БИОИНЖЕНЕРИЯ

Компоненты ПЦР

- вода
- буфер
- смесь четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов
- праймеры
- полимераза
- ДНК-матрица

Буфер для ПЦР

- Tris-HCl (5-75 mM, pH 8.8)
- KCl (50 mM), (NH4)2SO4 (20 mM)
- MgCl2 (1-3 mM)

Магний нужен для работы фермента и для образования комплексов праймеров с матрицей.

Праймеры (олигонуклеотиды)

Короткие (несколько десятков нуклеотидов) одноцепочечные молекулы ДНК, служащие затравками для синтеза новой цепи в ходе ПЦР и одновременно ограничивающие собой амплифицируемый участок ДНК.

Химический синтез в коммерческой фирме – именно так в настоящее время биоинженеры получают олигонуклеотиды для работы.

Очистка праймеров:
- либо вырезание из ПААГ,
- либо HPLC.

Самый главный параметр праймера – температура его отжига на матрицу

Очень примерная формула:
Tm (°C) = 4(G + C) + 2(A + T)

Приемлемая формула:
Tm (°C) = 81.5 + 0.41(%GC) - (675/N)

Термодинамически корректная формула:

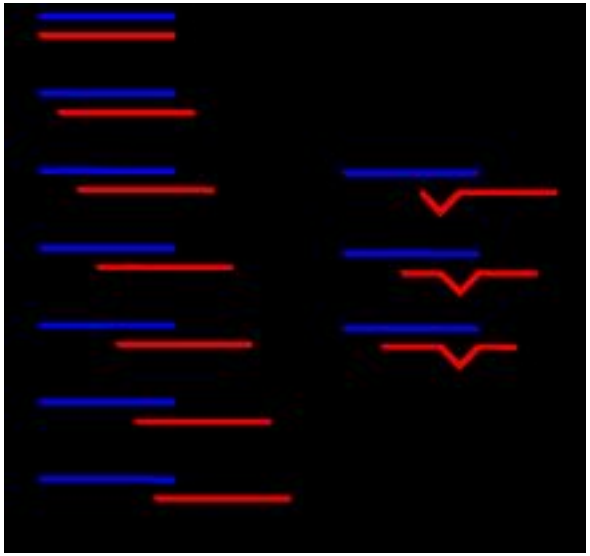
$$T_m = \left\{ \frac{\Delta H^\circ \cdot 1000}{A + \Delta S^\circ + R\ln(C_t / 4)} \right\} - 273.15 + 16.6\log[Na^+]$$

Where ΔH (Kcal/mol) is the sum of the nearest neighbor enthalpy changes for hybrids, A is a small, but important constant containing corrections for helix initiation, ΔS (eu) is the sum of the nearest neighbor entropy changes, R is the Gas Constant (1.987 cal deg^{-1} mol^{-1}) and C_t is the total molar concentration of strands. If the strand is self complementary, C_t /4 is replaced by C_t.

Как правильно подобрать праймеры для ПЦР

1. Длина праймера должна обеспечить его однозначный отжиг на целевой участок матрицы. При этом чем короче праймер, тем он стабильнее и дешевле!
2. Четыре 3’-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны ни самому праймеру, ни праймеру в паре. При этом они обязаны быть комплементарны матрице!
3. Температуры отжига двух праймеров должны быть более или менее одинаковыми.

Нестрогая комплементарность матрице – окно возможностей!



Внесение в праймер сайтов рестрикции!

Мутагенез!

ДНК-полимеразы для ПЦР: термостабильность – наше все!

ДНК-полимераза из обычного организма не очень подходит для ПЦР. Ее нужно было бы добавлять в реакцию в каждом цикле…

Термофильные организмы живут при высоких температурах. Их белки не денатурируют необратимо даже при 92 градусах.

ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза): период полужизни фермента при температуре 92 °C составляет 130 минут! Оптимум 72 °C!

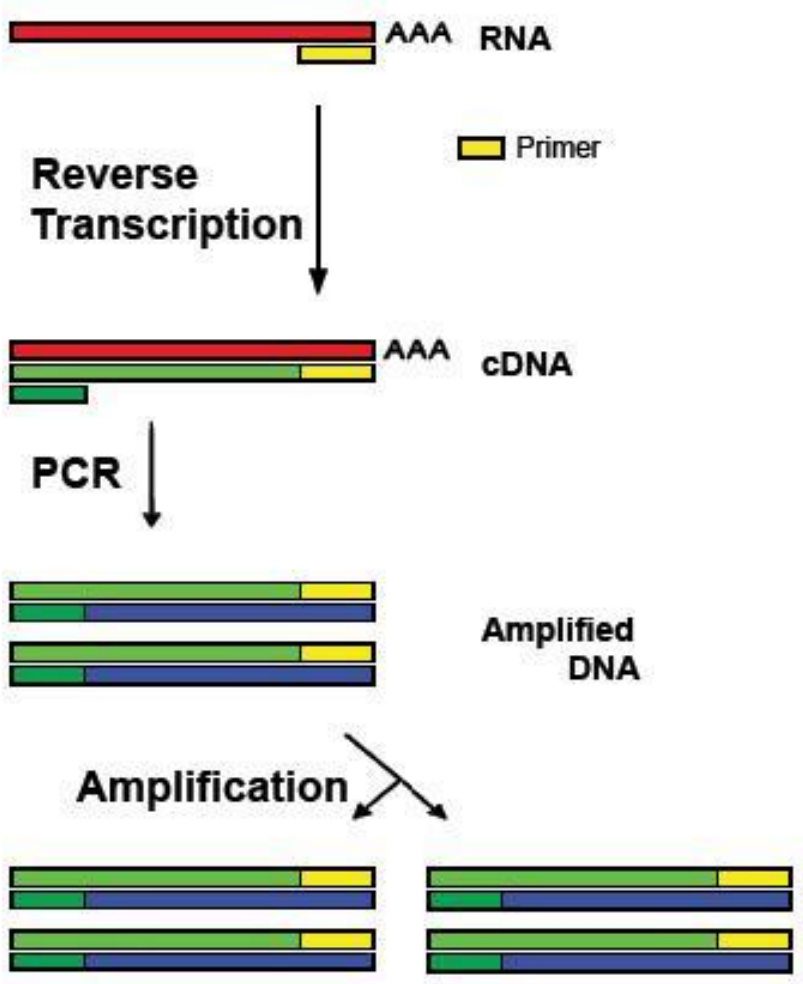
Другие термостабильные полимеразы

Полимераза	Частота ошибок
Pfu	1.3 x 10(-6)
Deep Vent	2.7 x 10(-6)
Vent	2.8 x 10(-6)
Taq	8.0 x 10(-6)

Сейчас используются рекомбинантные ферменты с повышенной точностью.

ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR)

Используется для получения кДНК (комплементарная ДНК, cDNA), то есть ДНК, являющейся точной копией зрелой мРНК. Часто это бывает необходимо, чтобы избежать проблем, связанных с процессингом РНК (сплайсинг и т.п.).



