

Полимеразная цепная реакция как инструмент современной биотехнологии

Л.И. Патрушев

*Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
г. Москва*

Кари Б. Муллис (Kary B. Mullis) – изобретатель полимеразной цепной реакции (ПЦР)



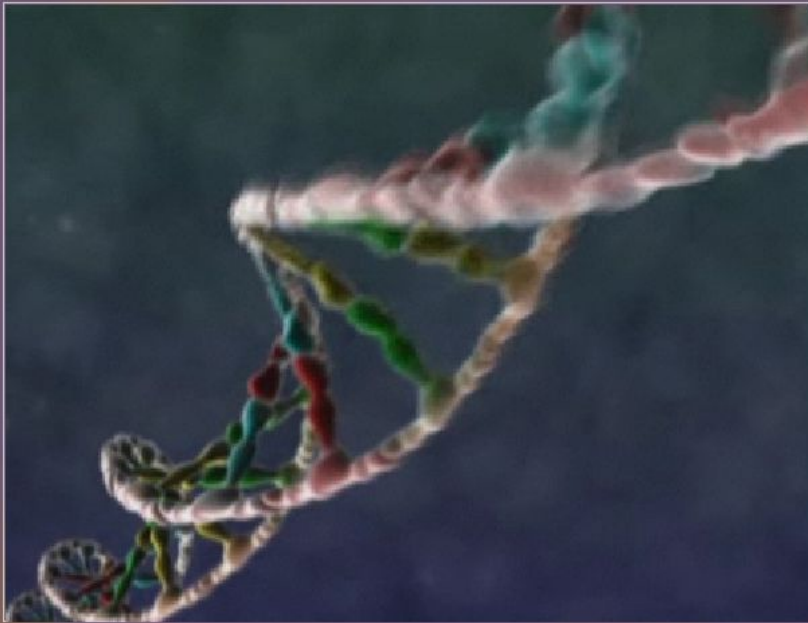
- **Американский биохимик 1944 г.р.**
- **Патент - 1985 г., фирма Cetus Corp. California**
- **Нобелевская премия по химии – 1993 г.**



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)



[HOME](#) | [BIOGRAPHY](#) | [PCR](#) | [ALTERMUNE](#) | [SCIENCE](#) | [BOOKS](#) | [LECTURES](#) | [CONTACT](#)





Полимеразная цепная реакция: 1-й цикл

Cycle 1

DNA Sample

Denaturation

Strands separate

Priming

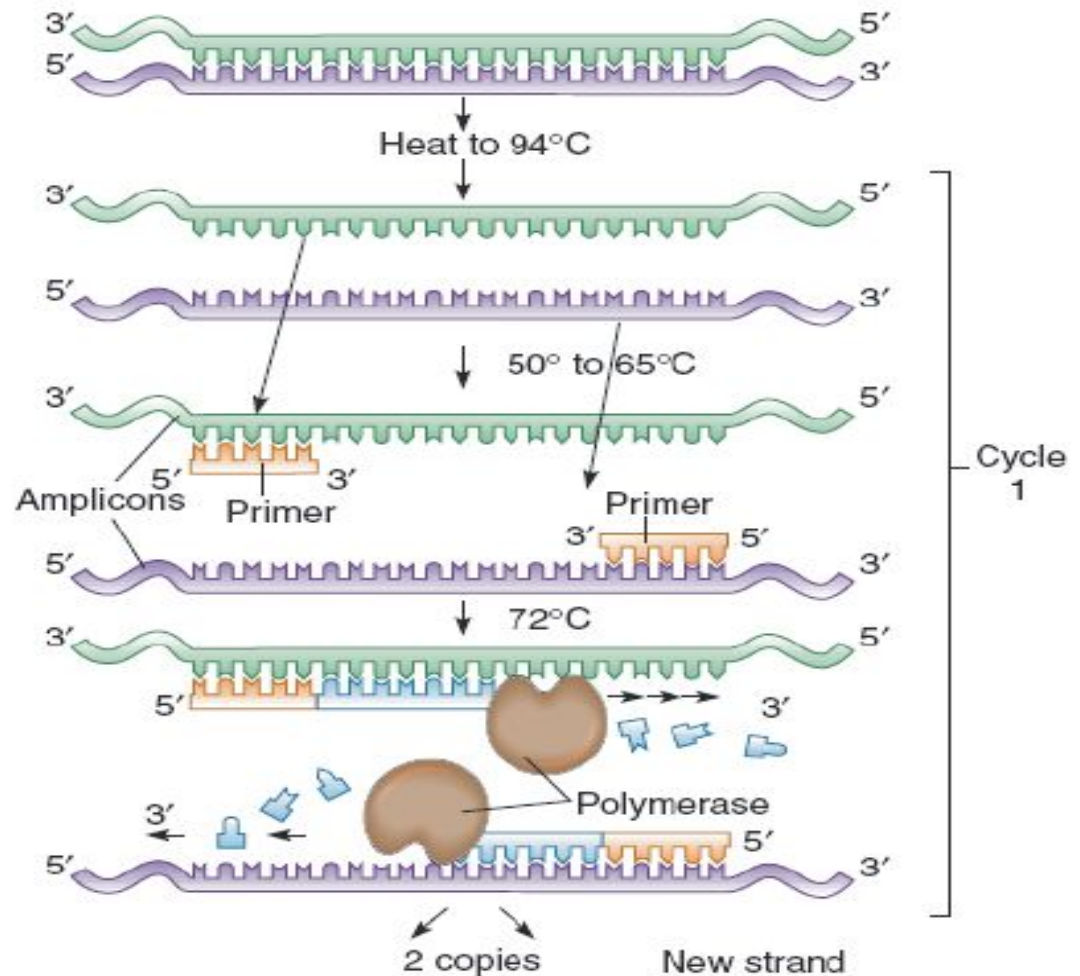
Oligonucleotide primers attach at ends of strands to promote replication of amplicons

Extension

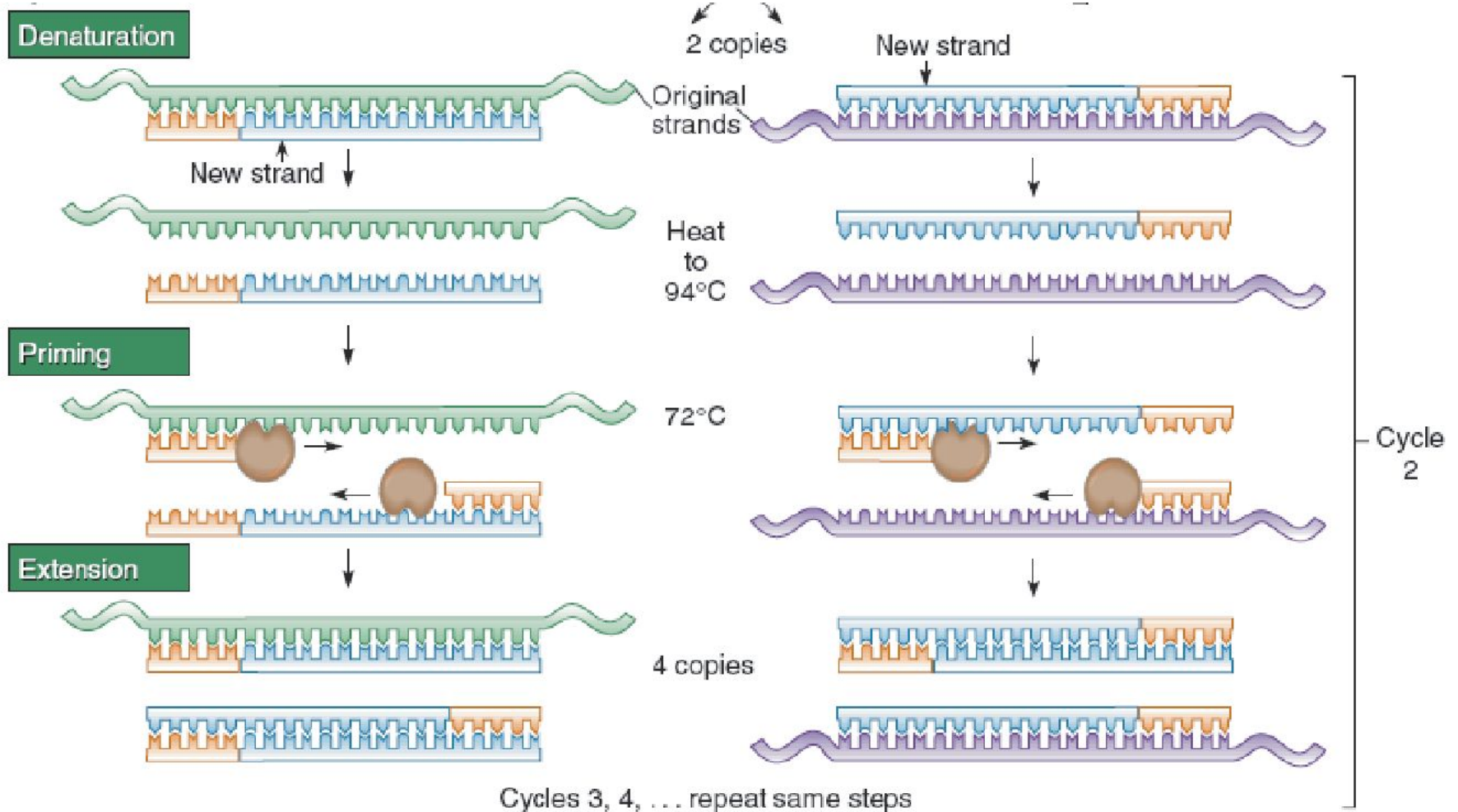
DNA polymerase synthesizes complementary strand

