

# Презентация

## Вирусология и биотехнология

Тема : полимеразная цепная реакция и ее использование в вирусологии

Студент: Нгуен Ван Сон  
Курс: 3  
Группа: 13 ВС/5-2

Москва 2015

1. Концепция полимеразная цепная реакция (ПЦР)

2. Проведение ПЦР

3. Компоненты реакции

4. Праймеры

5. Амплификатор

6. Ход реакции

7. Использование в вирусологии

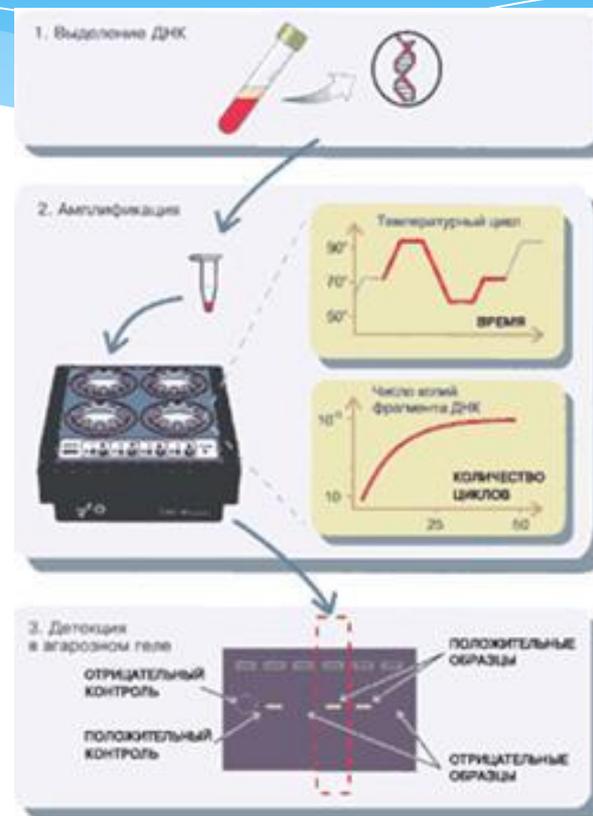
# Концепция полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- \* Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).
- \* Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.



# Проведение ПЦР

\* Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты 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. 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. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований

# Компоненты реакции

- \* Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:
- \* ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- \* Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- \* 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), *Puycococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Puycococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.

- \* Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (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.
- \* Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.
- \* Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

# Праймеры

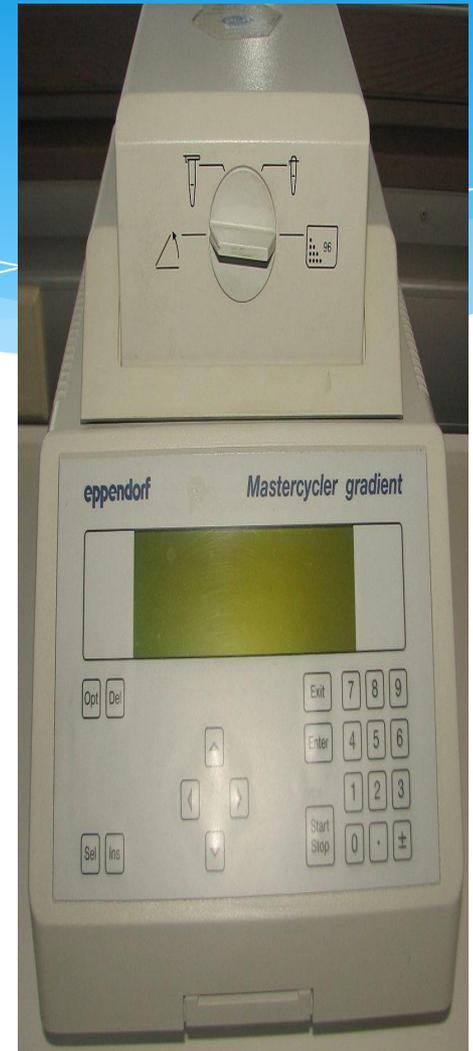
- \* Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.
- \* После гибридизации матрицы с праймером, последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы (см. ниже).
- \* Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления ( $T_m$ ) комплекса праймер-матрица.
- \*  $T_m$  — температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Усредненная формула подсчета  $T_m$  для короткого олигонуклеотида (и для длинных ДНК фрагментов), с учетом концентрации ионов  $K^+$  и DMSO:

В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °С.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

GC-состав ~ 40—60 %;

близкие  $T_m$  праймеров (отличия не более, чем на 5 °С); отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.



# Амплификатор

- \* ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при  $4^{\circ}\text{C}$ . Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

# Ход реакции

Денатурация

Отжиг

Элонгация

# 1. Денатурация

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (денатурацией), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно, перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров.

## 2. Отжиг

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 5 градусов меньше, чем температура плавления праймеров. 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). Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °С и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60—72 °С.

### 3. Элонгация

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5' к 3' концу. 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.

Количество специфического продукта реакции (ограниченного праймерами) теоретически возрастает пропорционально  $2^n - 2^n$ , где  $n$  — число циклов реакции. На самом деле эффективность каждого цикла может быть меньше 100 %, поэтому в действительности  $P \sim (1+E)^n$ , где  $P$  — количество продукта,  $E$  — средняя эффективность цикла.

Число «длинных» копий ДНК тоже растет, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент.

Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

# Использование в вирусологии

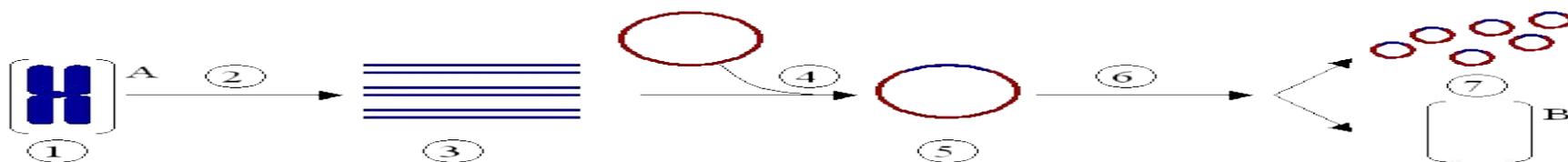


## \* 1. Медицинская диагностика

ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

\* 2. Клонирование генов:

\* Клонирование генов (не путать с клонированием организмов) — это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор — фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена — РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.



Клонирование гена с использованием плазмиды.

- (1) Хромосомная ДНК организма А.
- (2) ПЦР.
- (3) Множество копий гена организма А.
- (4) Вставка гена в плазмиду.
- (5) Плазида с геном организма А.
- (6) Введение плазмиды в организм В.
- (7) Умножение количества копий гена организма А в организме В.

Спасибо за просмотр!

