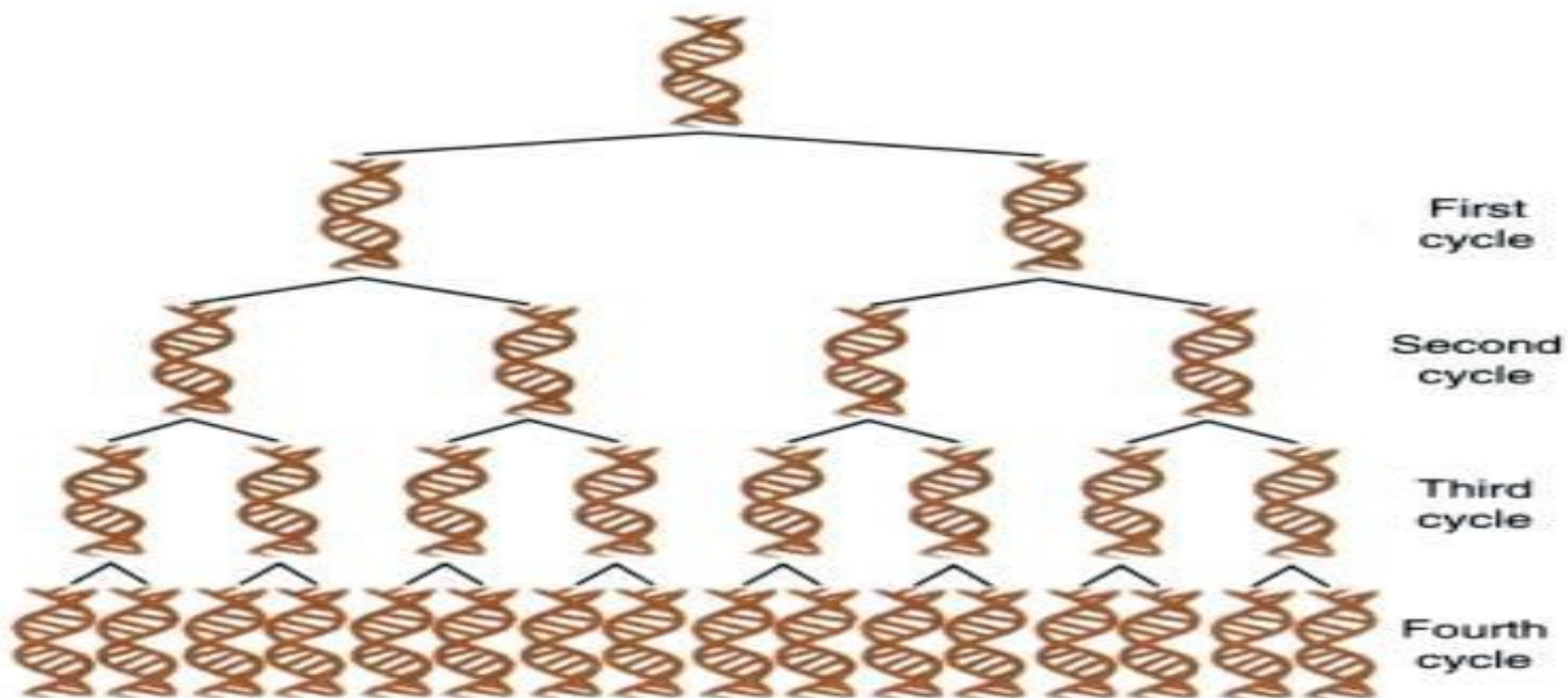
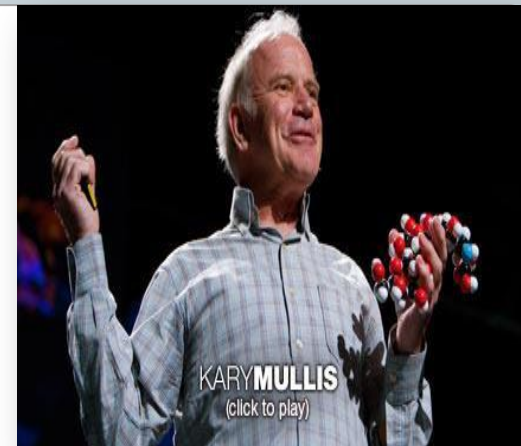
