



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра клинической лабораторной диагностики

Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных и наследственных болезней

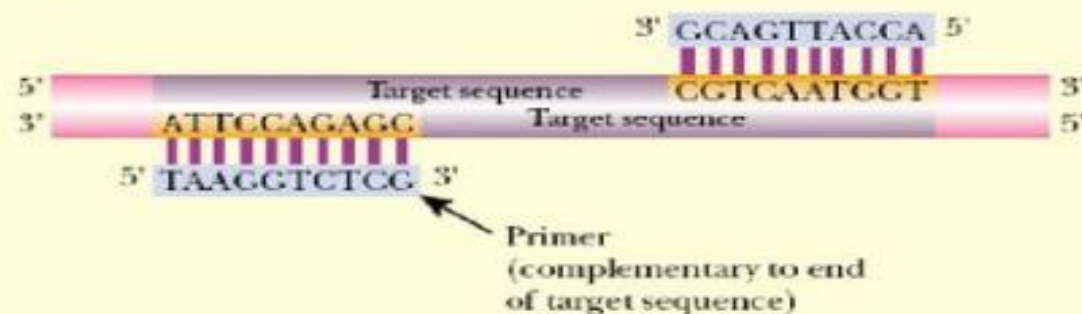
Полимеразная цепная реакция

Метод **ПЦР** представляет собой синтез *in vitro* (в пробирке) множества копий определенного целевого фрагмента ДНК, присутствующего в составе молекул ДНК в исследуемом образце, с помощью фермента ДНК-полимеразы при особом температурном режиме.

Выбор копируемого фрагмента ДНК и его границы определяются парой коротких синтетических олигонуклеотидов (праймеров), которые связываются с заданным участком в составе молекул ДНК в образце по принципу комплементарности, у его начала и конца, на противоположных цепях ДНК и служат затравками (началом) синтеза новых цепей.

Чувствительность метода такова, что позволяет обнаружить целевую последовательность, даже если она встречается однажды в образце из миллионов других молекул.

Template DNA



RUN PCR REACTION



Multiple copies of target sequence

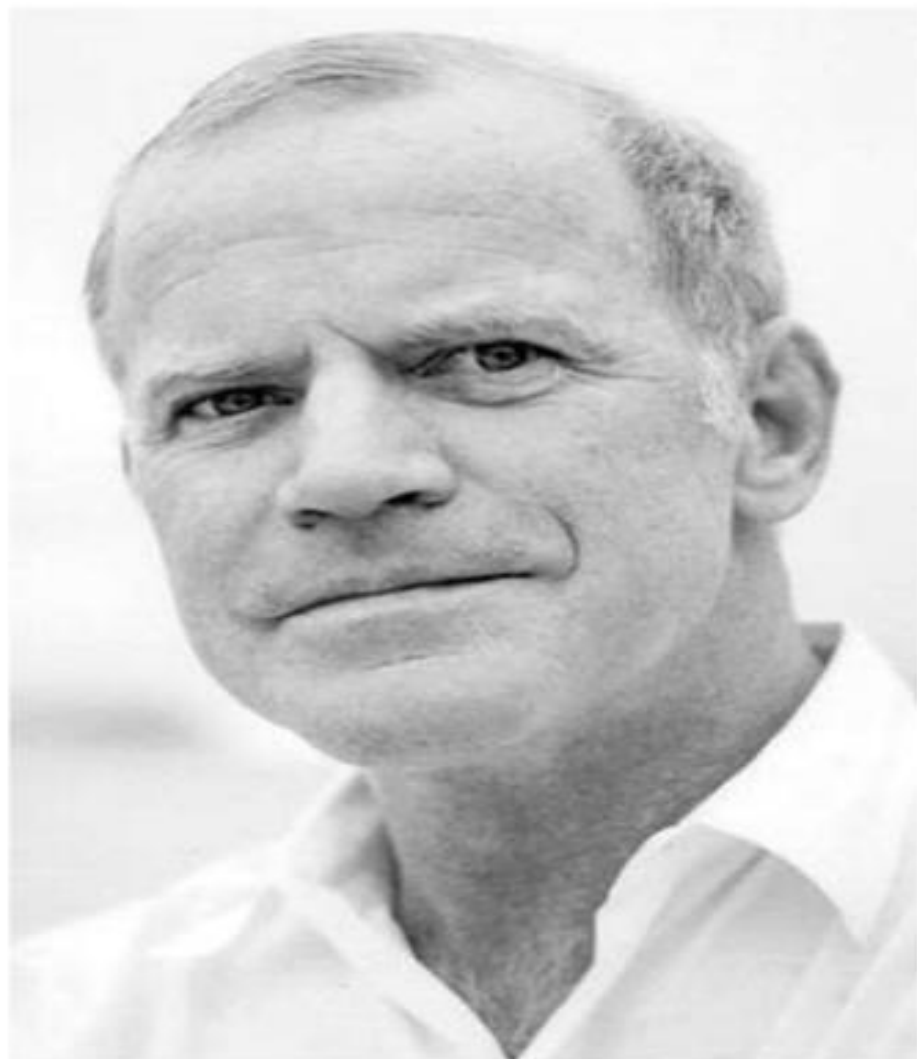
Полимеразная цепная реакция

Открытие метода ПЦР

Основные принципы использования праймеров и состав реакционной смеси для получения копий ДНК впервые были описаны *К. Клерре с соавторами* в 1971 г.

В 1983 г. сотрудник фирмы «Cetus» *Kary Mullis* предложил метод копирования (амплификации) определенных участков ДНК (метод ПЦР) в процессе повторяющихся температурных циклов. 1993 г. - Нобелевская премия по химии.

1985 г. - *Saiki R.K.* с соавторами опубликовали статью, в которой была описана амплификация участка гена β -глобина.



Kary Mullis

Полимеразная цепная реакция

Применение метода ПЦР

1. **Диагностика (выявление, обнаружение)**
 - диагностика инфекционных заболеваний;
 - диагностика онкологических заболеваний;
 - диагностика генетических заболеваний;
 - обнаружение микроорганизмов (в природных образцах, продуктах питания);
 - обнаружение генномодифицированных организмов и их компонентов в составе продуктов питания;
 - обнаружение целевых генов.
2. **Идентификация**
 - идентификация микроорганизмов;
 - идентификация личности;
 - установление родства.
3. **Клонирование (сборка) генов, модификация генов**
4. **Исследование структуры генов и геномов**
5. **Мутагенез и изменение свойств природных белков**

Полимеразная цепная реакция

Репликация (удвоение) ДНК

ПЦР моделирует в пробирке природный процесс репликации ДНК.

Особенности процесса репликации:

1. Катализируется ДНК-полимеразами

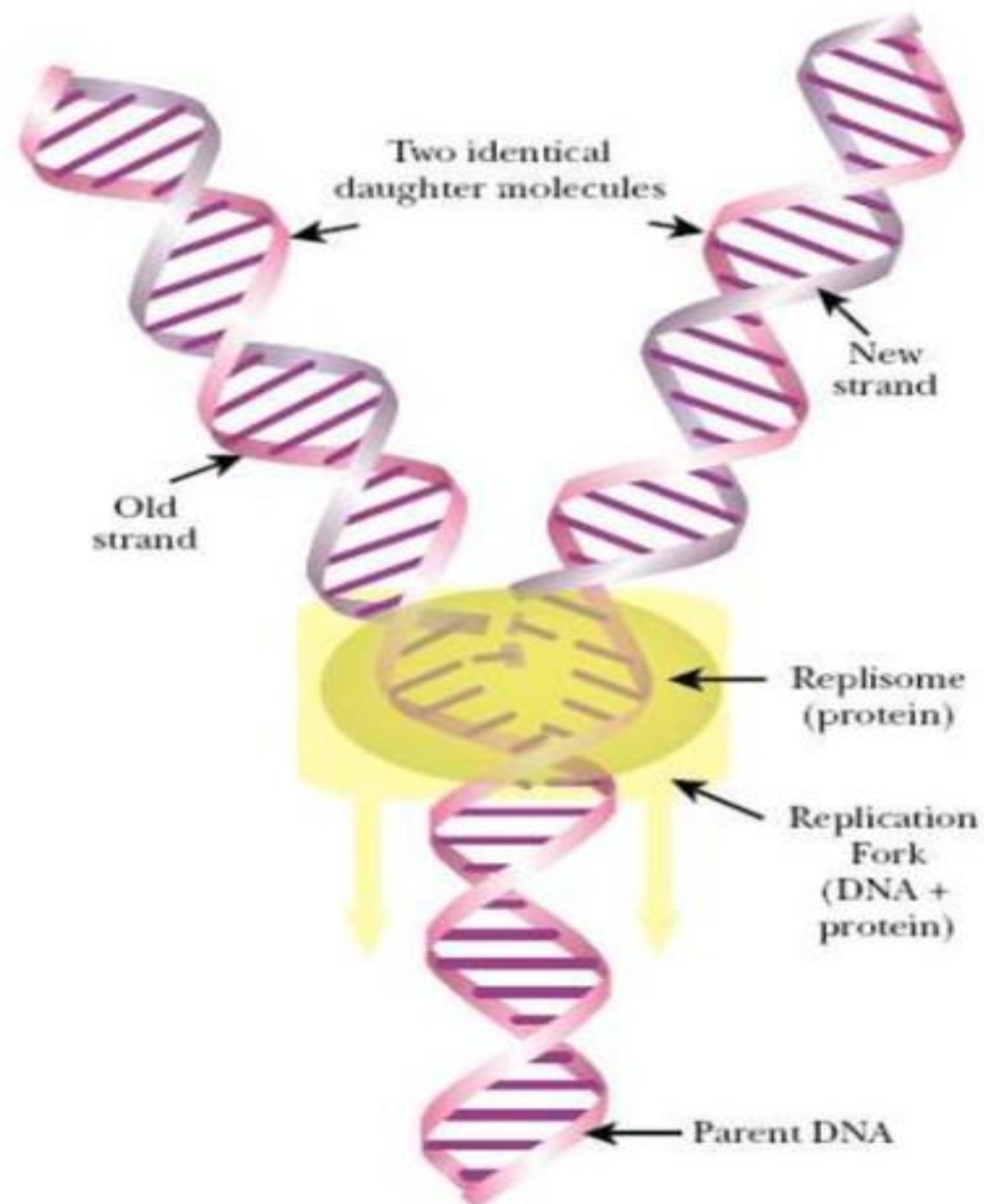
2. Полуконсервативность

3. Необходимость в затравке

4. Комплементарность

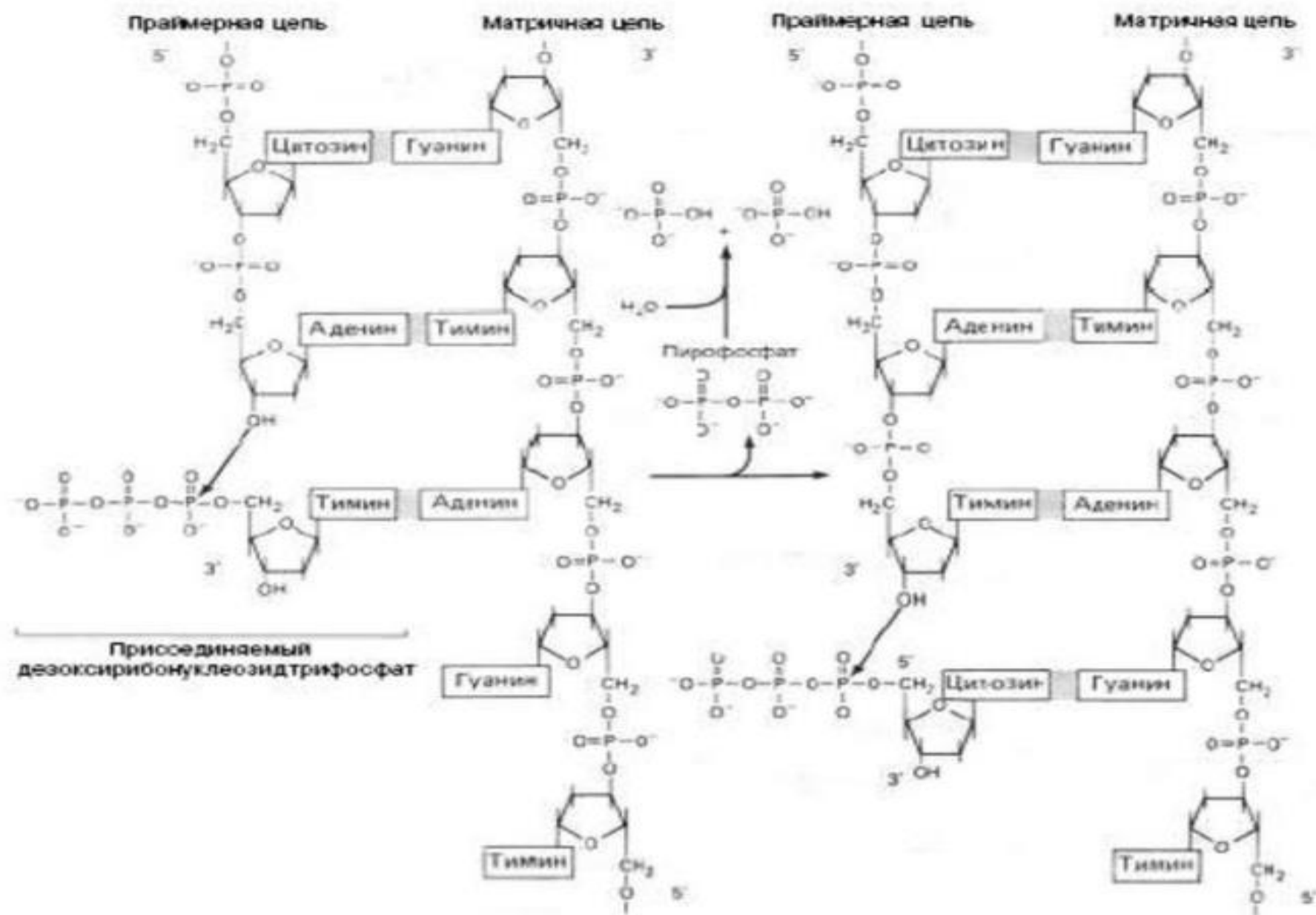
5. Последовательность нуклеотидов в матричной цепи считывается в направлении $3' \rightarrow 5'$

6. Новая (дочерняя) цепь синтезируется в направлении $5' \rightarrow 3'$



Полимеразная цепная реакция

Репликация (удвоение) ДНК



Полимеразная цепная реакция

Оборудование для ПЦР

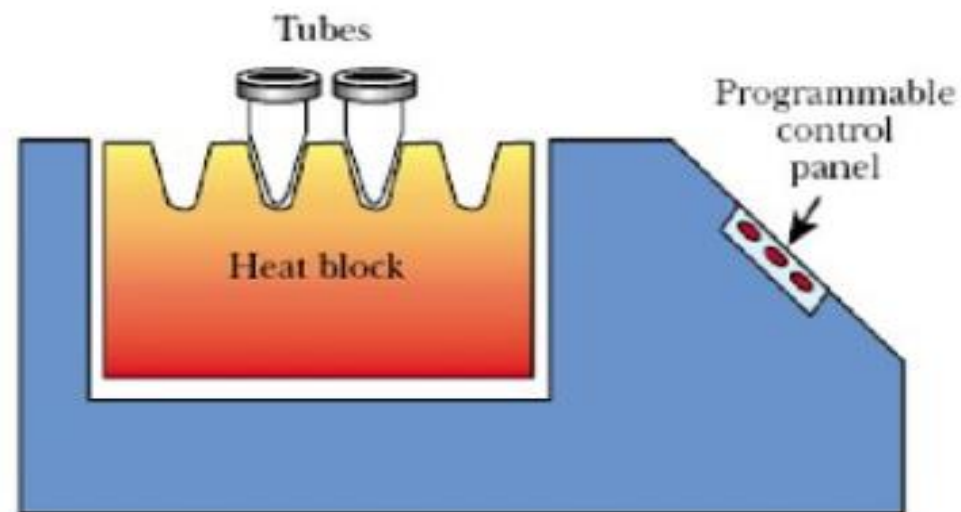
ДНК-амплификаторы, ПЦР-амплификаторы, термоциклеры (thermoscycler) – это устройства для быстрого изменения температуры реакционной смеси по определенной программе.

Амплификаторы разделяются на:

- детектирующие амплификаторы (возможна регистрация синтеза копий фрагмента ДНК в ходе самой реакции);
- обычные амплификаторы (нет возможности регистрации хода процесса во время реакции).

Амплификаторы имеют:

- блоки с обычными крышками;
- блоки с крышками, температура которых меняется согласованно с температурой самого блока.



