

ПЦР

Метод, позволяющий амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы

3 стадии:

денатурация

отжиг

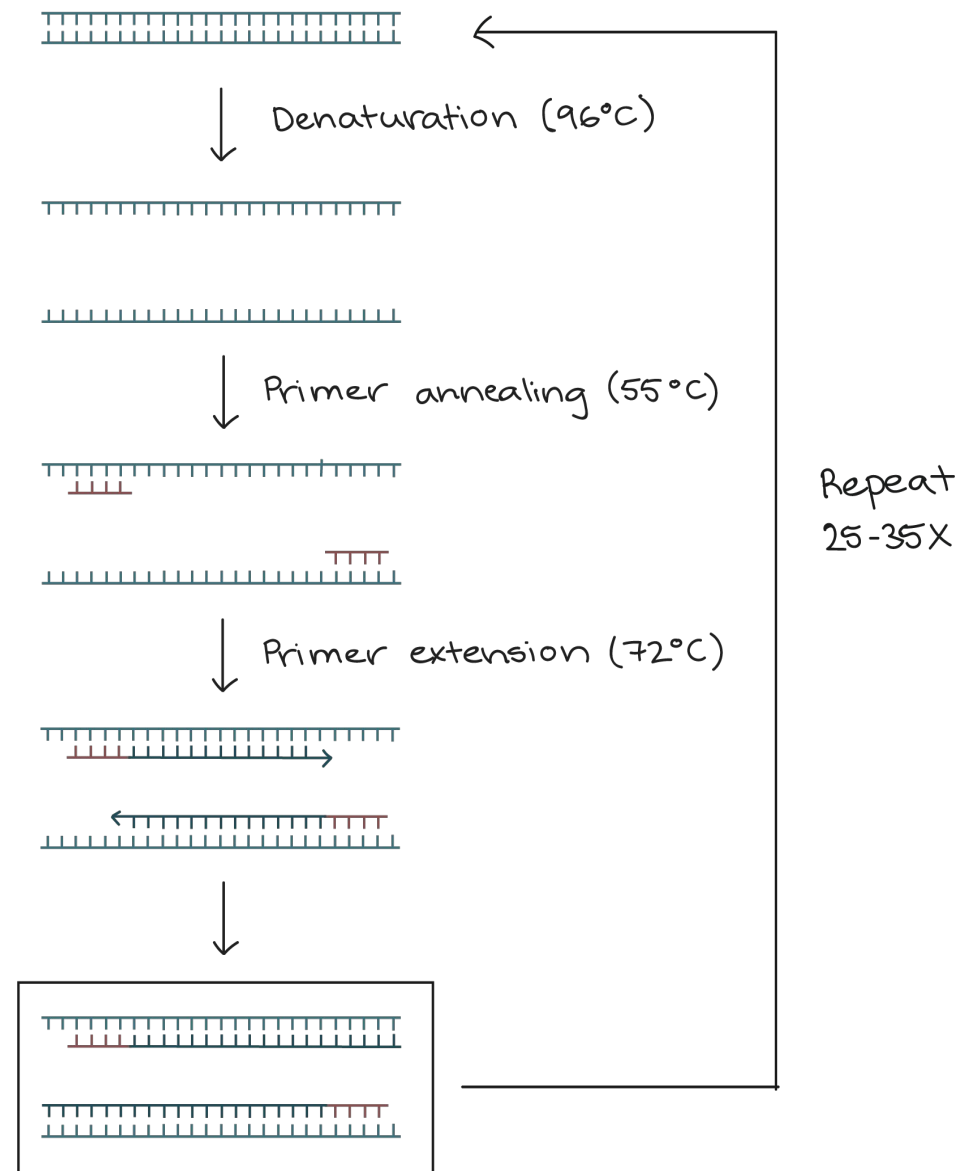
элонгация

(ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки)

Нужна высокая температура
(для разделения цепей ДНК)