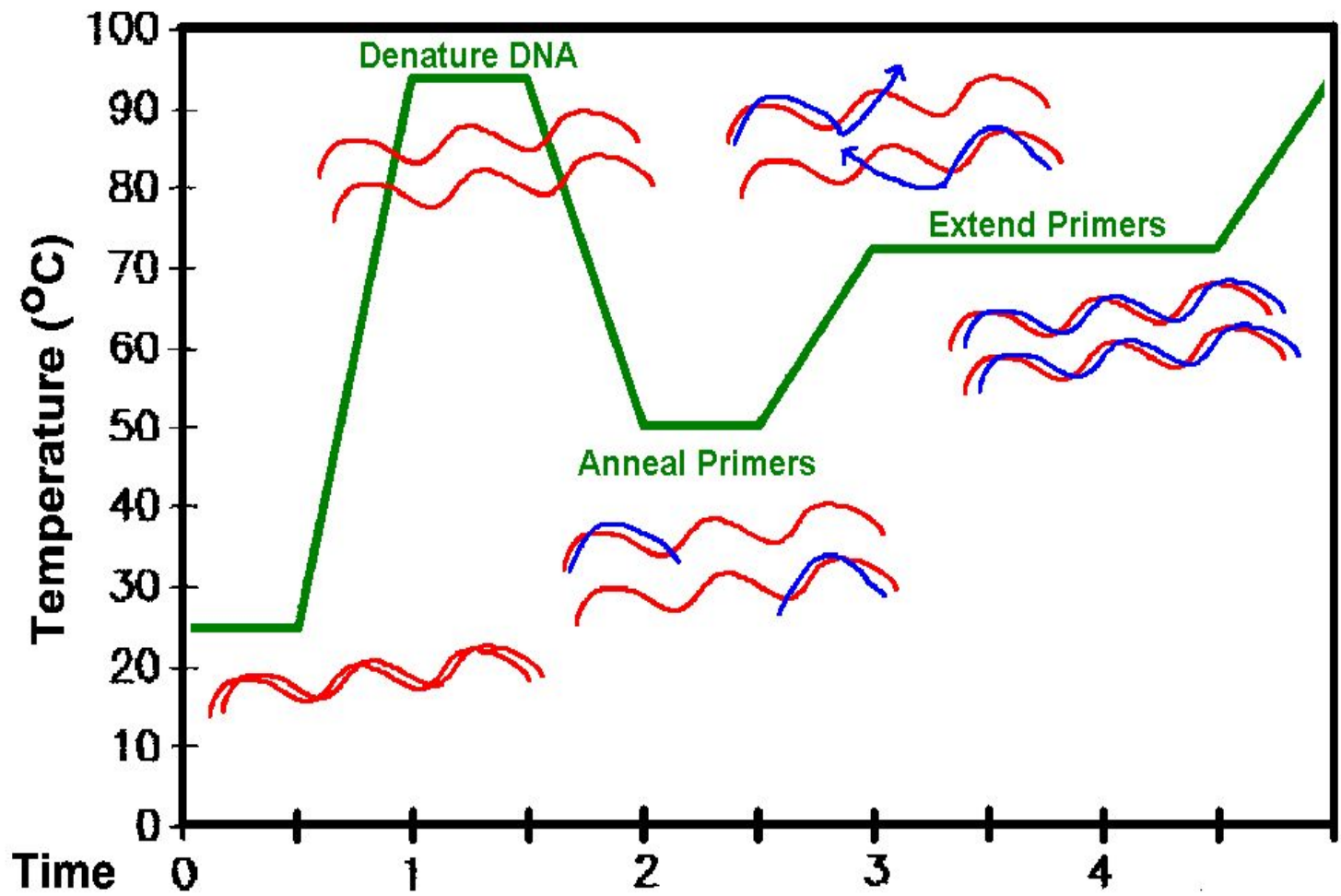


