

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«ПЦР: принцип, постановка, детекция»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы

Медико-биологического факультета

Направления подготовки Биология

Профиль Биохимия

Андреева Мария Григорьевна

Куркина Дарья Александровна

Чекина Анна Александровна

Долаева Алина Алибековна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной

медицины и биологии

Толкачев Борис Евгеньевич

*Хорошо (89 баллов)
с и. замечаниями
в листе работы
Док. (Толкачев)*

16.04.2015

Волгоград 2015

Содержание

Введение

Механизм полимеразной цепной реакции

Ход реакции

Аmplификация

Детекция

Введение

Полимеразная цепная реакция - экспериментальный метод, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

*стилизация не совпадает
научным термином*

Это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПНР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия.

Механизм полимеразной цепной реакции

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Ход реакции

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий (рис. 1).

1. Денатурация. На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96°C (или до 98 °C, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин. для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифичных продуктов реакции.

2. Отжиг. На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название "отжиг" (от англ. "annealing"). Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда

находится тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к

плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре). После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

3. Элонгация (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

*определяется длиной
на мм. чистоты*

Аmplификация молекул РНК

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода. Например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирус инфлюэнцы, пикорнавирусы и т.д.) представлены именно РНК. В их жизненных циклах отсутствует промежуточная фаза превращения в ДНК. При выявлении РНК необходимо в первую очередь перевести ее в форму ДНК. Для этого используют фермент обратную транскриптазу, который выделяют из двух различных вирусов: Avian myeloblastosis virus и Moloney murine leukemia virus. Использование этих ферментов связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, они термолабильны и поэтому могут быть использованы 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%. Предпринимаются попытки обойти этот недостаток используя в качестве обратной транскриптазы термостабильную полимеразу, полученную из термофильного микроорганизма *Thermus Thermophilus*, проявляющую транскриптазную активность в присутствии Mn^{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, должны присутствовать праймеры в качестве затравки и смесь 4-х дНТФ как "строительный материал".

После проведения реакции обратной транскрипции полученные молекулы кДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР.

Детекция

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в жизни встречается не часто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда из-за их присутствия не удастся амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

отсутствием вывода