Занятие №2. ПЦР как основа геномных методик

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- Метод, позволяющий избирательно синтезировать большие количества определённых фрагментов ДНК.
- Разработан Кэри Муллисом в 1983 году (Нобелевская премия 1993 года)

- “Полимеразная” – используется фермент ДНК-полимераза

- “Цепная” – состоит из повторяющихся циклов, количество ДНК с каждым циклом увеличивается в геометрической прогрессии

Виды ПЦР

- 1. В зависимости от измерения количества ПЦР-продукта:
- качественная
- количественная

- 2. Тип детекции ПЦР-продукта:
- электрофоретическая
- флюориметрическая

- 3. Этап детекции:
- в конечной точке
- в реальном времени

Применение ПЦР

- I. Получение информации
- генотипирование
- ДНК-диагностика
- анализ уровня транскрипции

- II. Получение материала (накопление)
- клонирование
- мутагенез
- секвенирование

Компоненты ПЦР-реакции

Компонент	Функция

Состав реакционной смеси ПЦР

- $V_{РС}$ = 10-50 мкл
- ДНК 1-20 пг/мкл (плазмиды, фаги) или 2-20 нг/мкл (геном)
- дНТФ 0,2 мМ
- праймеры 0,2-1 мкМ
- полимераза 0,01-0,05 е.а./мкл

Этапы ПЦР

Этап	Температура, °С	Продолжительность, мин.	Количество циклов

Наиболее применяемые ДНК-полимеразы

Полимераза	Процессивность	Активность	Температурный оптимум

Денатурация (denaturation)

- Необходима для разрушения водородных связей между комплементарными цепями ДНК (плавление ДНК)
- 1. **Температура (T_d):** определяется свойствами полимеразы, обычно составляет 95^{o}C. Для более термоустойчивых полимераз (Pwo) температура может быть увеличена.
- 2. **Время:** для крупных молекул (геномы) увеличивается, для малых (ампликоны) – уменьшается; время нужно также увеличивать в случае GC%>50%.

Отжиг (annealing)

- На этом этапе происходит понижение температуры, и праймеры могут присоединиться к комплементарным участкам на матрице ДНК

- ***Температура (T_a)**:* зависит от состава праймеров, который определяет температуру плавления (melting) комплекса праймер–матрица ($T_a = T_m - 5^oC$).

Критерии подбора праймеров

- 1. GC-состав должен быть в пределах 40-60%. При этом G/C должны быть распределены равномерно (не образовывать кластеров).
- 2. Температура плавления у прямого и обратного праймера должна отличаться не более, чем на 5°C.
- 3. Должны отсутствовать самокомплементарные участки как внутри праймера (иначе могут образовываться шпильки), так и между праймерами (иначе образуются димеры праймеров).
- 4. Лучше, если на 3'-конце праймеров будут G/C (связь сильнее), но не более 3х (чтобы не было отжига на неспецифические участки).

Температура плавления праймеров

- $Tm=4*[n(G)+n(C)]+2*[n(A)+n(T)]$

- где n(X) - количество нуклеотида X в праймере

Элонгация

- На этапе элонгации происходит синтез цепей ДНК с помощью ДНК-полимеразы.

- 1. **Температура:** определяется свойствами используемой ДНК-полимеразы и лежит в области оптимума для этого фермента (для Taq – 72^{o}C).

- 2. **Время:** рассчитывают по одной минуте на каждую т.п.н. ампликона (для небольших молекул обычно берут 0,5 мин.).