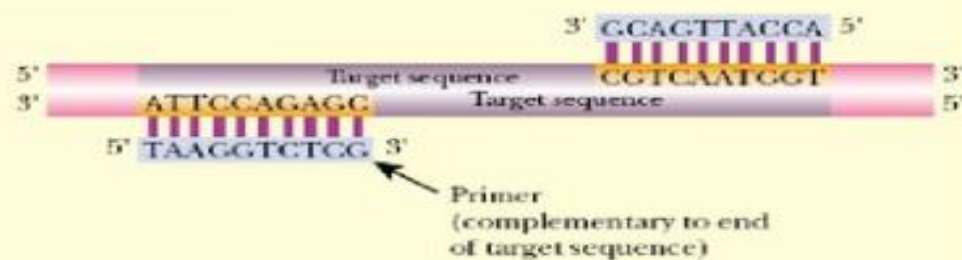
Полимеразная цепная реакция

Компоненты реакционной смеси

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, dNTP)
4. Праймер 1 f (forward)
5. Праймер 2 r (reverse)
6. Образец ДНК
7. ДНК-полимераза



Template DNA



RUN PCR REACTION



Multiple copies of target sequence

Полимеразная цепная реакция

Приготовление реакционной смеси

Компонент* / объем смеси	25 мкл	50 мкл	Конечная концентрация
Стерильная вода	до 25 мкл	до 50 мкл	-
10X Encyclo буфер	2.5 мкл	5 мкл	1X
50X смесь dNTP	0.5 мкл	1 мкл	1X (0.2 mM каждой)
PCR праймер 1**	переменное	переменное	0.2 - 0.5 мкМ
PCR праймер 2**	переменное	переменное	0.2 - 0.5 мкМ
ДНК-матрица**	переменное	переменное	1 пг - 200 нг/50 мкл
50X Encyclo полимераза	0.5 мкл	1 мкл	1X
Суммарный объем	25 мкл	50 мкл	-

Полимеразная цепная реакция

Циклический температурный режим (программа амплификации)

1 цикл – денатурация
(первоначальный прогрев
реакционной смеси)

91-95⁰C 1-5 мин 1 раз

2 цикл –

25-30 раз

1) денатурация

91-95⁰C 15-60 сек

2) отжиг

(связывание праймеров)

(annealing)

T_a

15-60 сек

3) элонгация (удлинение цепей) 72⁰C

30 сек на

500 нуклеотидов

t

3 цикл – окончательное достраивание
цепей

72⁰C

5 мин

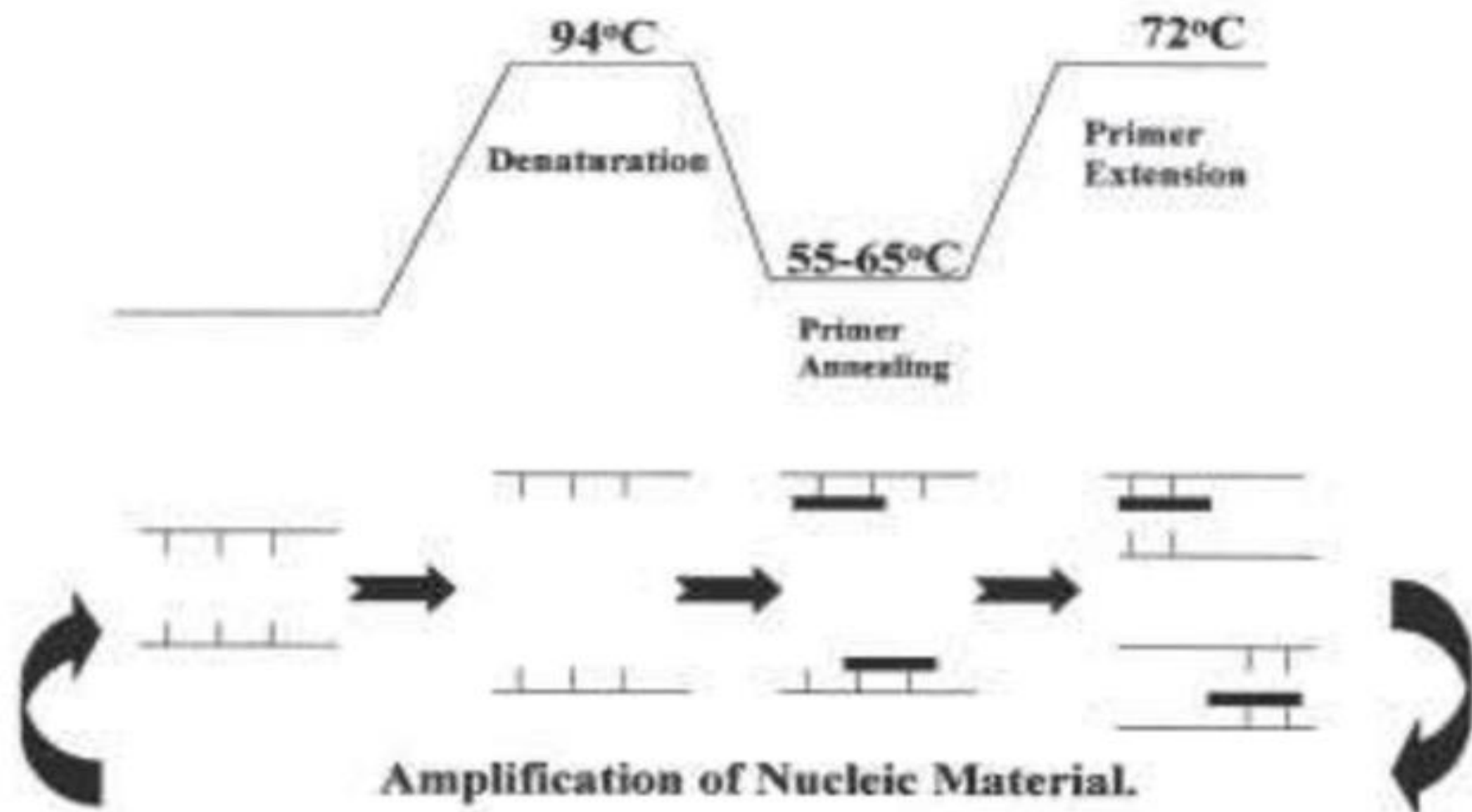
1 раз

4 цикл – охлаждение

4-10⁰C до выключения
прибора

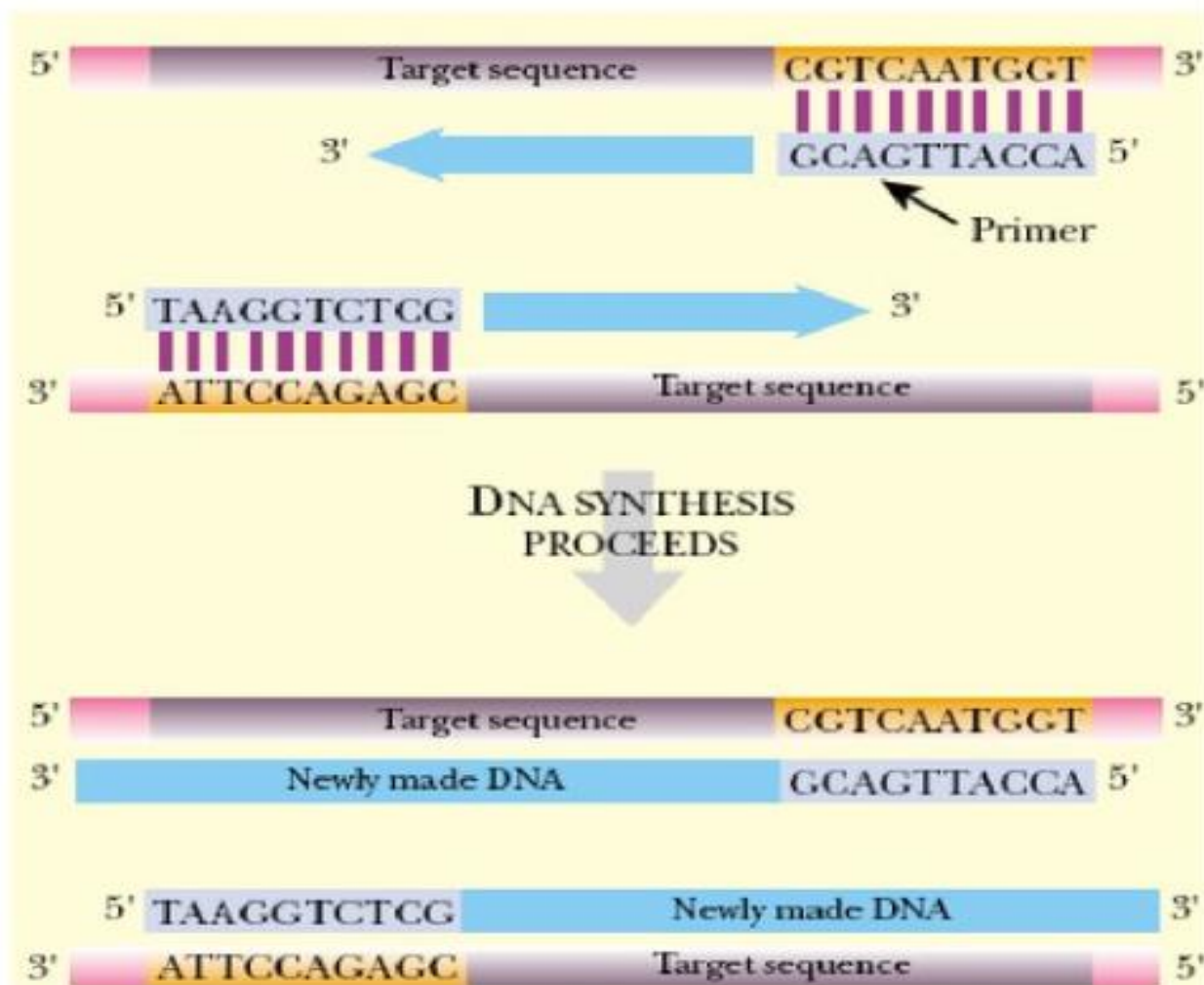
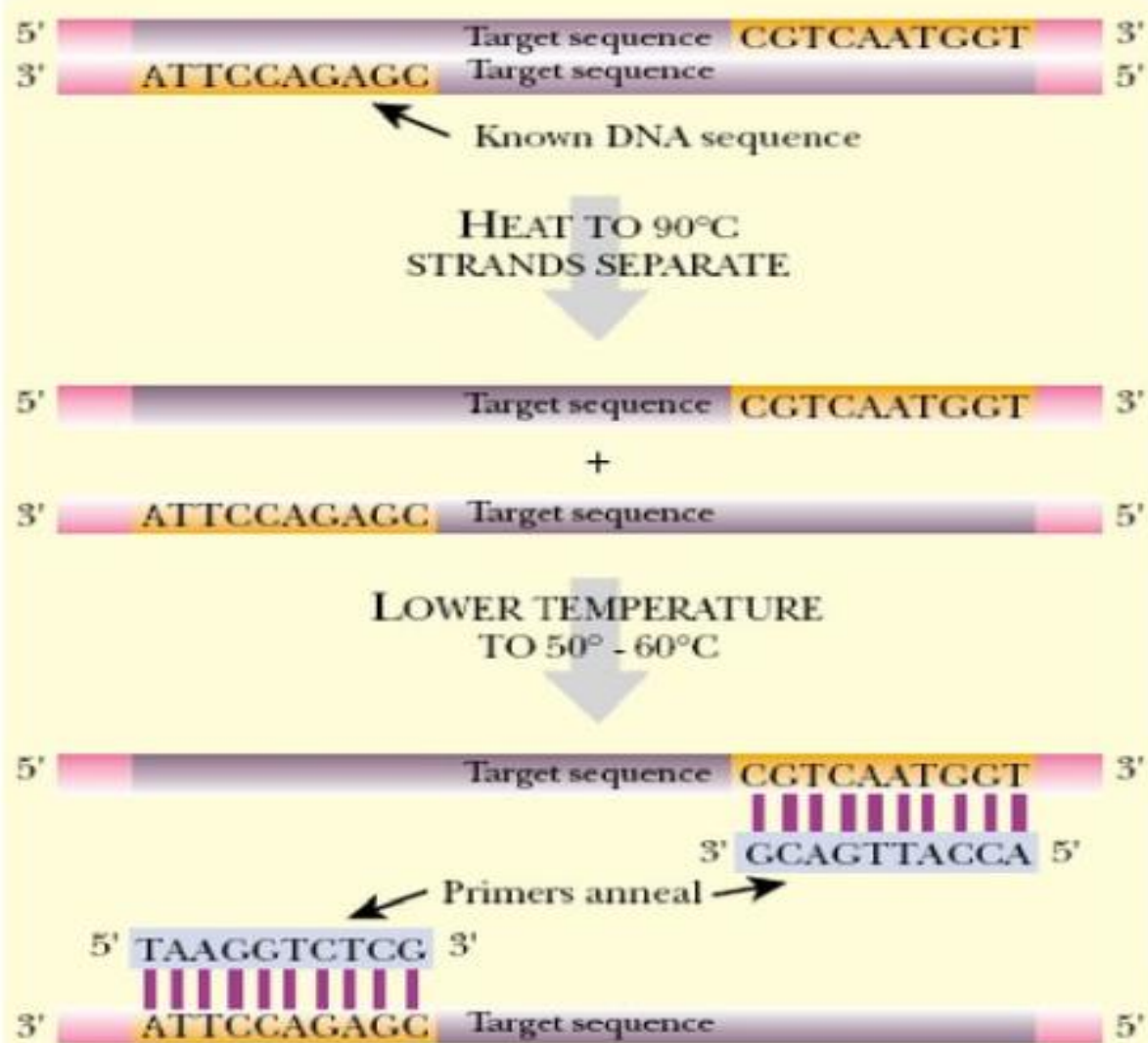
Полимеразная цепная реакция

Программа амплификации



Полимеразная цепная реакция

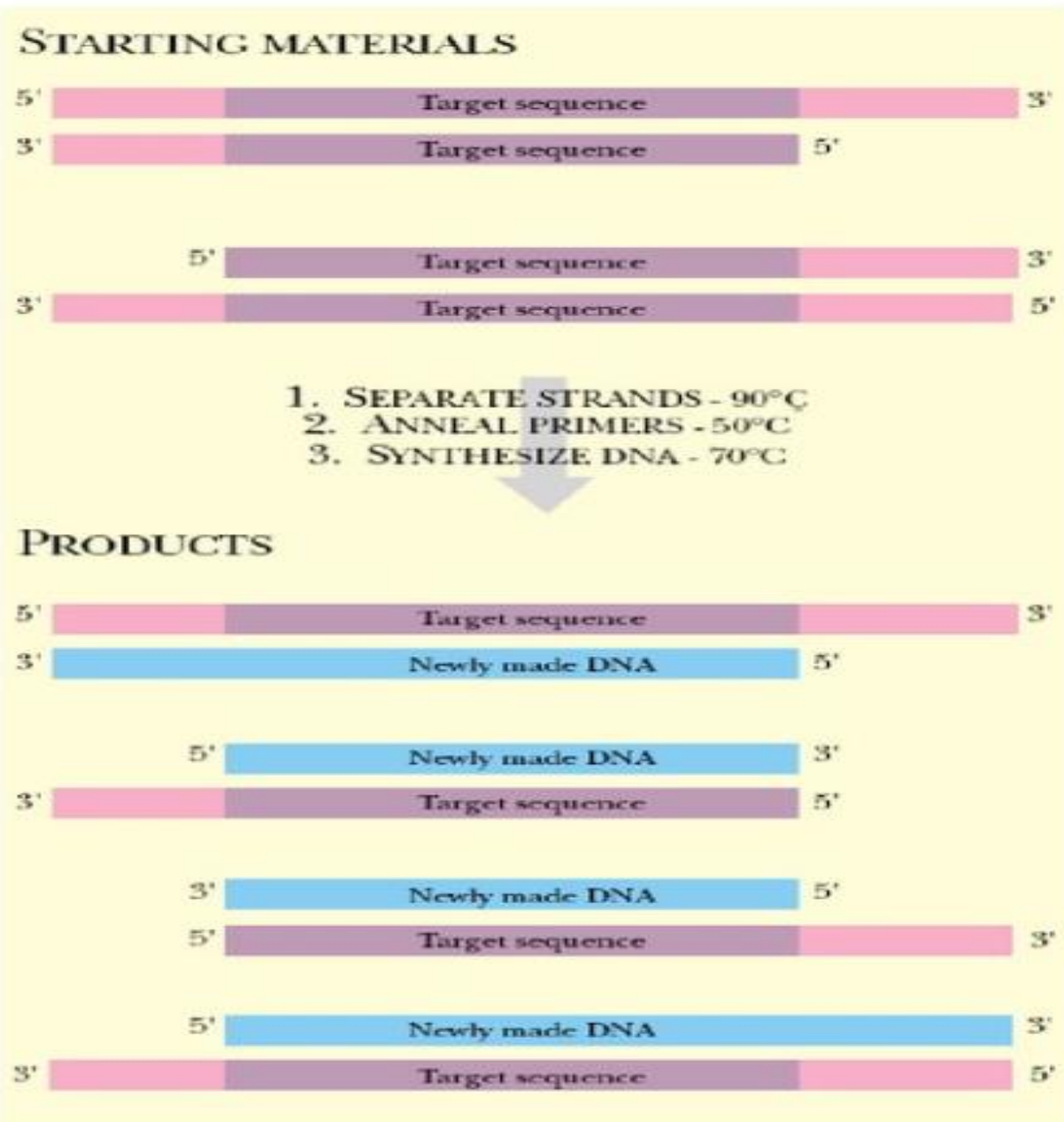
Механизм полимеразной цепной реакции 1 цикл



