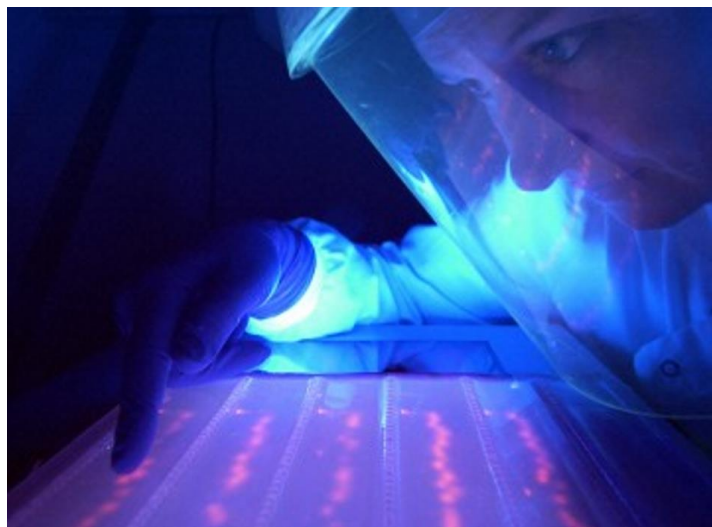


Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR)



Туранов С.В.

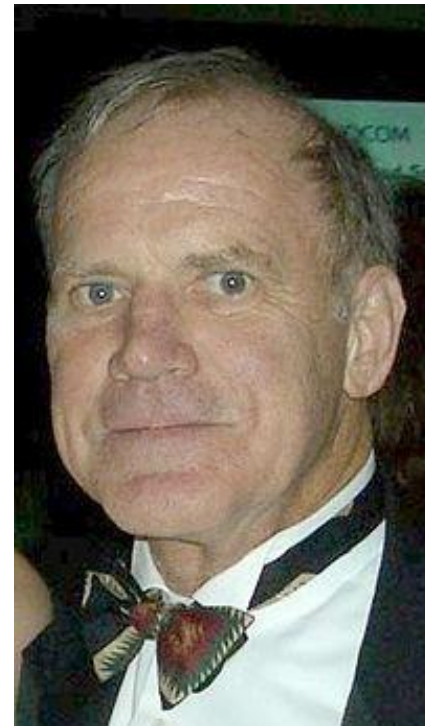
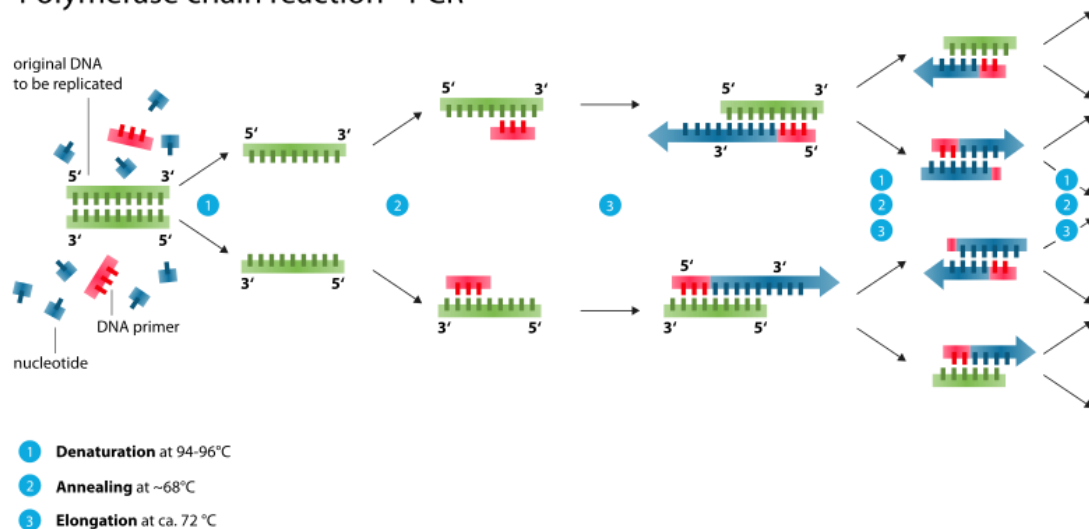
ННЦМБ ДВО РАН

Лаб. Молекулярной систематики

Осень 2019

1983-1985 гг. – изобретение полимеразной цепной реакции (ПЦР). Американский биохимик **Кэри Бенкс Муллис**.