Онлайн-ресурсы для подбора условий ПЦР

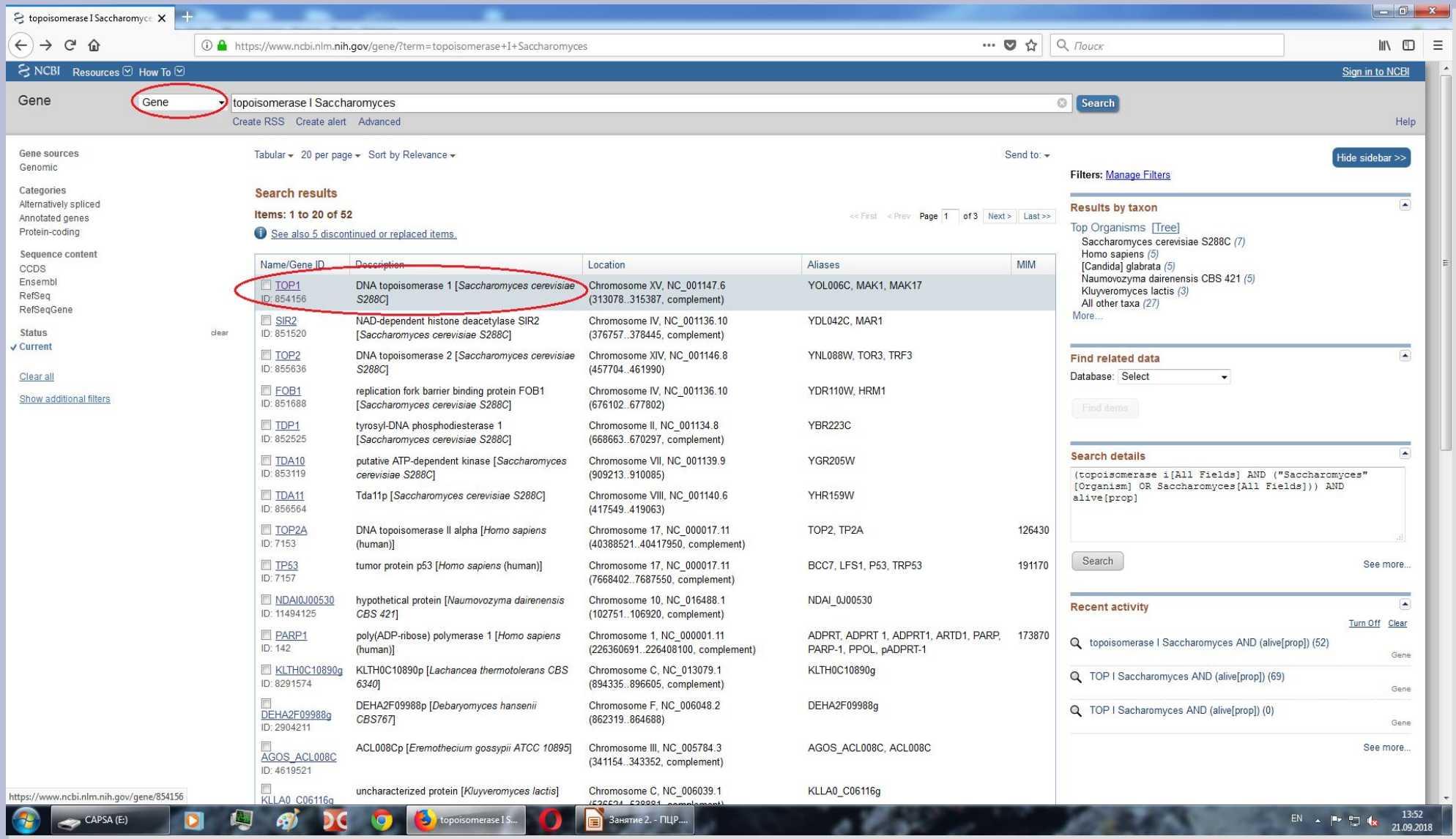
- Хранилище нуклеотидных последовательностей генов:
- *National Center for Bioinformatics (ncbi.nlm.nih.gov/gene)*

- Подбор праймеров:
- *Primer3 (bioinfo.ut.ee/primer3/)*
- *Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)*