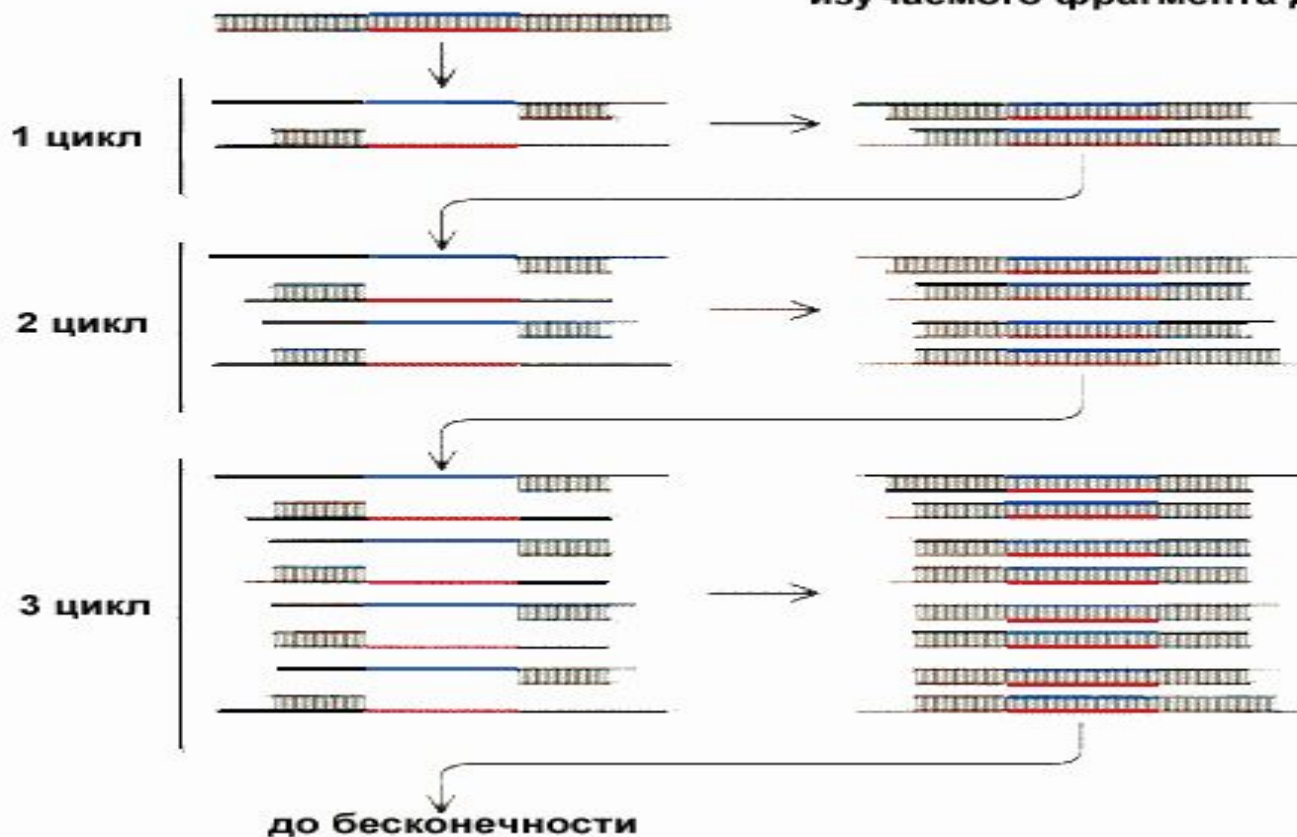
# PCR — полимеразная цепная реакция 1983