НО

▶ инактивируется ДНК-полимераза



Result after 1 cycle:
of DNA molecules
doubled

В начале использования метода

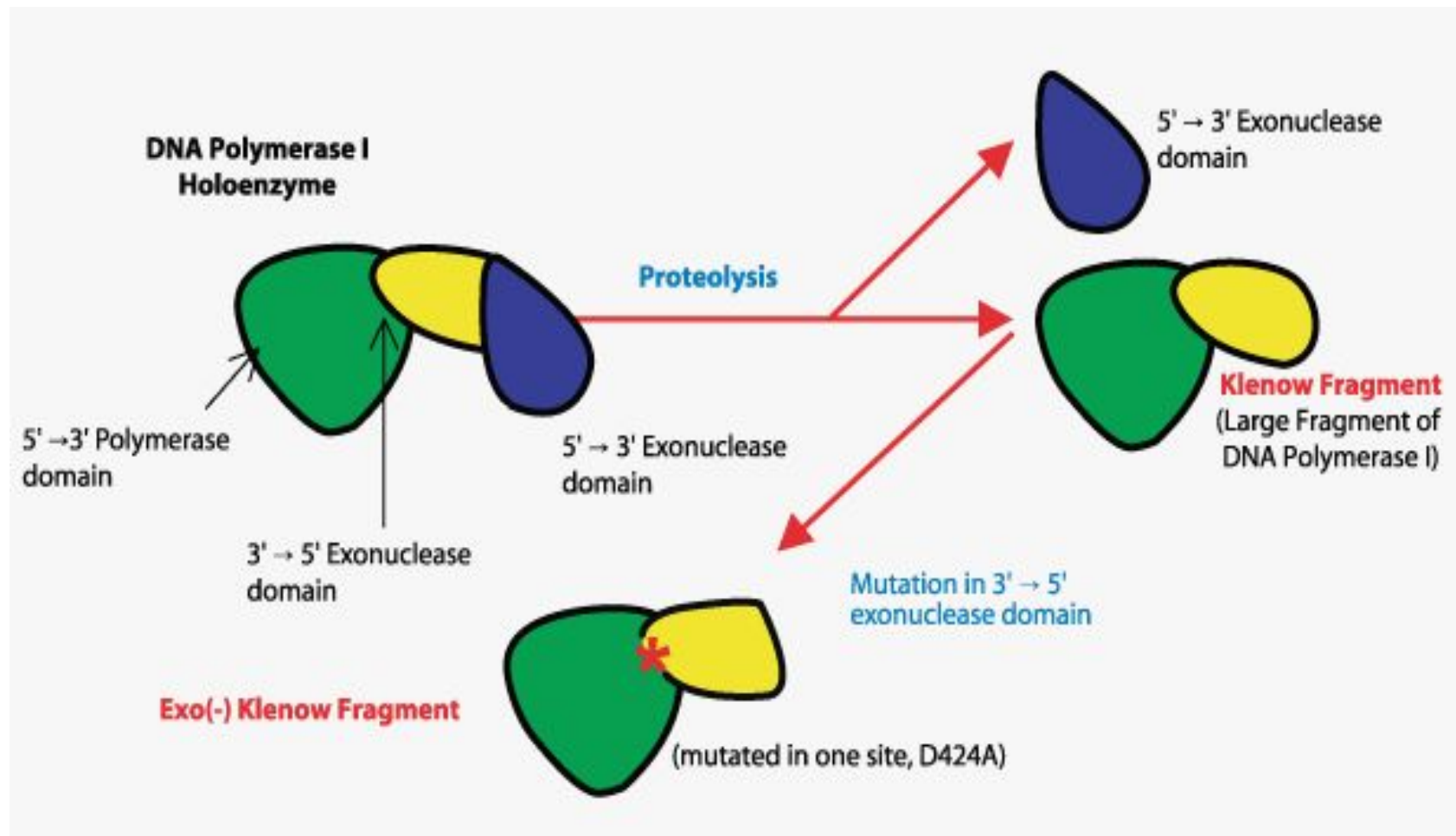
После каждого цикла нагревания-охлаждения добавляли в реакционную смесь ДНК-полимеразу

- небольшая эффективность реакции
- требовалось много времени
- требовалось много фермента

В качестве ДНК-полимеразы использовались фрагменты Клёнова

фрагмент Клёнова:

- описан в 1970 году Клёновым и Хеннигсенем
- есть $5' \rightarrow 3'$ -полимеразная активность
- есть $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность (корректорная)
- нет $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активности





В 1969 году Thomas D. Brock and Hudson Freeze описали
НОВЫЙ ВИД
термофильных бактерий – *Thermus aquaticus*

(Гейзер бассейна Йеллоустонского национального парка; после
были найдены в аналогичных местах обитания по всему миру
(природные и антропогенные гидротермы, компостные кучи)

