

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-биологический факультет

Кафедра Молекулярной биологии и генетики

РЕФЕРАТ

по дисциплине «Методы и объекты генетического анализа»

Тема:

«Полимеразная цепная реакция (ПЦР).»

Студентка гр. 301 _____ Ржевская А.Э.

Преподаватель _____ Замарин А.А.

Волгоград – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение.	3
2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).	4
3. Принцип метода.	5
3.1. Наличие в реакционной смеси ряда компонентов.	5 6
3.2. Циклический температурный режим.	
3.3. Основные принципы подбора праймеров.	7
4. Стадии постановки ПЦР.	8
4.1. Подготовка пробы биологического материала.	8
4.2. Амплификация.	10
4.3. Оценка результатов реакции.	11
5. Достоинства метода ПЦР.	12
6. Применение ПЦР.	14
7. Заключение.	15
8. Список литературных источников.	16

1. Введение.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрёл в 1983 году Кэри Мюллис (американский учёный). Впоследствии он получил за это изобретение Нобелевскую премию. В настоящее время ПЦР-диагностика является, одним из самых точных и чувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний. Данный метод диагностики сейчас, в 2021 году особенно распространён и востребован, в связи с ковидной ситуацией в стране.

2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный молекулярнобиологический метод, который основан на катализируемой ДНК-полимеразой реакции, и который позволяет амплифицировать (от английского amplify - многократно увеличивать, усиливать) малые концентрации определённых фрагментов ДНК в биологическом материале в миллионы раз в течение нескольких часов.

Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последнее десятилетие. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

Впервые состав ингредиентов, входящих в реакционную смесь для постановки полимеразной цепной реакции, и основные принципы использования праймеров (коротких искусственно синтезированных молекул ДНК) для получения копий ДНК были описаны Клерре с соавт. в 1971 году. Однако тогда еще не была продемонстрирована основная черта ПЦР - экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК как результат реакции.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

3. Принцип метода.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо соблюдение ряда условий.

3.1 Наличие в реакционной смеси ряда компонентов.

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.

Тaq-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 Тaq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;

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

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.

3.2. Циклический температурный режим.

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 Таq-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 Таq-полимеразы - 75°С, и начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера, с максимальной эффективностью.

3.3. Основные принципы подбора праймеров.

При создании ПЦР-тест-системы одной из основных задач является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

1. Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, т.к именно с них начинает достраивать комплементарную цепь ДНК Taq-полимераза. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно, синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Она видна на электрофорезе в виде тяжелых или легких дополнительных полос. Это мешает оценке результатов реакции, т.к легко перепутать специфический продукт амплификации с синтезированной посторонней ДНК. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.

2. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом.

4. Стадии постановки ПЦР.

4.1 Подготовка пробы биологического материала.

Для выделения ДНК используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки ПЦР.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, описанная Мармуром. Она включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и пересаживанием ДНК спиртом. Этот метод позволяет получить чистый препарат ДНК. Однако он довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий запах веществами, как фенол и хлороформ.

Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Воом с соавторами. Этот метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное "молоко" и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников типа Chalex, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а наоборот, примеси, мешающие реакции. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом. К сожалению, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, некоторые микроорганизмы не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

4.2 Амплификация.

Для проведения реакции амплификации необходимо приготовить реакционную смесь и внести в нее анализируемый образец ДНК. При этом важно учитывать некоторые особенности отжига праймеров. Дело в том, что, как правило, в анализируемом биологическом образце присутствуют разнообразные молекулы ДНК, к которым используемые в реакции праймеры имеют частичную, а в некоторых случаях значительную, гомологию. Кроме того, праймеры могут отжигаться друг с другом, образуя праймер-димеры. И то, и другое приводит к значительному расходу праймеров на синтез побочных (неспецифических) продуктов реакции и, как следствие, значительно уменьшает чувствительность системы. Это затрудняет или делает невозможным чтение результатов реакции при проведении электрофореза.

4.3 Оценка результатов реакции.

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.

5. Достоинства метода ПЦР.

Высокая чувствительность исследования

Чувствительность метода такова, что амплифицировать в ПЦР и выявить целевую последовательность можно даже в том случае, если она встречается однажды в образце из 10^5 клеток.

Специфичность анализа

ПЦР позволяет выявлять ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК организма-хозяина, а также проводить генотипирование. Специфически подбирая компоненты реакции (праймеры), Вы можете одновременно выявлять ДНК близкородственных микроорганизмов.

Универсальность метода ПЦР

Дело в том, что для ПЦР-диагностики инфекционных заболеваний, либо наследственных заболеваний человека можно использовать одно и то же оборудование, следовать универсальным процедурам подготовки образцов (проб) и постановки анализа, а также однотипные наборы реактивов.

Экономия времени

Важное преимущество ПЦР – отсутствие стадий культуральной микробиологической работы. Подготовка образцов, проведение реакции и анализ результатов максимально облегчен и во многом автоматизирован. Благодаря этому, время получения результата может сокращаться до 4-5 часов.

Эффективность метода ПЦР

ПЦР помогает избежать известных сложностей, возникающих при выращивании труднокультивируемых, некультивируемых или персистирующих форм микроорганизмов для диагностики латентных и

хронических инфекций. Эффективен метод ПЦР и при скрининге возбудителей с высокой антигенной изменчивостью, а также внутриклеточных паразитов.

Широта исследуемого клинического материала

В качестве образца при полимеразной цепной реакции может быть использован не только биологический материал от больного, но также и многие другие субстраты, в которых могут быть идентифицированы молекулы ДНК с высокой чувствительностью, например, вода, почва, продукты питания, микроорганизмы, смывы и многое другое.

Все перечисленные выше достоинства этого уникального метода - высокая чувствительность и специфичность, идентификация инфекционного агента и проведение генотипирования любого гена человека, высокая эффективность и экономия времени, универсальность приборной базы – позволяют широко применять сегодня метод ПЦР в клинической диагностике, медицинской практике, научных исследованиях, контроле качества и многих других областях.

6. Применение ПЦР.

Области применения полимеразной цепной реакции как современного метода молекулярной биологии разнообразны. Во многом это обусловлено широтой материала, который можно анализировать (практически все, из чего можно выделить более-менее качественную ДНК может стать объектом исследования), а также подобранных праймеров. Основные области применения ПЦР:

клиническая медицина

- диагностика инфекционных заболеваний
- диагностика наследственных заболеваний
- выявление мутаций
- генотипирование
- клеточные технологии
- создание генетических паспортов

экология

- мониторинг состояния окружающей среды
- анализ продуктов питания
- анализ генетически-модифицированных организмов (ГМО)

судебная медицина и криминалистика

- идентификация личности
- установление отцовства

фармакология

ветеринария

научные исследования (молекулярная биология, генетика)

7. Заключение

Самое широкое распространение метод ПЦР в настоящее время получил как метод диагностики различных инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет выявить этиологию инфекции даже если в пробе, взятой на анализ, содержится всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР широко используется в ранней диагностики ВИЧ-инфекций, вирусных гепатитов и т.д. На сегодняшний день почти нет инфекционного агента, которого нельзя было бы выявить с помощью ПЦР.

8. Список литературных источников.

<https://www.ld.ru/PCR/ilist-4208.html>

<http://www.academy.edu.by/files/podrazdelenia/biol/tsepnaya%20reactsia-biol%202019.pdf>

https://ru.wikipedia.org/wiki/Полимеразная_цепная_реакция

<https://elearning.volgmed.ru/mod/folder/view.php?id=52405>