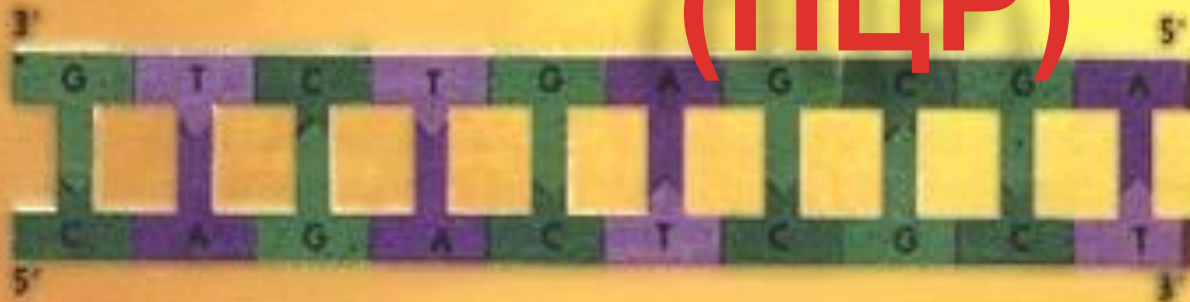
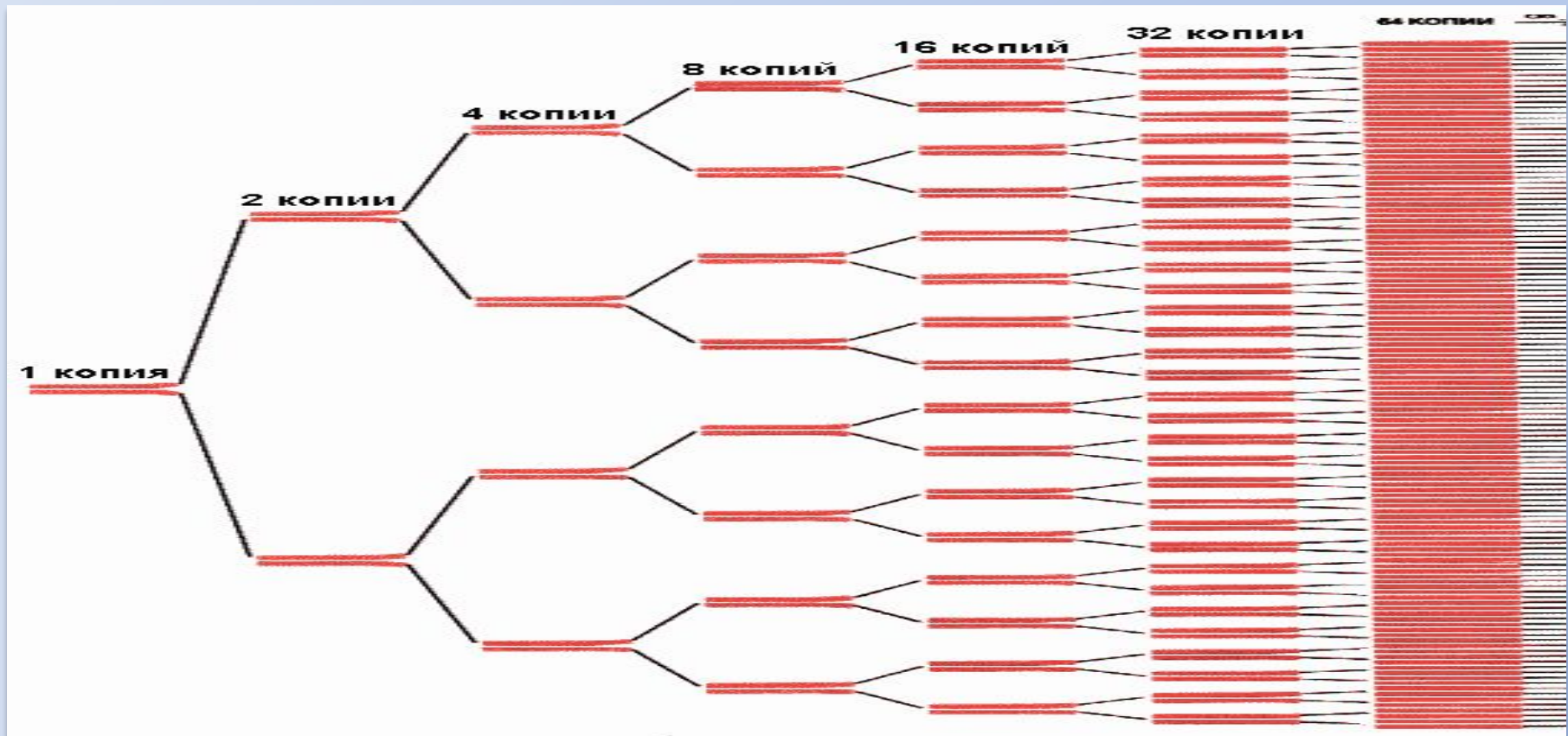