Taxonomic lineage

› *Bacteria*

› *Terrabacteria group*

› *Deinococcus-Thermus*

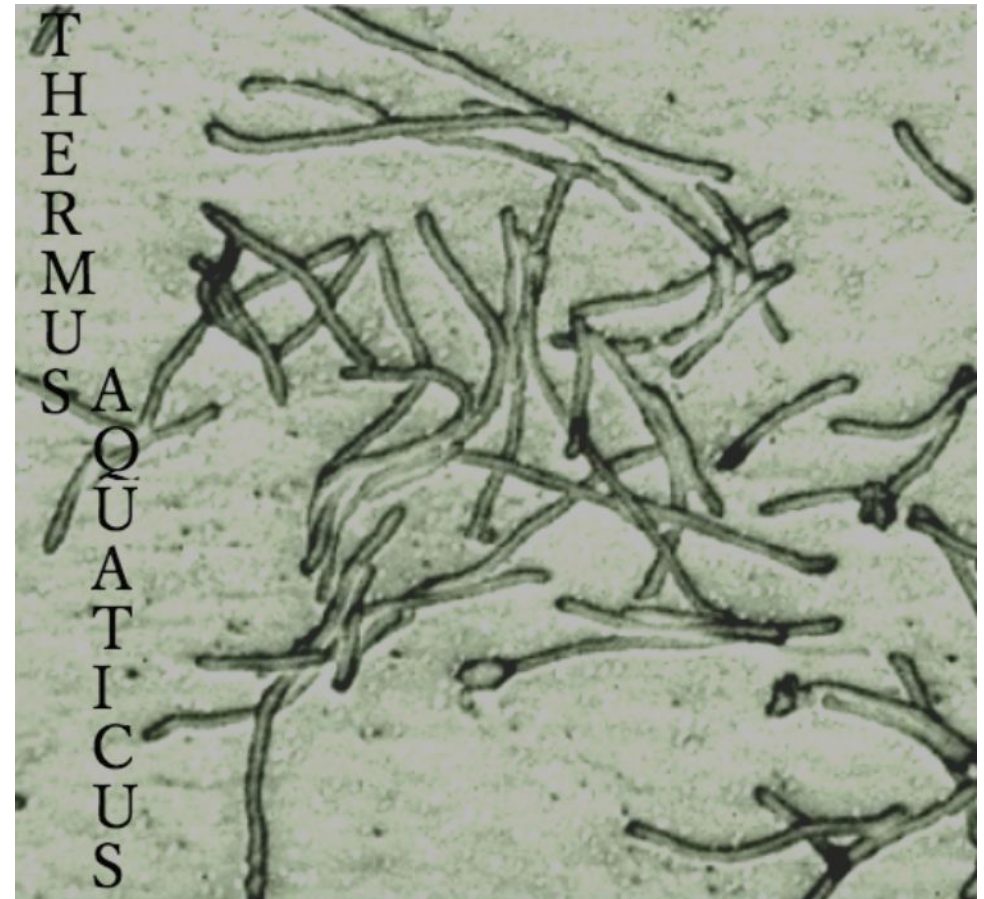
(одна из самых архаичных фил)

› *Deinococci*

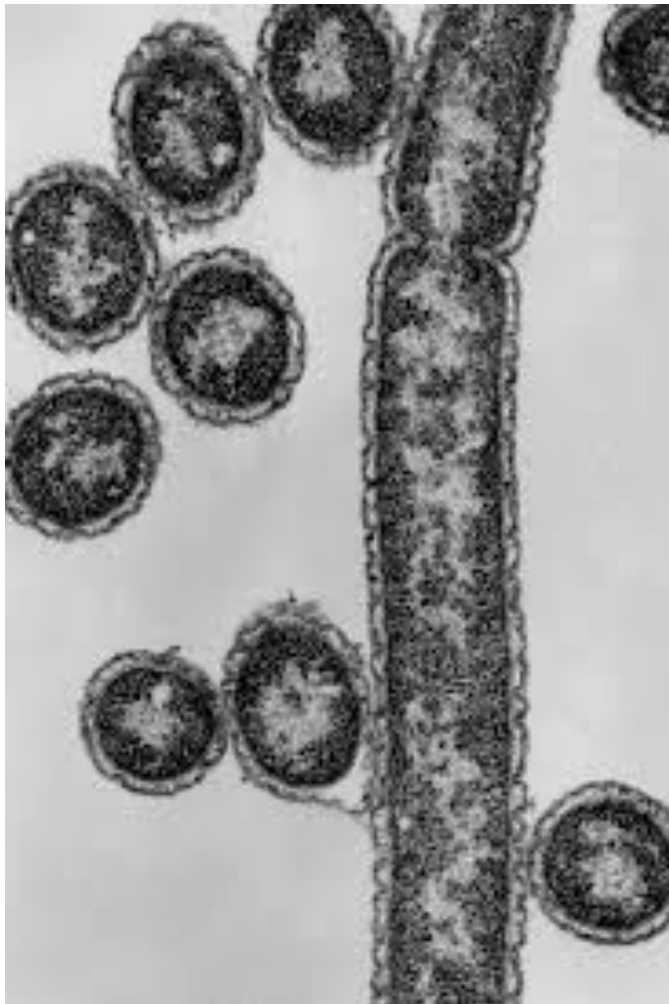
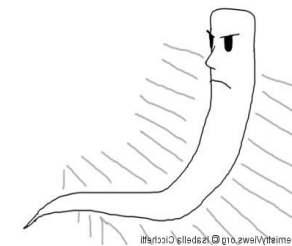
› *Thermales*