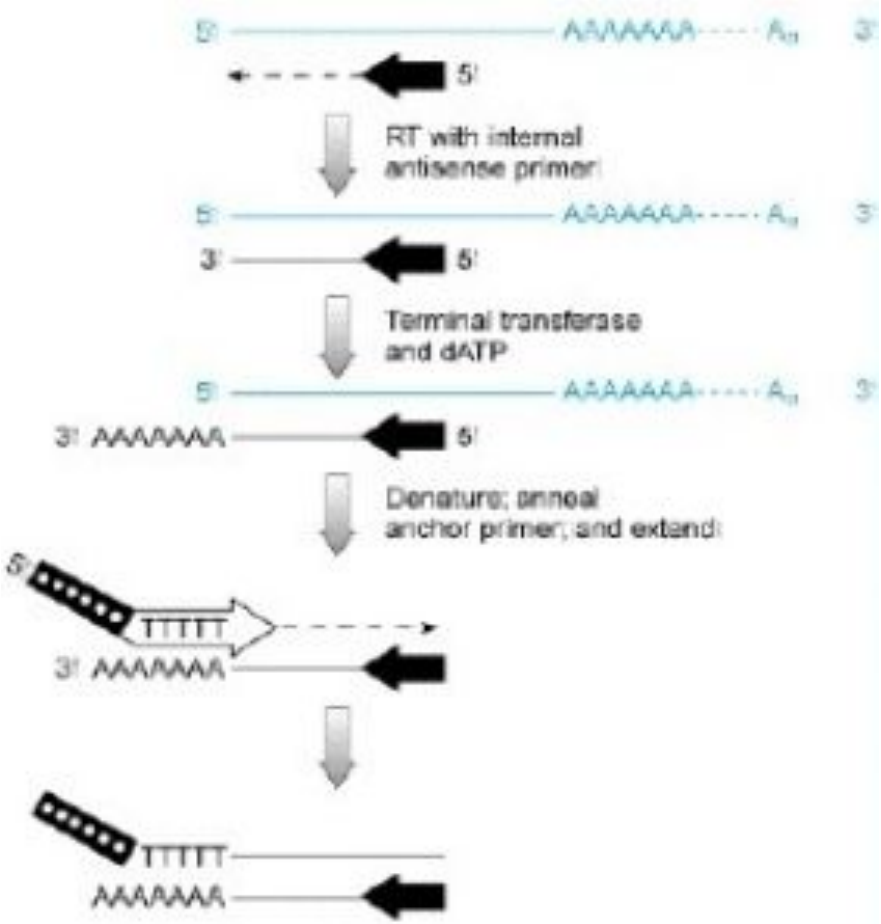
Библиотеки кДНК используются на практике гораздо чаще, чем полногеномные библиотеки.

В библиотеках кДНК содержатся только те последовательности, с которых можно *in vitro* синтезировать белок (что чаще всего и бывает нужно биоинженерам).

Хорошо жить в XXI веке! Много геномов уже известно, можно взять нужную мРНК и амплифицировать ее при помощи RT-PCR.
А как работали люди 30 лет назад, когда геномов еще не было?

RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends

Используется для определения последовательности транскриптов (мРНК).



