ПЦР

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

3 стадии:

денатурация

отжиг

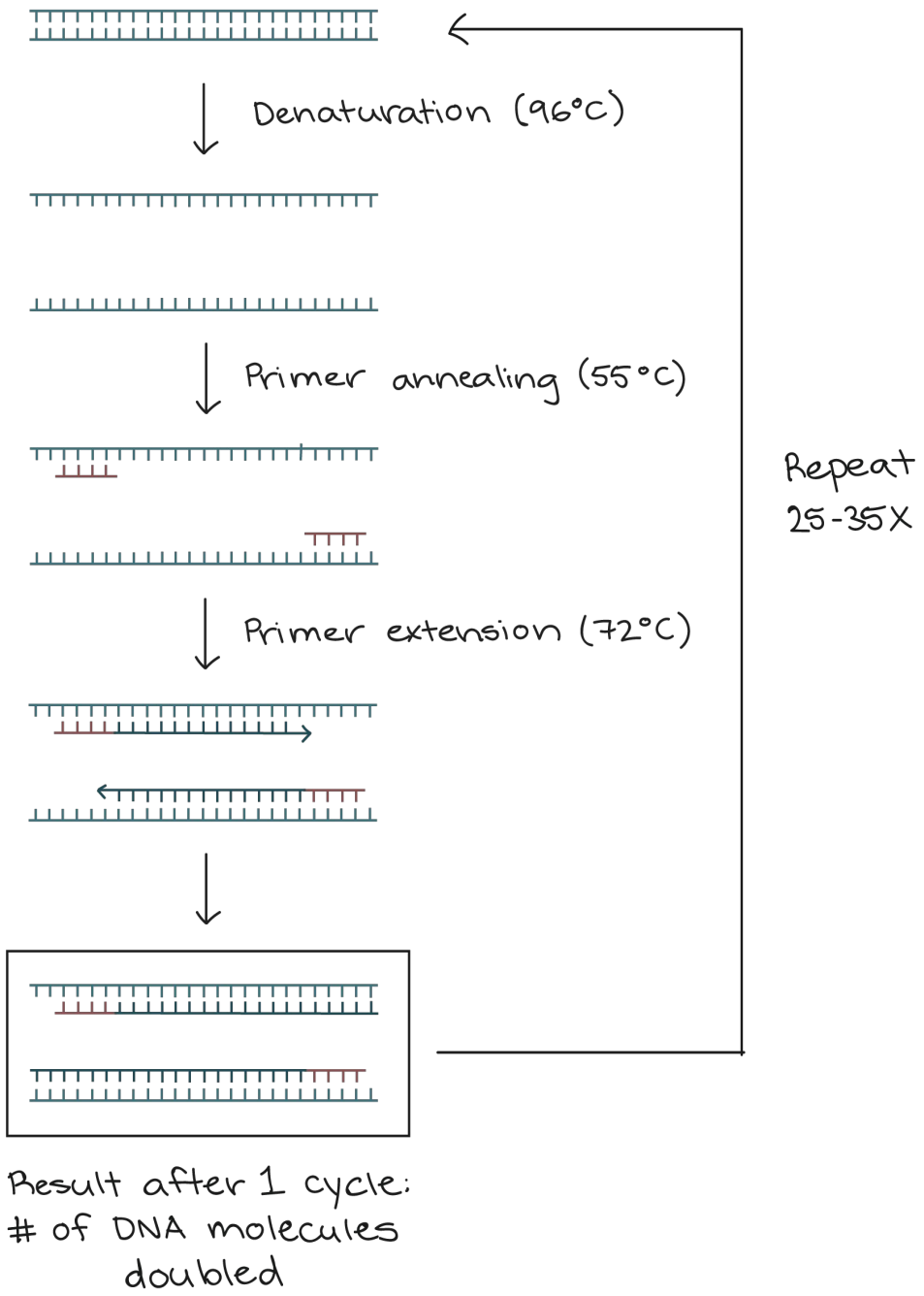
элонгация

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

Нужна высокая температура (для разделения цепей ДНК)