Cycle 2

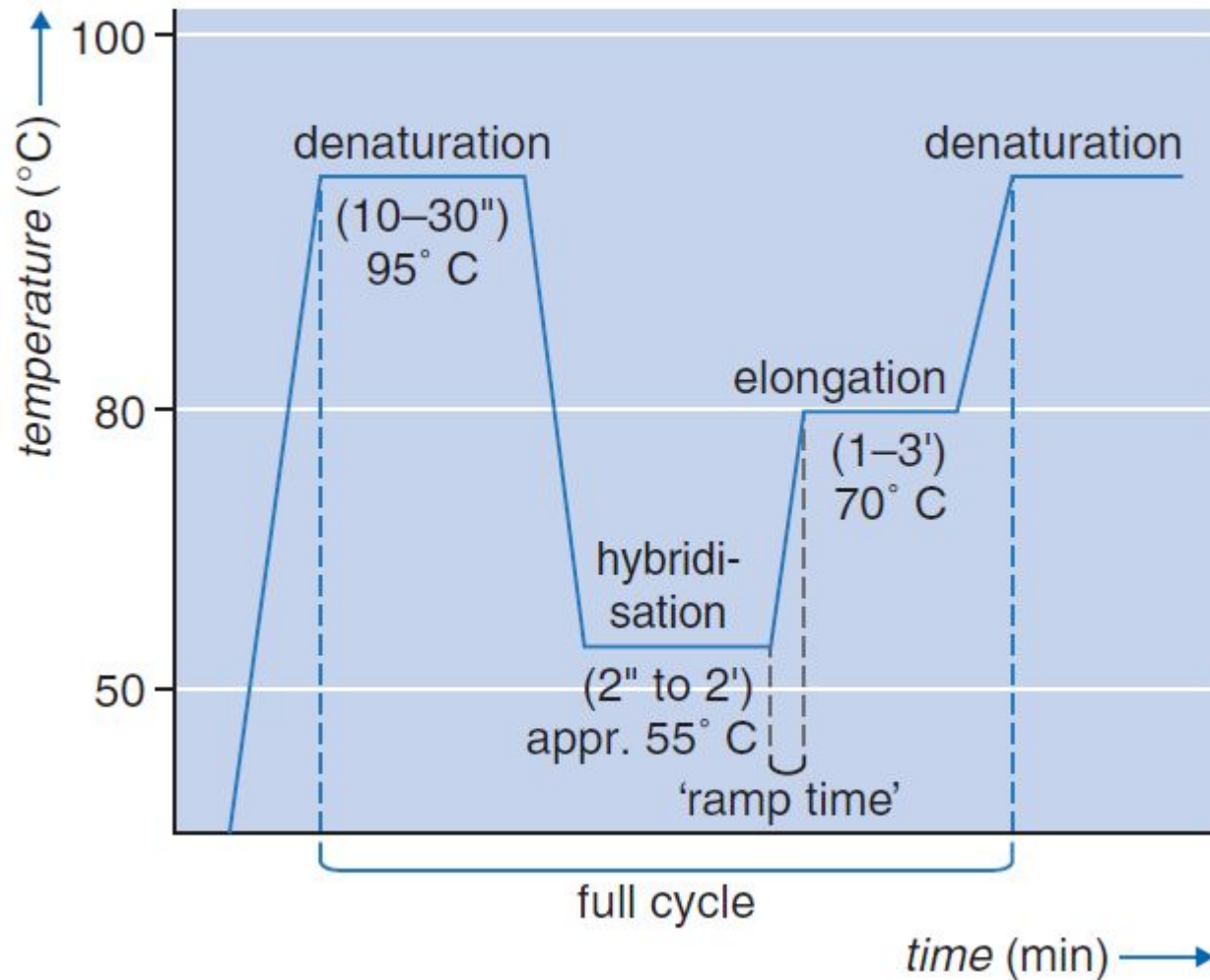
Denaturation



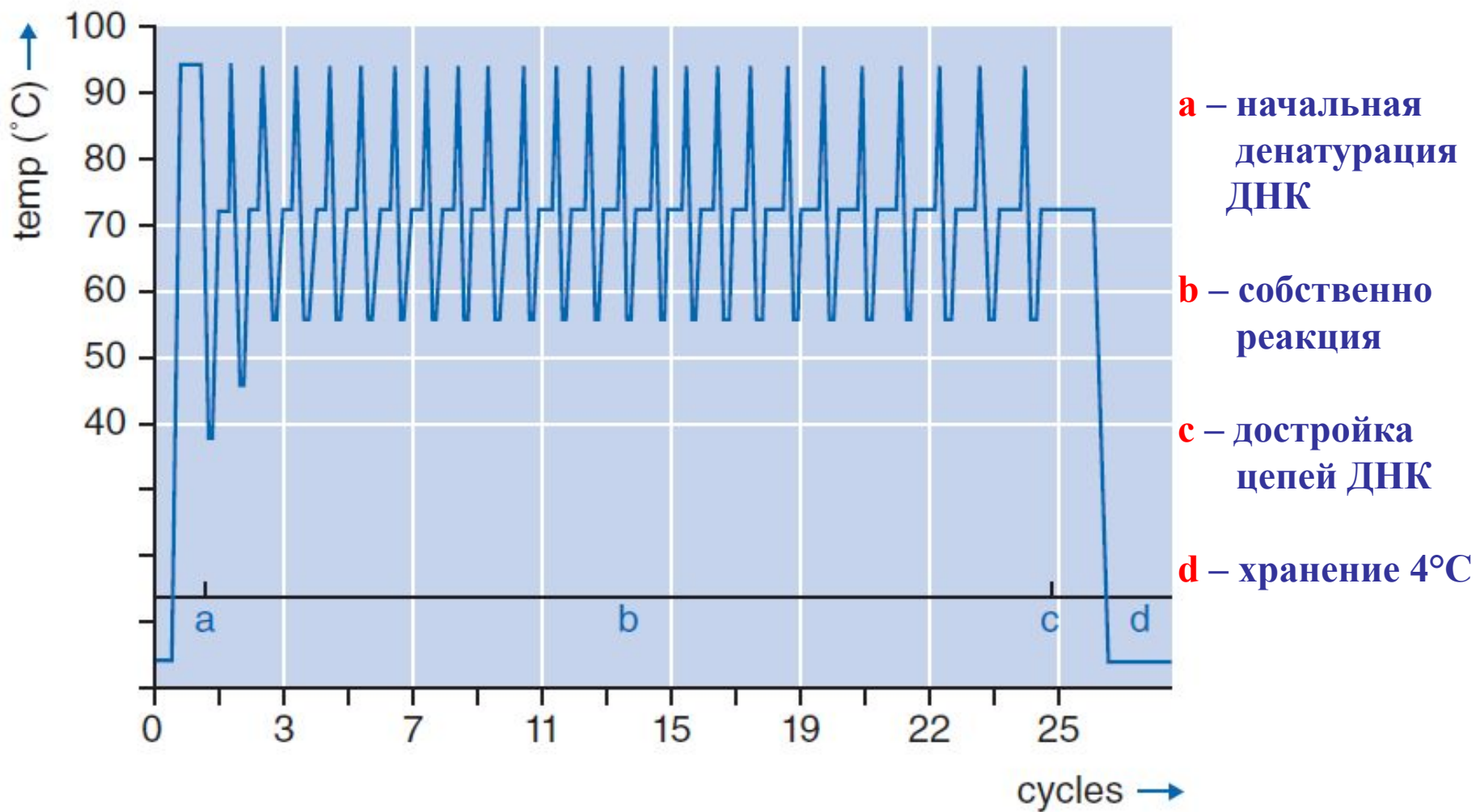
Полимеразная цепная реакция: 2-й цикл



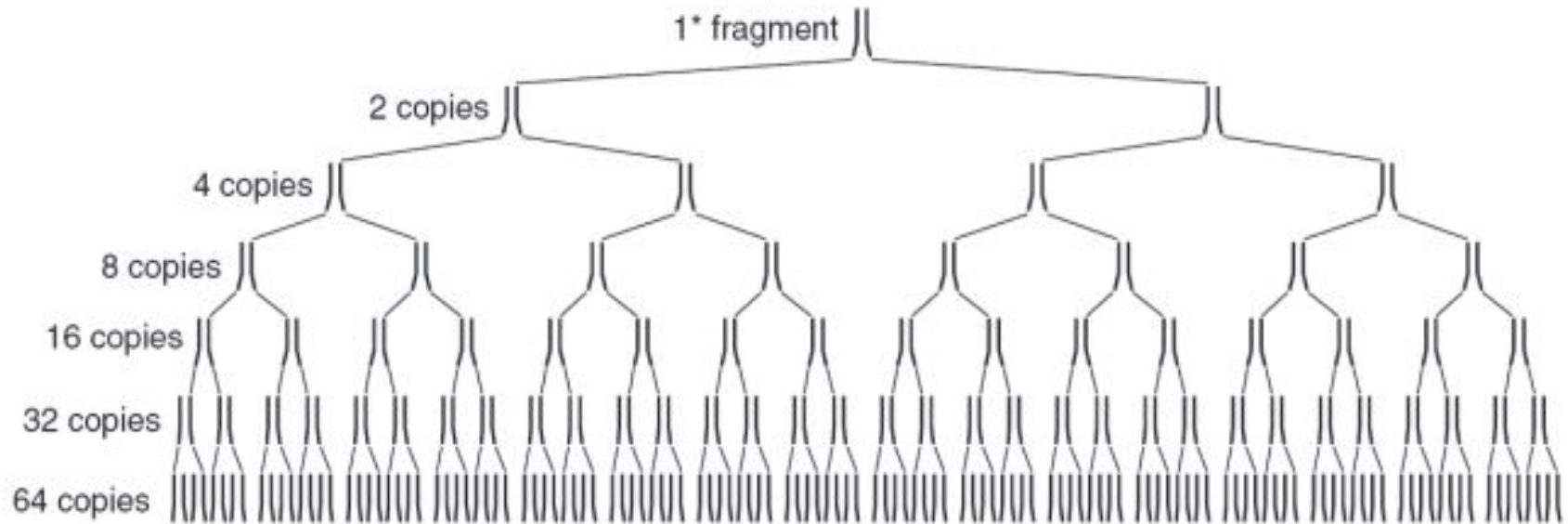
Изменение температуры в типичном трехступенчатом цикле ПЦР



Полный температурный профиль полимеразной цепной реакции (25 циклов)

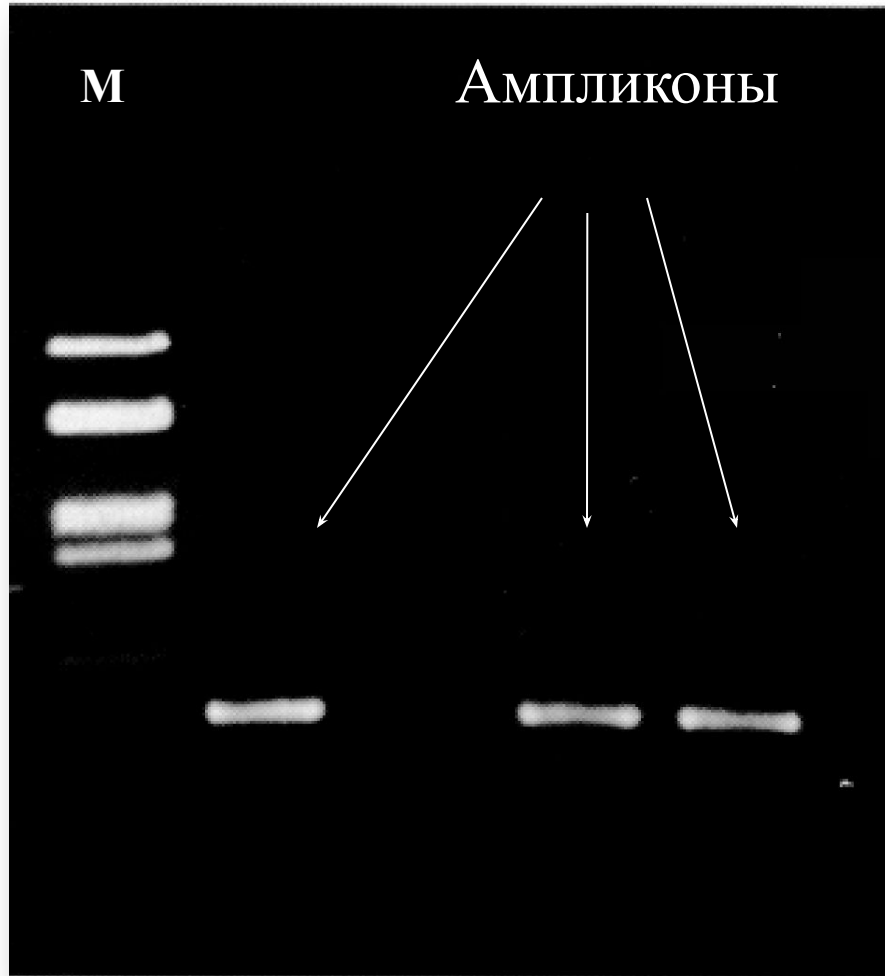


ПЦР как молекулярная копировальная машина («молекулярный ксерокс»)



- После 6 циклов ПЦР образуется 64 идентичных копии исходного генетического локуса (ампликона)

Типичный результат амплификации ДНК с помощью ПЦР



- Ген фактора V системы свертывания крови человека (**амплимер**)
- Размер продукта – 174 п. о.
- 20 циклов ПЦР
- Электрофорез в 3% агарозном геле
- Окраска бромистым этидием

Современный амплификатор

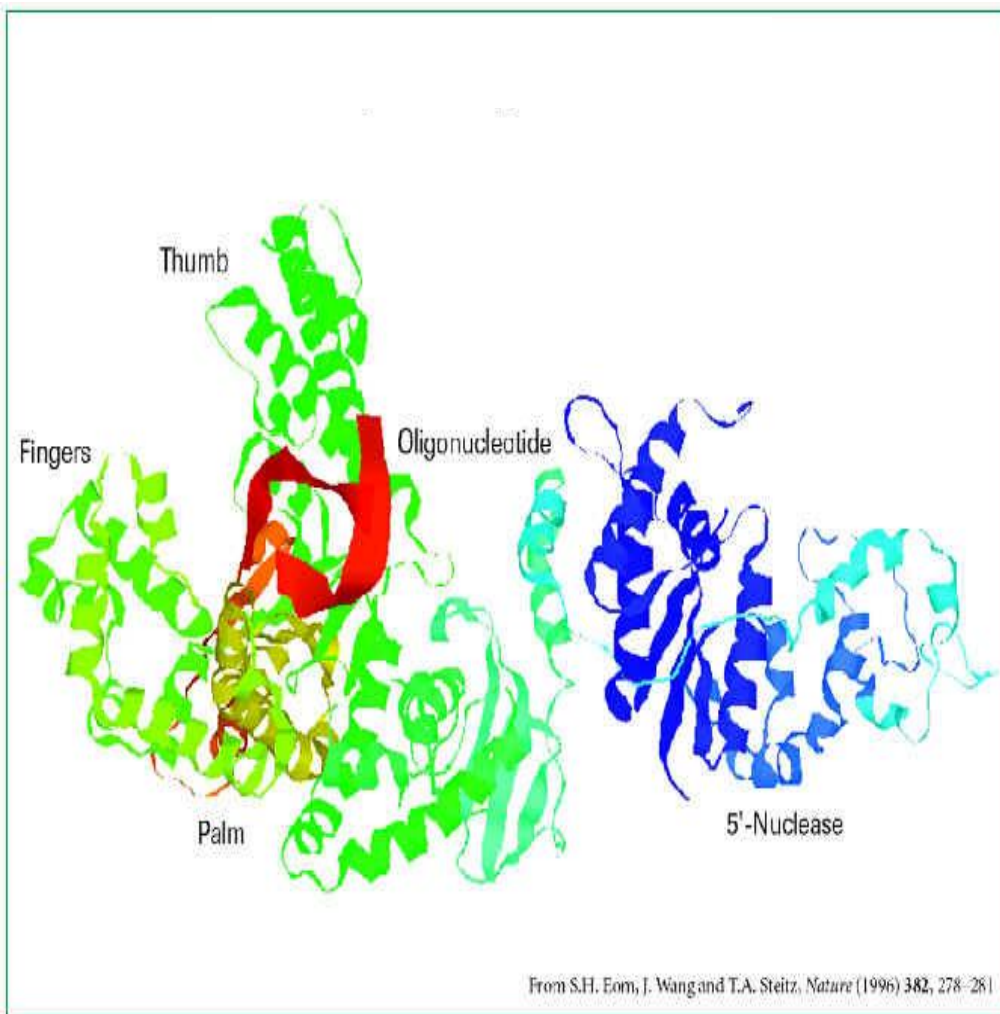


- Термостатируемая крышка
- Возможность использования 96-луночных плашек
- Градиент температуры вдоль нагревающего блока
- Возможность регуляции скорости перехода от одного сегмента цикла к другому (ramp time)
- «Терцик» фирмы *ДНК-технология* (Москва) – высококачественный отечественный амплификатор

Компоненты, необходимые для проведения ПЦР

- Объем пробы – 0,5-50 мкл
- Анализируемая ДНК – 50-100 нмоль, 0,1-0,25 мкг (до 1 молекулы в пробе)
- Термостабильная ДНК-полимераза
- 4 Дезоксирибонуклеозидтрифосфата (4 dNTPs –dATP, dGTP, TTP, dCTP) – 0,2 мМ
- Олигонуклеотидные праймеры – длина 17-25 н.т. (0,5-1,0 мкМ)
- Ионы Mg^{2+} - 0,5-3,0 мкМ
- Буферный раствор
- Все компоненты ПЦР производятся в ИБХ РАН