# ПОЛИМЕРАЗНА Я ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)



# 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  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ..



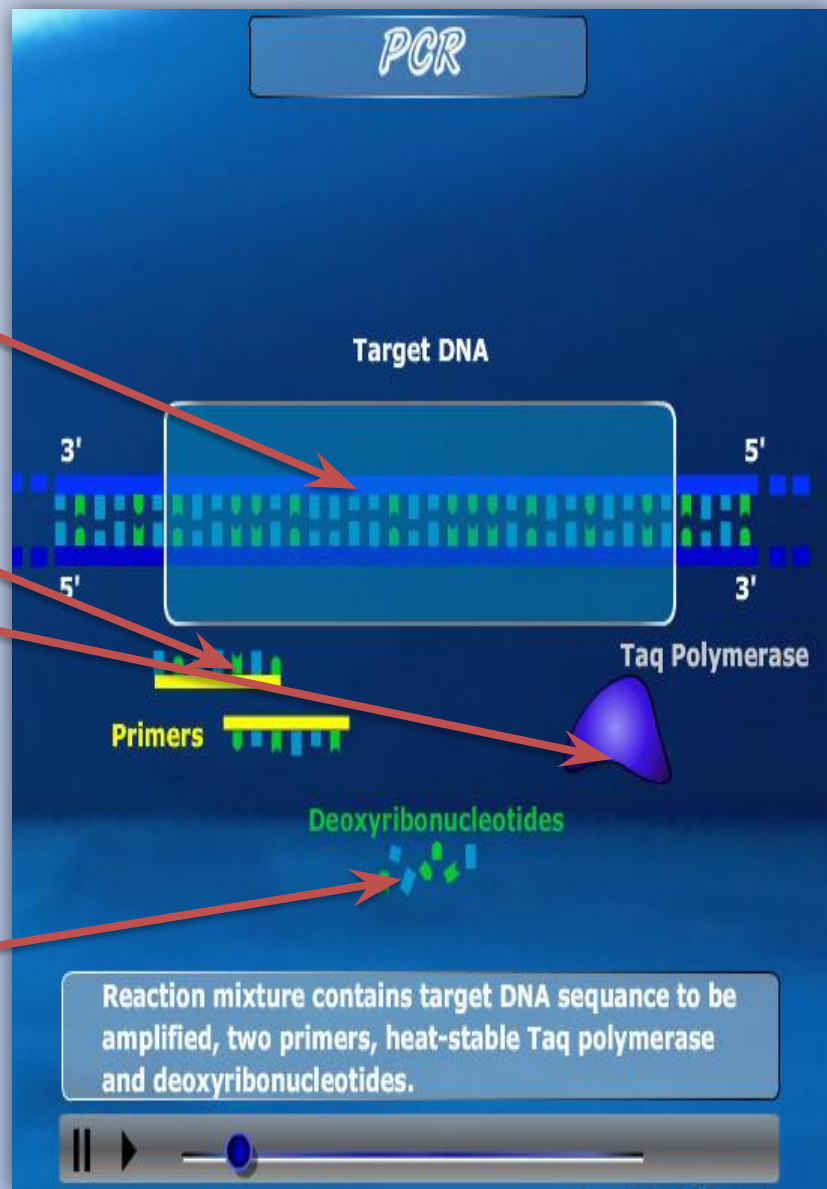