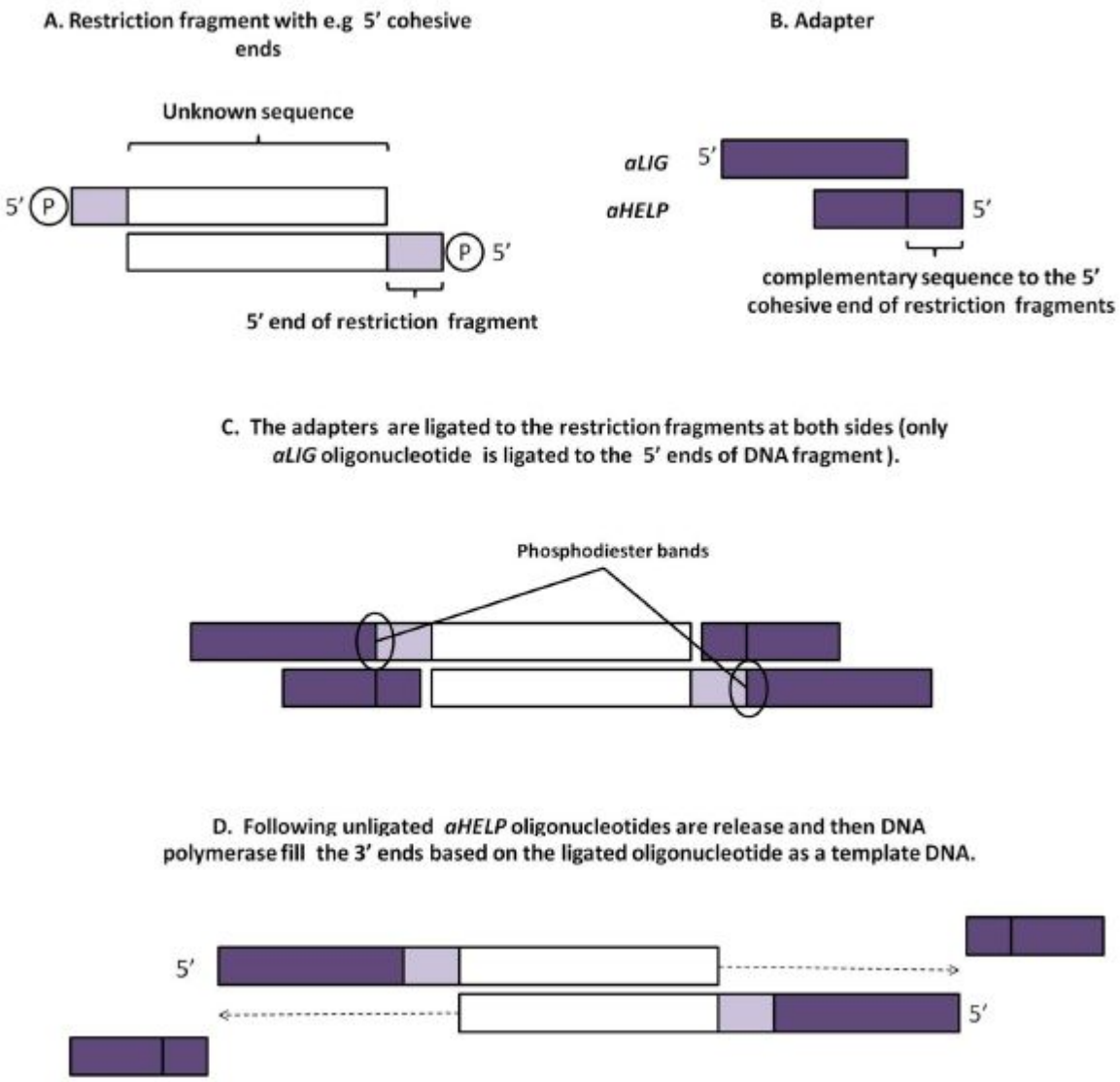
5’-RACE

Race ricerca del 3' ignoto

sintesi del I filamento di cDNA con RT con primer oligo dT
trattamento con RNase

PCR con primer frw. noto e primer rev. con coda aggiunta

Ligation-mediated PCR

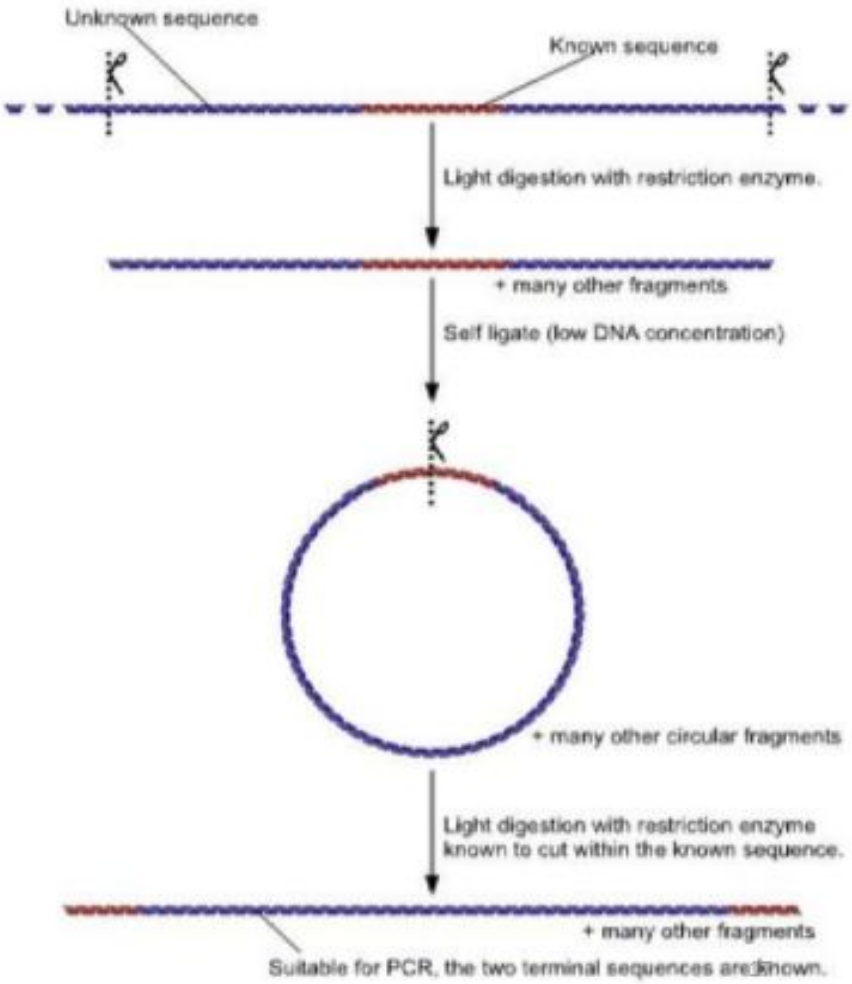


Совокупность подходов, основанных на лигировании адапторов и их последующем использовании для проведения ПЦР.

Применяются для первичного анализа неотсеквенированных геномов.

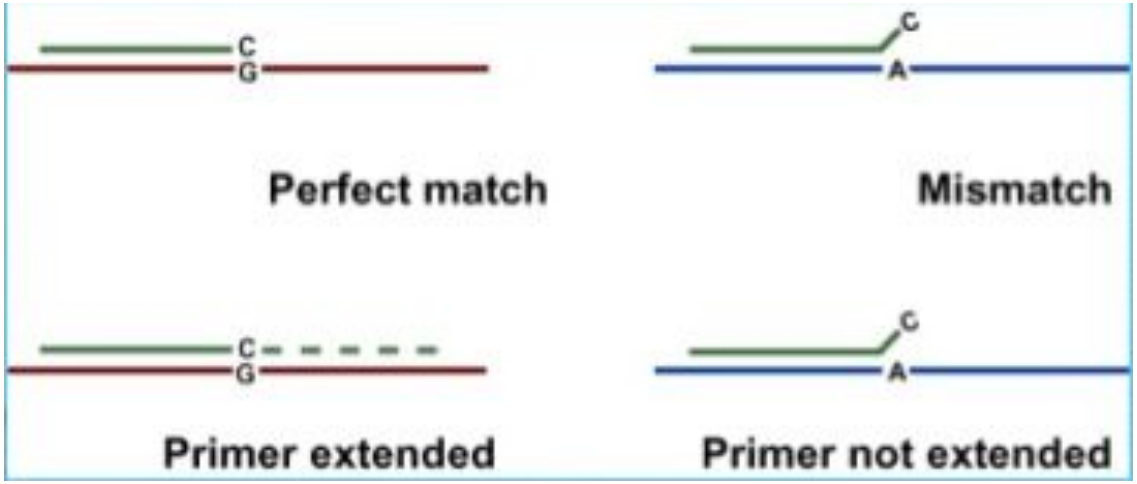
Inverse PCR

Используется для амплификации участков ДНК, фланкирующих участок с известной последовательностью.

