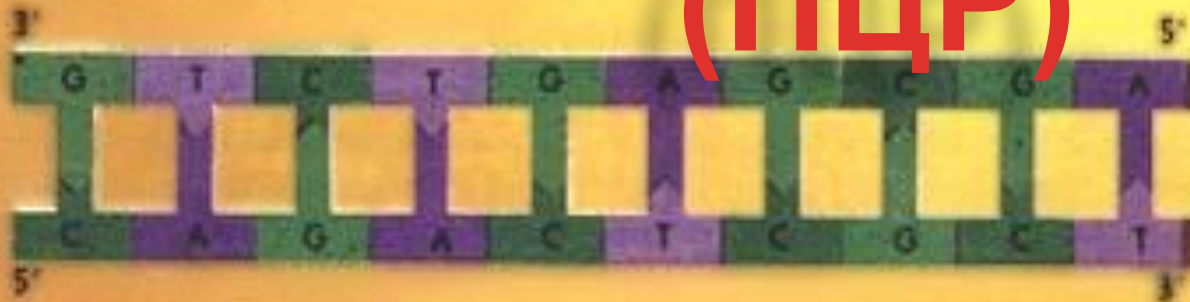
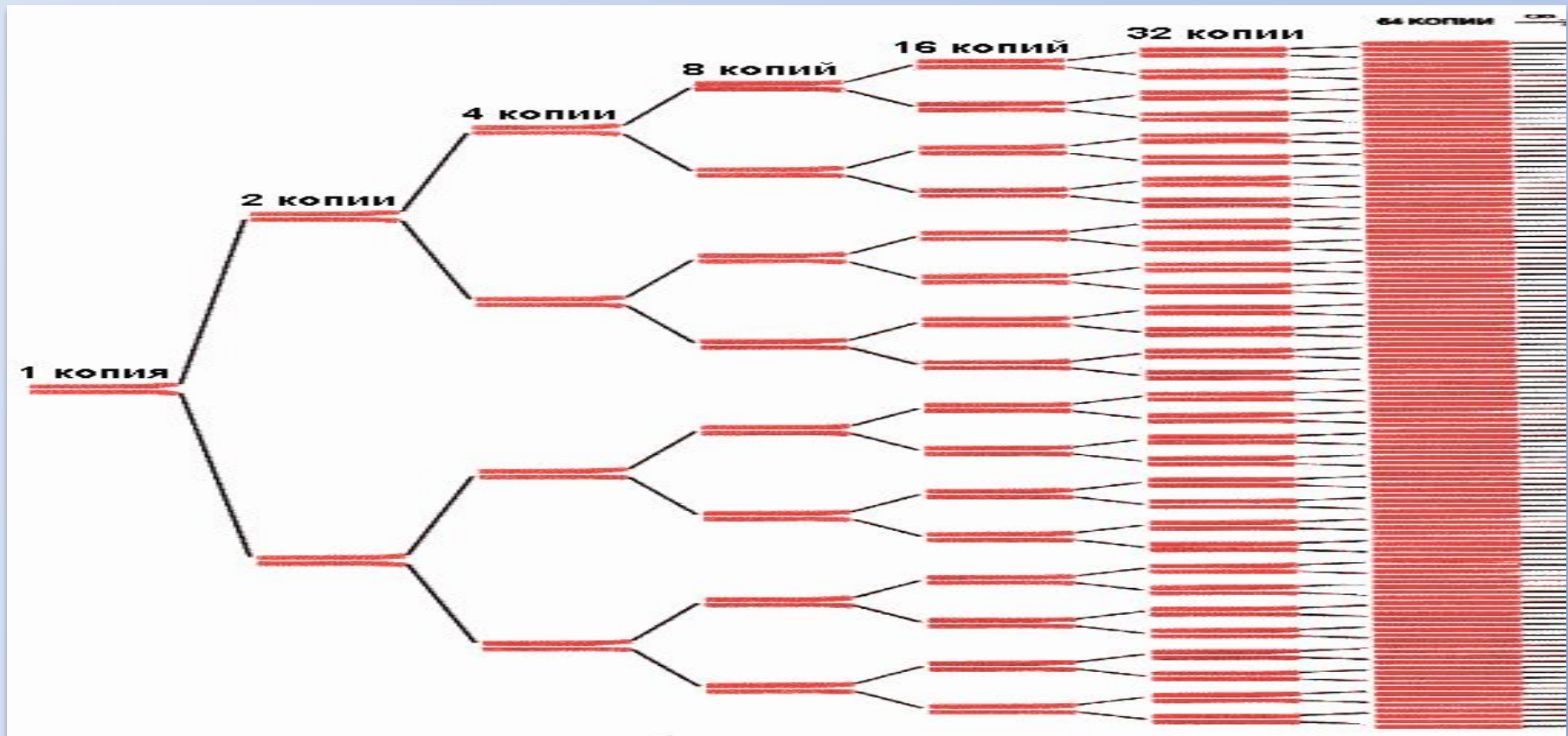