Структура и свойства *Taq*-ДНК-полимеразы

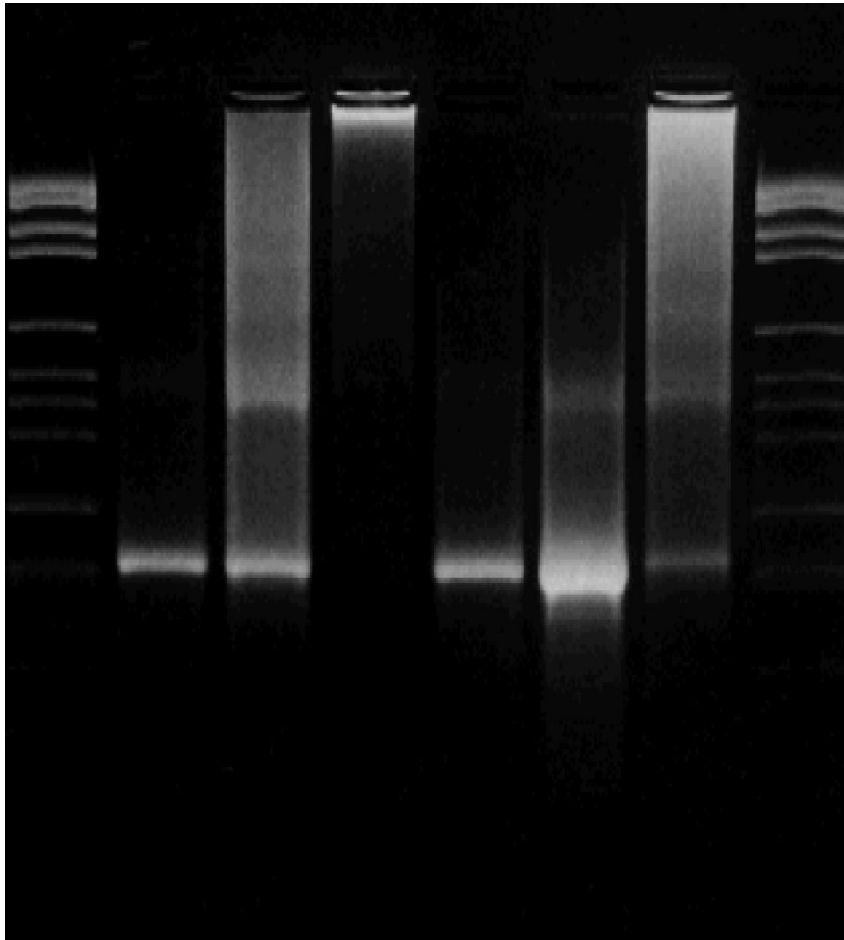


- Наличие 5'→3' экзонуклеазной активности
- Отсутствие 3'→5' экзонуклеазной активности
- Высокая термостабильность (время полужизни: ~ 2 часа при 95°C)
- Скорость синтеза ДНК ~ 50 нт/сек при 72°C

Критические характеристики ПЦР, наиболее важные для исследователя

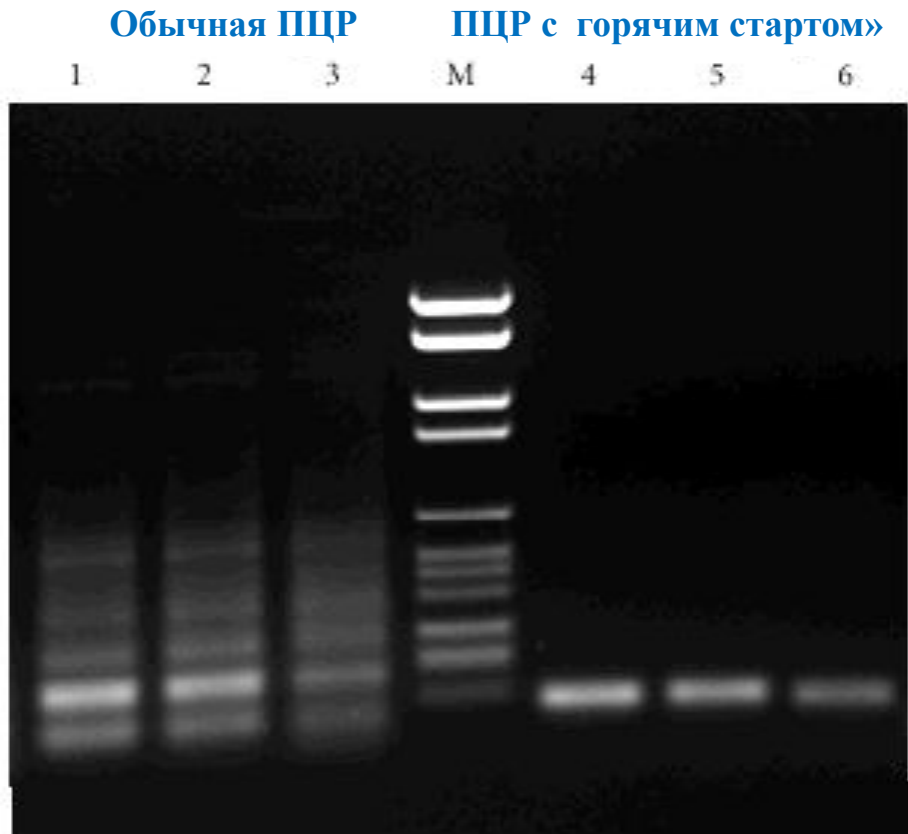
- **Специфичность**
- **Точность синтеза ДНК**
- **Эффективность**

Критические характеристики ПЦР: *специфичность*



- В неоптимальных условиях при амплификации образуются неспецифические продукты ПЦР (шмир, дополнительные полосы, в т.ч. димеры праймеров)
- Электрофорез в агарозном геле, окраска бромистым этидием,

ПЦР с «горячим стартом»

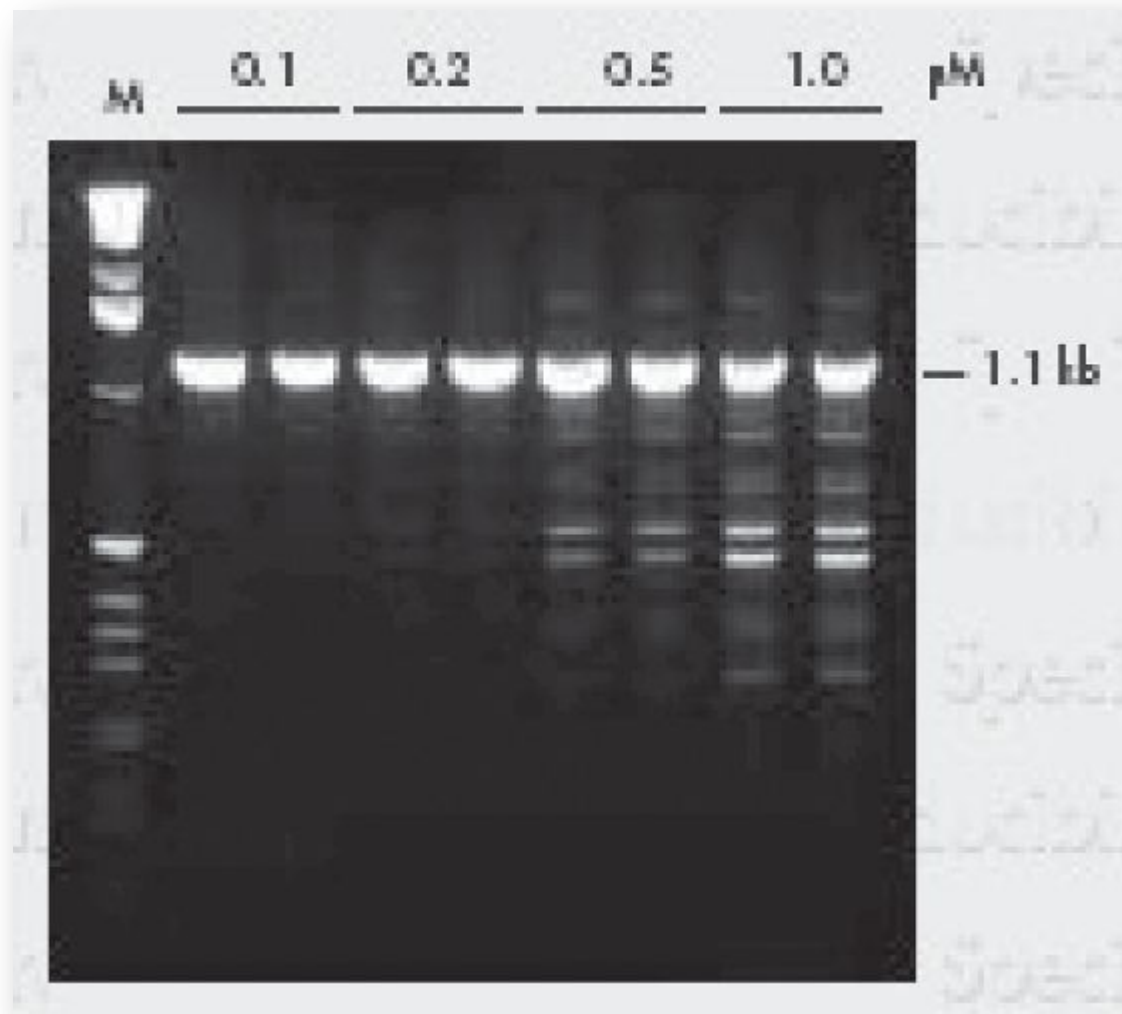


Уменьшение содержания ДНК в пробе >>>

- Обратимая инактивация *Taq*-ДНК-полимеразы резко увеличивает специфичность ПЦР
- Добавление в реакционную смесь некоторых соединений (DMSO, бетаин, 2-пирролидон) приводят к тому же эффекту

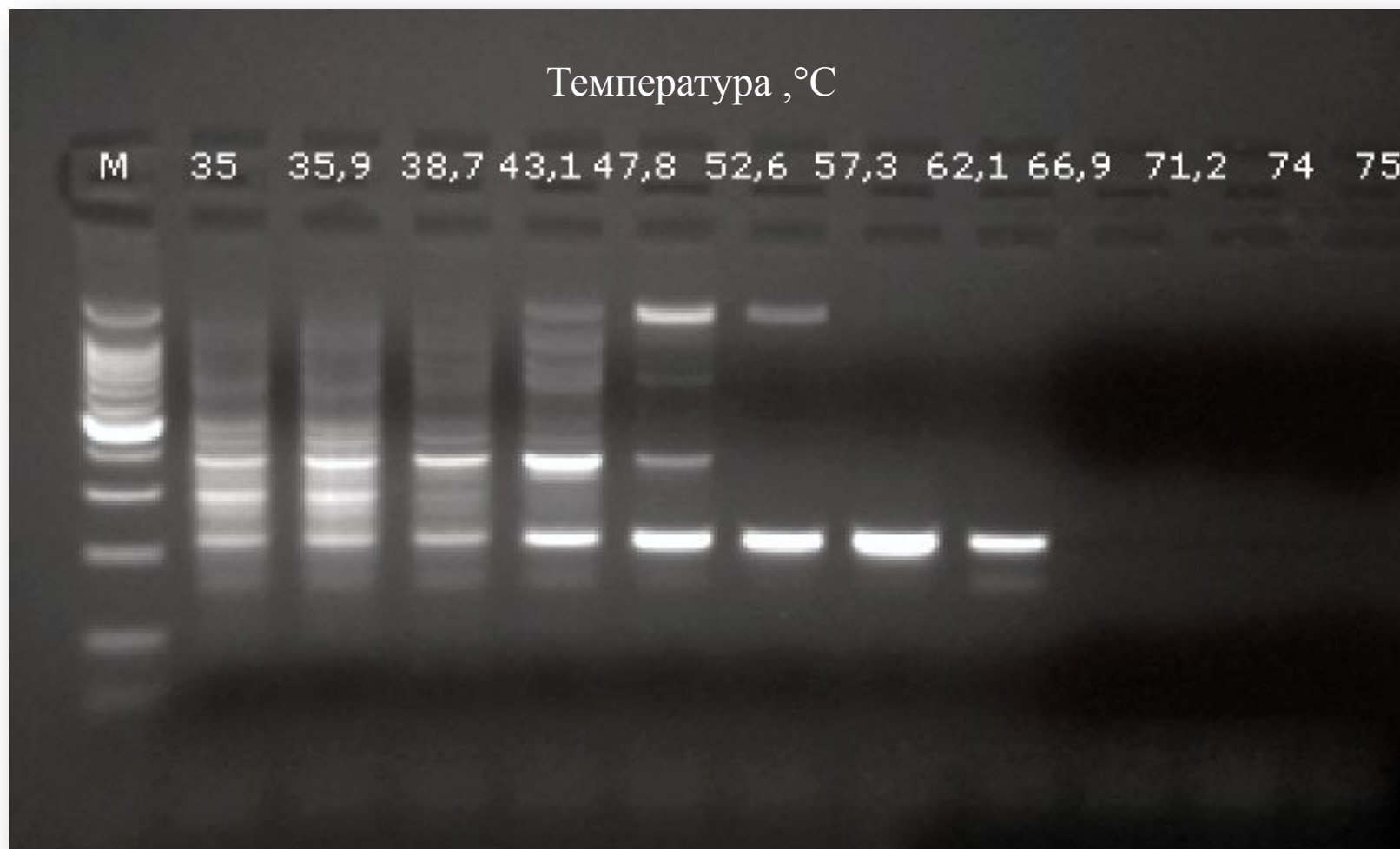
Аmplификация гена tPA

Влияние концентрации праймеров на специфичность ПЦР



Вверху указана
концентрация
праймеров

Влияние температуры отжига праймеров на специфичность ПЦР



Амплификация части гена фактора V системы свертывания крови человека

Точность синтеза ДНК некоторыми термостабильными ДНК-полимеразами

ДНК-полимераза	Частота ошибочного включения нуклеотидов $\times 10^{-6}$
Taq	8,0
Pfu	1,3
Смесь Taq/Pfu (50/1)	5,0

