

Полимеразная цепная реакция. Виды и применение в генетических технологиях. Дизайн праймеров. Амплификация бактериальных генов.



Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Смекенов И.Т.

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 4)

ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Изучить принцип действия и этапы проведения полимеразной цепной реакции. Ознакомиться с разновидностями ПЦР и их применением в молекулярной биологии и генетике. Научиться основам дизайна праймеров для амплификации целевых участков ДНК. Понять принципы амплификации бактериальных генов для последующего анализа или клонирования.

ЗАДАЧИ

- ✓ Разобрать механизмы амплификации ДНК с помощью термостабильных ДНК-полимераз.
- ✓ Рассмотреть основные этапы реакции: денатурация, отжиг праймеров, элонгация.
- ✓ Изучить типы ПЦР (обычная, градиентная, количественная qPCR, обратная RT-PCR, мультиплексная, колониальная и др.).
- ✓ Научиться подбирать праймеры по длине, GC-составу, температуре отжига и специфичности.
- ✓ Освоить применение ПЦР для анализа бактериальных генов, идентификации патогенов и генетических конструкций.

Ключевые термины

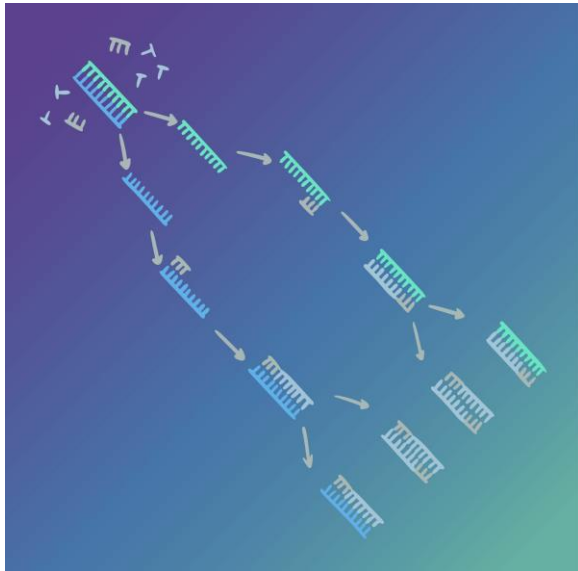
ПЦР, полимеразная цепная реакция, амплификация, праймеры, Taq-полимераза, денатурация, отжиг, элонгация, qPCR, RT-PCR, мультиплексная ПЦР, бактериальные гены, специфичность, генетические технологии, ампликон.

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод избирательного многократного копирования определённого участка ДНК *in vitro* с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.
2. Принцип ПЦР: Реакция проходит в три повторяющихся этапа:
 - Денатурация (94–96 °C): разрыв водородных связей между цепями ДНК.
 - Отжиг (50–65 °C): праймеры комплементарно связываются с матрицей.
 - Элонгация (72 °C): ДНК-полимераза достраивает новые цепи.
3. Амплификация бактериальных генов: Применяется для идентификации бактерий, анализа плазмид, клонирования целевых генов, изучения устойчивости к антибиотикам и филогенетических исследований (например, амплификация гена 16S rRNA).
4. Применение ПЦР в генетических технологиях: клонирование генов и создание рекомбинантных конструкций; диагностика инфекций; определение мутаций и полиморфизмов; контроль трансгенных организмов; судебно-медицинская и криминалистическая экспертиза.

ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Каков принцип работы ПЦР и какие этапы она включает?
- 2) Какую роль выполняет ДНК-полимераза в реакции?
- 3) Какие существуют разновидности ПЦР и в чём их особенности?
- 4) Что необходимо учитывать при проектировании праймеров?
- 5) Почему важно подбирать оптимальную температуру отжига?
- 6) Как ПЦР используется для амплификации и идентификации бактериальных генов?
- 7) Что такое ампликон и как его можно визуализировать? Чем отличается qPCR от традиционной ПЦР?
- 8) Как ПЦР применяется в генной инженерии и биотехнологии?
- 9) Какие ошибки при постановке ПЦР могут привести к неспецифическим продуктам?

- **Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR)** — метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.



- ✓ Метод позволяет из минимального количества исходного ДНК получить миллионы копий заданного фрагмента, что делает ПЦР одним из важнейших инструментов в **генетических, молекулярно-биологических, медицинских и криминалистических исследованиях.**