› *Thermaceae*

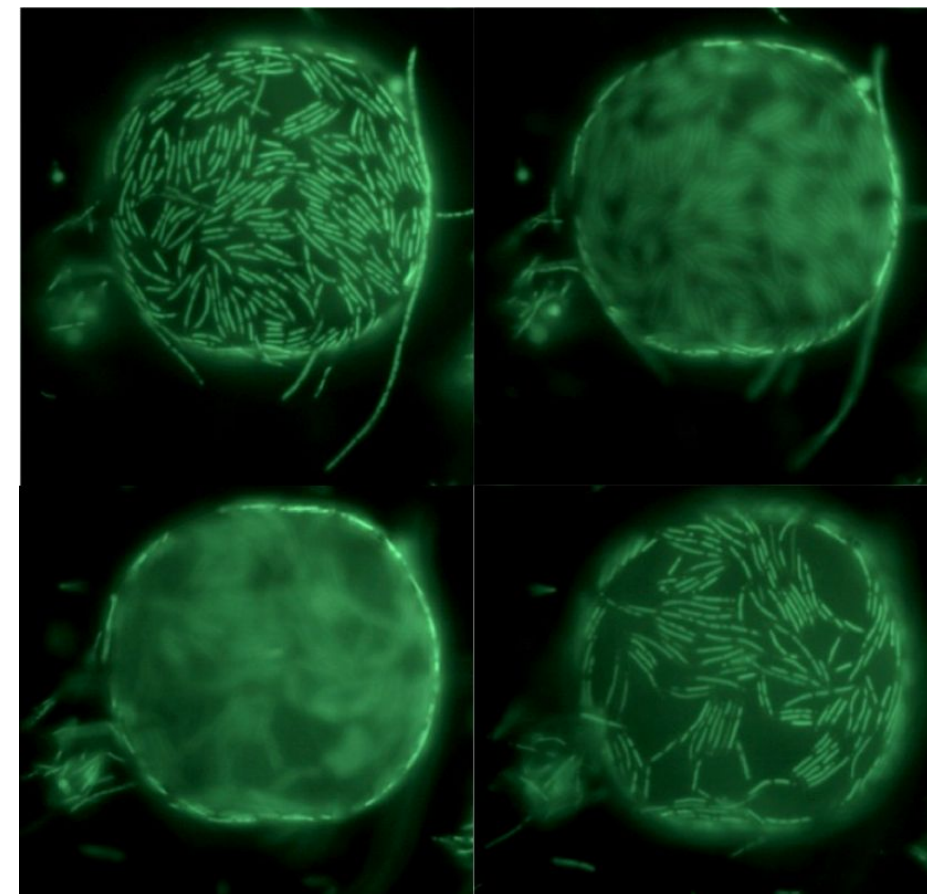
› *Thermus*



штамм YT-1 — первоисточник Taq-полимеразы



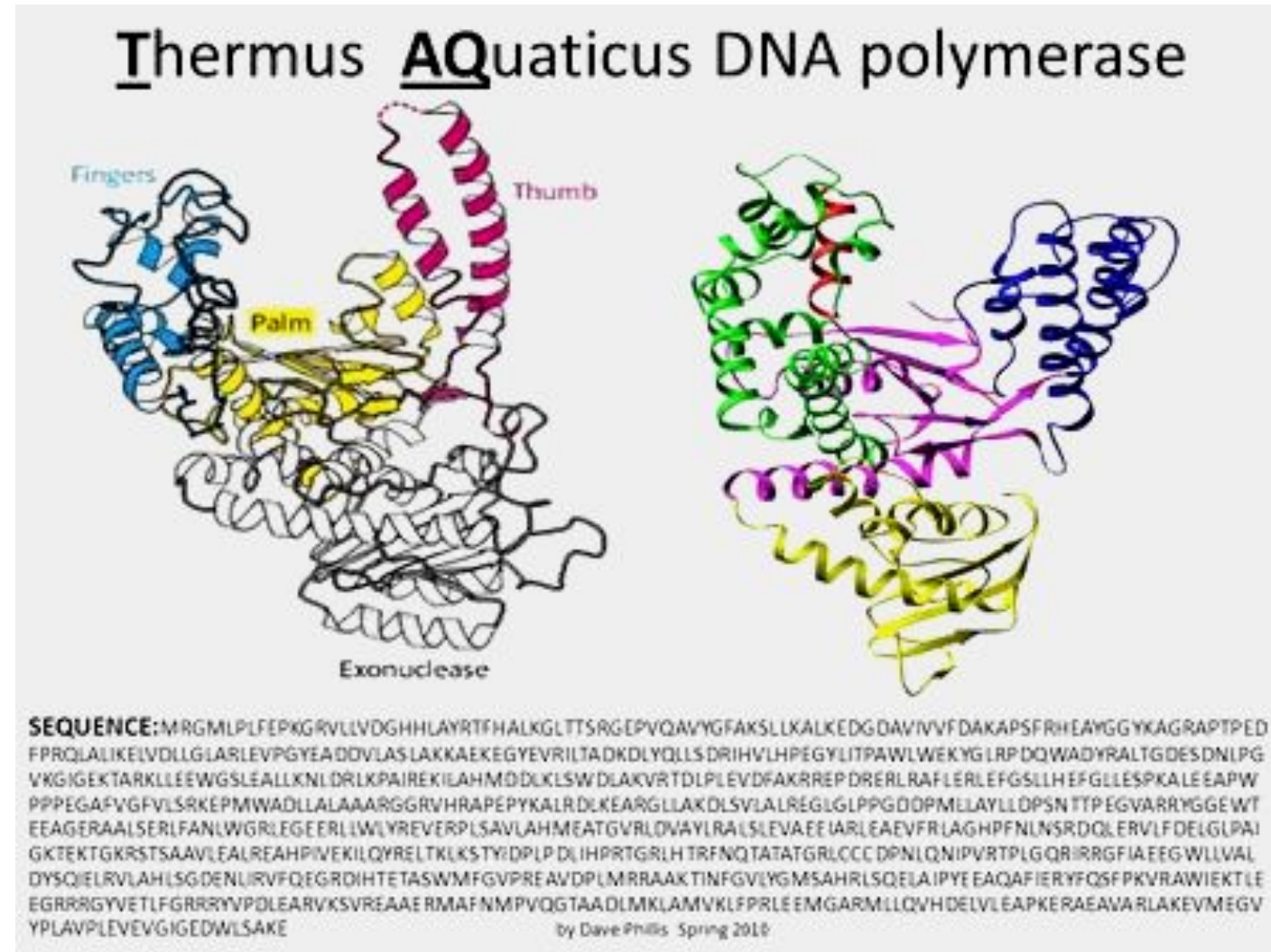
- грам (—)
- прямые палочки разной длины, одиночные или в нитях
- диаметр 0,5 – 0,8 мкм
- лишены подвижности
- хемоорганогетеротрофы
- не обладают радиационной устойчивостью
- склонны к агрегации →
- оптимальная t° – 65 – 70 $^{\circ}$ C
(выживает при 50 - 80 $^{\circ}$ C)



1976 г.: выделена Taq-полимераза, первый термостабильный фермент, использованный для ПЦР (1988)

- Кофакторы : Mg^{++} , Mn^{++}
- pH опт. – 8,0
- рекомендуемая t° использования – (68 – 72 °C)
- молек. масса: 94 – 95 кДа, 832 а.о.

- используется рекомбинантная форма (производимая E. coli)
- скорость синтеза: около 60 нуклеотидов/сек
- около 30 циклов
- синтезирует гораздо более длинные фрагменты, чем фрагменты Клёнова



- есть 5'→3' экзонуклеазная активность
- нет 3'→5' экзонуклеазной активности
- ошибки!

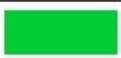



Показатели частоты ошибок в ранних исследованиях:
 $1-2 \times 10^{-4}$ [mutation frequency per base pair per duplication]