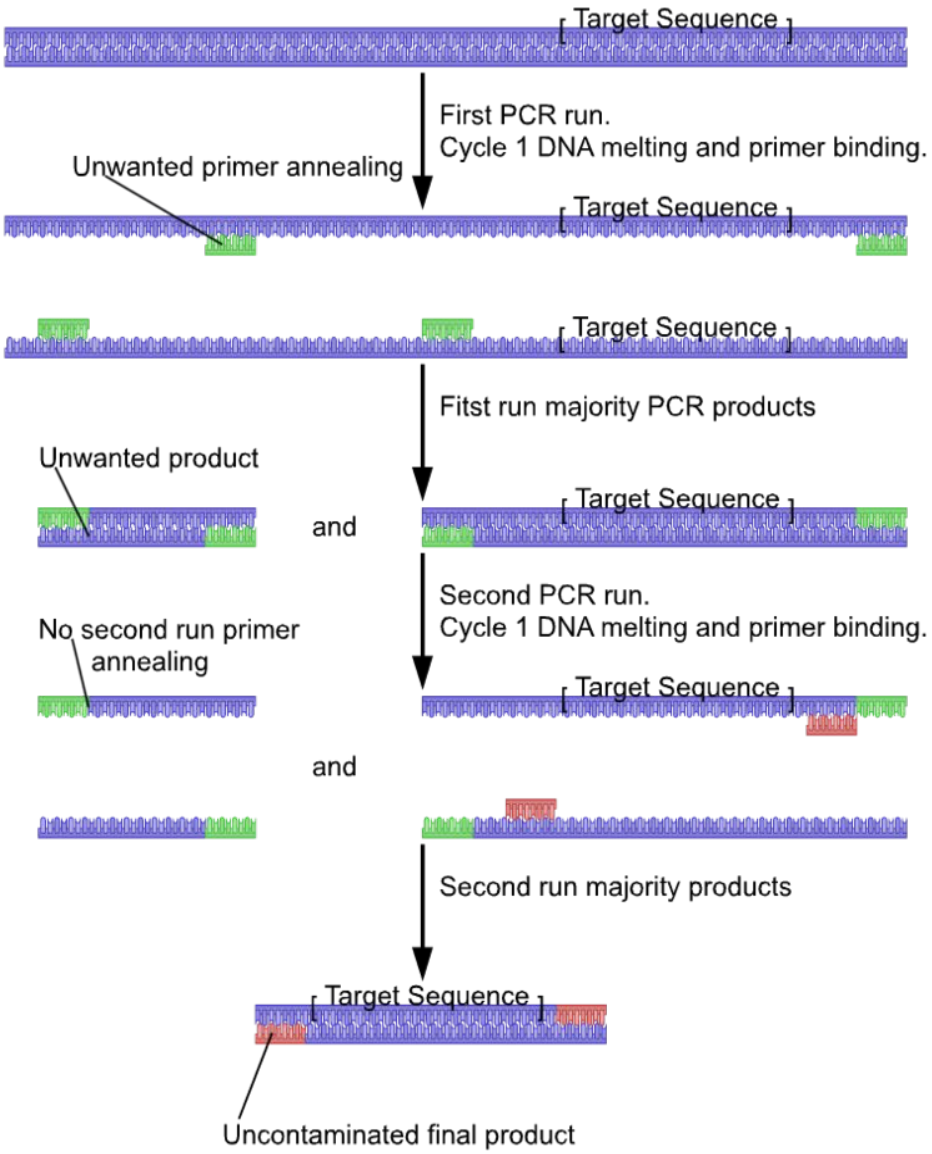


Аллель-специфическая ПЦР

Используется для детекции аллельных вариантов (однонуклеотидных полиморфизмов).



Nested PCR



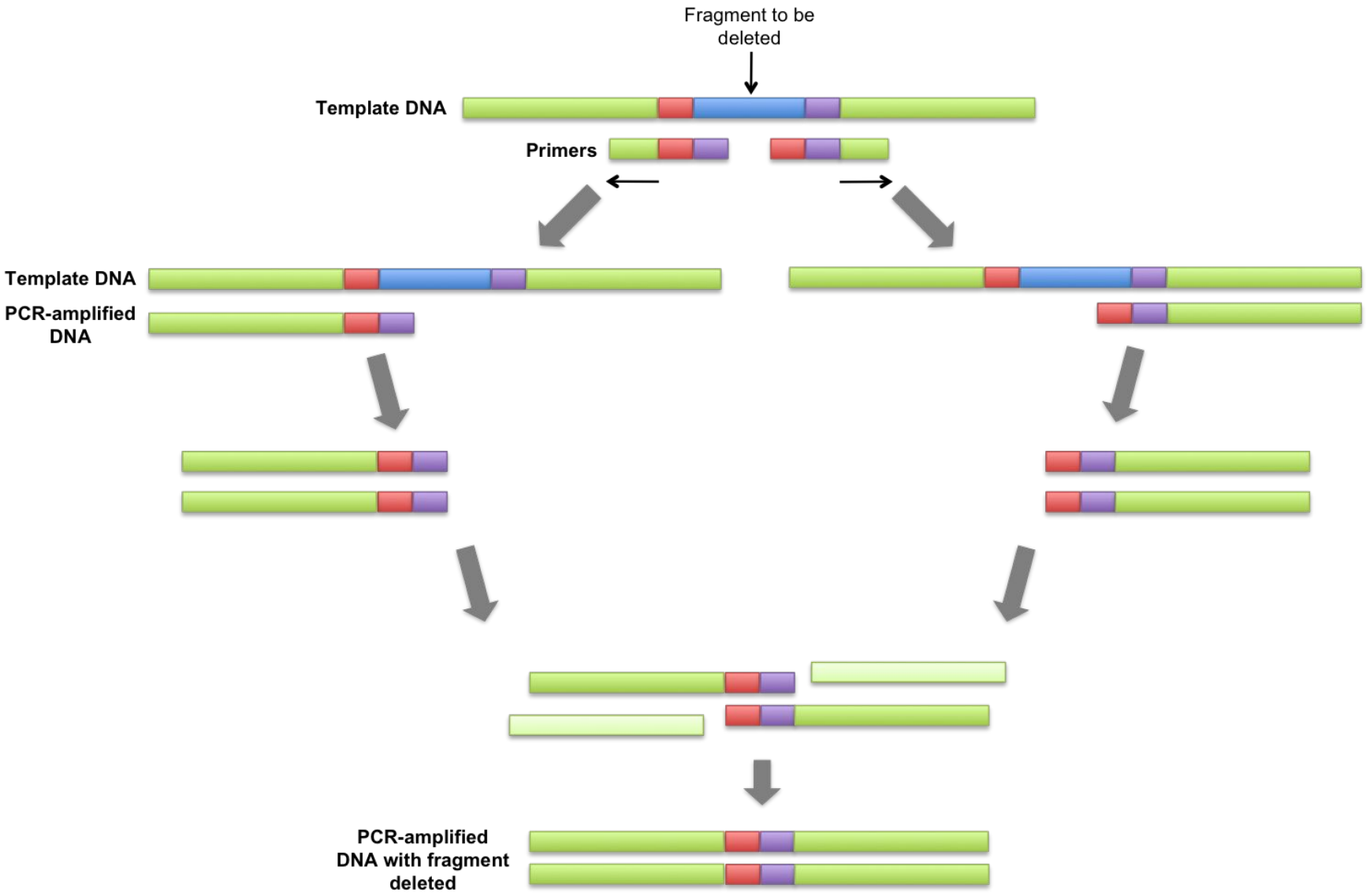
Используется в случае всякого рода сложных матриц, с которых получаются неспецифические продукты.

Позволяет получить чистый специфический продукт посредством двух последовательных ПЦР.

Первая ПЦР – несколько циклов. Ее продукт используется как матрица во второй ПЦР, и тогда неспецифические продукты уже не амплифицируются.