НО

► инактивируется ДНК-полимераза



В начале использования метода

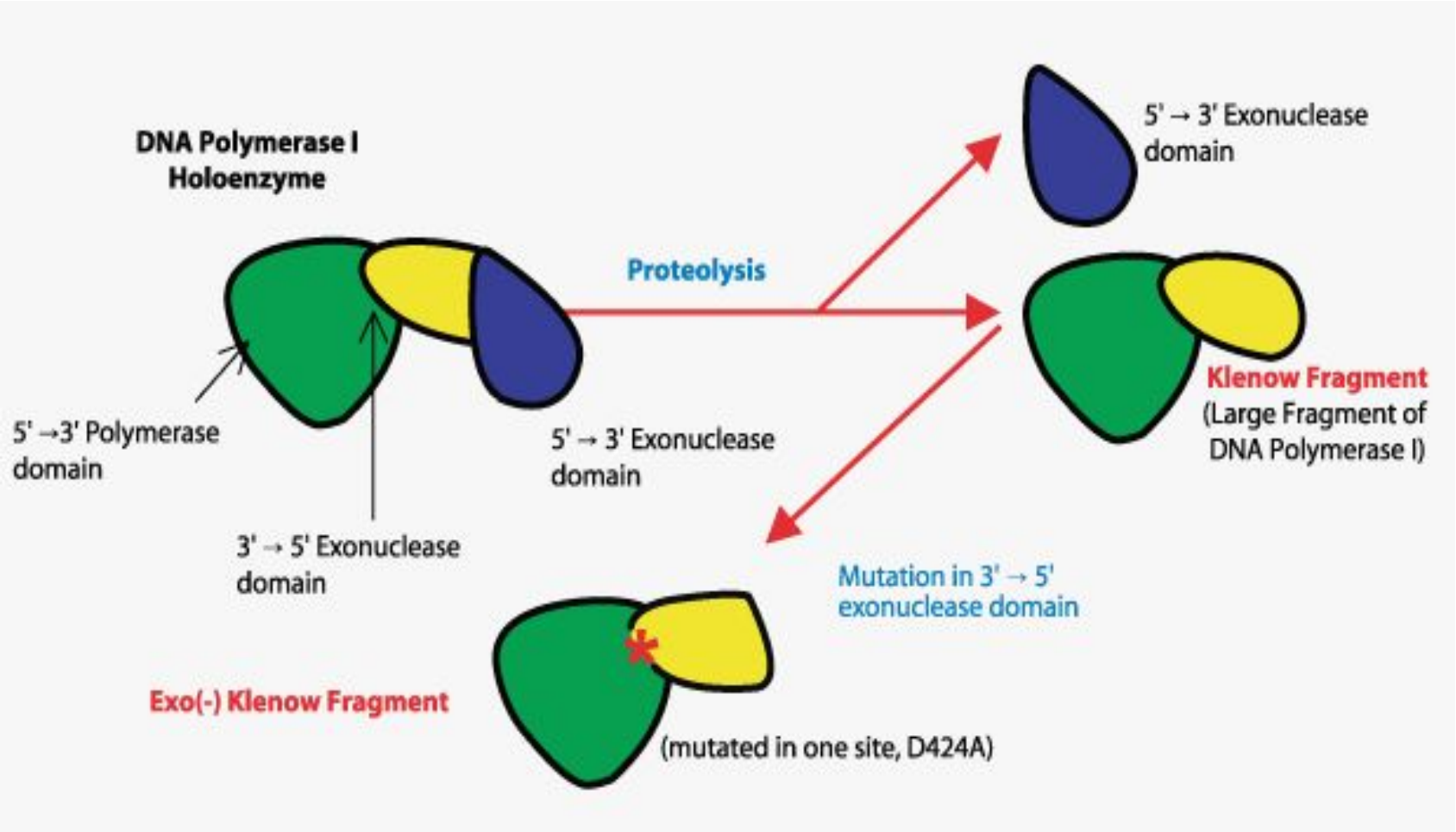
После каждого цикла нагревания-охлаждения добавляли в реакционную смесь ДНК-полимеразу

