

Детекция и идентификация биомолекул

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

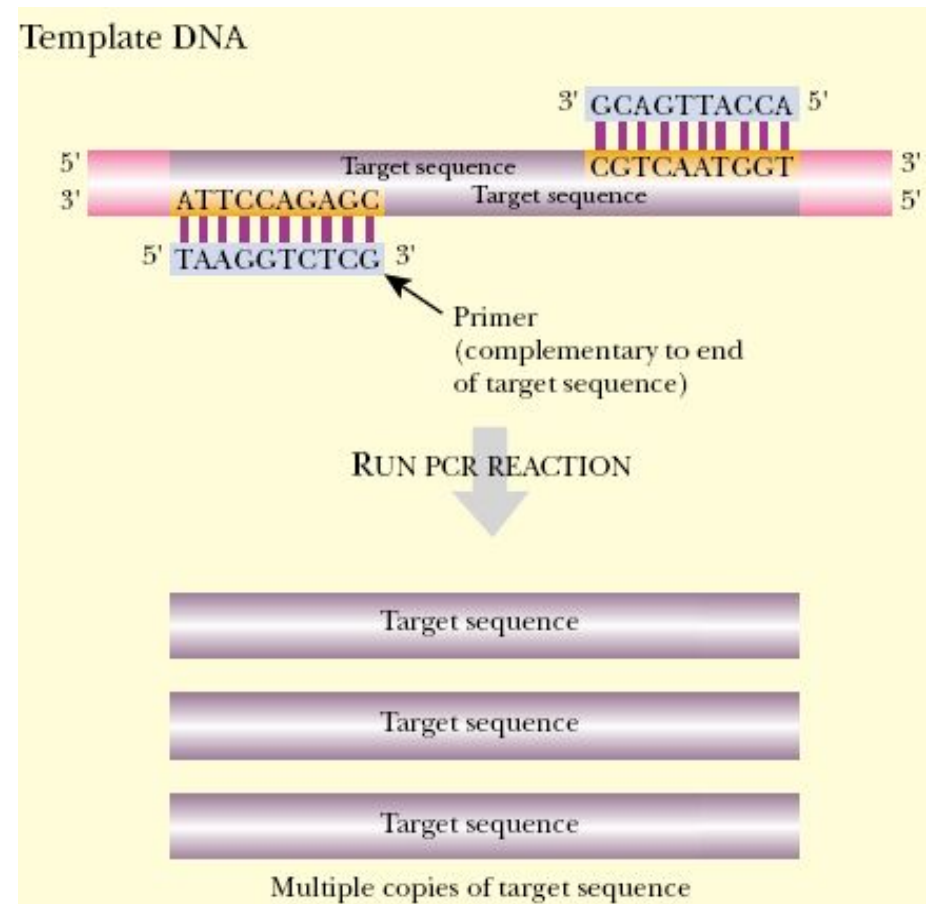
Polymerase chain reaction (PCR)

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.



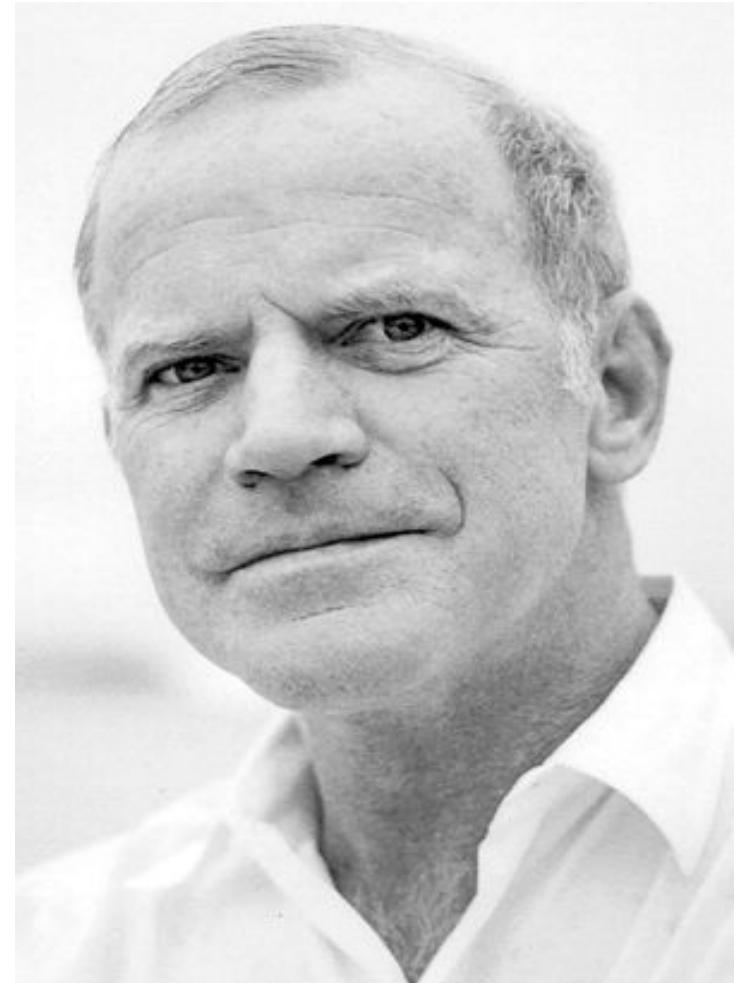
Полимеразная цепная реакция

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

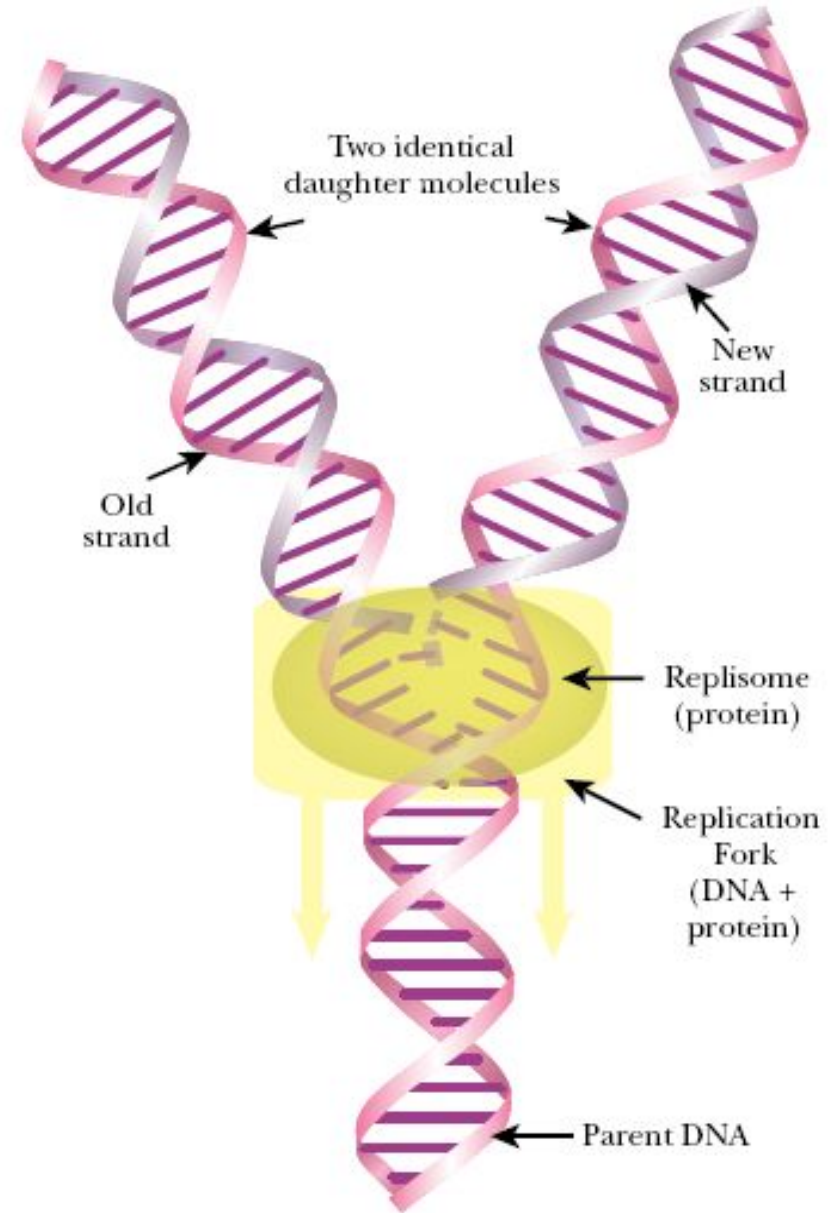
Полимеразная цепная реакция

Репликация (удвоение) ДНК

ПЦР моделирует в пробирке природный процесс репликации ДНК.

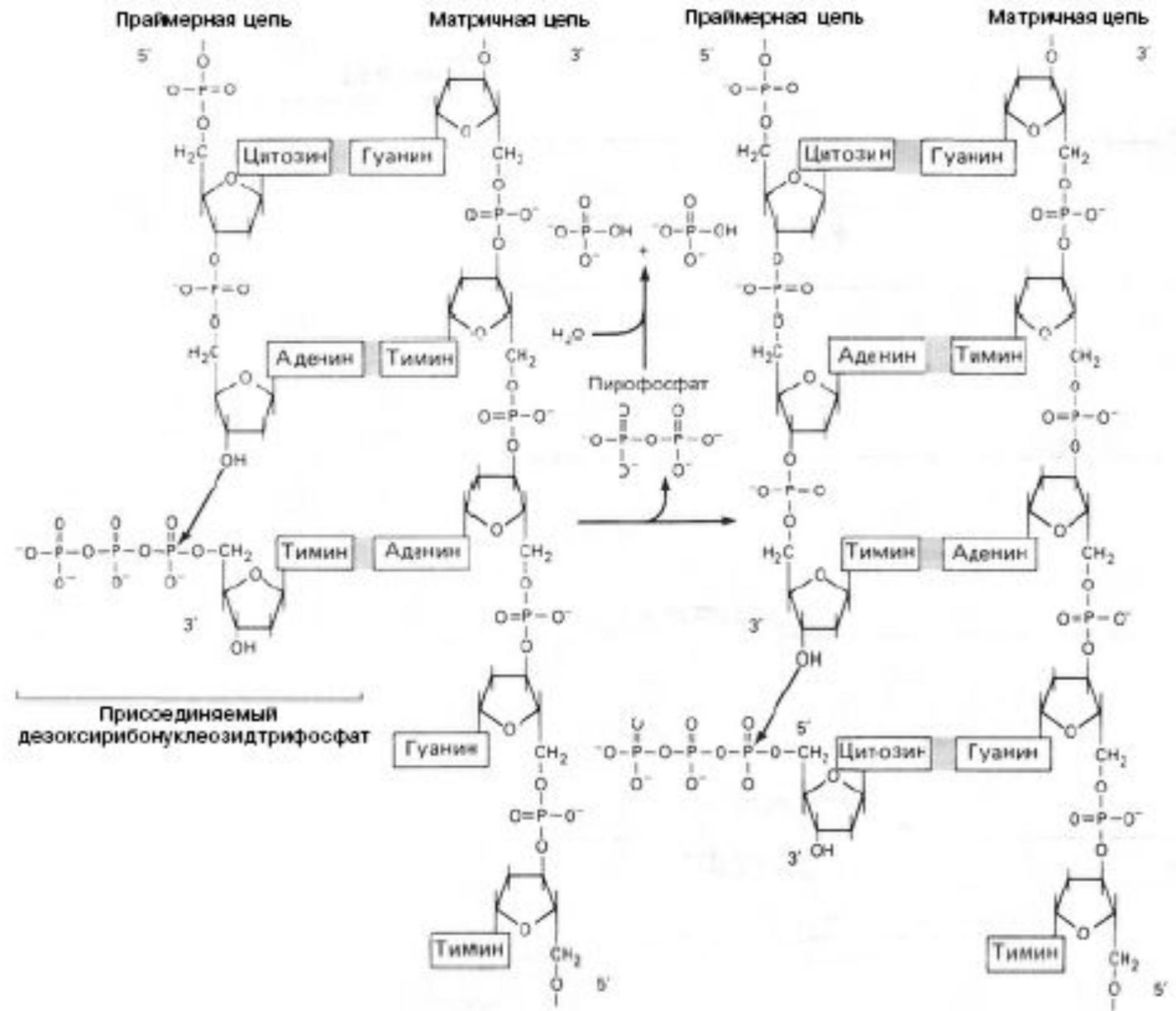
Особенности процесса репликации:

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

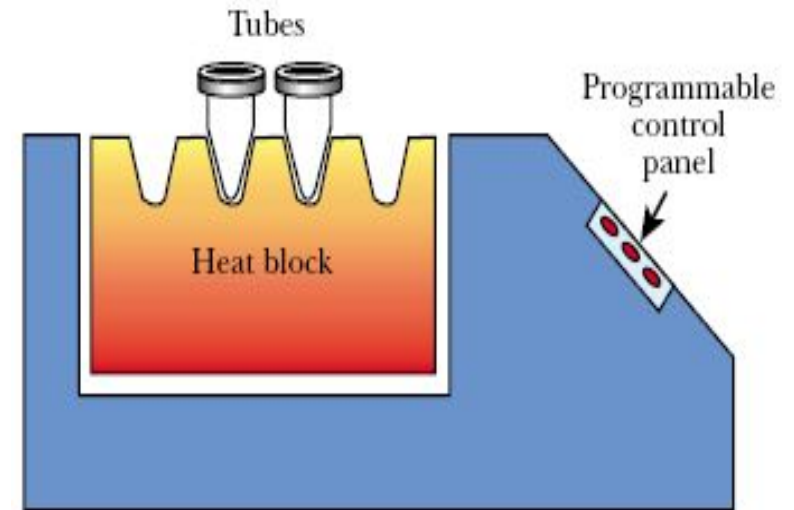
ДНК-амплификаторы, ПЦР-амплификаторы, термоциклеры (thermocycler) – это устройства для быстрого изменения температуры реакционной смеси по определенной программе.

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:

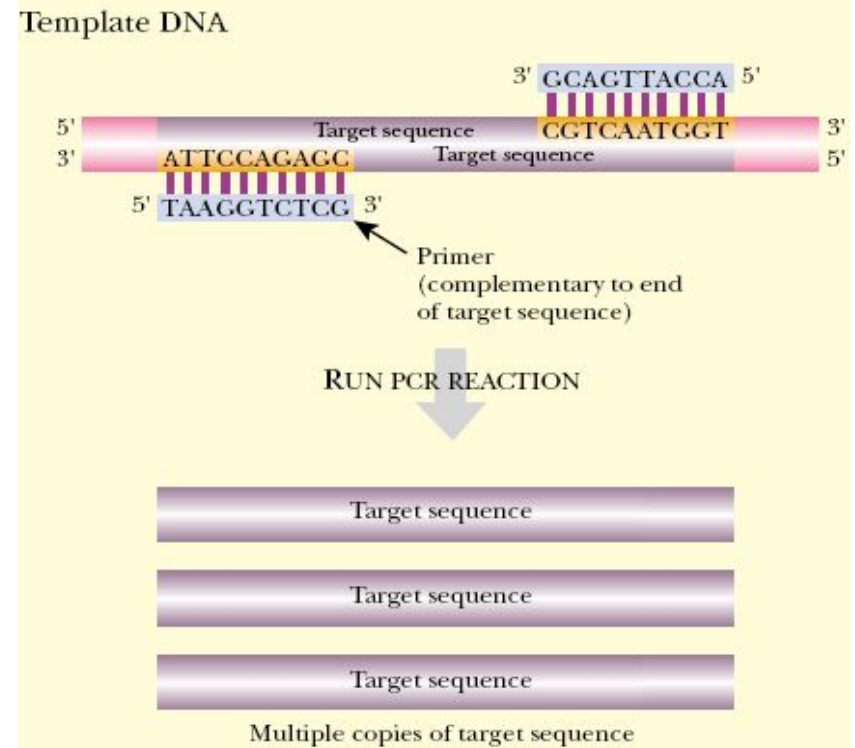
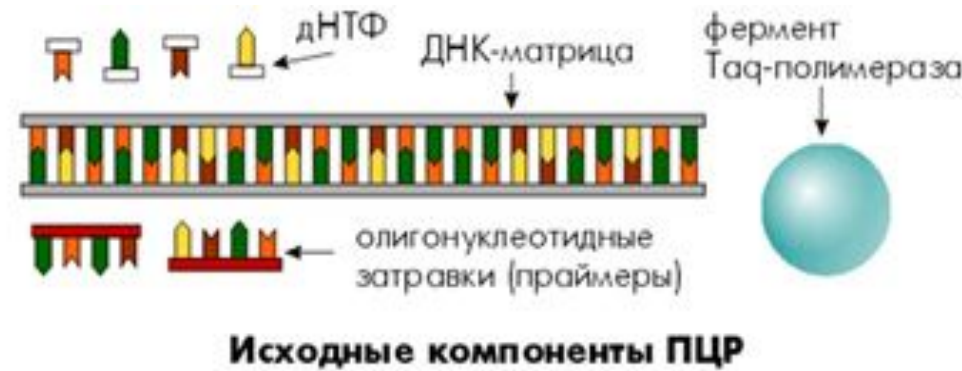
- блоки с обычными крышками;
- блоки с крышками, температура которых меняется согласованно с температурой самого блока.



