

Основные принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР)



Круг основных вопросов

Основные принципы
ПЦР. Часть I

Основные принципы молекулярной
биологии

Что представляет собой ПЦР

Фазы ПЦР

Основные принципы ПЦР.
Часть II

Что представляет собой ПЦР в
реальном времени

Качественная ПЦР в реальном времени

Количественная ПЦР в реальном времени

Основные принципы ПЦР.
Часть III

Что такое температура плавления

Анализ кривых плавления

Цели обучения

Общая цель этого модуля — дать представление о методах ПЦР, используемых в GeneXpert

По завершении курса обучения пользователь получит следующие знания:

- Перечислить элементы, участвующие в процессе ПЦР
- Объяснить процесс ПЦР и описать этапы ПЦР
- Определить термин «RT-PCR» (2 возможных значения «RT» в отношении ПЦР: «в реальном времени» и «с обратной транскрипцией»)
- Описать кривые ПЦР-РВ, определить C_t
- Объяснить, как методом ПЦР-РВ можно выполнить количественное определение
- Определить температуру плавления
- Объяснить, как анализ кривой плавления позволяет определить устойчивость микроорганизмов

Основные принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР) – I



Основные принципы молекулярной биологии

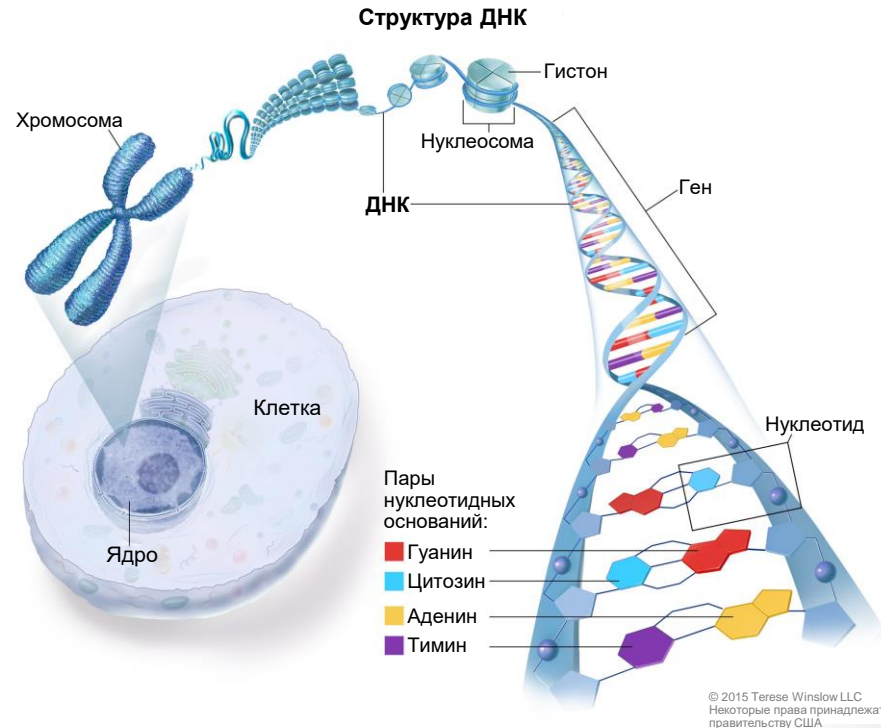
Краткое напоминание



Основные принципы молекулярной биологии

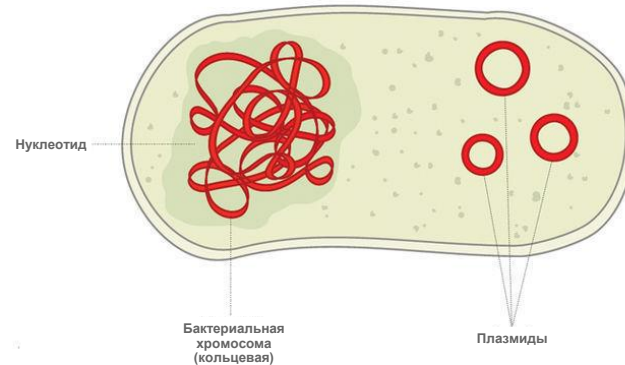
ДНК содержит генетическую информацию

- ДНК состоит из двойной спирали
- В ДНК закодирована генетическая информация (различные гены, различная информация)
- ДНК организована в длинную цепь, образующую хромосомы
- Ядро клетки человека содержит 23 пары хромосом