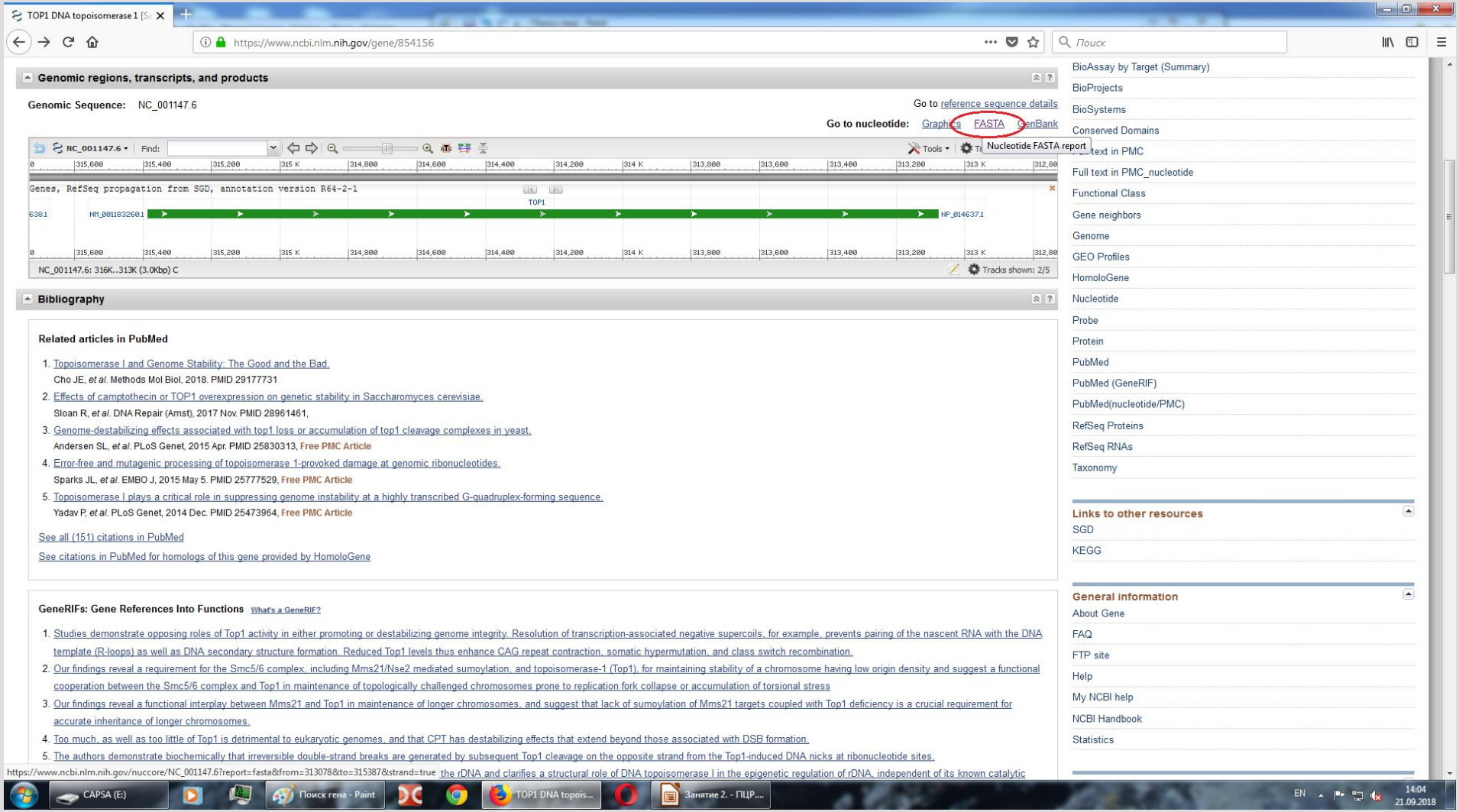
- Проведение расчётов (концентрации, операции с нуклеотидными последовательностями) и мн. др.:
- *MOLBIOL (molbiol.ru/scripts)*

Домашнее задание №1: подбор праймеров.