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



Полимеразная цепная реакция

Приготовление реакционной смеси

Компонент* / объем смеси	25 мкл	50 мкл	Конечная концентрация
Стерильная вода	до 25 мкл	до 50 мкл	-
10X Epcyclo 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 Epcyclo 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)

91-95⁰С 1-5 мин 1 раз

2 цикл –

25-30 раз

1) денатурация

91-95⁰С 15-60 сек

2) отжиг

(связывание праймеров)

(annealing)

T_a

15-60 сек

3) элонгация (удлинение цепей)

72⁰С

t

30 сек на

500 нуклеотидов

3 цикл – окончательное достраивание

цепей

72⁰С

5 мин

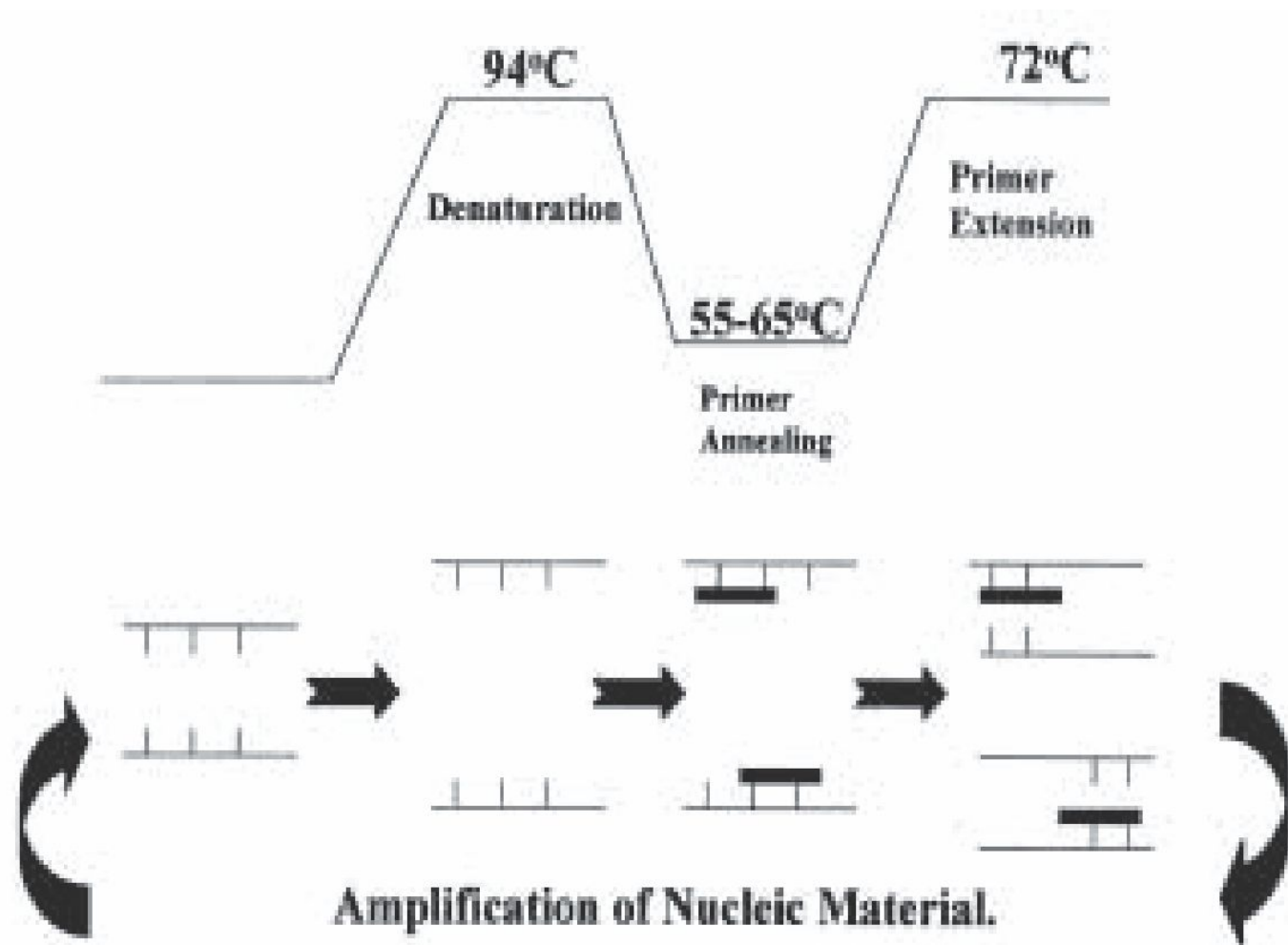
1 раз

4 цикл – охлаждение

4-10⁰С до выключения
прибора

Полимеразная цепная реакция

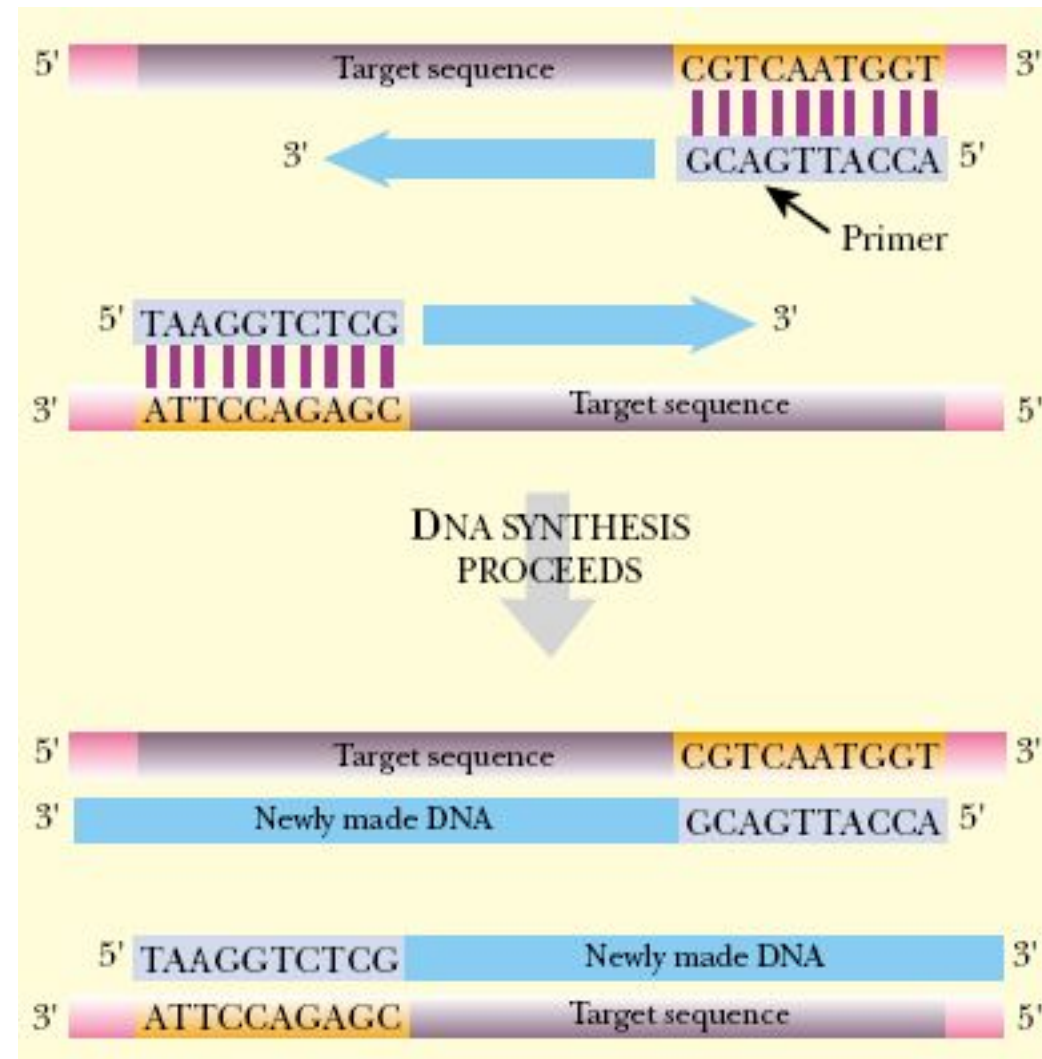
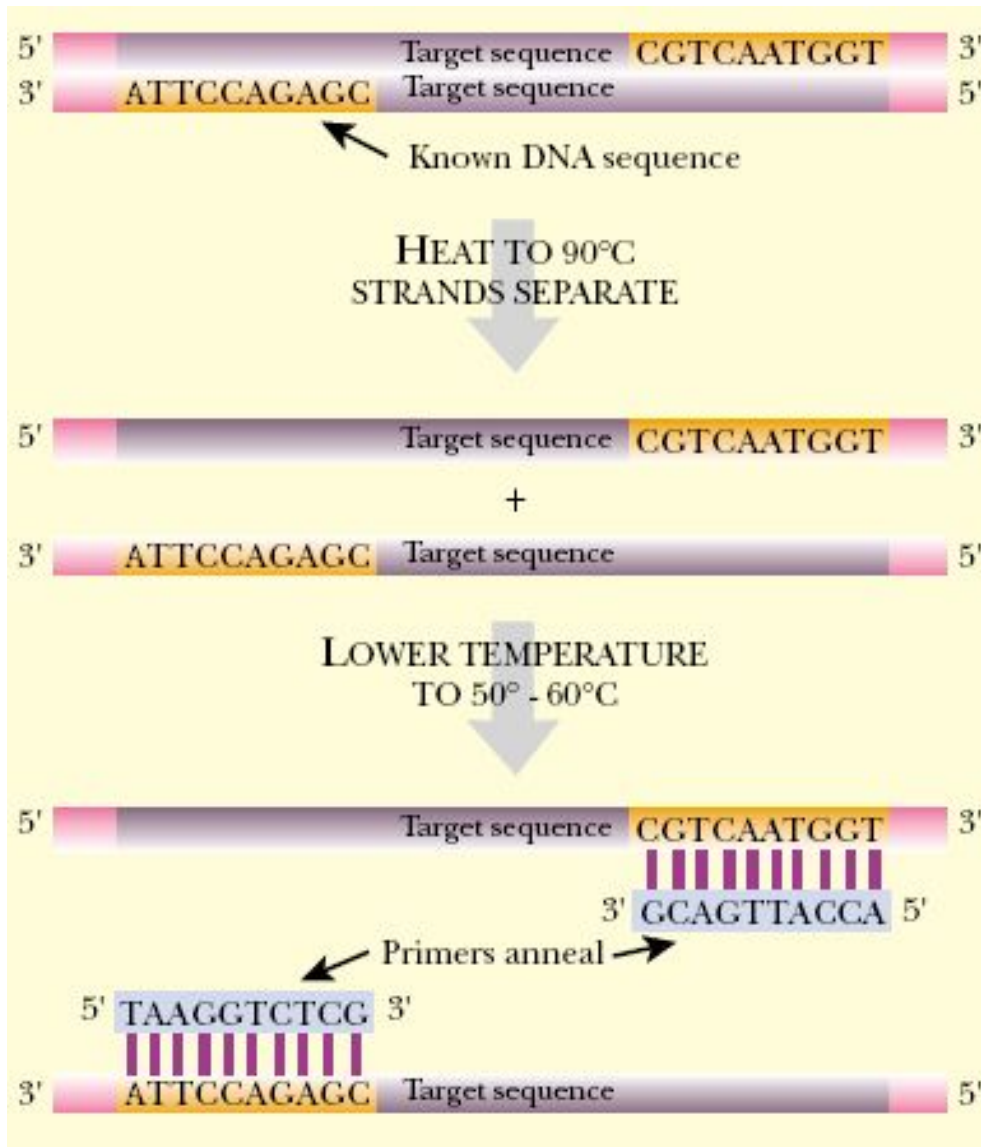
Программа амплификации



Полимеразная цепная реакция

Механизм полимеразной цепной реакции

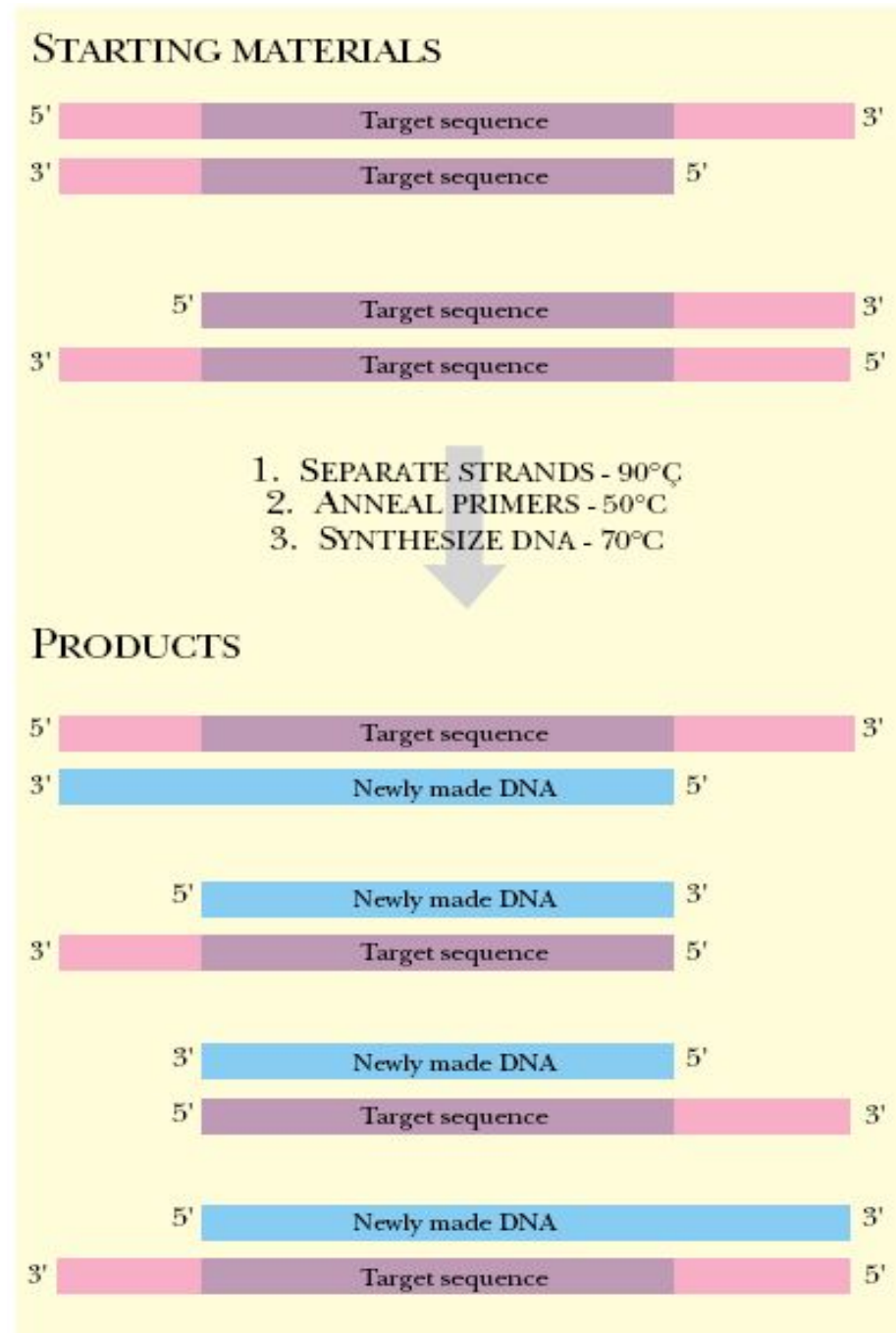
1 цикл



Полимеразная цепная реакция

Механизм полимеразной цепной реакции

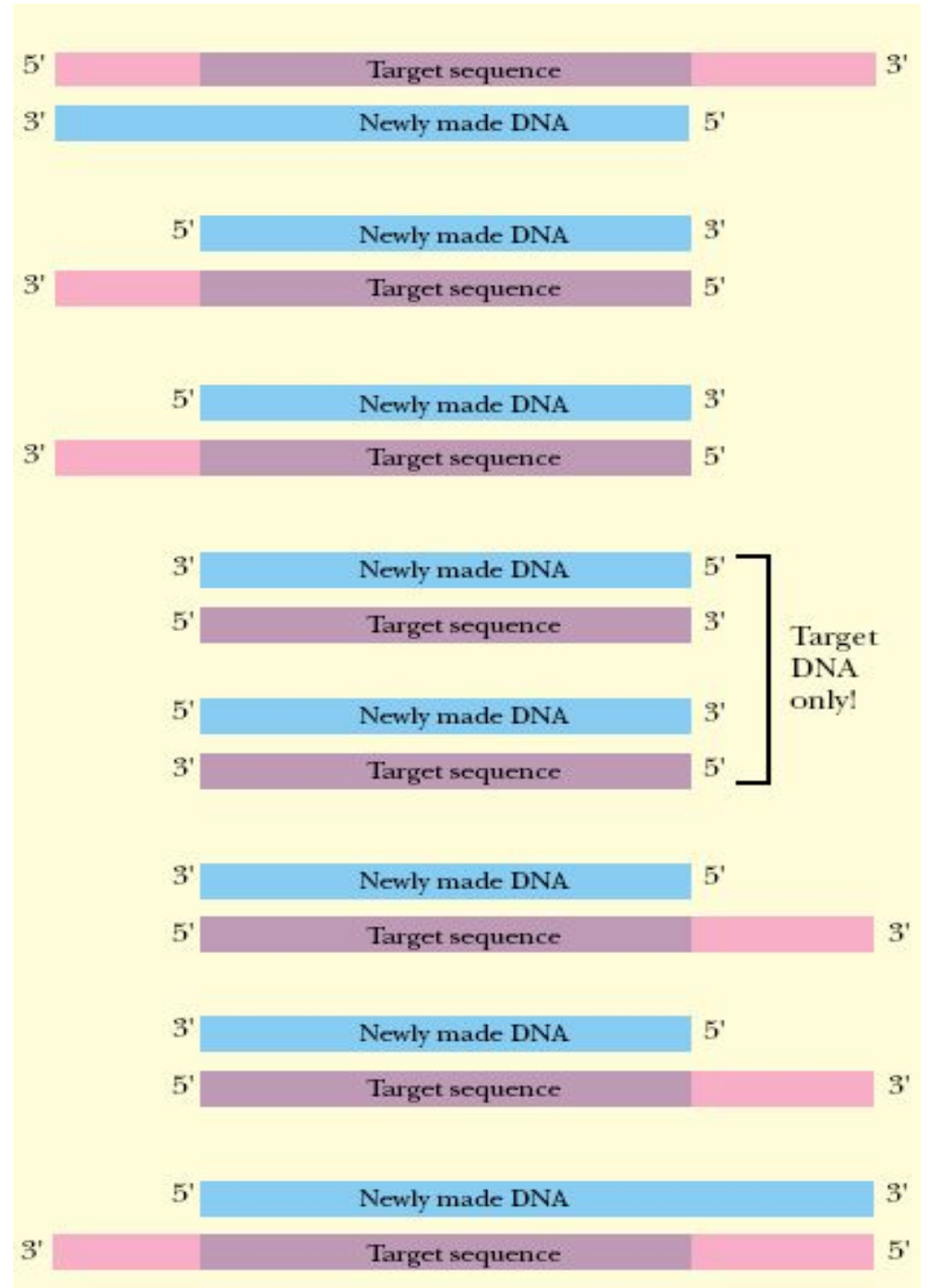
2 цикл



Полимеразная цепная реакция

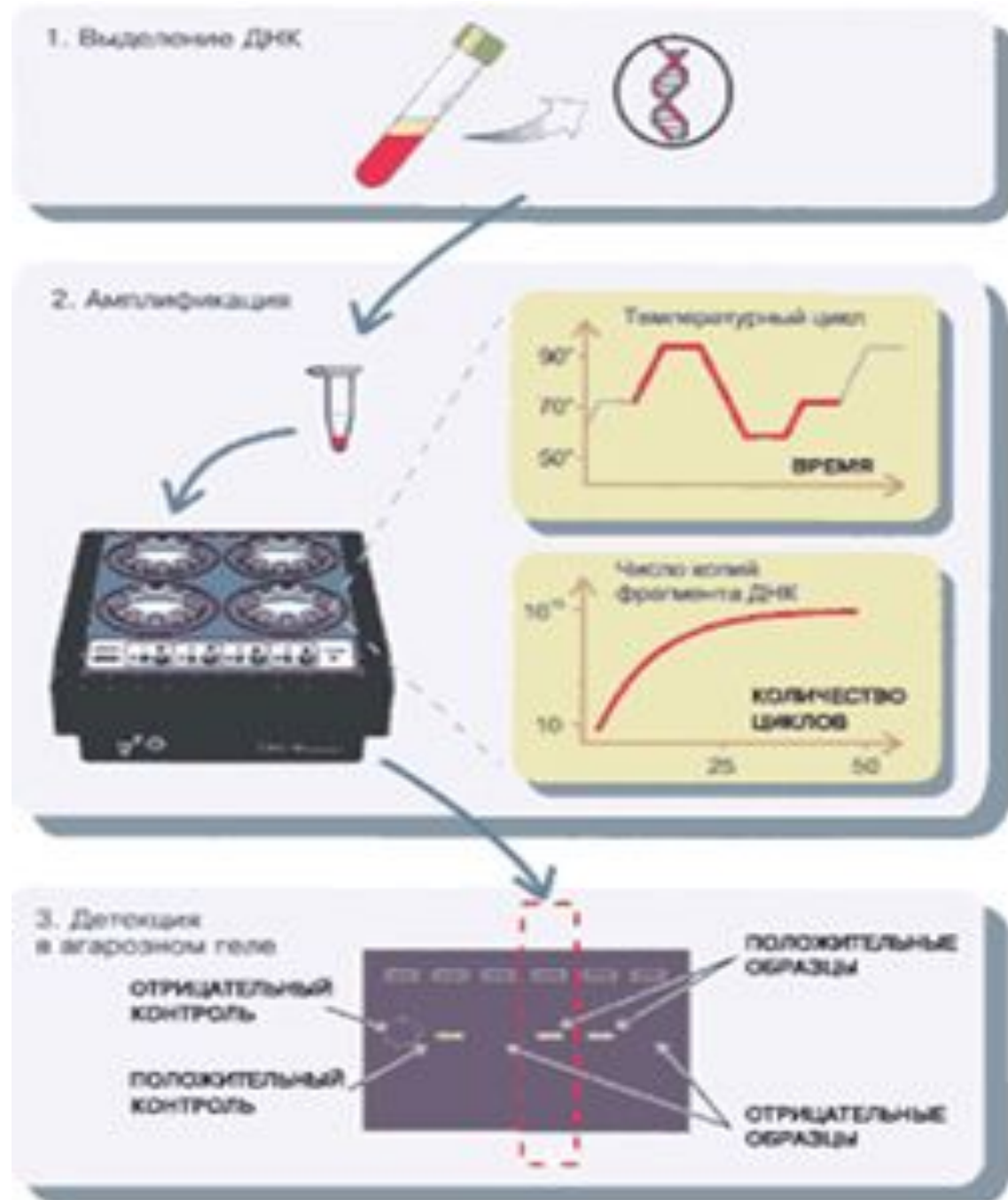
Механизм полимеразной цепной реакции 3 цикл