ПОЛИМЕРАЗНА Я ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)



Полимеразная цепная

это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей



Амплификат

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР и последующего хранения амплифицированных молекул при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$..



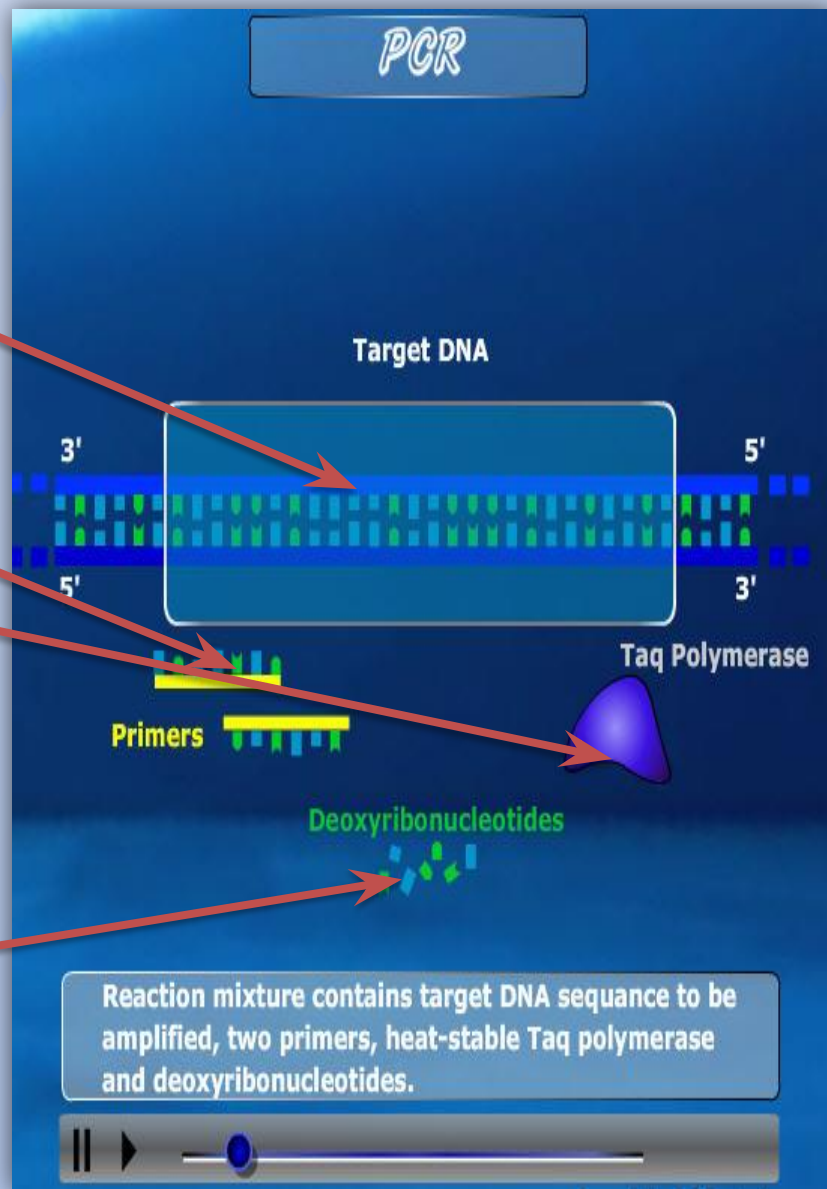
нажми на картинку

Для ПЦР

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), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.