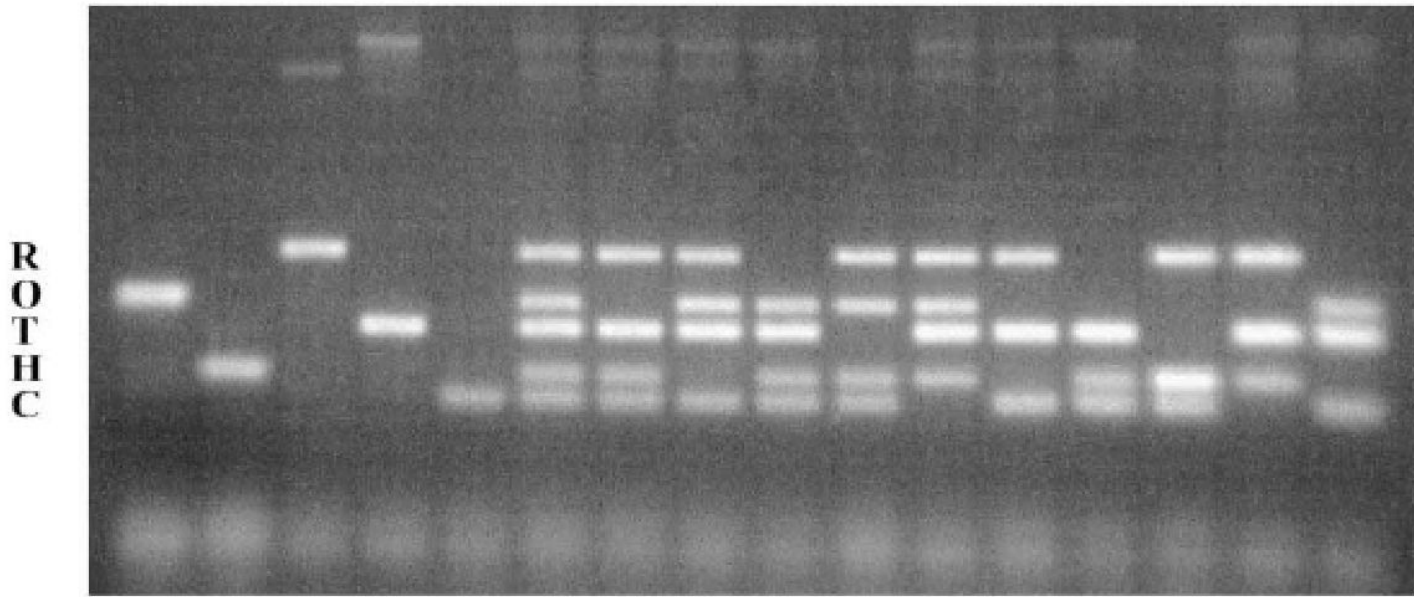
Методы ПЦР



Асимметричная ПЦР

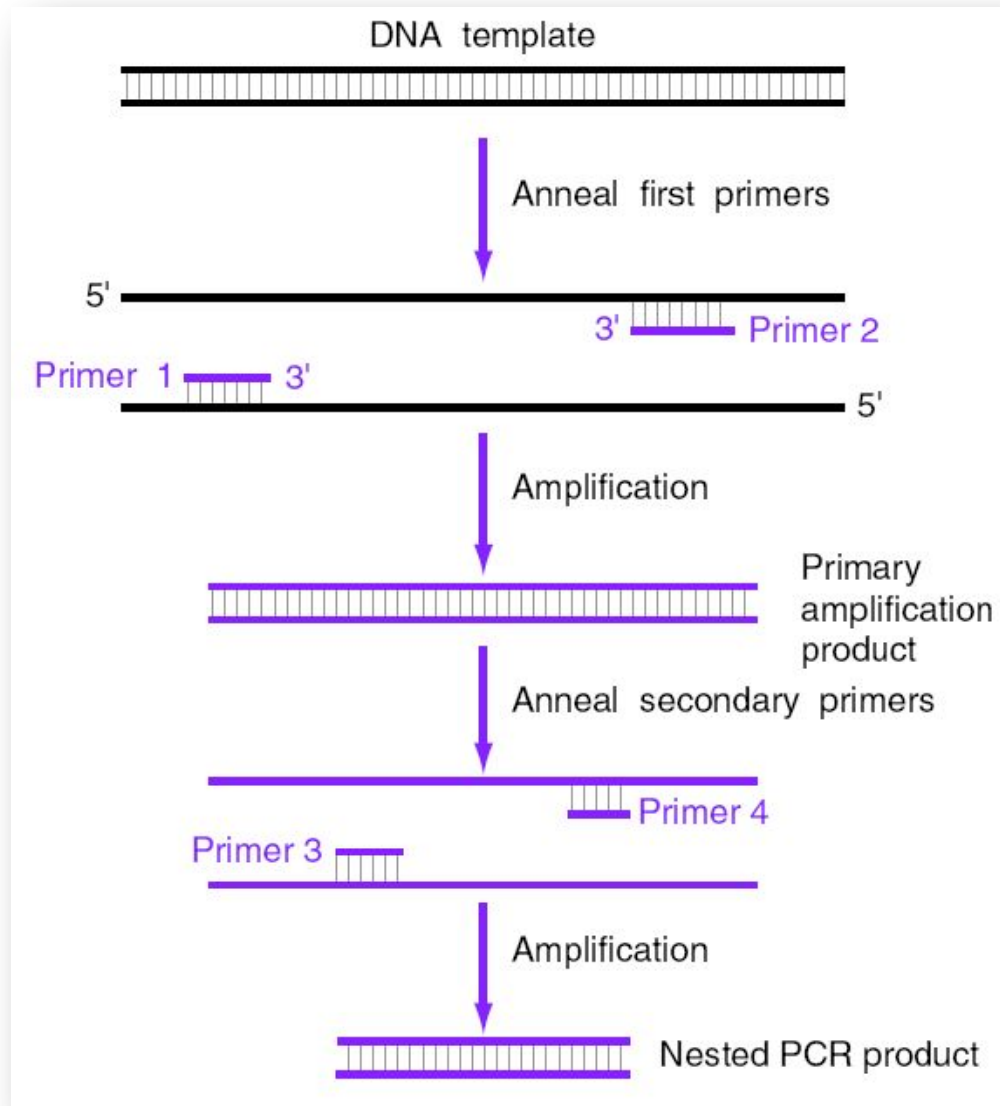
- **Амплификация с преимущественным использованием одного праймера**
 - **Один из праймеров в меньшей концентрации**
 - **В основном образуется одноцепочечный продукт ПЦР**
 - **Линейное увеличение продукта ПЦР**

Множественная ПЦР (Multiplex PCR) – одновременная амплификация нескольких ампликонов в одной пробирке



<i>O. ostertagi</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>H. placei</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>O. radiatum</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>T. colubriformis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>C. oncophora</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

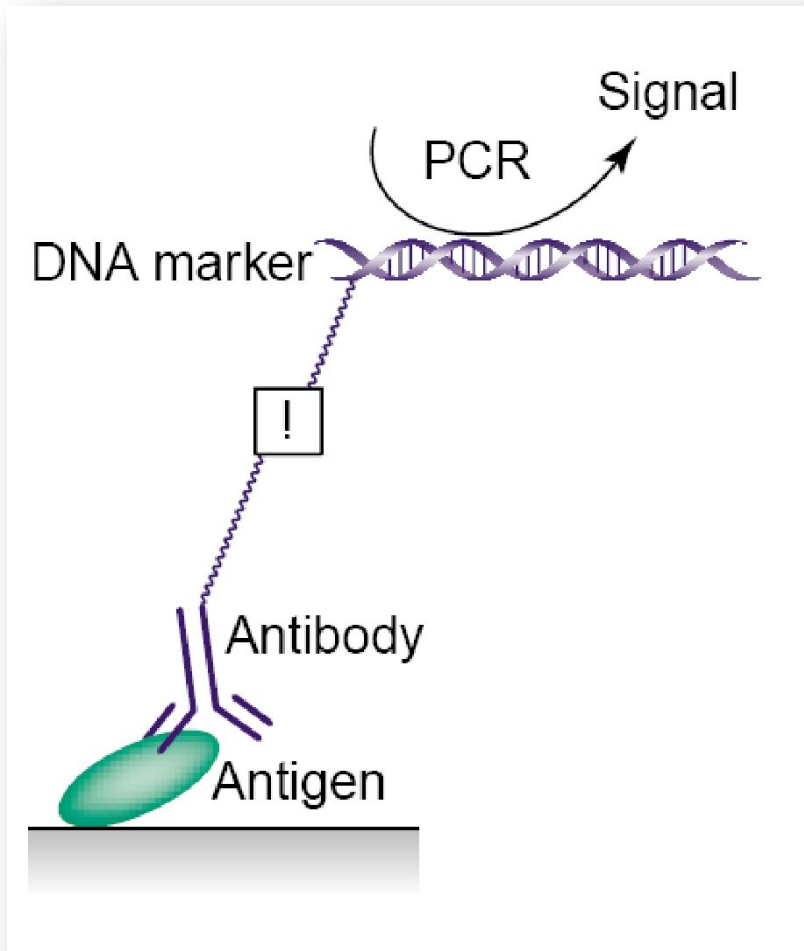
«Гнездовая» ПЦР (Nested PCR)



Амплификация больших участков ДНК с высокой точностью (Long PCR, LA PCR)

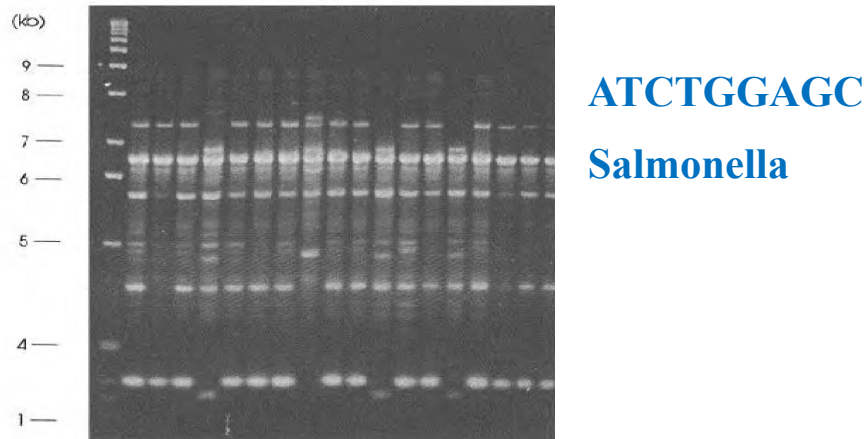
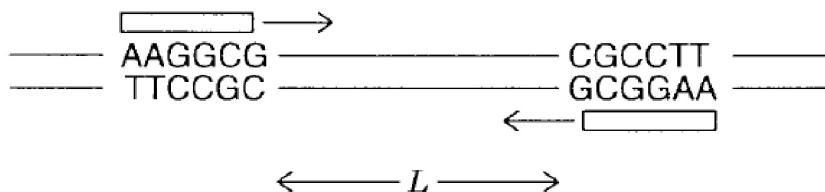
- Амплификация участков ДНК до 200 т.п.н. (целых эукариотических генов и вирусных геномов)
- Использование смесей из двух ДНК-полимераз, одна из которых обладает 3'→5'-экзонуклеазной активностью
- Использование высокоочищенных dNTPs

Иммуно-ПЦР (IPCR)



- ДНК-матрица конъюгирована с молекулами иммуноглобулинов, специфичных в отношении анализируемого антигена
- Конкурентная иммуно-ПЦР: конъюгат лиганда с ДНК-матрицей конкурирует со свободным лигандом за АТ
- 1000-Кратное увеличение чувствительности стандартного иммуноферментного метода

Случайная амплификация полиморфных последовательностей (метод RAPD)



Длина праймера, нт	Число продуктов PCR	Суммарное кол-во амплифицируемой ДНК (геном 3×10^9 п.н.) $L=2000$
8	1500	$1,5 \times 10^6$ п.н.
9	100	$1,0 \times 10^5$ п.н.
10	6	$6,0 \times 10^3$ п.н.