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



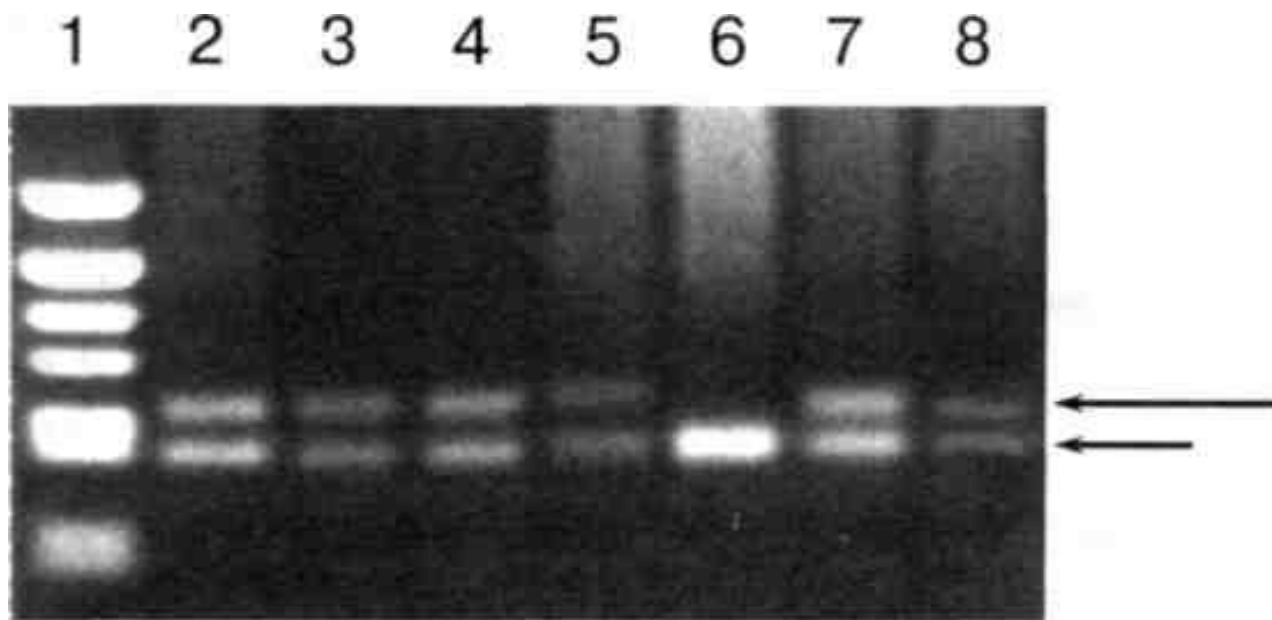
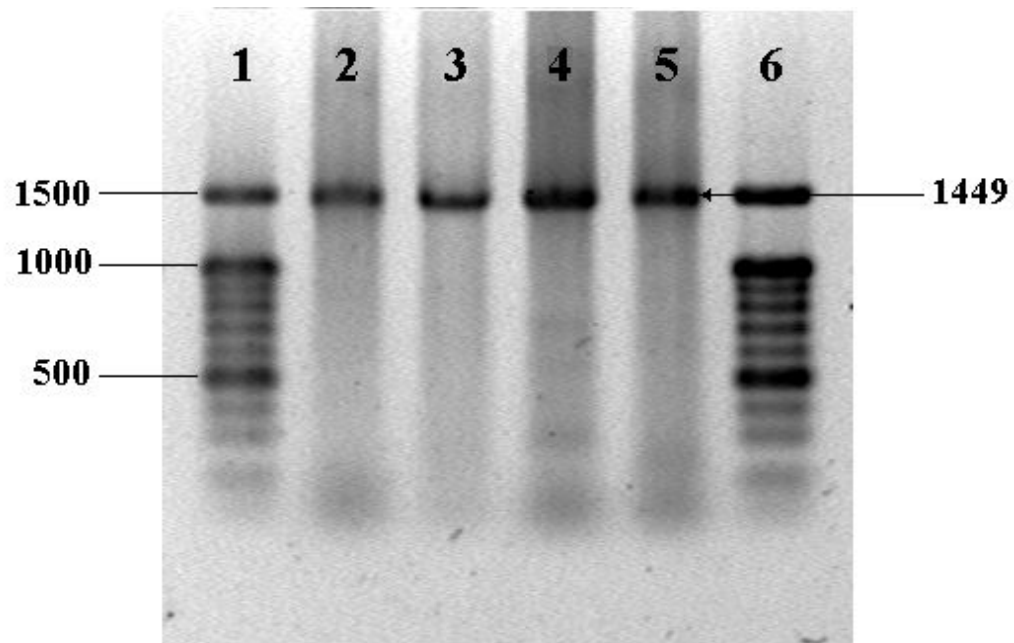
Полимеразная цепная реакция

Стадии постановки ПЦР



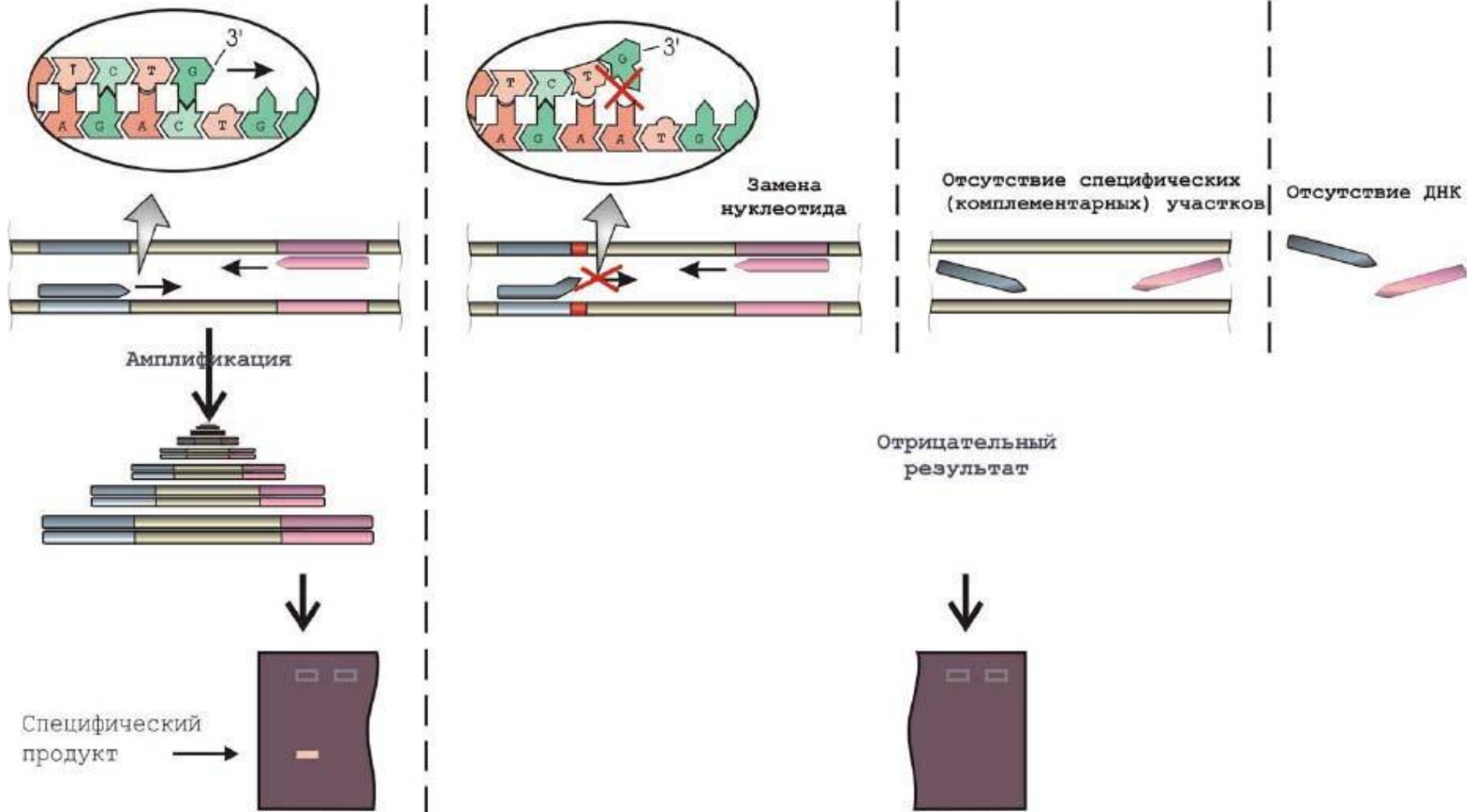
Полимеразная цепная реакция

Регистрация результатов ПЦР
методом электрофореза в
агарозном геле



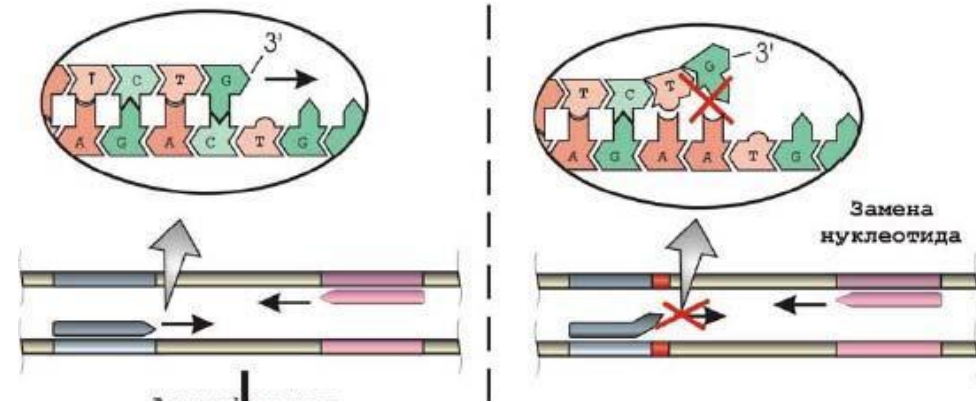
Полимеразная цепная реакция

Специфичность (правильность) ПЦР



Полимеразная цепная реакция

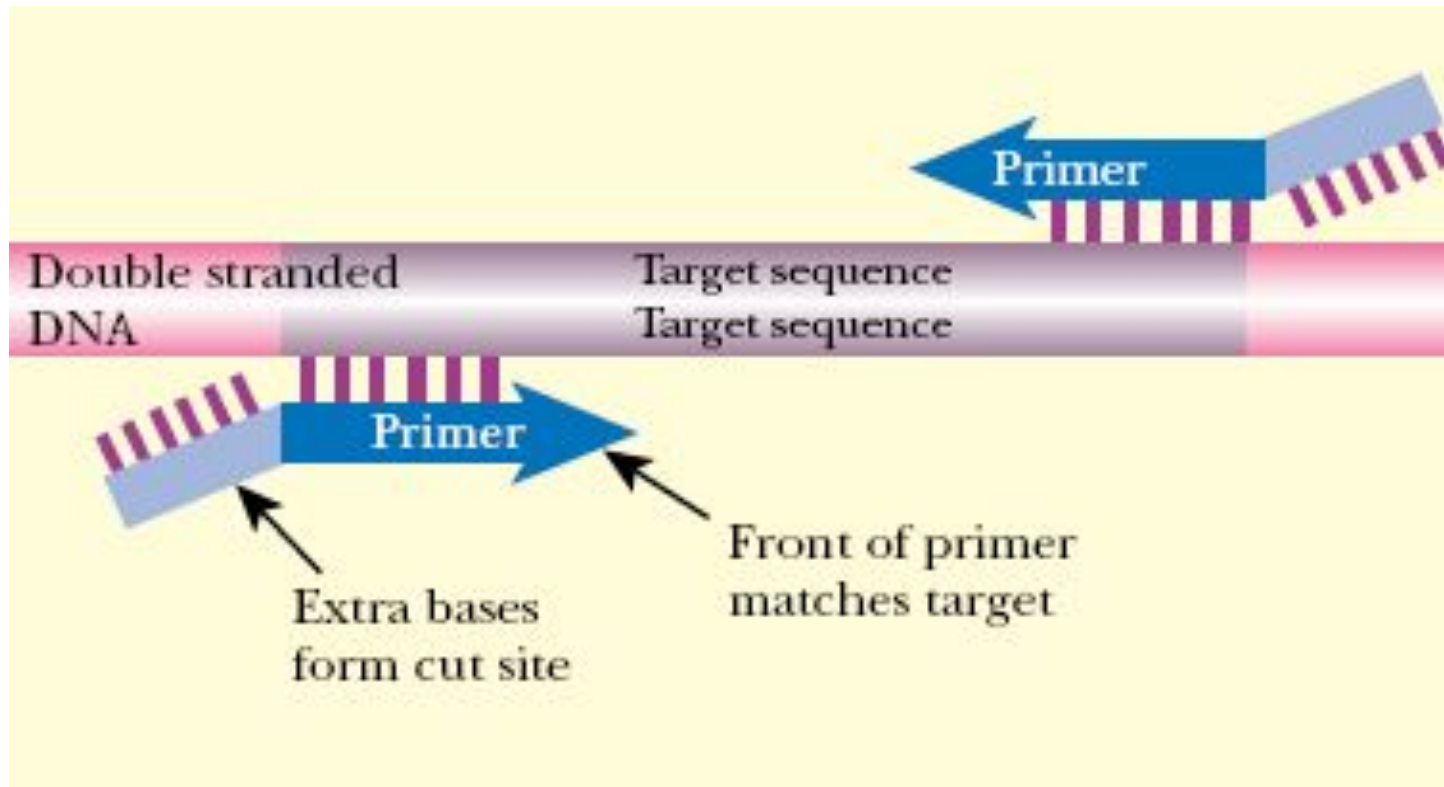
Требования к подбору праймеров



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

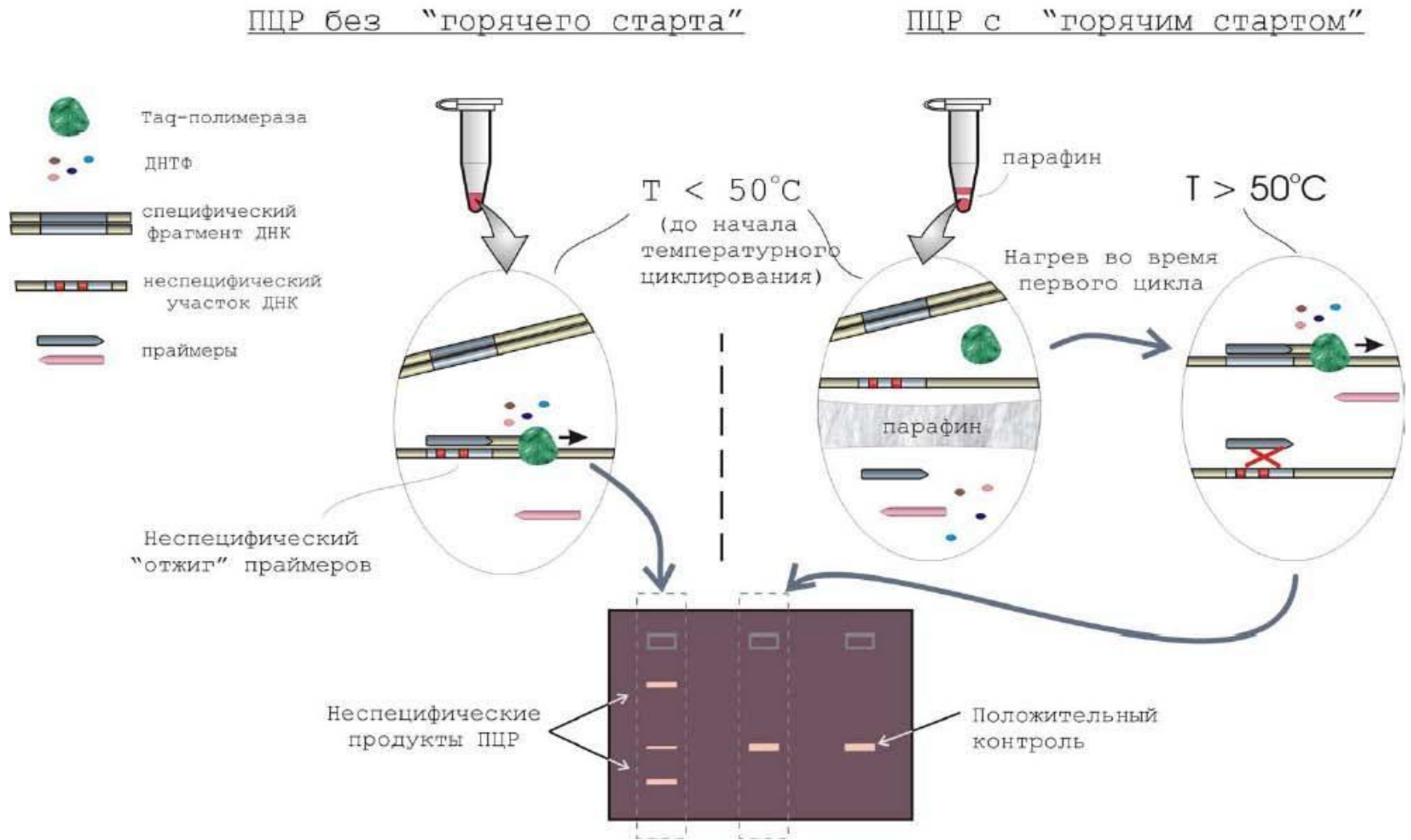
Добавление последовательностей нуклеотидов к копируемому фрагменту ДНК



Полимеразная цепная реакция

Специфичность ПЦР

«Горячий старт»