ПЦР осуществляется в ходе
трехэтапного циклического
процесса:

- ✓ Денатурация
- ✓ Ренатурация
- ✓ Синтез

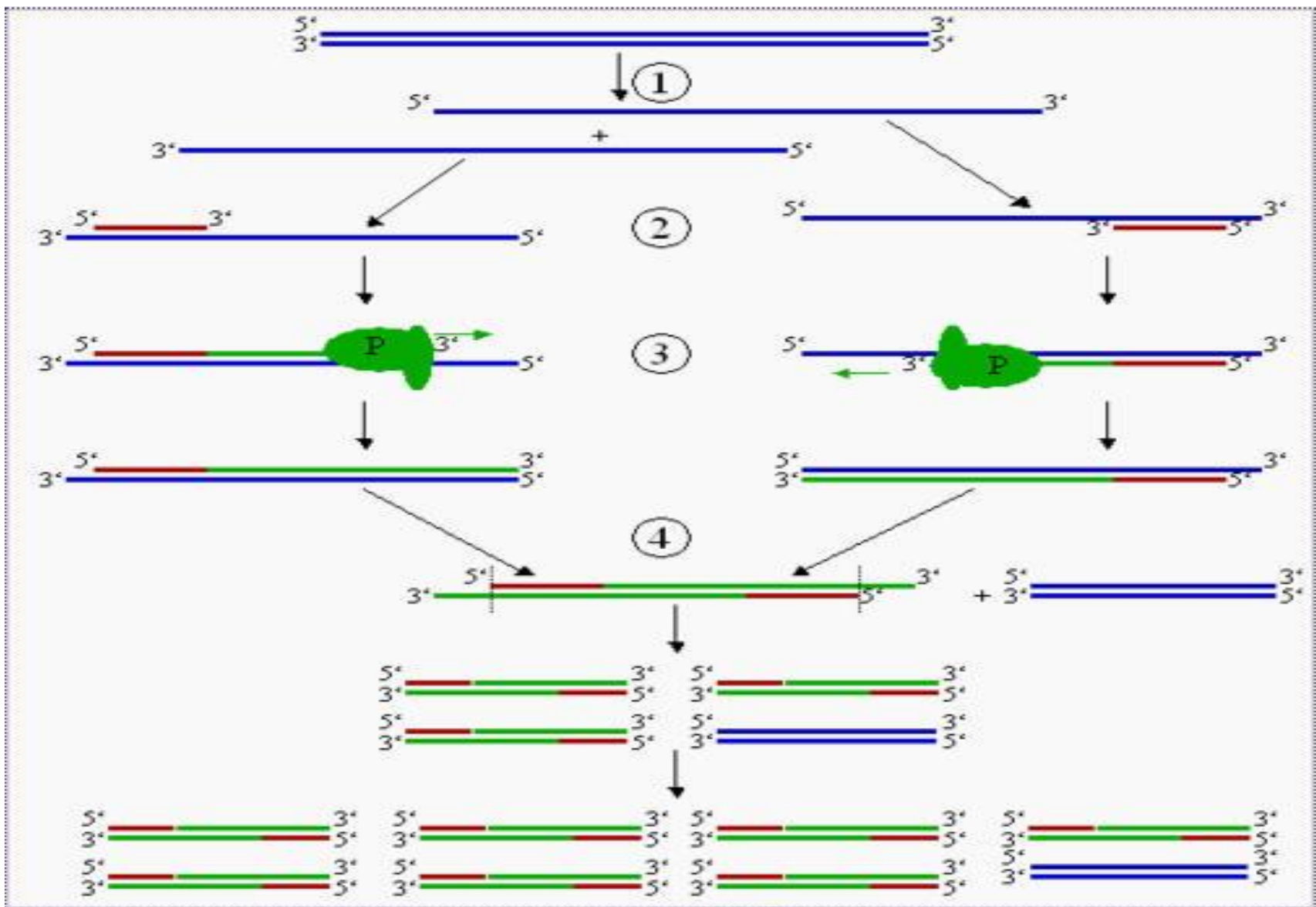
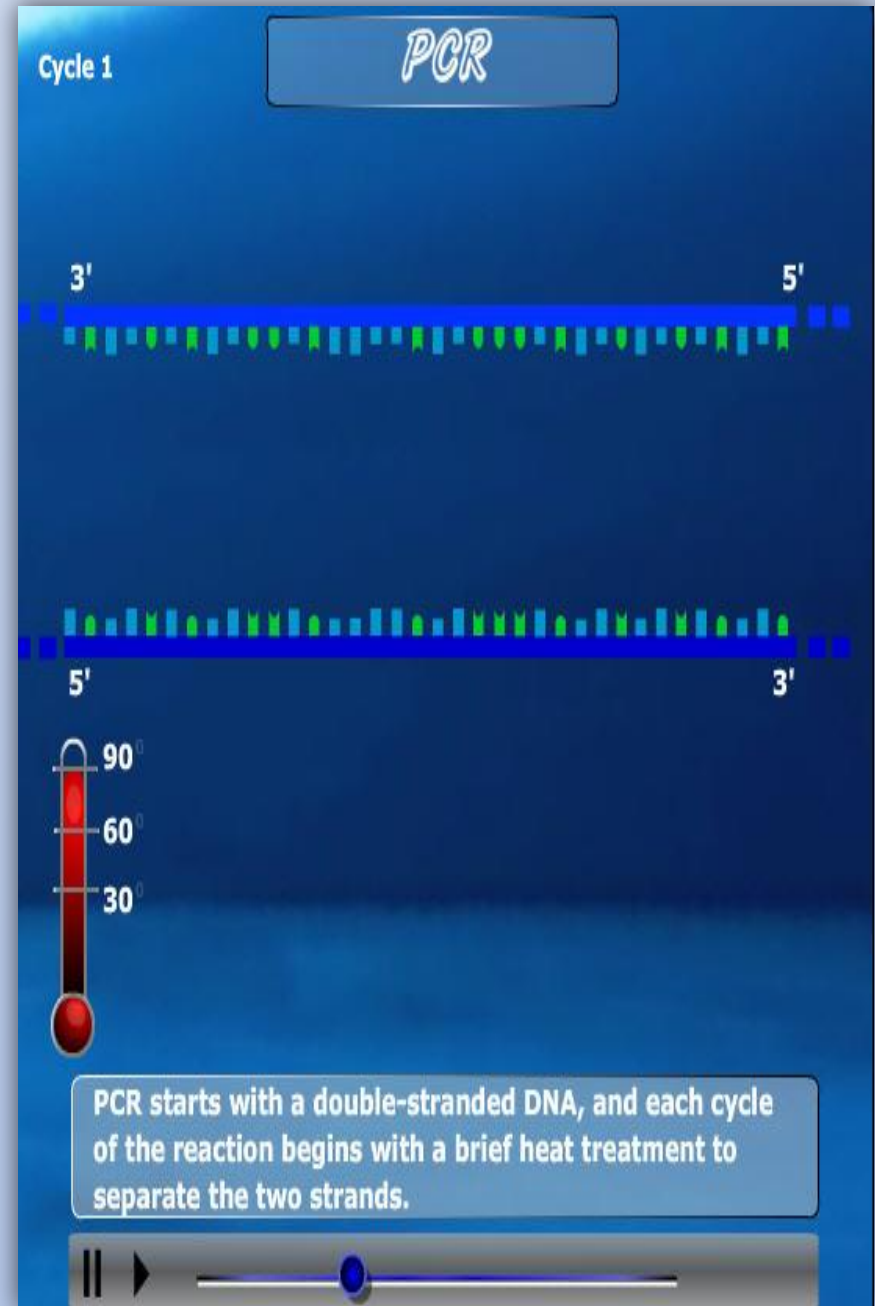


