

# Полимеразная цепная реакция - ПЦР

- **Что такое ПЦР?**
- **Компоненты ПЦР**
- **Принцип ПЦР**
- Историческая перспектива:  
развитие ПЦР  
и применения Taq-полимеразы
- **Технические аспекты ПЦР**
- **«Вариации на тему ПЦР»**  
различные протоколы на базе ПЦР  
количественный ПЦР в реальном времени  
(real time quantitative PCR)

# Что такое ПЦР?

Методика для «усиления» (получения многочисленных копий) специфического участка двухцепочной ДНК.

В ходе ПЦР-реакции образуются в больших количествах два **амплимера** – участка ДНК, заданного гена.

При расплавлении ДНК два праймера прикрепляются к комплиментарным участкам темплейта. **Термостабильная ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза)**

синтезирует комплиментарные участки амплимера, начиная от праймера.

Каждый цикл включает нагрев для денатурации ДНК и частичного охлаждения для возможности прикрепления праймеров к темплейту, с которого снимается копия.

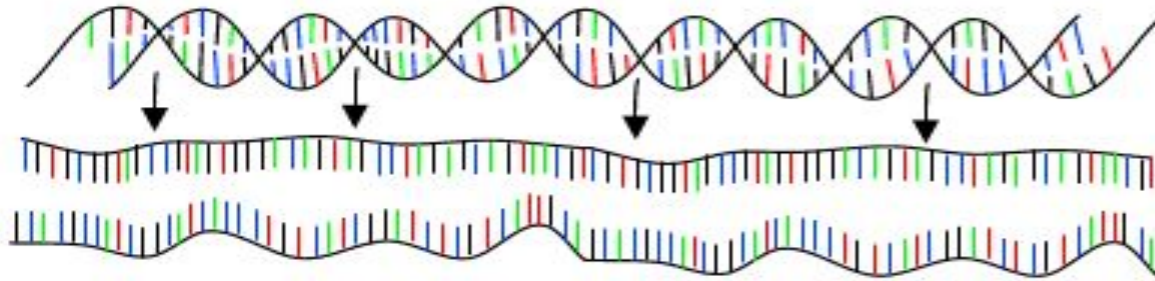
При частичном охлаждении также **Taq-полимераза** синтезирует копию гена или его заданного участка. Каждый цикл удваивает количество ДНК до цикла.

# Компоненты ПЦР

- **ДНК-темплейт**, например, грубый клеточный экстракт, общая геномная ДНК, плазмидная ДНК и т.д. (нанограммы)
- **Два олигонуклеотидных праймера**  
обычно 20 нуклеотидов (20-mer), (бывает 18-30!)  
(д.б. Одинаковой температуры плавления  $T_m$  of  $\sim 60^\circ\text{C}$ )
- **dNTPs** – деоксинуклеозид-трифосфаты  
(dATФ, dЦТФ, dГТФ, dТТФ)
- **ДНК-полимераза** (и буффер)  
обычно *Taq-ДНК-полимераза*
- **ПЦР-буффер**, обычно с  $\text{Mg}^{2+}$

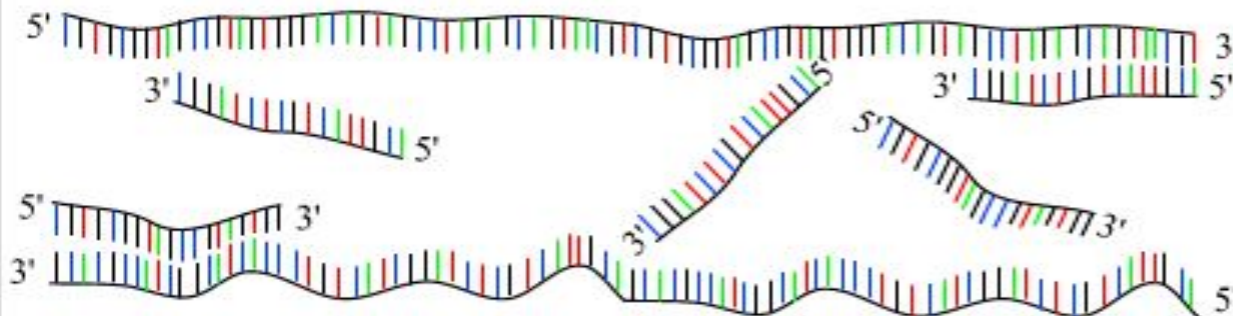
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

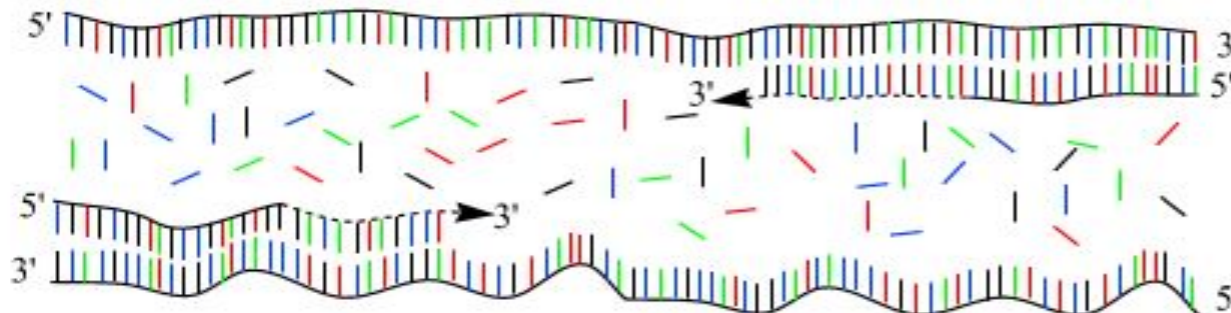
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