Полимеразная цепная реакция

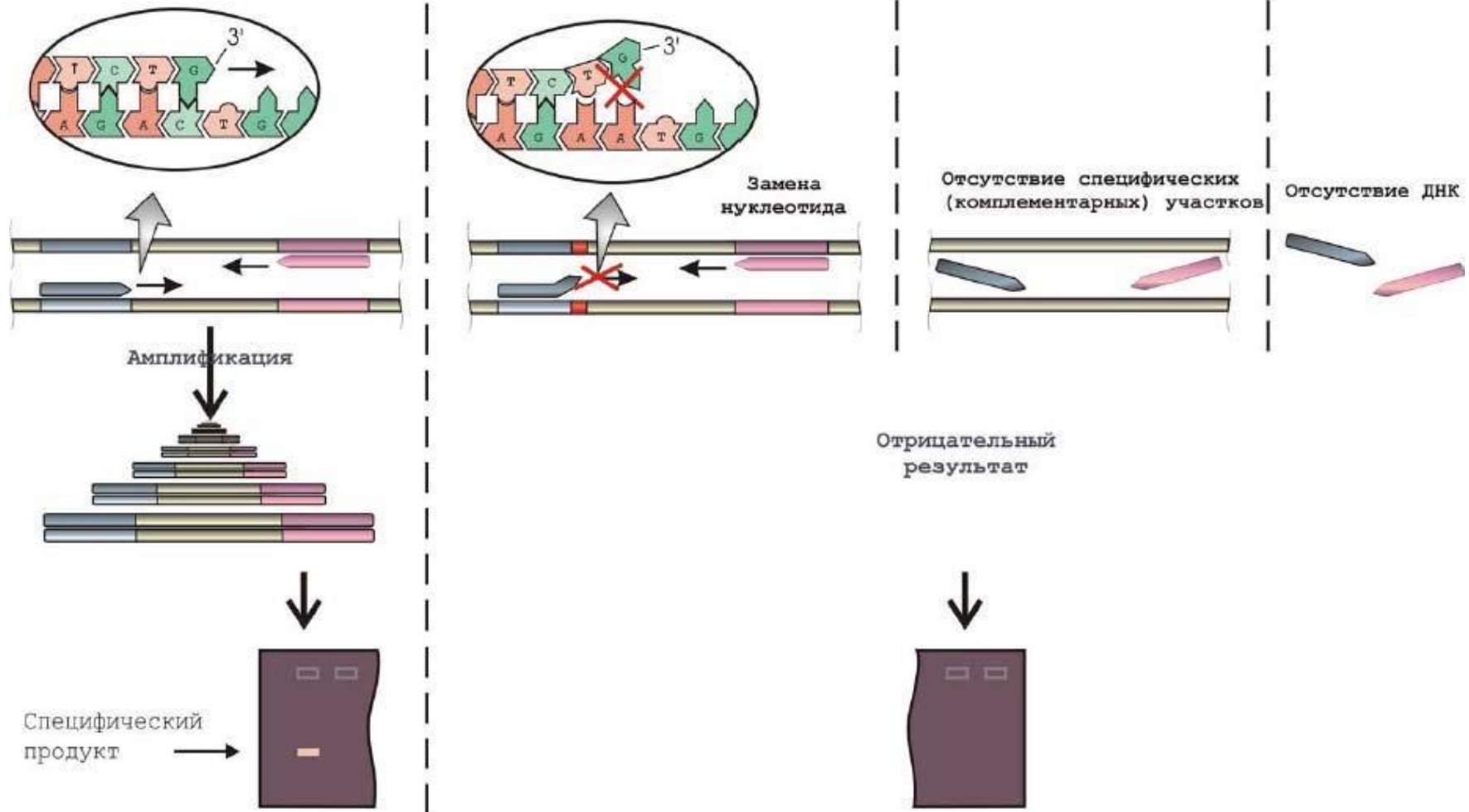
Специфичность ПЦР

«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.

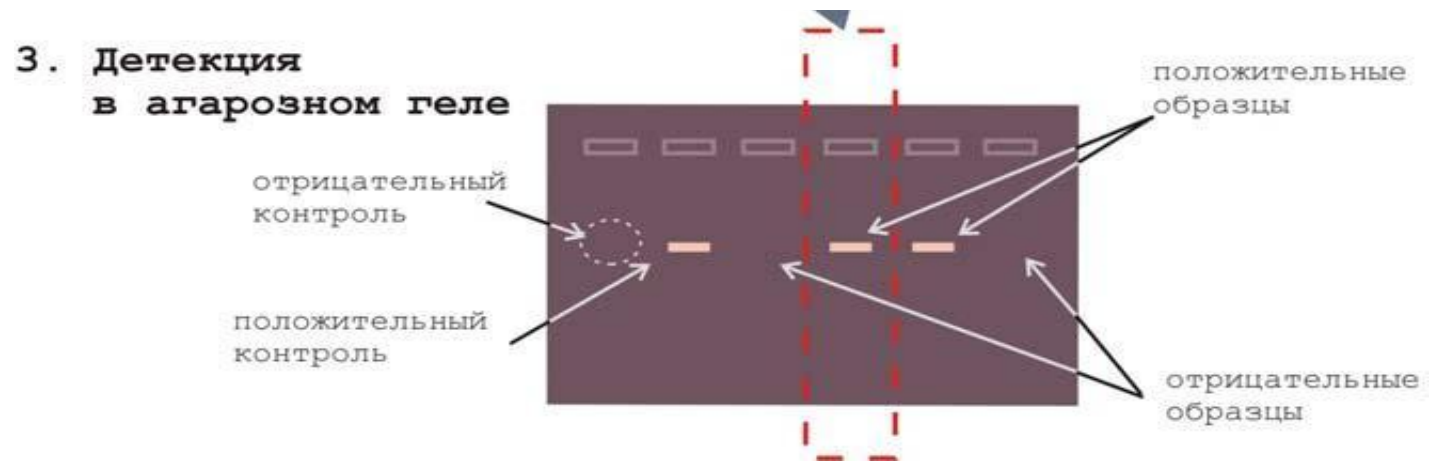
Полимеразная цепная реакция

Контроль за прохождением реакции ПЦР



Полимеразная цепная реакция

Контроль за прохождением реакции ПЦР



Отрицательный контроль

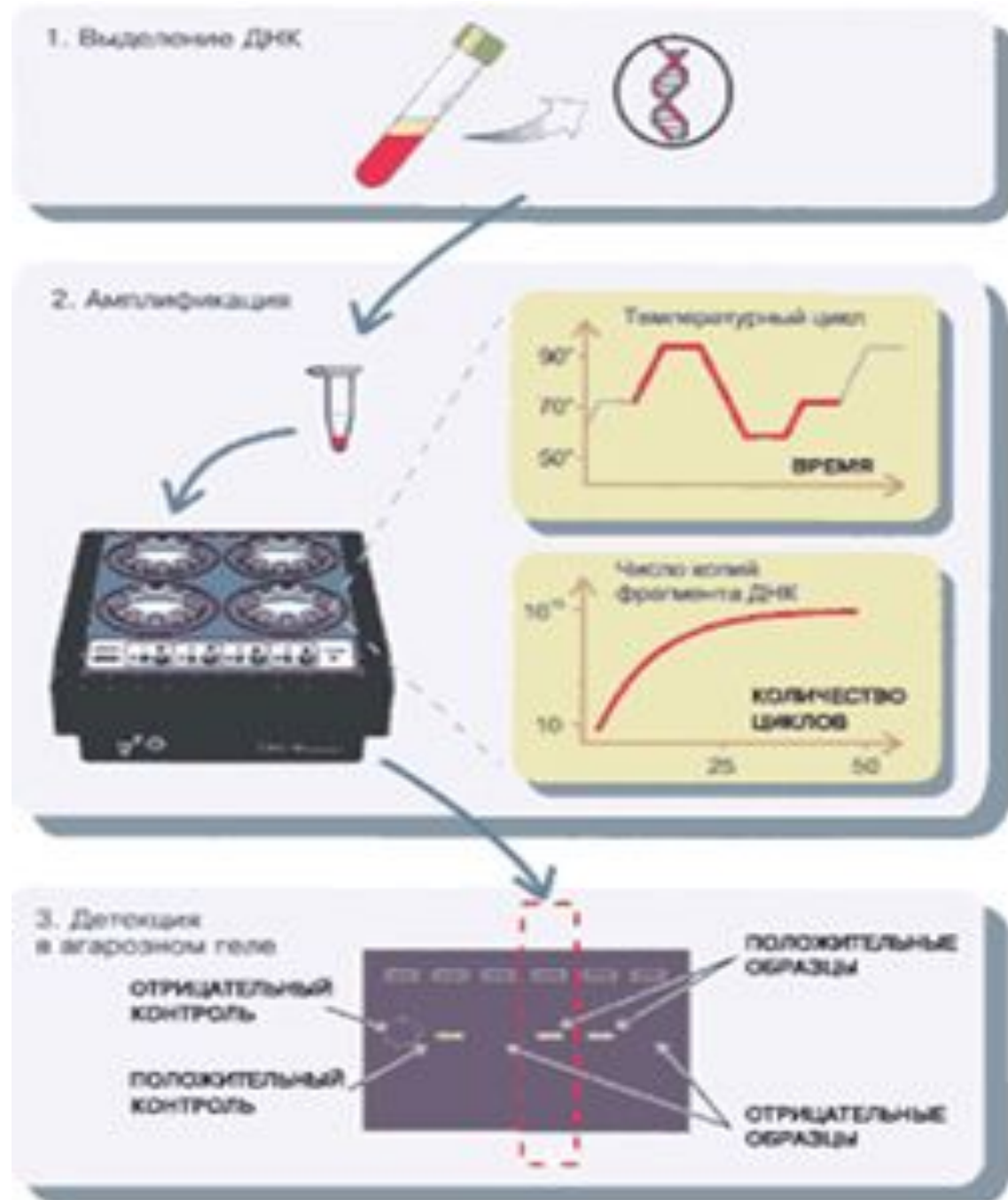
1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, dNTP)
4. Праймер 1 f (forward)
5. Праймер 2 r (reverse)
6. Деионизованная вода
7. ДНК-полимераза

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, содержащий копируемый фрагмент
7. ДНК-полимераза

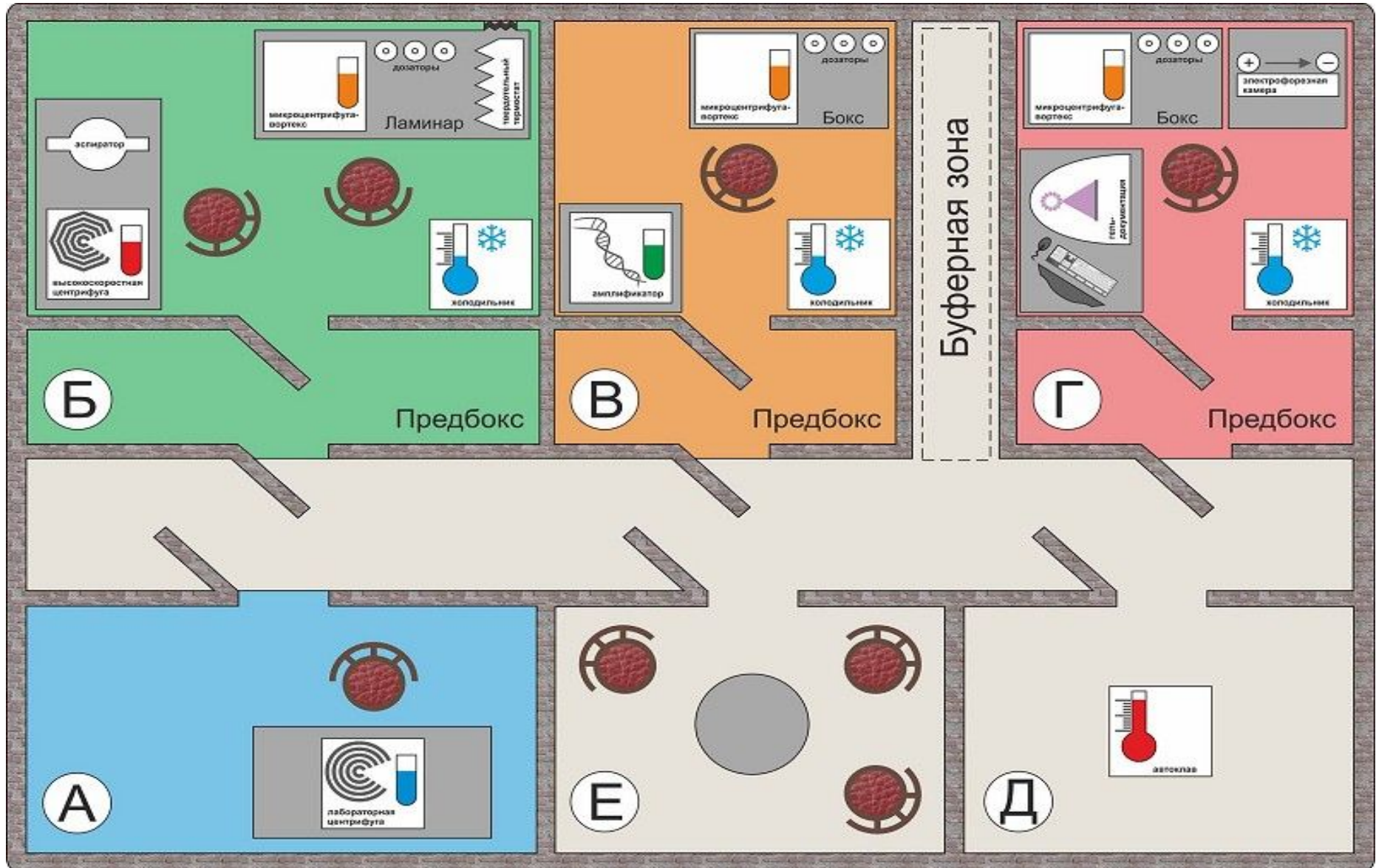
Полимеразная цепная реакция

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 Тaq-полимеразы фрагменты ДНК, как правило, содержат выступающий 3'-концевой нуклеотид (чаще всего — аденозин), нематрично присоединяемый ферментом. Это свойство Тaq-полимеразы используют для эффективного клонирования продуктов ПЦР в специально подготовленные лиnearизованные вектора с 3'-выступающим тимидином.

Полимеразная цепная реакция

Ферменты, используемые в ПЦР

Tth -полимераза была выделена из термофильной эубактерии *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 *Pyrococcus 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 *Pyrococcus 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).

Enzyme	Relative efficiency ^a	Error rate ^b	Processivity ^c	Extension rate ^d	3' to 5' exo	5' to 3' exo
<i>Taq</i> Pol	88	2×10^{-4}	55	75	no	yes
<i>Tli</i> Pol (Vent)	70	4×10^{-5}	7	67	yes	no
<i>Pfu</i> Pol	60	7×10^{-7}	n.d.	n.d.	yes	no
<i>rTth</i>	n.d.	n.d.	30	60	no	yes

^a Percent conversion of template to product per cycle.

^b Frequency of errors per base pairs incorporated.

^c Average number of nucleotides added before dissociation.

^d Average number of nucleotides added per second.

n.d. = not determined.

<http://www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Lecture12/Lecture12.html>

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).

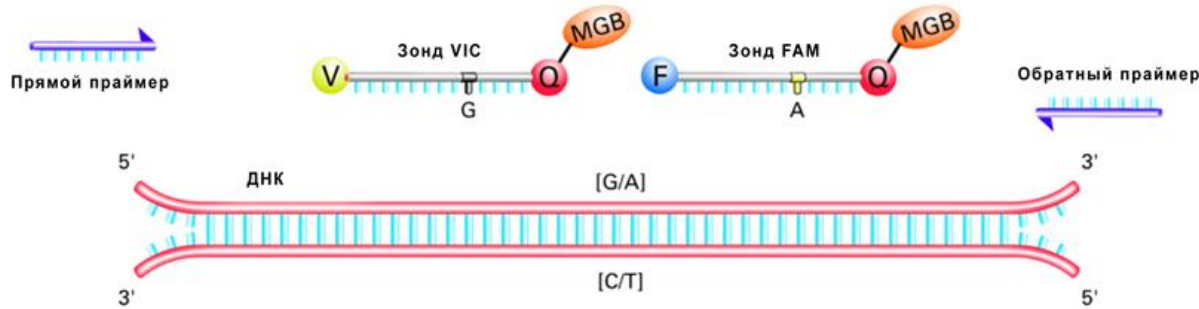
Ключевым элементом метода «FLASH» является использование гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и «темнового» гасителя. Зонды добавляют в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся 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.