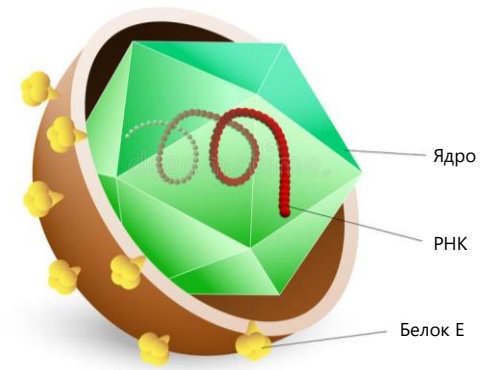
Генетический материал бактерий


- Генетическая информация бактерий закодирована в ДНК
- Геном большинства бактерий состоит из одной молекулы ДНК, замкнутой в кольцо и расположенной в регионе, называемом нуклеотидом (не имеет ограничителя в виде мембраны)
- Нехромосомные генетические элементы (например, плазмиды и бактериофаги) часто определяют резистентность к антибактериальным препаратам, образование факторов вирулентности или другие функции.



Генетический материал вирусов

- Вирус — это небольшой организм-паразит, который не может самостоятельно воспроизводиться. Он зависит от механизмов клетки хозяина.
- Геном вируса может иметь различные формы: РНК или ДНК, одноцепочечные или двухцепочечные, линейные, кольцевые или даже сегментированные



Пример: вирус гепатита С 

Элементы, из которых состоит ДНК

ДНК состоит из 4 нуклеотидов

- A = аденин
- T = тимин
- C = цитозин
- G = гуанин

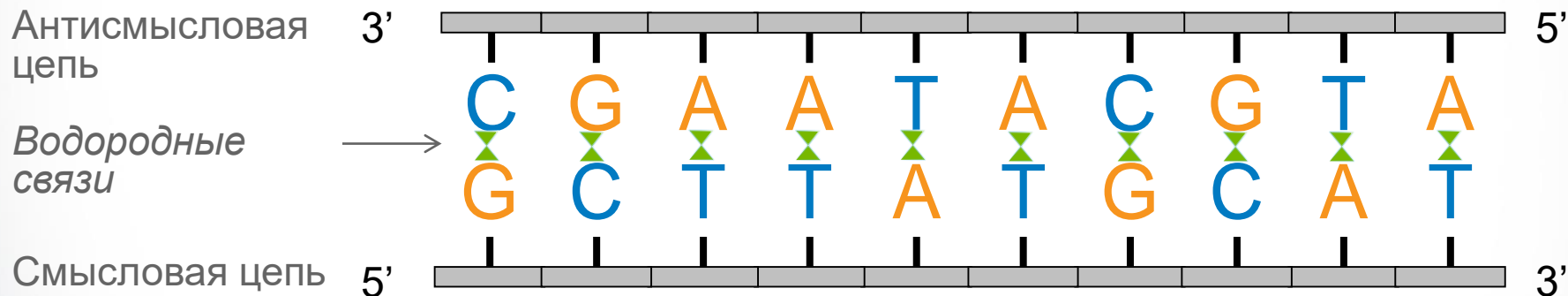


Эти 4 основания сцеплены друг с другом и образуют последовательность (одну цепочку ДНК)