- 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’ → 3’-полимеразная активность*
- *есть 3’ → 5’-экзонуклеазная активность (корректорная)*
- *нет 5' → 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)

<u>Taxonomic lineage</u>

› *Bacteria*

› *Terrabacteria group*

› *Deinococcus-Thermus*

(одна из самых архаичных фил)

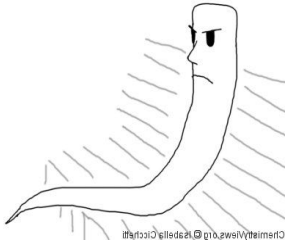
› *Deinococci*

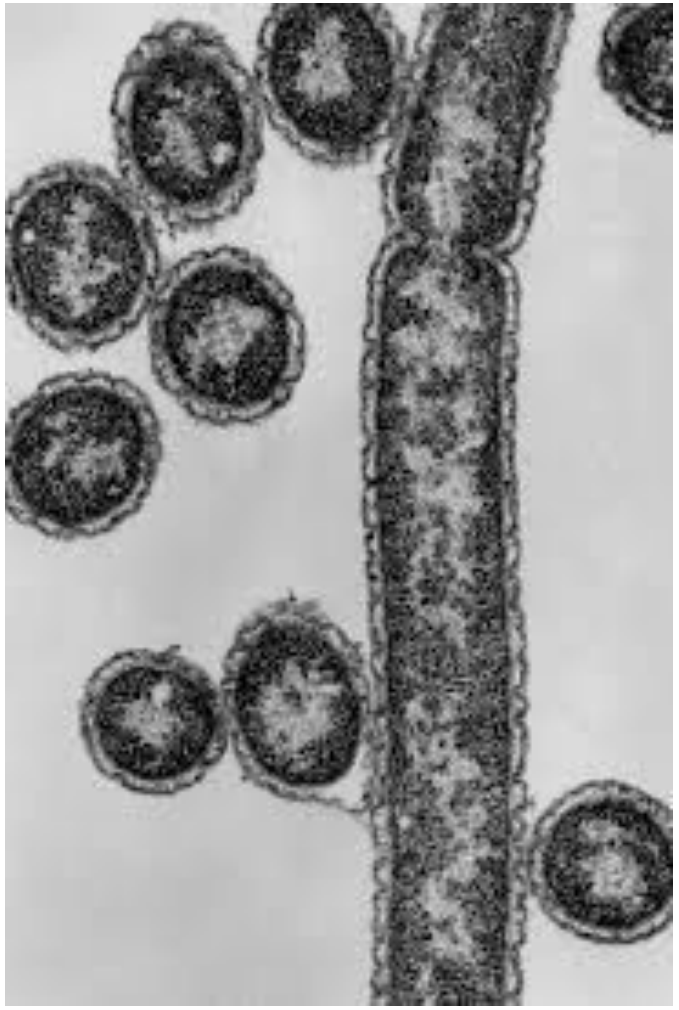
› *Thermales*

› *Thermaceae*

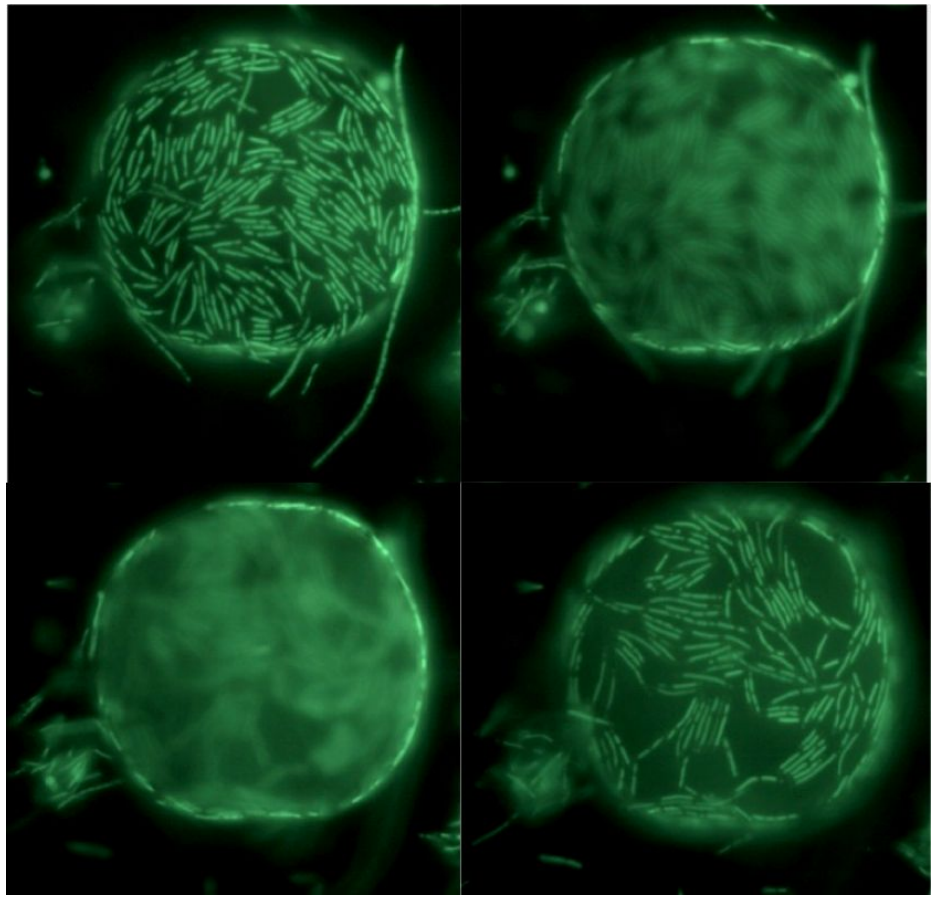
› *Thermus*

штамм YT-1 — первоисточник Taq-полимеразы



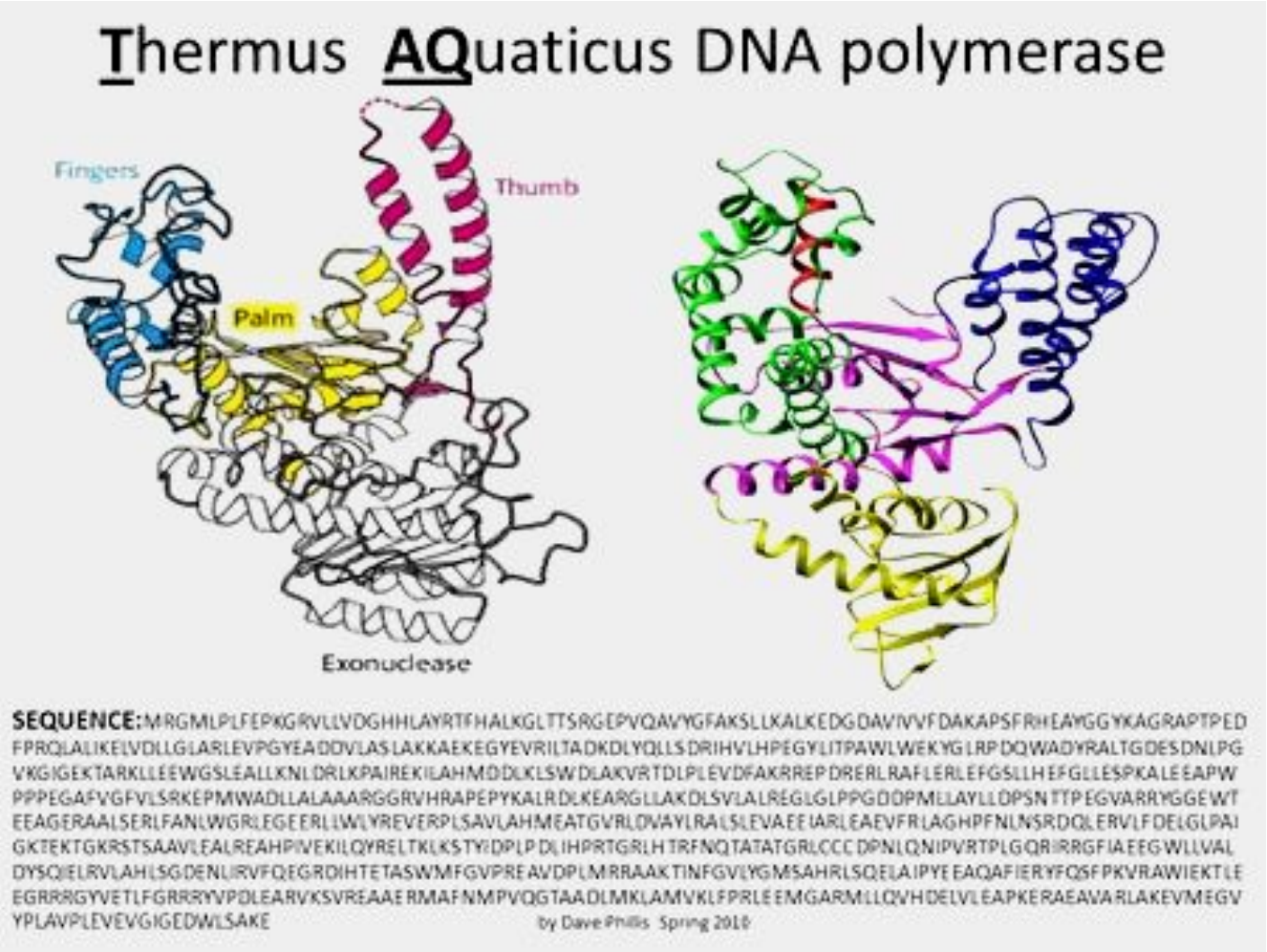


- грам (—)
- прямые палочки разной длины, одиночные или в нитях
- диаметр 0,5 – 0,8 мкм
- лишены подвижности
- хемоорганогетеротрофы
- не обладают радиационной устойчивостью
- склонны к агрегации
- оптимальная t° – 65 – 70°C (выживает при 50 - 80°C)



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:
$1–2\times10^{-4}$ [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