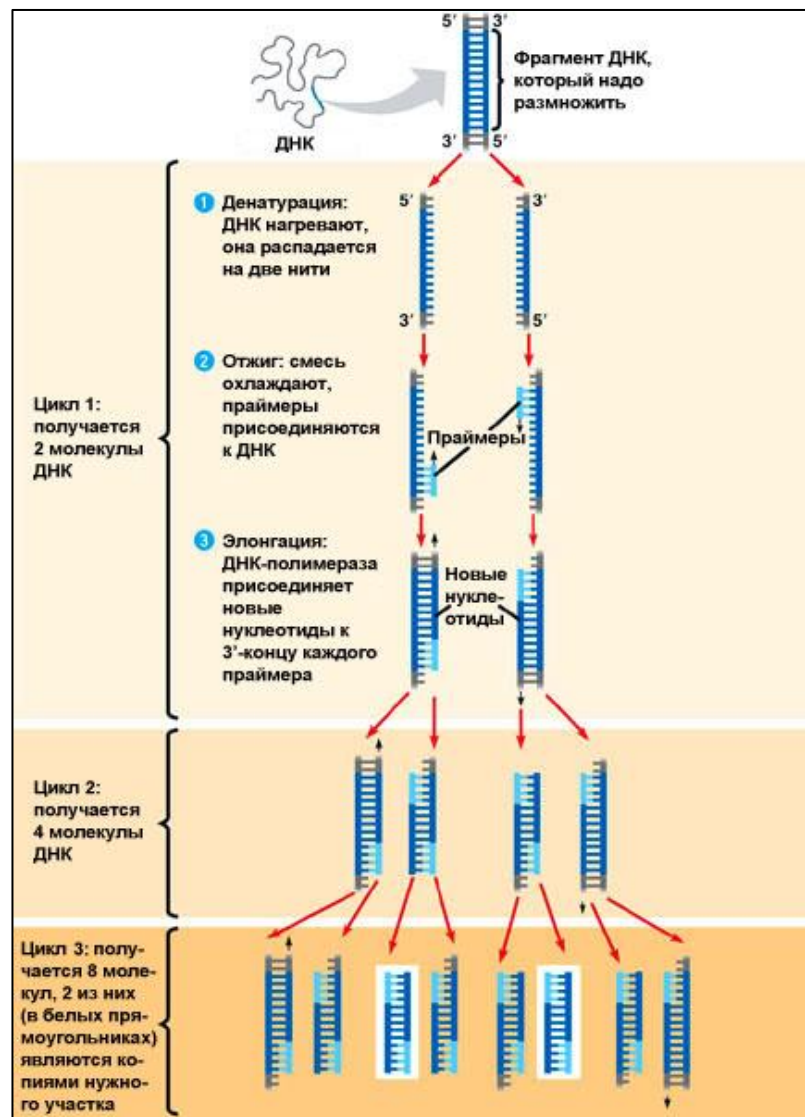
Кэри Бенкс Муллис
(англ. *Kary Banks Mullis*) - американский биохимик, лауреат Нобелевской премии по химии 1993 года

Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР):

ПЦР основана на **многократном копировании (амплификации)** определённого участка ДНК с помощью фермента — **термостабильной ДНК-полимеразы**. Процесс проходит в несколько циклов, каждый из которых включает три основных этапа:

1. **Денатурация (94–96 °C)** – двуцепочечная ДНК разрушается на две одноцепочечные молекулы.
 2. **Отжиг праймеров (50–65 °C)** – короткие синтетические олигонуклеотиды (**праймеры**), комплементарные целевым участкам, связываются с одноцепочечной ДНК.
 3. **Элонгация (72 °C)** – ДНК-полимераза достраивает новые цепи, используя праймеры как точки начала синтеза.
- Каждый цикл **удваивает количество целевого фрагмента**, и после 25–40 циклов образуется **миллионы копий** исходного участка ДНК.

◆ Таким образом, **ПЦР имитирует процесс репликации ДНК в пробирке**, обеспечивая высокую чувствительность и специфичность для анализа генетического материала.

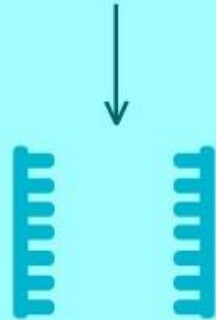


Цикл ПЦР

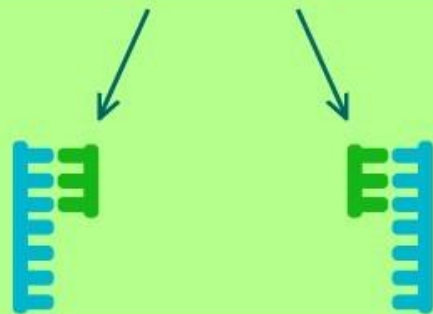
Компоненты



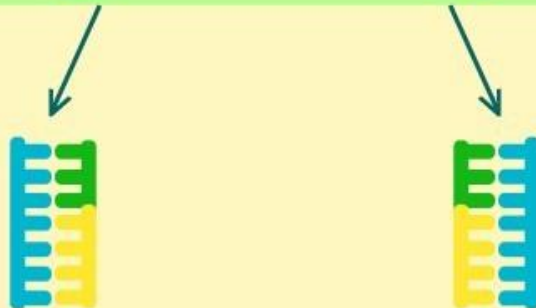
Денатурация
ДНК при 93-96°C



Связывание
праймеров
с цепями ДНК
при 40-75°C



Сборка
комплементарных
цепей ДНК
при 60-75°C



Формула расчёта количества ДНК при ПЦР:

Количество ДНК после каждого цикла ПЦР увеличивается в **геометрической прогрессии**, поэтому общее количество амплифицированных молекул можно рассчитать по формуле:

$$N = N_0 \times 2^n$$

где:

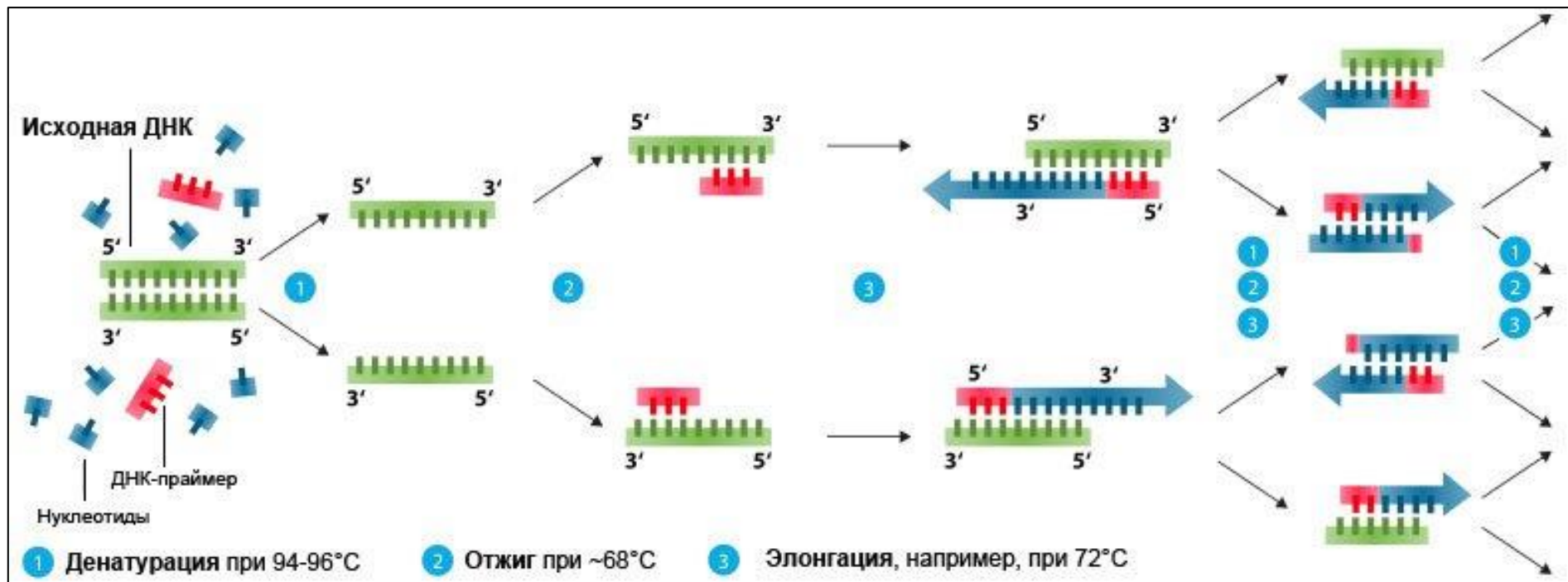
- N — количество молекул ДНК после n циклов,
- N_0 — исходное количество копий ДНК,
- n — число циклов амплификации,
- 2^n — коэффициент удвоения, так как при каждом цикле количество молекул ДНК теоретически удваивается.

◆ **Пример:** Если изначально было $N_0=1$ копия ДНК и проведено 30 циклов:

$$N = 1 \times 2^{30} = 1\,073\,741\,824$$

То есть, теоретически, после 30 циклов можно получить более **1 миллиарда копий** целевого фрагмента ДНК.

⚠ На практике эффективность каждого цикла составляет менее 100%, поэтому реальное количество копий несколько меньше, чем рассчитанное теоретически.



Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси основных компонентов:

1. **Исследуемая ДНК** - служит матрицей для многократного копирования нужного участка;
2. **Праймеры** – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные (комплементарные) противоположным концам противоположных цепей искомого участка ДНК-мишени.
3. **Тaq-полимераза** – термостабильный фермент, который обеспечивает достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.
4. **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)** – дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ которые являются строительным материалом, используемый Таq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.
5. **Буфер** – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР НЕОБХОДИМЫ СЛЕДУЮЩИЕ ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ:

1. ДНК-шаблон (матрица) – участок ДНК, который нужно амплифицировать. Может быть геномная ДНК, плазмида или любой другой источник.

2. Праймеры (oligonucleotides) – короткие синтетические одноцепочечные ДНК, комплементарные началу и концу целевого фрагмента.

- ✓ **Прямой праймер (forward)** – комплементарен 5'-концу целевой последовательности.
- ✓ **Обратный праймер (reverse)** – комплементарен 3'-концу целевой последовательности.