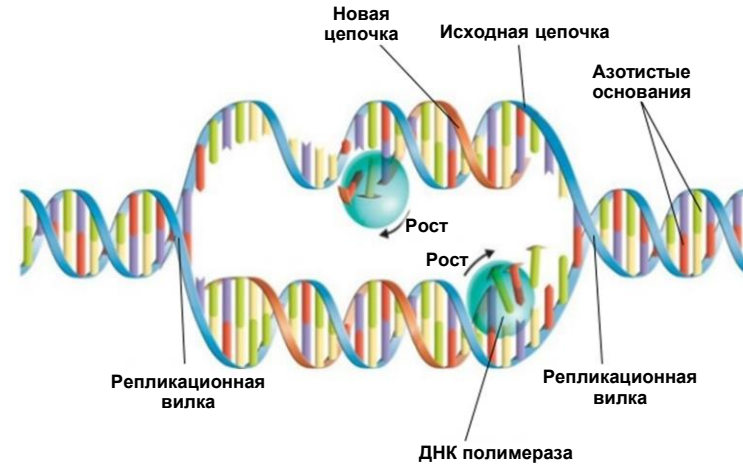
Основы молекулярной биологии

Основная часть ДНК имеет структуру двойной цепочки со строго определенным расположением пар нуклеотидов:



Репликация ДНК

- Новая ДНК образуется при действии ферментов, называемых **ДНК-полимеразы**. Они синтезируют ДНК только в направлении от 5' к 3'.
- Другой фермент, называемый праймазой, образует **РНК-праймер** для запуска работы полимеразы.
- После образования РНК-праймера ДНК-полимераза его «удлиняет», добавляя нуклеотиды по одному для образования новой цепочки ДНК, которая комплементарна матричной цепи.



Copyright Pearson Prentice Hall

Что представляет собой ПЦР

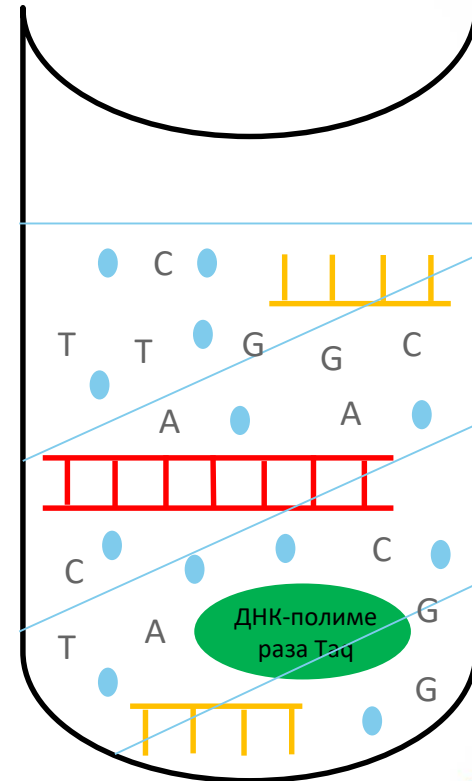


Что такое ПЦР?

1. ПЦР (полимеразная цепная реакция) является **цепной реакцией**, в результате которой образуется множество копий конкретной последовательности ДНК, находящейся в образце.
2. Амплификация ДНК происходит при **повторяющихся циклах изменения температуры**
3. Число копий заданной последовательности **удваивается** после каждого цикла
4. После сорока циклов из одной копии образуются приблизительно 2 триллиона копий

Компоненты ПЦР

- **Матричная ДНК** (ген вируса, бактерии или человека)
- **дНТФ** (смесь всех четырех нуклеотидов, необходимых для построения новой ДНК: А, Т, С, G)
- **Праймеры** (олигонуклеотиды, состоящие примерно из 20 нуклеотидов, которые присоединятся к целевой ДНК)
- **Полимераза** (натуральная термостабильная ДНК-полимераза Taq, имеющая оптимум температуры примерно 70 °С)
- **Буфер** (Mg²⁺, Трис-НСl, Тритон) создает оптимальные условия для работы полимеразы