ПЦР *in situ*: амплификация участков ДНК или РНК в интактных клетках

- **Фиксация 10% формалином клеток и тканей, помещение в парафиновые блоки, пермеабелизация клеточных мембран протеиназами (пепсин), их удаление диэтилпирокарбонатом, амплификация с биотинилированными нуклеотидами, детекция**
- **Позволяет:**
 - **Локализовать анализируемые последовательности во внутриклеточном пространстве**
 - **Обнаруживать 1 копию последовательности на фоне 1 μg ДНК, т.е. уникальные гены и их транскрипты**
- **Находит широкое применение в вирусологии, онкологии и биологии развития**

Недостатки ПЦР, проводимой в обычном формате

- **Необходимость анализа продуктов ПЦР после завершения реакции**
 - Электрофорез
 - Гибридизация и т.п.
- **Опасность кроссконтаминаций продуктами ПЦР**
- **Невозможность количественной оценки содержания амплифицируемой матрицы в анализируемых образцах**

Обычная ПЦР не позволяет определять количество матричной ДНК или РНК в пробе

- Ни одна из стадий ПЦР не завершается с эффективностью 100%**
- Накопление ингибиторов ПЦР при прохождении реакции**
- Наименее эффективны завершающие циклы**
- Решение проблемы с помощью ПЦР в реальном времени**

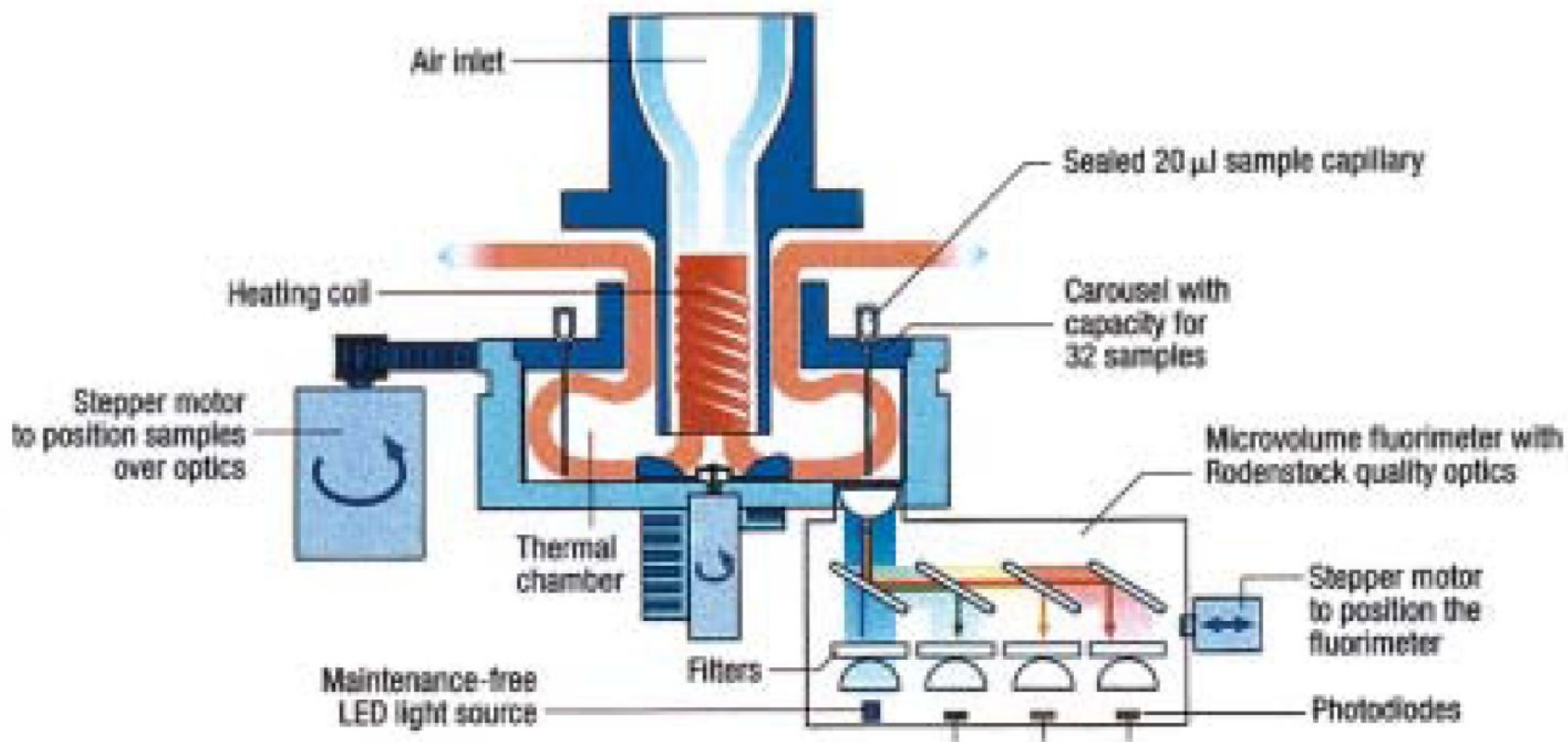
Количественная ПЦР

ПЦР в реальном времени

Real-time PCR

Позволяет, не открывая пробирки, непрерывно следить за накоплением продуктов ПЦР в пробах

Устройство капиллярного амплификатора LightCycler

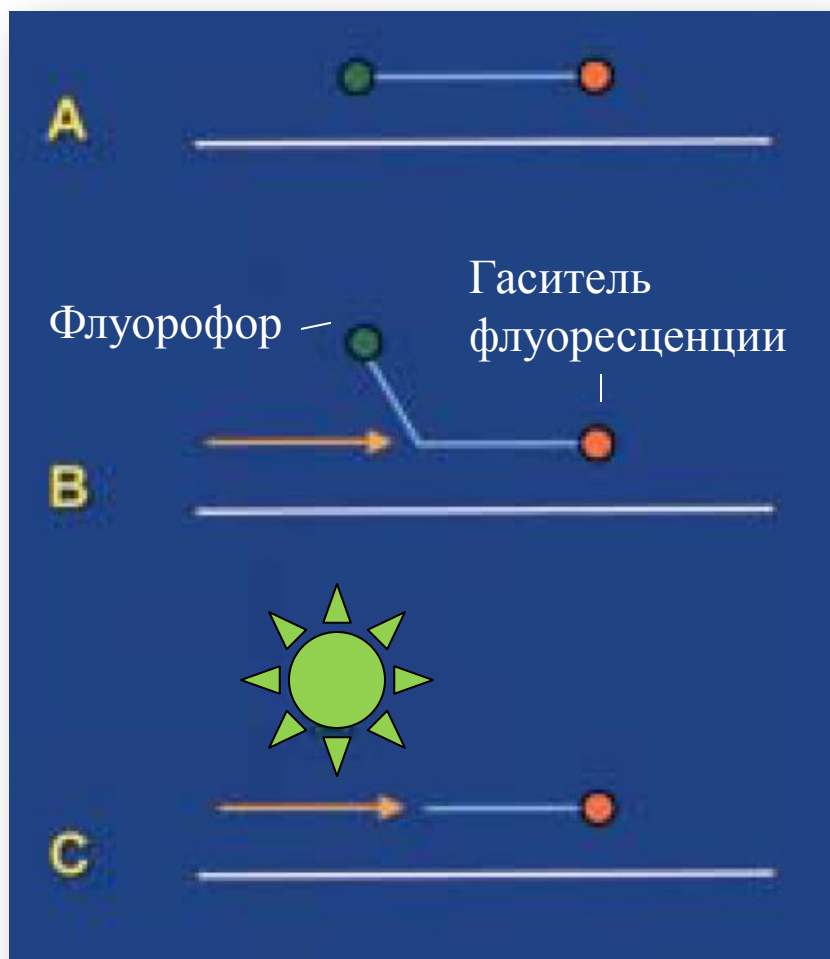


Капилляры объемом 20 мкл обеспечивают высокое соотношение поверхности к объему и высокую скорость теплообмена. 30 циклов завершаются за 20-30 мин

Российские производители амплификаторов для проведения ПЦР в реальном времени

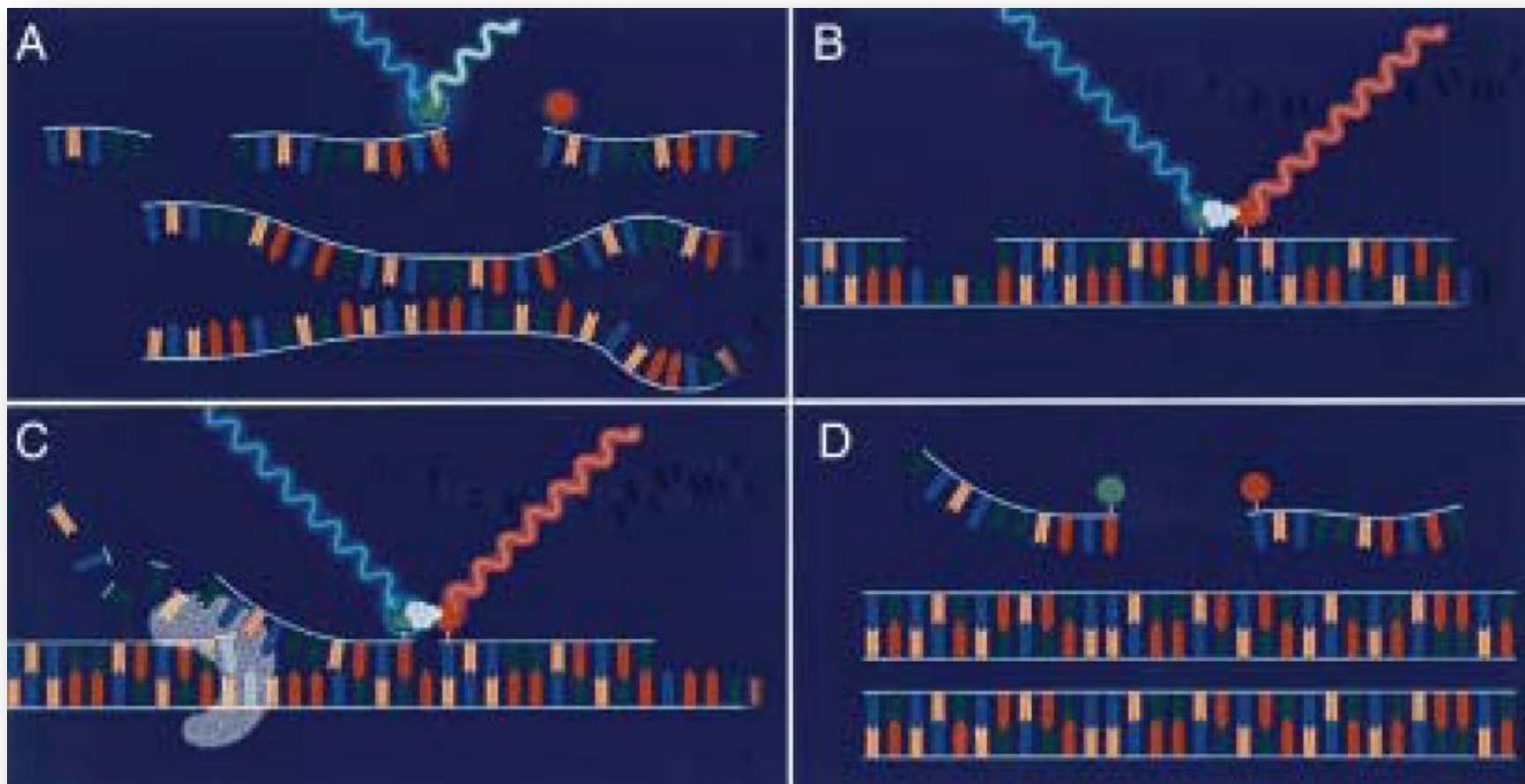
- *Институт аналитического приборостроения РАН, С-Петербург совместно с фирмой «Синтол», Москва*
- *Фирма «ДНК-Технология», Москва*
- *Флуоресцентно-меченые зонды – «ДНК-синтез», (ИБХ РАН), фирма «Синтол», Москва*

Принцип действия зондов TaqMan

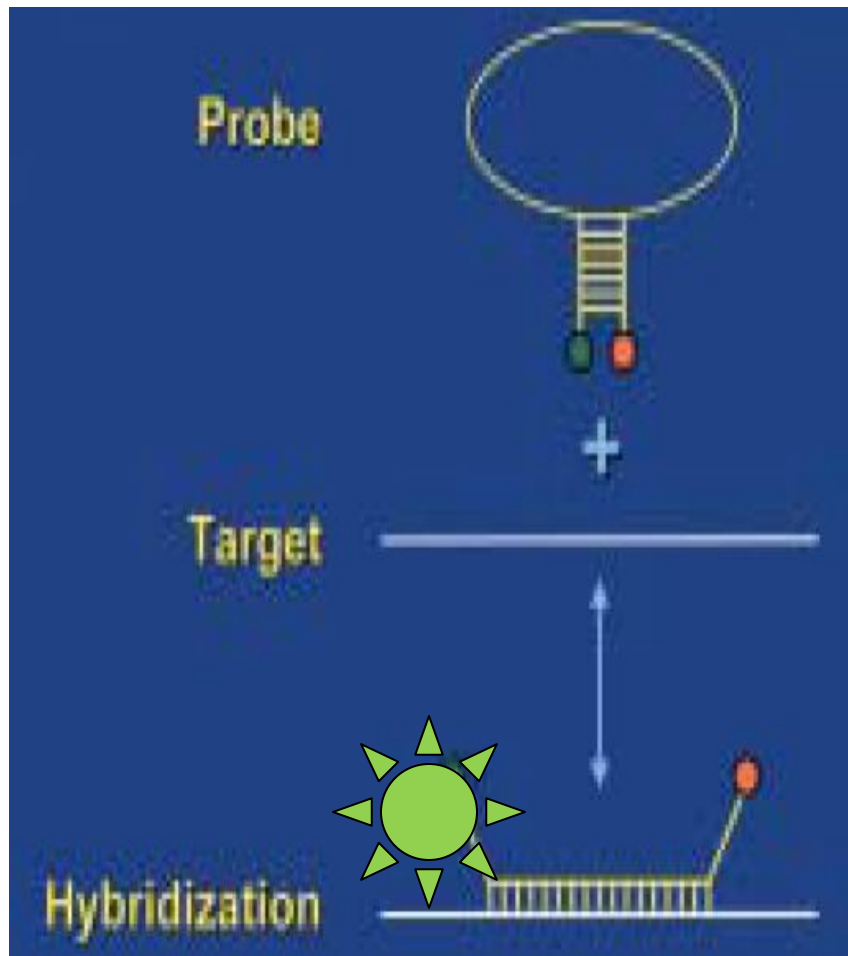


- 5'→3'-экзонуклеаза Taq-ДНК-полимеразы отщепляет флуоресцентный краситель, который начинает флуоресцировать в реакционной смеси