Рис. 2: Схематическое изображение первого цикла ПЦР. (1) Денатурация при 94—96°C. (2) Отжиг при 68 °С (например). (3) Элонгация при 72 °С (P=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

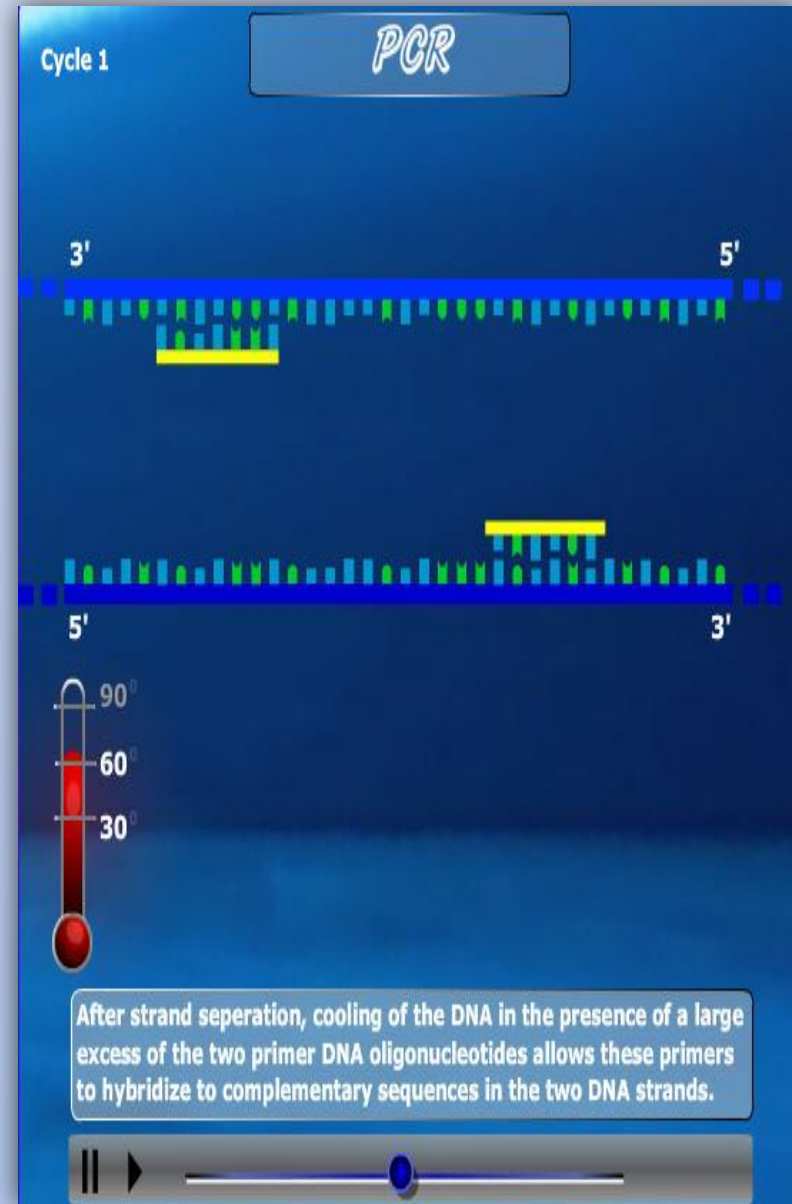
Денатурация

- 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 **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.