**разделение цепей ДНК  
и присоединение праймеров**

**удлинение праймеров  
с образованием копий  
изучаемого фрагмента ДНК**



## Виды ПЦР

- ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)
- Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR) или ПЦР в реальном времени
- Метилспецифическая, метилчувствительная ПЦР
- ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR)
- Вложенная ПЦР (Nested PCR)
- Ступенчатая ПЦР (Touchdown, stepdown PCR)
- RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) — fingerprinting
- Инвертированная ПЦР (Inverse PCR), асимметричная ПЦР (asymmetric PCR)

## ПЦР в реальном времени (Real – time, qPCR)

- одна из разновидностей полимеразной цепной реакции. Используется для одновременной амплификации и измерения количества определенной молекулы ДНК.

Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором.

Основное **отличие** состоит в том, что **измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации**. Для количественного определения применяют флуоресцентные красители и модифицированные олигонуклеотиды ( ДНК- зонды).

**Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.))**  
или **ПЦР в реальном времени** — используется для  
непосредственного наблюдения за измерением количества  
конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции.

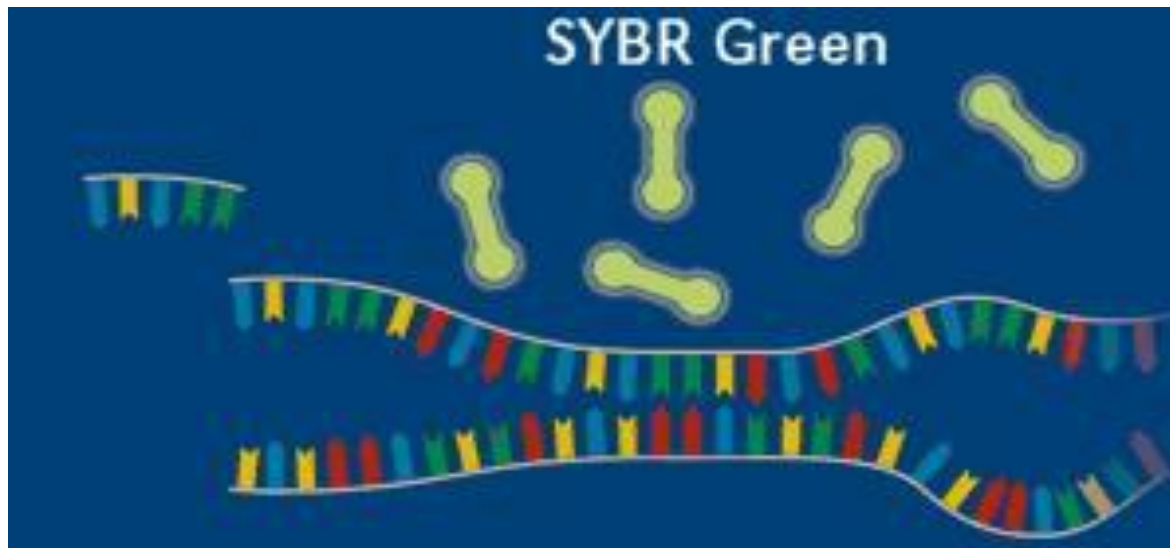
## Используются

флуоресцентно-меченые праймеры  
или ДНК-зонды для точного  
измерения количества продукта  
реакции по мере его наполнения

флуоресцентный  
интеркалирующий краситель  
*Sybr Green I*

- ✓ обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения ПЦР-продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов или праймеров.

*SYBR Green I* совместим со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени. Максимум поглощения для *SYBR Green I* находится при длине волны 494 нм. Кроме главного, в спектре красителя имеются два небольших дополнительных максимума поглощения — при 290 нм и 380 нм. Максимум испускания для *SYBR Green I* находится при длине волны 521 нм (зелёный)





**ДНК-Технология** – одна из самых динамично развивающихся отечественных биотехнологических компаний. В их ассортименте – приборы для ПЦР в реальном времени и классического ПЦР, термостаты, источники питания, ПЦР тест-системы.



Предназначен для регистрации результатов ПЦР при использовании тест-систем, основанных на принципах флуоресцентной детекции.

## ПРИБОРЫ ДЛЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ:

### Анализаторы нуклеиновых кислот "АНК"



- количественное определение ДНК/РНК
- 4<sup>x</sup>-цветная детекция красителей
- высокая чувствительность
- удобное программное обеспечение
- снижение риска контаминации

Регистрационное удостоверение изделия медицинской техники № ФСР 2010/08892 от 21 сентября 2010 года

Свидетельство об утверждении типа средств измерений RU.C.39.010.A №38476 от 10.03.2010

**Анализаторы нуклеиновых кислот "АНК-16" и "АНК-32"** предназначены для качественного и количественного определения фрагментов нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), а также для определения температуры плавления фрагментов ДНК.