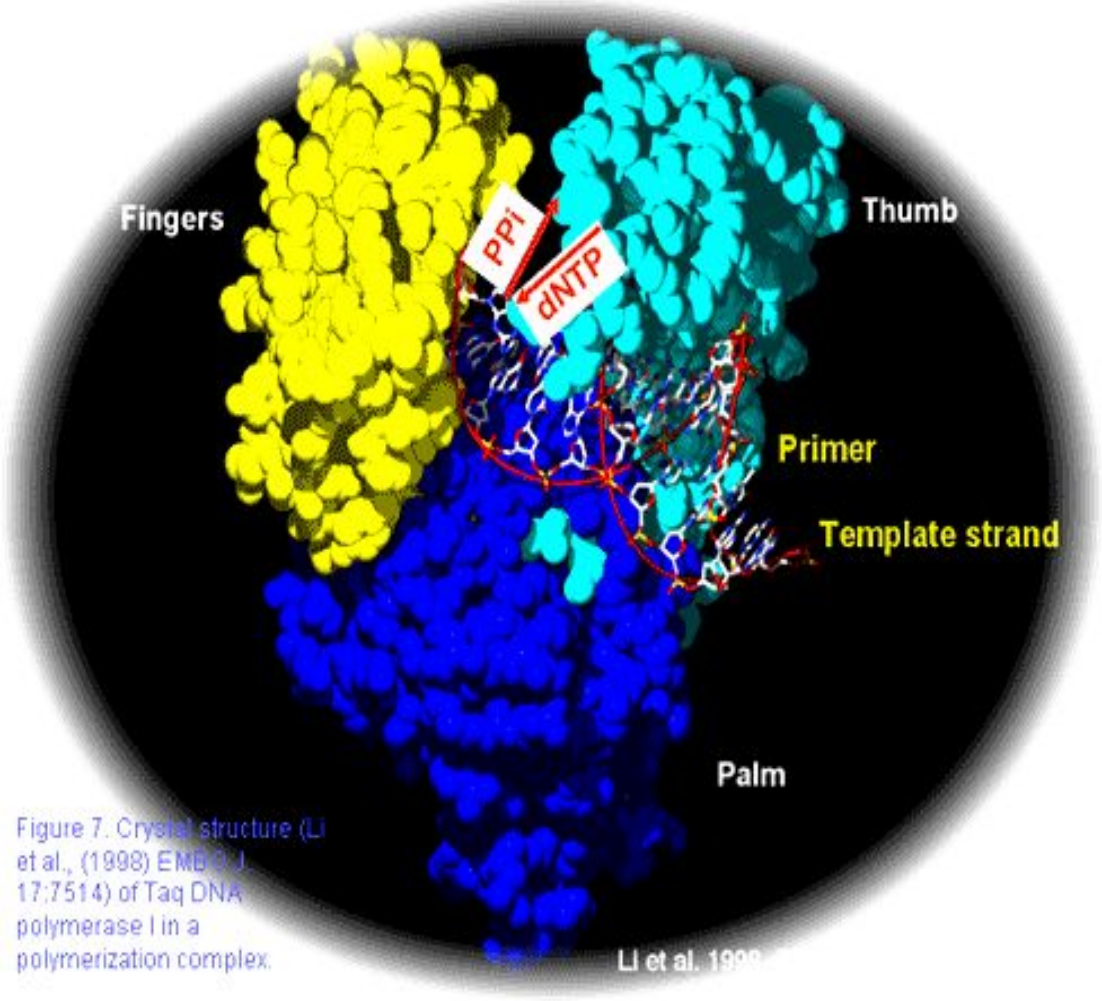


Figure 7. Crystal structure (Li et al., (1998) EMBO J. 17:7514) of Taq DNA polymerase I in a polymerization complex.

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

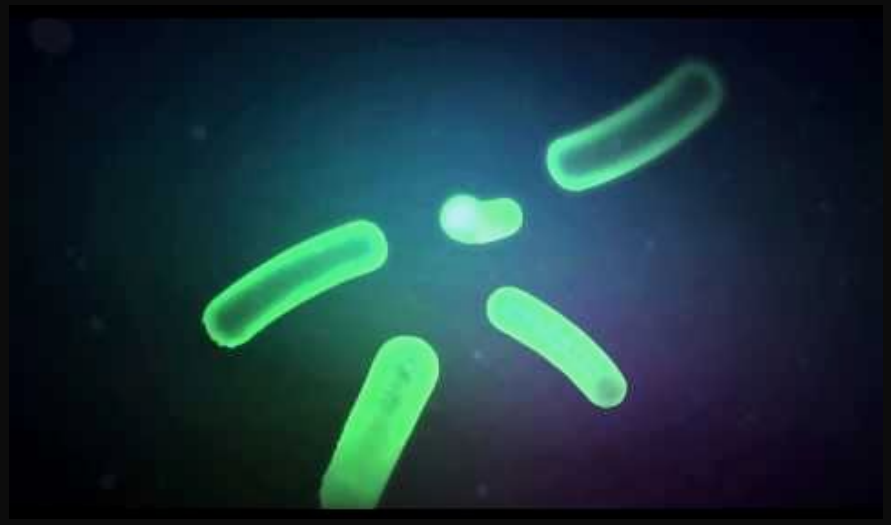
Некоторые термостабильные ДНК-полимеразы были выделены из других термофильных бактерий и архебактерий, многие обладают коррекционной способностью, и используются вместо (или в сочетании) с Taq.