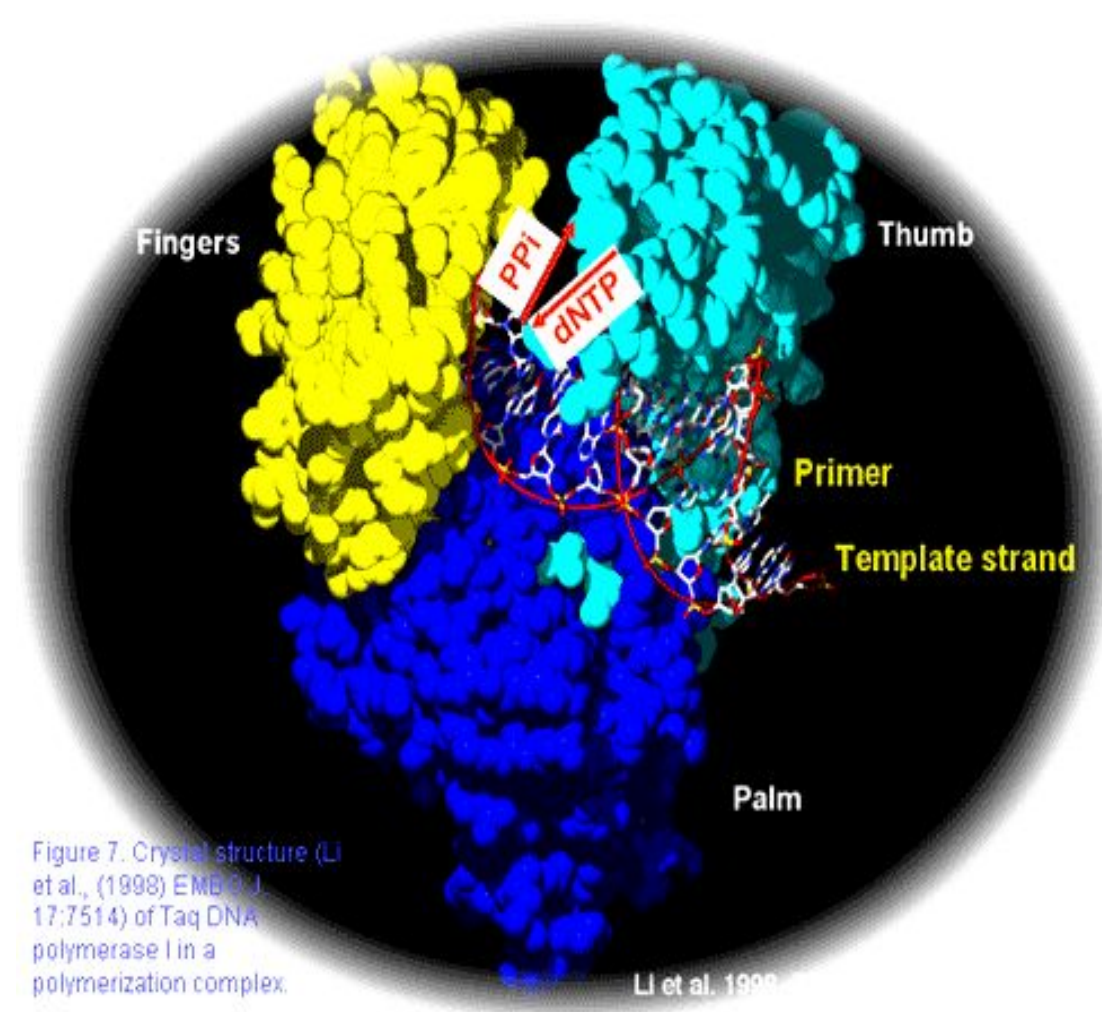
В более поздних исследованиях: 1.2×10^{-5} to 8×10^{-6}

Therefore, the fidelity of Taq is better than its reputation

Шифр: 2.7.7.7

Домены:

	PF09281	Taq-exonuc	Taq polymerase, exonuclease
	PF00476	DNA_pol_A	DNA polymerase family A
	PF01367	5_3_exonuc	5'-3' exonuclease, C-terminal SAM fold
	PF02739	5_3_exonuc_N	5'-3' exonuclease, N-terminal resolvase-like domain



Некоторые термостабильные ДНК-полимеразы были выделены из других термофильных бактерий и археобактерий, многие обладают коррекционной способностью, и используются вместо (или в сочетании) с Taq.

Фермент	5' → 3' э. а.	3' → 5' э. а.	опт. t, °C	Время полужизни при t°=95...100°C	Скорость работы (т.п. н./мин)	Частота ошибок (на пару оснований)	Бактерия
ф. Клёнова	—	+	37	не t-стабилен			<i>Escherichia coli</i>
Taq	+	—	68 — 80	95 - 97 — 20´	1,0 — 4,8	$1.8 \cdot 10^{-4} - 8.0 \cdot 10^{-6}$	<i>Thermus aquaticus</i>
Tth	+	—	70 — 74	95° — 20´	1,5 — 2,0		<i>Thermus thermophilus</i>
Pfu	—	+	72 — 82	95° — 1 h	0,5 — 1,5	$2.2 \cdot 10^{-6} - 0.7 \cdot 10^{-6}$	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pwo	—	+	72	100° — 2 h			<i>Pyrococcus woiesei</i>
Tli (Vent)	—	+	72 — 80	95° — 6,7 h 100° — 1,3 h	1,0	$4.5 \cdot 10^{-5} - 2.8 \cdot 10^{-6}$	<i>Thermococcus litoralis</i>
KOD1	—	+	72 — 75	95° — 12 h 100° — 3 h	6,0 — 7,8	$2.6 \cdot 10^{-6}$	<i>Thermococcus kodakarensis</i>