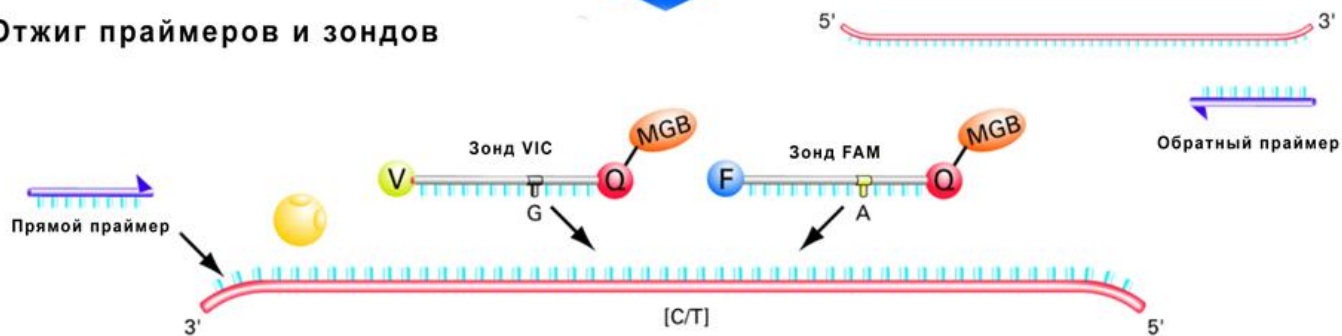
Полимеразная цепная реакция

FLASH – Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization

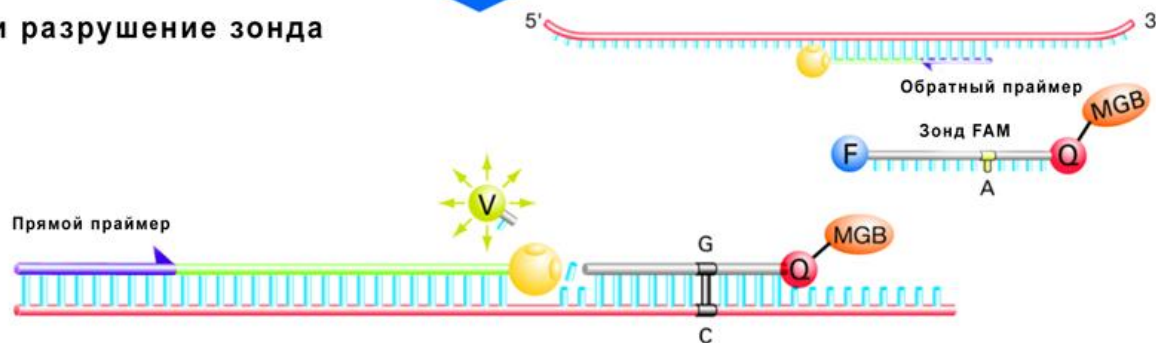
1. Компоненты реакции



2. Отжиг праймеров и зондов



3. Элонгация и разрушение зонда

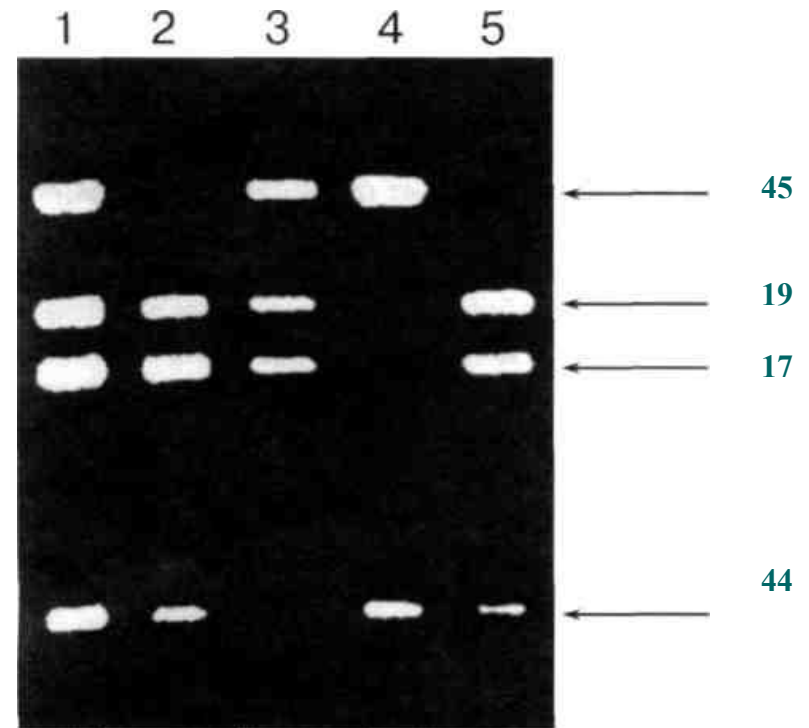


Обозначения

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

Полимеразная цепная реакция

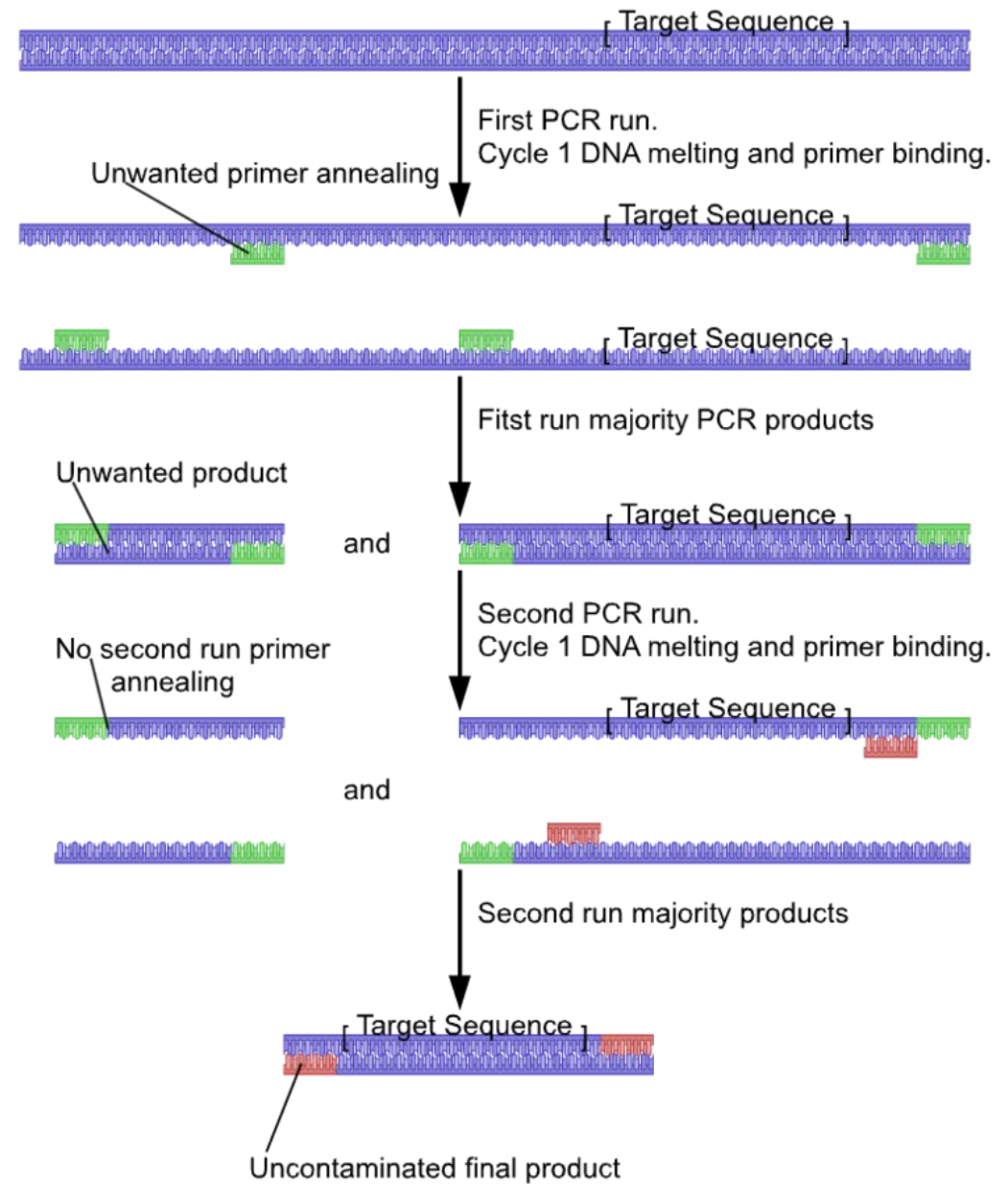
Multiplex-PCR (множественная ПЦР)



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

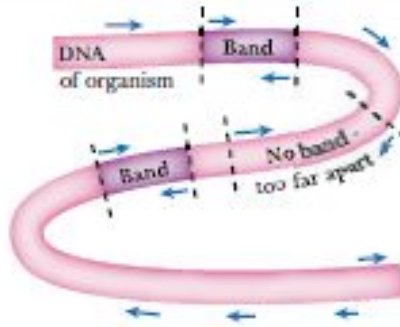
«Nested»-PCR (гнездная ПЦР)



Полимеразная цепная реакция

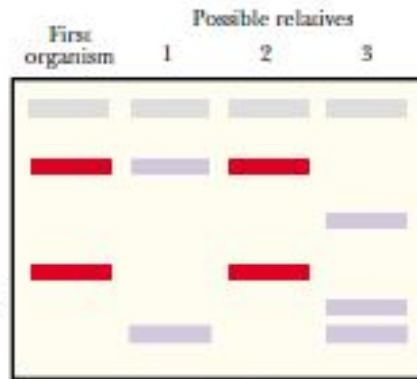
RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA - PCR)

PRIMER
SITES
FOR
RAPDs

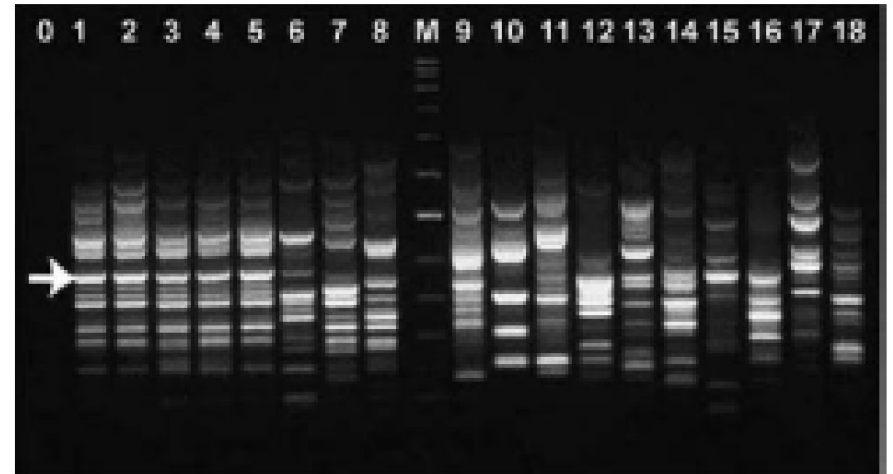


RUN PCR
SEPARATE ON AGAROSE GEL

AGAROSE
GEL
OF RAPDs
FROM
SEVERAL
ORGANISMS



2 is a correct match
1 and 3 not related

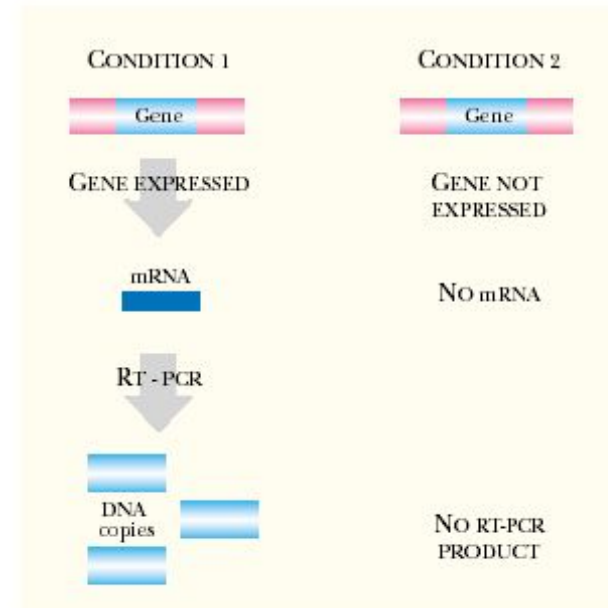
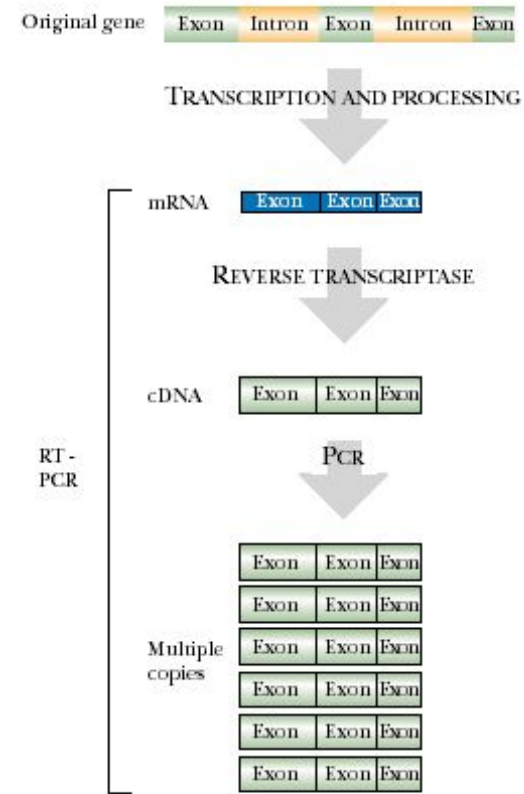


Identification of Fungal Pathogens by RAPD

Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

ПЦР, совмещенная с реакцией обратной транскрипции



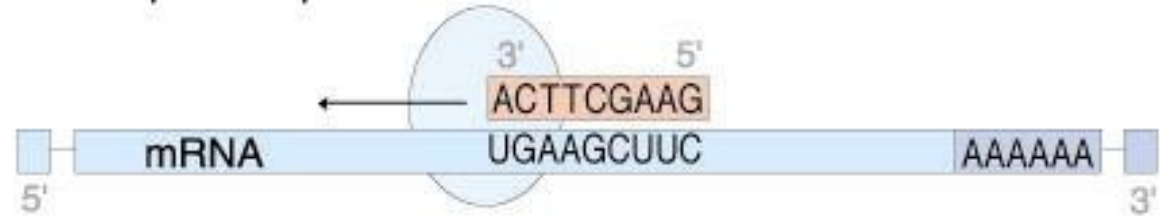
Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

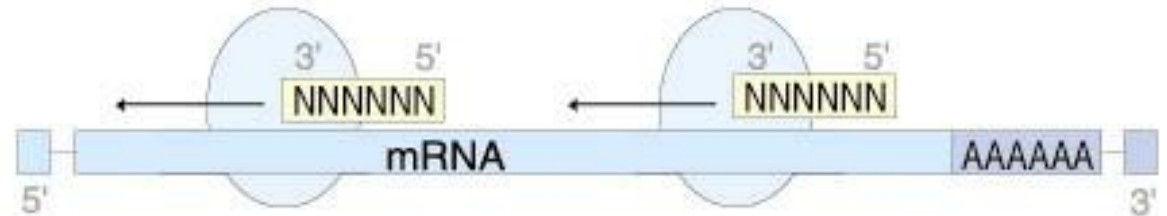
Праймеры для реакции обратной транскрипции

V dGTP, dATP or dCTP
N any base

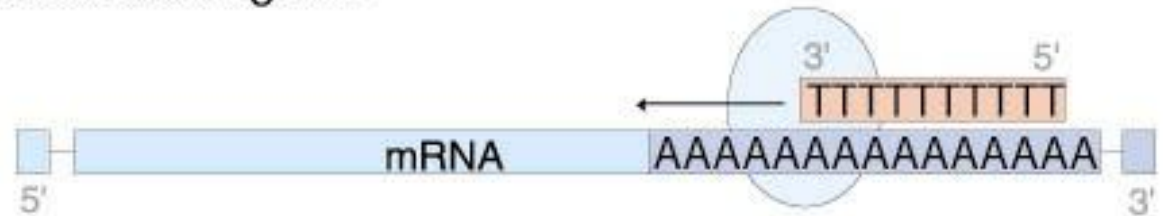
Gene-specific primer



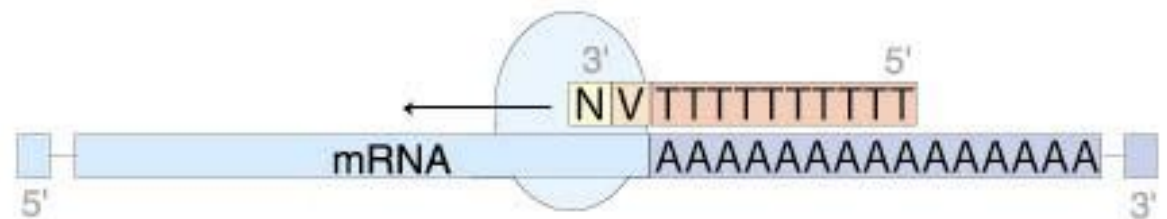
Random primers



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.

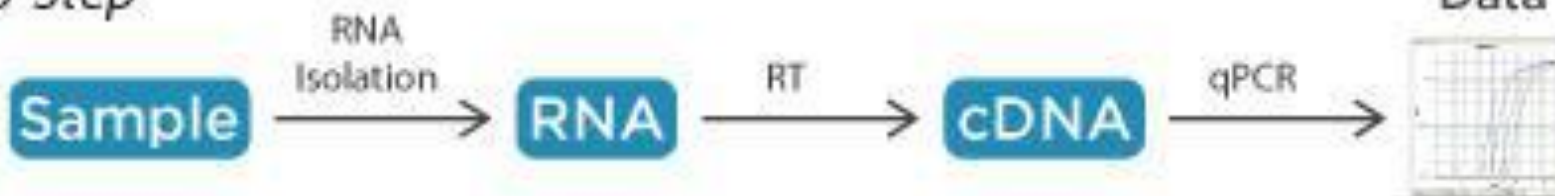
Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

One-Step



Two-Step

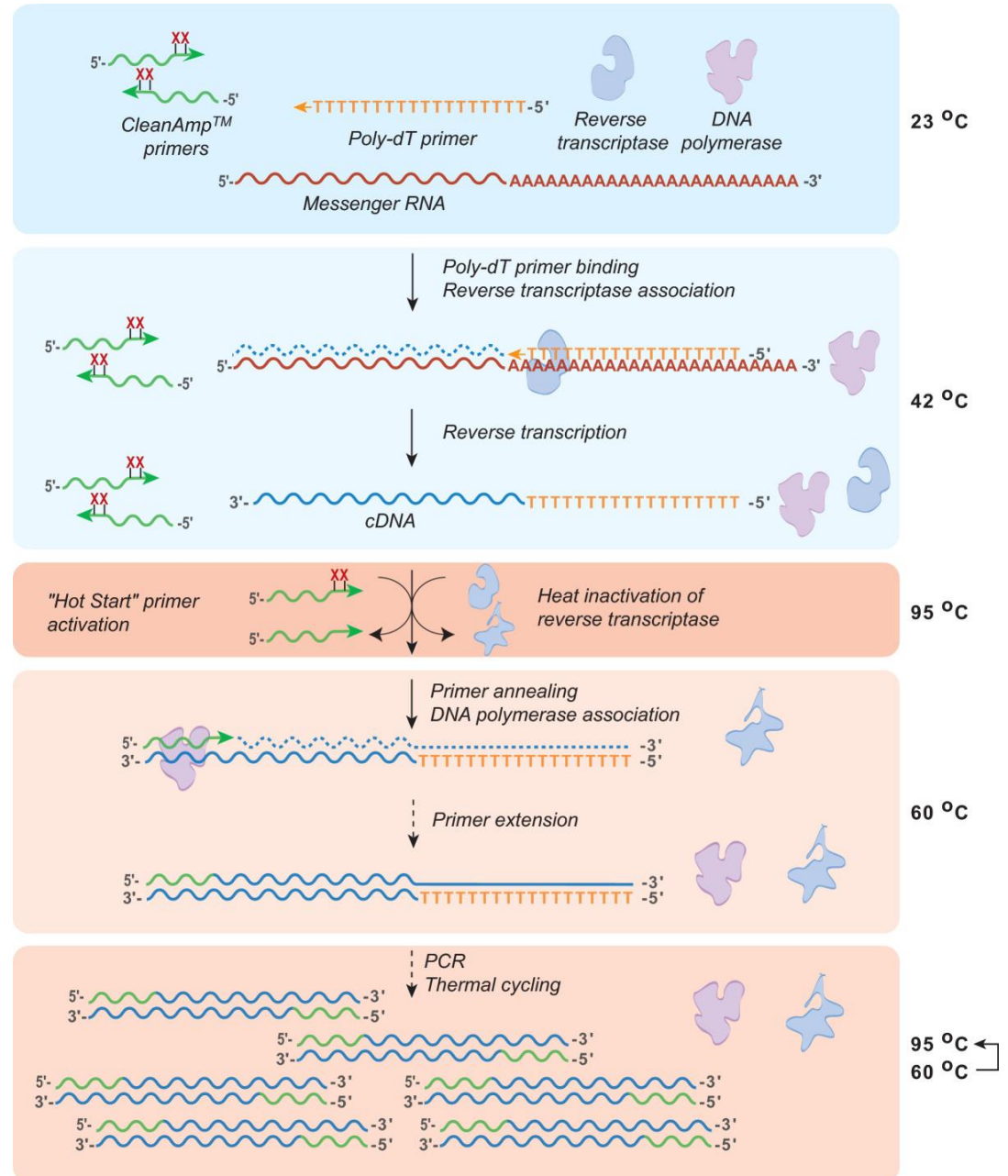


<http://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2011/09/12/one-step-two-step>

Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

One step RT-PCR



Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

Primers used in RT

Two-Step Protocol

- Oligo(dT) primers
- Random hexamers
- Gene-specific primers
- A mix of these

One-Step Protocol

- Gene-specific primers

Advantages

- Choice of primers
- Optimize reactions for maximum yield
- Modulate amount of RT that goes into PCR—controlling for target abundance
- Perform multiple PCR reactions on the same cDNA sample
- Adjust for challenging PCR (e.g., GC-rich sequences)
- Experiment with different RT and Taq enzymes

- Quick setup and limited handling
- Easy processing of multiple samples for repetitive tests, or high-throughput screening
- Fewer pipetting steps, reducing potential errors
- Eliminates possibility of contamination between the RT and qPCR steps

Considerations

- Requires more setup, hands-on, and machine time
- Additional pipetting increases the chances for experimental errors and contamination
- Uses more reagents

- Must “start over,” or save RNA aliquot and perform new RT to analyze new target or repeat amplifications
- Reaction conditions are not optimal—efficiency & thus quantification are affected
- Primer dimers a bigger potential problem

Best for:

- amplifying multiple targets from a single RNA source
- when you plan to reuse cDNA for additional amplifications

- working with multiple RNA samples to amplify only a few targets
- assays performed repeatedly

Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

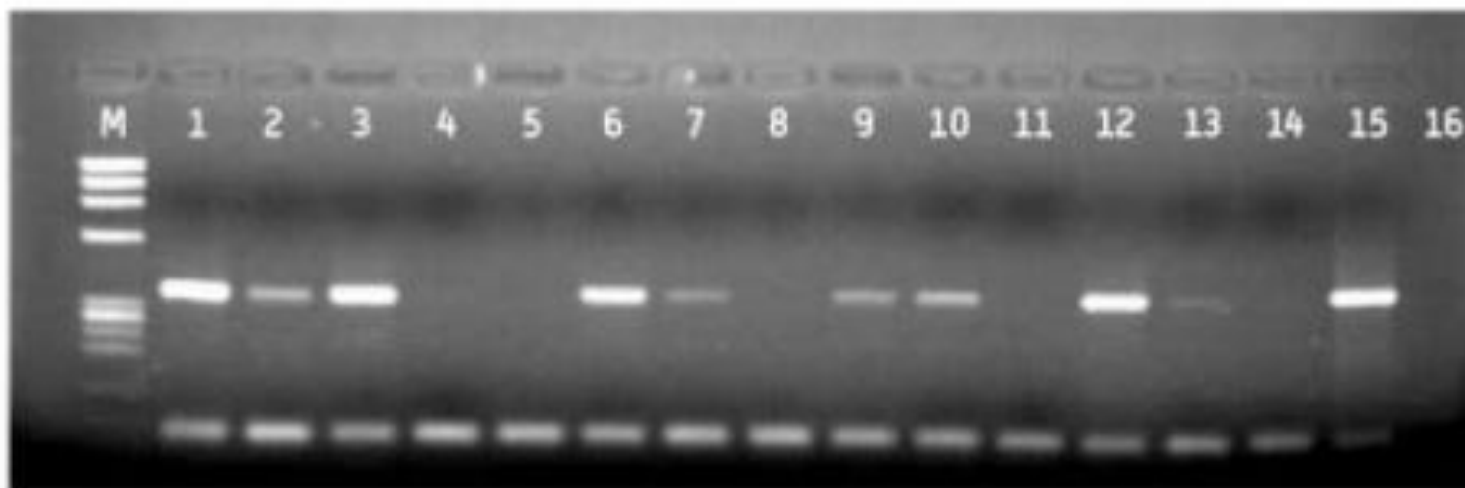
Choose the 1-Step Kit, if you...	Choose the 2-Step Kit, if you...
<ul style="list-style-type: none">▪ Do not store cDNA	<ul style="list-style-type: none">▪ Need to store cDNA
<ul style="list-style-type: none">▪ Dispose samples after one or few uses	<ul style="list-style-type: none">▪ Have limited sample quantity
<ul style="list-style-type: none">▪ Have many samples with one or few targets	<ul style="list-style-type: none">▪ Have many targets per sample
<ul style="list-style-type: none">▪ Use liquid handling robotics	<ul style="list-style-type: none">▪ Require maximum performance of both RT and PCR steps
<ul style="list-style-type: none">▪ Choose to reduce chance of cross contamination during procedure	
<ul style="list-style-type: none">▪ Need to reduce time to results	

Полимеразная цепная реакция

RT-PCR (ОТ-ПЦР)

Детекция РНК-содержащих вирусов

RT-PCR for detection of A(H5N1) avian influenza virus in simulated samples sent from INSTAND (Germany) for international quality control at the National Laboratory of Influenza, Bulgaria, 2006



Legend: Subtyping of influenza viruses and RSV by one-step RT-PCR. Lanes 1 to 15 are simulated samples. Lanes 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13 are positive for A(H5); lane 15 is A(H5) positive control (Sacace kit); lanes 4, 5, 8, 11, 14, 16 are negative for A(H5); lane M (ΦX DNA) molecular size marker.

Each band is 365 bp.

http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V13N30/H5N1_Bulgaria_Figure1.jpg

Полимеразная цепная реакция

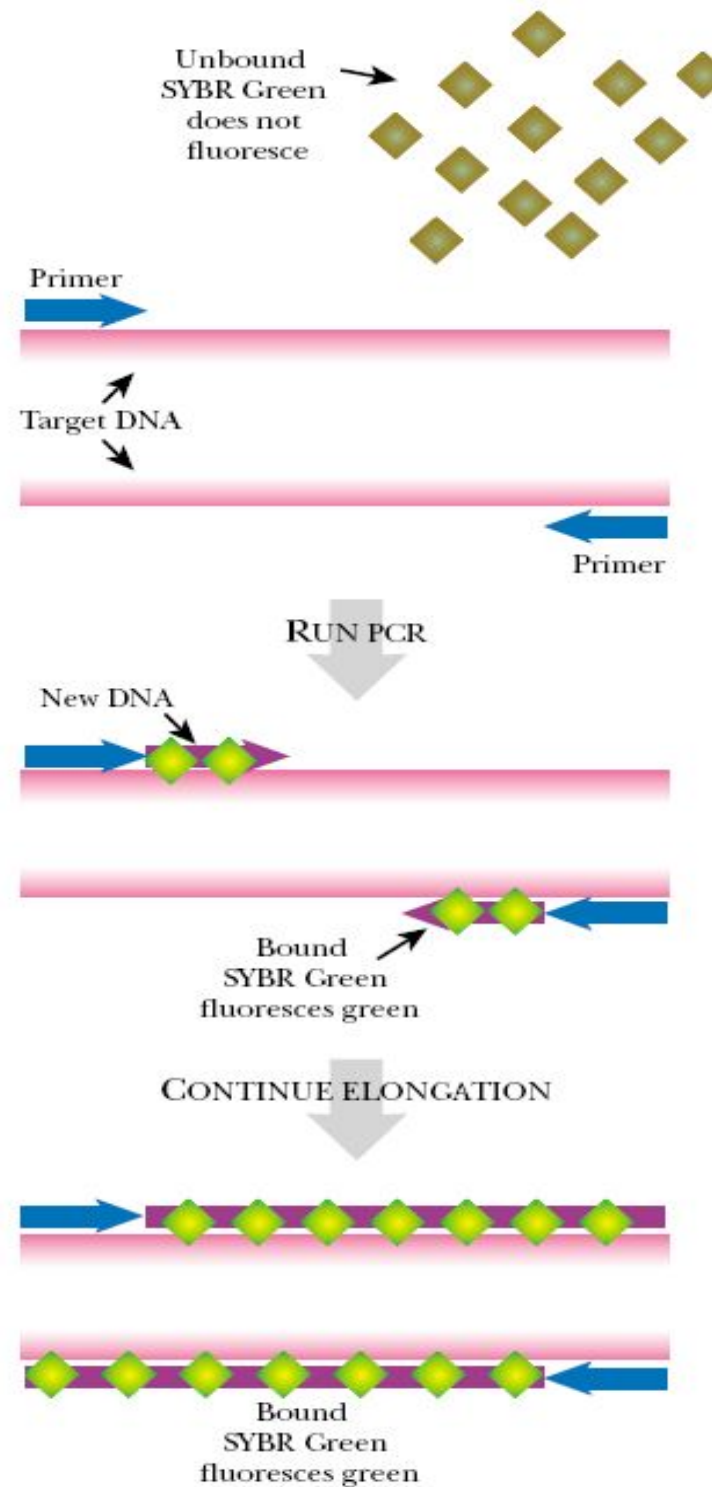
ПЦР в режиме реального времени

неспецифические системы детекции

интеркалирующие красители:

SYBR Green I

SYBR Gold



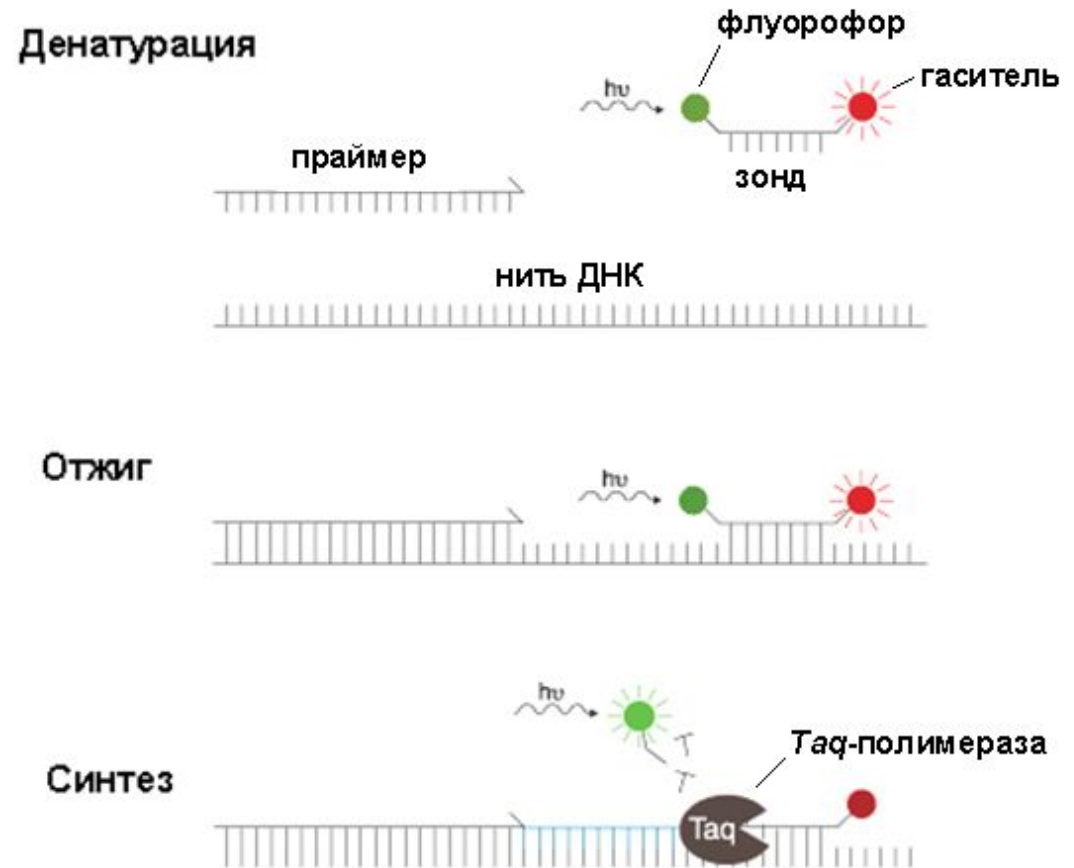
Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме
реального времени

специфические
системы детекции

линейные разрушаемые
зонды (пробы)

TaqMan



Праймеры и линейные разрушаемые зонды (пробы) TaqMan

Критерии подбора

праймеров	зондов
▪ GC состав: 20-80%	▪ GC состав: 20-80%
▪ Температура плавления 58-60°C	▪ Температура плавления 68-70°C
▪ Температура плавления праймеров, работающих в паре, не должна отличаться более, чем на 2°C	▪ Температура плавления зонда должна быть на 5-10°C выше температуры плавления праймеров
▪ Четыре 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны самому праймеру, праймеру в паре или зонду	▪ На 5'-конце не должно быть G
▪ Длина 20-30 нуклеотидов	▪ Расстояние между флуорофором и гасителем не должно быть менее 5-6 нуклеотидов
▪ Длина ПЦР-продукта 50-200 нуклеотидов	▪ Спектр поглощения гасителя должен перекрываться со спектром излучения флуорофора

Выбор флуорофора и гасителя

<u>Флуорофор</u>	$\lambda_{\text{макс' поглощения, нм}}$	$\lambda_{\text{макс' флуоресценции, нм}}$
FAM	490	520
R6G	520	550
HEX	530	556
TAMRA	550	580
ROX	580	610
Cy5	645	670
Cy5.5 ^{new}	680	705

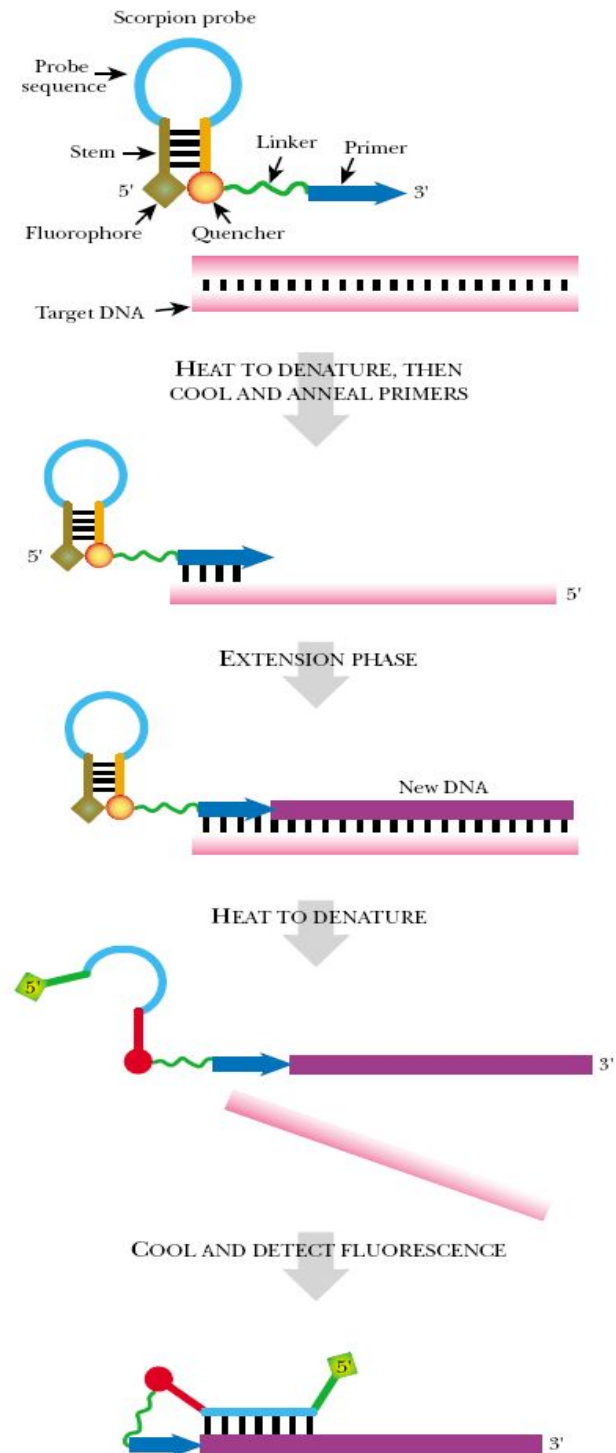
<u>Гаситель</u>	$\lambda_{\text{макс' поглощения, нм}}$	$\lambda_{\text{макс' флуоресценции, нм}}$
RTQ-1 ^{new}	520	470-570
BHQ-1	535	480-580
BHQ-2	575	550-650
RTQ-2 ^{new}	625	580-670
BHQ-3	670	620-730

Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени

специфические системы детекции

праймеры- «скорпионы»

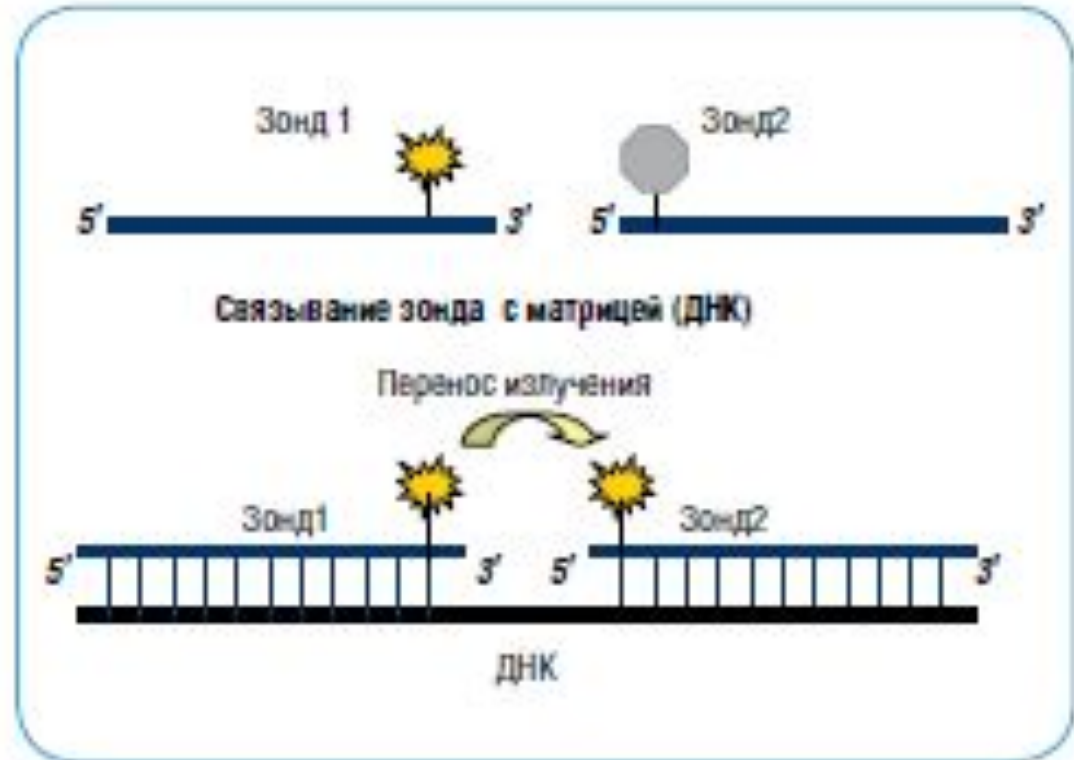


Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени специфические системы детекции