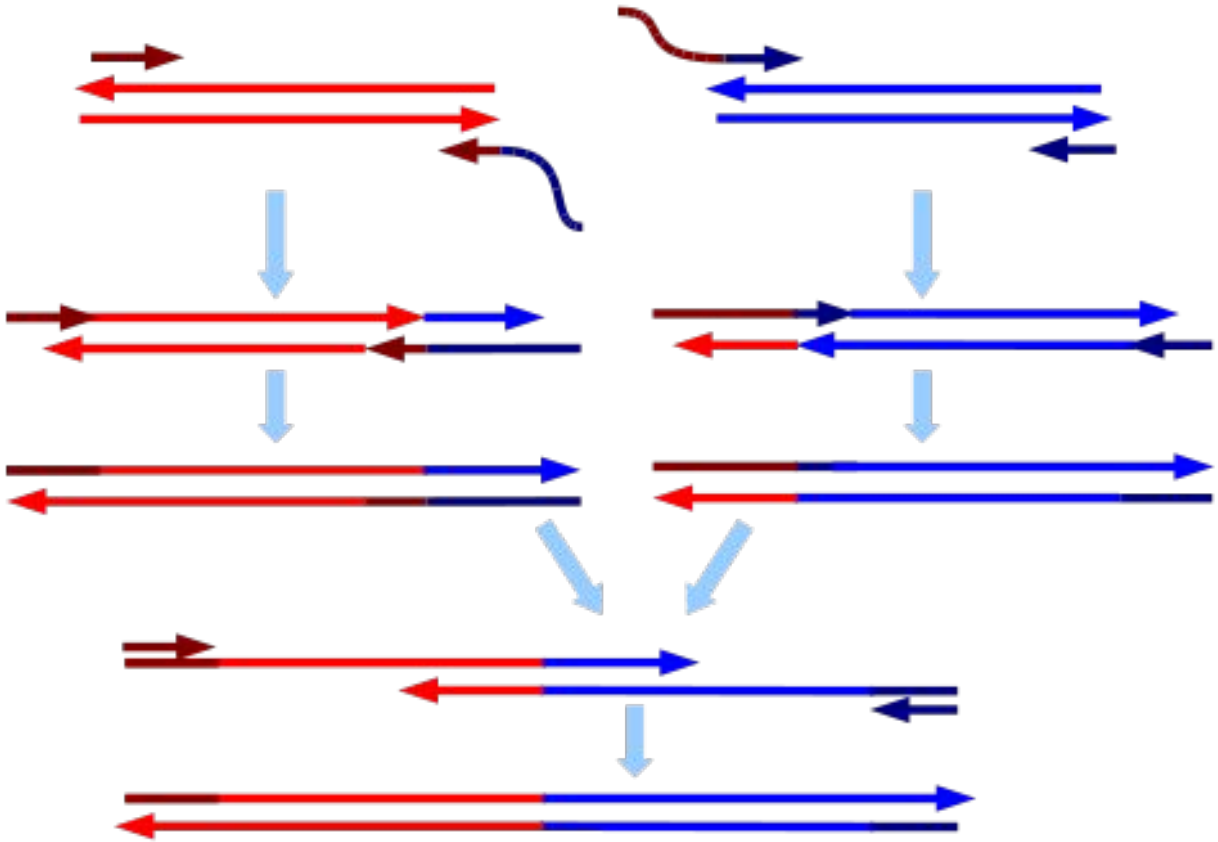
Overlap extension PCR

Для делеции какого-либо участка из ДНК



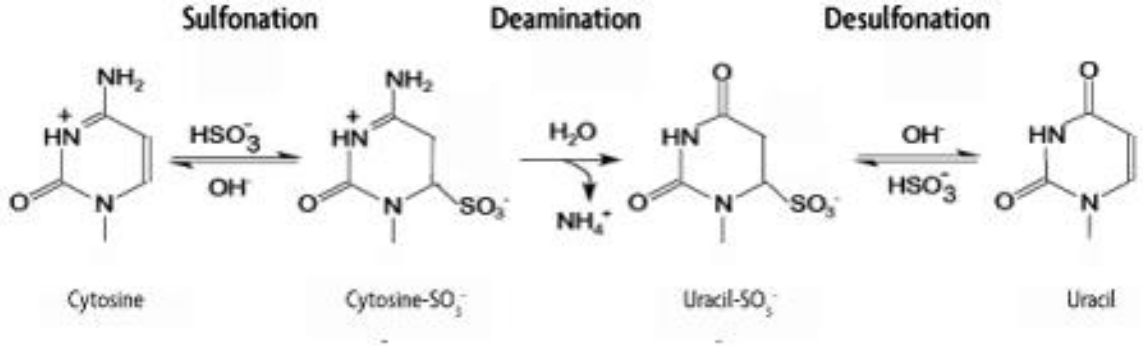
Overlap extension PCR

Для слияния двух участков ДНК



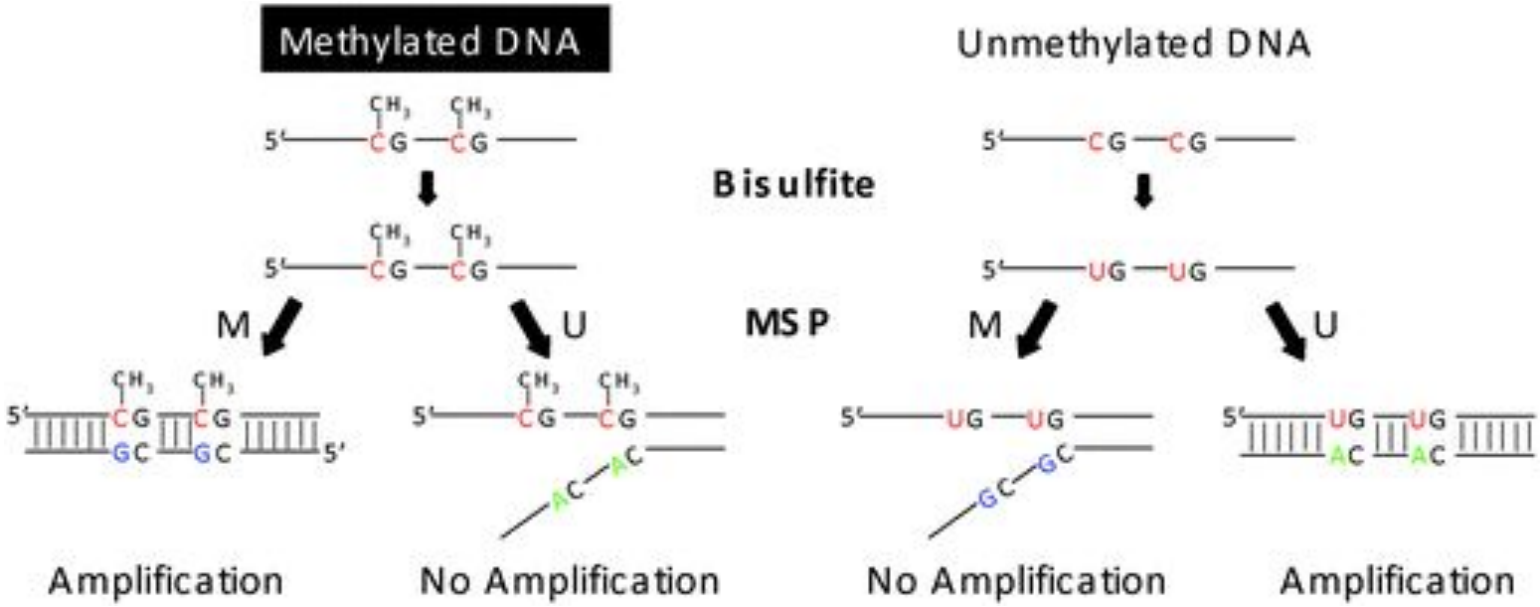
Метил-чувствительная ПЦР

Бисульфитная конверсия CpG-последовательностей:



Если C метилирован – это не работает!

И вы можете количественно определить уровень метилированности ДНК:



Miniprimer PCR

Используется для одновременной амплификации многих похожих последовательностей (чаще всего – генов рибосомных РНК микробных сообществ).

