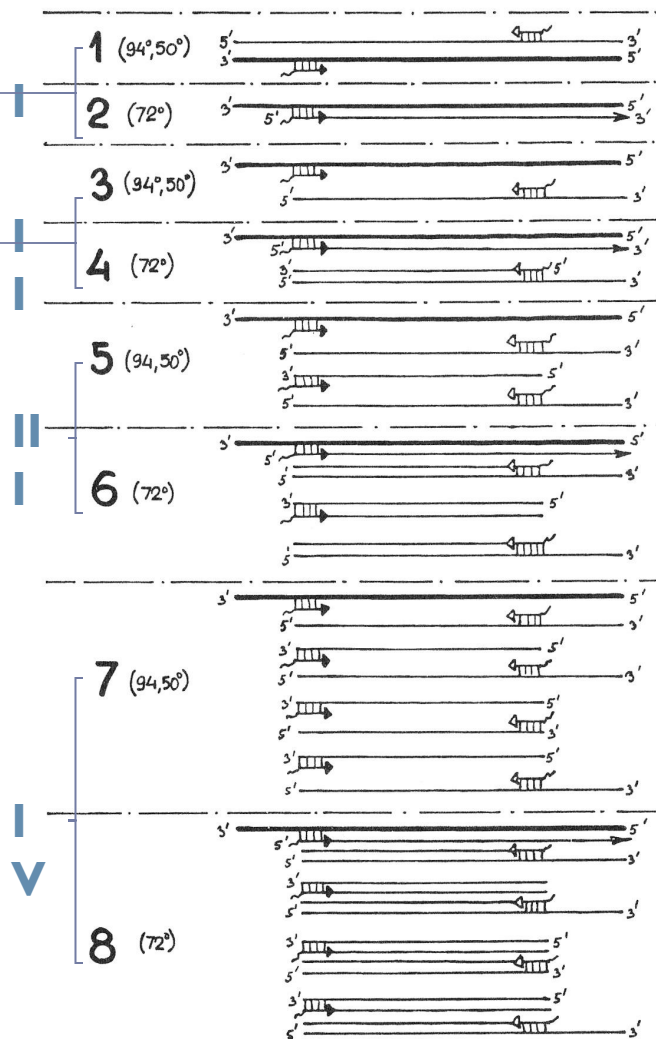




# Критические компоненты и параметры ПЦР

# 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 олигонуклеотидных праймера, фланкирующих исследуемый фрагмент мДНК. Реакционную смесь разогревают до температуры  $\sim 95^{\circ}\text{C}$ , что приводит к расхождению цепей ДНК. Это дает возможность для «отжига» праймеров при температуре от  $37^{\circ}\text{C}$  до  $65^{\circ}\text{C}$ , 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 окончании 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 амплификации недопустимы при определении первичной структуры амплифицированного локуса, или при использовании продукта ПЦР для синтеза кодируемого им белка в генно-инженерных системах экспрессии;
- **Эффективность синтеза ДНК** – количественно оценивается по выходу продукта после окончания реакции. Теоретически через  $n$  циклов количество продуктов ПЦР 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 находиться 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:  $[4(\text{Г}+\text{Ц})+2(\text{А}+\text{Т})]-5^{\circ}\text{C}$ , при длине праймера  $\leq 20$  нт, или  $62,5 + 0,41^{\circ}\text{C} (\% \text{Г-Ц})$  при длине праймера  $\geq 20$  нт.;
- Желательно, чтобы температуры отжига пары праймеров для ПЦР совпадали, хотя допускается различие в 4-6 $^{\circ}\text{C}$ ;
- При выборе мест отжига праймеров на матрице необходимо избегать участков, которые в одноцепочечной форме образуют вторичную структуру;