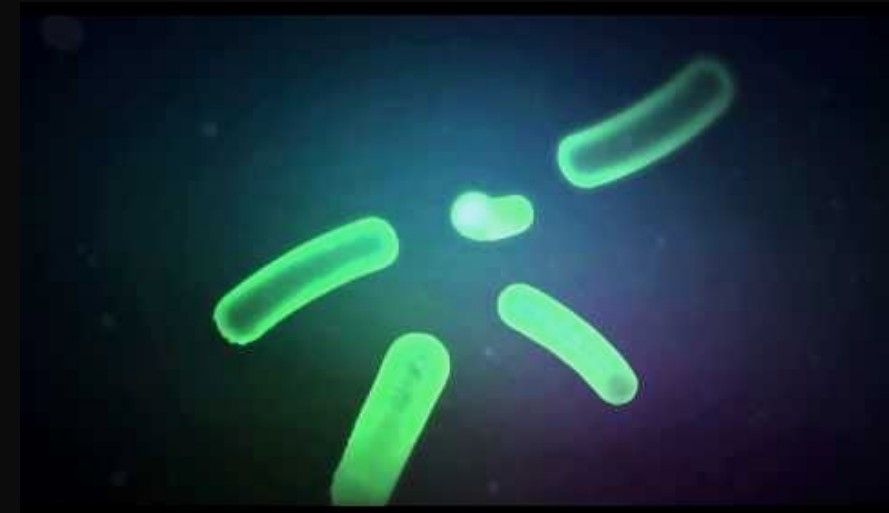
Горячие источники Изу в Японии

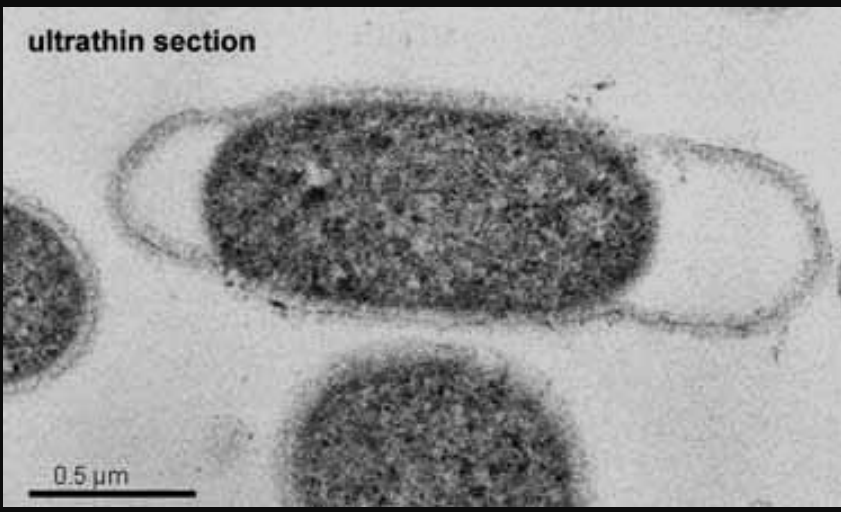
Вид выделен в 1971 году и описан в 1974
Таиро Ошимой и Кацутomo Имахори



- опт. темп – 68 – 85°C
- pH: 3.4 – 9.0
- рекомбинантная Tth:
активность обратной
транскриптазы (Mn²⁺)

Thermus thermophilus

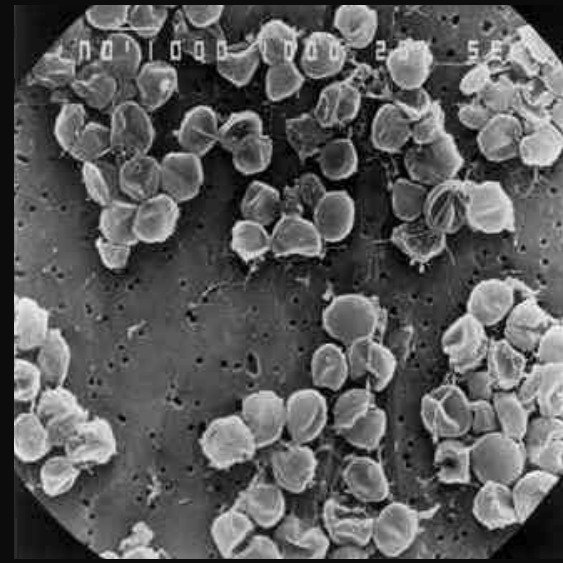
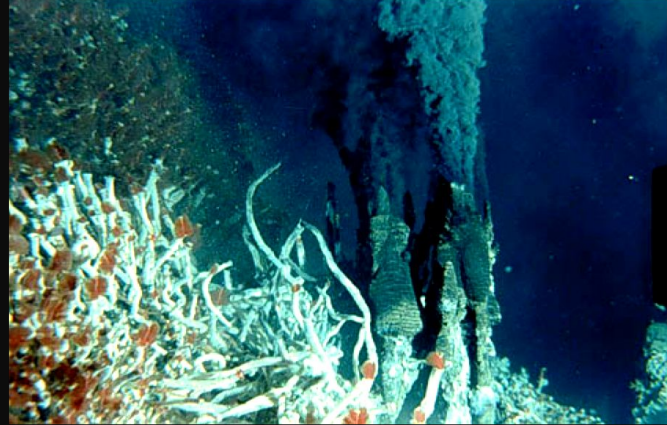