Polymerase chain reaction - PCR



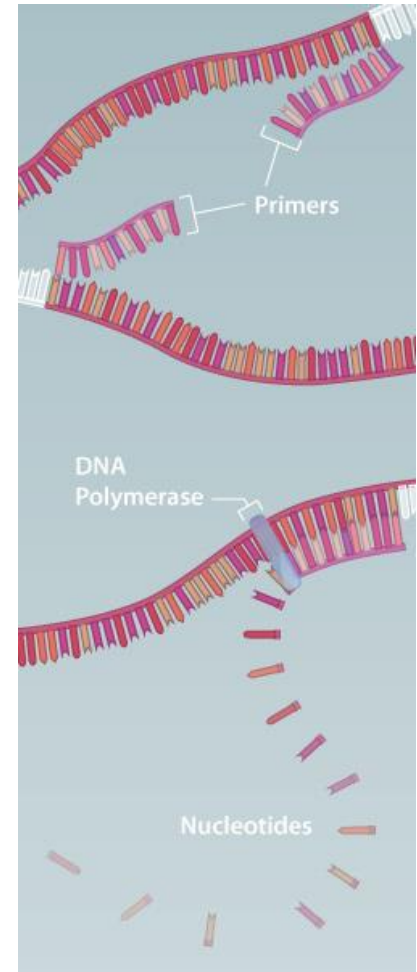
The PCR song:

<https://www.youtube.com/watch?v=x5yPkxCLads>

GTCA song:

<https://www.youtube.com/watch?v=ID6KY1QBR5s>

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, англ. Polymerase chain reaction, PCR) — это метод **амплификации** последовательностей ДНК или РНК. Любой участок молекулы ДНК, **фланкирующие** последовательности которого известны, может быть амплифицирован.



Необходимые компоненты реакции

- Очищенная **ДНК** в буфере для хранения (матрица).
- **Два праймера** (обычно), комплементарные 3'-концам цепочек.

Прямой комплементарен обратной цепи

(садится на обратную цепь),

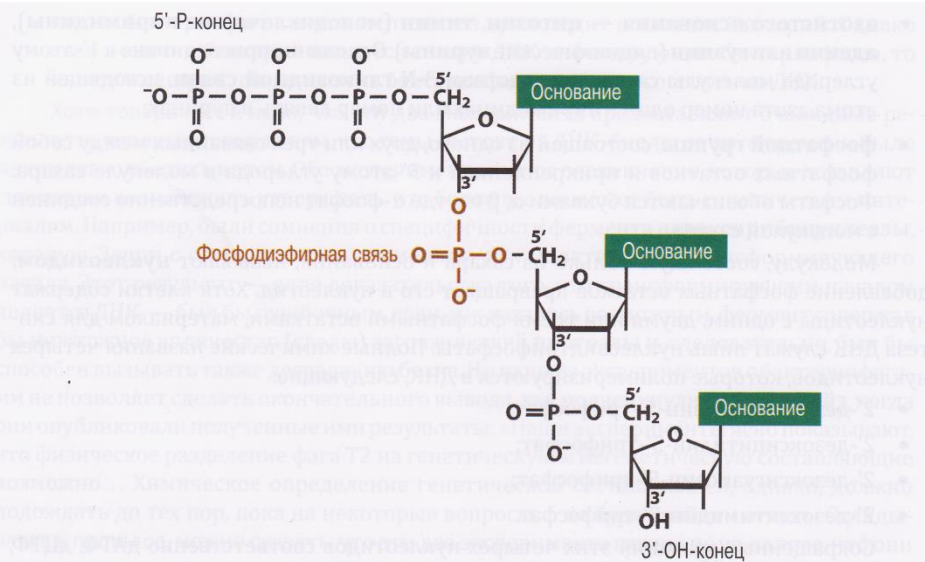
обратный — прямой цепи.

3'-конец — растущий.