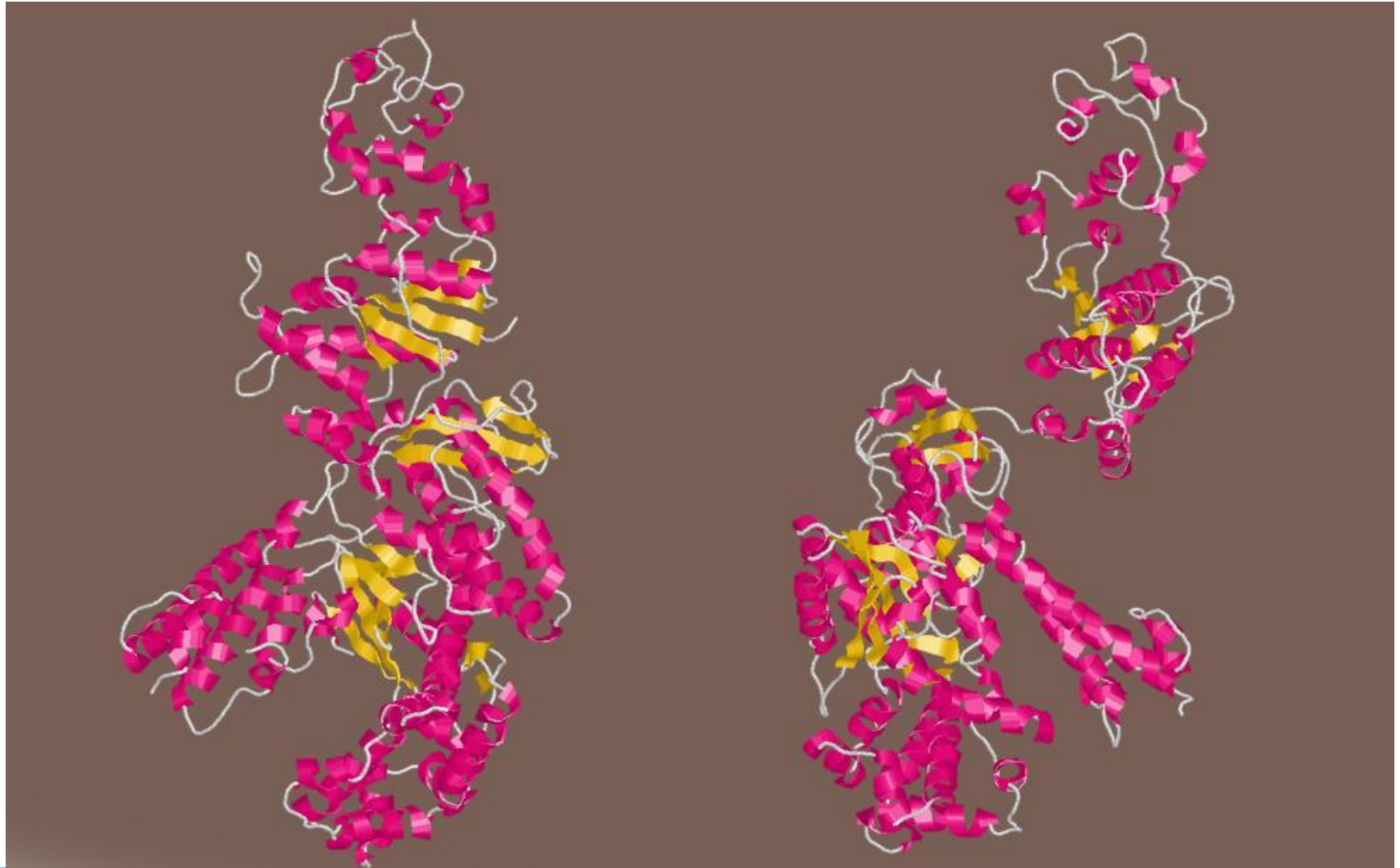
# ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ

---

- Для эффективной ПЦР не требуется полной комплементарности 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 неспецифического 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
<b>Taq – ДНК - полимераз</b>	$5,0 \cdot 10^{-6}$	-	Наиболее распространенный фермент
Tth – ДНК - полимераз			В присутствии ионов $Mn^{2+}$ обладает активностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы
Pfu-ДНК-полимераз	<b><math>1.3 \cdot 10^{-6}</math></b>	3' → 5'	При использовании в смеси с Taq-полимеразой способствует образованию продуктов ПЦР с тупыми концами
Vent – ДНК - полимераз	$2,8 \cdot 10^{-6}$	3' → 5'	Не способна амплифицировать матрицы, если в них присутствуют остатки I или dU.
Deep Vent - ДНК - полимераз	$2.7 \cdot 10^{-6}$	3' → 5'	Позволяет амплифицировать участки ДНК длиной по крайней мере до 14 т.п.о.
UITma – ДНК - полимераз	$5,0 \cdot 10^{-6}$	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°C  
позволяет  
инактивировать  
примесные белки и  
способствует более  
полной денатурации  
матричной ДНК