Полимеразная цепная реакция

Механизм
цепной реакции полимеразной

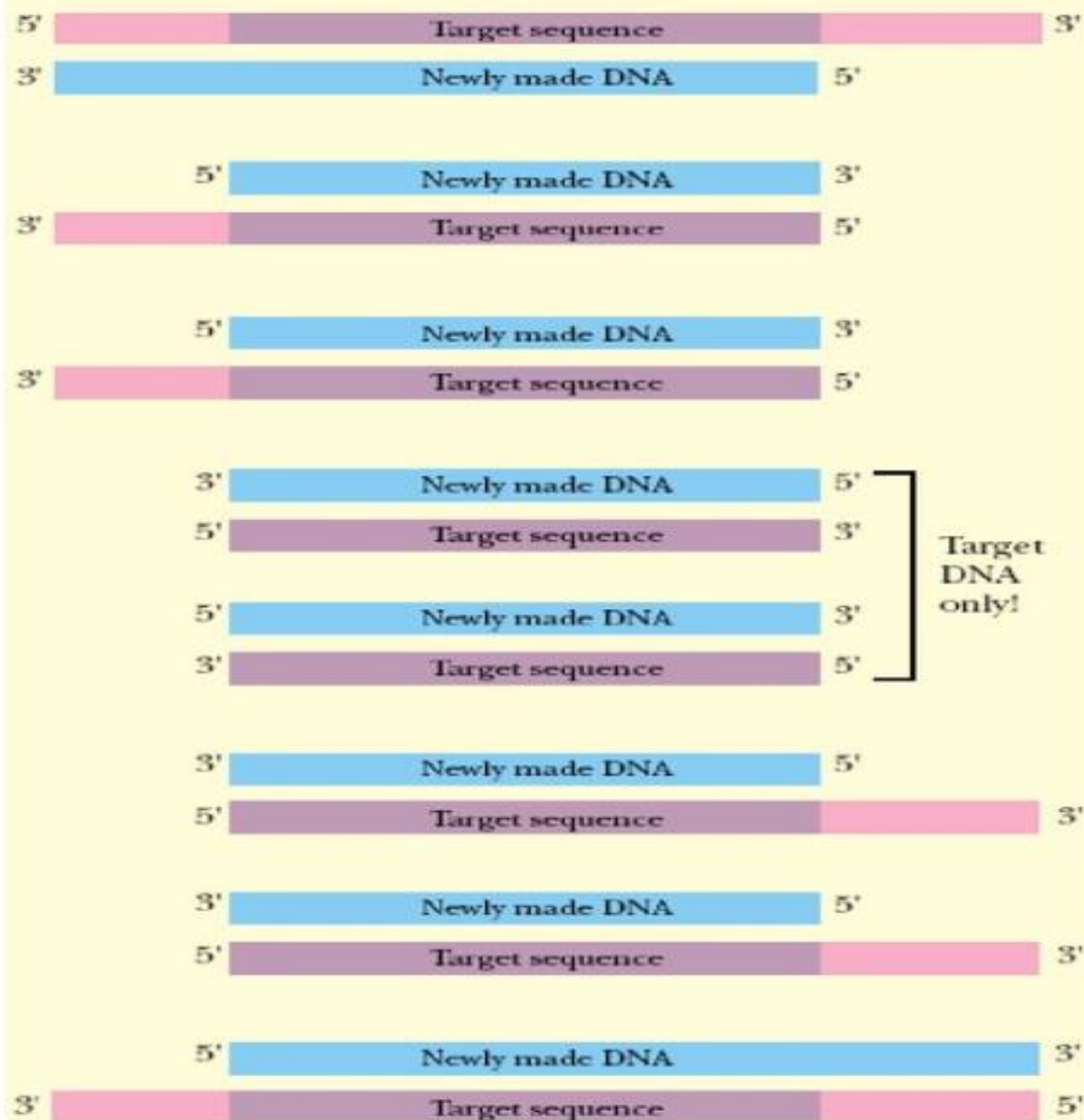
2 цикл



Полимеразная цепная реакция

Механизм полимеразной цепной реакции 3 цикл

CYCLE NUMBER	NUMBER OF DOUBLE-STRANDED TARGET MOLECULES
1	()
2	()
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16,384
17	32,768
18	65,536
19	131,072
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,544,432
28	67,108,864
29	134,217,728
30	268,435,456
31	536,870,912
32	1,073,741,824



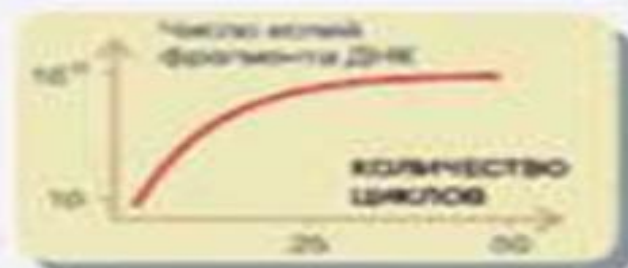
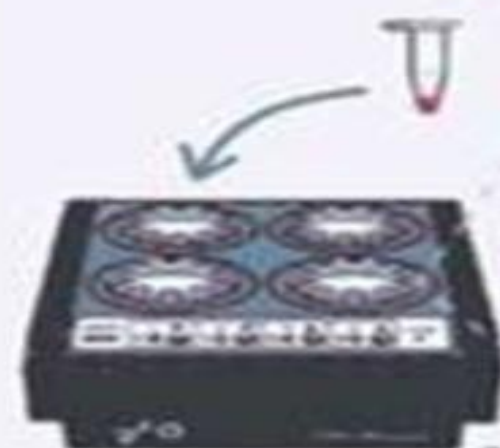
Полимеразная цепная реакция

Стадии постановки ПЦР

1. Выделение ДНК



2. Амплификация



3. Детекция
в agarозном геле

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
КОНТРОЛЬ

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
КОНТРОЛЬ

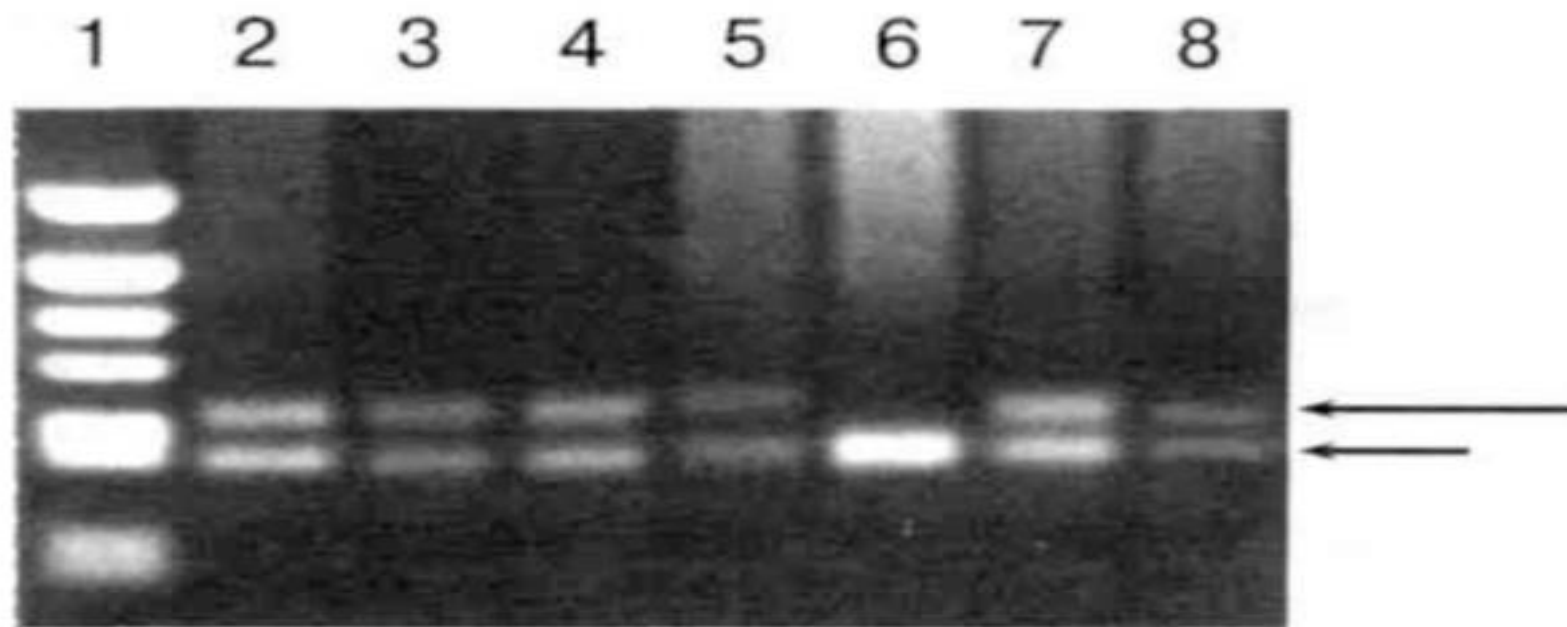
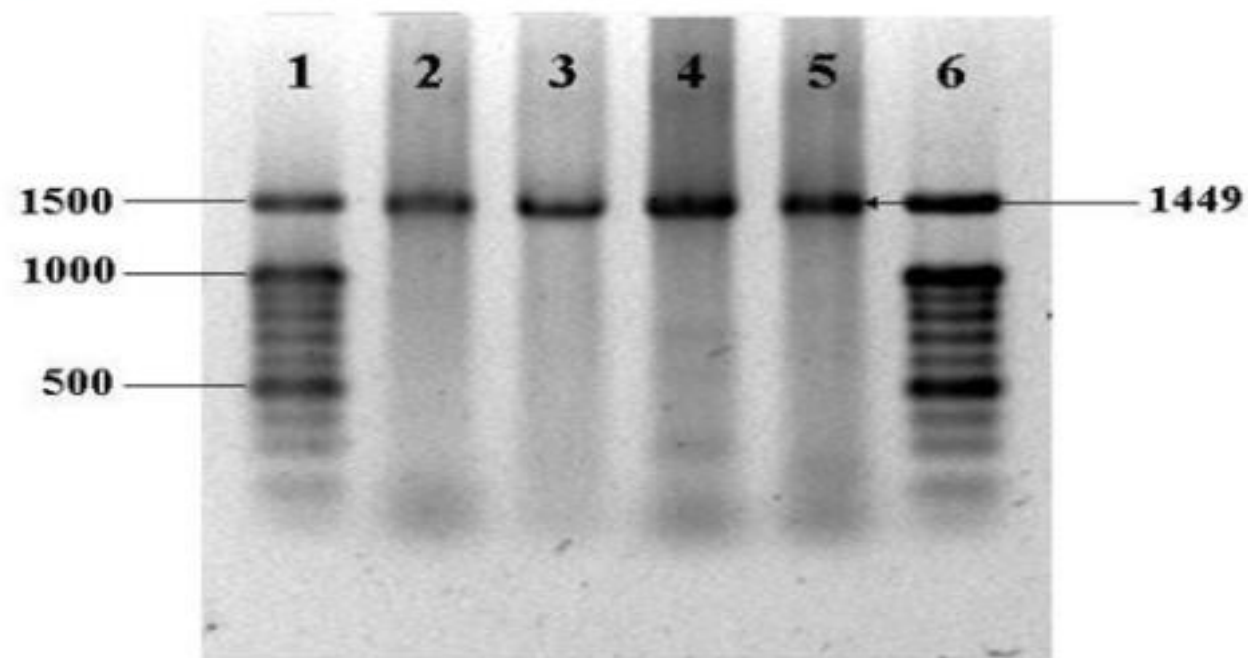


ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ
ОБРАЗЦЫ

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ
ОБРАЗЦЫ

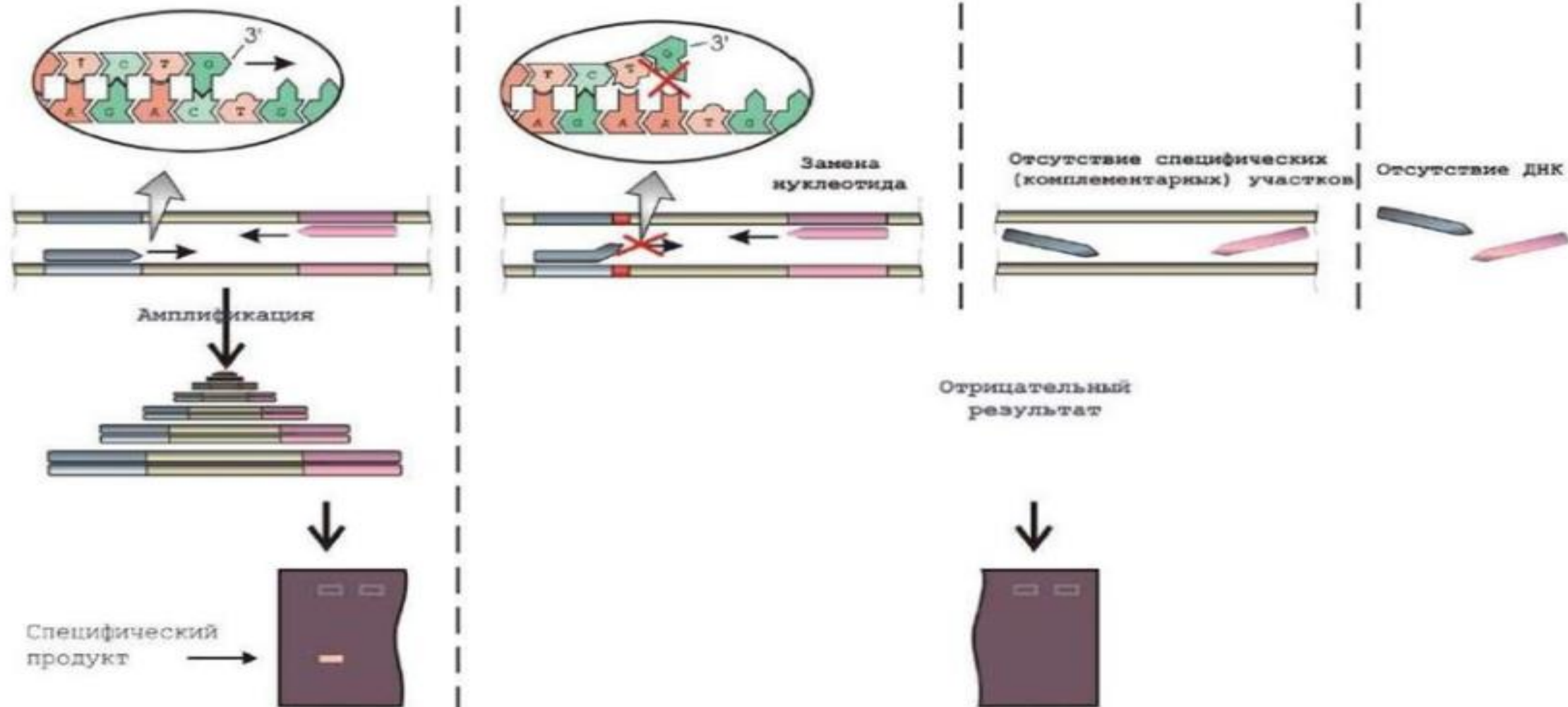
Полимеразная цепная реакция

Регистрация результатов ПЦР
методом электрофореза в
агарозном геле



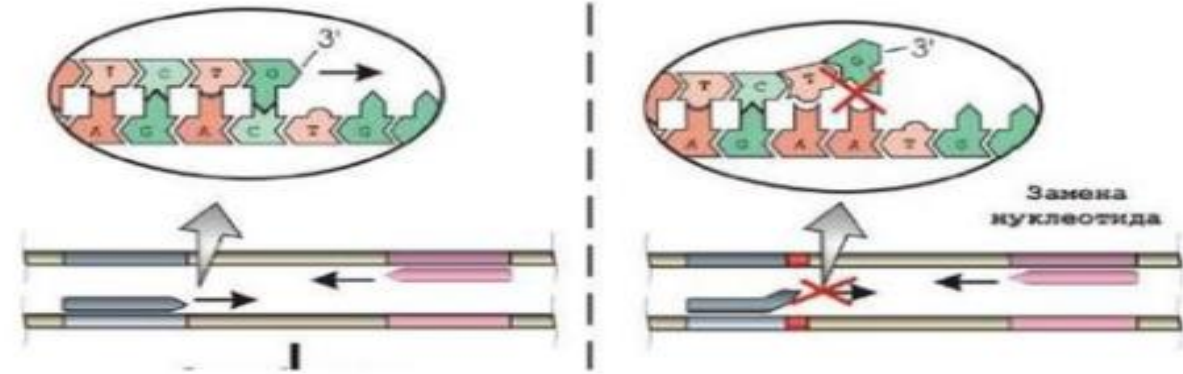
Полимеразная цепная реакция

Специфичность (правильность) ПЦР



Полимеразная цепная реакция

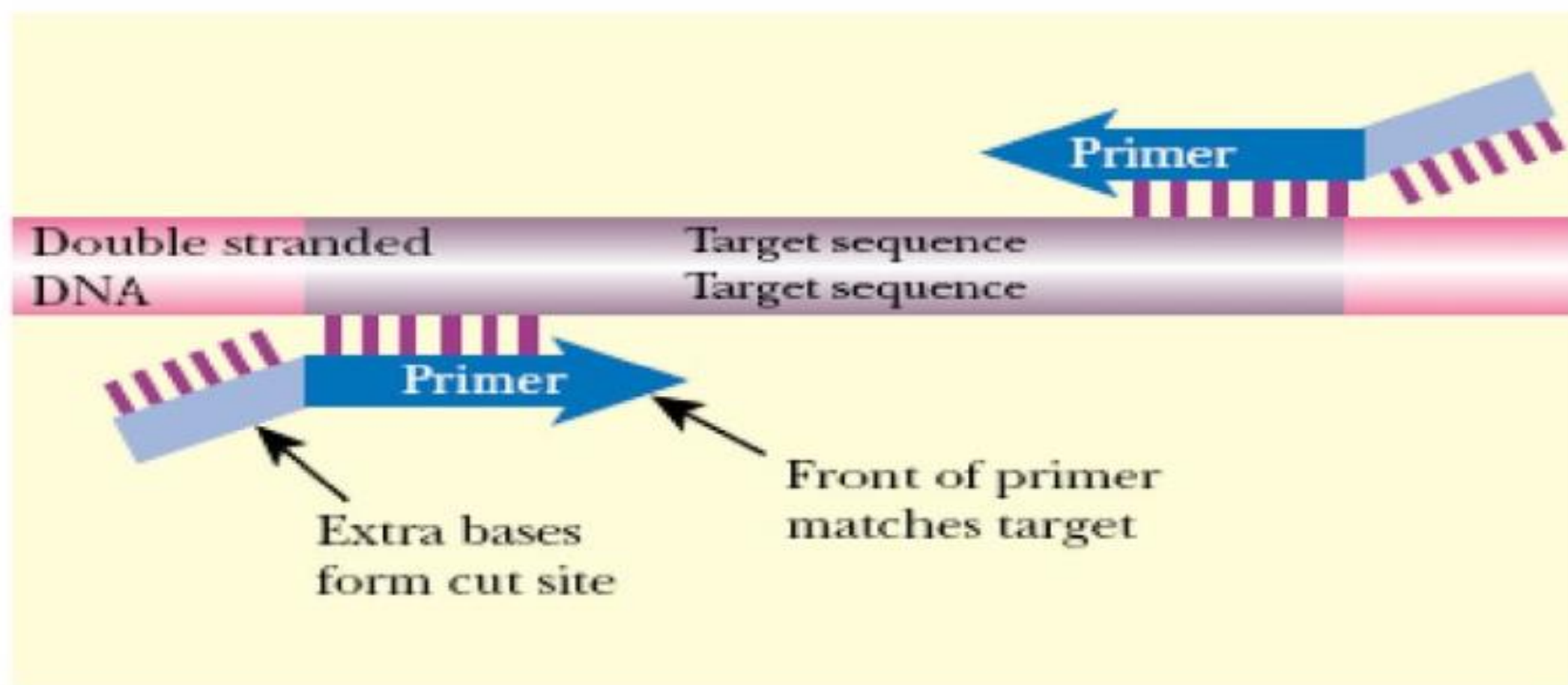
Требования к подбору праймеров



1. Длина праймера – 17-28 нуклеотидов.
2. Состав нуклеотидов в праймере должен быть таков, что $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ должна лежать в диапазоне 55-75 °C.
3. На 3'-конце праймера должны быть нуклеотиды G, C, GC или CG.
4. T_m праймеров, работающих в паре, должна быть сходной.
5. На 3'-конце праймера не должно быть последовательностей из CCC или GGG.
6. Четыре и более нуклеотидов на 3'-конце праймера не должны быть комплементарны самому праймеру либо праймеру в паре.
7. С 5'-конца праймера может быть добавлена любая не комплементарная матрице последовательность нуклеотидов любой длины.