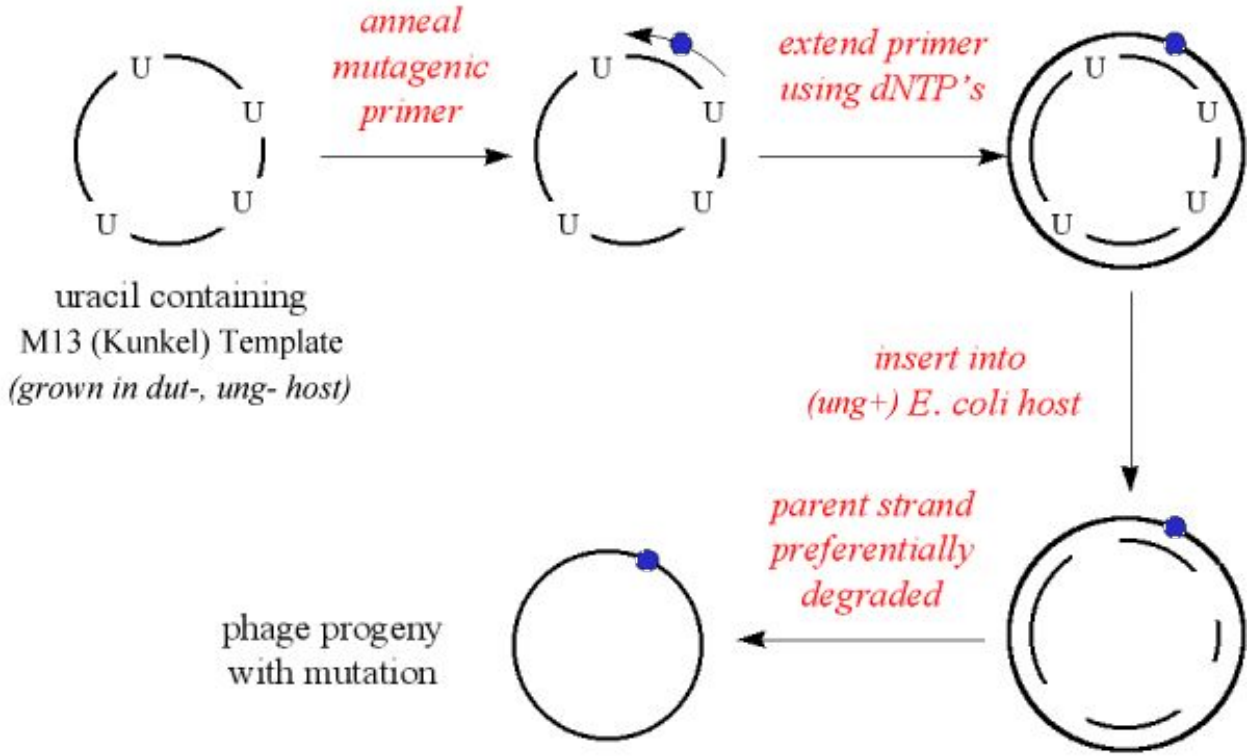
В методе используется ДНК-полимераза S-Tbr. Ее отличительная черта – способность катализировать синтез с коротких (около 8 нуклеотидов) праймеров. Такие праймеры будут отжигаться сразу на все гены рибосомных РНК и давать набор продуктов, которые потом можно клонировать, секвенировать и определить состав данного микробного сообщества.

Метод очень простой, его все описывают на словах, поэтому я в Интернете картинки не нашел, а самому мне рисовать лень, уж не обессудьте.

ПЦР-мутагенез

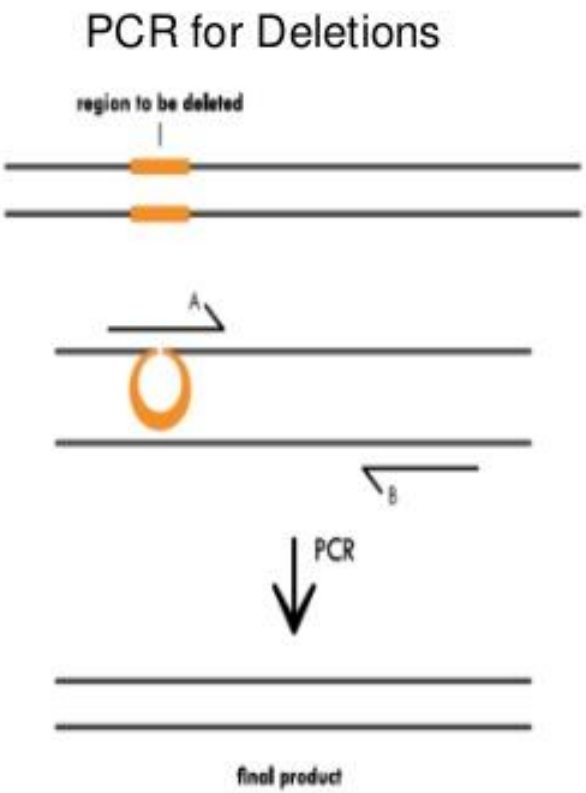
Направленный мутагенез в любом случае подразумевает использование праймера с мутацией и ДНК-полимеразы.

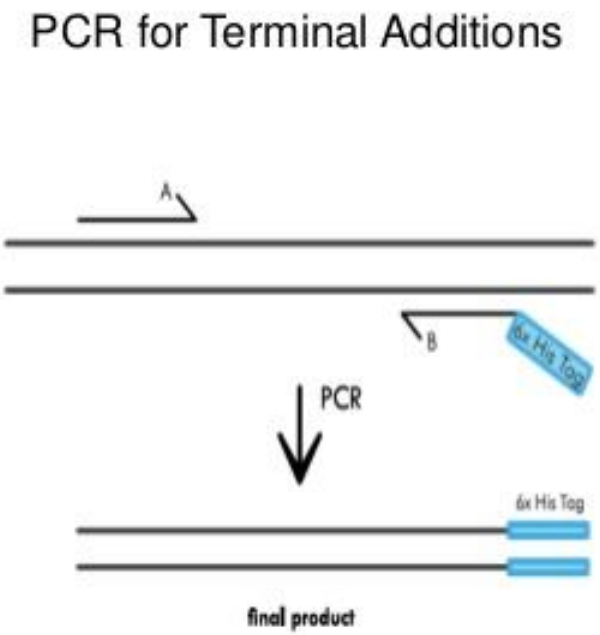
Пока не было ПЦР, люди дико мучились с этим делом.
Вот, например, мутагенез по Кюнкелю:



ПЦР-мутагенез

Самый просто вариант – это нужная вам мутация в праймере.