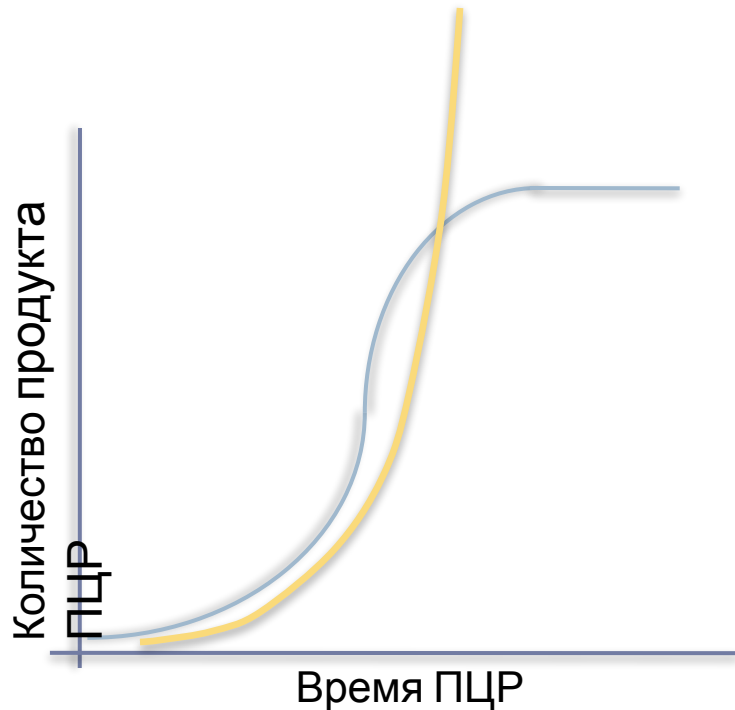
ПЦР



Выдерживание  
реакционной смеси  
в течении 5-10  
минут при  
температуре 72°C  
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:

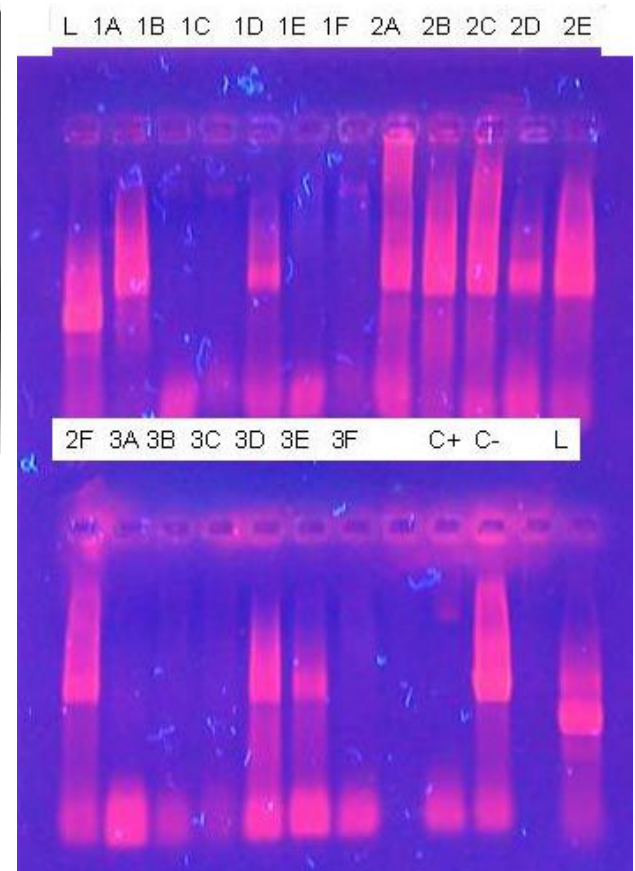
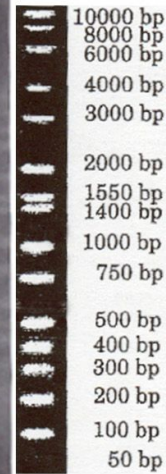
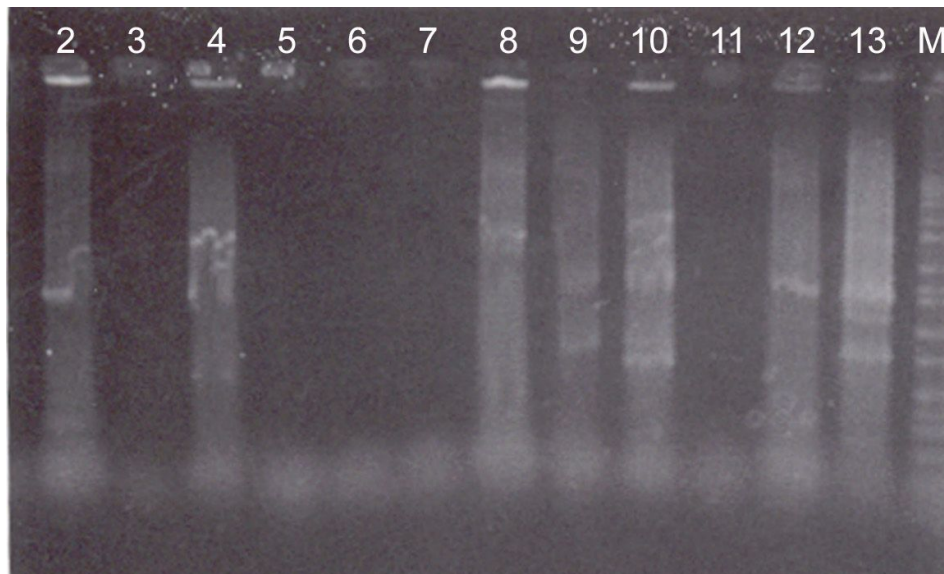
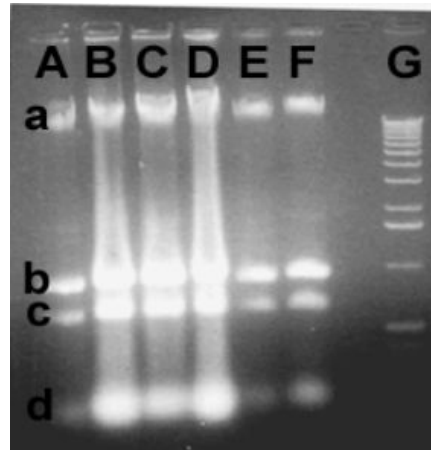
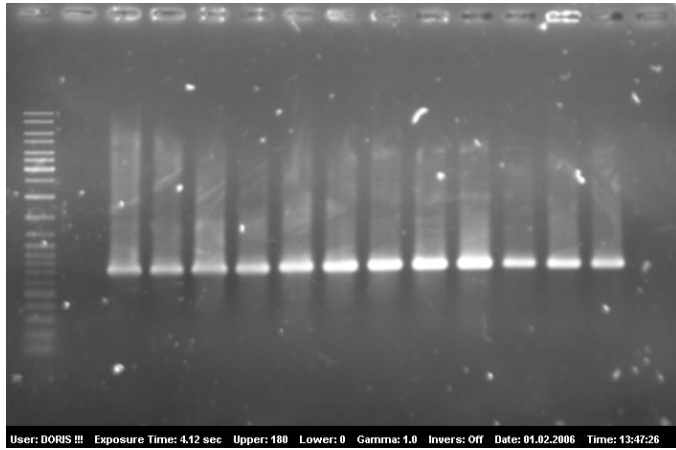
- Истощение субстрата (дНТФ или праймеров)
- Ингибирование ПЦР конечными продуктами реакции
- Конкуренция за субстрат со стороны неспецифичных продуктов реакции
- Неполная денатурации дцДНК
- Стабильность компонентов реакции
- «Изнашивание» ДНК-полимераз
- Увеличение вязкости реакционной смеси (препятствует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