Полимеразная цепная реакция

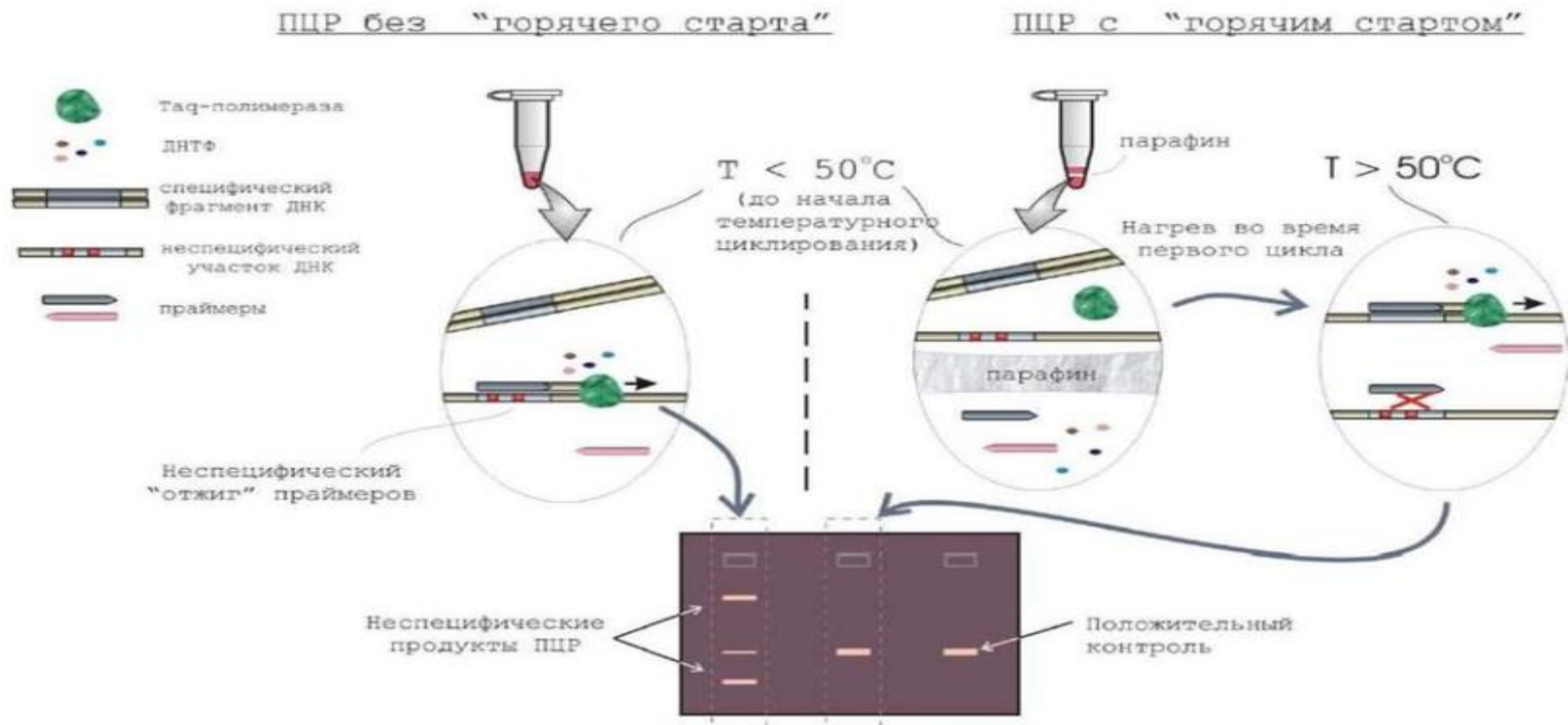
Добавление последовательностей нуклеотидов к копируемому фрагменту ДНК



Полимеразная цепная реакция

Специфичность ПЦР

«Горячий старт»



Полимеразная цепная реакция

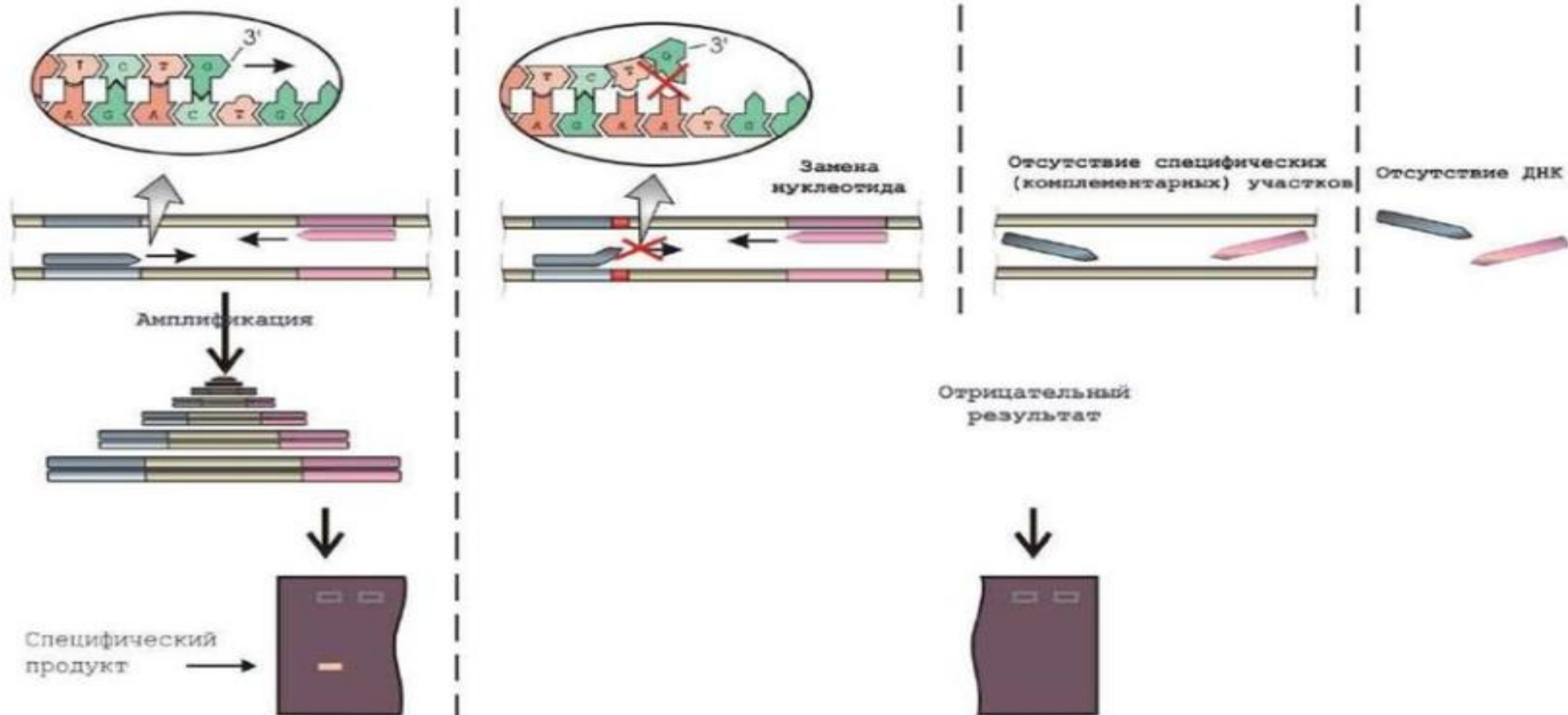
Специфичность ПЦР

«Горячий старт»

1. Разделение компонентов реакционной смеси барьером (прослойкой парафина).
2. Внесение в реакционную смесь одного из компонентов реакции (ДНК-полимеразы) во время первого цикла после прогрева пробирки до температуры денатурации.
3. Ингибирование полимеразы антителами.
4. Использование химически модифицированной ДНК-полимеразы.

Полимеразная цепная реакция

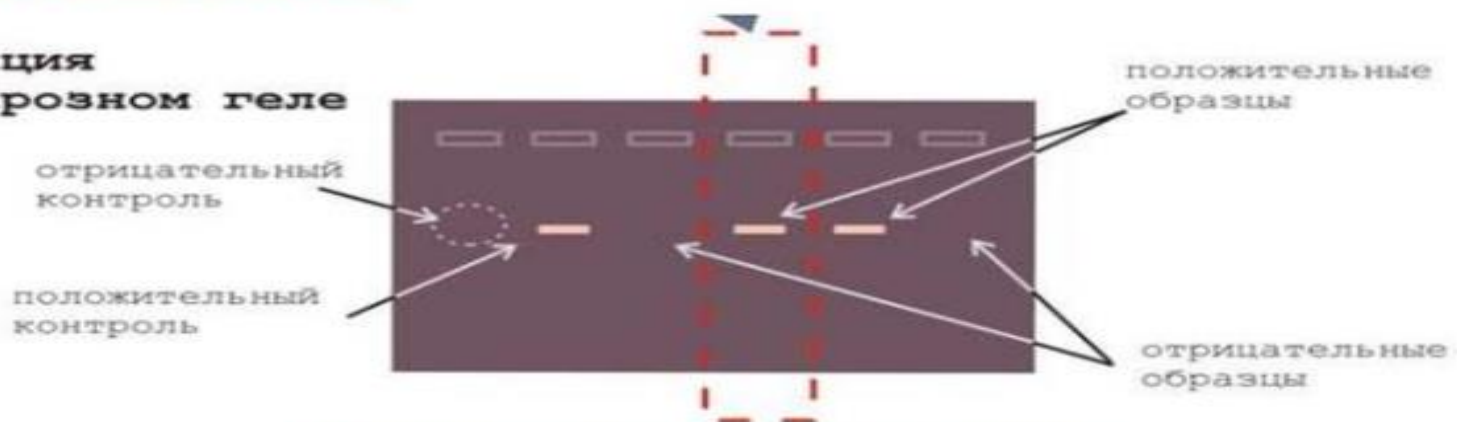
Контроль за прохождением реакции ПЦР



Полимеразная цепная реакция

Контроль за прохождением реакции ПЦР

3. Детекция в агарозном геле



Отрицательный контроль

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, dNTP)
4. Праймер 1 f (forward)
5. Праймер 2 r (reverse)
6. **Деионизованная вода**
7. ДНК-полимераза

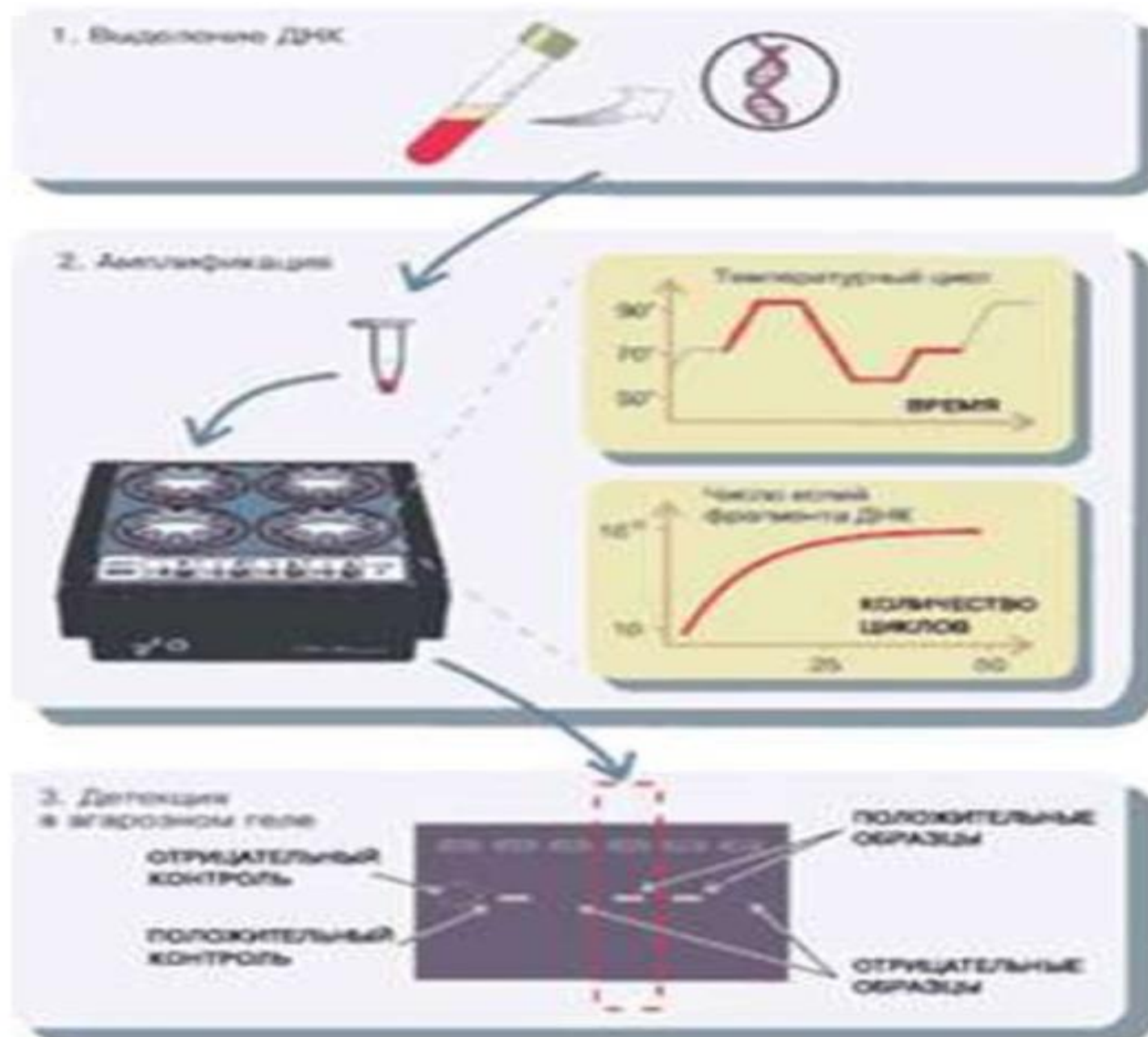
Положительный контроль

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, dNTP)
4. Праймер 1 f (forward)
5. Праймер 2 r (reverse)
6. **Образец ДНК, копируемый фрагмент**
7. ДНК-полимераза