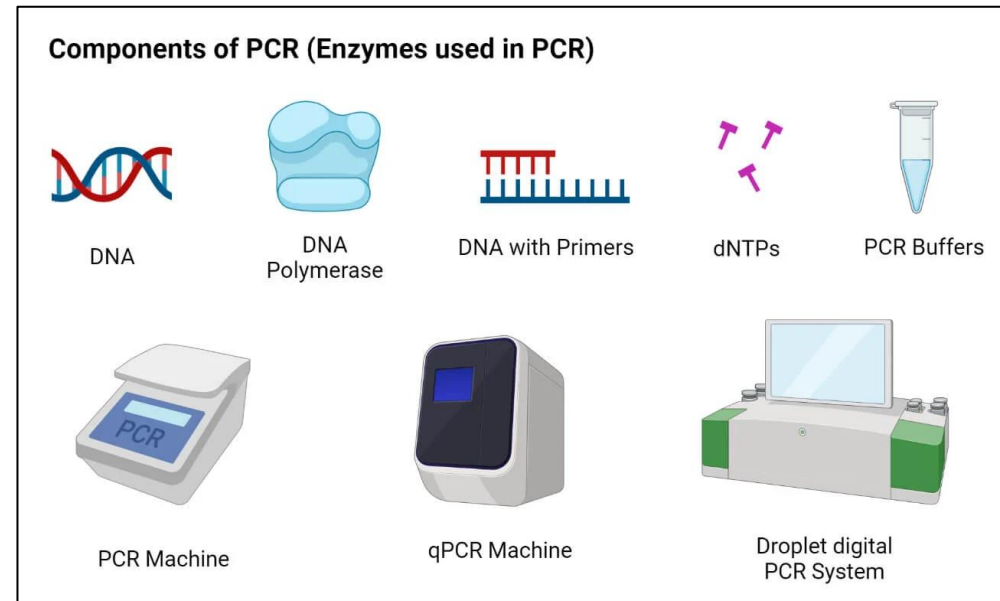
3. Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs) – строительные блоки ДНК: dATP, dTTP, dGTP и dCTP, из которых полимераза синтезирует новые цепи.

4. ДНК-полимераза – термостабильный фермент (обычно **Taq-полимераза**), который достраивает новые цепи ДНК, начиная от праймеров.

5. Буферный раствор (PCR buffer) – обеспечивает оптимальные условия для активности полимеразы (pH, ионная сила, соль Mg^{2+}).

6. Mg^{2+} и другие ионы – кофактор для ДНК-полимеразы; концентрация магния влияет на эффективность и специфичность амплификации.

7. Вода (дистиллированная, без ДНКаз) – для разведения компонентов и доведения объема реакции до требуемого.





Принцип работы градиентного термоциклера

Градиентный термоциклер — это разновидность ПЦР-термоциклеров, который позволяет одновременно проводить несколько ПЦР при **разных температурах отжига праймеров**. Это особенно удобно при **оптимизации ПЦР**, когда необходимо подобрать оптимальную температуру для конкретных праймеров.

ПРИНЦИП РАБОТЫ:

Наличие градиента температуры

1. Внутри термоциклера создаётся температурный градиент по одной оси блока.
2. Например, один край блока может быть 55 °С, а другой — 65 °С.
3. Разные лунки пробирок будут находиться при разных температурах, но остальные этапы цикла (денатурация и элонгация) одинаковы для всех проб.

Циклический нагрев и охлаждение

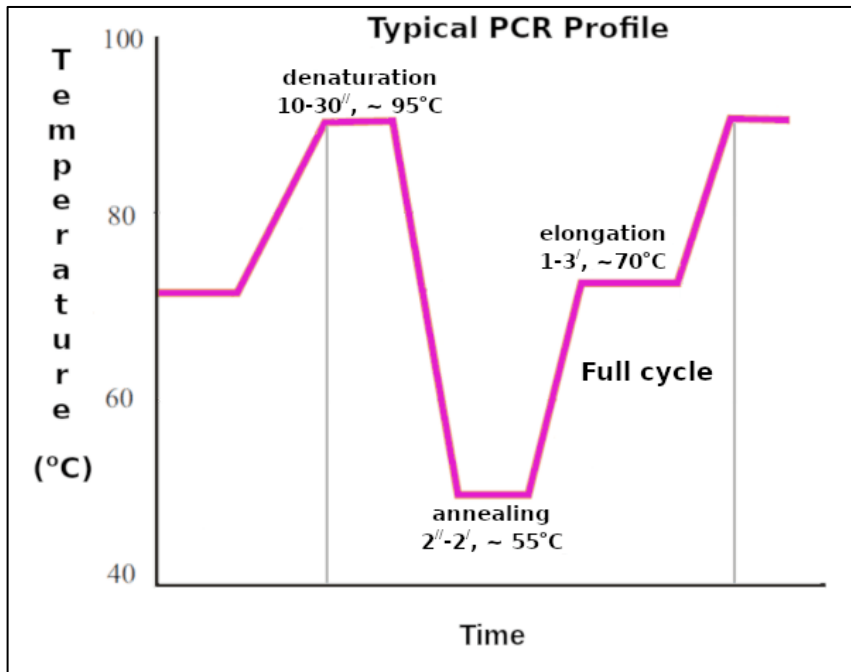
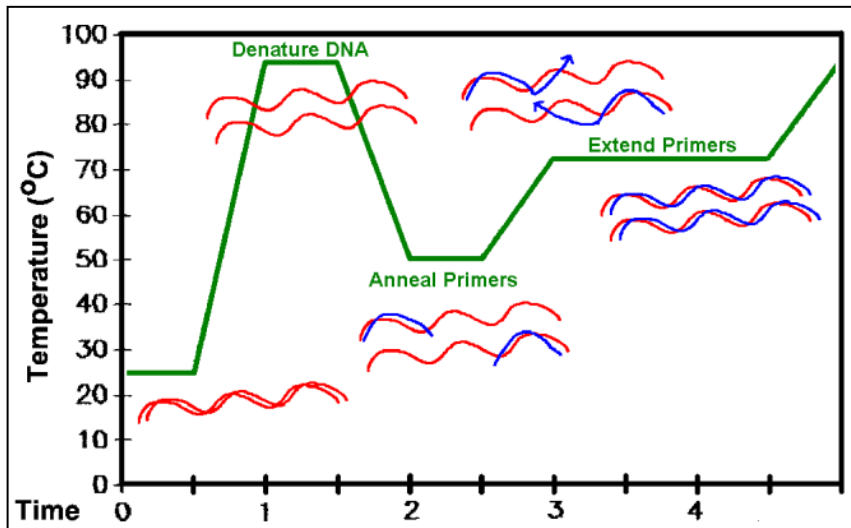
Как и в обычной ПЦР, реакция проходит через три этапа:

1. **Денатурация** — высокая температура для разделения цепей ДНК (обычно 94–96 °С).
2. **Отжиг** — градиент позволяет протестировать диапазон температур для праймеров.
3. **Элонгация** — оптимальная температура для работы ДНК-полимеразы (например, 72 °С).

Оптимизация условий ПЦР

1. После завершения реакции можно определить, при какой температуре отжига праймеров амплификация была наиболее эффективной и специфичной.
2. Это уменьшает количество неспецифических продуктов и обеспечивает высокую чувствительность реакции.





Настройка термоциклера

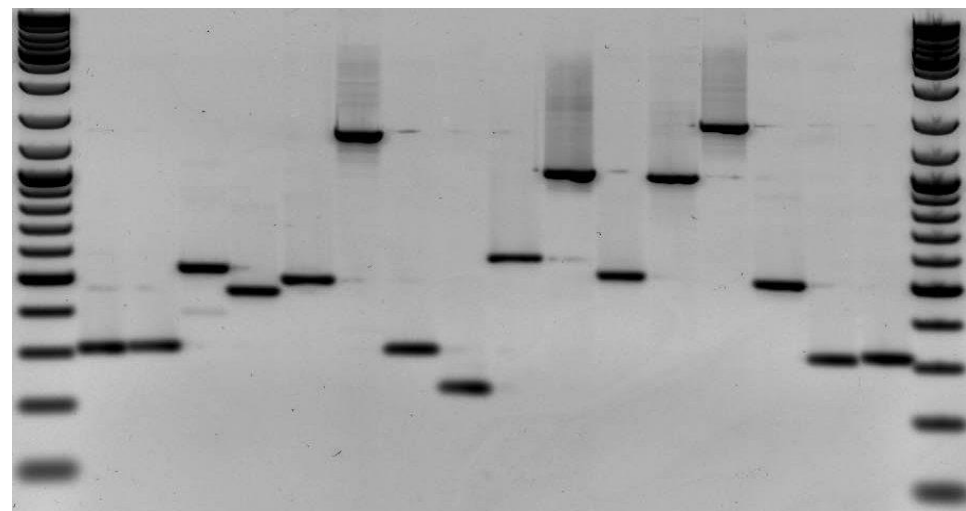
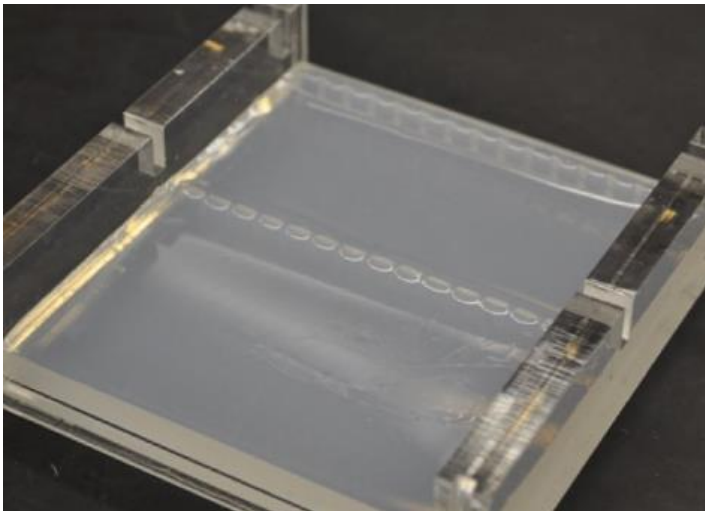
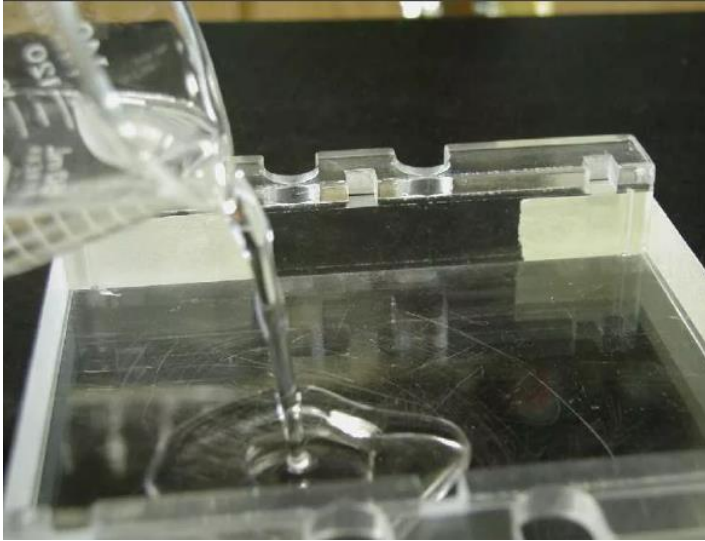
В термоциклере создают «программу» следующим образом:

- Вводят **температуры и времена** для каждого этапа.
- Указывают **количество повторений цикла**.
- Программу сохраняют и запускают.

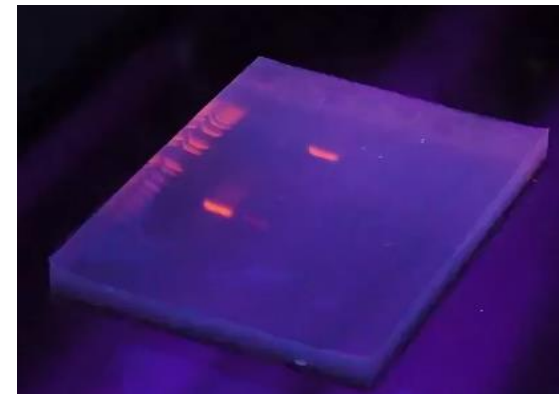
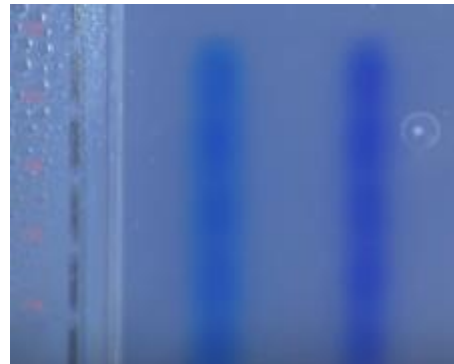
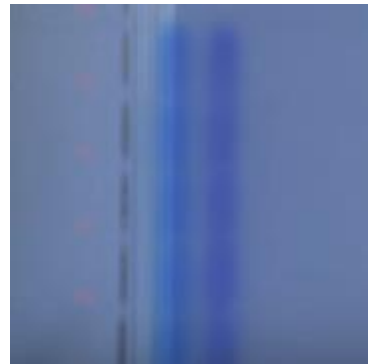
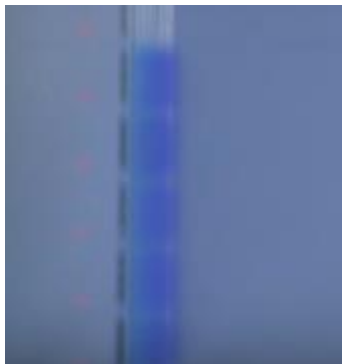
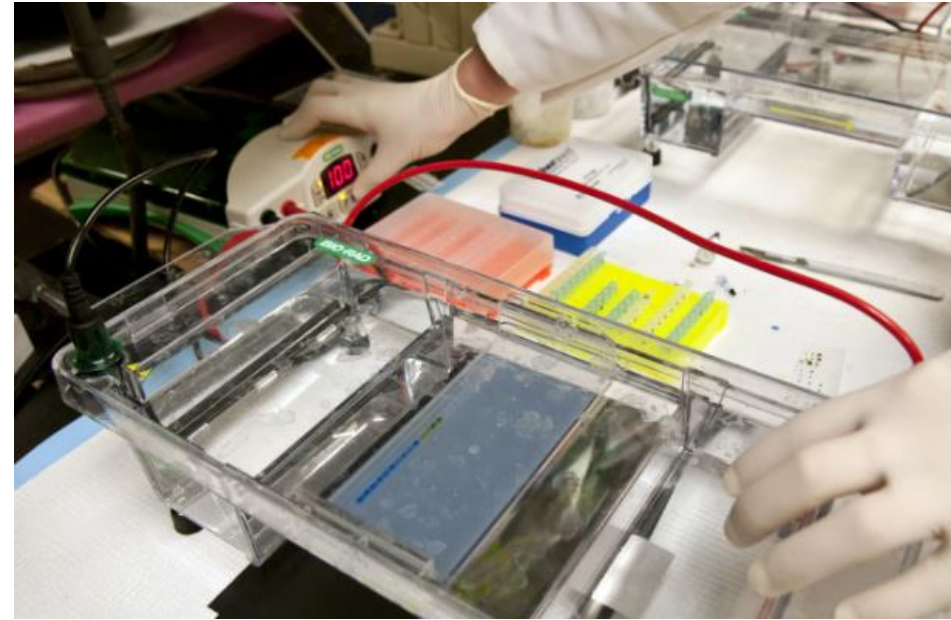
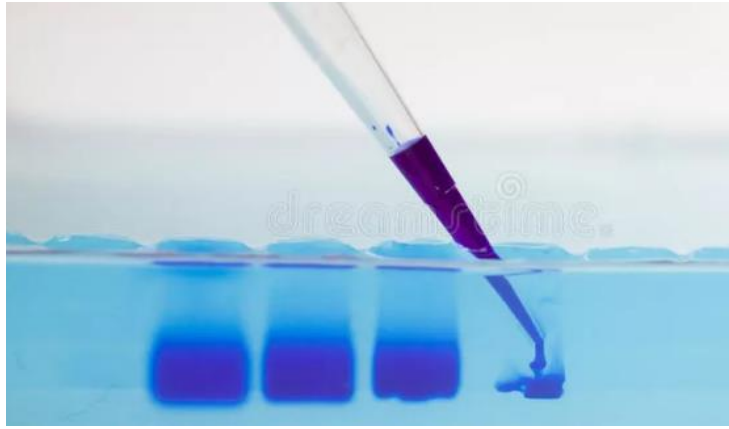
Пример стандартной программы для обычной ПЦР:

Этап	Температура	Время	Циклы
Первичная денатурация	95 °C	3 мин	1
Цикл: денатурация	95 °C	30 сек	25–35
Цикл: отжиг праймеров	55–60 °C	30 сек	25–35
Цикл: элонгация	72 °C	1 мин/кб	25–35
Финальная элонгация	72 °C	5–10 мин	1

- После окончания ПЦР содержимое пробирок подвергают электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле с последующим окрашиванием — так молекулы ДНК разной длины разделяются пространственно и становятся видны.



Процесс агарозного геля электрофореза



Визуализация ПЦР продукта

Система гель-документирования (Gel Documentation System, Gel Doc) — это оборудование, позволяющее **визуализировать, фиксировать и анализировать результаты электрофореза ДНК или РНК на агарозном геле с высокой точностью.**



ПРЕИМУЩЕСТВА:

1. Качественная визуализация:

- ✓ Позволяет получать чёткое изображение ДНК, окрашенной красителями (например, EtBr или SYBR Safe).
- ✓ Улучшается контраст и видимость даже слабых полос, которые трудно заметить невооружённым глазом.

2. Фиксация и хранение результатов:

- ✓ Изображение геля можно сохранять в цифровом виде, что упрощает документирование экспериментов.
- ✓ В отличие от обычного геля на подставке под UV-лампой, где результат виден только в момент наблюдения.

3. Квантитативный анализ:

- ✓ Многие системы позволяют **измерять интенсивность полос**, что позволяет оценить количество ДНК или РНК в пробе.
- ✓ Можно сравнивать образцы между собой, строить графики и отчёты.

4. Безопасность и удобство:

- ✓ Современные системы оснащены защитой от ультрафиолетового излучения, снижая риск повреждения глаз и кожи.
- ✓ Некоторые системы используют LED или голубое свечение, что безопаснее, чем традиционный UV-лампы.

5. Скорость и точность:

- ✓ Процесс визуализации и анализа значительно быстрее и точнее по сравнению с простым наблюдением геля на UV-трансллюминаторе.
- ✓ Возможность автоматической калибровки и измерения размеров молекул с помощью встроенных маркеров.

