расхождению цепей ДНК. Это дает возможность для «отжига» праймеров при температуре от 37°С до 65°С, с этого момента праймеры могут служить затравкой для работы ДНК-полимеразы. Температуру реакционной смеси поднимают до оптимальной температуры работы фермента и проводят элонгацию цепей вновь синтезирующейся ДНК в течение 0,5-2 минут. По окончанию стадии синтеза ДНК заканчивается первый цикл ПЦР и начинается второй, третий и последующие циклы в автоматическом режиме.

КРИТИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ ПЦР

При практическом использовании ПЦР, по крайней мере, три характеристики данного метода важны для исследователя:

- **Специфичность реакции** – продуктом ПЦР должен быть именно тот локус ДНК, который амплифицировали, других продуктов от ПЦР быть не должно (при этом не обращают внимание на ошибочно включенные, в результате работы полимеразы, нуклеотиды);

- **Точность синтеза ДНК** – ошибки в амплификафии недопустимы при определении первичной структуры аплифицированного локуса, или при использвоании продукта ПЦР для синтеза кодируемого им белка в генно-инженерных системах экпресии;

- **Эффективность синтеза ДНК** – количественно оценивается по выходу продукта после окончании реакции. Теоретически через n циклов количество продуктов ПРЦ достигнет 2^{n-1} штук с каждой молекулы кДНК. Однако на практике такое происходит редко.

ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ

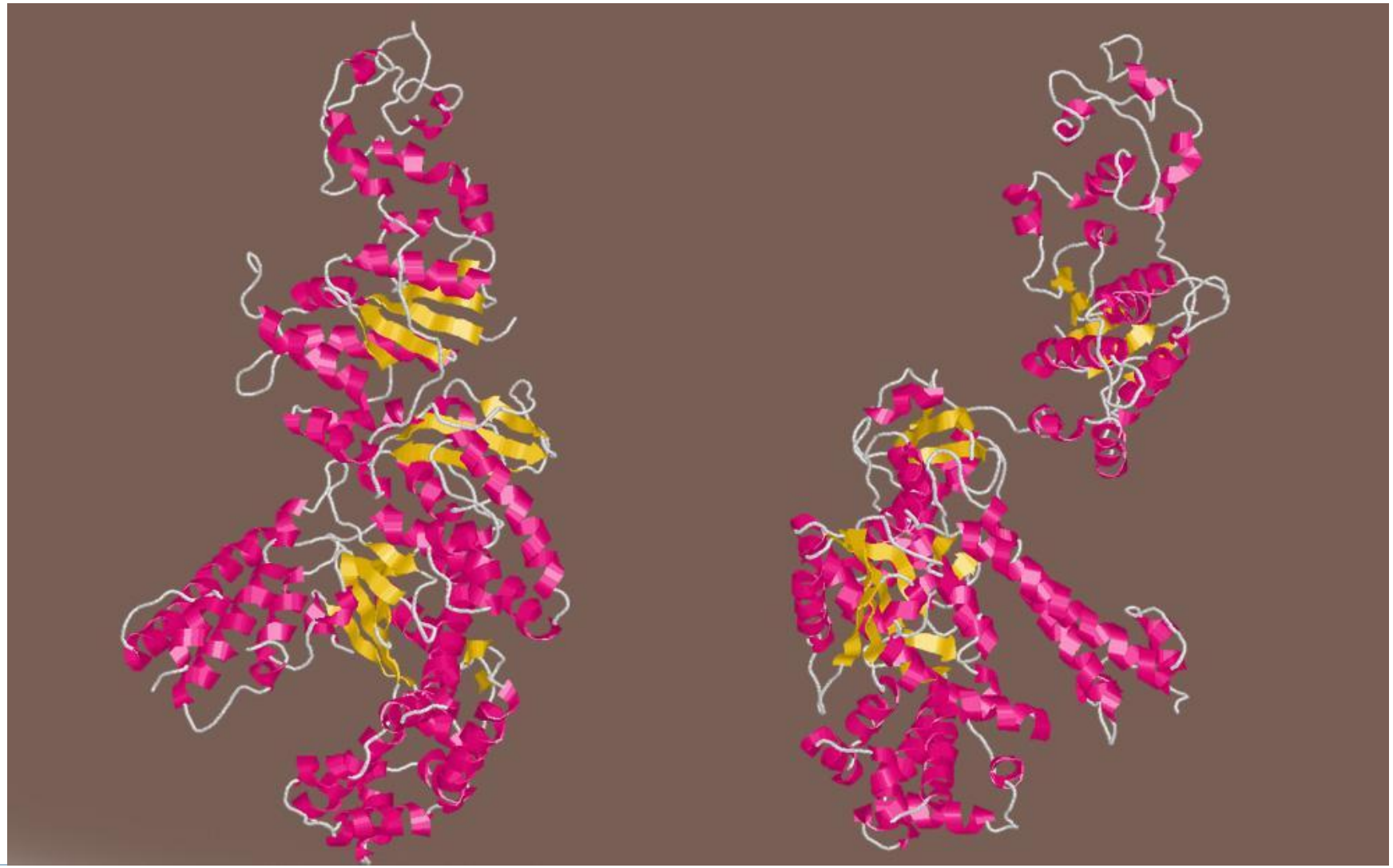
- **Температура отжига праймера**: ГЦ-состав праймера определяет температуру отжига праймера на кДНК и должен находится в пределах 35-65% (идеально 45-55%). Хотя состав праймера определяется первичной структурой кДНК, в случае если состав матрицы оказывается сильно смещенным в сторону А-Т или Г-Ц пар, допускается добавление к 5'-концу праймера нескольких Г-Ц или А-Т остатков, не комплементарных матрице. Для расчета температуры отжига праймеров используют следующую формулу: **[4(Г+Ц)+2(А+Т)]-5°С**, при длине праймера ≤ 20 нт, или **62,5 + 0,41°С (%Г-Ц)** при длине праймера ≥ 20 нт.;