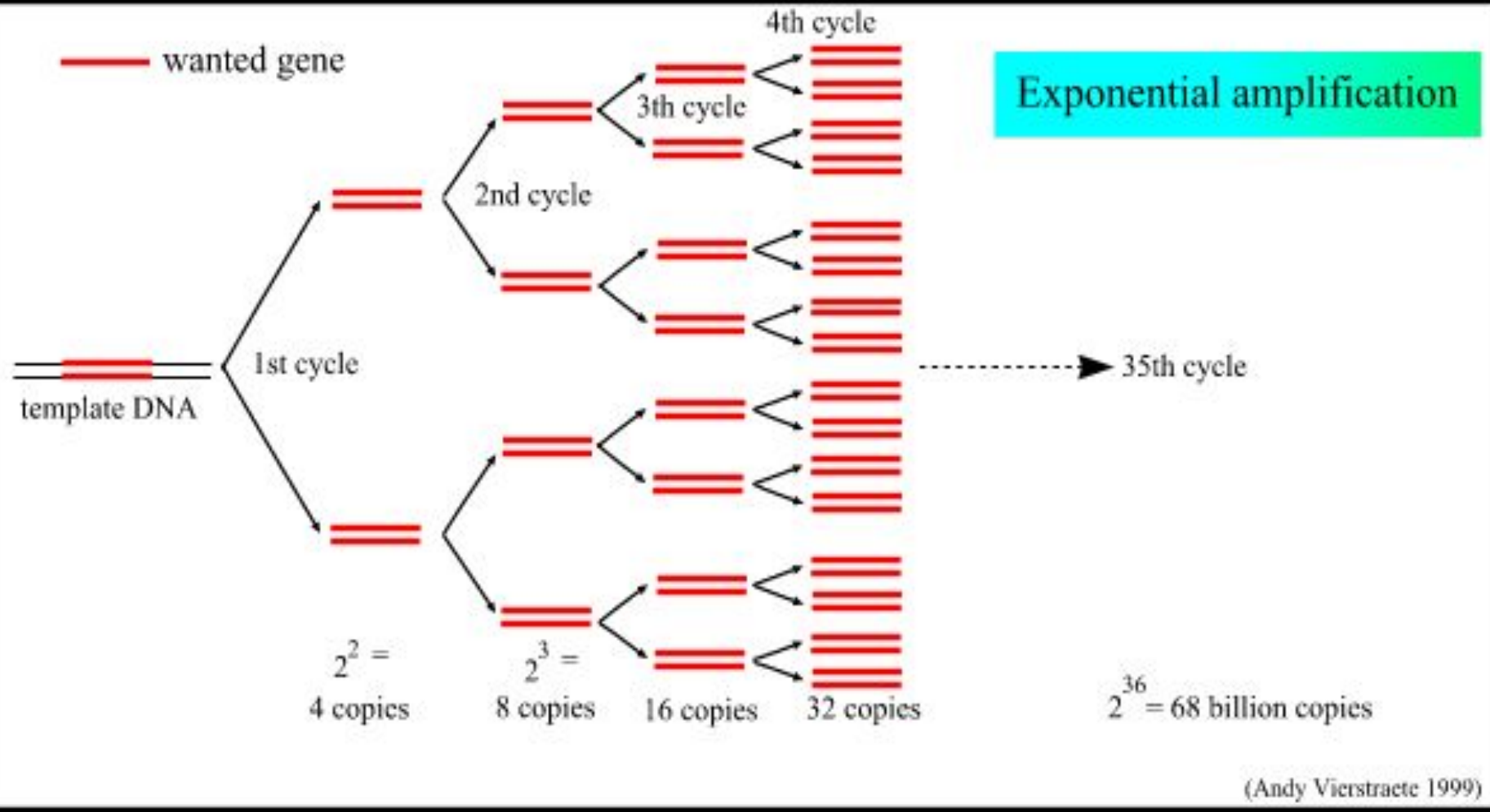
**forward and reverse primers !!!**



**Step 3 : extension**

2 minutes 72 °C

**only dNTP's**



## □ Историческая перспектива I

□ **метод был предложен в 1983** группой, работающей в Корпорации Cetus.

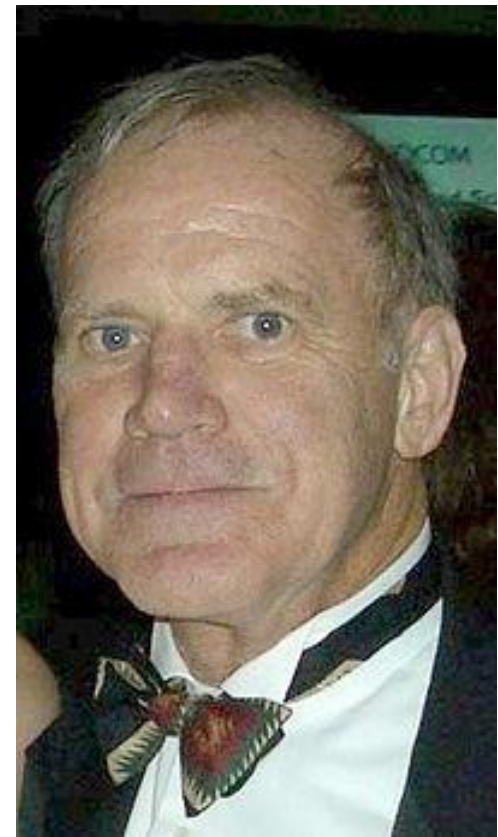
*Кэри Муллиз считается разработчиком (лауреат Нобелевской премии по химии 1993 года).*

□ Впервые опубликовано:

□ **Saiki et al., (1985) Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.**

□ **В начале проводилась в ванночках с горячим раствором разной температуры** – сейчас это делают ПЦР-машины

□ **Фермент:** Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. Coli*. Была необходимость добавления свежего фермента после каждого цикла денатурации



*Кэри Муллиз*

## Enzymatic Amplification of $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia

Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis  
Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

Recent advances in recombinant DNA technology have made possible the molecular analysis and prenatal diagnosis of several human genetic diseases. Fetal DNA obtained by amniocentesis or chorionic villus sampling can be analyzed by restriction enzyme digestion, with subsequent electrophoresis, Southern transfer, and specific hybridization to cloned gene or oligonucleotide probes. With

This disease results from homozygosity of the sickle-cell allele ( $\beta^S$ ) at the  $\beta$ -globin gene locus. The S allele differs from the wild-type allele ( $\beta^A$ ) by substitution of an A in the wild-type to a T at the second position of the sixth codon of the  $\beta$  chain gene, resulting in the replacement of a glutamic acid by a valine in the expressed protein. For the prenatal diagnosis of sickle cell anemia, DNA ob-

**Abstract.** *Two new methods were used to establish a rapid and highly sensitive prenatal diagnostic test for sickle cell anemia. The first involves the primer-mediated enzymatic amplification of specific  $\beta$ -globin target sequences in genomic DNA, resulting in the exponential increase (220,000 times) of target DNA copies. In the second technique, the presence of the  $\beta^A$  and  $\beta^S$  alleles is determined by restriction endonuclease digestion of an end-labeled oligonucleotide probe hybridized in solution to the amplified  $\beta$ -globin sequences. The  $\beta$ -globin genotype can be determined in less than 1 day on samples containing significantly less than 1 microgram of genomic DNA.*

polymorphic DNA markers linked genetically to a specific disease locus, segregation analysis must be carried out with restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) found to be informative by examining DNA from family members (1, 2).

Many of the hemoglobinopathies, however, can be detected by more direct methods in which analysis of the fetus alone is sufficient for diagnosis. For example, the diagnosis of hydrops fetalis (homozygous  $\alpha$ -thalassemia) can be made by documenting the absence of any  $\alpha$ -globin genes by hybridization with an  $\alpha$ -globin probe (3-5). Homozygosity for certain  $\beta$ -thalassemia alleles can be determined in Southern transfer experiments by using oligonucleotide probes that form stable duplexes with the normal  $\beta$ -globin gene sequence but form unstable hybrids with specific mutants (6, 7).

Sickle cell anemia can also be diagnosed by direct analysis of fetal DNA.

tained by amniocentesis or chorionic villus sampling can be treated with a restriction endonuclease (for example, Dde I and Mst II) that recognizes a sequence altered by the  $\beta^S$  mutation (8-11). This generates  $\beta^A$ - and  $\beta^S$ -specific restriction fragments that can be resolved by Southern transfer and hybridization with a  $\beta$ -globin probe.

We have developed a procedure for the detection of the sickle cell mutation that is very rapid and is at least two orders of magnitude more sensitive than standard Southern blotting. There are two special features to this protocol. The first is a method for amplifying specific  $\beta$ -globin DNA sequences with the use of oligonucleotide primers and DNA polymerase (12). The second is the analysis of the  $\beta$ -globin genotype by solution hybridization of the amplified DNA with a specific oligonucleotide probe and subsequent digestion with a restriction endonuclease (13). These two techniques increase the speed and sensitivity, and

lessen the complexity of prenatal diagnosis for sickle cell anemia; they may also be generally applicable to the diagnosis of other genetic diseases and in the use of DNA probes for infectious disease diagnosis.