содержащий

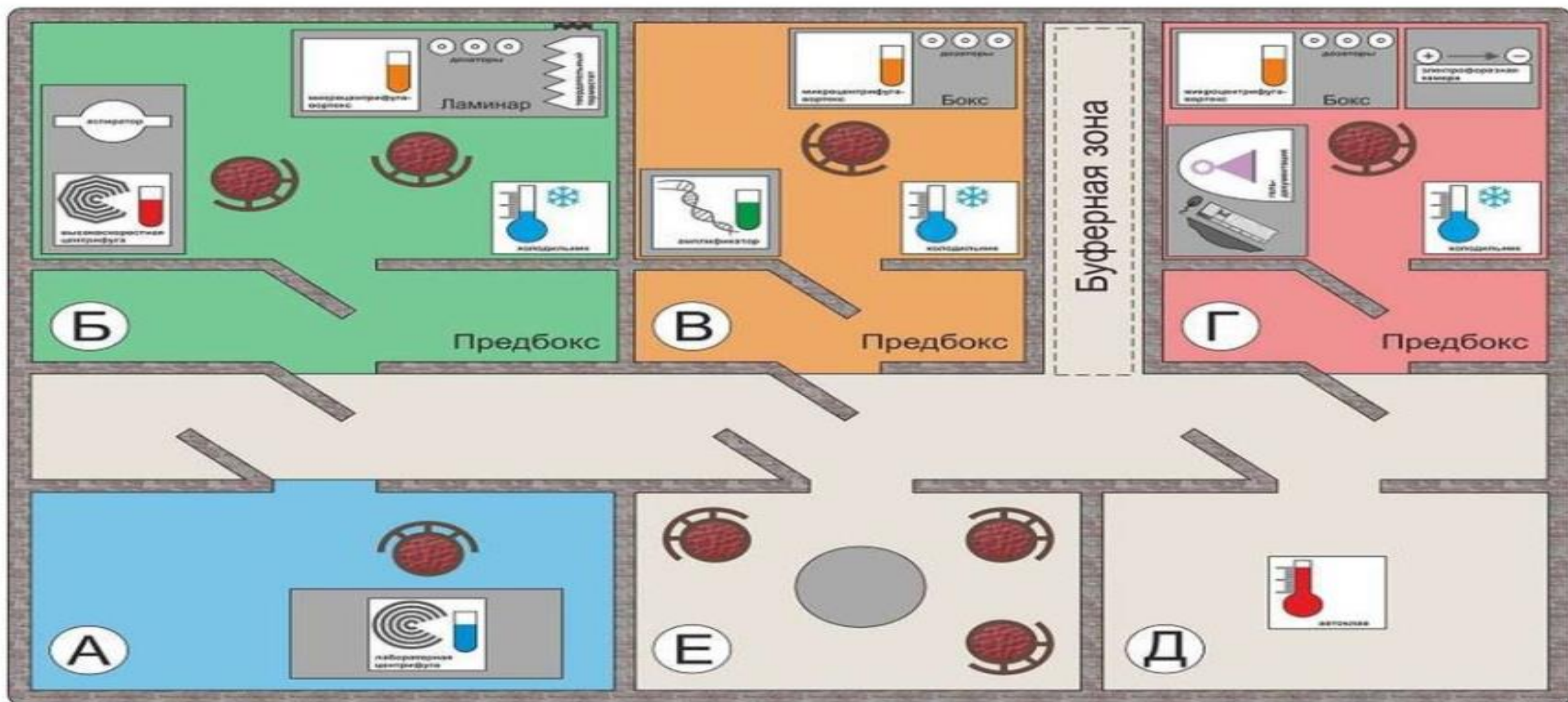
Полимеразная цепная реакция

Стадии постановки ПЦР



Полимеразная цепная реакция

Принцип организации ПЦР-лабораторий



Полимеразная цепная реакция

Ферменты, используемые в ПЦР

Тaq-ДНК-полимераза	<i>Thermus aquaticus</i>	не точный
Tth-ДНК-полимераза	<i>Thermus thermophilus</i>	не точный
Pwo-ДНК-полимераза	<i>Pyrococcus woesei</i>	точный
Pfu-ДНК-полимераза	<i>Pyrococcus furiosus</i>	точный
AMV-обратная транскриптаза	<i>Avian myeloblastosis virus</i>	
MMLV-обратная транскриптаза	<i>Moloney murine leukemia virus</i>	точный

Полимеразная цепная реакция

Ферменты, используемые в ПЦР

Тaq-полимераза была выделена из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*. Фермент представляет собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой около 95 к Да. Это высокопроцессивный фермент (как правило, эффективно амплифицирующий фрагменты длиной до 3-5 т. п. н.) с хорошо выраженной 5'-3' экзонуклеазной активностью и без 3'-5' (корректирующей) экзонуклеазной активности. Получаемые при использовании Таq-полимеразы фрагменты ДНК, как правило, содержат выступающий 3'-концевой нуклеотид (чаще всего — аденозин), нематрично присоединяемый ферментом. Это свойство Таq-полимеразы используют для эффективного клонирования продуктов ПЦР в специально подготовленные линеаризованные вектора с 3'-выступающим тимидином.

Полимеразная цепная реакция

Ферменты, используемые в ПЦР

Tth -полимераза была выделена из термофильной зубактерии *Thermus thermophilus*. Это также высокопроцессивный фермент (дает фрагменты длиной до 3 т. п. н.) массой около 94 кДа с хорошо выраженной 5'-3' экзонуклеазной активностью и без 3'-5' экзонуклеазной активности. Особенностью этой полимеразы является наличие ревертазной активности (способности использовать в качестве матрицы молекулы РНК). Данный фермент пытаются использовать для проведения обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке.

Полимеразная цепная реакция

Ферменты, используемые в ПЦР

Pwo -полимераза была выделена из гипертермофильной археобактерии *Puycococcus woesei*. Масса фермента около 90 кДа. Это процессивный фермент (дает фрагменты до 3 т. п. н.) без 5' -3' экзонуклеазной активности и с хорошо выраженной 3'-5' экзонуклеазной активностью.

Pfu -полимераза получена из *Puycococcus furiosus*. Масса фермента около 92 кДа. *Pwo* -полимераза отличается сравнительно низкой процессивностью (эффективно амплифицирует фрагменты до 1 т. п. н.) и обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью (proofreading activity). Наличие 3'-5' экзонуклеазной активности делает фермент пригодным для ПЦР, где необходимо получение продукта с высокой точностью синтеза (для последующего клонирования и определения последовательности нуклеотидов).

Полимеразная цепная реакция

Методы ПЦР

Long-PCR

протяженная ПЦР

Hot-start PCR

ПЦР с горячим стартом

Multiplex-PCR

множественная ПЦР

«Nested»-PCR

гнездная ПЦР

RAPD-PCR

Случайная амплификация полиморфной ДНК

RT-PCR

ПЦР, совмещенная с реакцией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР)

Real time PCR

ПЦР в режиме реального времени

Полимеразная цепная реакция

Hot-start PCR (ПЦР с горячим стартом)

ПЦР с «горячим» стартом (hot-start PCR) – модификация, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Для этого полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody до наступления первой денатурации (проводится при 95 °С в течение 10 минут).

Кроме того, для предотвращения преждевременного взаимодействия фермента с компонентами реакционной смеси и, как следствие, образования неспецифических продуктов реакции до момента полного прогрева, используется легкоплавкий парафин или специальные масла, отделяющие полимеразу от реакционной смеси.

В зависимости от ГЦ-состава и размера, праймеры имеют определенную температуру плавления T_m , при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, то есть температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

Даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, в отсутствие фермента элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

Полимеразная цепная реакция

End-point PCR (ПЦР с анализом результатов по конечной точке)

ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации, не открывая пробирки. Таким образом, решается одна из основных проблем ПЦР – проблема контаминации ампликонами.

Одним из таких вариантов является метод «FLASH» (FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами).

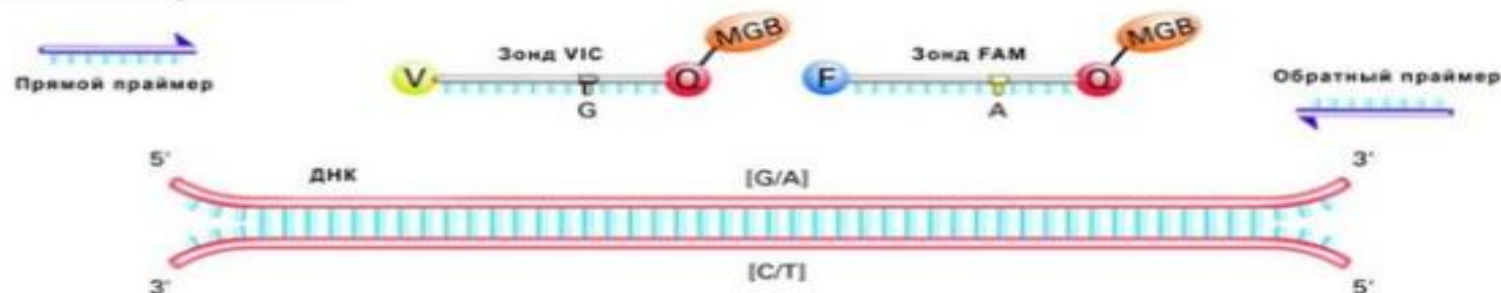
Ключевым элементом метода «FLASH» является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Зонды добавляются в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует.

Во время реакции зонды гибридизуются с ДНК-мишенью, на стадии элонгации Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказываются пропорциональными количеству образовавшихся ампликонов. Следует отметить, что регистрация флуоресценции происходит с помощью детектора флуоресценции после окончания реакции, поэтому метод не является количественным.

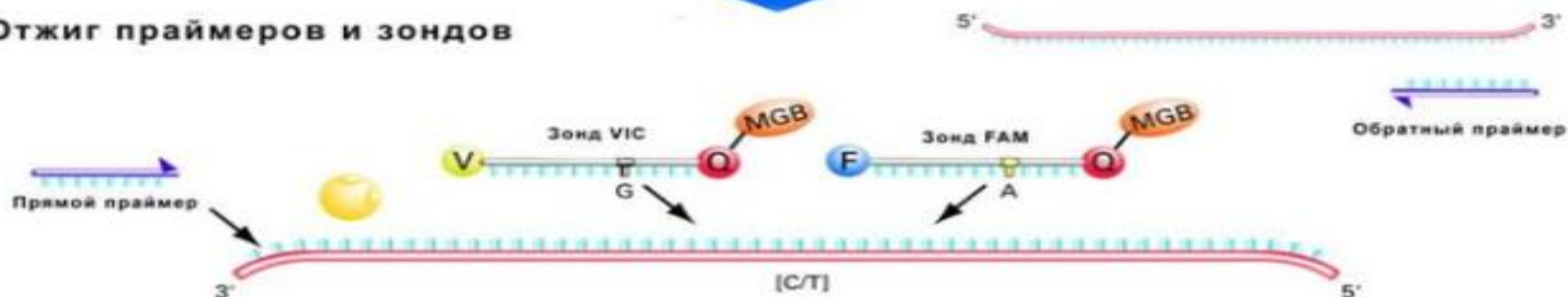
Полимеразная цепная реакция

FLASH – Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization

1. Компоненты реакции



2. Отжиг праймеров и зондов



3. Элонгация и разрушение зонда

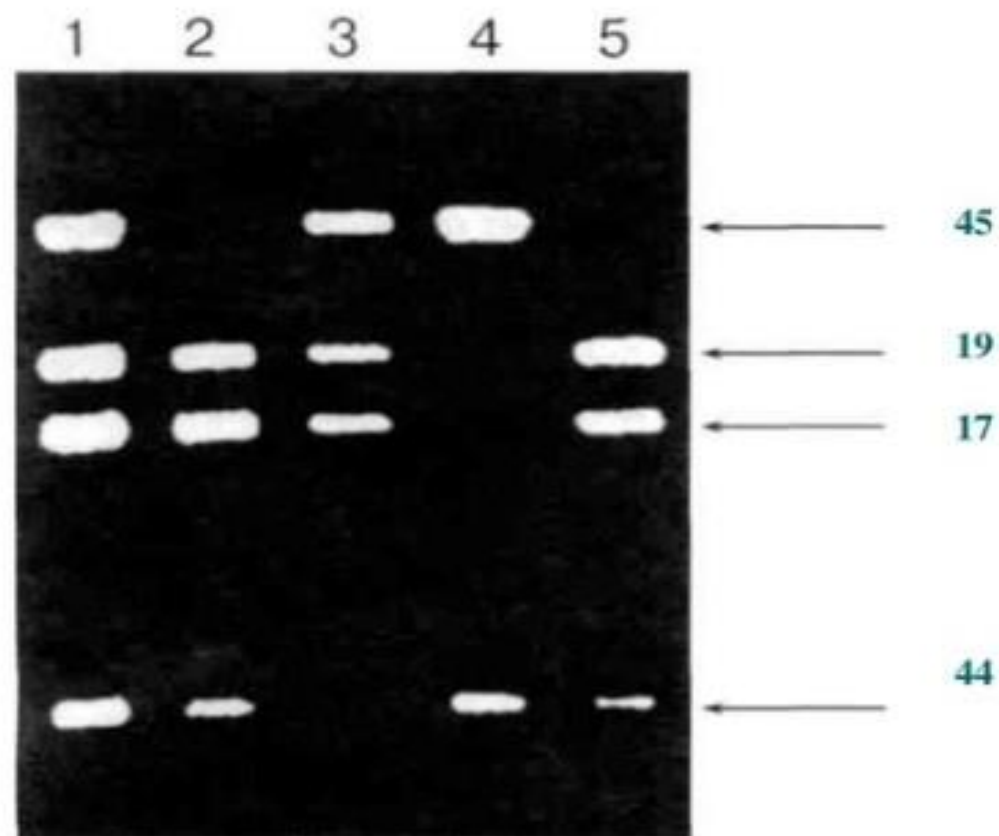


Обозначения

- V Краситель VIC
- F Краситель FAM
- Q Гаситель
- MGB MGB
- Taq-полимераза
- Зонд
- Праймер
- Образец ДНК
- Удлиненный праймер

Полимеразная цепная реакция

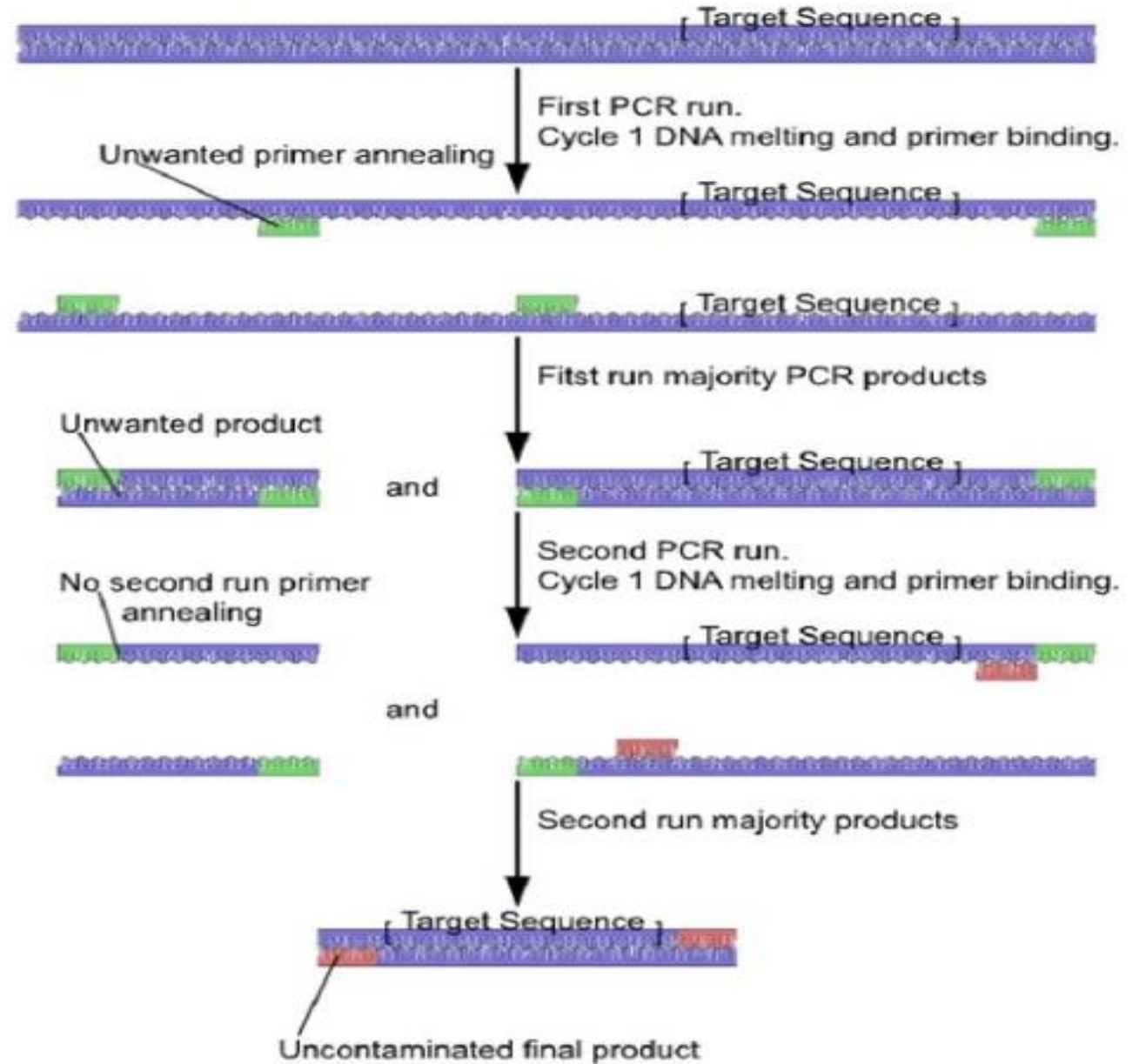
Multiplex-PCR (множественная ПЦР)



Прямая ДНК-диагностика мышечной дистрофии Дюшенна с помощью мультиплексной ПЦР (электрофорез в агарозном геле). У каждого из обследуемых лиц одновременно амплифицированы четыре экзона гена дистрофина (экзоны 17, 19, 44 и 45; стрелки указывают на соответствующие продукты амплификации).