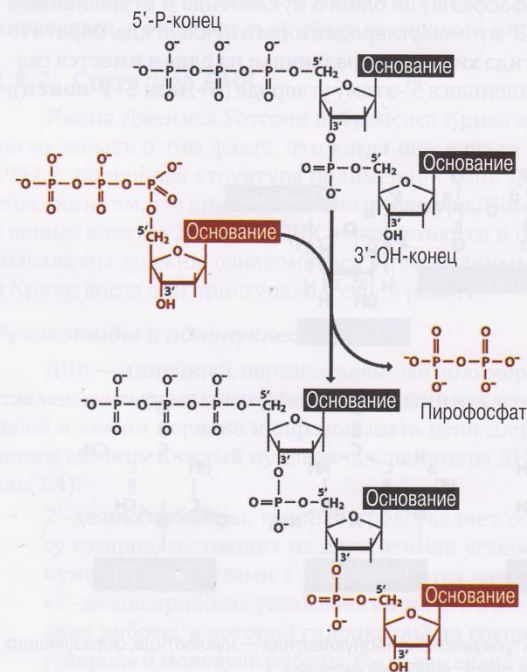
- **Taq-полимераза.**
- **Дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs).** Кирпичики для новых фрагментов.
- **Буфер.** Поддержание нужных химических условий реакции.
- **Кофакторы** полимеразы. Mg^{2+} .



При обычных условиях можно амплифицировать фрагмент от 100 до 10000 п.н.
Для более длинных фрагментов – LongPCR (нужна более точная полимераза).



Короткий полинуклеотид ДНК, показывающий структуру фосфодиэфирной связи. Обратите внимание, что два конца полинуклеотида химически различны



Реакция полимеризации, в ходе которой производится синтез полинуклеотида ДНК. Синтез ведется в направлении 5'→3', и при этом новый нуклеотид добавляется к 3'-атому углерода на конце существующего полинуклеотида. β- и γ-фосфаты присоединяемого нуклеотида удаляются в виде молекулы пирофосфата

Ход реакции

- **Предварительный нагрев** (preheating). 95°C.

- **Циклы:**

Денатурация (denaturation). 30 сек. при 94-98°C.

Отжиг или **гибридизация** (annealing). 20-40 сек (обычно 30). при 40-65 °C.

Элонгация (Elongation/Extension). От 72 до 80 °C 1000 нукл. в мин.