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			*Escherichia coli*
Taq	+	—	68 — 80	95 - 97 — 20´	1,0 — 4,8	$1.8 \cdot 10^{-4} – 8.0 \cdot 10^{-6}$	*Thermus aquaticus*
Tth	+	—	70 — 74	95° — 20´	1,5 — 2,0		*Thermus thermophilus*
Pfu	—	+	72 — 82	95° — 1 h	0,5 — 1,5	$2.2 \cdot 10^{-6} – 0.7 \cdot 10^{-6}$	*Pyrococcus furiosus*
Pwo	—	+	72	100° — 2 h			*Pyrococcus woiesei*
Tli (Vent)	—	+	72 — 80	95° — 6,7 h 100° — 1,3 h	1,0	$4.5 \cdot 10^{-5} – 2.8 \cdot 10^{-6}$	*Thermococcus litoralis*
KOD1	—	+	72 — 75	95° — 12 h 100° — 3 h	6,0 — 7,8	$2.6 \cdot 10^{-6}$	*Thermococcus kodakarensis*

Горячие источники Изу в Японии

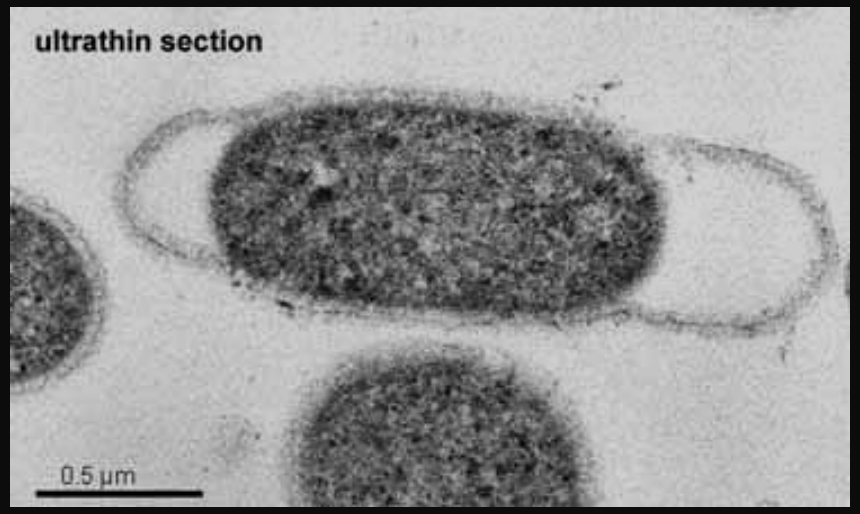
Вид выделен в 1971 году и описан в 1974
Таиро Ошимой и Кацутомо Имахори

- опт. темп – 68 – 85°C
- pH: 3.4 – 9.0
- рекомбинантная Tth: активность обратной транскриптазы (Mn^{2+})