- Желательно, чтобы температуры отжига пары праймеров для ПЦР совпадали, хотя допускается различие в 4-6°С;
- При выборе мест отжига праймеров на матрице необходимо избегать участков, которые в одноцепочечной форме образуют вторичную структуру;

ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ

- Для эффективной ПЦР не требуется полной комлементарности матрице, хотя полное соответствие желательно. В связи с этим допускается присоединение к 5’-концам праймеров участков, заключающих сайты рестрикции, кодоны инициации и терминации транскрипции;
- Включение Г или Ц остатков на 3’-конец праймера повышает вероятность неспецифичного отжига праймера на матрице;
- **Недопустима самокомлементарность праймеров, особенно в 3’-концевых областях, так как это приводит к образованию димеров праймеров и уменьшению их эффективности;**
- Ионные условия при проведении ПЦР должны подбираться индивидуально для каждой новой пары праймеров
- Стандартные концентрации праймеров в реакционной смеси составляют 0,1-1 мкМ, увеличение концентрации обычно в большинстве случаев дает хорошие результаты, однако это делает дороже пробу.

ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



ТЕРМОСТАБИЛЬНЫЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Название	Частота мутаций	Экзонуклеазная активность	Особенности
Taq – ДНК - полимераза	$5{,}0 \cdot 10^{-6}$	-	Наиболее распространенный фермент
Tth – ДНК - полимераза			В присутствии ионов Mn^{2+} обладает активностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы
Pfu-ДНК-полимераза	**$1.3 \cdot 10^{-6}$**	3’ → 5’	При использовании в смеси с Taq-полимеразой способствует образованию продуктов ПЦР с тупыми концами
Vent – ДНК - полимераза	$2{,}8 \cdot 10^{-6}$	3’ → 5’	Не способна амплифицировать матрицы, если в них присутствуют остатки I или dU.
Deep Vent - ДНК - полимераза	$2.7 \cdot 10^{-6}$	3’ → 5’	Позволяет амплифицировать учстки ДНК длинной по крайней мере до 14 т.п.о.
UlTma – ДНК - полимераза	$5{,}0 \cdot 10^{-6}$	3’ → 5’	Не образует продукты ПЦР с выступающими 3’-концами, поэтому эти продукты могут быть использованы для клонирования по тупым концам

КРИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПЦР

- Температурный режим
- Количество циклов
- Ионы двухвалентных металлов
- Объем реакционной смеси
- Матричные нуклеиновые кислоты

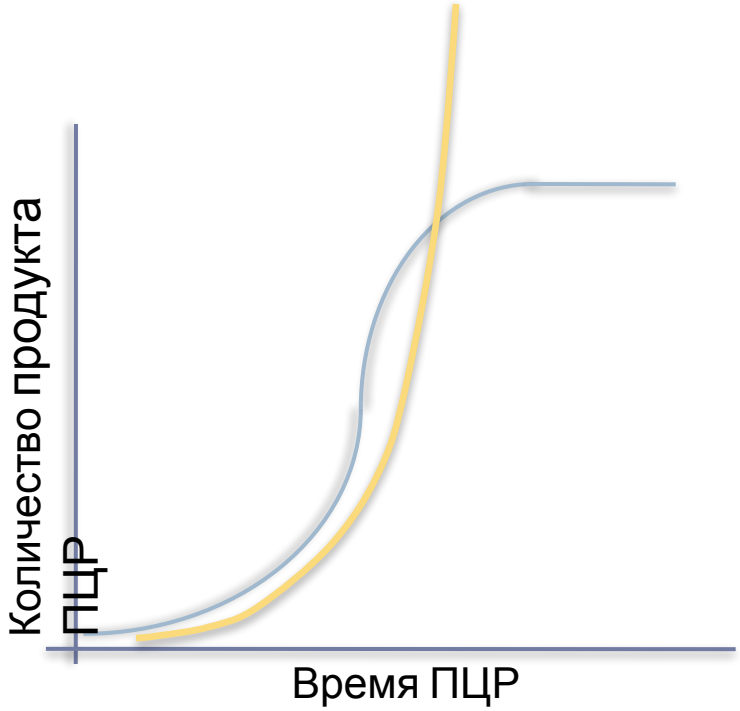
ТЕМПЕРАТУРНЫЙ РЕЖИМ

Преактивация: Выдерживание реакционной смеси перед началом ПЦР в течении 0,5-10 минут при 92°С позволяет инактивировать примесные белки и способствует более полной денатурации матричной ДНК

ПЦР

Выдерживание реакционной смеси в течении 5-10 минут при температуре 72°С для полного завершения синтеза продуктов ПЦР

Количество циклов ПЦР



Теоретически при развитии ПЦР должна наблюдаться экспоненциальная фаза роста количества продукта реакции, однако реально наблюдается «эффект плато».

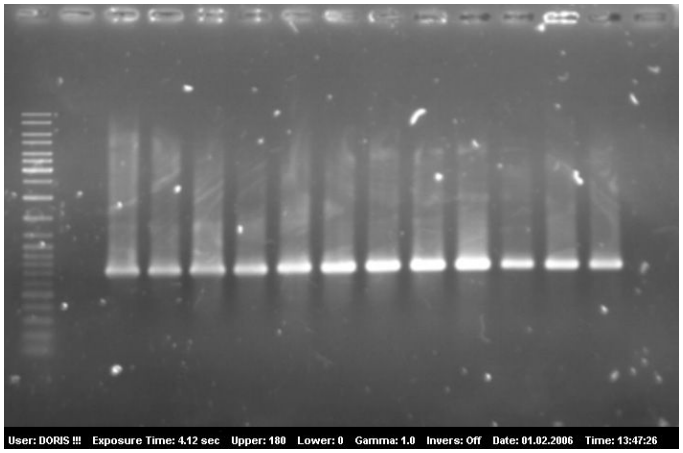
Факторы уменьшающие скорость роста количества продукта ПЦР:

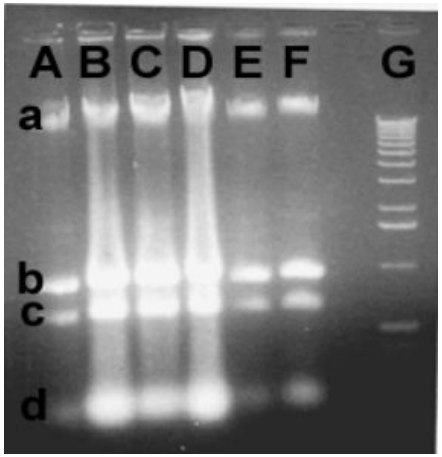
- Истощение субстрата (дНТФ или праймеров)
- Ингибирование ПЦР конечными продуктами реакции
- Конкуренция за субстрат со стороны неспецифичных продуктов реакции
- Неполная денатурации дцДНК
- Стабильность компонентов реакции
- «Изнашивание» ДНК-полимераз
- Увеличение вязкости реакционной смеси (препятствует элонгации праймеров)

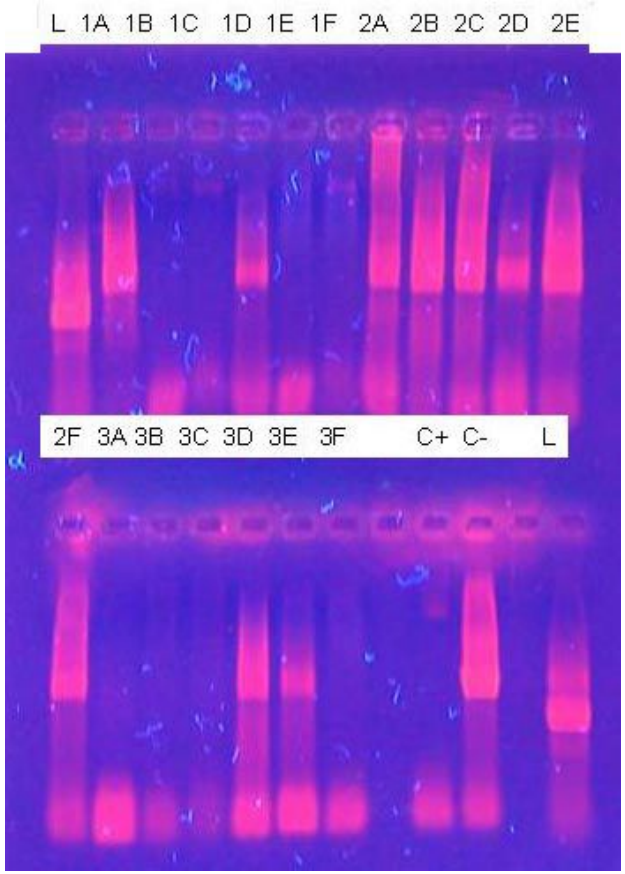
К ЧЕМУ ЭТО ВСЕ?