Принцип действия зондов, основанных на резонансном переносе энергии флуоресценции (FRET - fluorescence resonance energy transfer)

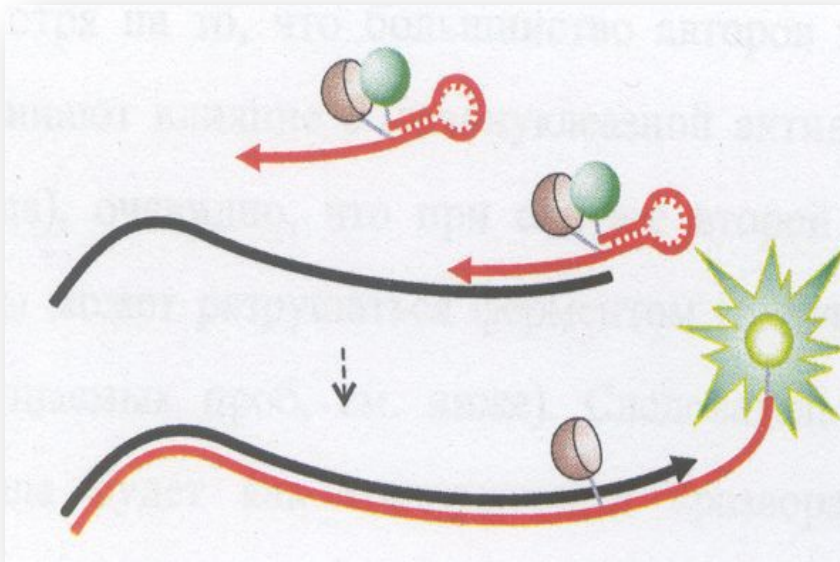


Принцип действия зондов – молекулярных маяков (molecular beacon probes)

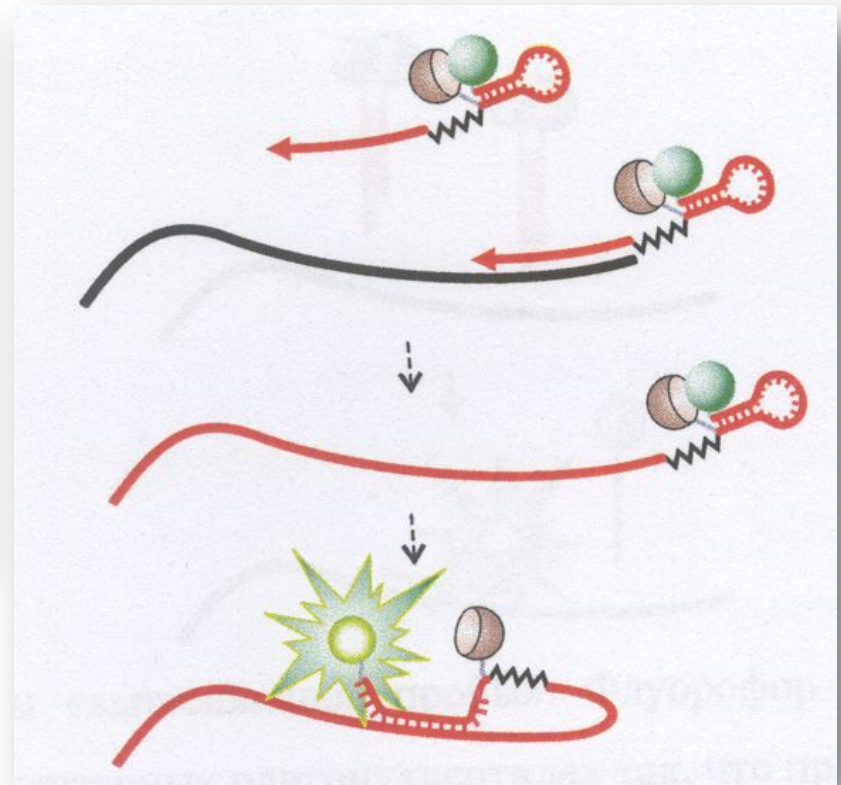


- В растворе зонды образуют структуру «стебель-петля», что приводит к сближению флуорофора и гасителя флуоресценции

Праймеры, меченые флуорофорами, в ПЦР в реальном времени

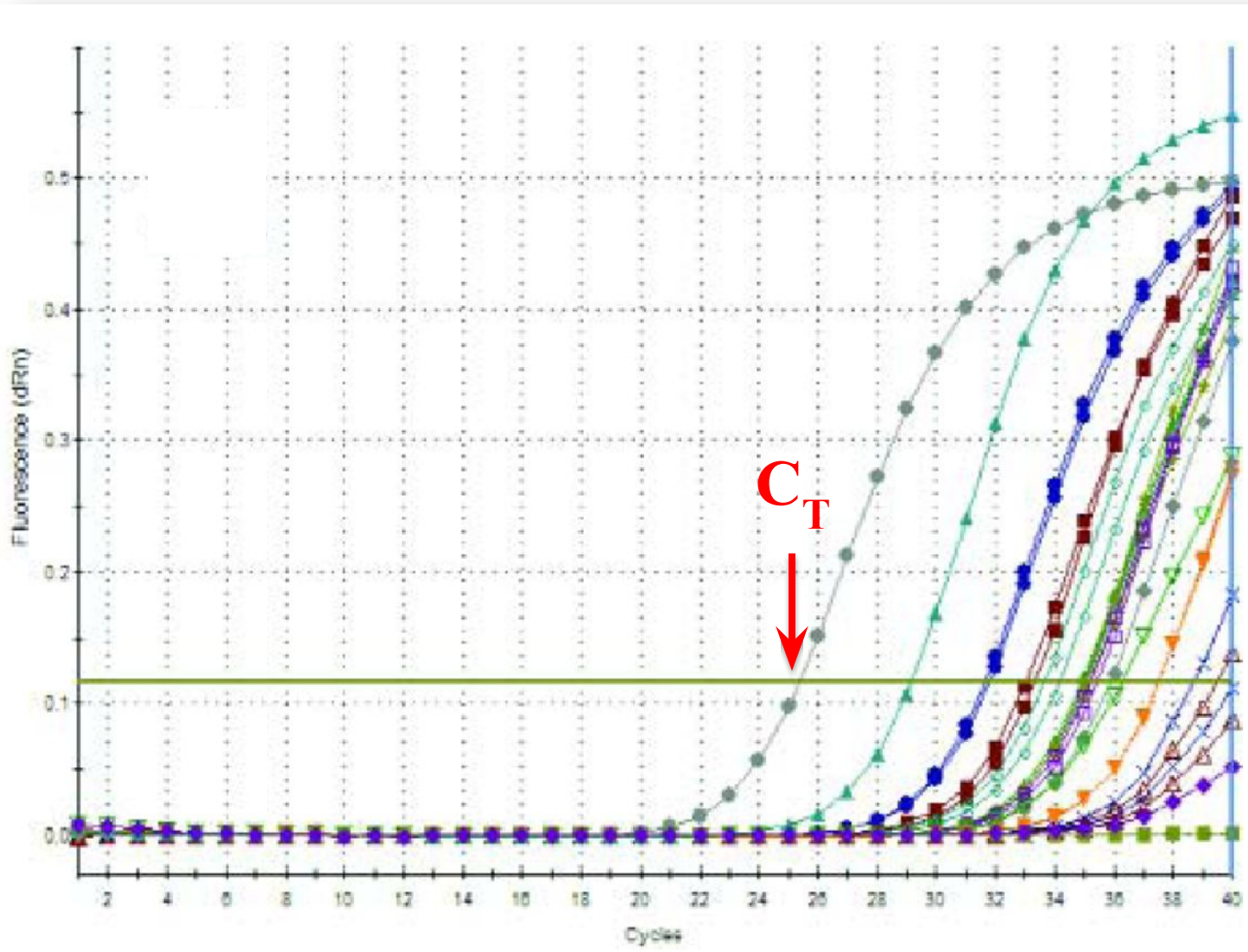


Праймеры
«Амплифлюр»



Праймеры
«Скорпион»

Мониторинг накопления продуктов ПЦР в реальном времени протекания реакции



C_T –
пороговый
цикл

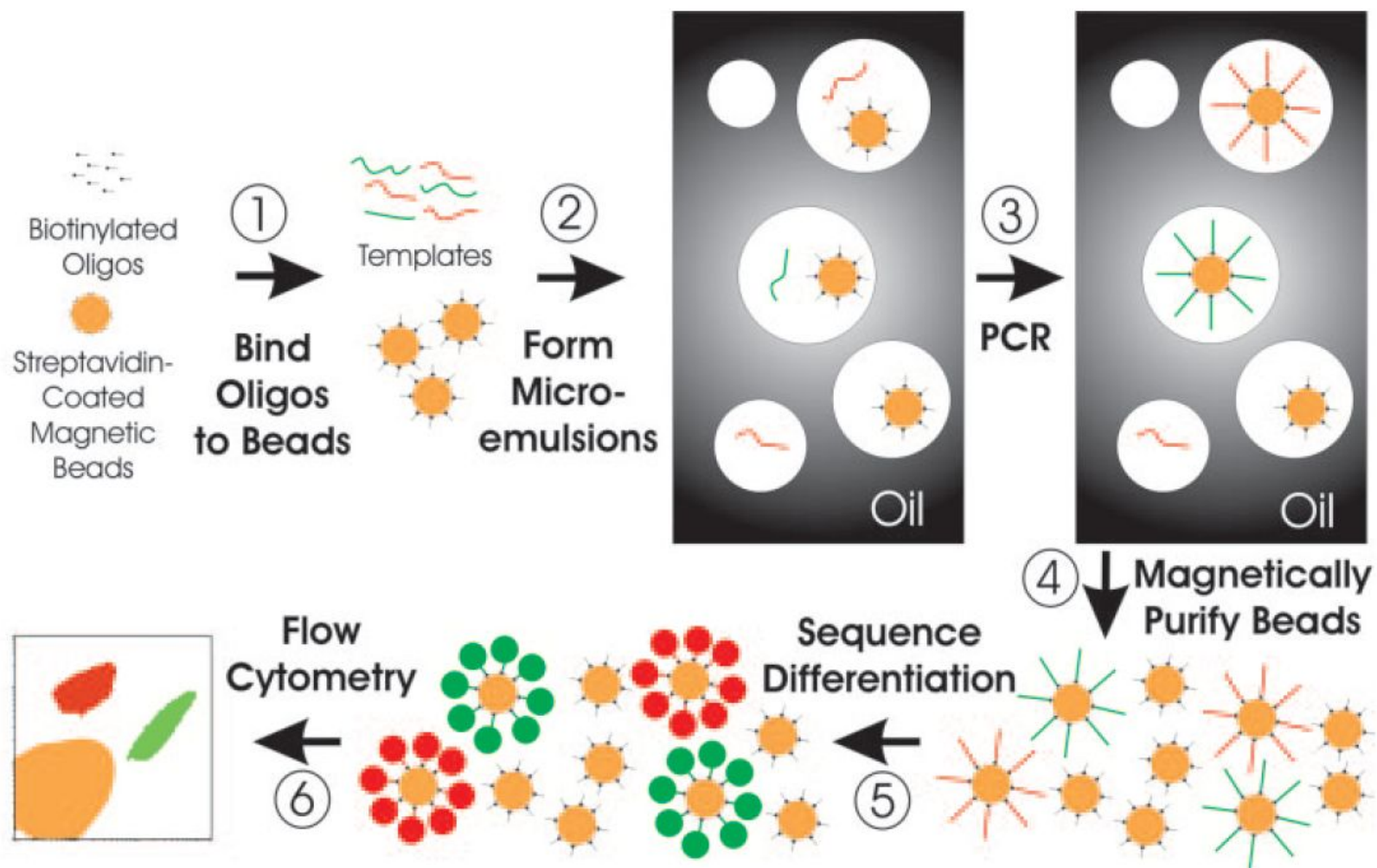
Калибровочная кривая для определения количества ДНК-матрицы в пробе