**Sequence amplification by polymerase chain reaction.** We use a two-step procedure for determining the  $\beta$ -globin genotype of human genomic DNA samples. First, a small portion of the  $\beta$ -globin gene sequence spanning the polymorphic Dde I restriction site diagnostic of the  $\beta^A$  allele is amplified. Next, the presence or absence of the Dde I restriction site in the amplified DNA sample is determined by solution hybridization with an end-labeled complementary oligomer followed by restriction endonuclease digestion, electrophoresis, and autoradiography.

The  $\beta$ -globin gene segment was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) procedure of Mullis and Faloona (12) in which we used two 20-base oligonucleotide primers that flank the region to be amplified. One primer, PC04, is complementary to the (+)-strand and the other, PC03, is complementary to the (-)-strand (Fig. 1). The annealing of PC04 to the (+)-strand of denatured genomic DNA followed by extension with the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I and deoxynucleotide triphosphates results in the synthesis of a (-)-strand fragment containing the target sequence. At the same time, a similar reaction occurs with PC03, creating a new (+)-strand. Since these newly synthesized DNA strands are themselves template for the PCR primers, repeated cycles of denaturation, primer annealing, and extension result in the exponential accumulation of the 110-base pair region defined by the primers.

An example of the degree of specific gene amplification achieved by the PCR method is shown in Fig. 2A. Samples of DNA (1  $\mu$ g) were amplified for 20 cycles and a fraction of each sample, equivalent to 36 ng of the original DNA, was subjected to alkaline gel electrophoresis and transferred to a nylon filter. The filter was then hybridized with a  $^{32}$ P-labeled 40-base oligonucleotide probe, RS06, which is complementary to the target sequence (Fig. 1A) but not to the PCR primers. The results, after a 2-hour autoradiographic exposure, show that a fragment hybridizing with the RS06 probe

The authors are in the Department of Human Genetics, Cetus Corporation, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, California 94608. The present address for N.A. is Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles 90089-0371.

# □ Историческая перспектива II

## □ **Изоляция Taq-ДНК-полимеразы**

Источник: *Thermus aquaticus*

Ключевое свойство: термостабильность

□ Применение Taq в ПЦР было впервые описано:

□ **Saiki R. K et al., (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988 239:487-91.**

4Эта находка революционизировала ПЦР, сейчас это основной фермент в большинстве приложений на основе ПЦР



## Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase

RANDALL K. SAIKI, DAVID H. GELFAND, SUSANNE STOFFEL, STEPHEN J. SCHARF, RUSSELL HIGUCHI, GLENN T. HORN, KARY B. MULLIS,\* HENRY A. ERLICH

A thermostable DNA polymerase was used in an in vitro DNA amplification procedure, the polymerase chain reaction. The enzyme, isolated from *Thermus aquaticus*, greatly simplifies the procedure and, by enabling the amplification reaction to be performed at higher temperatures, significantly improves the specificity, yield, sensitivity, and length of products that can be amplified. Single-copy genomic sequences were amplified by a factor of more than 10 million with very high specificity, and DNA segments up to 2000 base pairs were readily amplified. In addition, the method was used to amplify and detect a target DNA molecule present only once in a sample of  $10^5$  cells.

THE ANALYSIS OF SPECIFIC NUCLEOTIDE sequences, like many analytic procedures, is often hampered by the presence of extraneous material or by the extremely small amounts available for examination. We have recently described a method, the polymerase chain reaction (PCR), that overcomes these limitations (1, 2). This technique is capable of producing a selective enrichment of a specific DNA sequence by a factor of  $10^6$ , greatly facilitating a variety of subsequent analytical manipulations. PCR has been used in the examination of nucleotide sequence variations (3-5) and chromosomal rearrangements (6), for high-efficiency cloning of genomic sequences (7), for direct sequencing of mitochondrial (8) and genomic DNAs (9, 10), and for the detection of viral pathogens (11).

PCR amplification involves two oligonucleotide primers that flank the DNA segment to be amplified and repeated cycles of heat denaturation of the DNA, annealing of the primers to their complementary sequences, and extension of the annealed primers with DNA polymerase. These primers hybridize to opposite strands of the target sequence and are oriented so DNA synthesis by the polymerase proceeds across the region between the primers, effectively doubling the amount of that DNA segment. Moreover, since the extension products are also complementary to and capable of binding primers, each successive cycle essentially doubles the amount of DNA synthesized in the previous cycle. This results in the exponential accumulation of the specific target

fragment, approximately  $2^n$ , where  $n$  is the number of cycles.

One of the drawbacks of the method, however, is the thermostability of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I used to catalyze the extension of the annealed primers. Because of the heat denaturation step required to separate the newly synthesized strands of DNA, fresh enzyme must be added during each cycle—a tedious and error-prone process if several samples are amplified simultaneously. We now describe the replacement of the *E. coli* DNA polymerase with a thermostable DNA polymerase purified from the thermophilic bacterium, *Thermus aquaticus* (*Taq*), that can survive extended incubation at  $95^\circ\text{C}$  (12). Since this heat-resistant polymerase is relatively unaffected by the denaturation step, it does not need to be replenished at each cycle. This modification not only simplifies the procedure, making it amenable to automation, it also substantially improves the overall performance of the reaction by increasing the specificity, yield, sensitivity, and length of targets that can be amplified.

Samples of human genomic DNA were subjected to 20 to 35 cycles of PCR amplifi-

R. K. Saiki, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Cetus Corporation, Department of Human Genetics, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, CA 94608.  
D. H. Gelfand and S. Stoffel, Cetus Corporation, Department of Microbial Genetics, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, CA 94608.

\*Present address: Xytroxix, 6555 Nancy Ridge Drive, Suite 200, San Diego, CA 92121.

# Технические аспекты ПЦР

- ① Дизайн праймеров
- ② Температура ренатурации (отжига)
- ③ Предотвращение загрязнения
- ④ Число ПЦР-циклов
- ⑤ Концентрации  $Mg^{2+}$
- ⑥ Выбор полимеразы

# 1 Дизайн праймеров

□ **сбалансированная точка плавления  $T_m$  для обоих праймеров.**

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G + C) \times 4$$

□ **высокая консервативность 3'-конца – существенный фактор**

□ **желателен участок, обогащенный Г или Ц на 5'-конце; это повышает стабильность**

□ **избегание комплиментарности между праймерами, что снижает образование димеров из двух праймеров**

□ **избегание последовательных повторов Г и Ц, что снижает вероятность образования гарпинов**

□ **NCBI primerBLAST – одна из лучших программ для дизайна праймеров**

## ② Температура ренатурации (отжига)

обычно на 5 градусов ниже температуры плавления данных праймеров (5°C)

Более высокая температура ренатурации

Более высокая «stringency» – аккуратность связывания (выше требуемая комплиментарность)

Более низкая температура ренатурации -

Более низкая «stringency»

## 3 Предотвращение загрязнения

- Контроль реагентов**

  - используется только стерильная деионизованная или дистиллированная вода

- стерильная пластиковая посуда и непросроченные реагенты**

- дозаторы (автоматические пипетки), которые используются для ПЦР больше нигде не используются в лаборатории**

- отдельная ПЦР-кабинеты**

## ④ Число ПЦР-циклов

### □ С увеличением кол-ва ПЦР-циклов

😊 + растет кол-во (“урожай”) ДНК

😞 - растут ошибки в последовательности НК

😞 - если используется смесь темплейтов, то увеличивается вероятность образования химер (*при смешении последовательностей двух темплейтов*)