# К ЧЕМУ ЭТО ВСЕ?

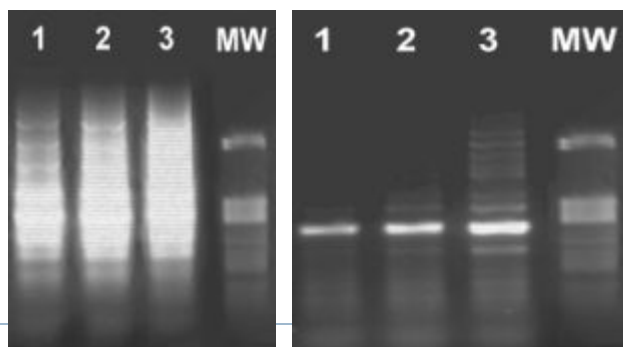
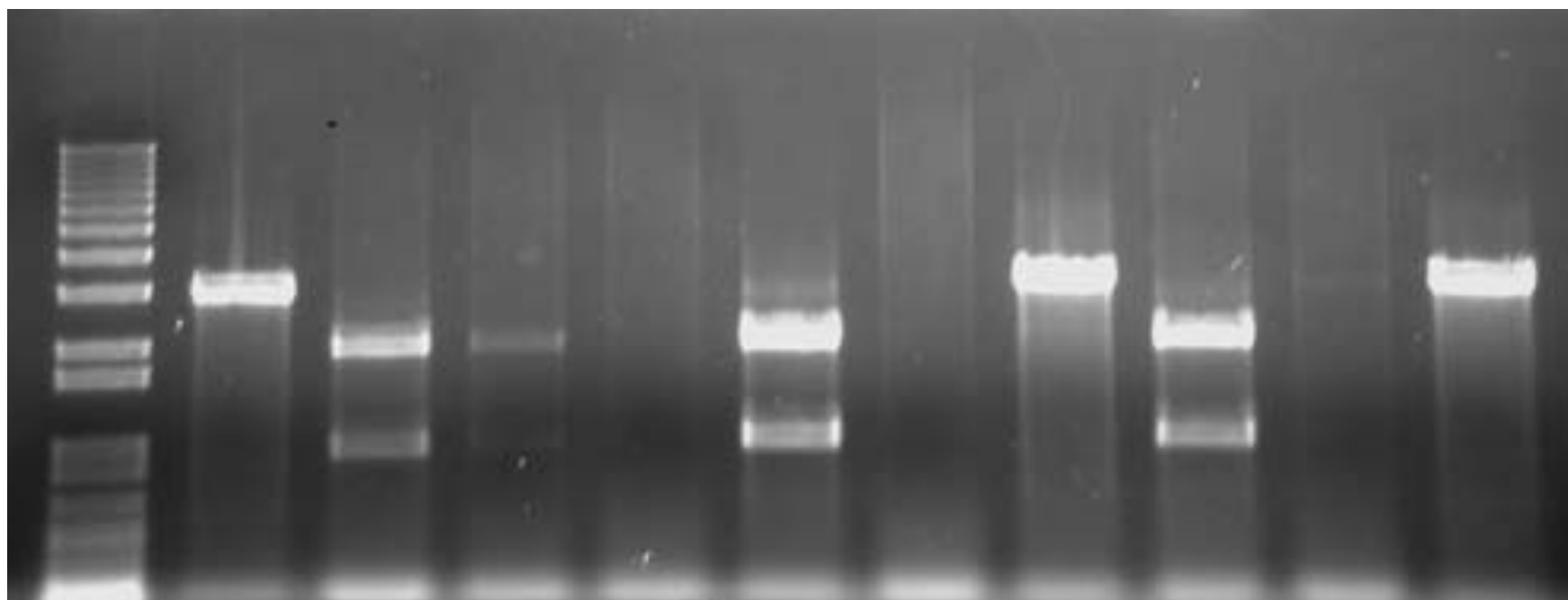
Неверный подбор условий и компонентов ПЦР приводит к образованию побочных продуктов реакции, «шмира», димеров праймеров, низкому выходу или полному отсутствию продуктов реакции