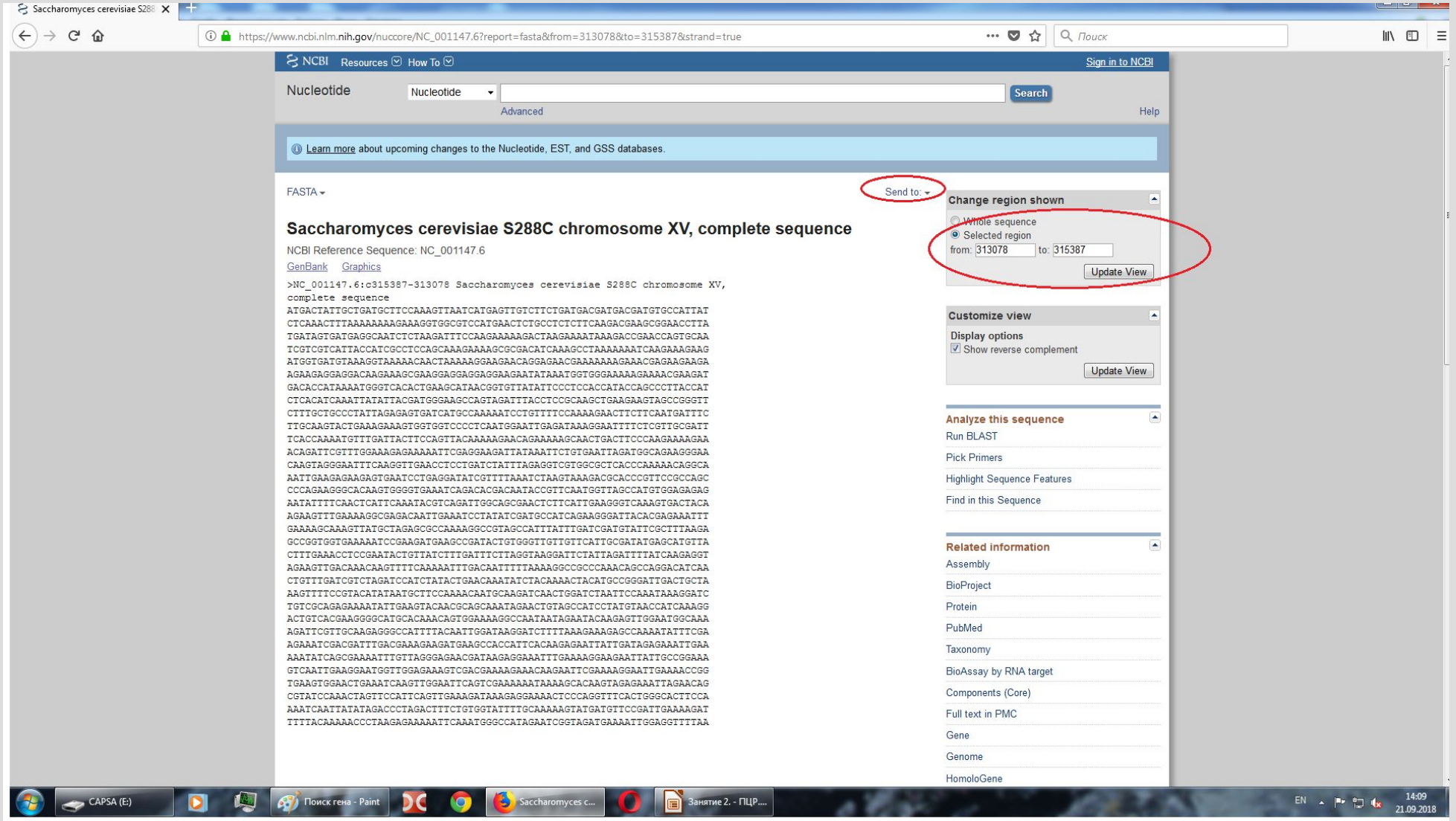
1. Найти на NCBI в базе данных Gene запись о каком-нибудь гене, открыть её.