## 5 Концентрация $Mg^{2+}$

- увеличение  $[Mg^{2+}]$  приводит к:
  - повышению стрингетности (четкости гибридизации)
  - снижению кол-ва синтезируемых НК (вследствие частичной инактивации полимераз под действием  $Mg^{2+}$ )
- рекомендуемая концентрация:  
1.5-3 мМ  $MgCl_2$

# 6 Выбор полимеразы

## □ **Тaq-полимеразы :**

### *Преимущества:*

- ☺ **Высокий «урожай» (выход НК)**
- ☺ Таq-полимераза добавляет А (аденозин) на обоих концах синтезируемой НК, что облегчает клонирование в так-называемых ТА-векторах

### *Недостатки:*

- ☹ Высокая степень ошибок, отсутствие так-называемого пруффридинга (проверки, редакции) синтезируемой НК

## □ **Альтернативные полимеразные системы:**

Все обладают пруффридингом (proof-reading): 3' - 5'-экзонуклеазной активностью

*Pwo (Pyrococcus woesei),*

*Vent (Thermococcus litoralis)*

*Pfu (Pyrococcus furiosus)*

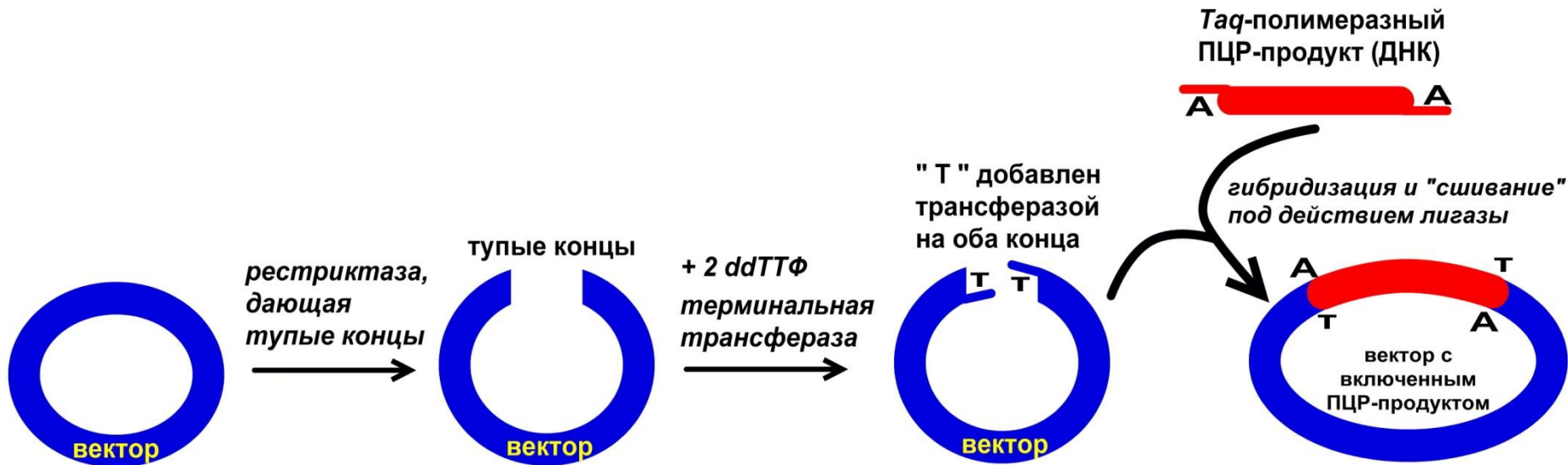
- ☺ **высокий уровень точности (совпадения)**
- ☹ образуются продукты с тупыми концами Blunt-ended products
- ☹ низкая производительность

**Наиболее часто исследователи используют комбинации ферментов:  
например «Expand» (смесь Taq и Pwo)**

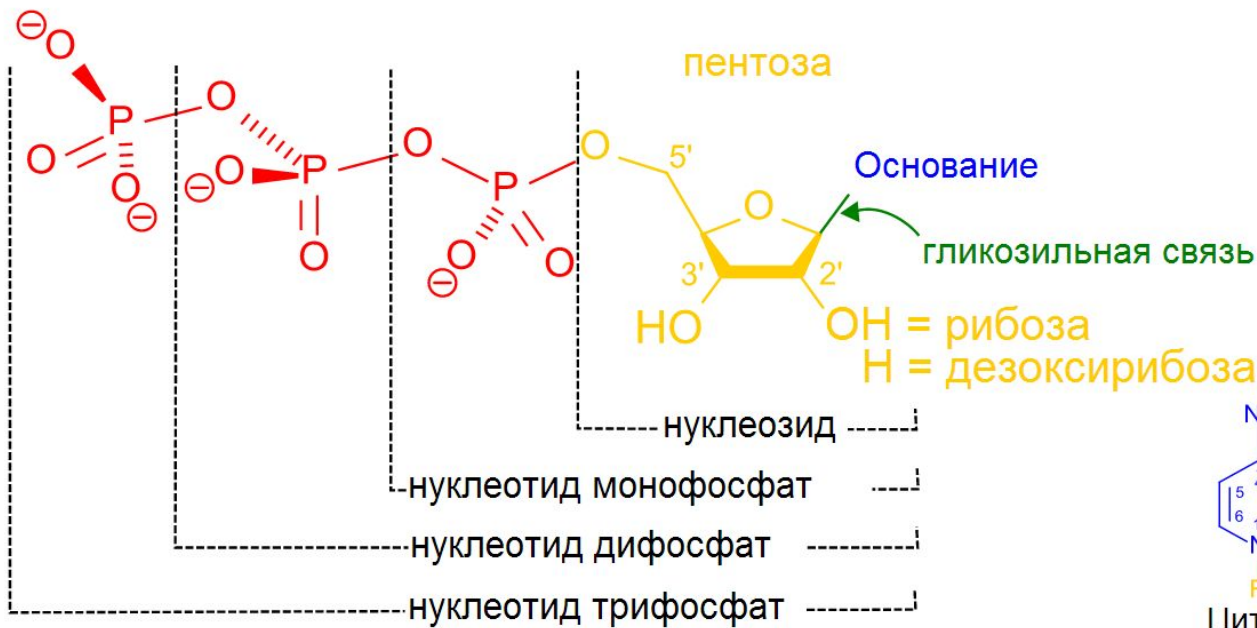


# TA-клонирование ПЦР-продуктов

- *главное преимущество это простота и дешевизна, так как требуется всего одна рестриктаза и небольшой набор других ферментов и методических этапов:*



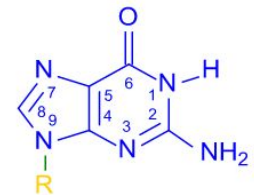
# Повторение: «химия» нуклеиновых оснований:



## Пурины

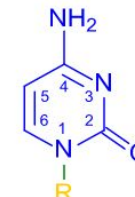


Аденин

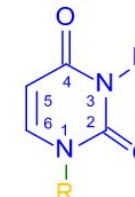


Гуанин

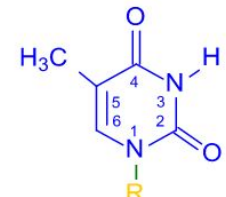
## Пиримидины



Цитозин



Урацил



Тимин

## Сокращения для нуклеиновых оснований:

**A** — А: Аденин;

**G** — Г: Гуанин;

**C** — Ц: Цитозин;

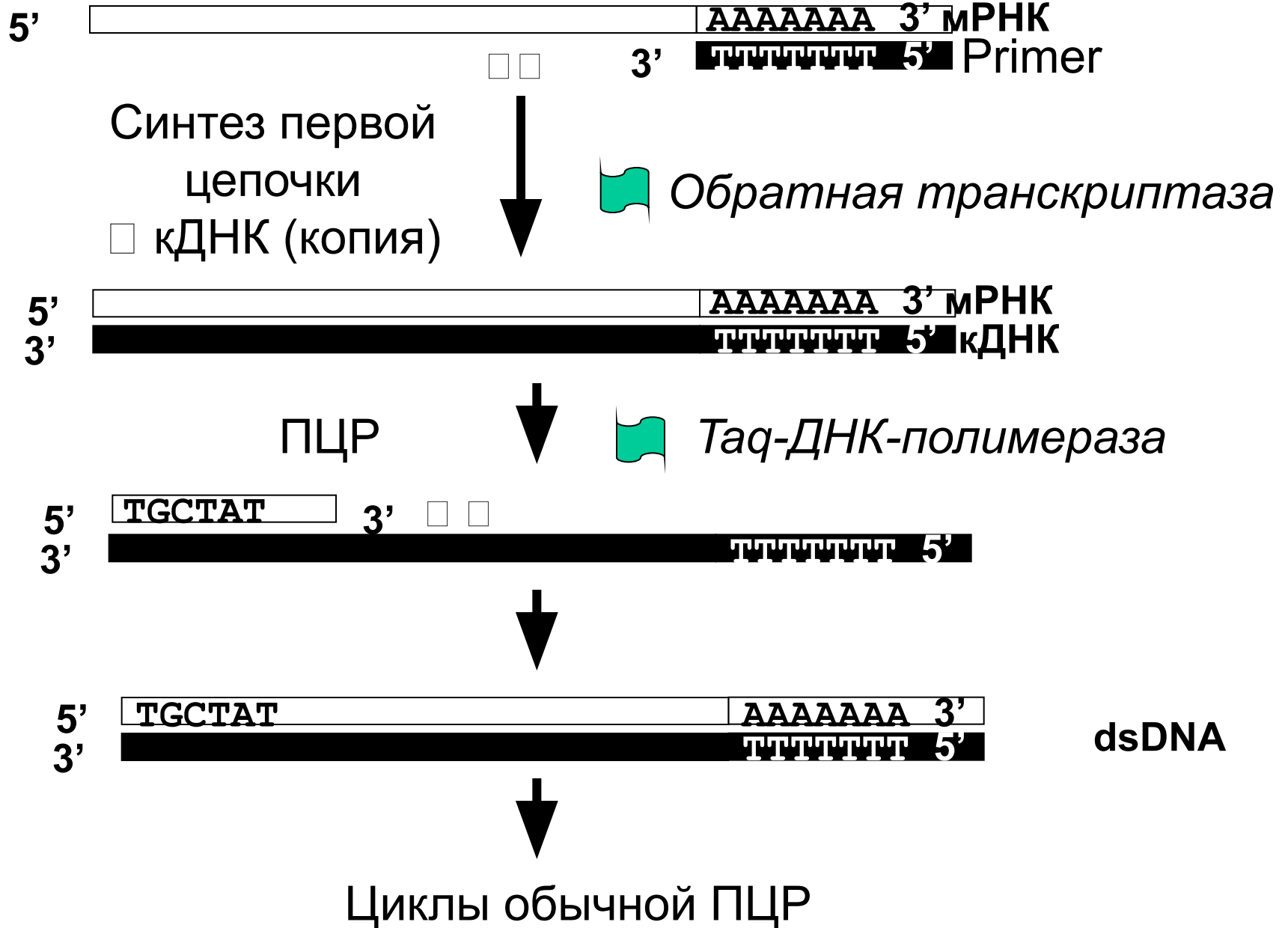
**T** — Т: Тимин (5-метилурацил), только в ДНК;

**U** — У: Урацил, только в РНК.

# Вариации на тему ПЦР: производные протоколы

- ❶ ПЦР из РНК – при помощи обратной транскриптазы
- ❷ Клонирование ПЦР-продуктов
- ❸ «Циклическое» ПЦР-секвенирование
- ❹ ПЦР-фингерпринтинг и создание генетических карт
- ❺ Оптимизированное ПЦР:
  - Hot-start ПЦР
  - Nested ПЦР
  - Touchdown ПЦР
  - Long ПЦР
- ❻ Детекция множественных генов – мультиплексная ПЦР
- ❼ Количественная и конкурентная ПЦР
- ❽ Локализация сайтов экспрессии генов – ПЦР *in situ*

# ПЦР при помощи обратной транскриптазы (RT-PCR)



# RT- PCR (reverse transcriptase PCR)

## Области применения:

- Позволяет получить подтверждение того, что определенный ген экспрессируется, при том даже если экспрессия очень низка
- Может быть использована для подсчета экспрессии генов во времени в зависимости от различных действующих факторов и условий (например, атака патогенов, засоление или активация определенных программ развития – цветение, закладка семян, биосинтез фенольных производных, морфогенез и т.д.)
- Сравнение уровня экспрессии гена по отношению к контролю (при генетических манипуляциях)

## Недостатки:

- Может быть использована только для известных генов
- Необходимость высокой специфичности праймеров
- Проблема контроля – экспрессия всех генов изменяется во времени, даже контрольных

# Оптимизация ПЦР

## □ Hot-start ПЦР (горячий старт)

Реакция удерживается на «ДНК-денатурирующей температуре до добавления ферментов и нуклеотидов:

- предотвращает формирование димеров праймеров
- снижает уровень миспрайминга (неправильного присоединения праймеров)

□ **Chou et al., 1992 Nucl. Acids Res. 20, 1717-1723.**

## □ Nested ПЦР (гнездовой ПЦР)

первое применение – ДНК β-глобулина – сначала усиление большого участка, потом более короткого (2 набора праймеров)

□ **Mullis & Faloona, 1987 Meth. Enzymol. 155,335-350.**

□ **Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR)** – для уменьшения влияния неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72-75°C, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60-65°C. □  
□ **Don et al., 1991 Nucl. Acids. Res. 19, 4008.**

