**Тема: Полимеразная цепная реакция.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Основные компоненты ПЦР-смеси и их роль.
2. Этапы и температурные режимы.
3. Ингибиторы ПЦР.
4. Проблема контаминации.
5. Контроли в реакции амплификации.

**Краткое содержание занятия:**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод амплификации ДНК *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

Праймеры - пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов, имеющих, как правило, размер от 15 до 30 п. н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Taq-полимераза - термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3’-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) - "строительный материал", используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;

Буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН;

Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования (например, ДНК микроорганизмов). При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов.

1. Денатурация. На первом этапе необходимо денатурировать ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95° С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Этот процесс длится не менее 1 минуты.

2. Отжиг. На втором этапе температуру смеси понижают до 55°С праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры выбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа.

После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3’-конца праймера.

3. Элонгация (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы - 75°С, и начинается синтез комплементарной цепи ДНК, инициируемый 3’-гидроксильной группой праймера, с максимальной эффективностью.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров к температуре оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухстадийный цикл ПЦР, совместив две стадии - отжиг и элонгацию - в одной.

В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Фактически значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет, по некоторым данным, 78-97%. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции это значение может быть намного меньше.

Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат. Смена температурного режима и его поддержание осуществляется автоматически. Каждый цикл обычно длится 3 - 5 минут.

Первый цикл. ДНК-мишень фланкирована определенными последовательностями. К образцу ДНК добавляют праймеры (Р1 и Р2), ДНК-полимеразу Taq и четыре дНТФ. Здесь каждая из новосинтезированных цепей имеет гораздо большую длину, чем расстояние от 3’-гидроксильной группы "её" праймера до концевого нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Такие цепи называют "длинными матрецами", именно на них будет идти дальнейший синтез. Эти цепи служат матрицами во втором раунде ПЦР.

Во втором цикле двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и новосинтезированной ("длинная матрица") цепей, вновь денатурируют, а затем отжигают с праймерами. При отжиге праймеры гобридизуются с комплементарными им участками как исходных цепей, так и "длинных матриц", синтезированных в первом цикле. В результате ферментативного синтеза на исходных цепях синтезируются "длинные матрицы", а на "длинных матрицах" - "короткие", с праймером на одном конце и с последовательностью, комплементарной второму праймер, на другом.

В третьем цикле все гетеродуплуксы, образовавшиеся ранее, одновременно подвергаются денатурации и отжигу с праймерами, а затем реплецируются. При отжиге праймеры гибридизуются с комплементарными участками исходных цепей, а также "длинных" и "коротких" матриц. При ферментативном синтезе *in vitro* на исходных цепях синтезируются "длинные матрицы", а на "длинных" и "коротких" матрицах - только "короткие матрицы".

В послудующих циклах число "коротких матриц" становится все больше.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.