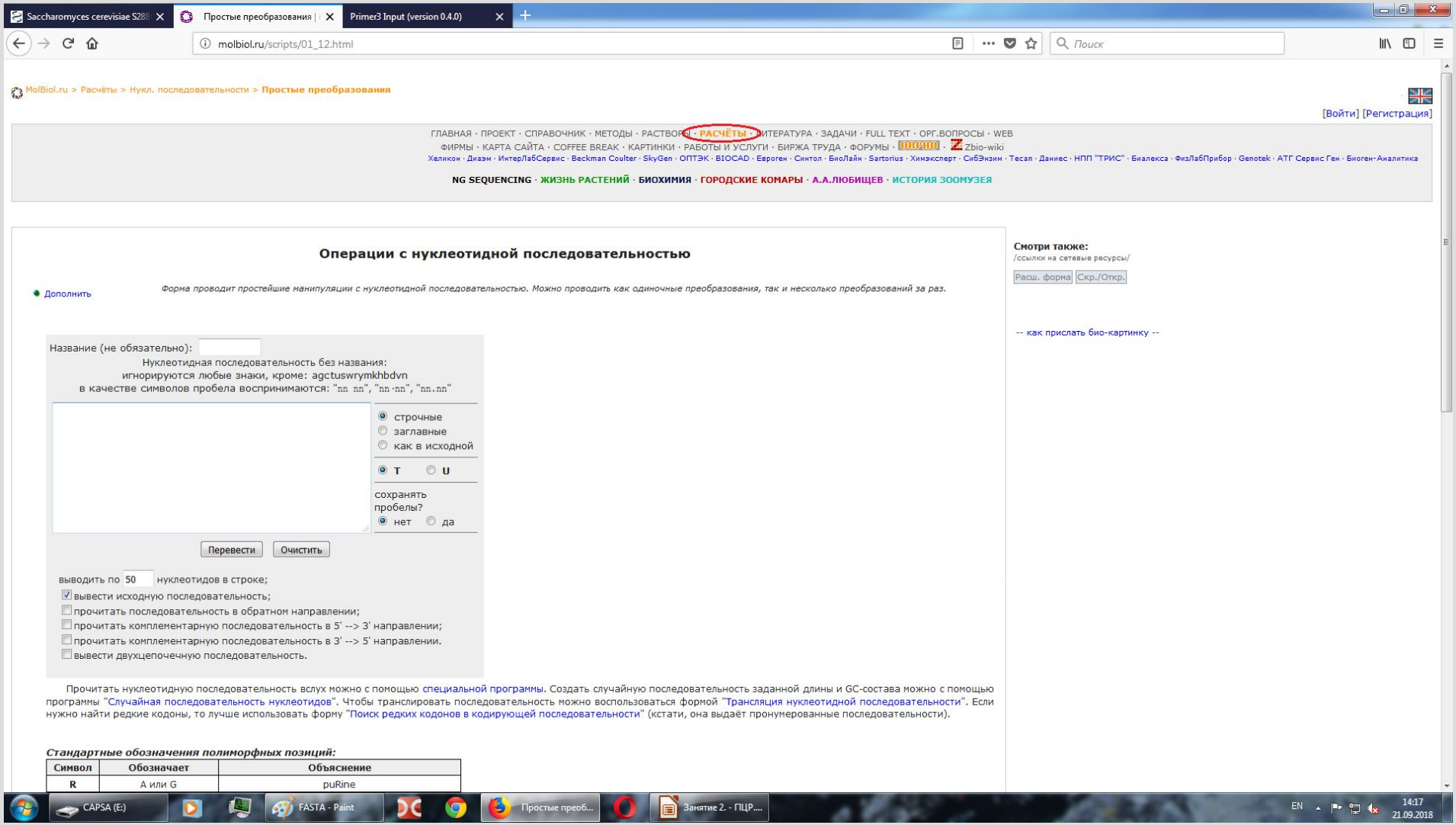
2. Открыть последовательность гена в формате FASTA.