**нажми на  
картинку**

# Для ПЦР

**ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

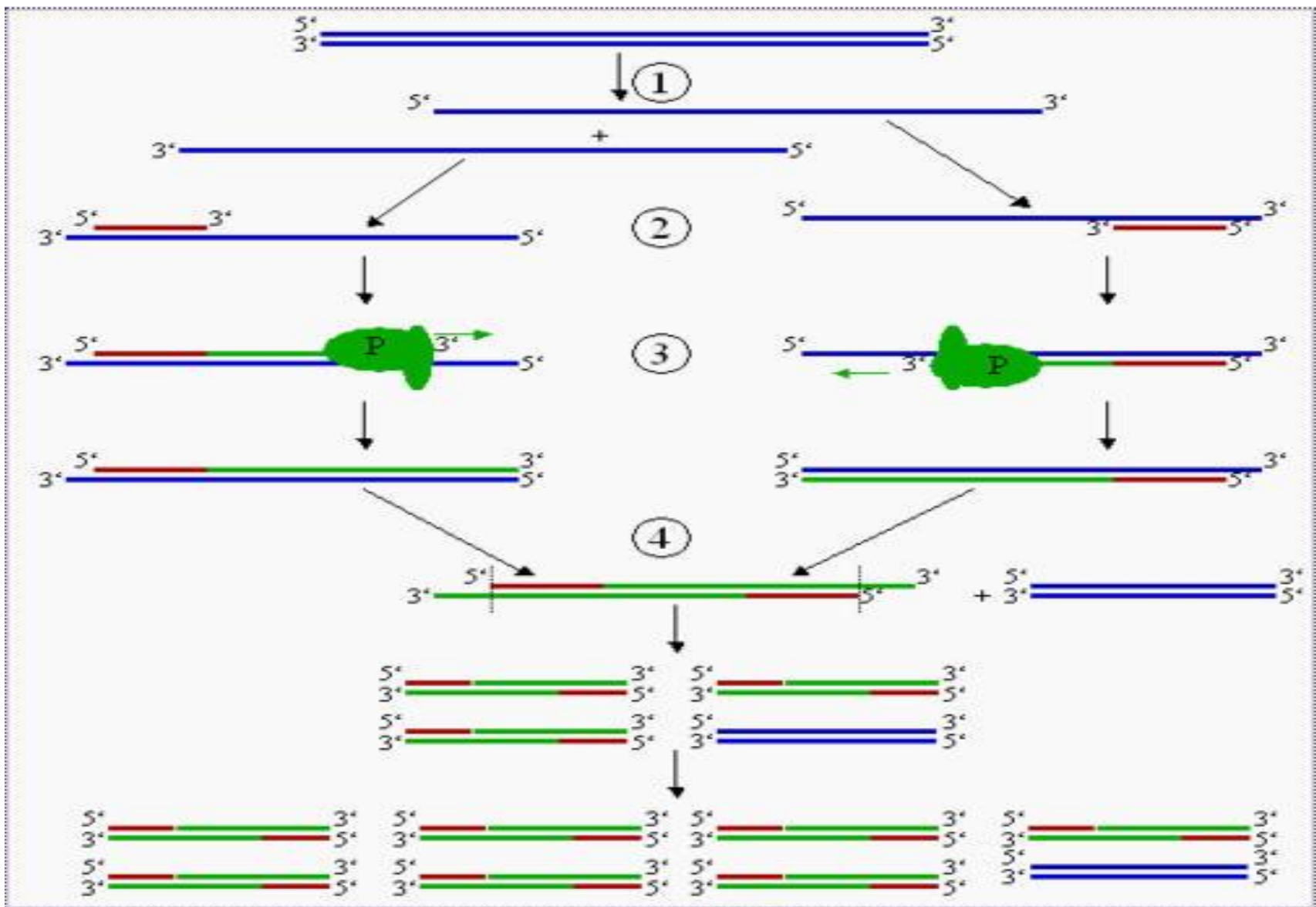
**Два праймера**, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