FRET-PCR

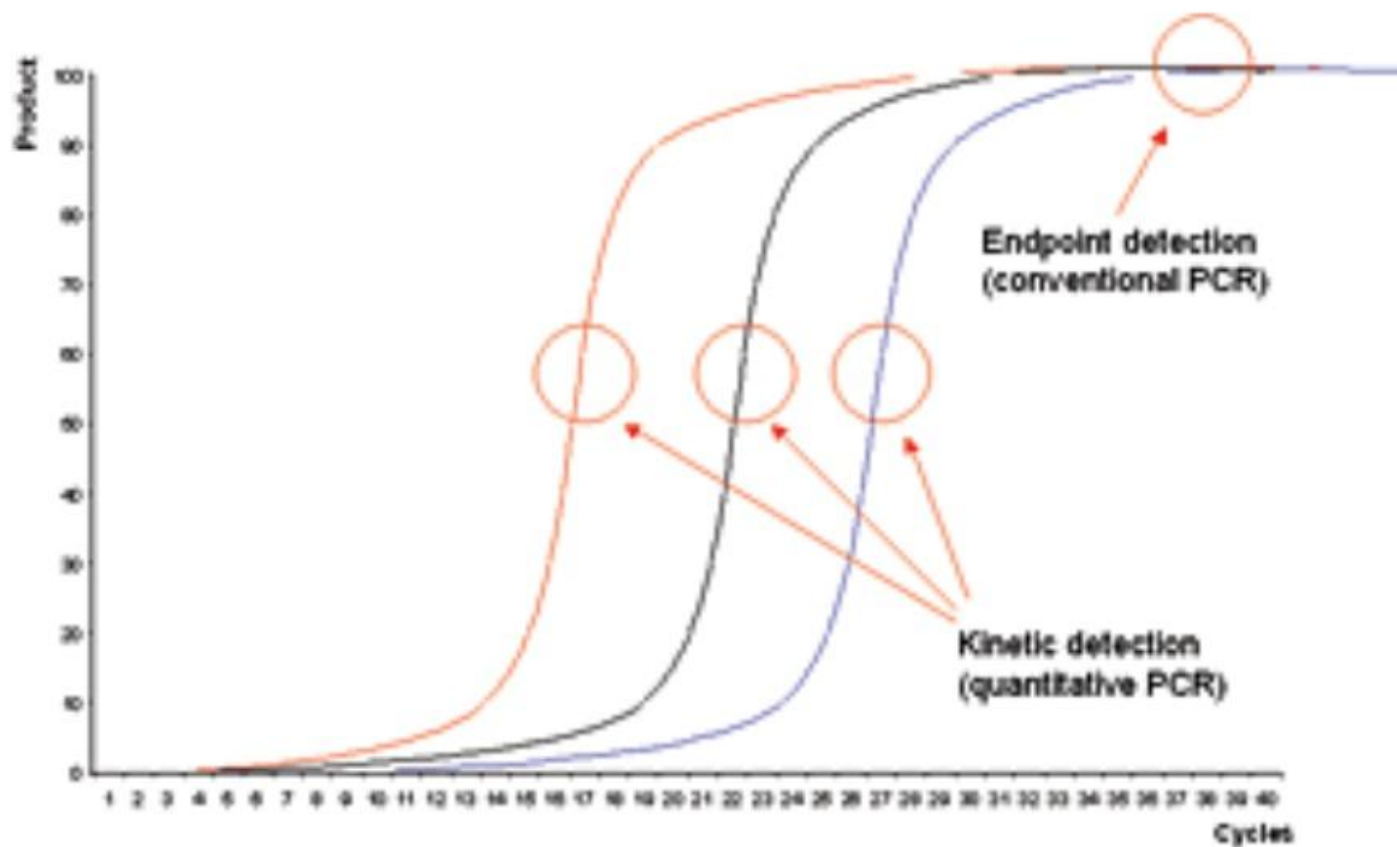
Применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии – данный способ детекции отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося 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).



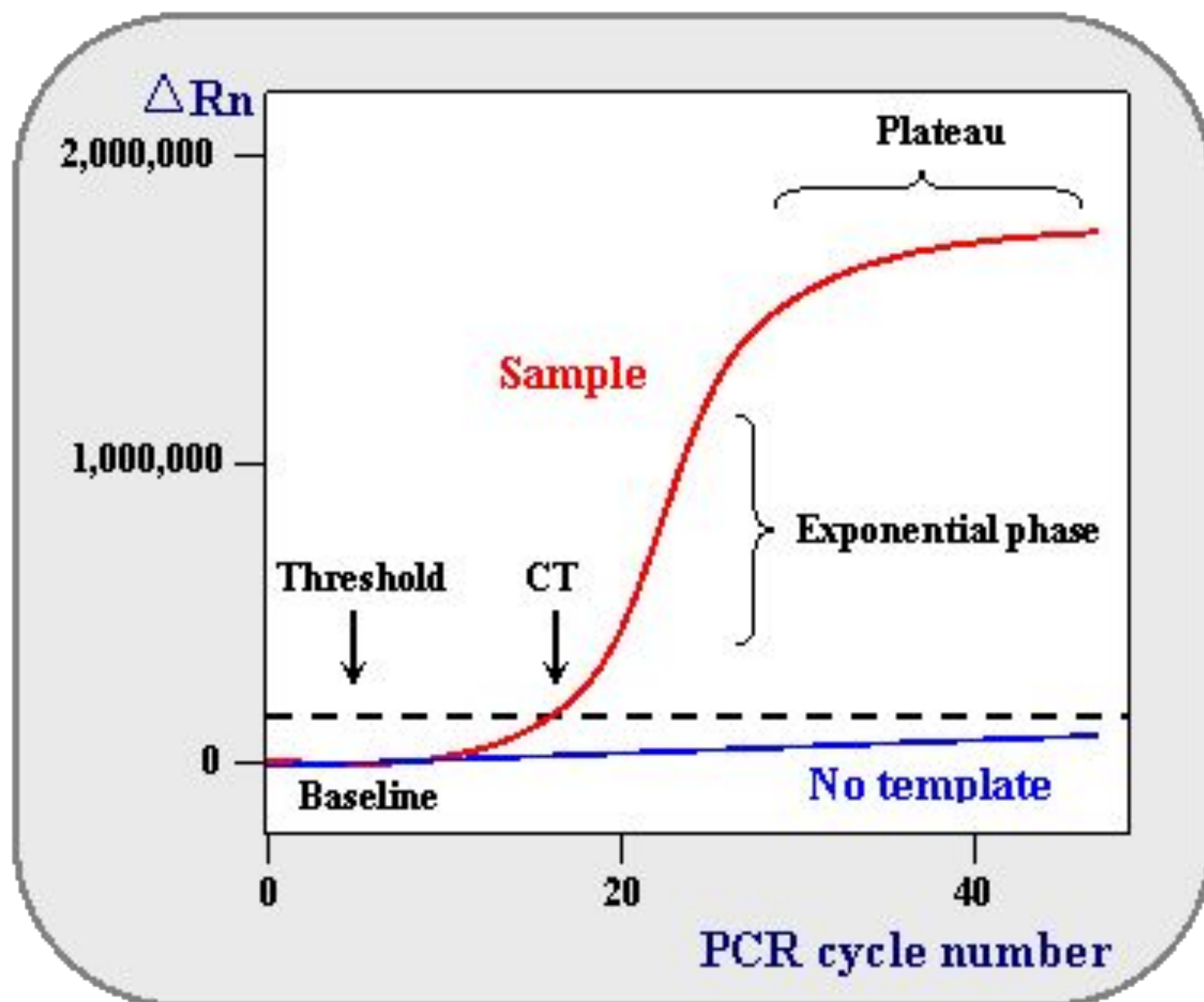
Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме
реального времени

системы детекции



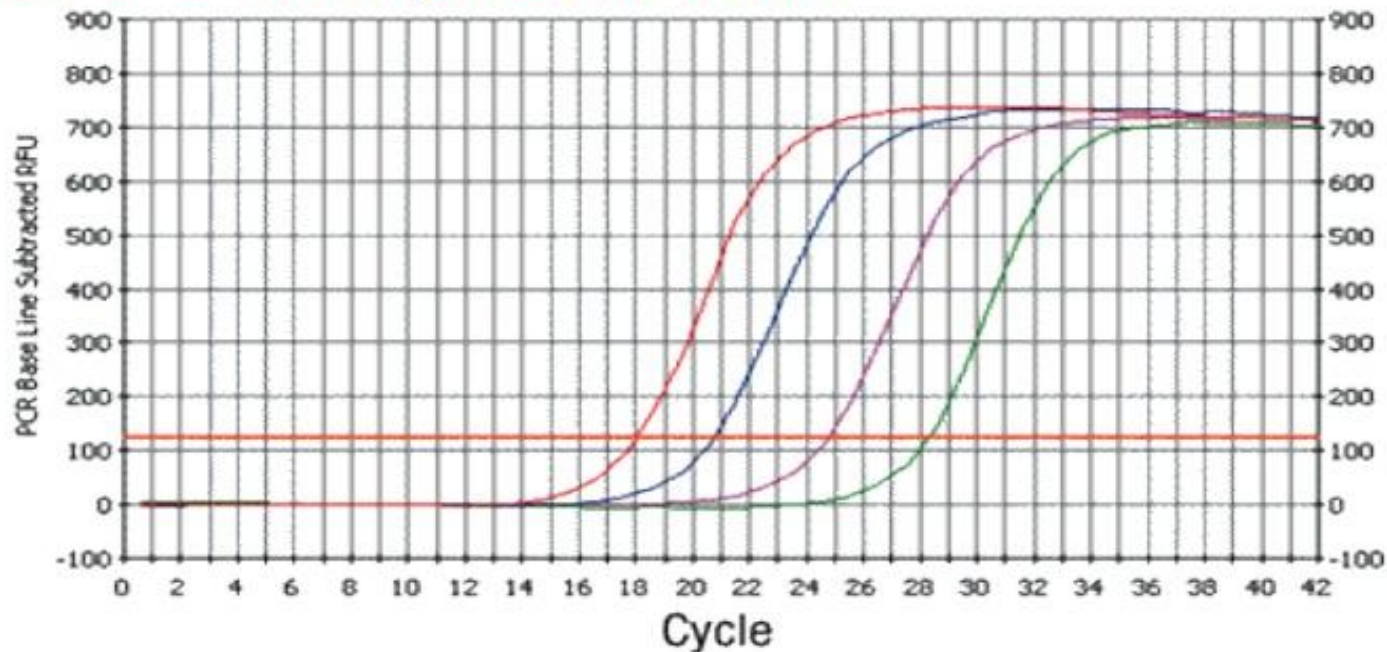
Model of real time quantitative PCR plot



Полимеразная цепная реакция

ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение



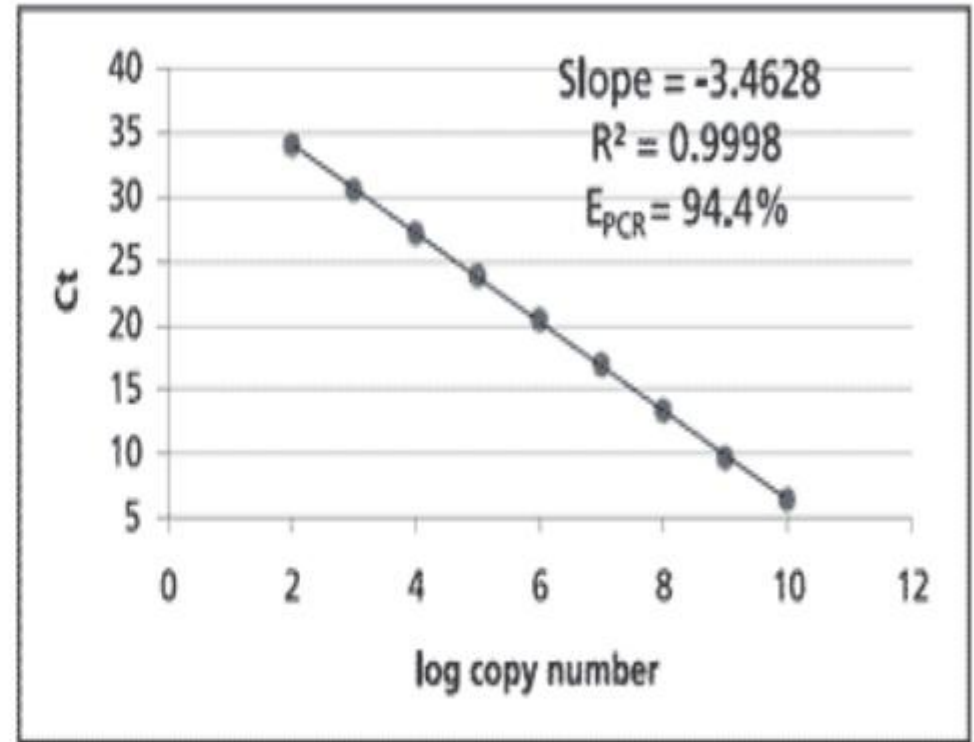
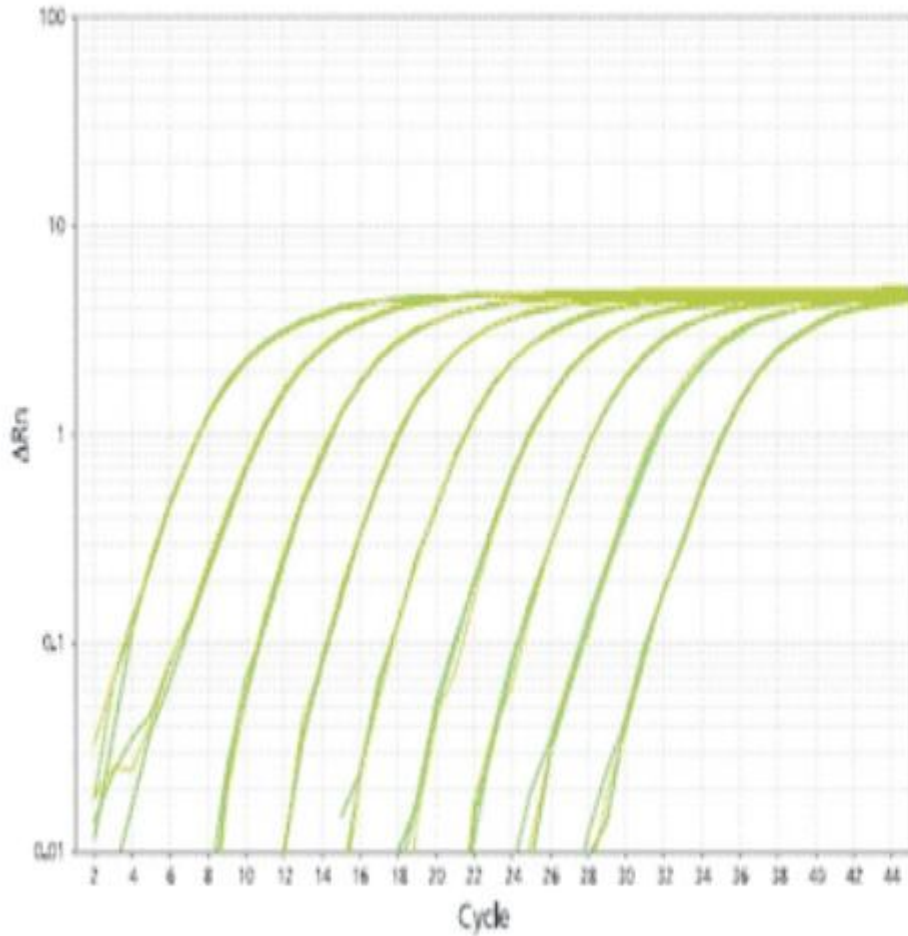
Red=10,000 cells
Blue=1,000 cells
Pink=100 cells
Green=10 cells

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

Полимеразная цепная реакция

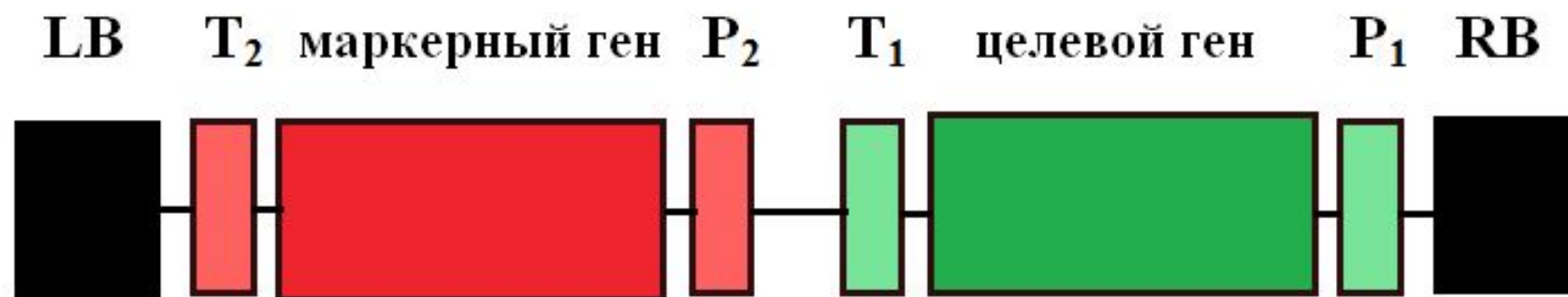
ПЦР в режиме реального времени

Количественное определение



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

Структура генетической конструкции, встраиваемой в геном растений



LB – левая граница T-ДНК

RB – правая граница T-ДНК

P₁ – промотор целевого гена

T₁ – терминатор целевого гена

P₂ – промотор маркерного гена

T₂ – терминатор маркерного гена

Структура праймеров и зонда для выявления фрагмента промотора 35S CaMV

1 TGATGTGATA TCTCCACTGA CGTAAGGGAT GACGCACAAT CCCACTATCC TTCGCAAGAC
 АСТАСАСТАТ АГАГГТГАСТ ГСАТТСССТА СТГСГТГТТА ГГГТГАТАГГ ААГСГТТСТГ

61 CCTTCCTCTA TATAAGGAAG TTCATTTTCAT TTGGAGAGAA CACGCTGAAA TCACCAGTCT
 GGAAGGAGAT ATATTCCTTA AAGTAAAGTA AACCTCTCTT GTGCGACTTT AGTGGTCAGA

121 CTCTCTACAА АТСТАТСТСТ СТСТАТААТА АТГТГТГАГТ АГТТСССАГА ТААГГГААТТ
 ГАГАГАТГТТ ТАГАТАГАГА ГАГАТАТТАТ ТАСАСАСТСА ТСААГГГТСТ АТТСССТАА

Праймер 35Sf - CCACTGACGTAAGGGATGAC, длина 20 н., Tm – 64,2 °C

Праймер 53Sr – CTCTSSAAATGAAATGAACTTCC, длина 23 н. Tm – 63,1 °C

Зонд – FAM- CAATSSCACTATCCTTCGCAAGACCC-BHQ1, длина – 26 н., Tm – 70,5 °C

Структуру и термодинамические свойства олигонуклеотидов оценивали с помощью программы Real Time Design на сайте <http://www.biosearchtech.com/>.