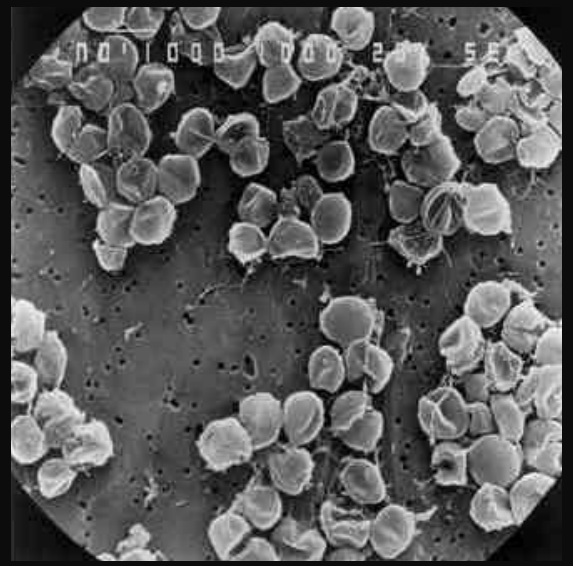
Thermus thermophilus

Другие экстремофилы, из которых получена термостабильная ДНК-полимераза

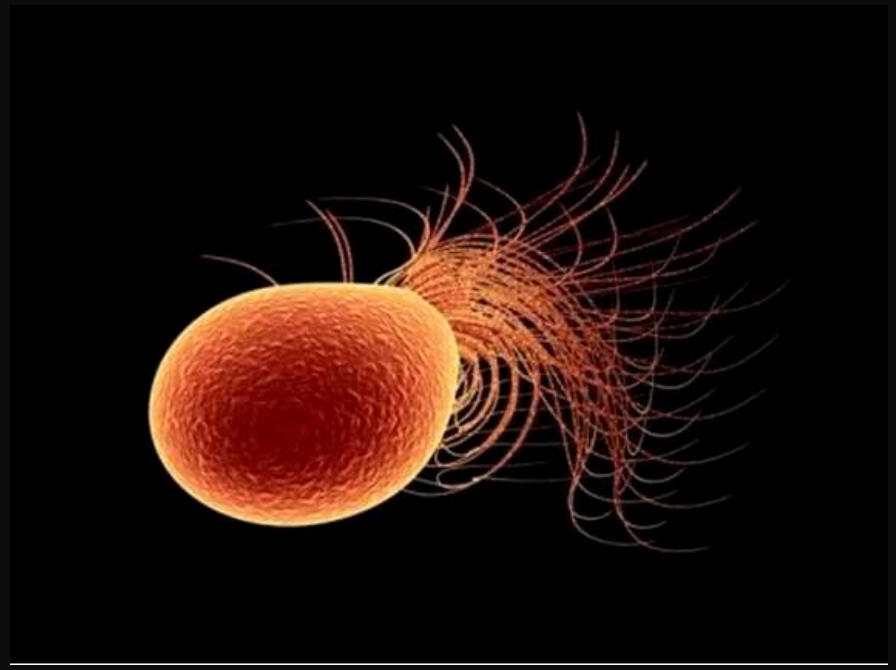


Thermotoga maritima (Tne)

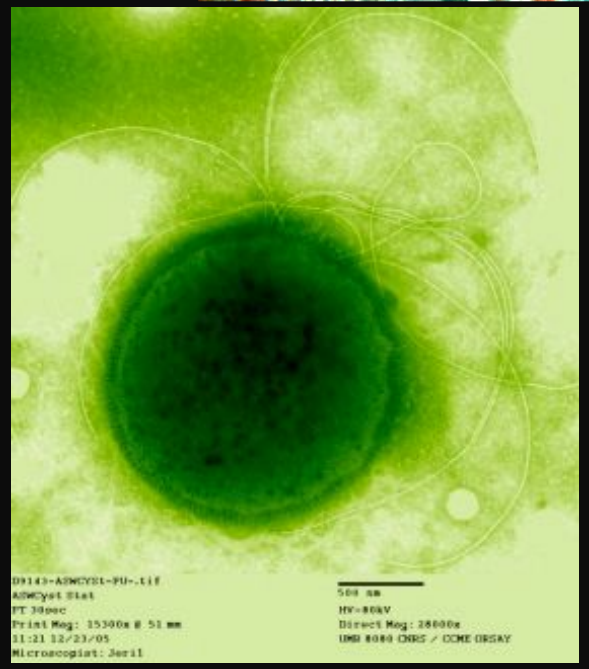
Место жительства Архей-термофилов



Pyrococcus abyssi (Pab)



Архея Pyrococcus furiosus (Pfu)



Thermococcus litoralis (Tli)

Thermococcus kodakarensis (KOD1)