# Оптимизирование ПЦР

## □ Long PCR (продолжительная ПЦР)

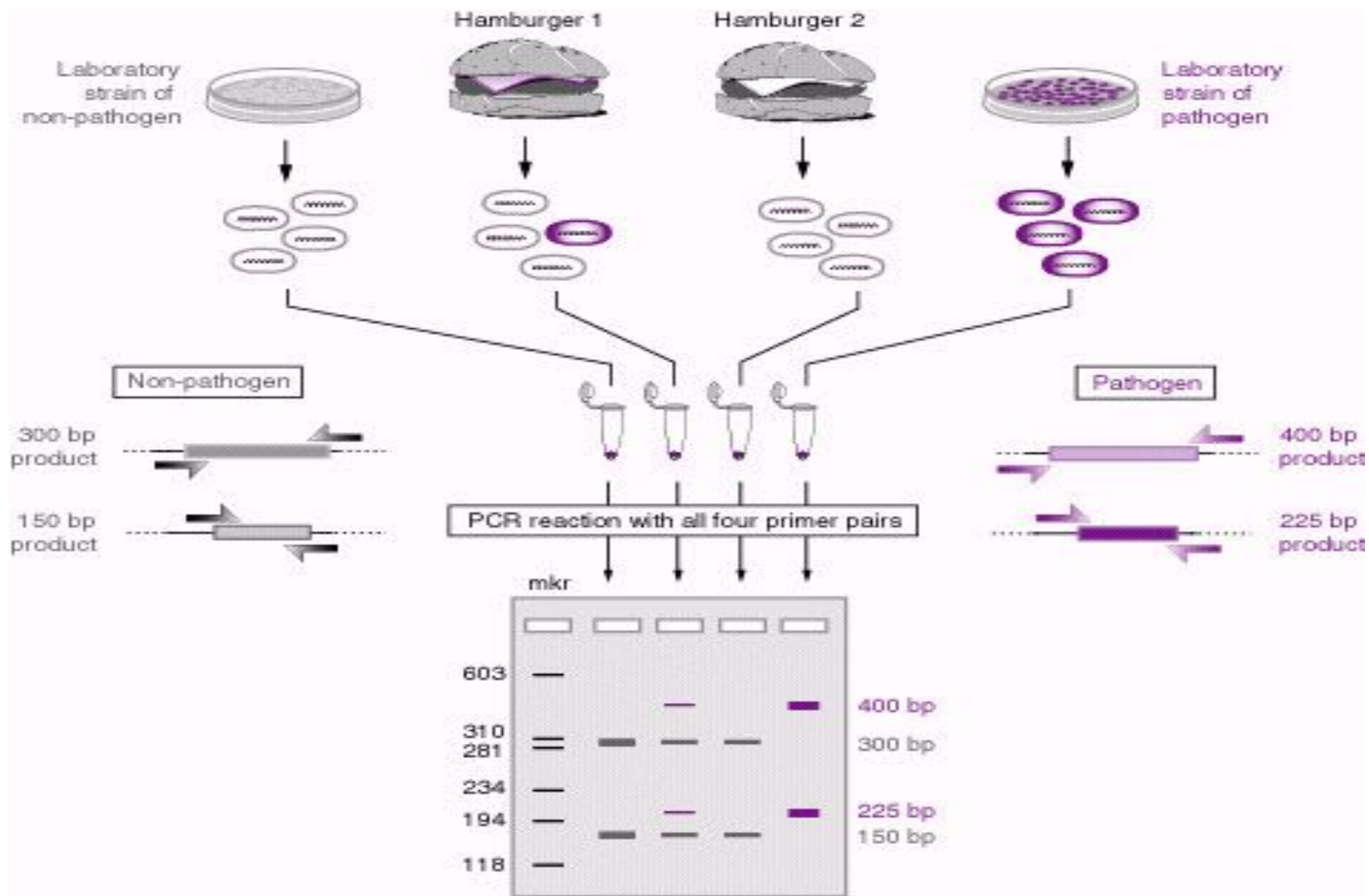
*Taq*-ДНК-полимераза обычно ограничена синтезом 5000 оснований поэтому ее комбинируют с другим ферментом, например, *Exrand*, *Pfu*, который может амплифицировать до 30000-40000 оснований

□ **Cheng *et al.*, 1994 PNAS (USA) 91, 5695-5699.**

**Вторая полимераза используется для корректировки ошибок *Taq*-полимеразы, которая останавливает синтез ДНК в случае добавления некомплементарного нуклеотида (его удаляет вторая полимераза).**

**Смесь полимераз: 50:1 или 100:1, т.е. *Taq*-полимеразы в 25-100 раз больше по отношению к *Pfu*-полимеразе.**

# Детекция множественных генов: Multiplex PCR



Miesfeld / Applied Molecular Genetics  
Fig. 06.10. Multiplex PCR



# Количественный анализ НК при помощи ПЦР

Многочисленные «неточности» делают процесс количественного ПЦР-анализа проблематичным

3 подхода:

а) конкурентная ПЦР: с использованием контрольной ДНК известной концентрации в качестве внутреннего стандарта.

б) саузерн-блот + ДНК-зонд (гибридизационная проба)

в) Real Time (с флуоресцентной детекцией) – наиболее широко используемый сейчас метод.

Смотрите доп. информ.: [Applied Biosystem's Real time PCR page](#)

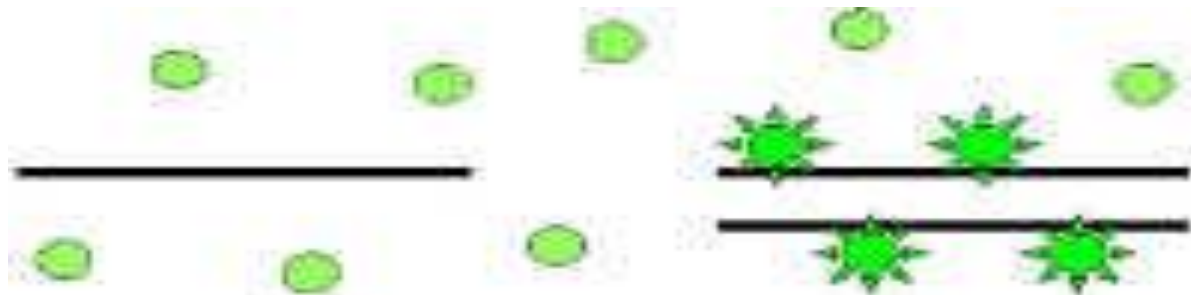
## **ПЦР *in situ***

- ПЦР внутри клетки**
- обычно это фиксированный на предметной стекле клеточный экстракт**

# Количественный ПЦР – анализ данных

В основе лежит флуоресценция, возрастающая по ходу ПЦР-эксперимента:

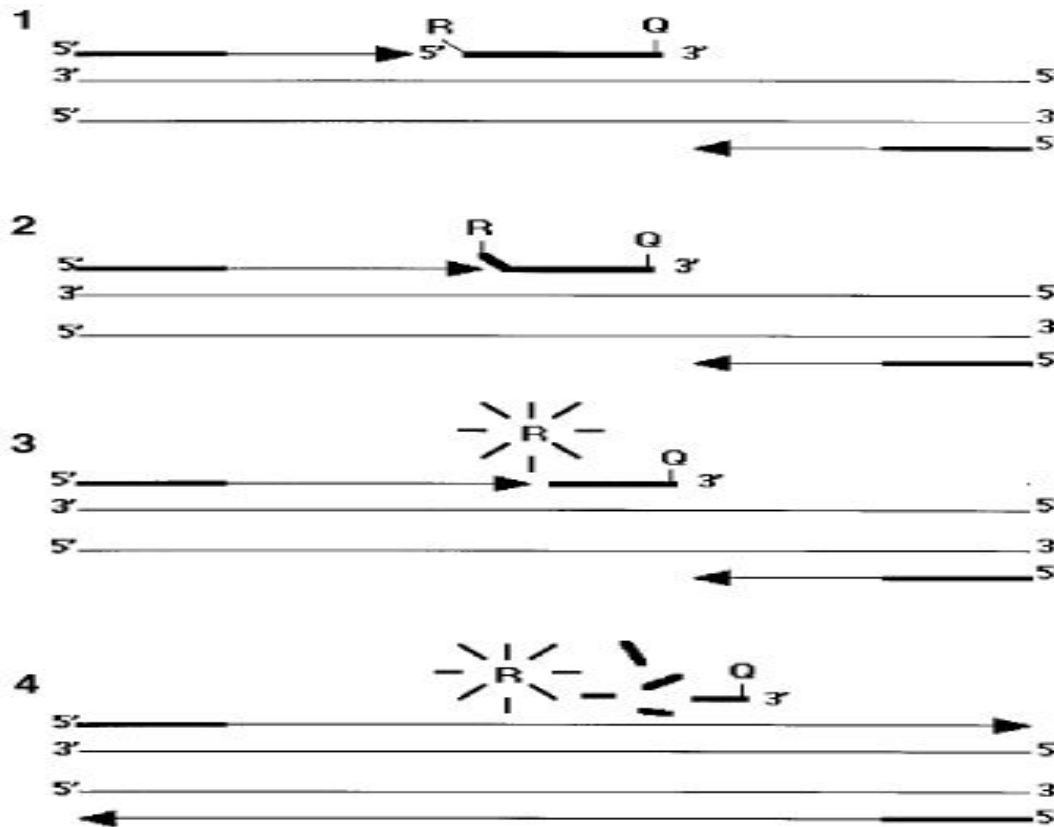
- С использованием флуоресцентного красителя SYBR green, который флуоресцирует ярче только в присутствии ds-ДНК. SYBR green может быть просто добавлен в реакционную смесь ПЦР-реакции, а его возрастающая флуоресценция будет свидетельствовать о росте концентрации ампликона.
- Главный недостаток: если праймеры образуют димеры в большой концентрации, то результаты являются артефактом.