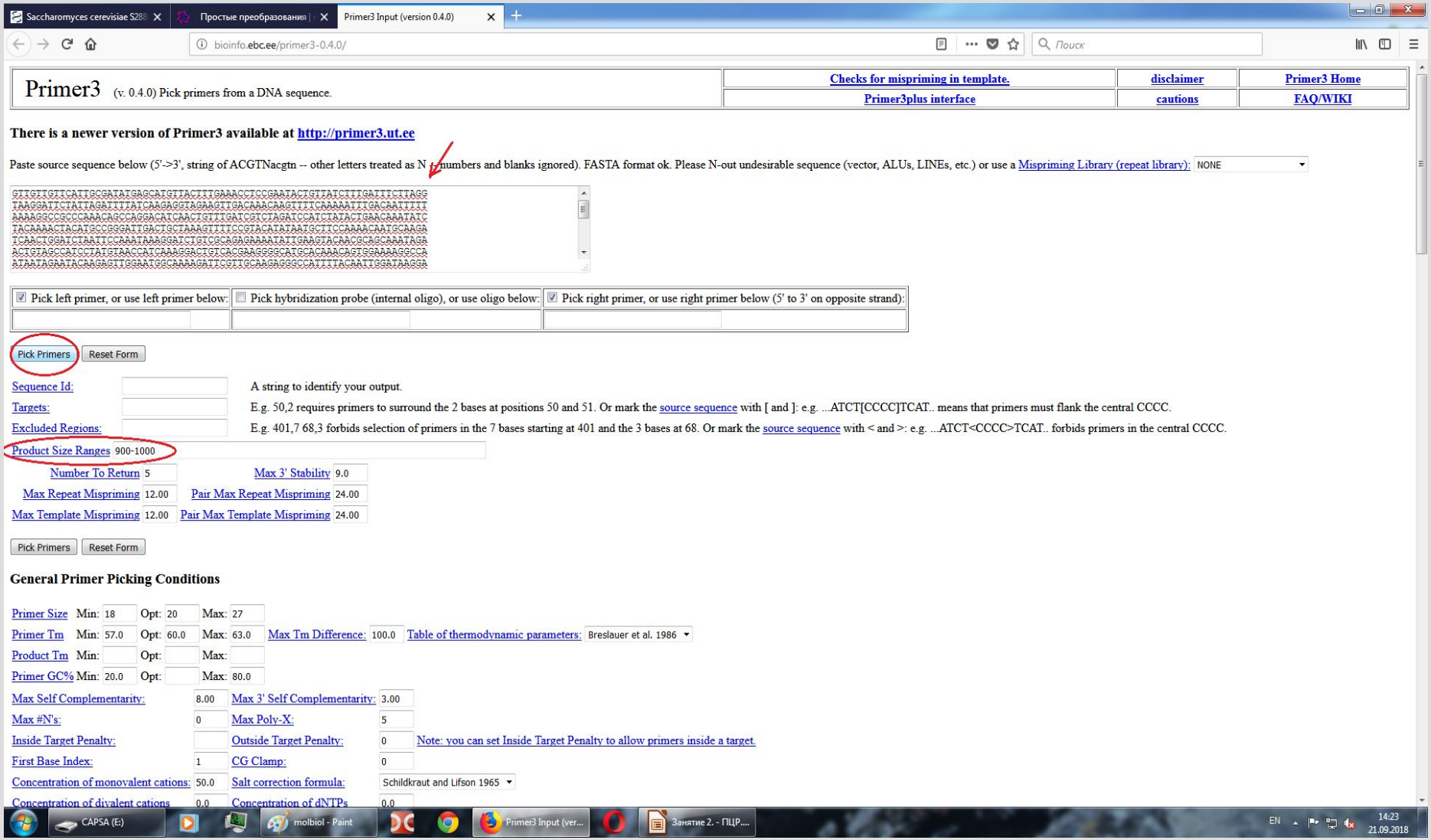
3. В последовательности выбрать первые 1000 нуклеотидов и сохранить в текстовый файл.