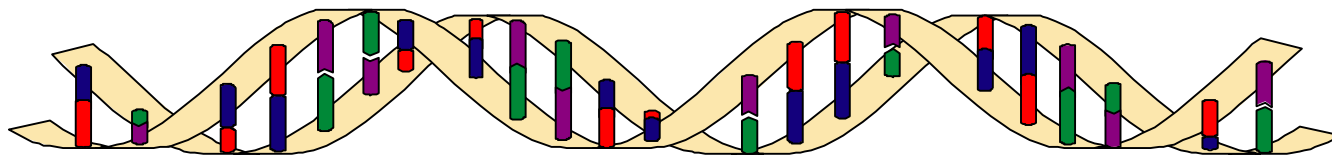


Фазы ПЦР



Первая фаза цикла ПЦР — денатурация

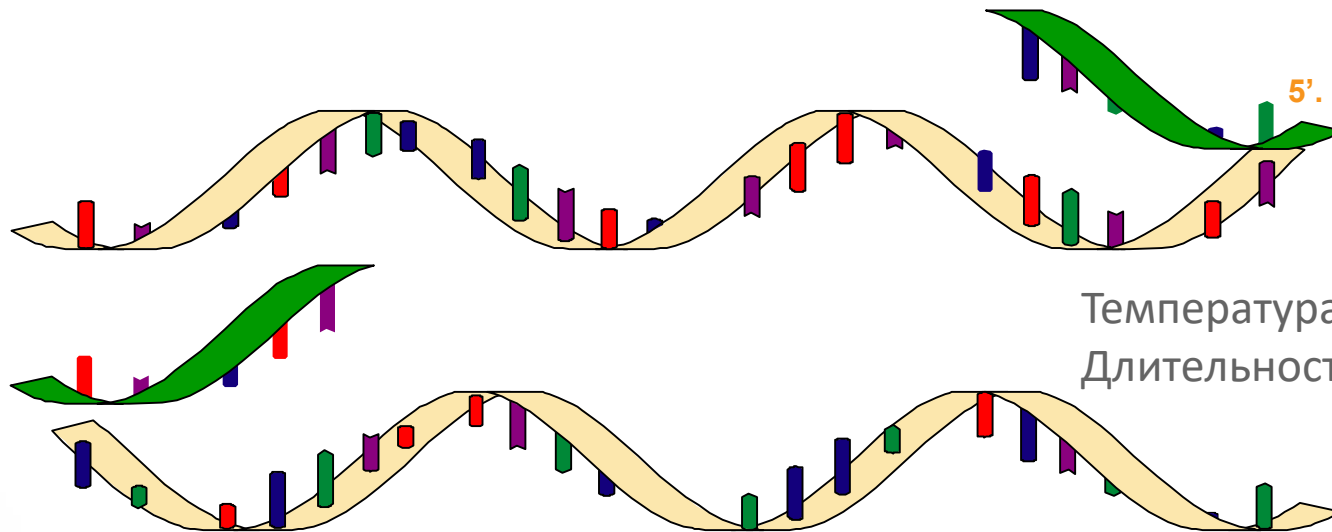
разделение цепочек ДНК



- 90–95 °C
- 20–30 с

Вторая фаза цикла ПЦР — ОТЖИГ

связывание специфического праймера



5'. Обратный праймер

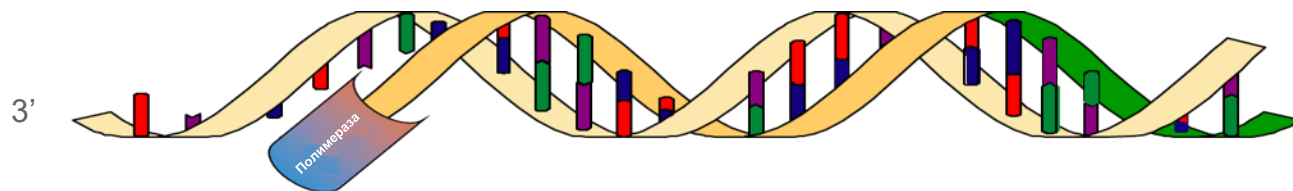
Температура: 40–65 °C

Длительность: 20–40 секунд

Прямой праймер 5'