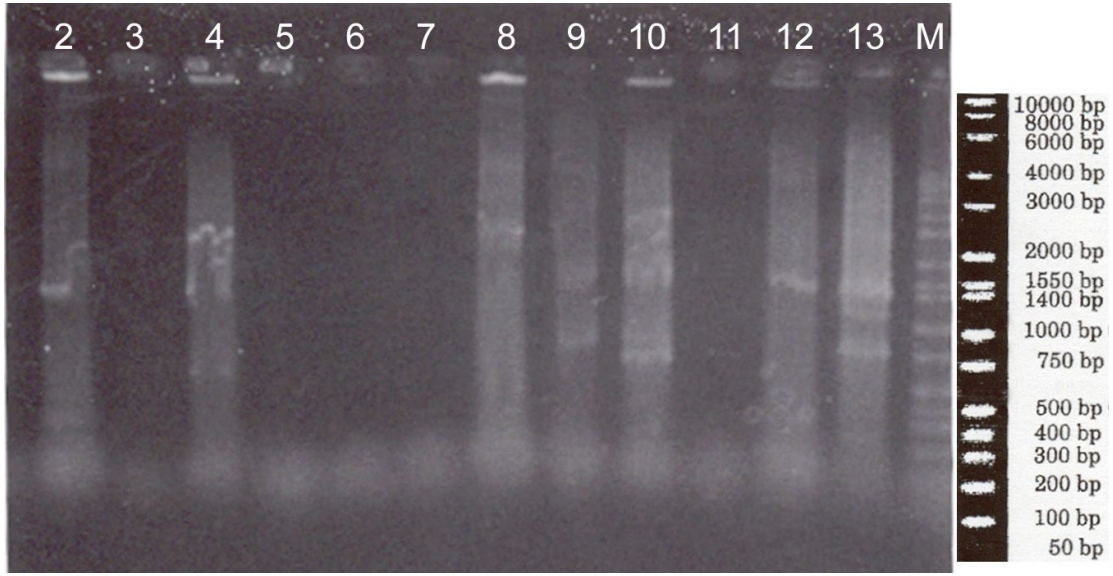
Неверный подбор условий и компонентов ПЦР приводит к образованию побочных продуктов реакции, «шмира», димеров праймеров, низкому выходу или полному отсутвию продуктов реакции

«ШМИР»