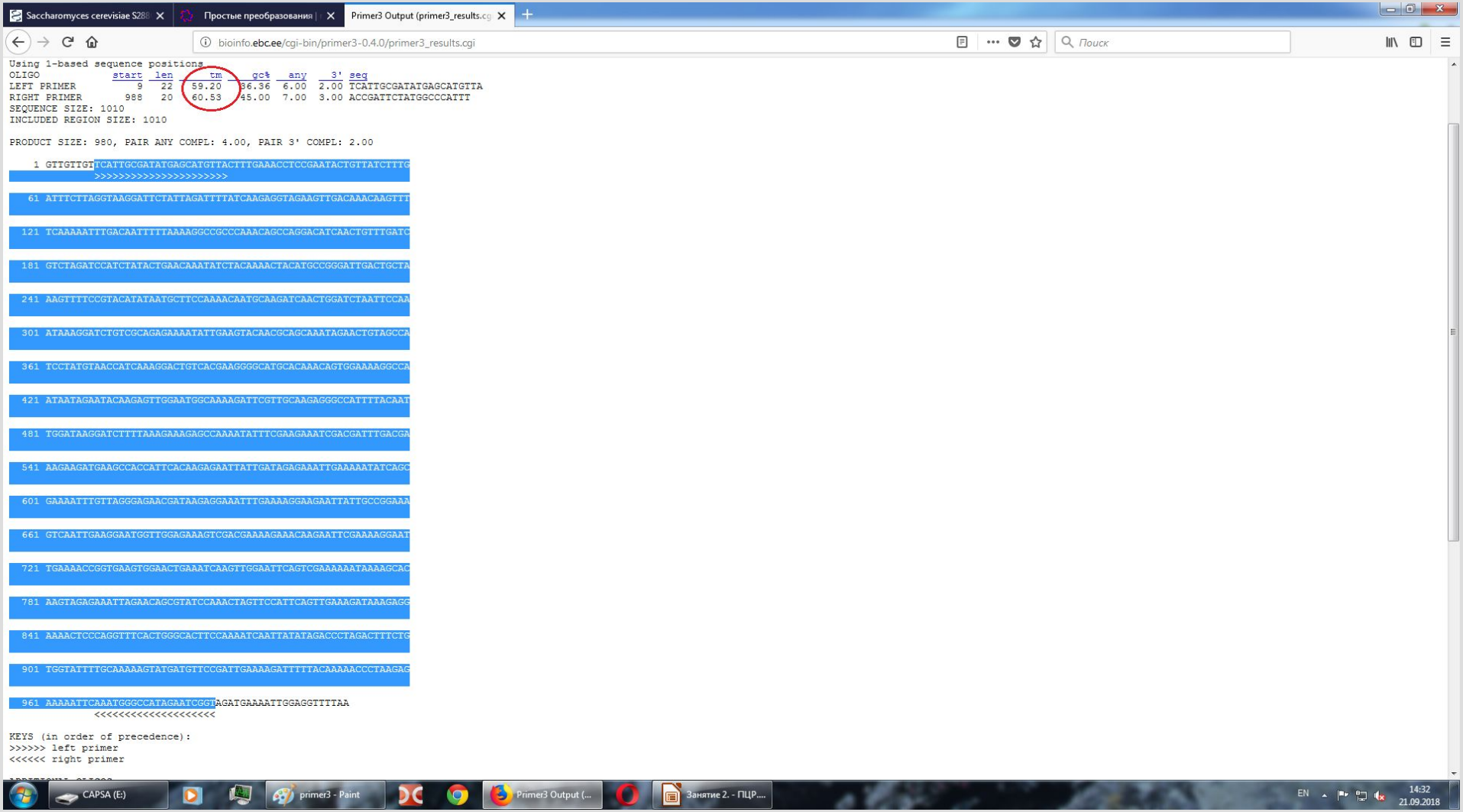
4. “Наивный” подбор праймеров: с помощью сайта Molbiol составить праймеры (по 20 нуклеотидов) (прямой праймер совпадает с началом последовательности, обратный – комплементарен перевёрнутому концу последовательности)