Третья фаза цикла ПЦР — элонгация

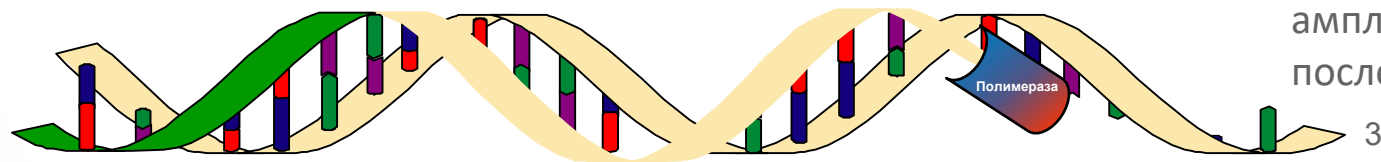
Синтез цепочки ДНК



5'. Обратный праймер

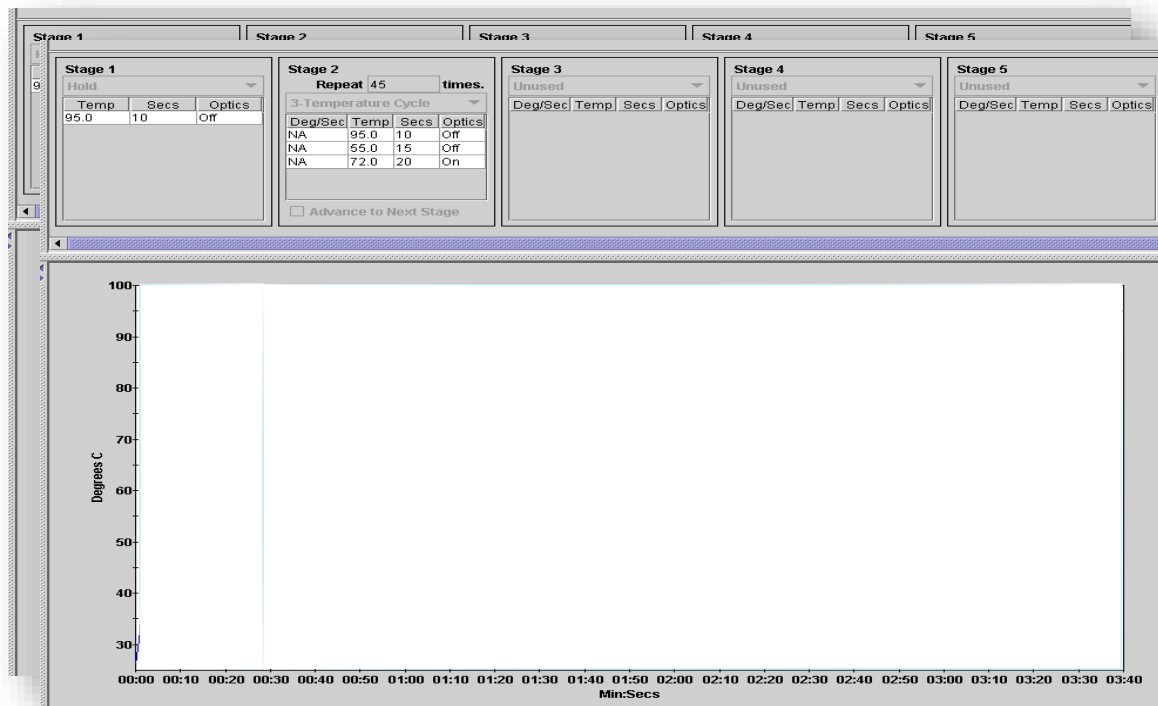
- 60–75 °C

Длительность
зависит от размера
амплифицируемой
последовательности



Прямой праймер 5'