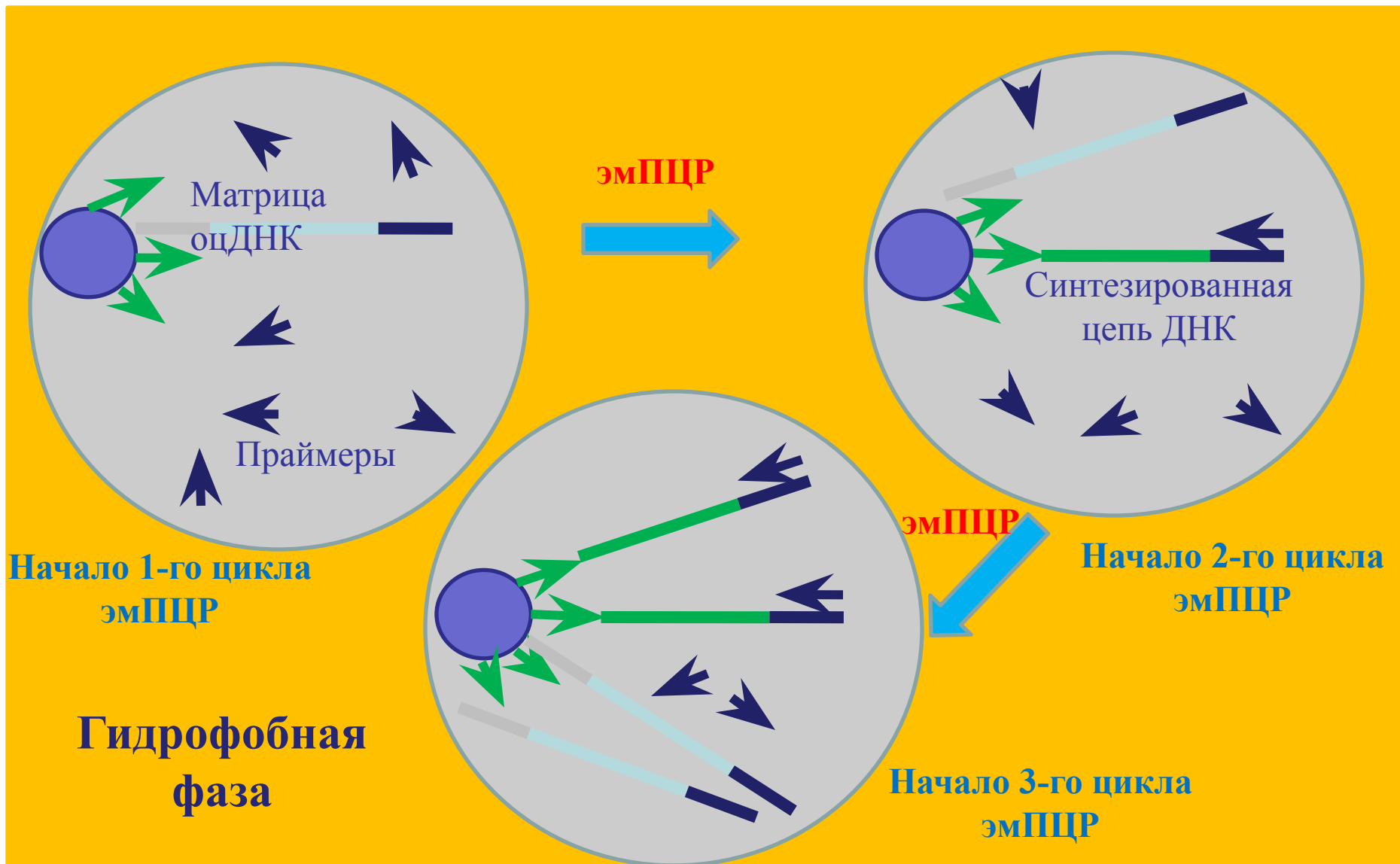
Определение числа плазмидных копий гена *F8* в трансфицированных клетках человека

Концентрация ДНК в крайних точках различается на 9 порядков

Цифровая ПЦР (Digital PCR) (на основе эмульсионной ПЦР)

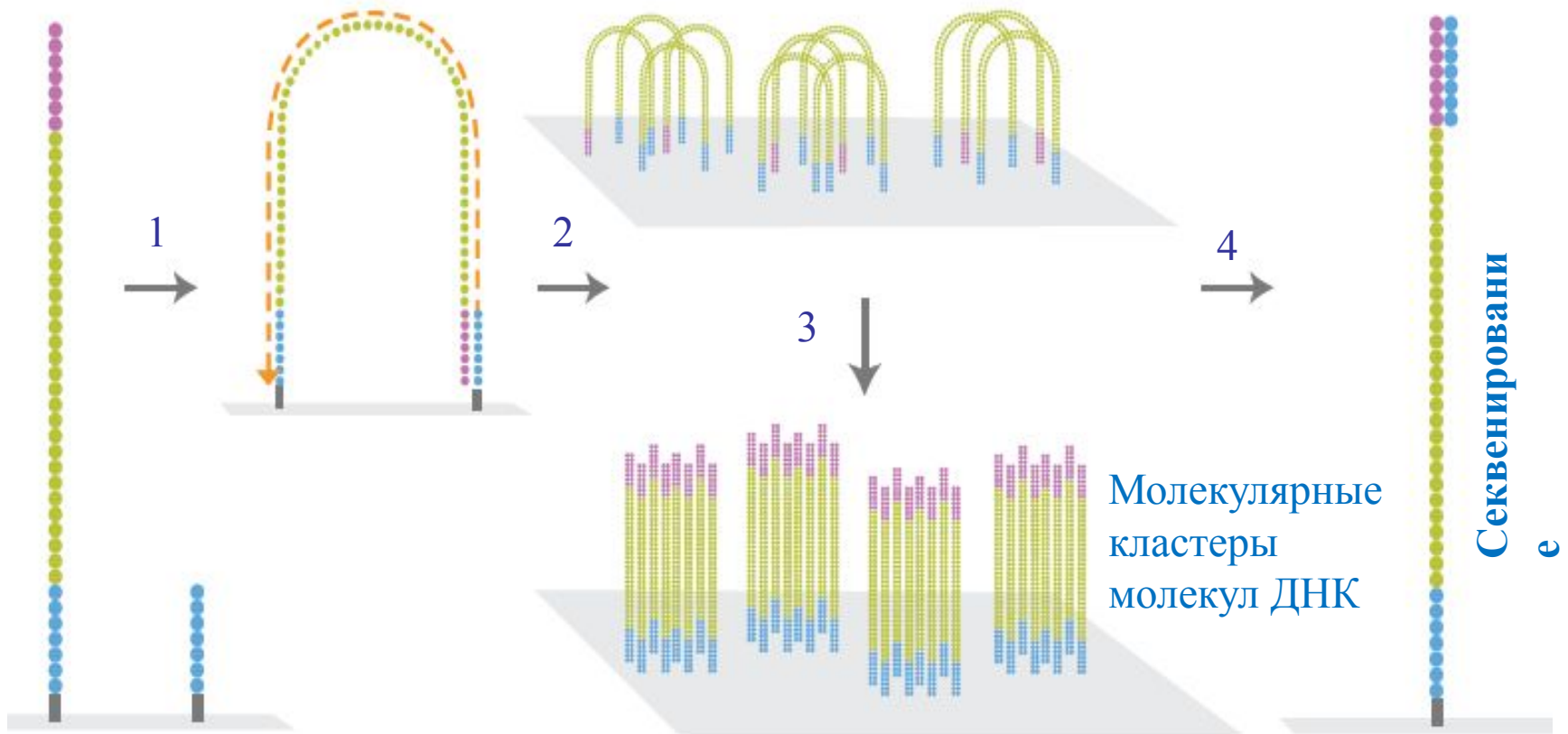


Эмульсионная (эм)ПЦР на мибочастицах с иммобилизованным праймером



Вторая стратегия получения полимеразных колоний в секвенаторах второго поколения

Аmplификация ДНК на твердой (стеклянной) подложке

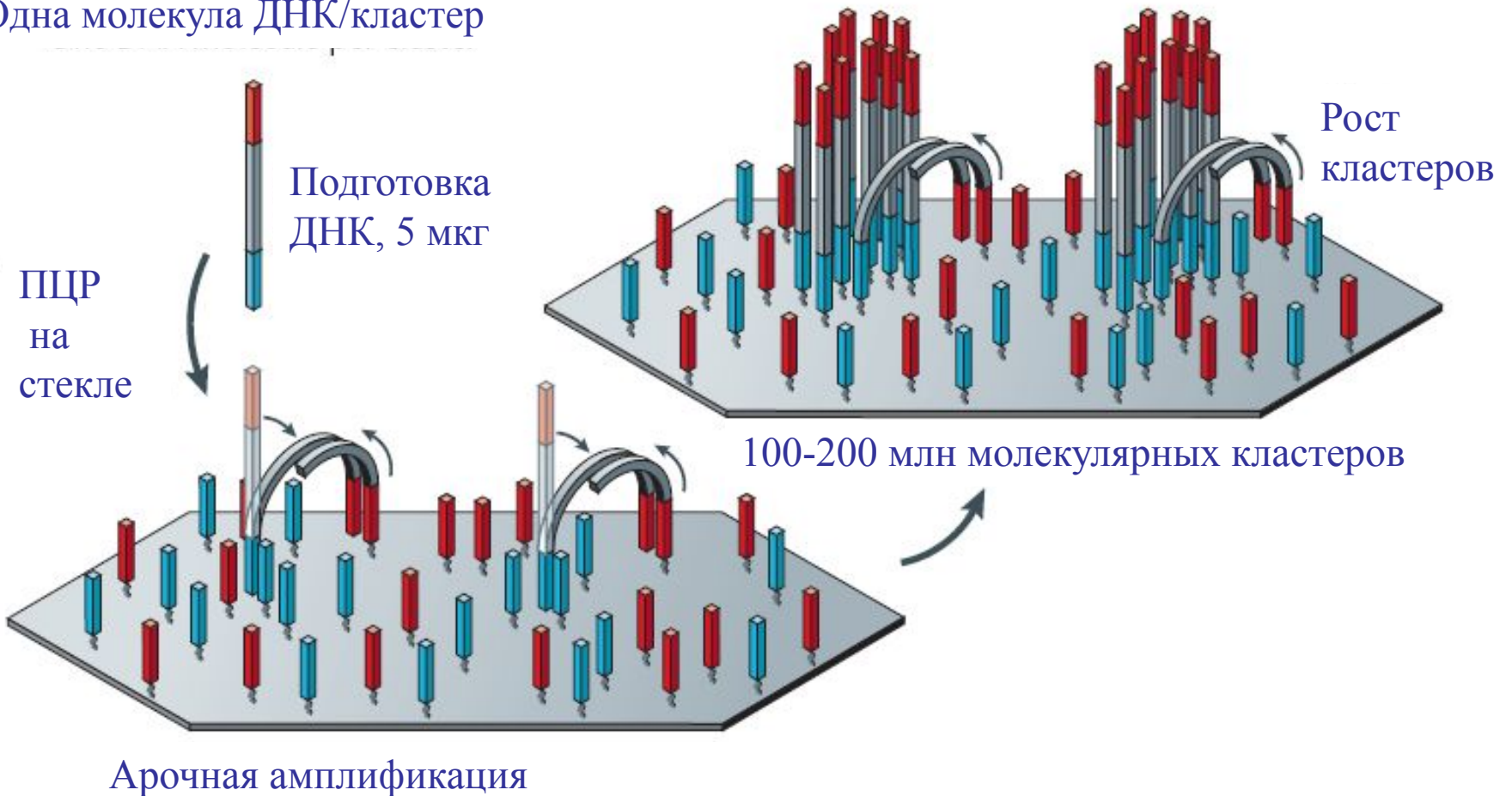


Иммобилизация праймеров и матрицы на стекле □
ПЦР

Стратегии получения полимеразных колоний в секвенаторах второго поколения

Illumina/Solexa

Одна молекула ДНК/кластер



ПЦР

в прикладных исследованиях

ДНК-диагностика

Что такое «ДНК-диагностика»?

- **Постановка диагноза заболевания или выявление предрасположенности к нему путем определения особенностей структуры генов (ДНК) обследуемого пациента**

Геном человека в связи его болезнями

- Количество известных генов, ассоциированных с болезнями – >1500 (*OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man*)
- Количество заболеваний, диагностируемых на генетическом уровне – >1000
- Количество генетических тест-систем, используемых в современной клинике – >650

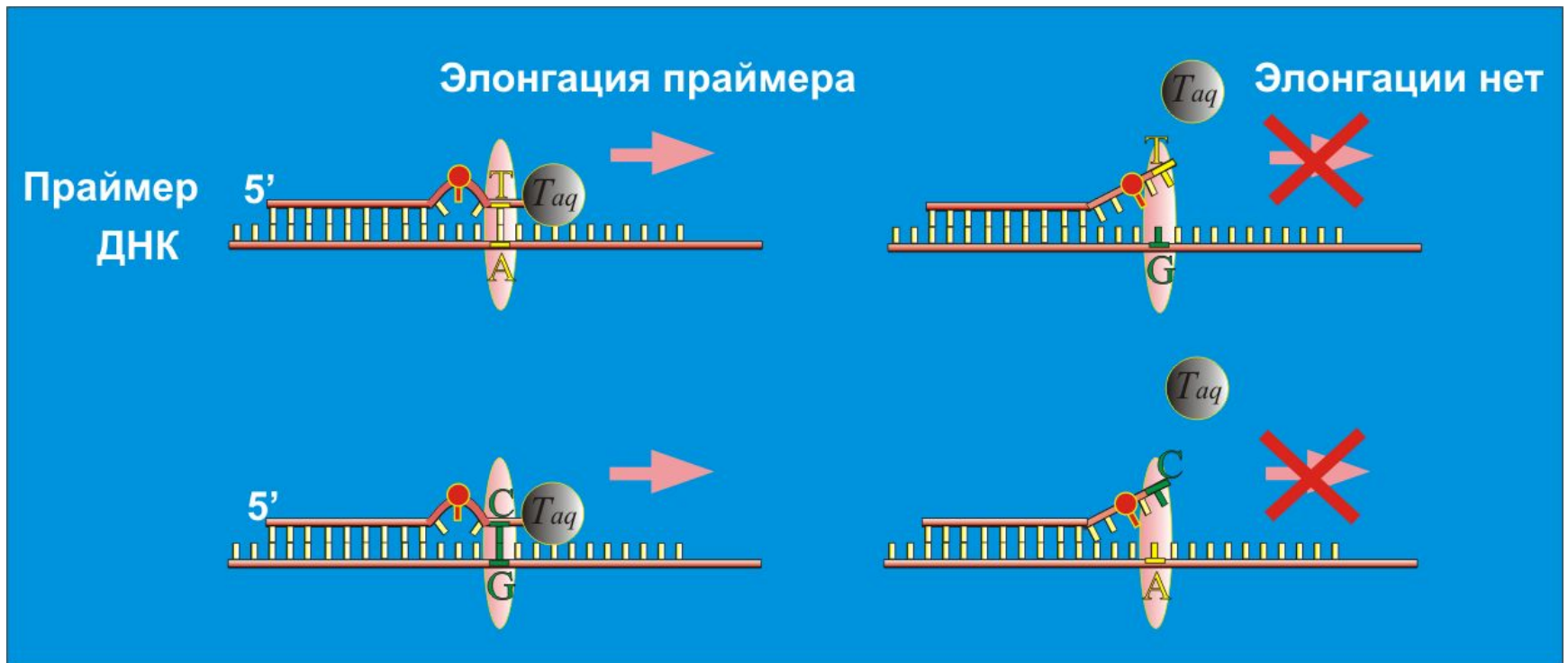
ДНК-полиморфизмы – основа генетической индивидуальности человека