**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:

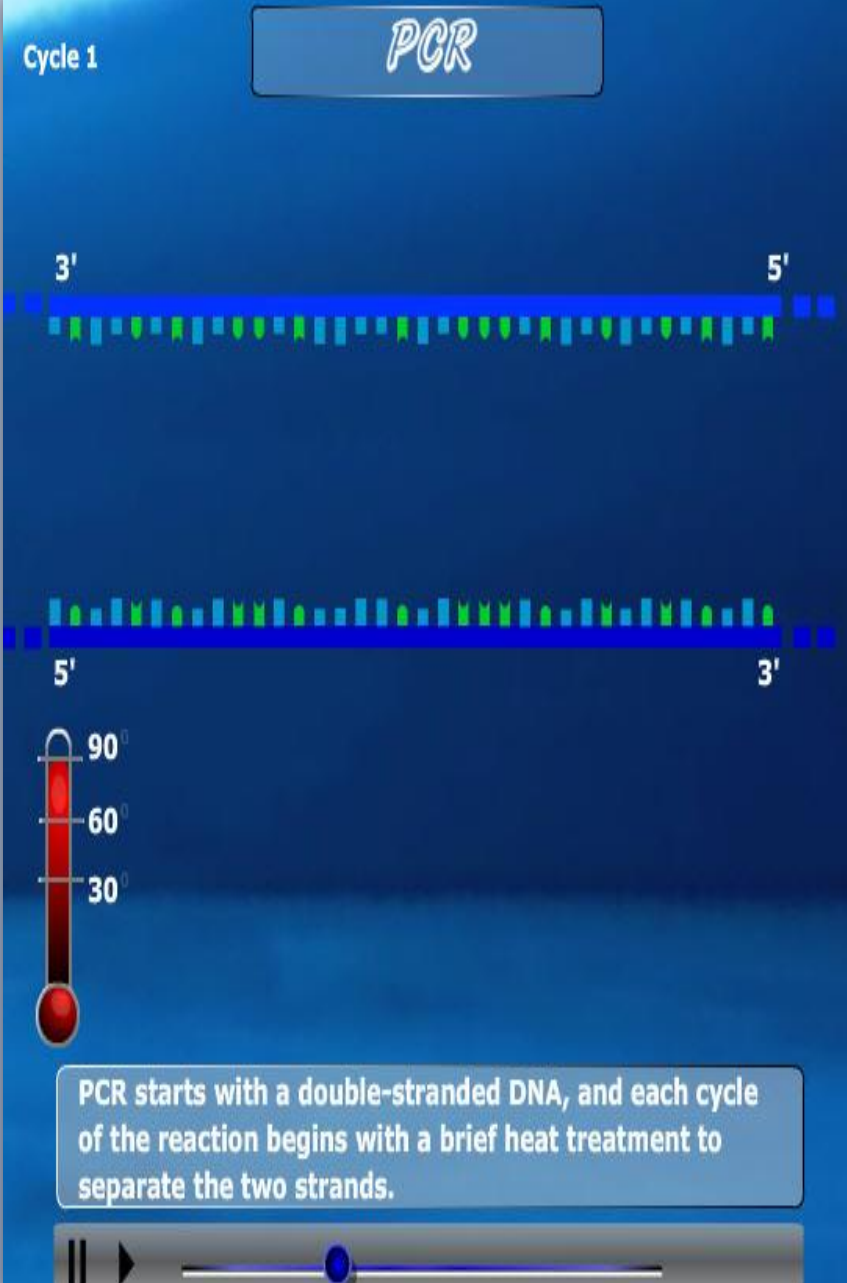
- ✓ Денатурация
- ✓ Ренатурация
- ✓ Синтез