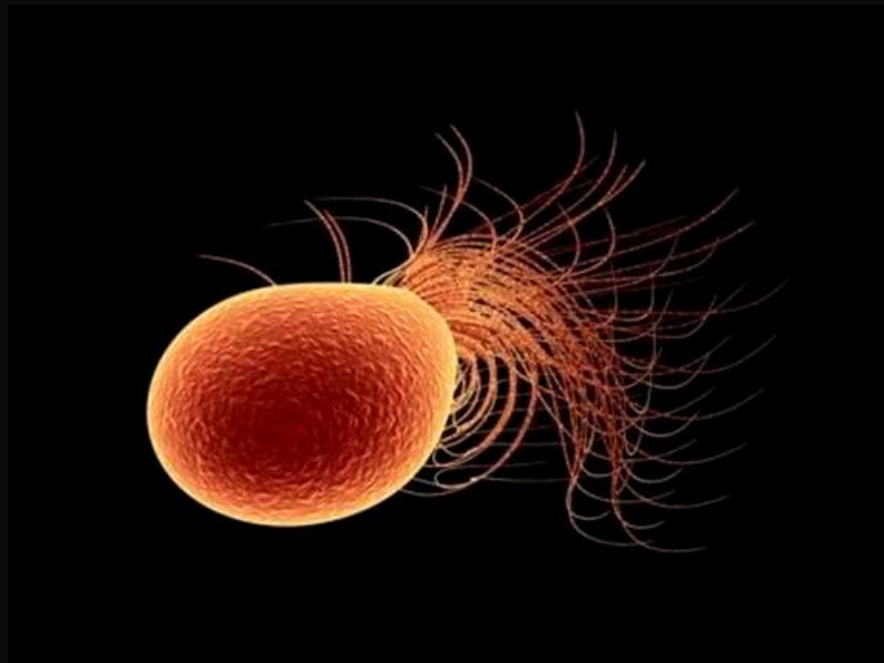
Thermotoga maritima (Tme)

Другие экстремофилы, из которых получена термостабильная ДНК-полимераза

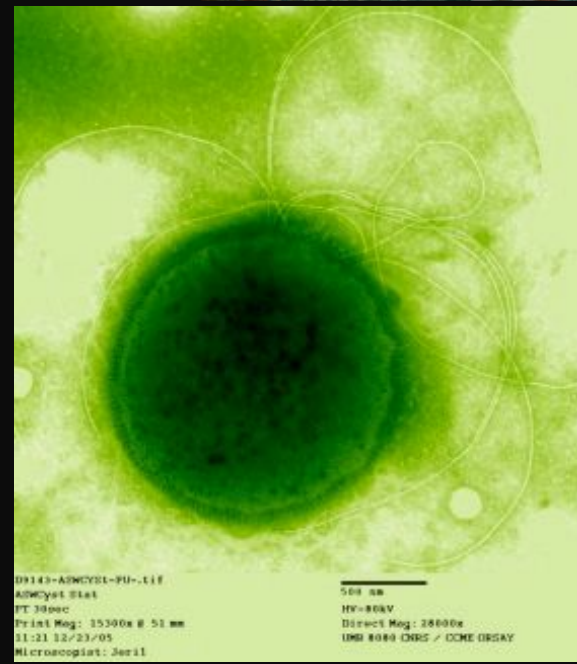
Место
жительства
Архей-
термофилов



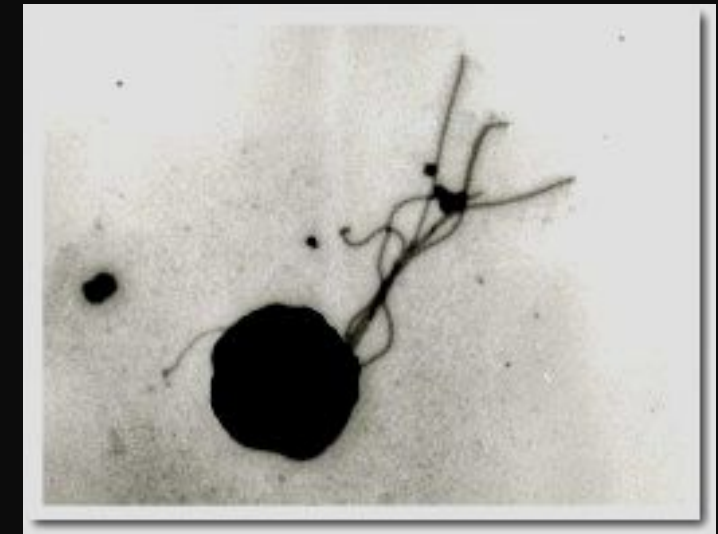
Pyrococcus abyssi (Pab)



Архея *Pyrococcus furiosus (Pfu)*



Thermococcus litoralis (Tli)



Thermococcus kodakarensis (KOD1)