- **Полиморфизмы – это мутации с частотой >1%**
- **SNP – (single nucleotide polymorphisms)
полиморфизмы по отдельным нуклеотидам –
обнаружено в геноме человека – >10,000,000**
- **Геномы двух людей различаются по ~1,500, 000
SNP, (1 SNP/180 п. н., исследовано 137 человек)**
- **CNV – copy number variation (различия в числе
копий участков генома)**

Поиск SNP в генах человека

- Поиск SNP в генах пациентов, ассоциированных с заболеваниями – одно из главных направлений современных медико-генетических исследований

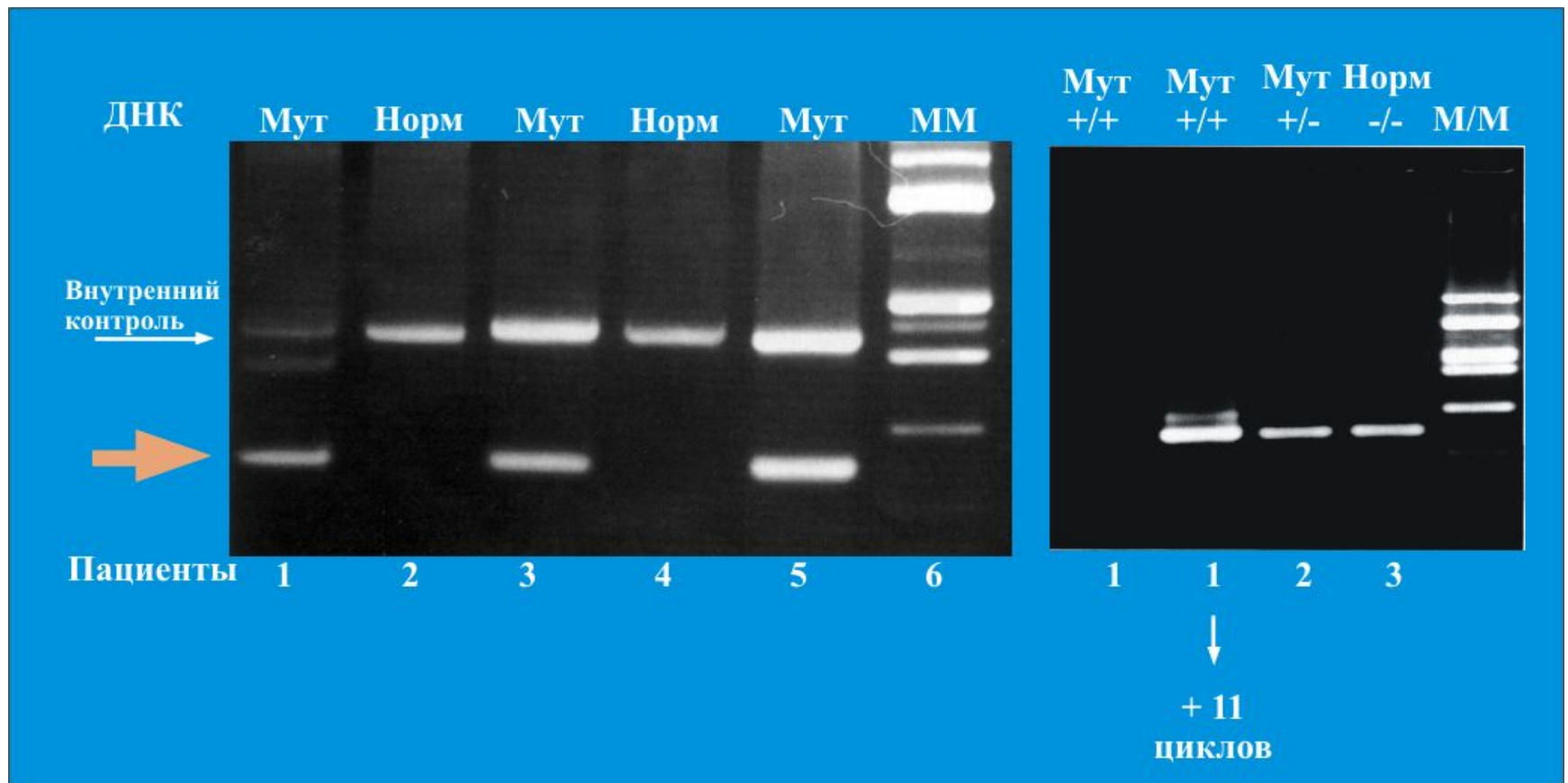
Аллель-специфическая ПЦР



Принцип действия аллель-специфических праймеров:

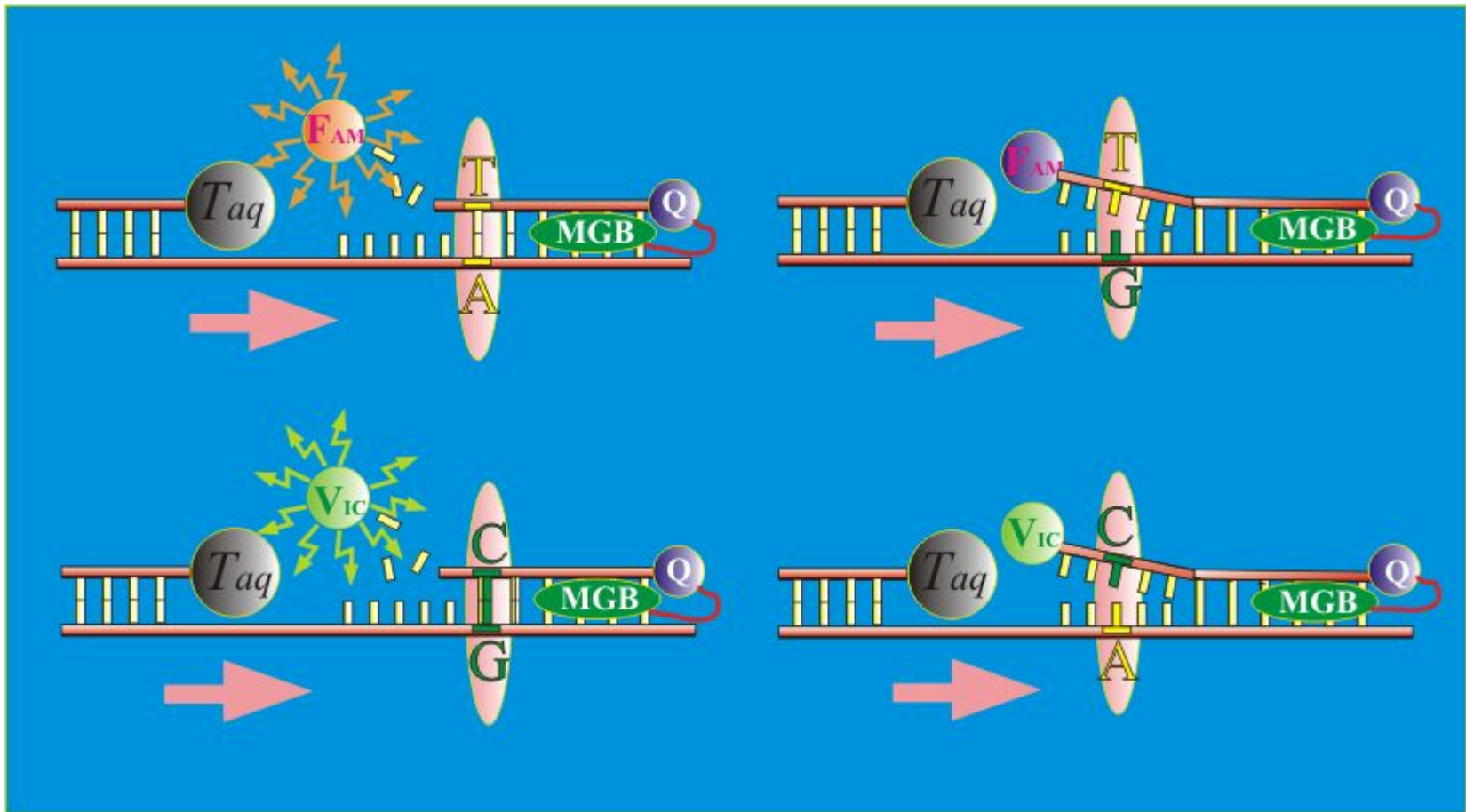
Элонгация праймера происходит только в том случае, если его 3'-концевой нуклеотид комплементарен матричной ДНК

Выявление мутации *FV Leiden* в геноме человека с использованием аллель-специфической ПЦР

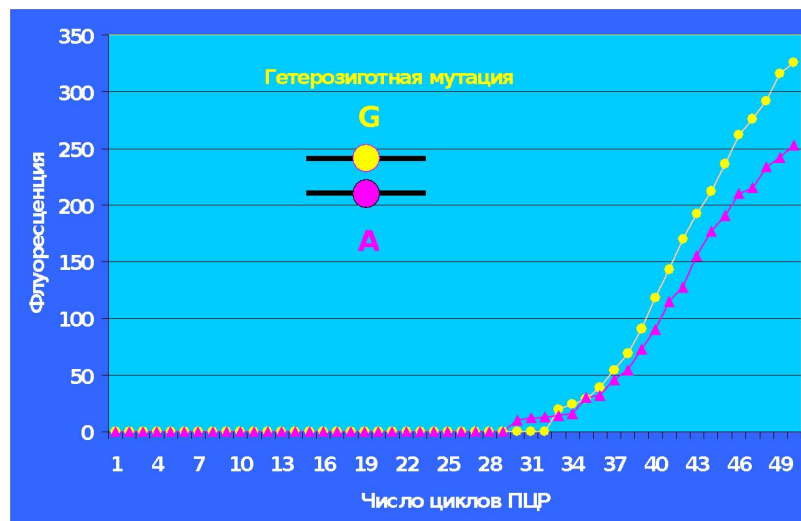
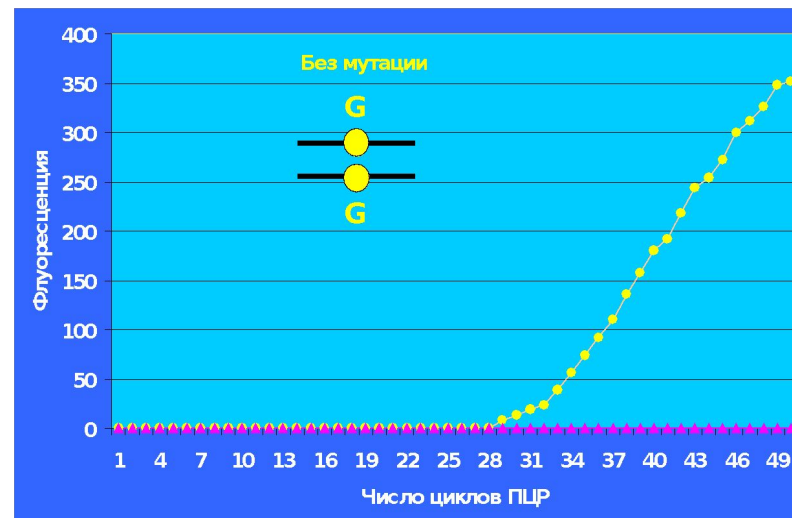
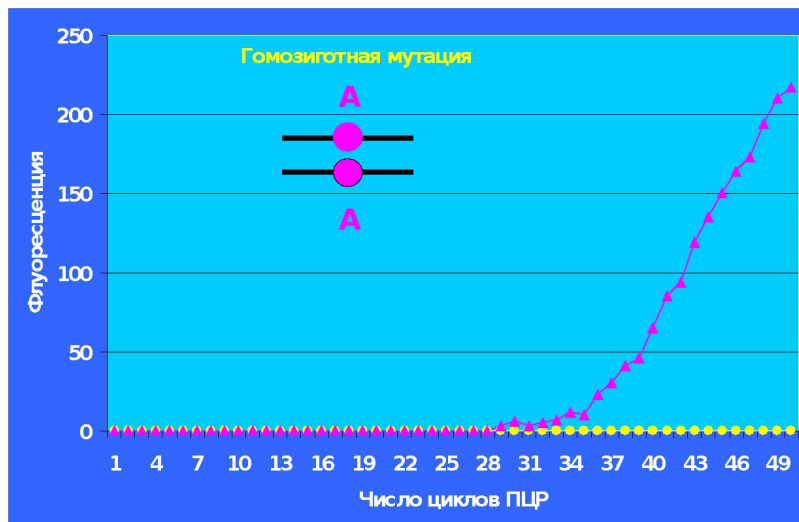


Электрофорез продуктов ПЦР в 3% агарозном геле

ПЦР в реальном времени: принцип действия системы TaqMan с аллель-специфическими зондами



Выявление мутации FV *Leiden* с помощью ПЦР в реальном времени и аллель-специфических зондов



**Будущее ДНК-диагностики –
это высокопроизводительное
параллельное секвенирование
ДНК**