**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 неспецифических продуктов реакции.



The diagram illustrates the denaturation step of PCR. At the top, it is labeled "Cycle 1" and "PCR". A double-stranded DNA molecule is shown with a blue top strand (3' to 5') and a blue bottom strand (5' to 3'). The strands are being heated, as indicated by a thermometer on the left showing a temperature of 90 degrees Celsius. The DNA strands are shown separating into two single strands. A text box at the bottom explains: "PCR starts with a double-stranded DNA, and each cycle of the reaction begins with a brief heat treatment to separate the two strands." A play button and a progress slider are visible at the bottom of the diagram.

Cycle 1

PCR

3' 5'

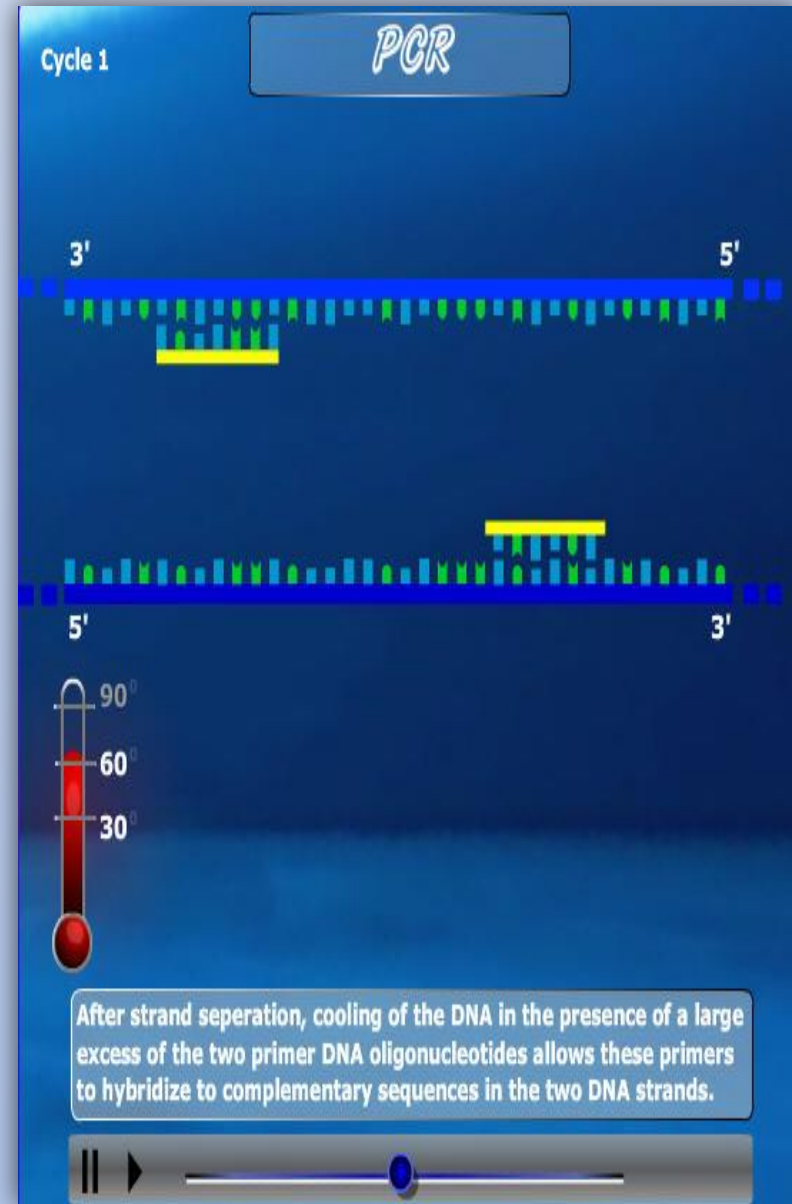
5' 3'

90°  
60°  
30°

PCR starts with a double-stranded DNA, and each cycle of the reaction begins with a brief heat treatment to separate the two strands.