# «ШМИР»



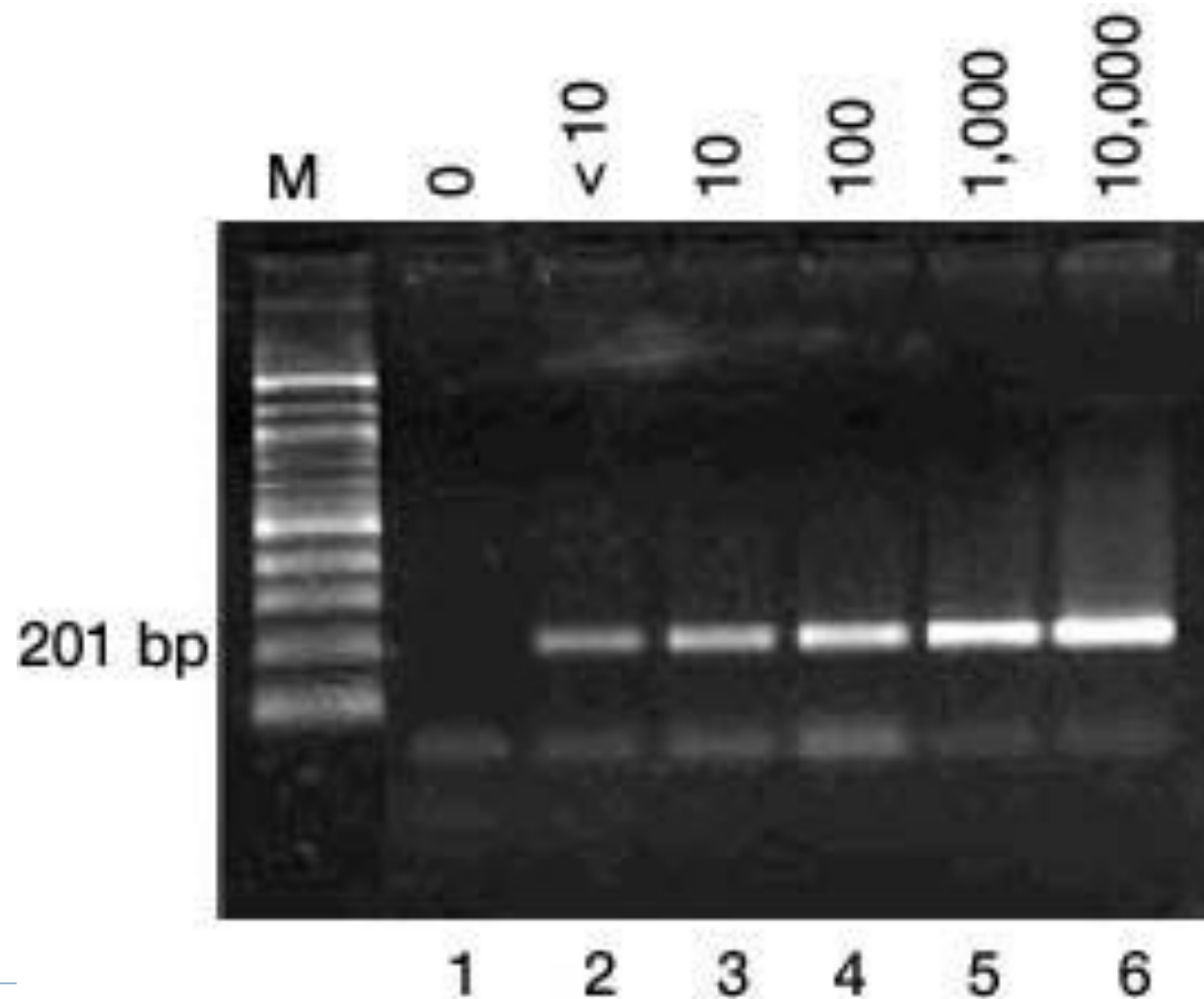
# Неспецифические продукты ПЦР

---



# 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