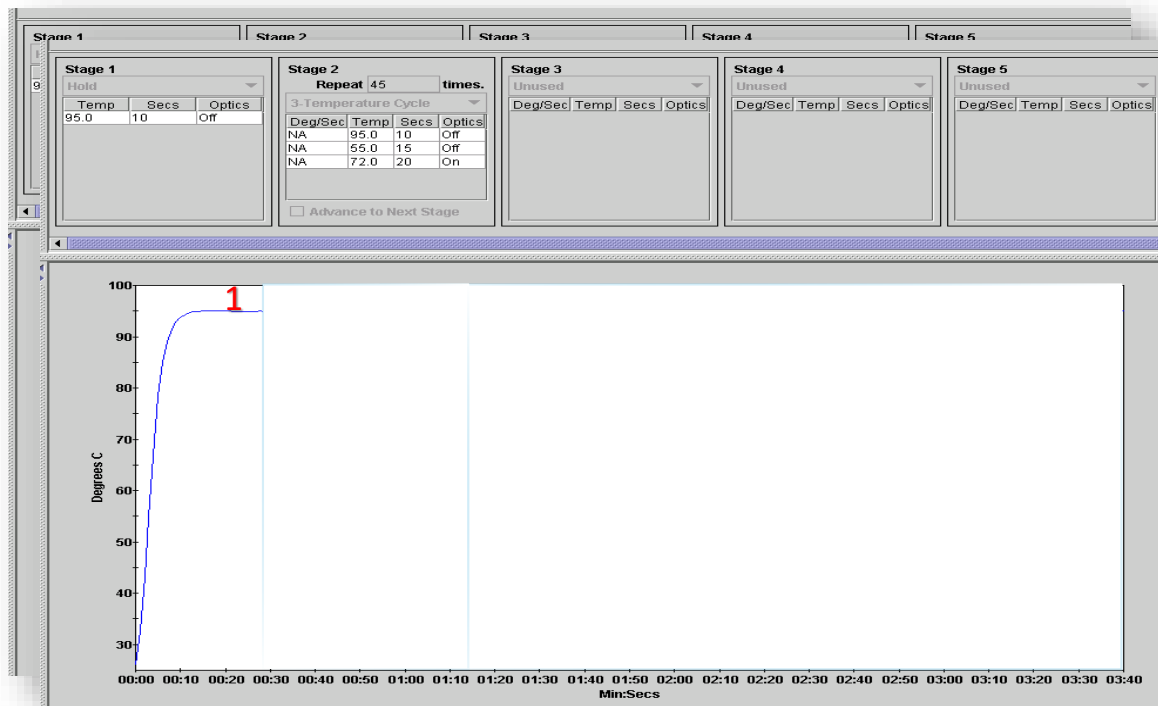
Профиль температуры в циклах ПЦР



1. Денатурация

Примечание: ПЦР обычно состоит из 30–40 циклов

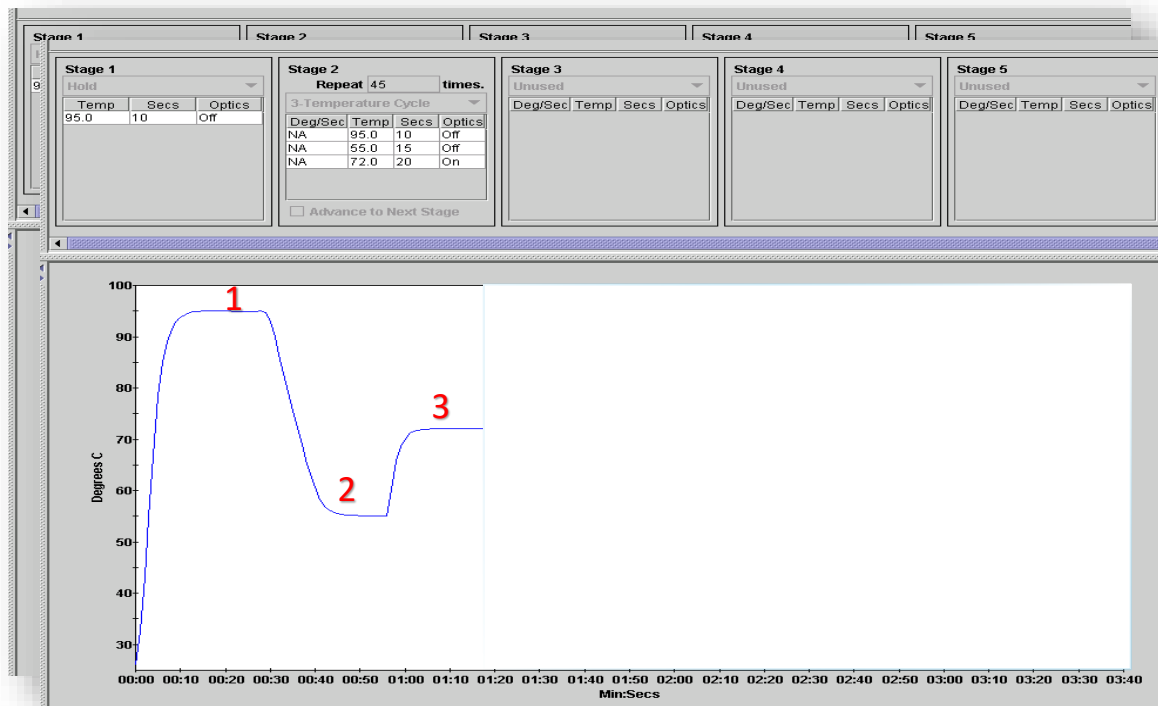
Профиль температуры в циклах ПЦР



2. Отжиг

Примечание: ПЦР обычно состоит из 30–40 циклов

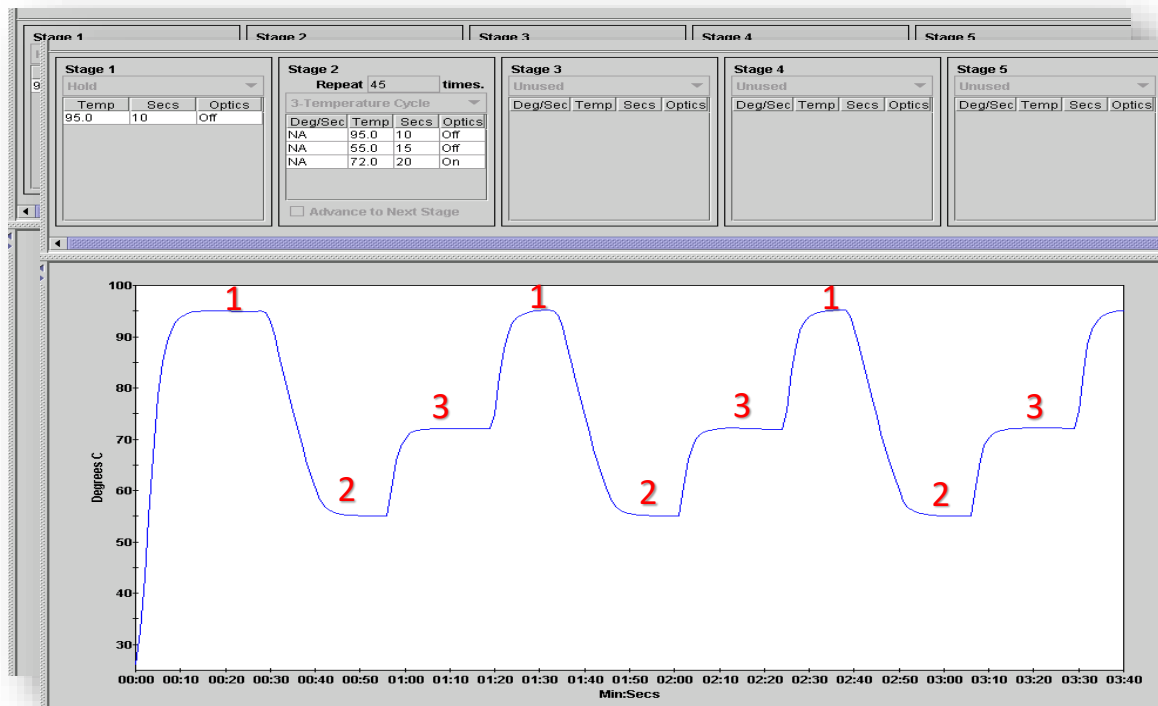
Профиль температуры в циклах ПЦР



3. Элонгация

Примечание: ПЦР обычно состоит из 30–40 циклов

Профиль температуры в циклах ПЦР



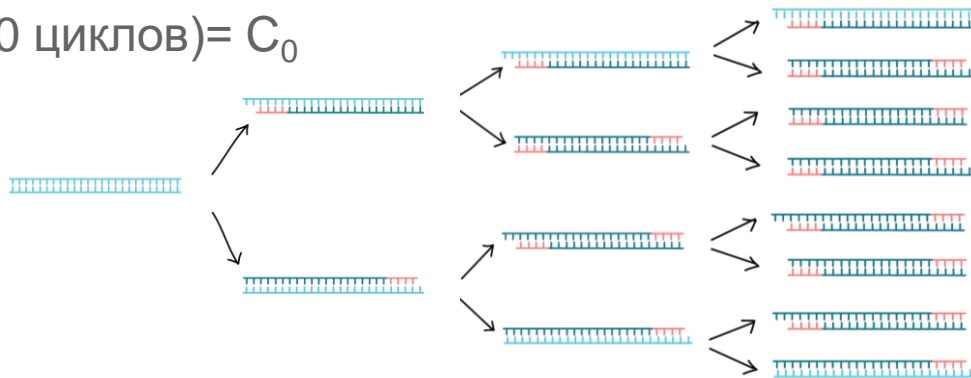
1. Денатурация
2. Отжиг
3. Элонгация

Примечание: ПЦР обычно состоит из 30–40 циклов

Число копий ДНК, получаемых в ПЦР

– Теоретически число копий целевой ДНК удваивается в каждом цикле, что дает коэффициент эффективности ПЦР $E=2$

- Начальная концентрация (0 циклов) = C_0