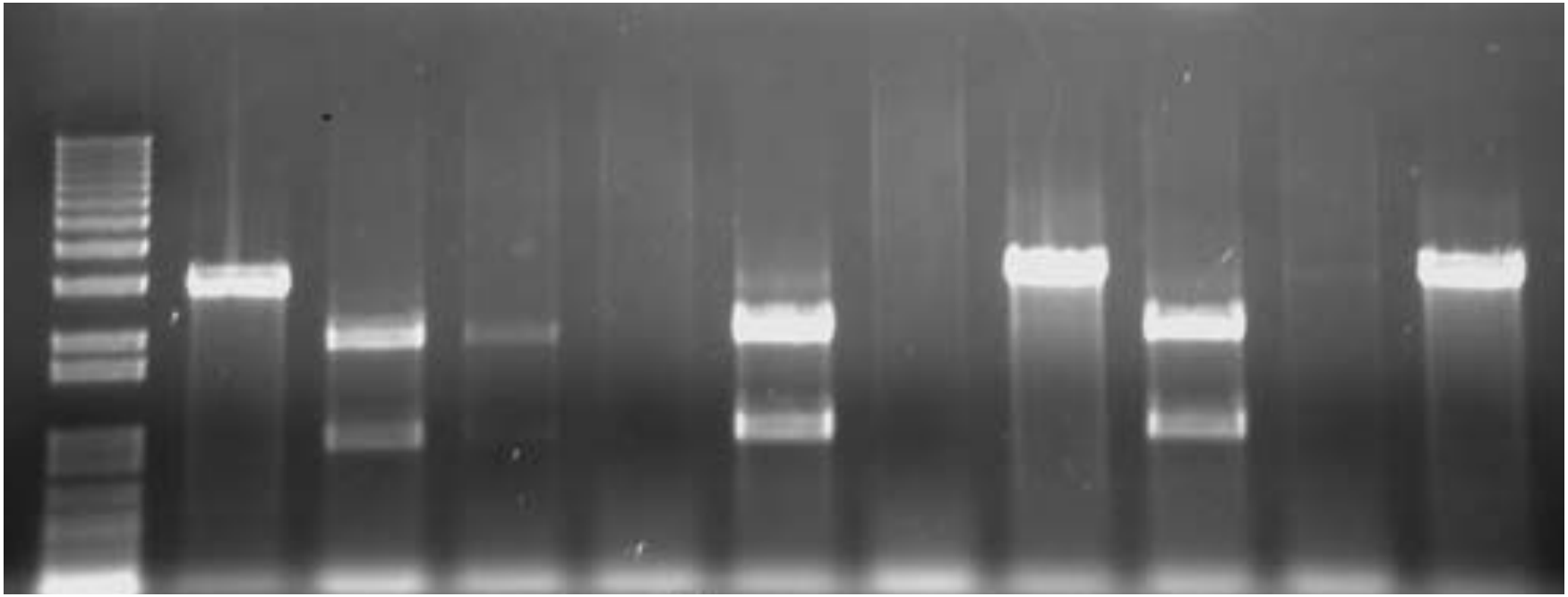

User: DORIS !!! Exposure Time: 4.12 sec Upper: 180 Lower: 0 Gamma: 1.0 Invers: Off Date: 01.02.2006 Time: 13:47:26

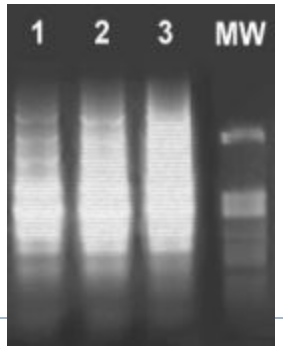

A B C D E F G
a
b
c
d

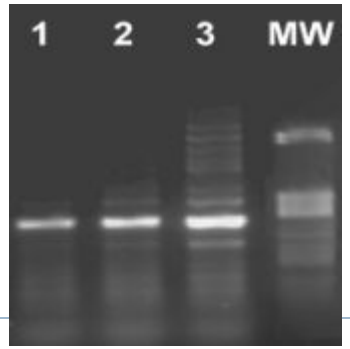

L 1A 1B 1C 1D 1E 1F 2A 2B 2C 2D 2E
2F 3A 3B 3C 3D 3E 3F C+ C- L


2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M
10000 bp
8000 bp
6000 bp
4000 bp
3000 bp
2000 bp
1550 bp
1400 bp
1000 bp
750 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp
50 bp