## Ренатурация (Отжиг)

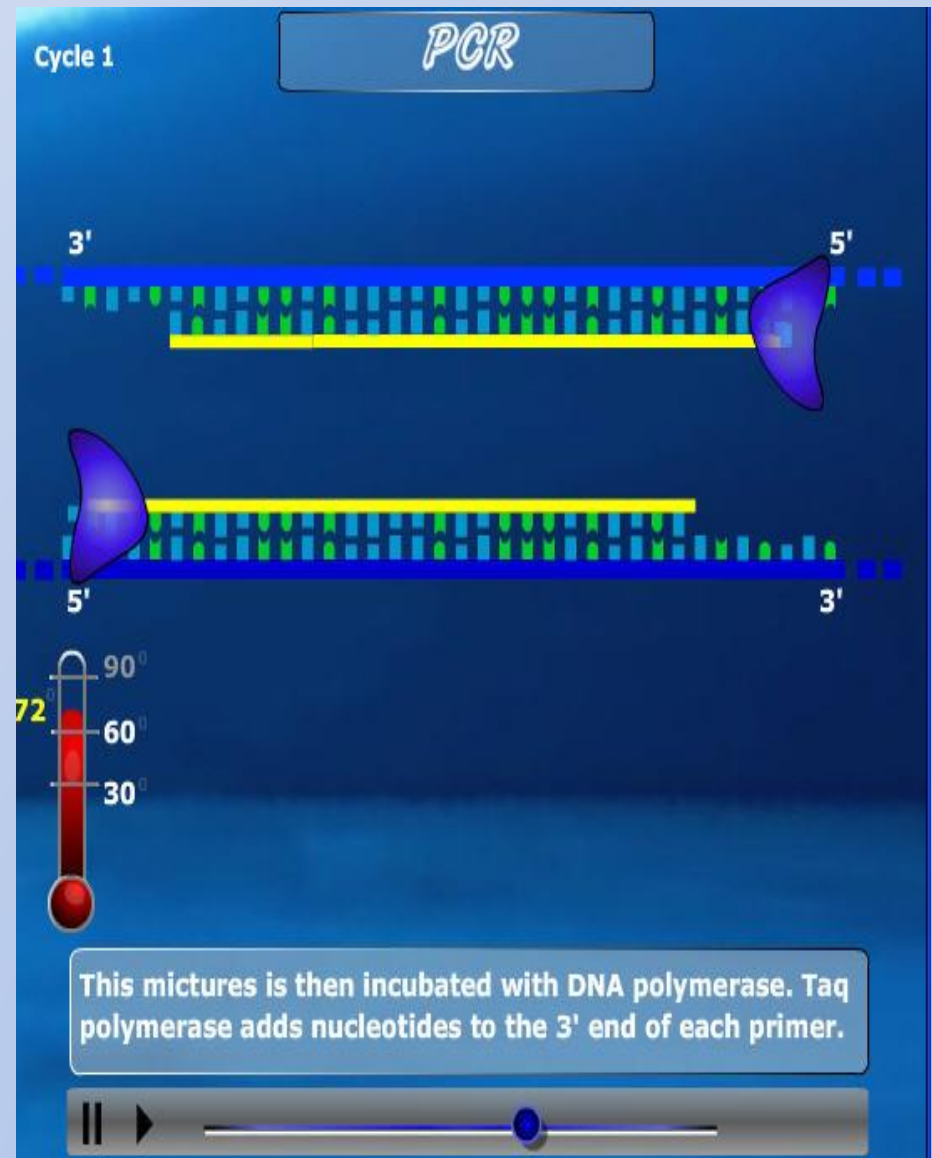
- Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*.
- Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 мин.
- Неправильный выбор температуры 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