Полимеразная цепная реакция

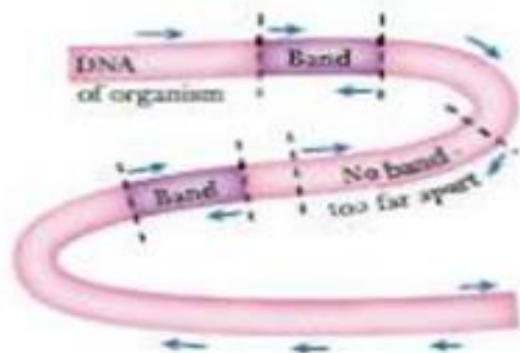
«Nested»-PCR (гнездная ПЦР)



Полимеразная цепная реакция

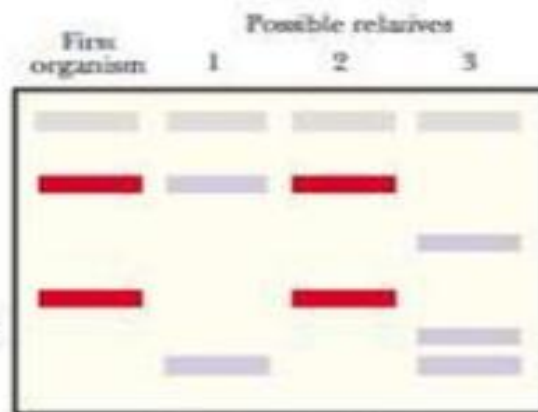
RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - PCR)

PRIMER
SITES
FOR
RAPDs

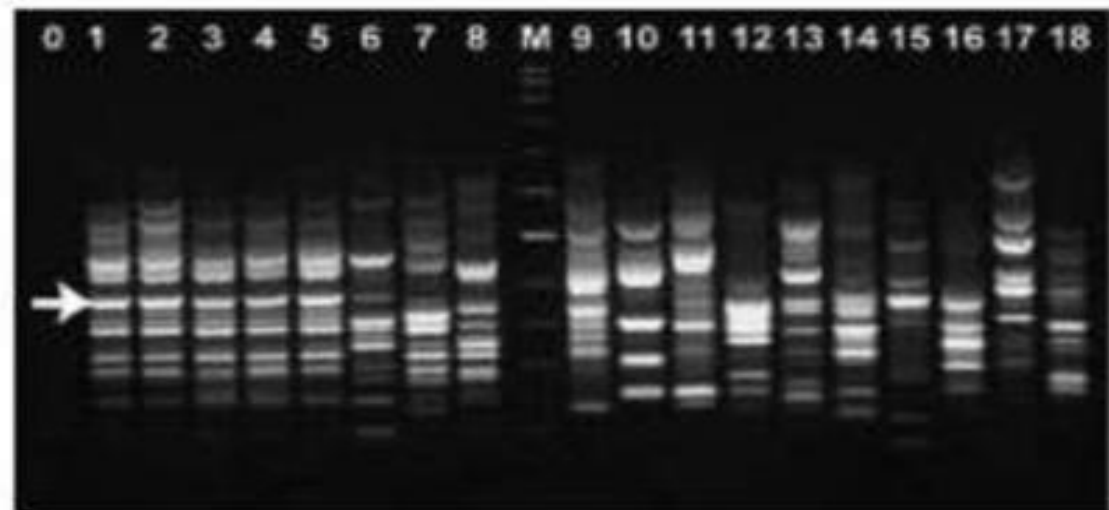


RUN PCR
SEPARATE ON AGAROSE GEL

AGAROSE
GEL
OF RAPDs
FROM
SEVERAL
ORGANISMS



2 is a correct match
1 and 3 not related

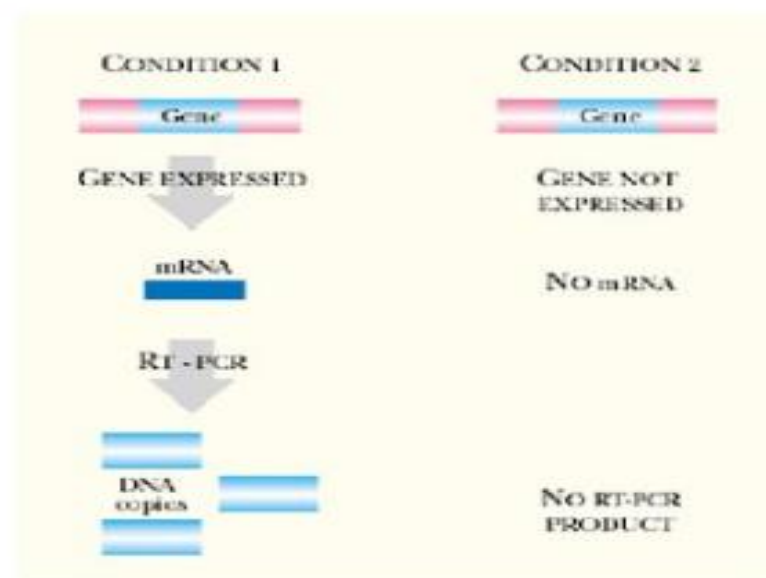
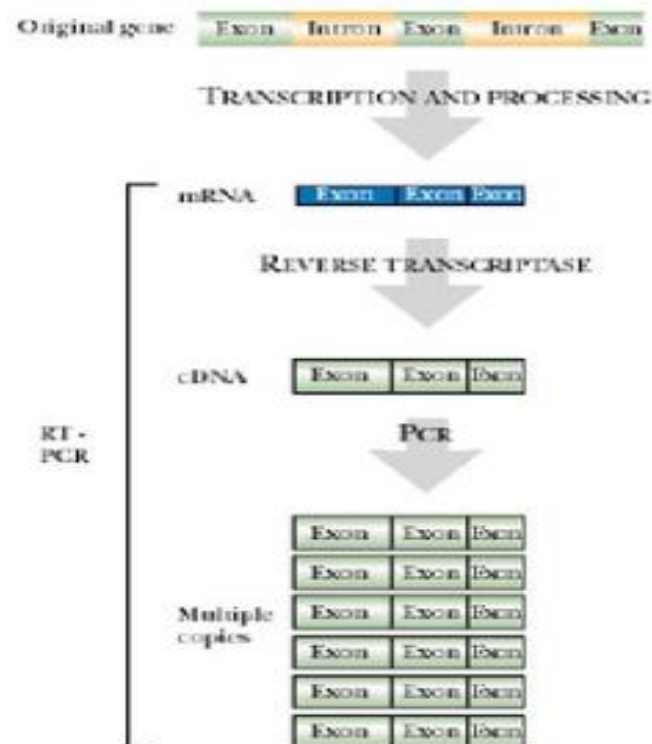


1. Identification of Fungal Pathogens by RAPD

Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

ПЦР, совмещенная с реакцией обратной транскрипции



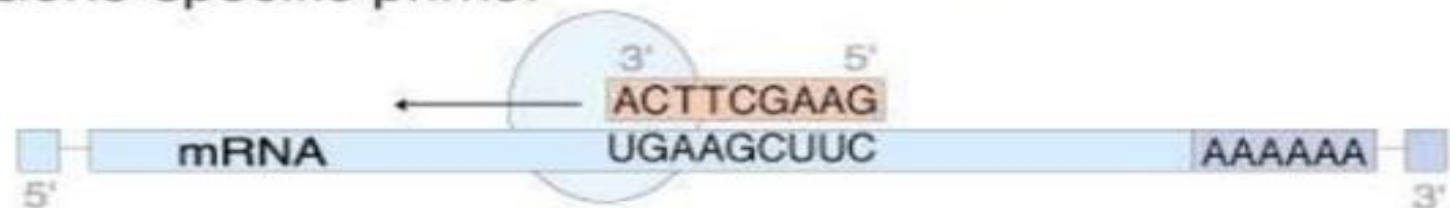
Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

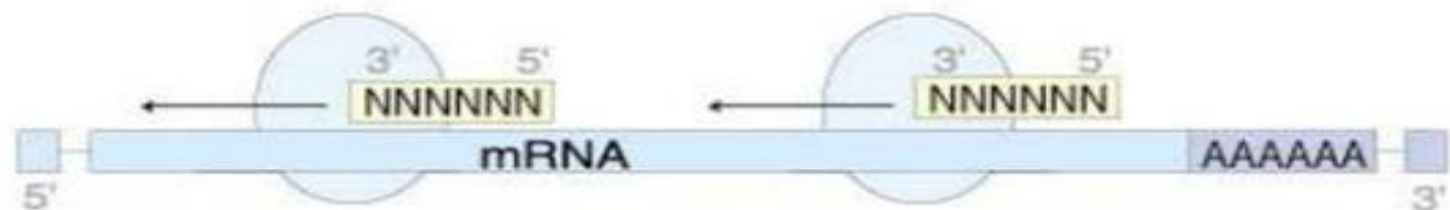
Праймеры для реакции обратной транскрипции

V dGTP, dATP or dCTP
N any base

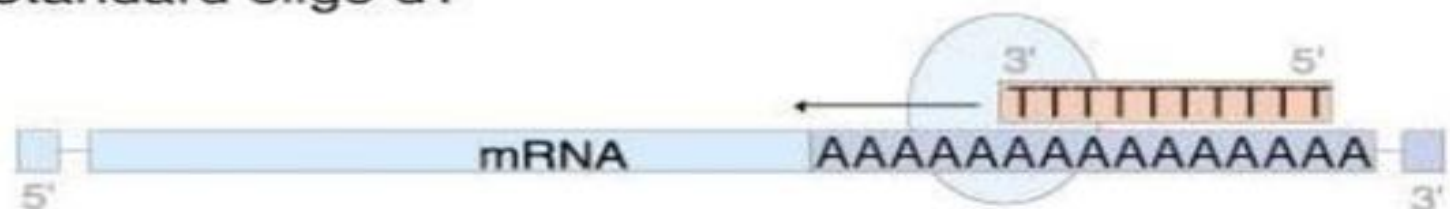
Gene-specific primer



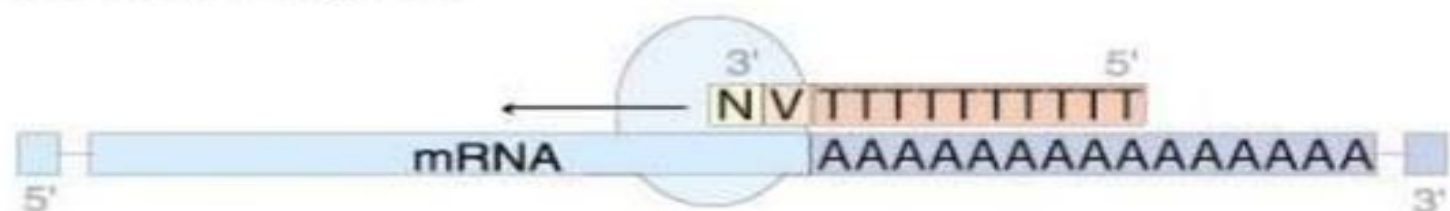
Random primers



Standard oligo dT



Anchored oligo dT



Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

Использование ревертазы связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, данный фермент термолабилен и поэтому может быть использован при температуре не выше 42°C. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5%. Этот недостаток может быть устранен при использовании в качестве обратной транскриптазы *термостабильной полимеразы*, проявляющей активность в присутствии ионов Mg^{2+} . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, в качестве затравки должны присутствовать праймеры и смесь 4-х дНТФ.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода, например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирусы гриппа, ВИЧ и т.д.) представлены именно РНК.

Полимеразная цепная реакция

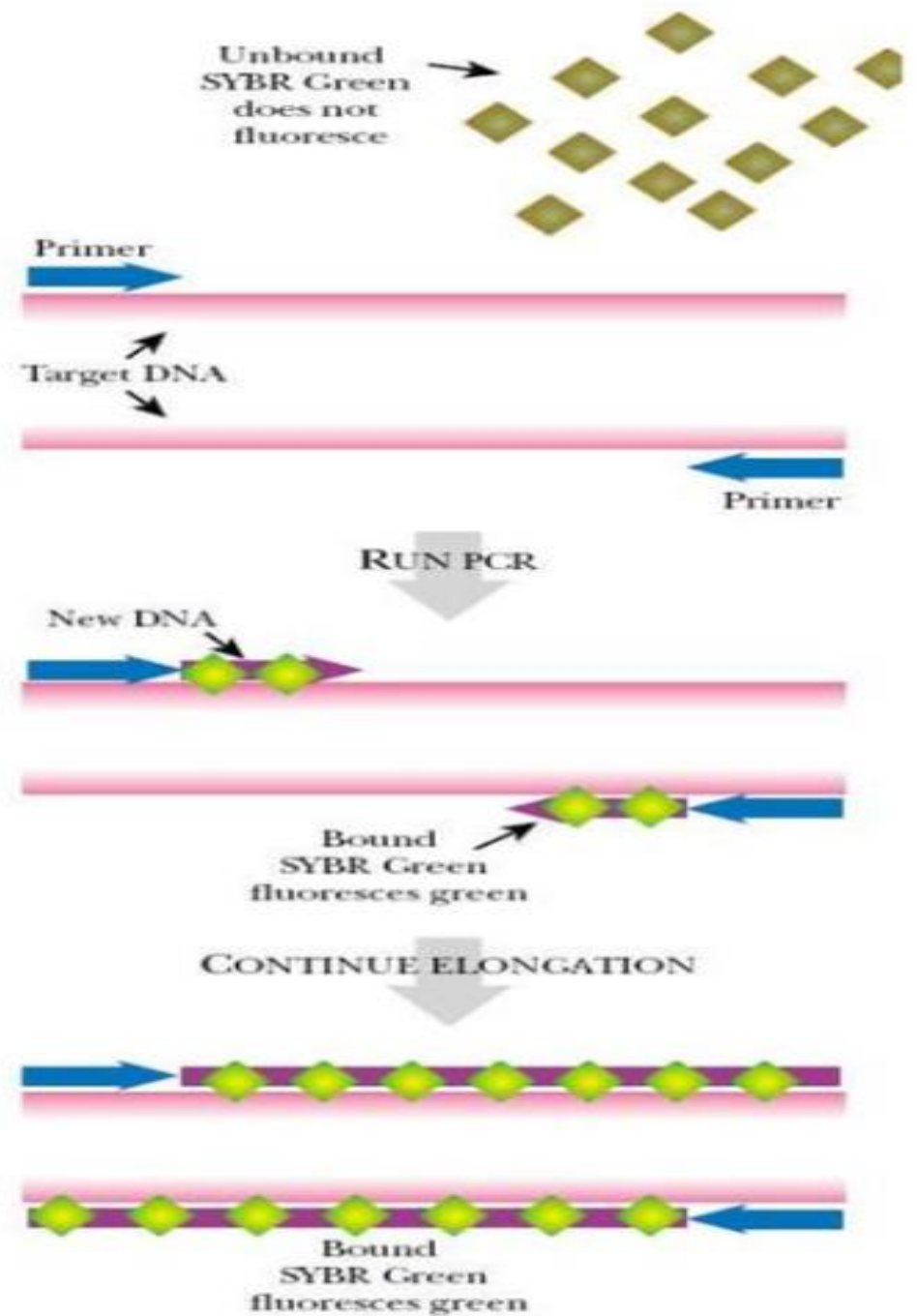
ПЦР в режиме реального времени

неспецифические системы детекции

интеркалирующие красители:

SYBR Green I

SYBR Gold



Полимеразная цепная реакция

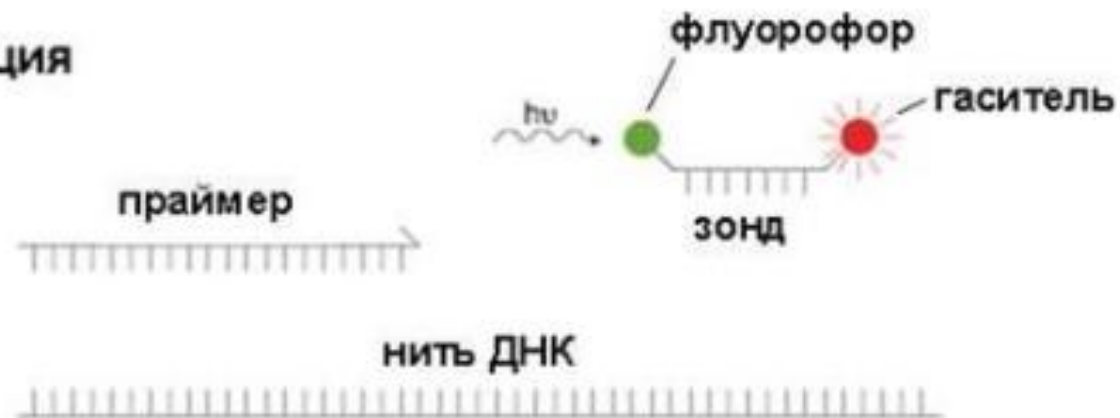
ПЦР в режиме
реального времени

специфические
системы детекции

линейные разрушаемые
зонды (пробы)