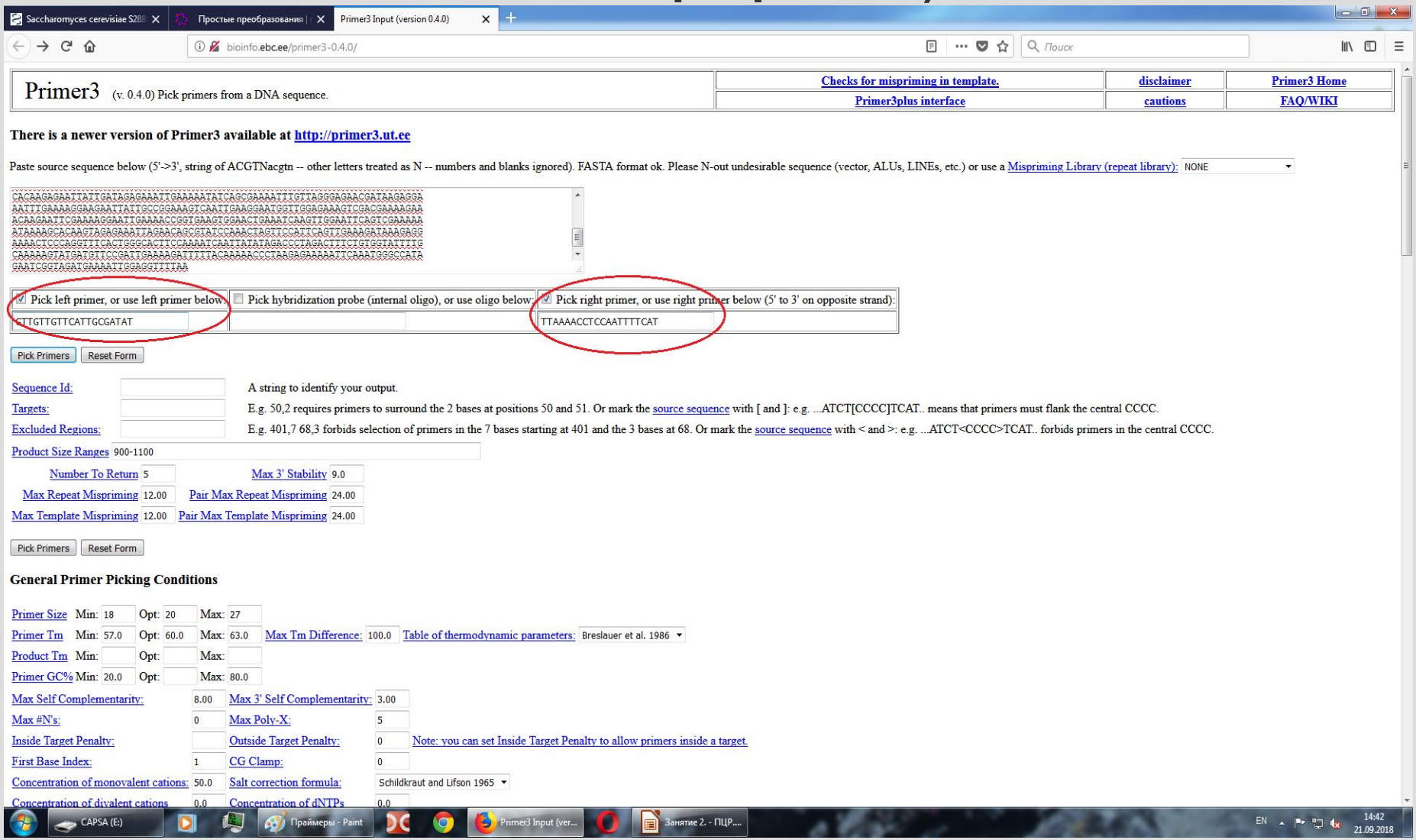
5. Подбор “оптимальных” праймеров: скопировать последовательность и вставить в окошко на сайте Primer3; установить длину амплифицируемого фрагмента 900-1000, нажать Pick primers.



6. Выписать в файл с исходной последовательностью наиболее оптимальные праймеры (прямой и обратный), их температуры плавления и последовательность ПЦР-продукта (указать его длину).



7. Проверка качества “наивных” праймеров: вставить последовательности “своих” праймеров и нажать Pick primers; в файле указать характеристики праймеров и причины, по которым они не подходят (указаны в отчёте программы).



Итого

- Нужно прислать по почте текстовый файл (Фамилия_группа.doc), в котором есть:
- Исходная последовательность.
- “Наивные” праймеры, их температура плавления и причины, по которым не подходят.
- “Оптимальные” праймеры и их температура плавления.
- Последовательность и длина продукта ПЦР с “оптимальными” праймерами.