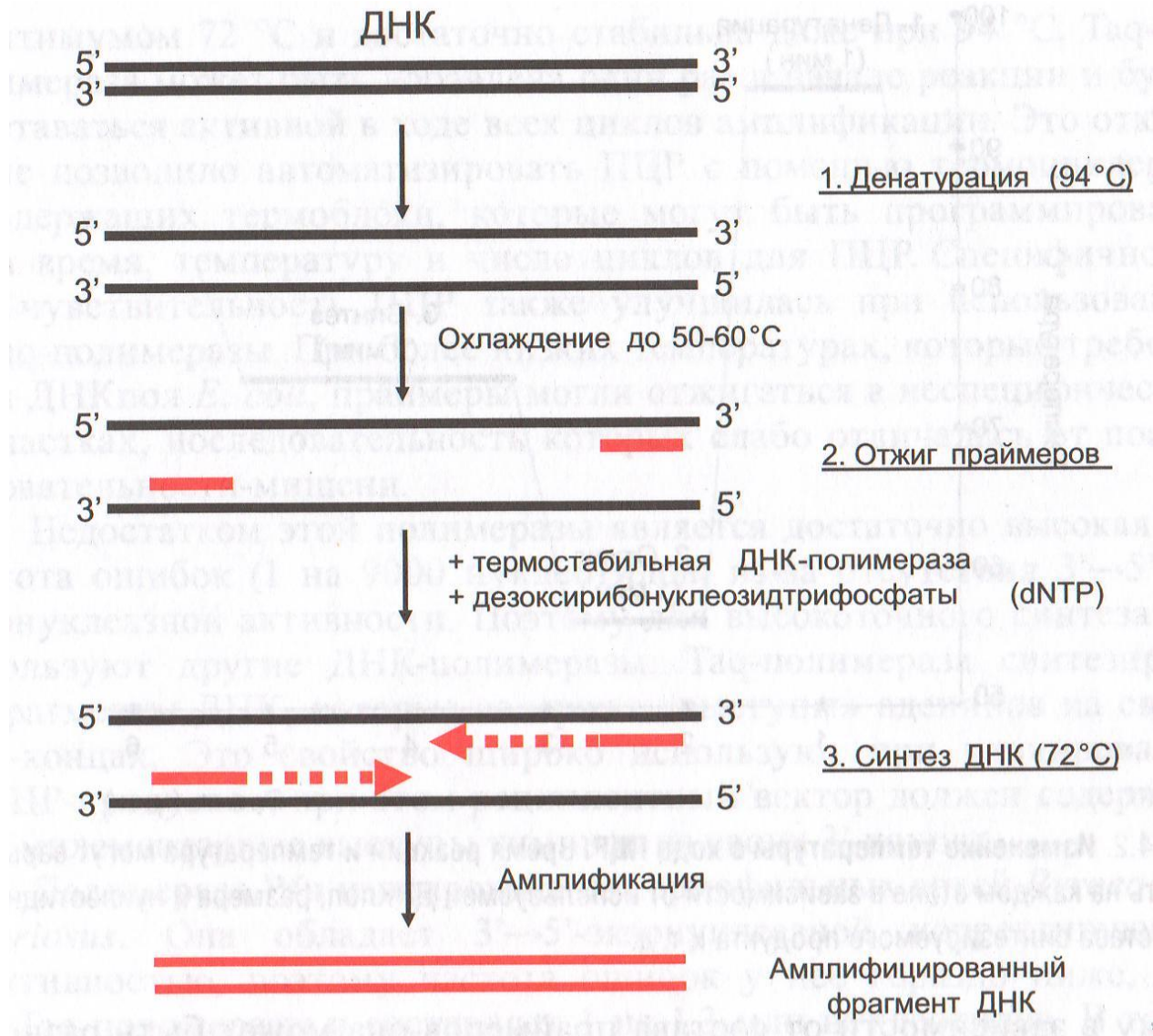
1-3 шага повторяются 20-40 раз

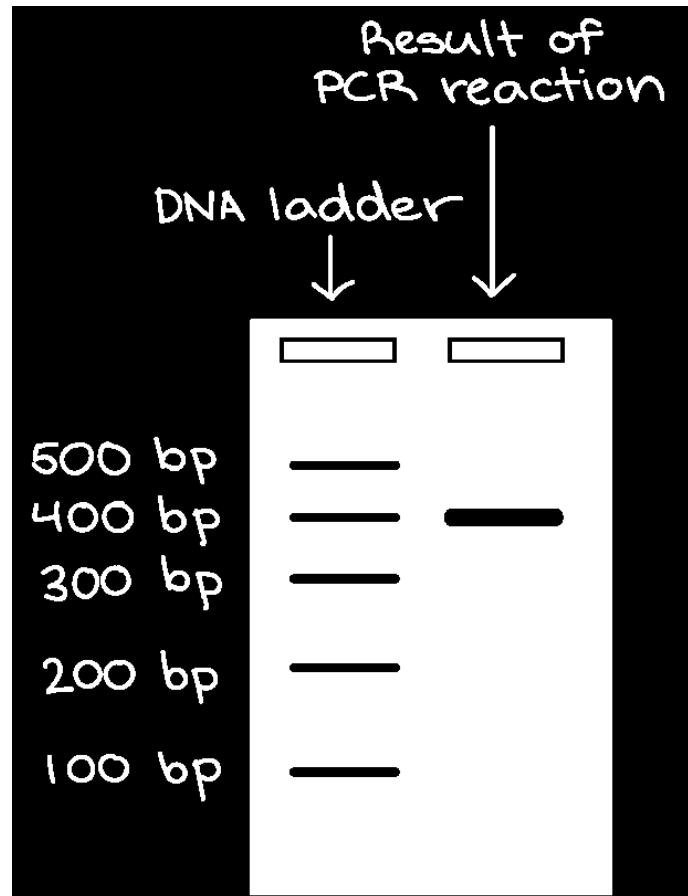
- **Заключительная элонгация** (final elongation). 5-15 мин при 72 °C.
- **Временное хранение в амплификаторе** (hold). От 4 до 12 °C ∞

Общее время реакции — 2-4 часа.

(<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>)

Для проверки качества **ампликонов** используем **электрофорез в агарозном геле**.