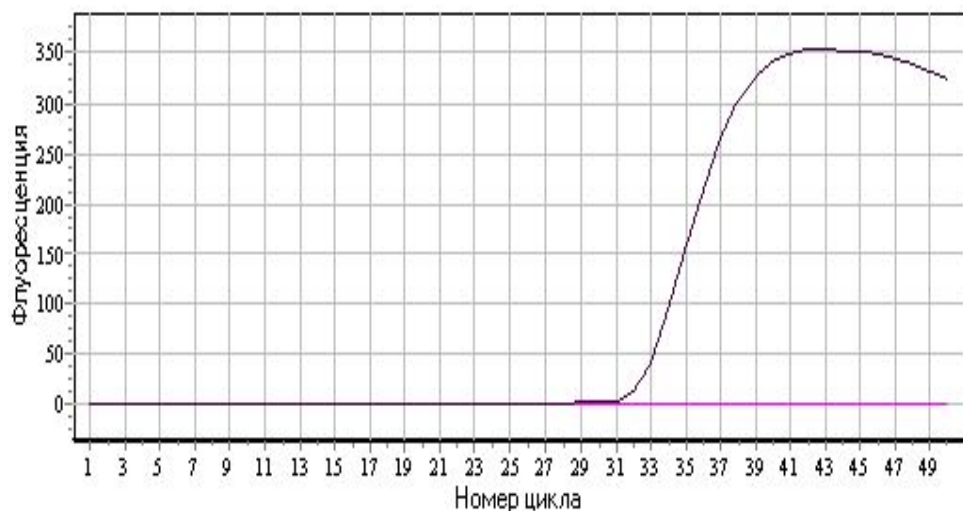


Режим ПЦР

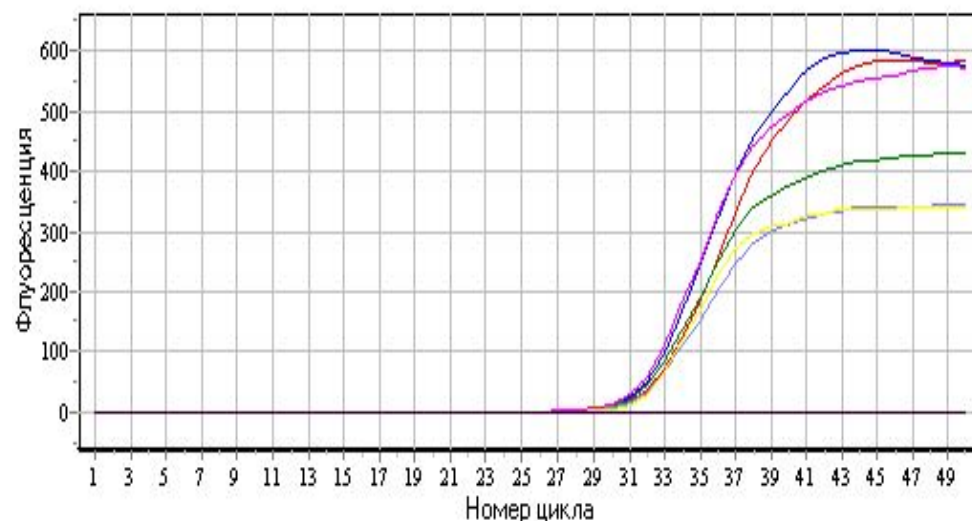
Температура	Время	Количество циклов
80,0°C	30 секунд,	1цикл
94°C	90 секунд	
94°C	30 секунд	5 циклов
64°C *	15 секунд	
94°C	10 секунд	45 циклов
64°C*	15 секунд	
10 °C	Хранение	

* - регистрация результатов

Изменение флуоресценции в реакционной смеси в ходе полимеразной цепной реакции



Флуоресценция красителя **FAM**,
связанного с зондом на **целевой**
фрагмент ДНК



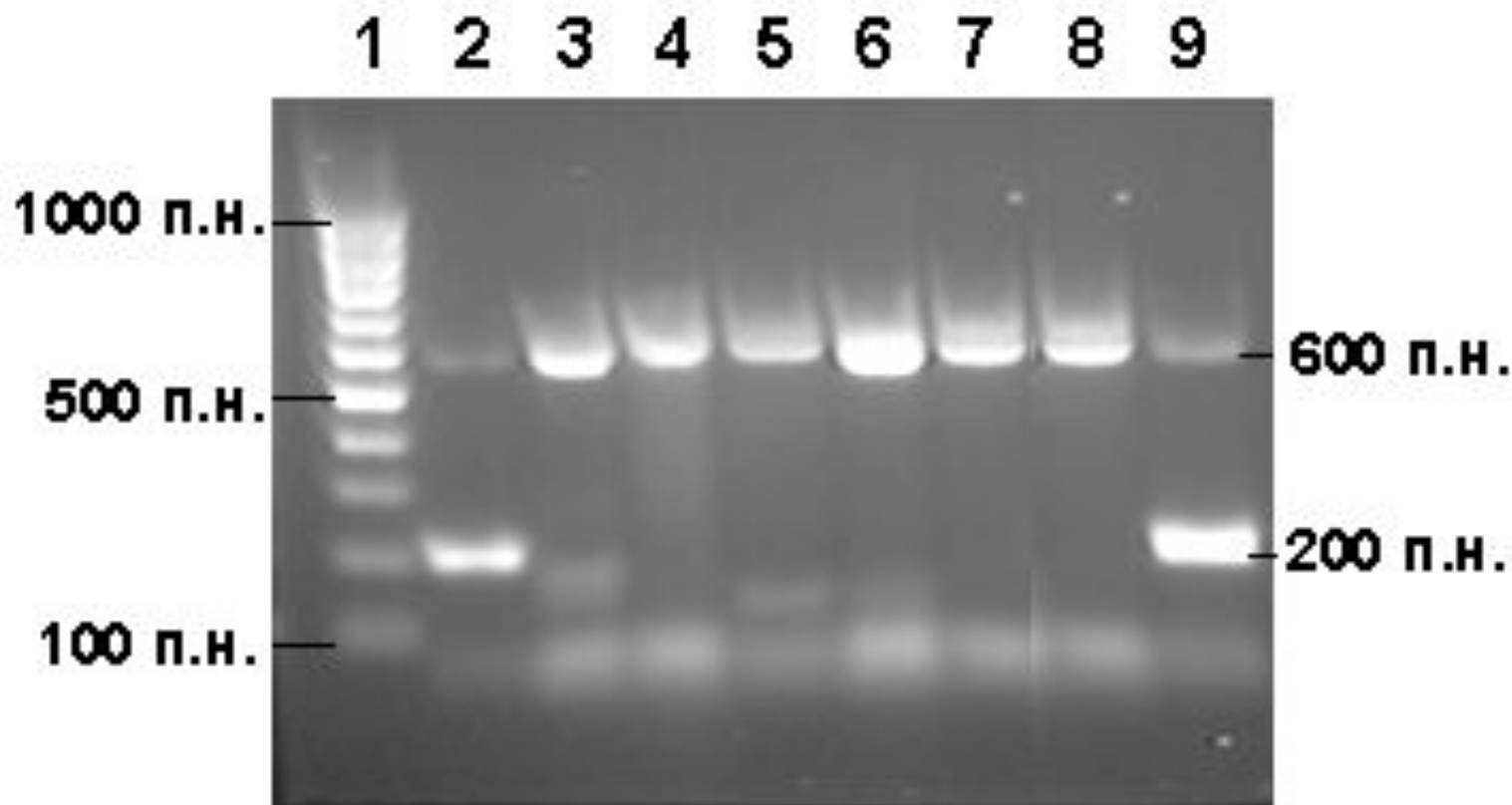
Флуоресценция красителя **HEX**,
связанного с зондом на
референсный фрагмент ДНК
(**внутренний контроль**)



Протокол реакции

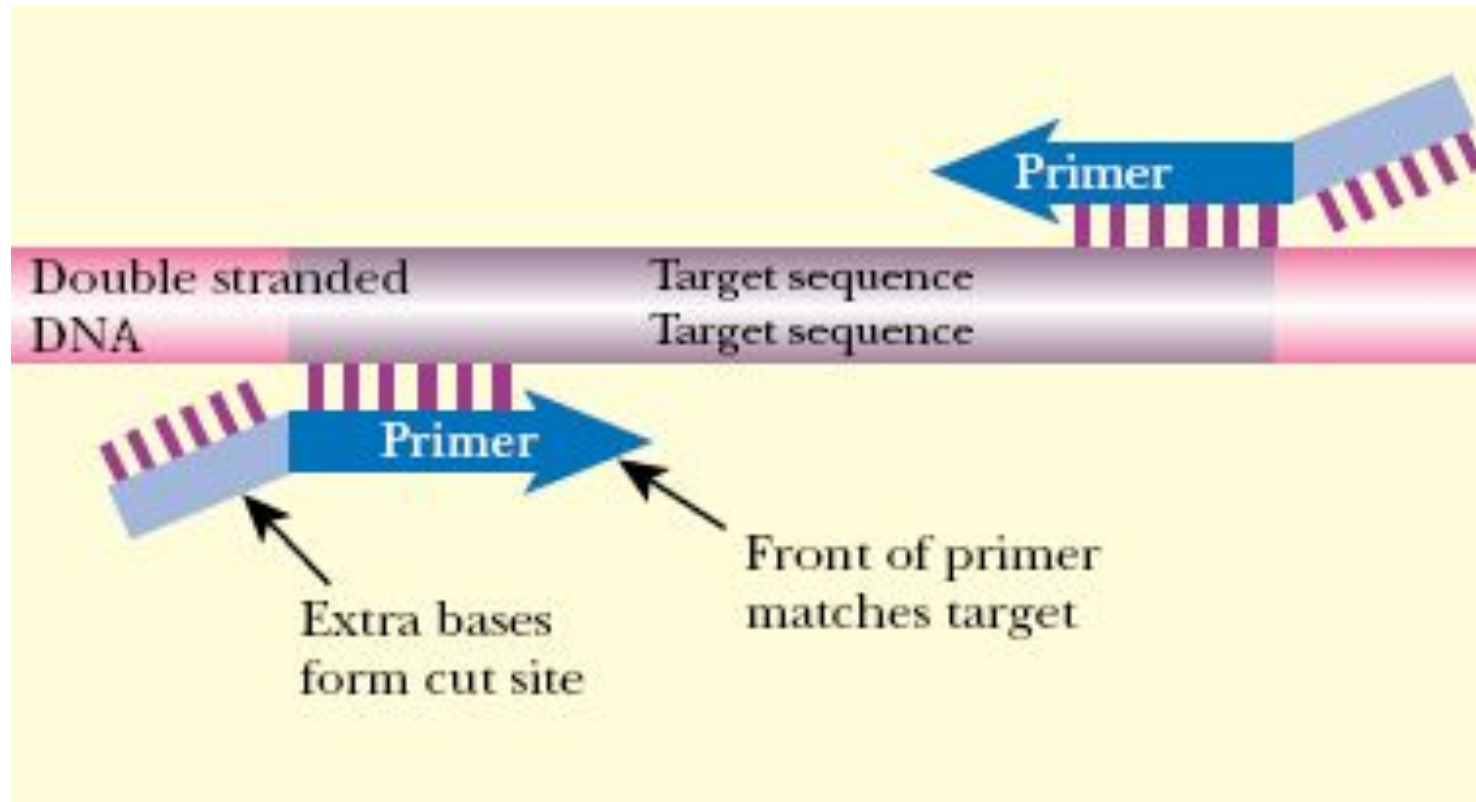
Образец №	Препарат ДНК выделен из:	Ср_Фам		Ср_Нех	
1	Колбаса вареная «Для завтрака», ООО Абсолют»		-	33,8	+
2	Паштет мясной «Домашний», Кировский мясокомбинат		-	33,3	+
3	Тушенка из говядины «Смоленская», ЗАО «Йошкаротинский мясокомбинат»		-	33,0	+
4	Рисовая бумага «Сэн Сой - Премиум», «Хиеп Лонг Ко»		-	33,1	+
5	Кукуруза консервированная сладкая в зернах «Наш хуторок», ООО «Бондюэль-Кубань»		-	33,1	+
6	Смесь овощная «Шампиньон де Пари», «4 сезона»		-	33,0	+
7	Кукуруза низкокалорийная суперхрустящая «Зеленый великан», Серетрам	33,8	+	34,0	+
8	Хлеб из кукурузной муки, «РусьБейкери»	30,5	+	32,3	+
9	Пюре картофельное со вкусом говядины, ООО «Сантус ЛТД»	32,1	+	34,0	+
К+	Примечание: Ср – номер порогового цикла	32,3	+	33,3	+
К-			-	32,5	+

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



Подбор вырожденных праймеров

Partial sequence of polypeptide:

Met--Tyr--Cys--Asn--Thr--Arg--Pro--Gly

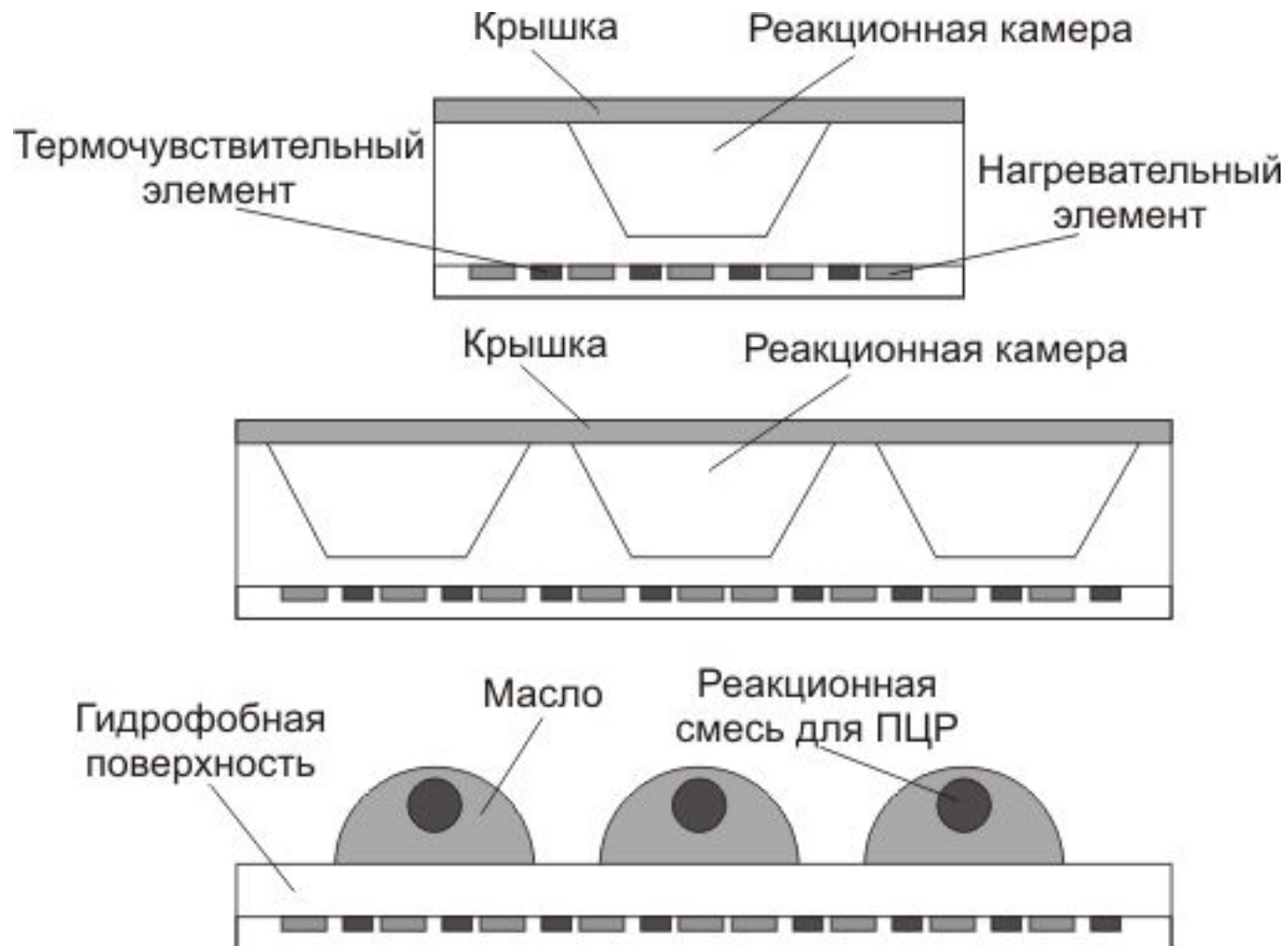
Possible codons in DNA:

ATG	TAC	TGT	AAT	ACT	AGA	GCT	GGT
	TAT	TGC	AAC	ACC	AGG	GCC	GGC
				ACA		GCA	GGA
				ACG		GCG	GGG

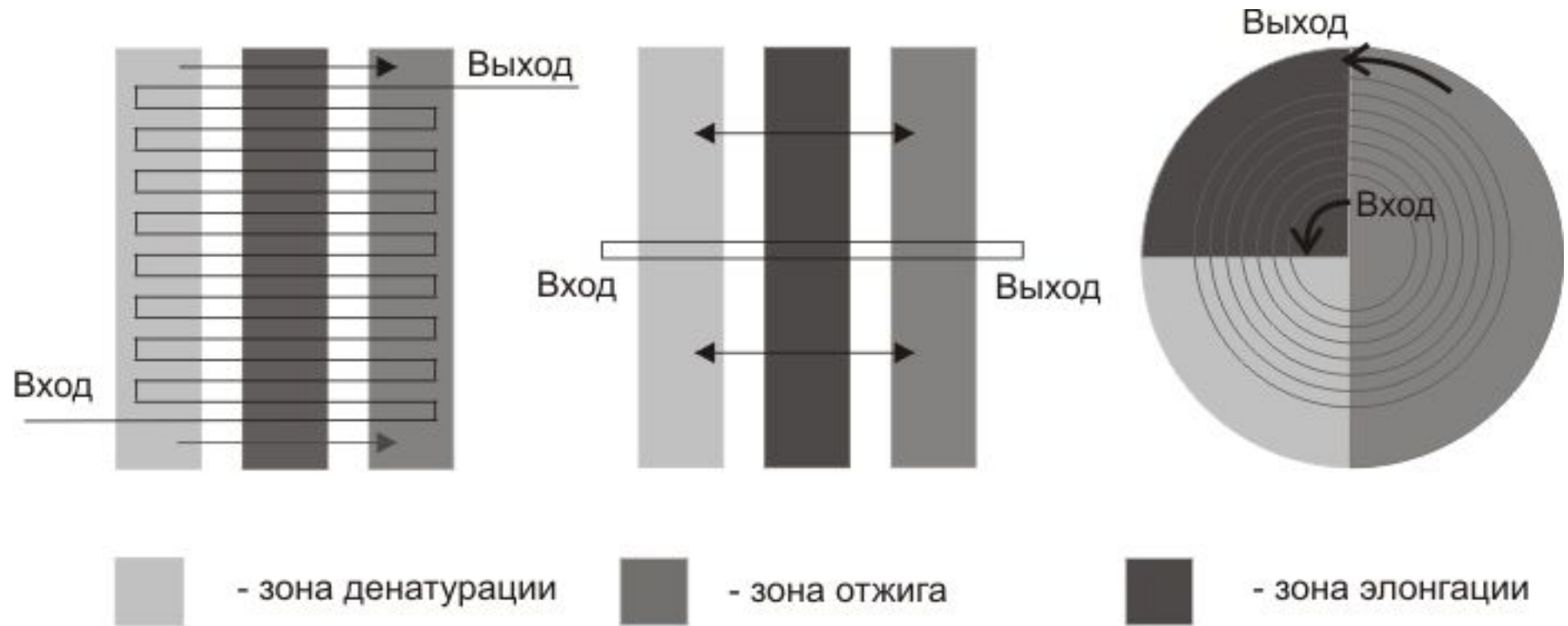
Corresponding redundant primer:

ATG	TAC	TGT	AAT	ACT	AGA	GCT	GGT
	T	C	C	C	G	C	C
				A		A	A
				G		G	G

ПЦР-биочипы



Проточные ПЦР-биочипы



Интегрированный микрокапиллярный ПЦР-биочип