TaqMan

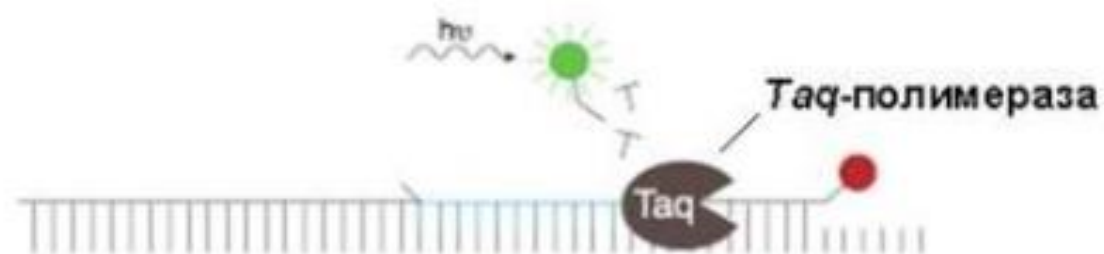
Денатурация



Отжиг



Синтез

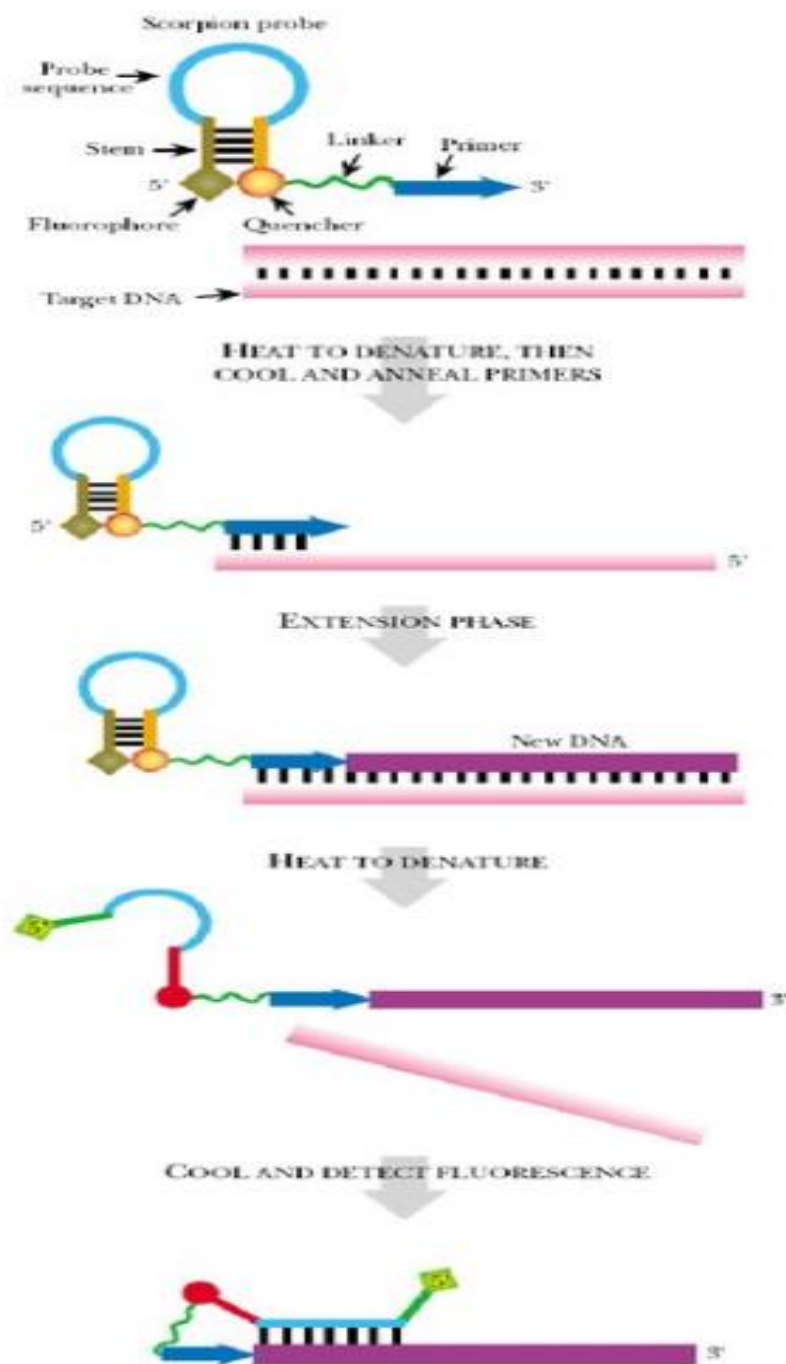


Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени

специфические системы детекции

праймеры- «скорпионы»

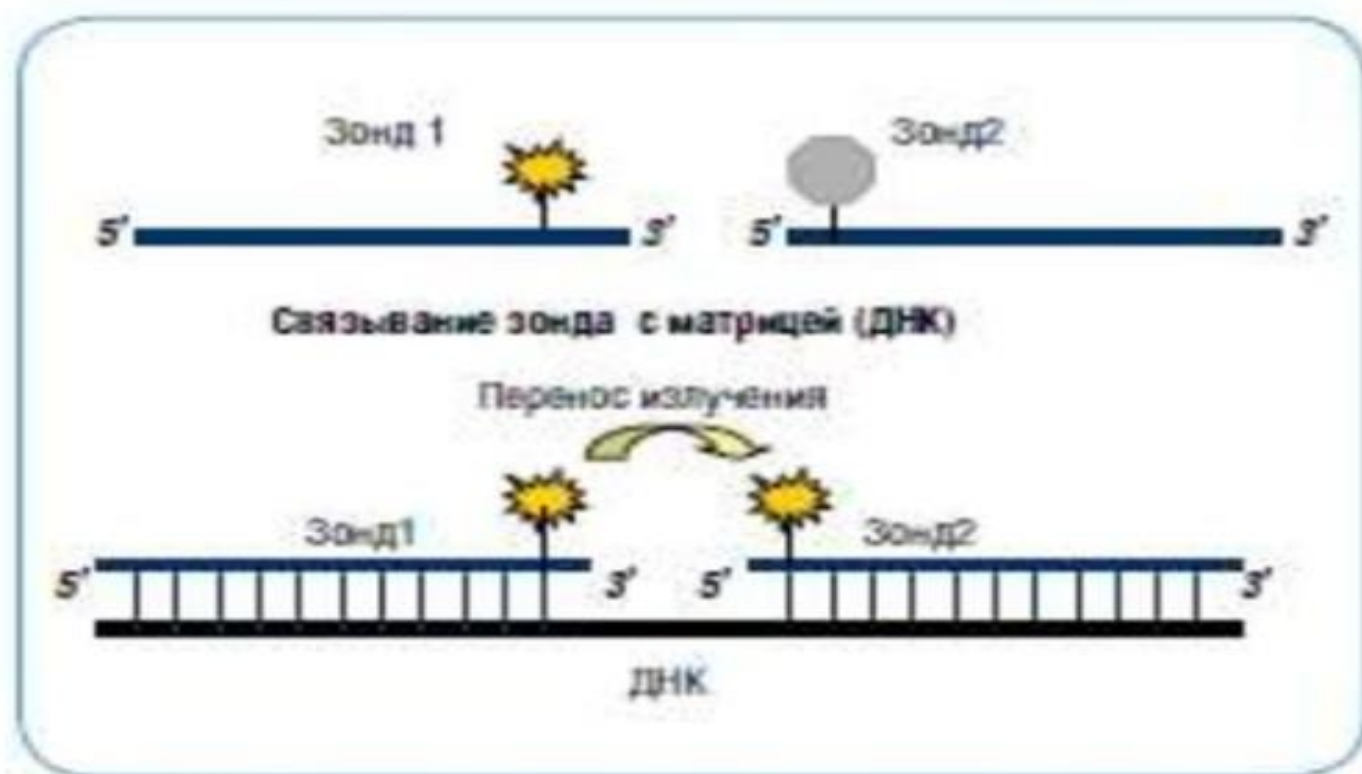


Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени специфические системы детекции

FRET-PCR

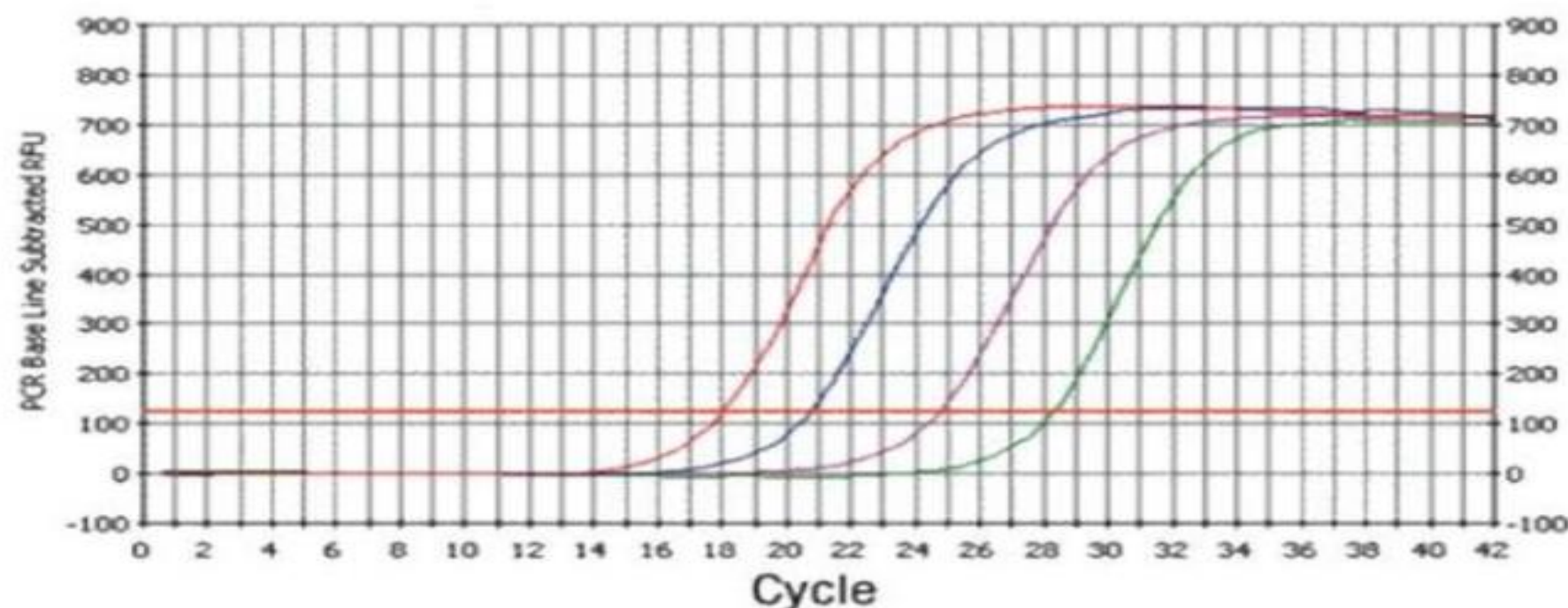
Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии – данный способ детекции отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3' конце первого зонда, ко второму флуорофору, который находится на 5' конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида. При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей излучение, испускаемое первым флуорофором передается на второй флуорофор, а его излучение детектируется прибором (рис. 8).



Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение



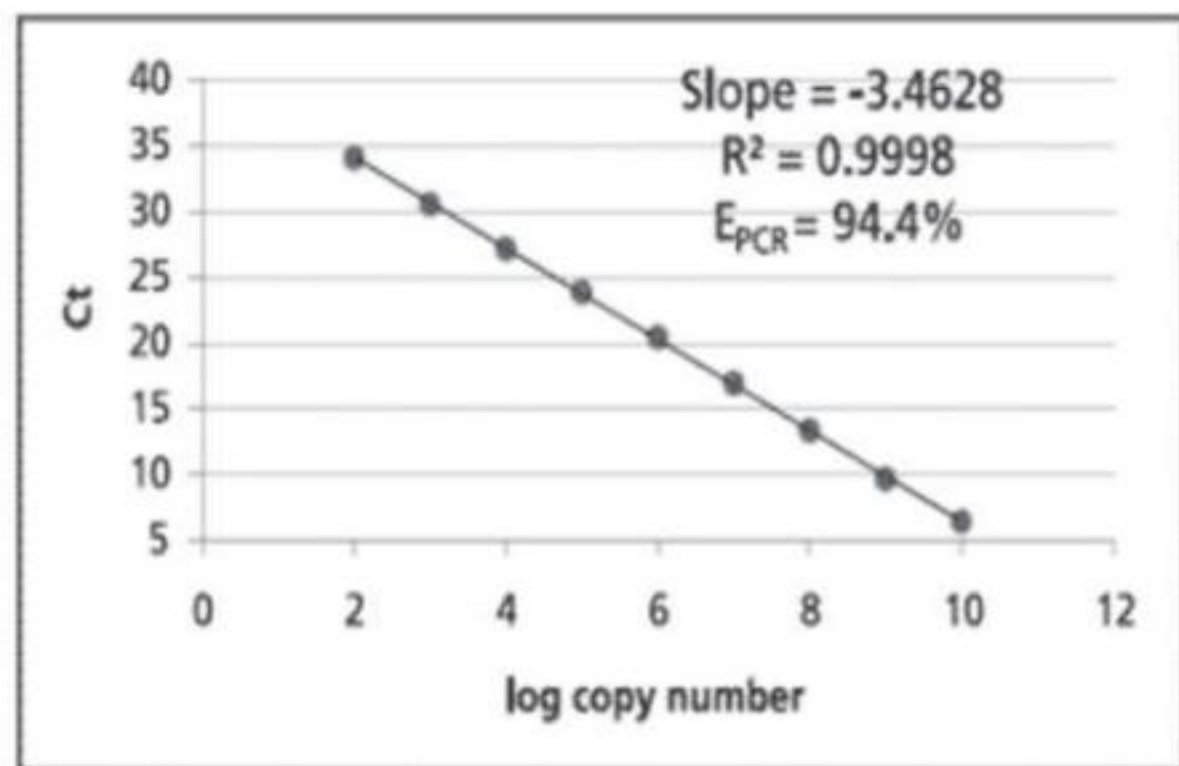
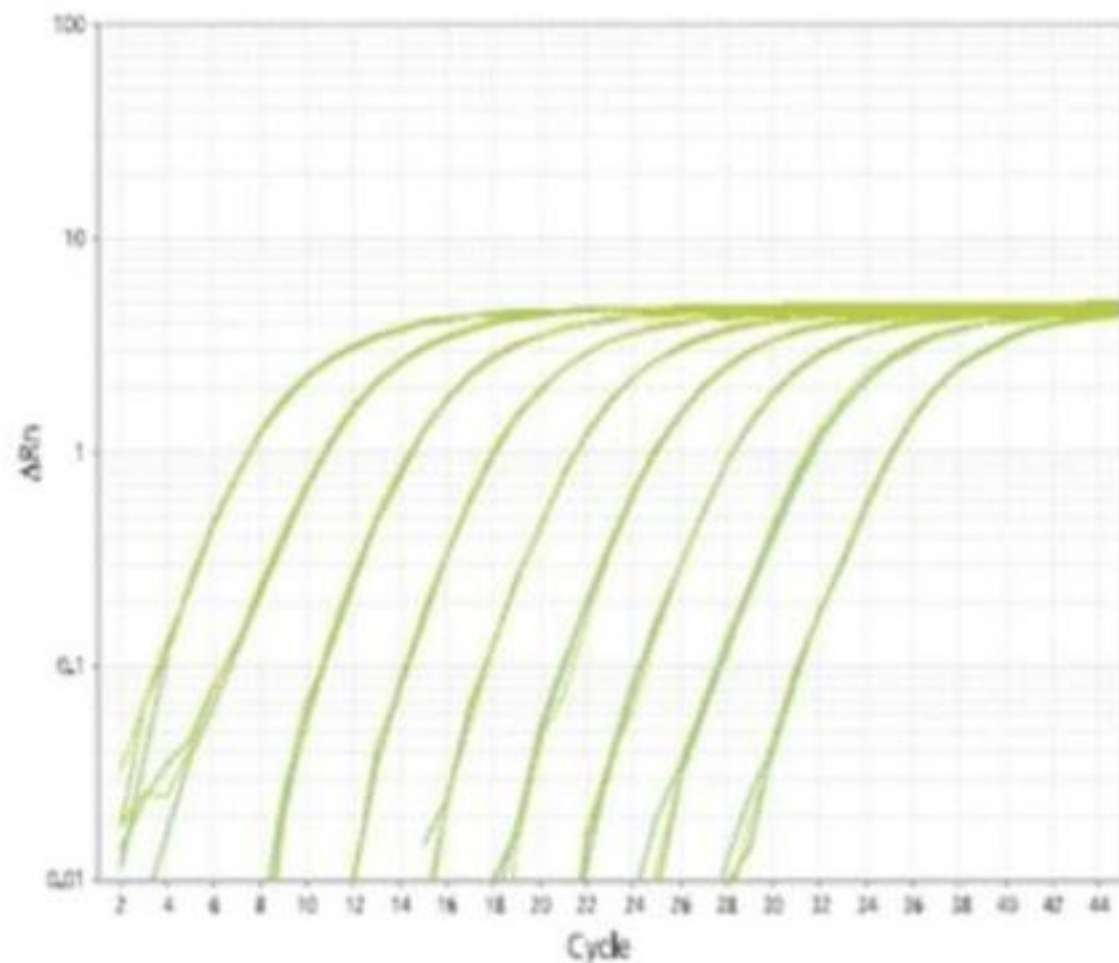
Red=10,000 cells
Blue=1000 cells
Pink=100 cells
Green=10 cells