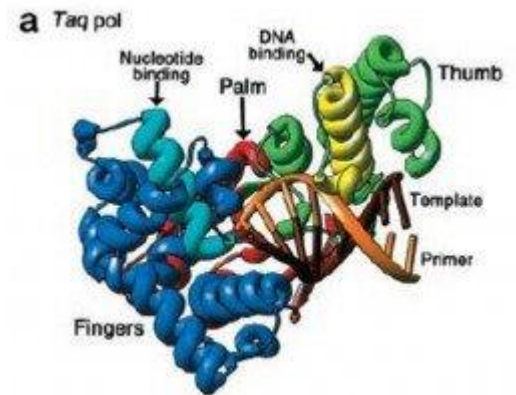


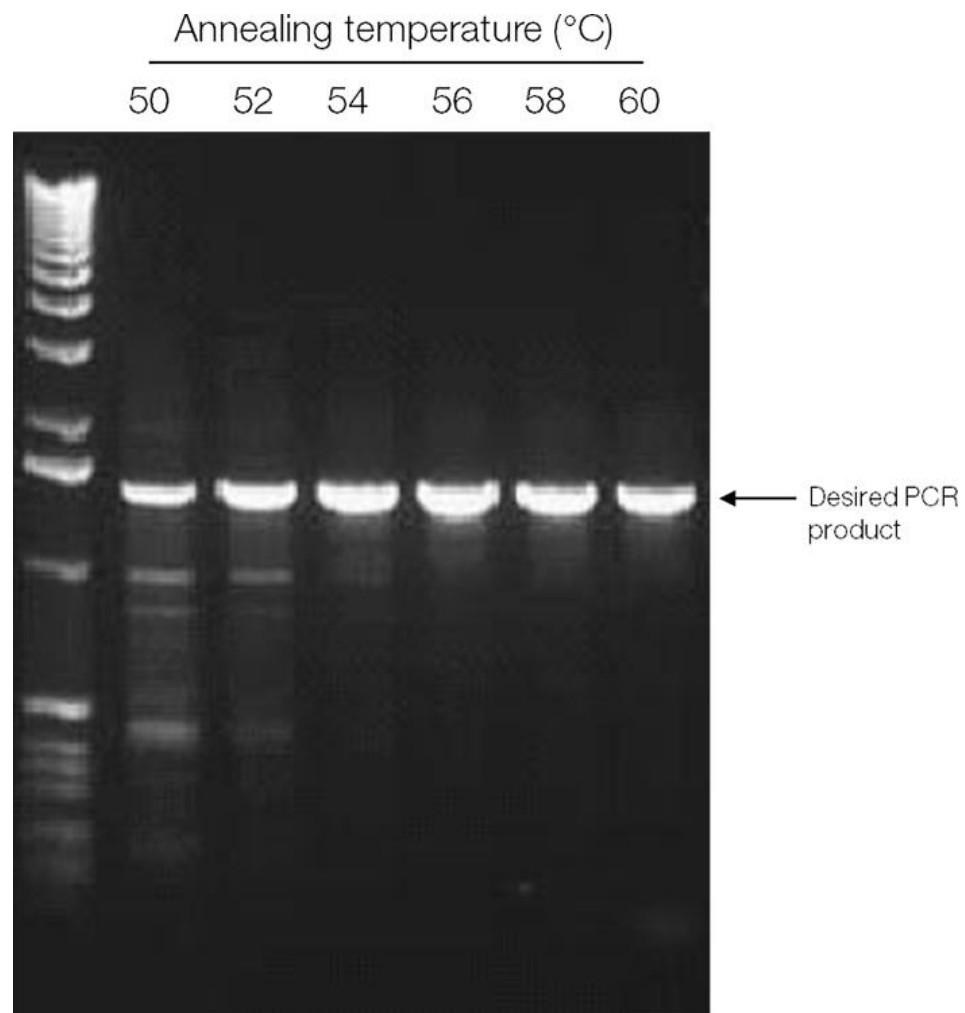


Проблемы

- **Не получается (вообще):** неверные праймеры, неверные условия реакции (термический алгоритм), контаминанты-ингибиторы, нет ДНК либо ДНК деградировала, полимераза сдохла, нет кофактора, много ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), **неправильно ставим форе́з).**
- **Неспецифика (вылезло совсем не то):** праймеры, их концентрация, концентрация ДНК, условия реакции, большая концентрация кофактора.

Taq-полимераза →





Специфичность амплификации в зависимости от температуры отжига

Литература

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
3. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени — 6-е изд. — М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — 223 с.
4. Журавлева Г.А. Генная инженерия в биотехнологии / Г.А. Журавлева; ред. С.Г. Инге-Вечтомов. - Спб.: Эко-Вектор, 2016. - 328 с.: ил.