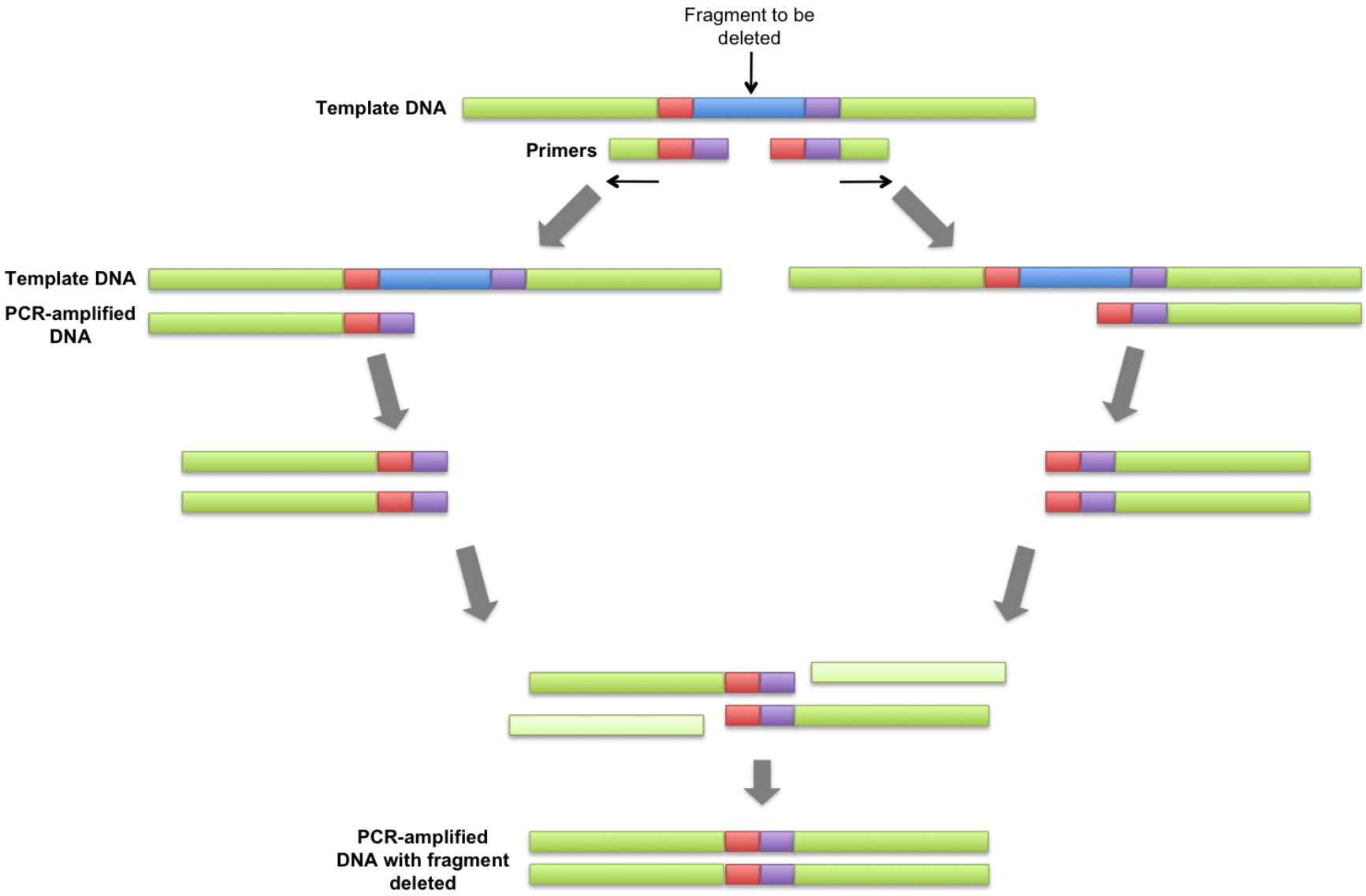


Однако это все легко и просто, если нужная вам мутация находится на конце амплифицируемого фрагмента (в таком случае она может попасть в праймер).

А что если вы хотите мутацию в середине гена?