- После одного цикла: $C_0 \times 2$
- После 2 циклов: $C_0 \times 4$
- После 3 циклов: $C_0 \times 8$
- После n циклов: $C_0 \times 2^n$



– В реальных условиях такая скорость репликации не может поддерживаться бесконечно и число копий в каждом цикле увеличивается менее чем вдвое, а затем репликация совсем прекращается

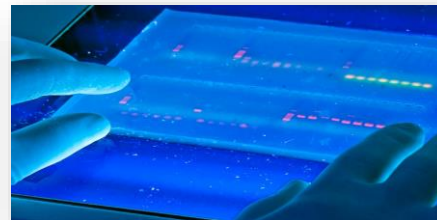
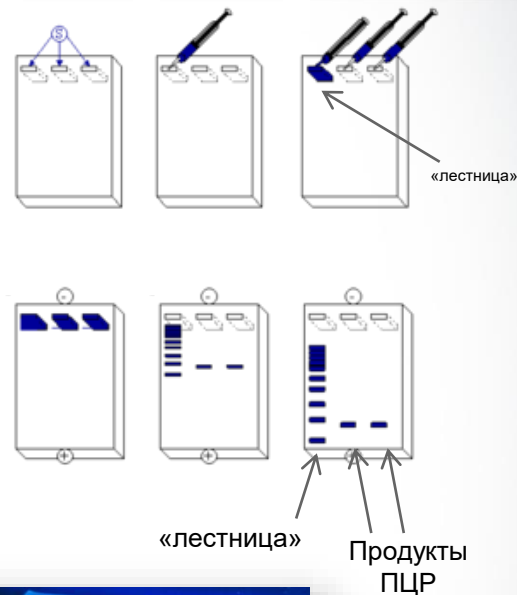
Факторы, влияющие на эффективность ПЦР

- Организация теста (производитель)
 - Природа праймеров и зондов
 - Тип ДНК полимеразы
 - Качество реактивов
 - Исходная смесь
 - Условия циклов ПЦР: температура и длительность фаз
- Подготовка к анализу (технические специалисты лаборатории)
 - Качество **реагентов**, зависящее от условий **транспортировки и хранения**
 - Качество **образца**: присутствие **ингибиторов** ПЦР

Детекция продукта в конечной точке

В классическом варианте ПЦР детекцию выполняют в конечной точке (после завершения ПЦР)

1. Смесь фрагментов известных размеров («лестницу») наносят на агарозный гель в качестве референсного препарата для вычисления размеров продуктов ПЦР.
2. Продукт ПЦР также наносят на гель
3. На материал воздействуют электрическим полем, в результате чего отрицательно заряженные молекулы мигрируют к положительному полюсу
4. Происходит миграция продукта ПЦР в соответствии с его размером
5. ДНК окрашивают бромидом этидия, видимым под УФ лампой
6. Если в образце присутствует искомая целевая последовательность, продукт ПЦР содержит компонент ожидаемого размера



Благодарим за
внимание!



www.Cepheid.com