http://www.cambio.co.uk/library/images/html_images/arraypure_fig01.gif

Полимеразная цепная реакция

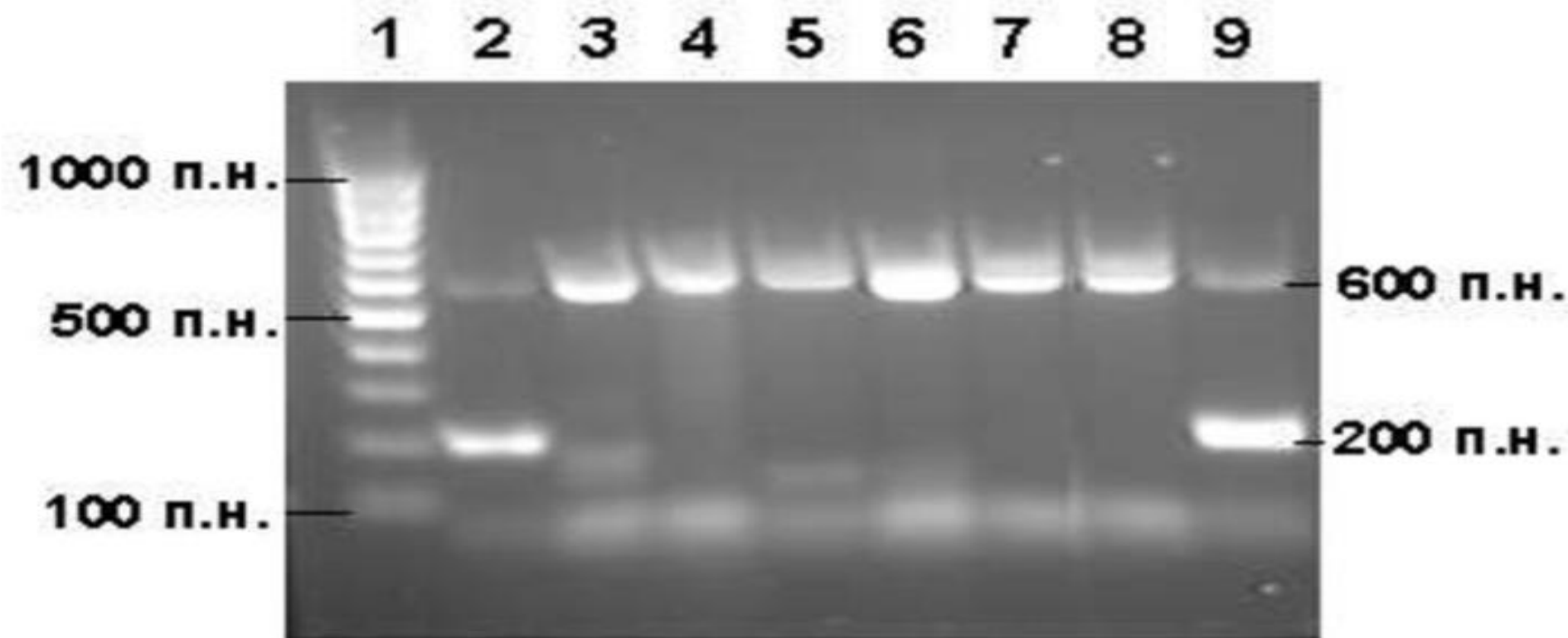
ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение



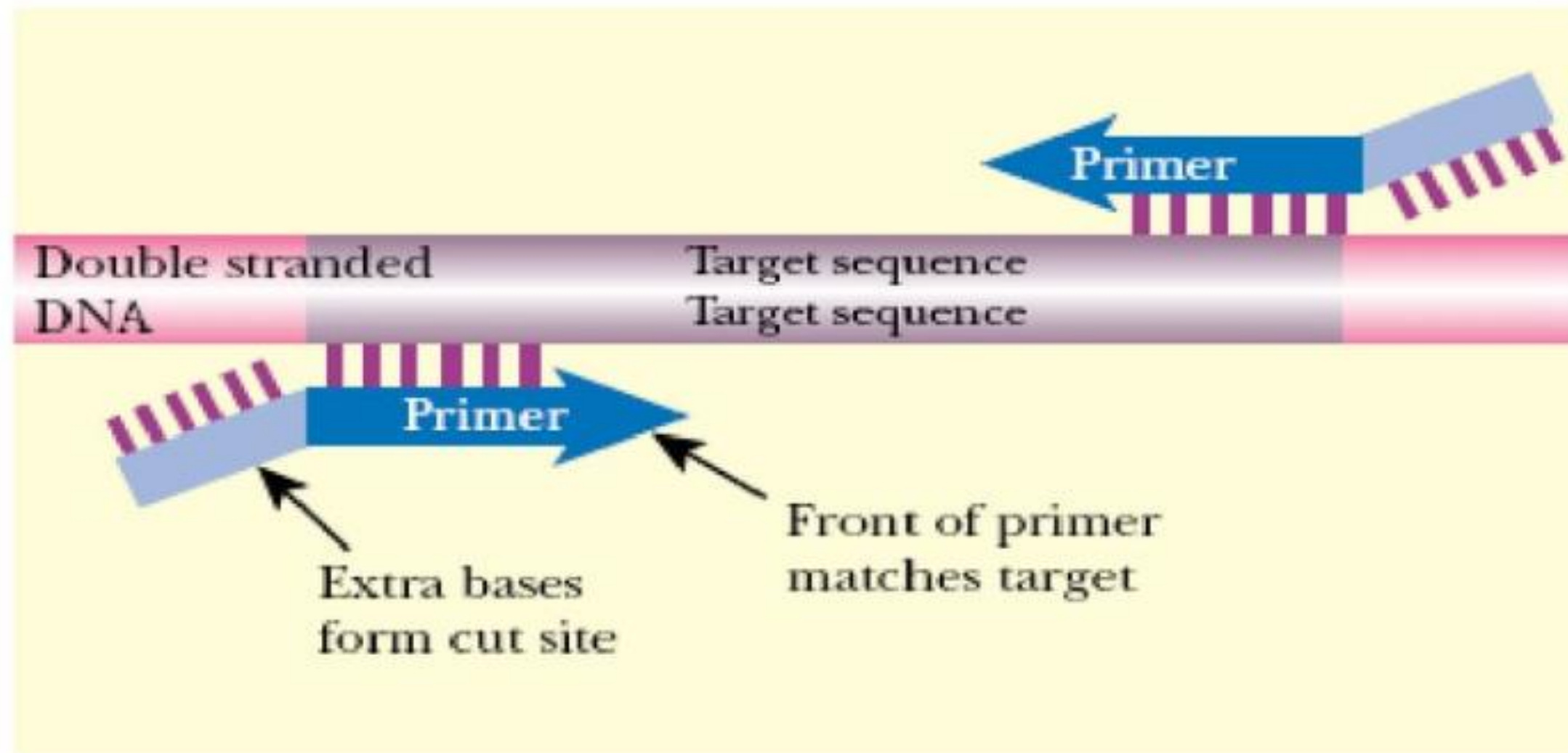
http://www.affymetrix.com/fa/images/usb_figures/75680_fig1.gif

Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных после ПЦР с использованием праймеров коммерческой тест-системы, специфичных к Р-35S

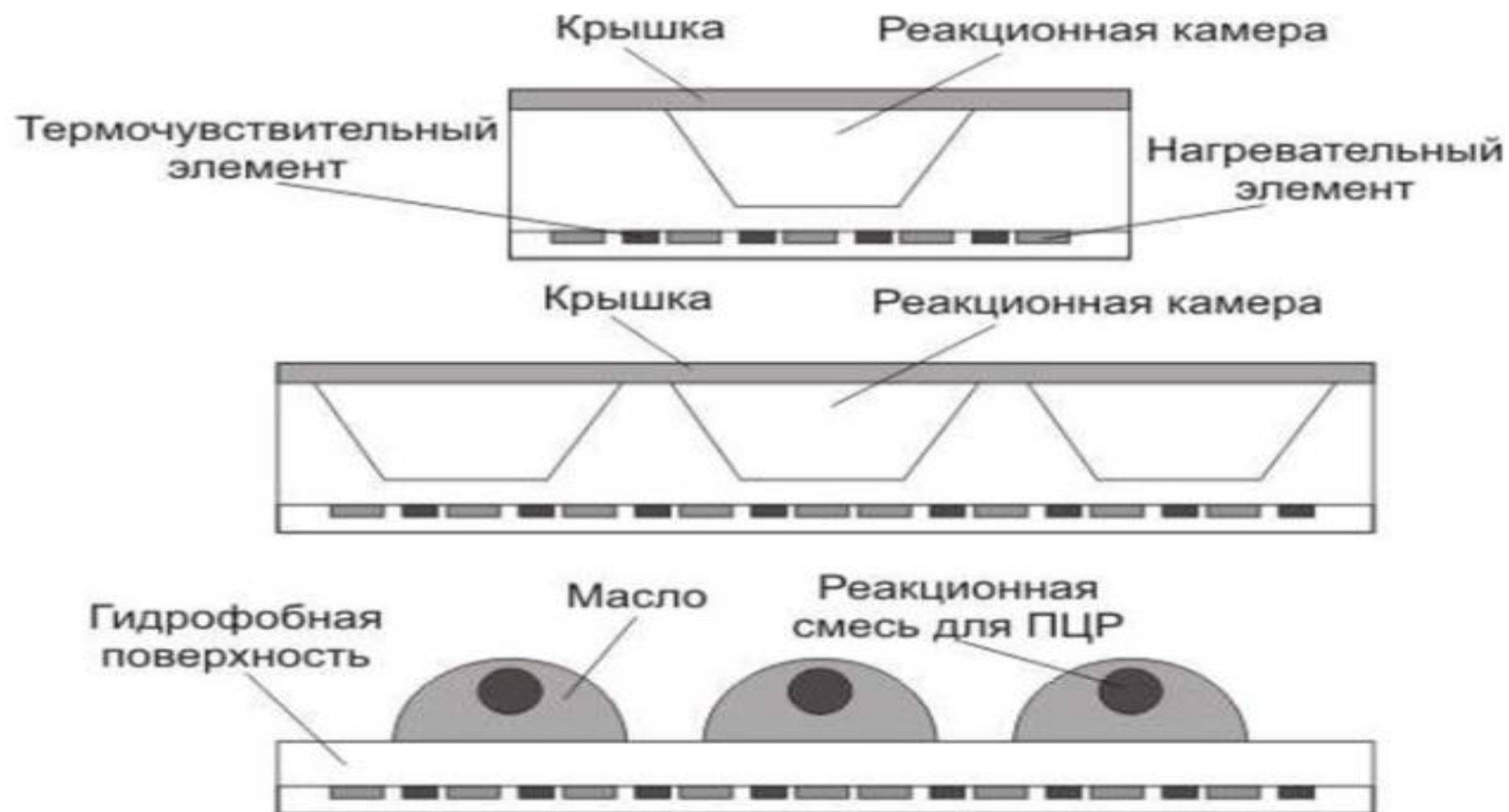


1- ДНК-маркеры; 2- положительный контроль; 3-9 – продукты амплификации целевого фрагмента (~200 п.н.) и референсного гена (~600 п.н.) в образцах №1-7. Электрофорез проводили в 1% агарозном геле.

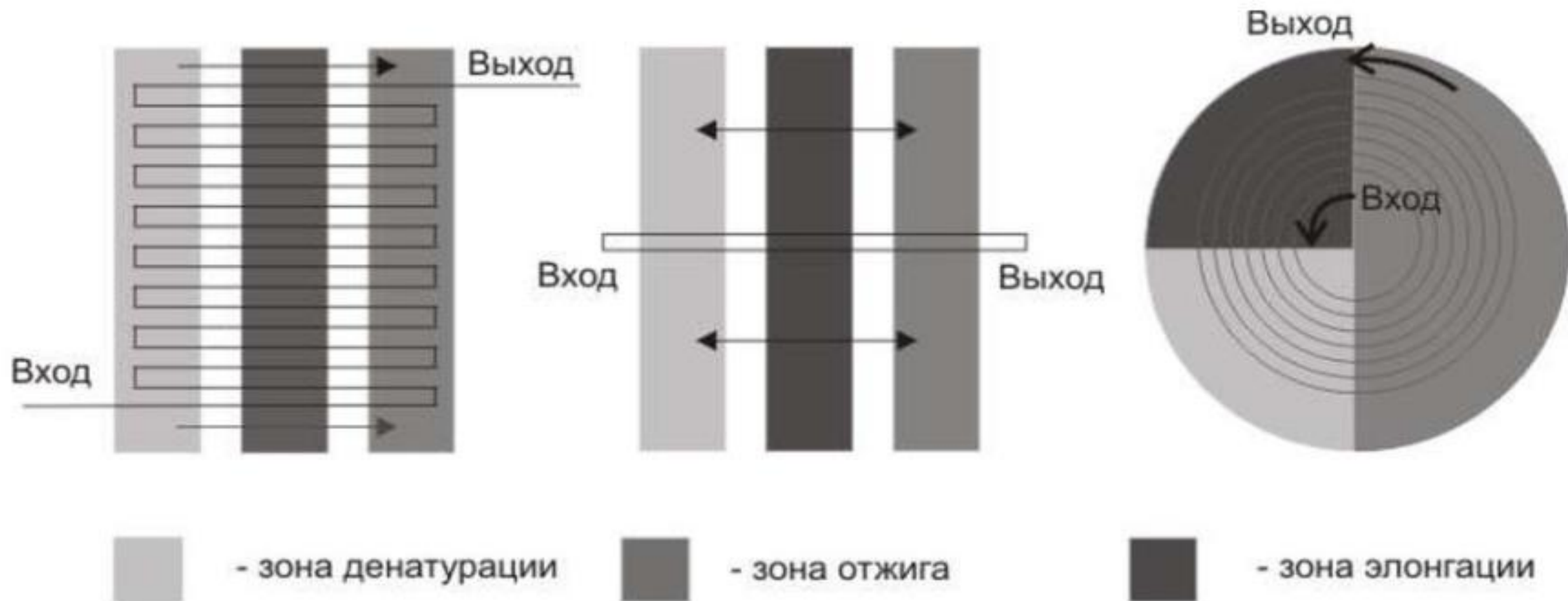
Модификация концов копируемого фрагмента



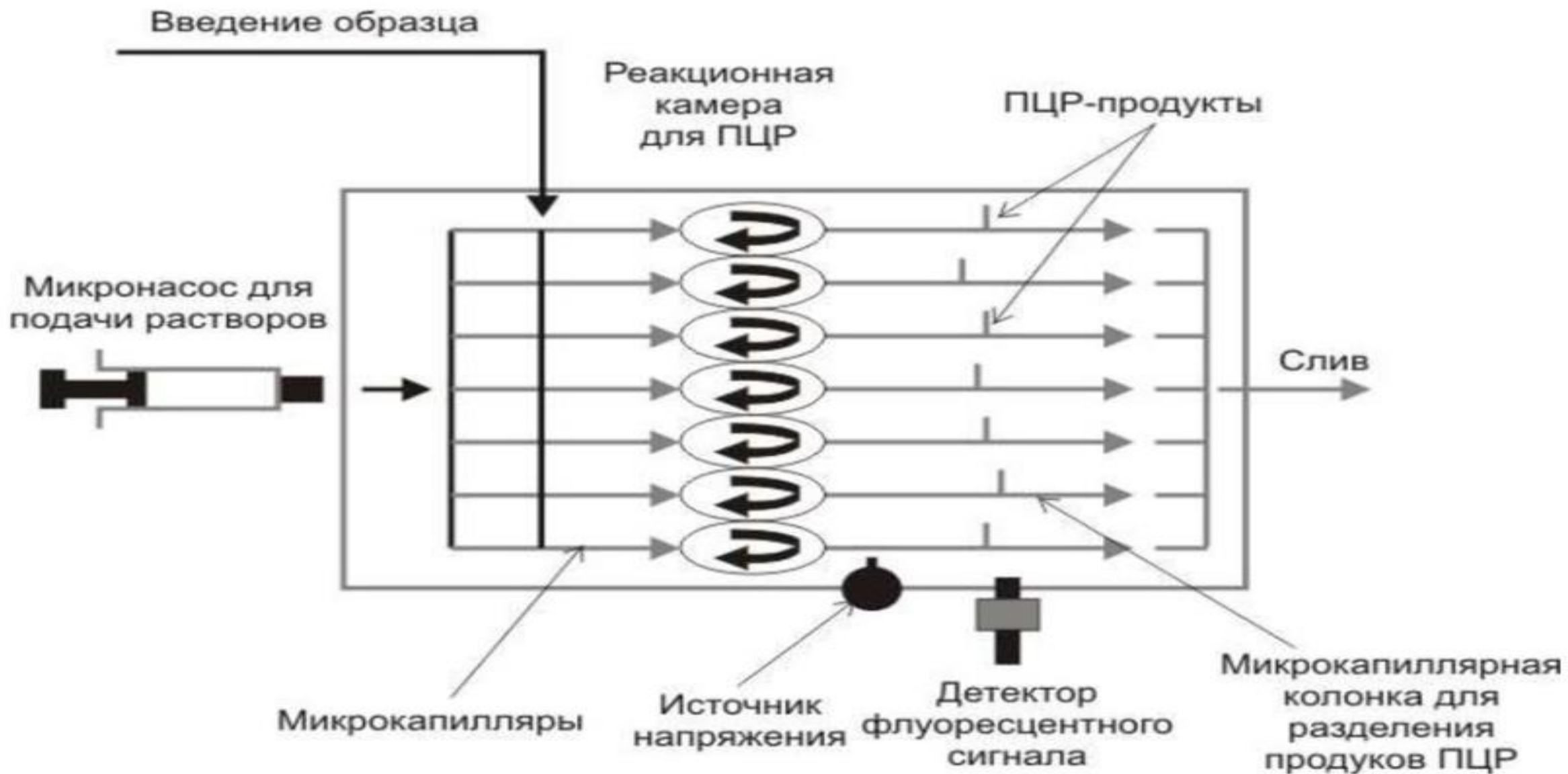
ПЦР-биочипы



Проточные ПЦР-биочипы



Интегрированный микрокапиллярный ПЦР-биочип





БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!