## Технические характеристики приборов для ПЦР в реальном времени "АНК"

Количество лунок для пробирок	16 или 32
Стандартные пробирки, стрипы и плашки с прозрачной плоской или выпуклой крышкой, объём, мл	0.2
Динамическое термостатирование пробирок с пробами по задаваемой циклограмме в диапазоне, °С	4 - 99
Разброс температур по лункам, °С	± 0.15
Абсолютная погрешность температуры в лунке в диапазоне от 40 до 95 °С, °С	± 0.1
Регулируемый нагрев крышки амплификатора, °С	95-110
Точность поддержания температуры крышки, °С	± 1
Источник света	галогеновая лампа (гарантийный срок службы лампы - 4000 часов)
Детектор света	ФЭУ
Длина волны возбуждения, нм	490, 530, 580, 630
Длина волны регистрации, нм	520, 550, 610, 670
Чувствительность каждого канала по соответствующим флуоресцентным красителям, не более М	$2.5 \cdot 10^{-9}$
Потребляемая мощность, Вт	350
Габариты, мм	340*400*420
Масса, кг	26
Срок гарантийного обслуживания	2 года

**высокая производительность ;  
мультиплексная детекция с использованием до 5 каналов флуоресценции;  
долговечность источников света – светодиодов, отличающихся высокой  
продолжительностью;  
высокая чувствительность;  
термоблок позволяет задавать градиент температуры отжига;  
возможность автономного выполнения задания и восстановления программы;  
простота управления**

Амплификатор Real-time ДТ-96



## **Основные преимущества ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ:**

количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;

- ❑ **сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;**
- ❑ повышение специфичности реакции за счет использования гибридационных зондов;
- ❑ обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- ❑ исключение послеамплификационных манипуляций с продуктом и, как следствие, **снижение риска контаминации, экономия времени и сокращение затрат на поддержание ПЦР-лаборатории;**

## Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR (англ.))

— с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72-75°C, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60-65°C.

## *Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР*

– это одновременная амплификация двух и более последовательностей ДНК в одной пробирке.

**Преимущество** данного метода:

возможность выявления ряда патогенов, генетических модификаций организмов и т.д., поместив пробу в одну пробирку.

## *Гнездовая («вложенная», англ. nested PCR) ПЦР*

– применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции.

Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции.

Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

## *ПЦР «инвертированная»*

– используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для этого проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов.

## *Ассиметричная ПЦР*

– проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. Сама ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.



**Метод молекулярных колоний** (ПЦР в геле, [англ. Colony - PCR Colony](#))  
— [акриламидный гель полимеризуют](#) со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

**ПЦР длинных фрагментов** ([англ. Long-range PCR](#)) — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз, одна из которых — *Taq*-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это *Pfu* полимераза. Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой, так как *Taq*-полимераза останавливает синтез ДНК если был добавлен не комплементарный нуклеотид. Этот не комплементарный нуклеотид удаляет *Pfu* полимераза. Смесь полимераз берется в отношении 50:1 или даже меньше 100:1, где *Taq*-полимеразы берётся в 25—100 раз больше по отношению к *Pfu*-полимеразе.

**RAPD** (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA*), ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

## **ПЦР с использованием горячего старта ([англ. Hot-start PCR](#))**

— модификация ПЦР, суть которой состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

**Полимеразная активность фермента в момент постановки ПЦР блокируется антителами или небольшими молекулами типа Affibody до наступления первой денатурации**

**Отделение полимеразы от реакционной смеси с использованием легкоплавкого парафина или специальных масел**

**Позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и получения ложноположительных результатов анализа**

**Виртуальная ПЦР** (англ. in silico PCR, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР) — математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы, кольцевой ДНК или любого другого участка ДНК.

**Спасибо за внимание!**