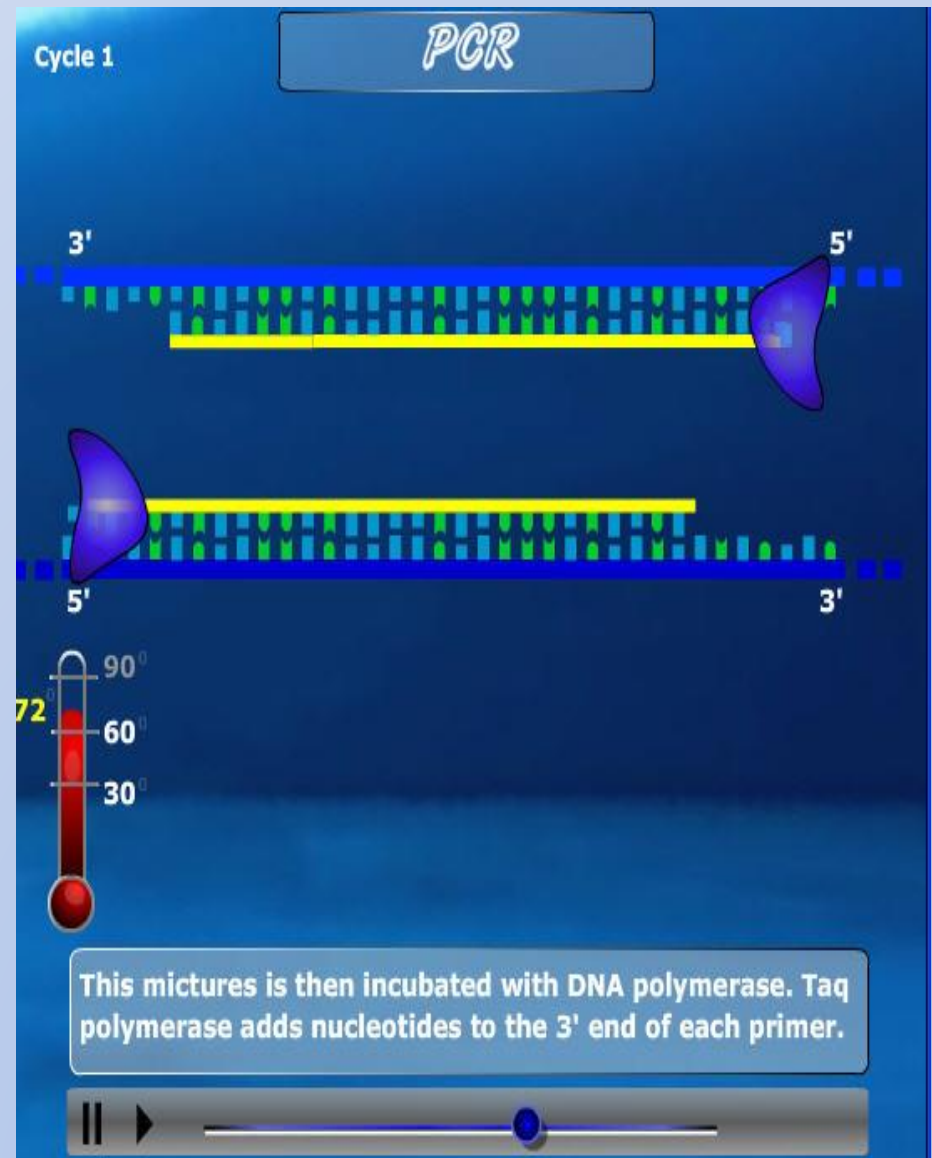
Ренатурация (Отжиг)

- 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 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).



Синтез (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.
- Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °C.



Применение

• КРИМИНАЛИСТИК

• УСТАНОВЛЕНИЕ
ОТЦОВСТВА

• МЕДИЦИНСКАЯ
ДИАГНОСТИКА

• КЛОНИРОВАНИЕ
ГЕНОВ

• МУТАГЕН