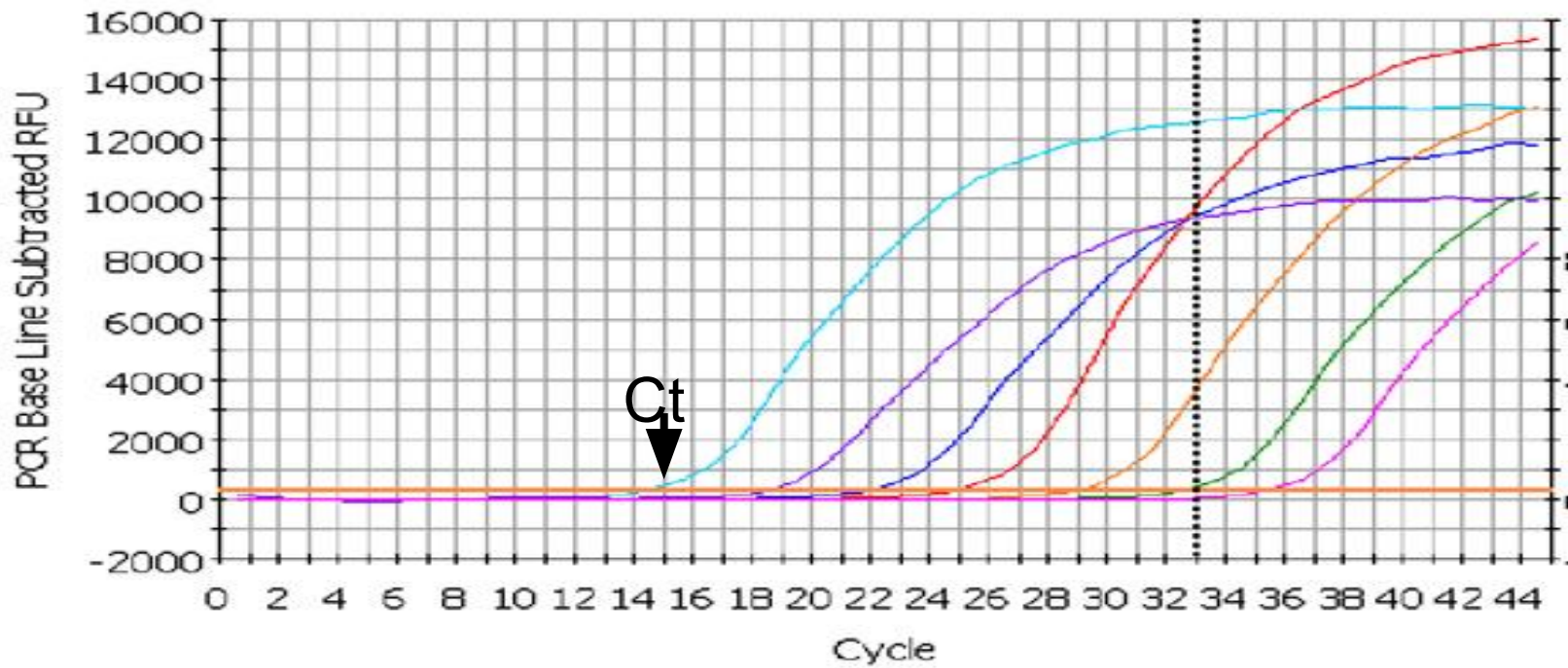
# Quantitative real time PCR – more details

-2

- Use of Taqman probes relies on a third primer (called the probe) labelled at the 5' end with a fluorescent molecule and a quencher (inhibitor of fluorescence at the 3' end). During PCR the probe is degraded by Taq polymerase and the fluor is separated from its quencher and an increase in fluorescence is detected



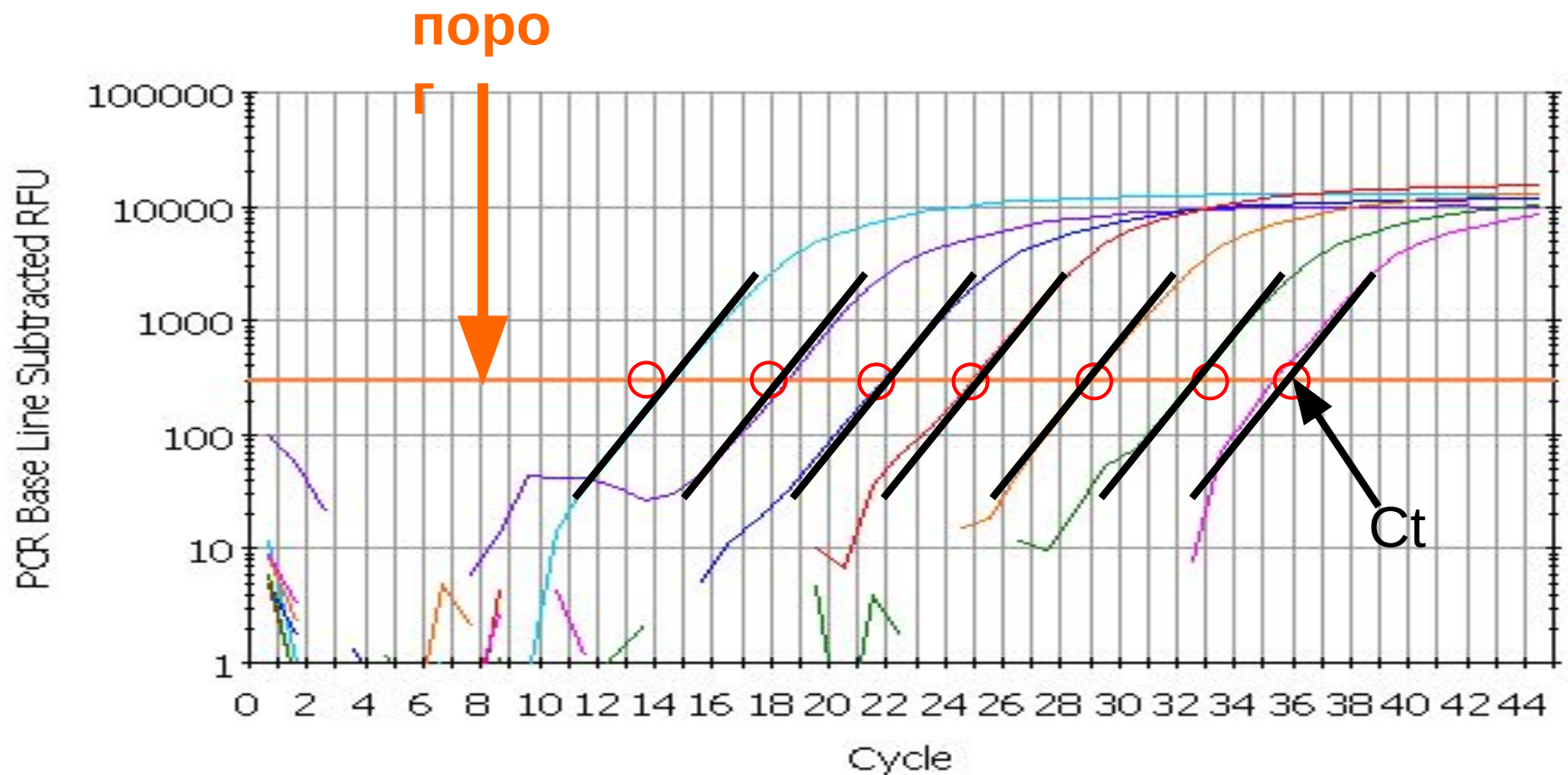
**Любой из методов даст экспоненциальные кривые роста интенсивности флуоресценции**



**SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS**

- Можно перевести интенсивность флуоресценции в логарифмический масштаб, что облегчает дальнейший анализ

- линейный наклон (эквивалент экспоненциального роста) отражает эффективность реакции и его угол не должен зависеть от количества ДНК, отклонения указывают на загрязнения или димеризацию праймеров



# Методы нормализации

- Обычно это нормализация ампликона ДНК или мРНК относительно гена-стандарта
- Например, когда требуется подсчитать мРНК (как кДНК-продукт), используются гены актина или тубулина, которые имеют высокую экспрессию в независимости от условий.
- Отсутствуют идеальные гены-стандарты и желательно использовать дополнительные методы детекции (например, нозерн-блот), чтобы показать, что экспрессия гена-стандарта не изменяется в ходе эксперимента.

Относительный уровень =  $\frac{\text{уровень мРНК в тесте}}{\text{уровень мРНК в контроле}}$   
(отношение )

- Уровни ДНК и РНК тестируемого гена могут быть вычислены относительно двух различных условий (например, в контроле и при стрессе) или относительно гена-стандарта.

$$X = 2^{\Delta Ct \text{ (target control - target test)}}$$

- Since values also have to be normalised the same calculation is done for the reference gene, eg. actin to give a value  $X_c$

$$X_c = 2^{\Delta Ct \text{ (actin control - actin test)}}$$



The final test versus control level of a DNA or mRNA molecule normalised for a reference gene can be put together as a ratio..... (see Pfaffl 2001)

$$\frac{X}{X_c} = \frac{2^{\Delta Ct (\text{target control} - \text{target test})}}{2^{\Delta Ct (\text{actin control} - \text{actin test})}}$$

This number assumes an efficiency per cycle of 100% = a doubling of PCR product (fluorescence value at every cycle). This is not always so  
.....

| <b>CYCLE</b> | <b>AMOUNT OF DNA<br/>100% EFFICIENCY</b> | <b>AMOUNT OF DNA<br/>70% EFFICIENCY</b> |
|--------------|--|---|
| 0            | 1  | 1                                       |
| 1            | 2  | 2                                       |
| 2            | 4  | 3                                       |
| 3            | 8  | 5                                       |
| 4            | 16                                       | 8                                       |
| 5            | 32                                       | 14                                      |
| 6            | 64                                       | 24                                      |
| 7            | 128                                      | 41                                      |
| 8            | 256                                      | 70                                      |
| 9            | 512                                      | 119                                     |
| 10           | 1,024                                    | 202                                     |
| 11           | 2,048                                    | 343                                     |
| 12           | 4,096                                    | 583                                     |
| 13           | 8,192                                    | 990                                     |
| 14           | 16,384                                   | 1,684                                   |
| 15           | 32,768                                   | 2,862                                   |
| 16           | 65,536                                   | 4,866                                   |
| 17           | 131,072                                  | 8,272                                   |
| 18           | 262,144                                  | 14,063                                  |
| 19           | 524,288                                  | 23,907                                  |
| 20           | 1,048,576                                | 40,642                                  |
| 21           | 2,097,152                                | 69,092                                  |
| 22           | 4,194,304                                | 117,456                                 |
| 23           | 8,388,608                                | 199,676                                 |
| 24           | 16,777,216                               | 339,449                                 |
| 25           | 33,554,432                               | 577,063                                 |
| 26           | 67,108,864                               | 981,007                                 |
| 27           | 134,217,728                              | 1,667,71                                |
| 28           | 268,435,456                              | 2,835,109                               |
| 29           | 536,870,912                              | 4,819,686                               |
| 30           | 1,073,741,824                            | 8,193,466                               |

**AMOUNT OF DNA**



**AFTER N CYCLES:  
fold increase =  
(efficiency)<sup>n</sup>**

Cycle efficiency (E) for a primer pair can be calculated from the log of the slope and this can be included in calculations.....(see Ramakers et al 2003)

$$\frac{X}{X_c} = \frac{E^{\Delta Ct \text{ (target control - target test)}}}{E^{\Delta Ct \text{ (actin control - actin test)}}$$

All of this can now be automated and roboticised such that many genes can be assayed at once. For example, the expression of 1400 transcription factor genes have been assayed simultaneously in Arabidopsis (model plant species) see Czechowski et al 2004

# Полезные статьи и интернет-ссылки:

- Glick, B.R. & Pasternak, J.J. (1998) 'Molecular Biotechnology'. pp. 96-108.
- Brown, T.A. (1999) 'Genomes' p20.

## Also:

- Strachan, T. & Read, A.P. (1999) Chapter 10
- McPherson *et al.*, (1995) PCR 2 : a practical approach.
- Newton, C.R. & Graham, A. (1997) PCR.
- Schuldiner *et al.*, (1989) Nucl. Acids. Res. 17,4409.
- Wang & Wang, (1996) Microbiology 142,1107-1114.
- Powell *et al.*, (1987) Cell 50,831-840.
- Chou *et al.*, 1992 Nucl. Acids Res. 20, 1717-1723.
- Don *et al.*, 1991 Nucl. Acids. Res. 19, 4008.
- Chamberlain *et al.*, (1988) Nucl. Acids Res. 16,11141-11156
  - Badie *et al.*, Mol. Cell. Biol. **20**, 2358-2366
  - Liang & Pardee. (1992) Science **257**, 967-971.
- Pfaffl (2001) Nucl. Acids Res. 29: 2002 – 2007
- Ramakers *et al.* (2003) Neuroscience Lett.339: 62 -66
- Czechowski *et al.* (2004) Plant J. 38: 366-379

- PCR Jump Station
- Making PCR - a history
- PCR primer design
- Roche PCR manual
- Applied Biosystem's Real time PCR page
- Roche *in situ* PCR site
- PCR animation I

"PCR animation II

"Quantitative real time PCR for mRNA tutorial

(<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>)