Overlap extension PCR

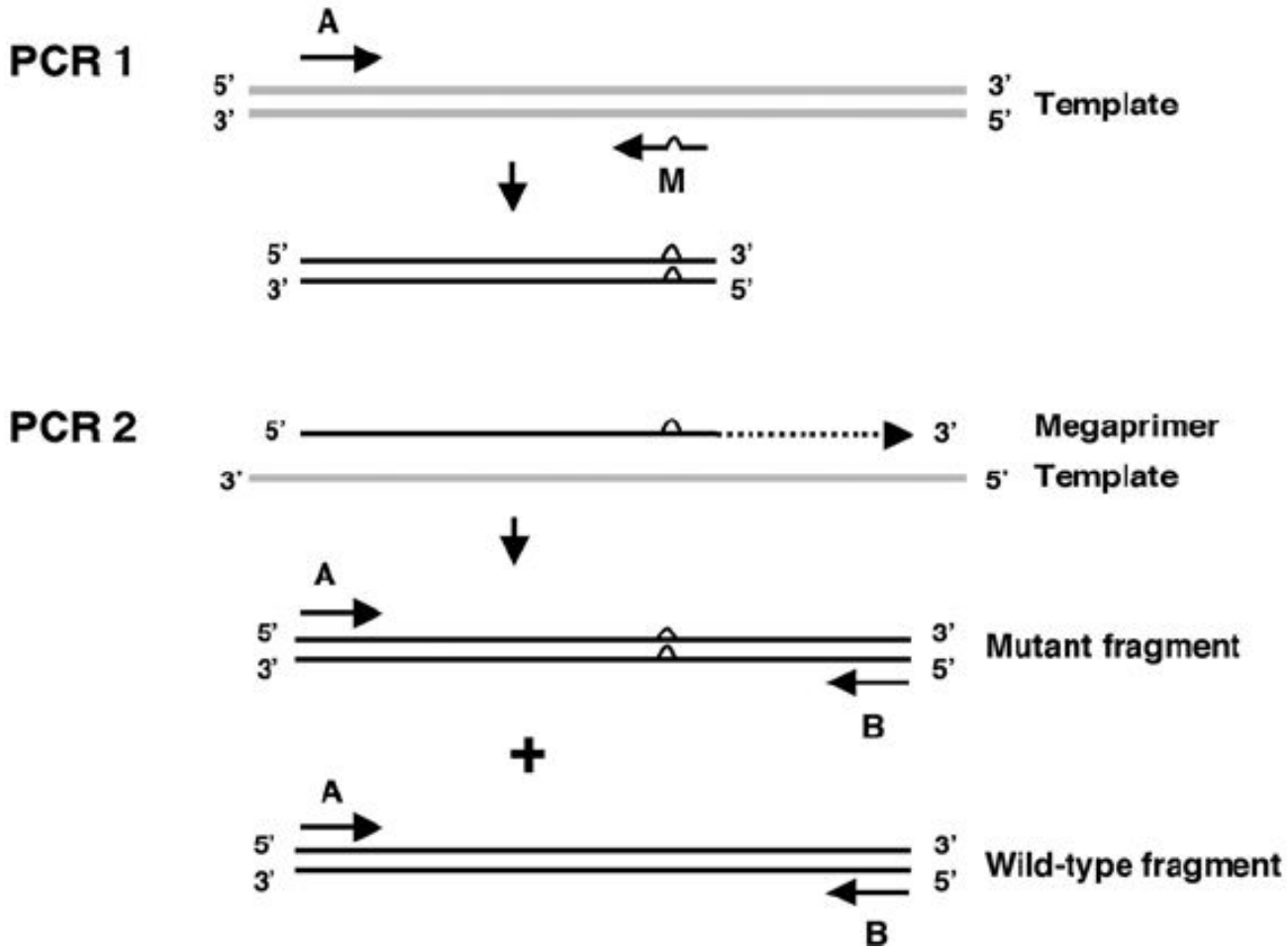
Для делеции какого-либо участка из ДНК



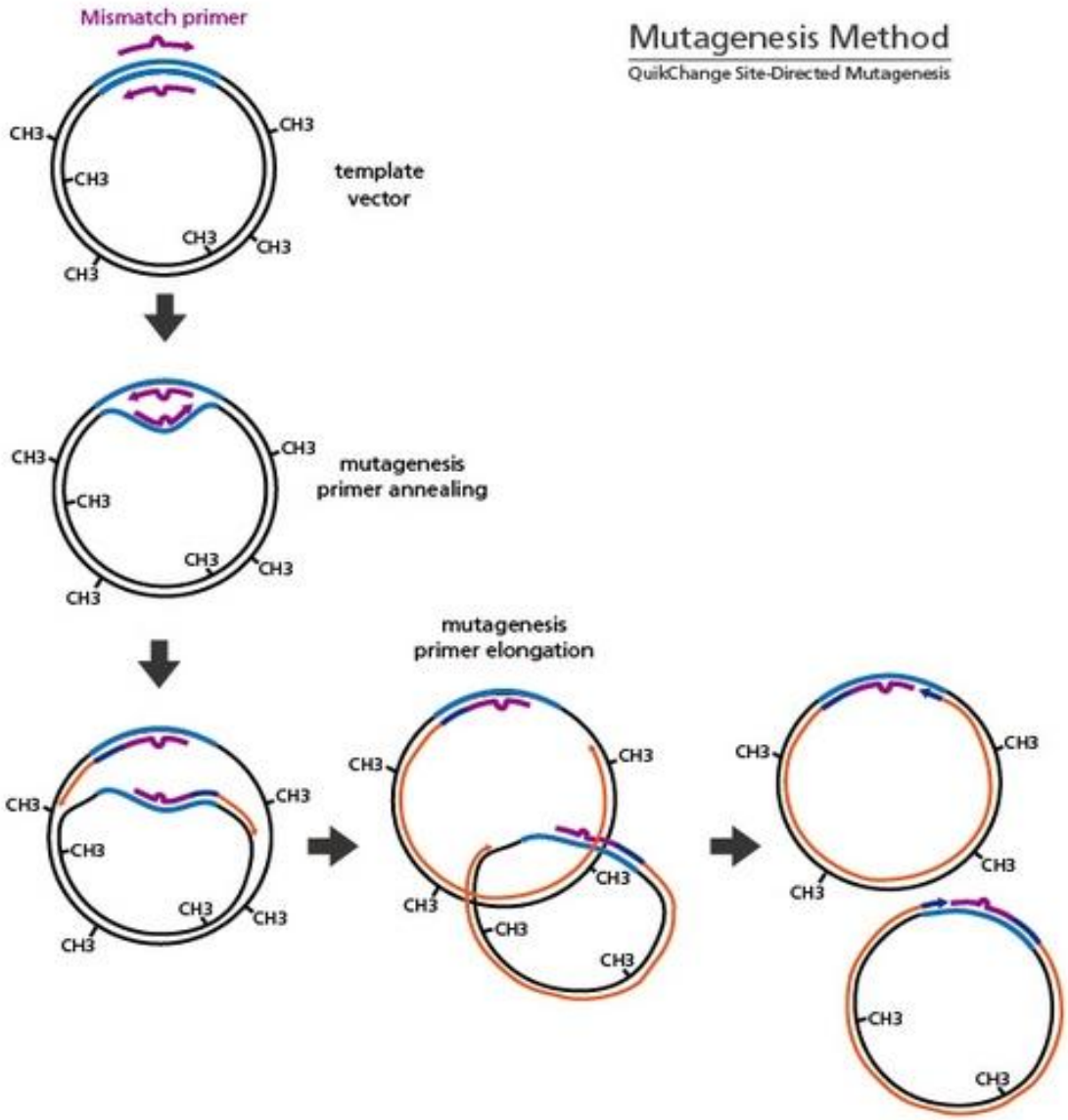
Megaprimer PCR

Две последовательных ПЦР.

1. Амплифицируется часть гена, один из праймеров содержит мутацию.
2. Продукт первой ПЦР используется как праймер (мегапраймер) во второй ПЦР.

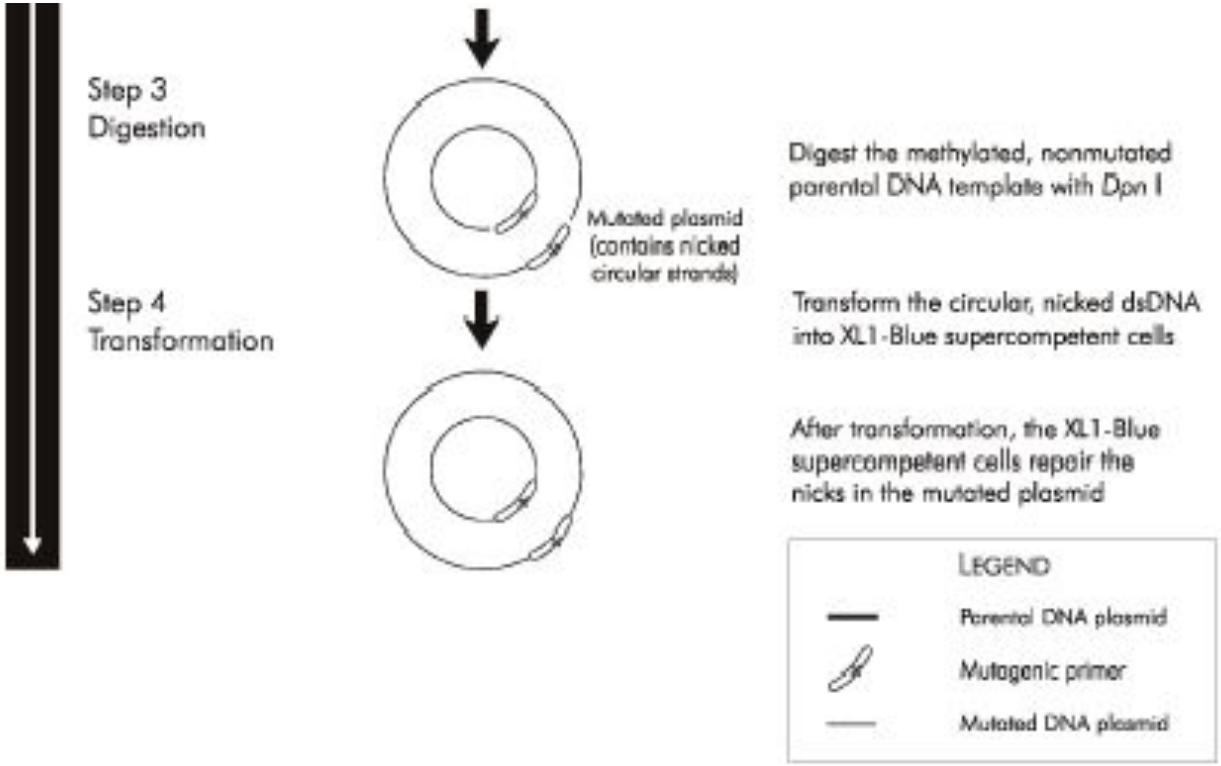


Мутагенез, основанный на метилированности матричных молекул ДНК



Pfu-полимераза работает по механизму «nonstrand-displacement».

Мутагенез, основанный на метилированности матричных молекул ДНК



Рестриктаза Dpn1 расщепляет только метилированные ДНК. Родительская цепь метилирована (это плазмида, выделенная из *E.coli*). Останется только новосинтезированная цепь (она получена *in vitro* и не метилирована). Такие цепи образуют двуцепочечные молекулы с никами. Ники залечатся системами бактериальной репарации после трансформации.