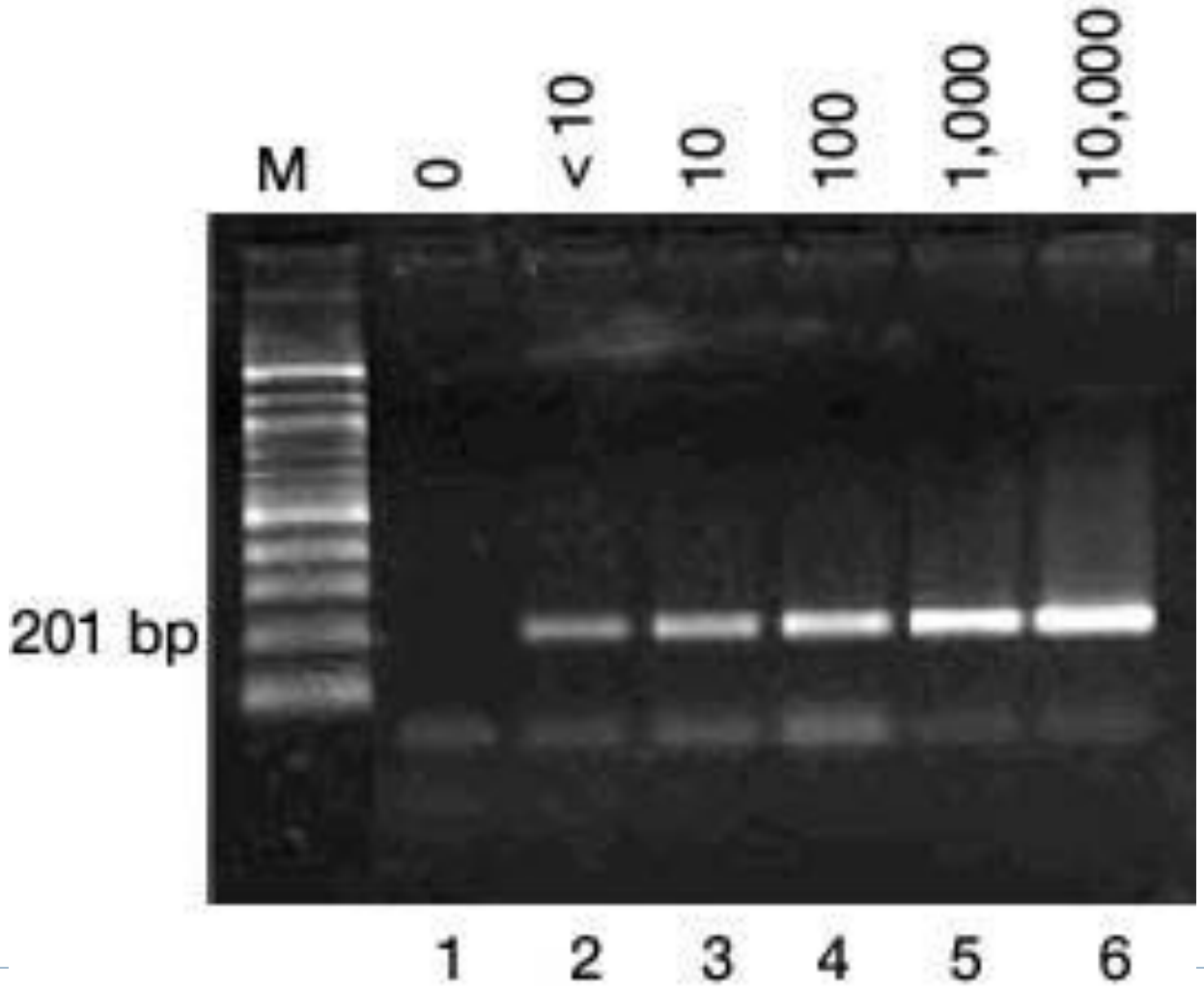
Неспецифические продукты ПЦР



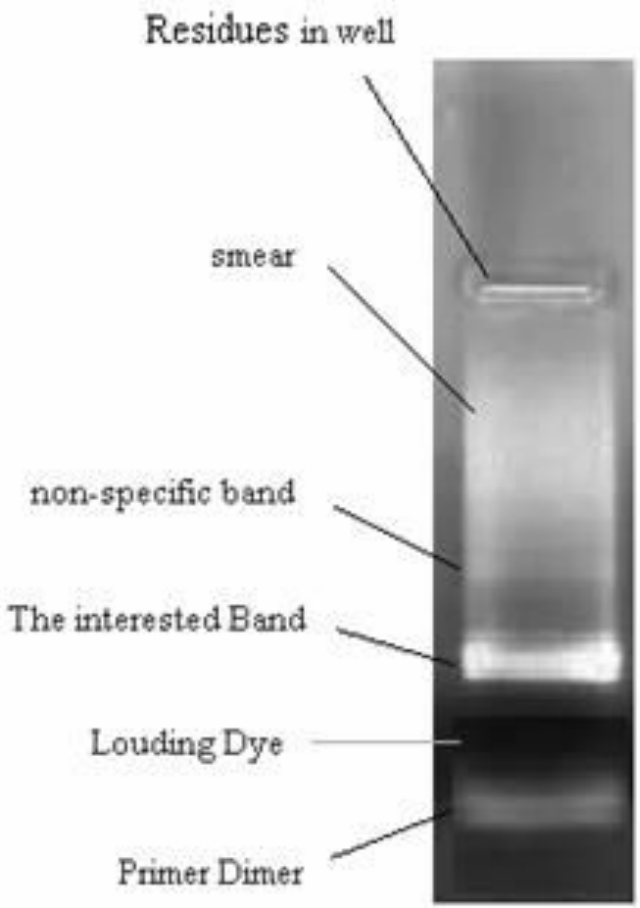




Димеры праймеров



Если все сделано правильно, то…



При проявлении в агарозном геле:

- Видна тонкая полоска
- В лунке нет остатков образца
- Нет «шмира»
- Нет неспецифичных продуктов реакции
- Нет димеров праймеров