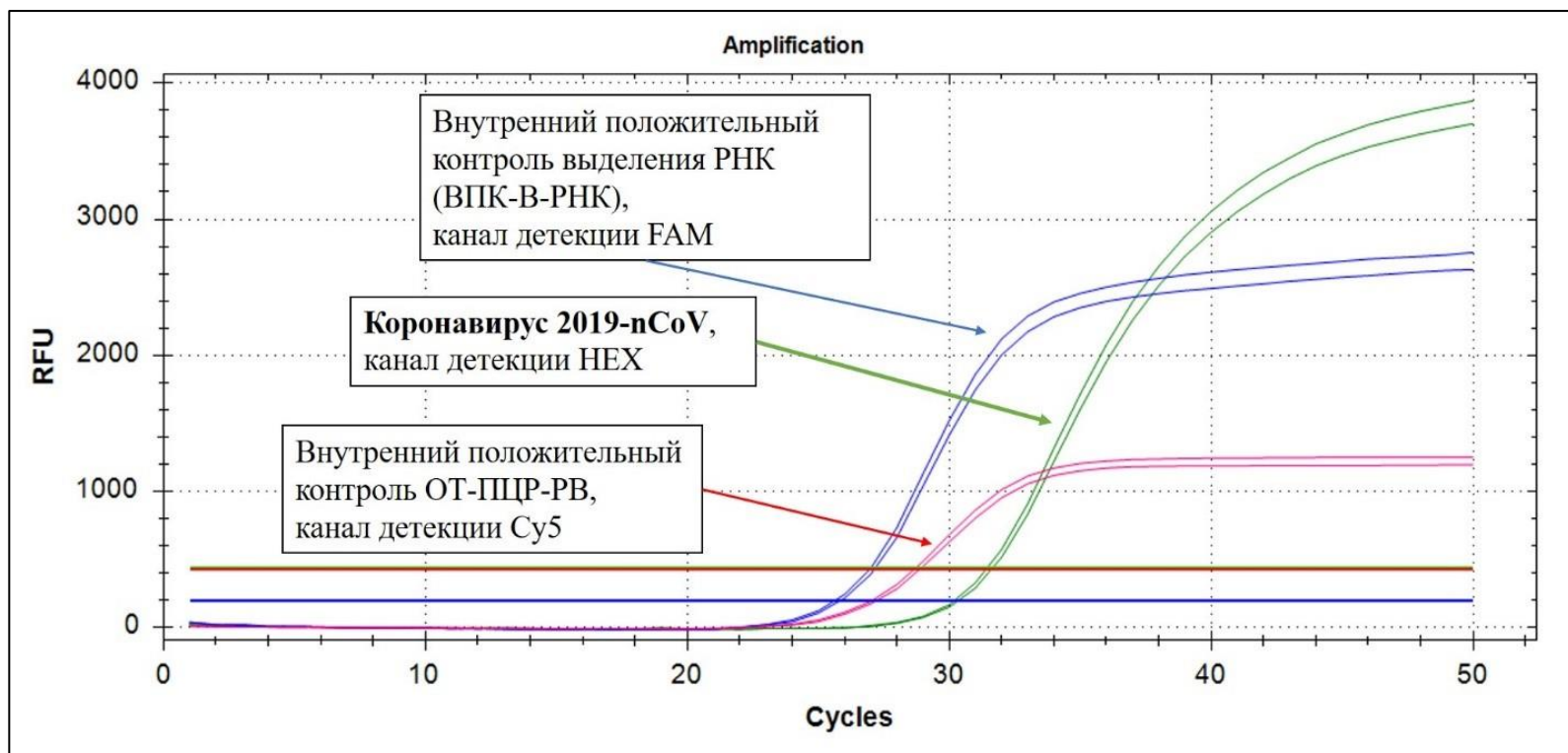
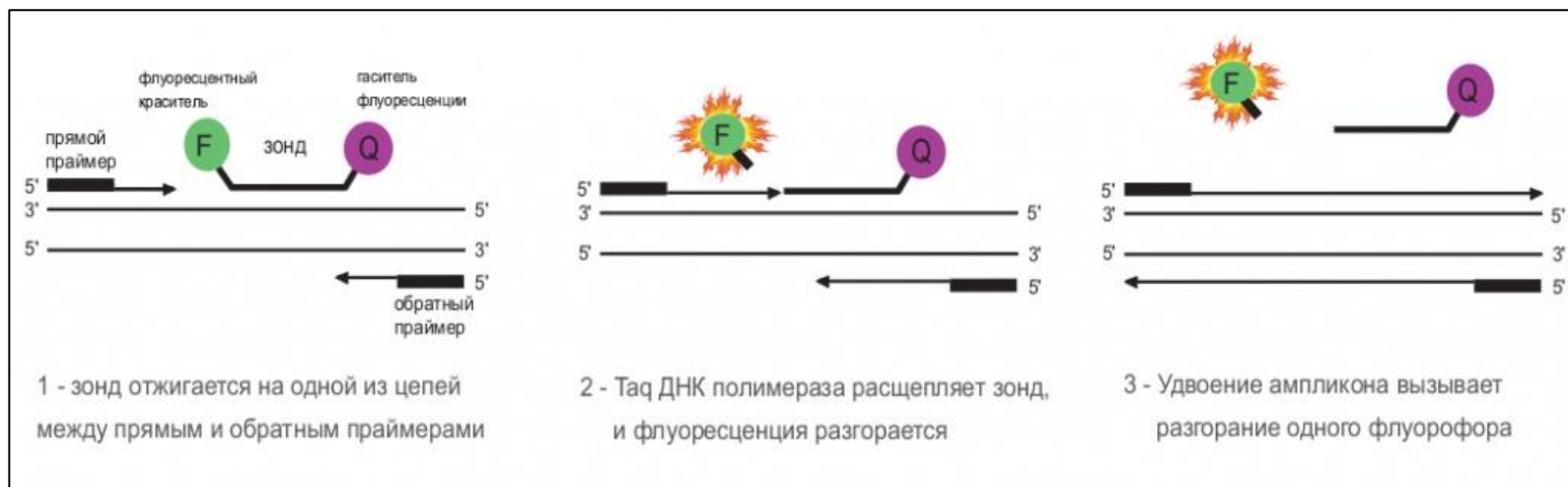
Системы гель-документирования

Виды ПЦР

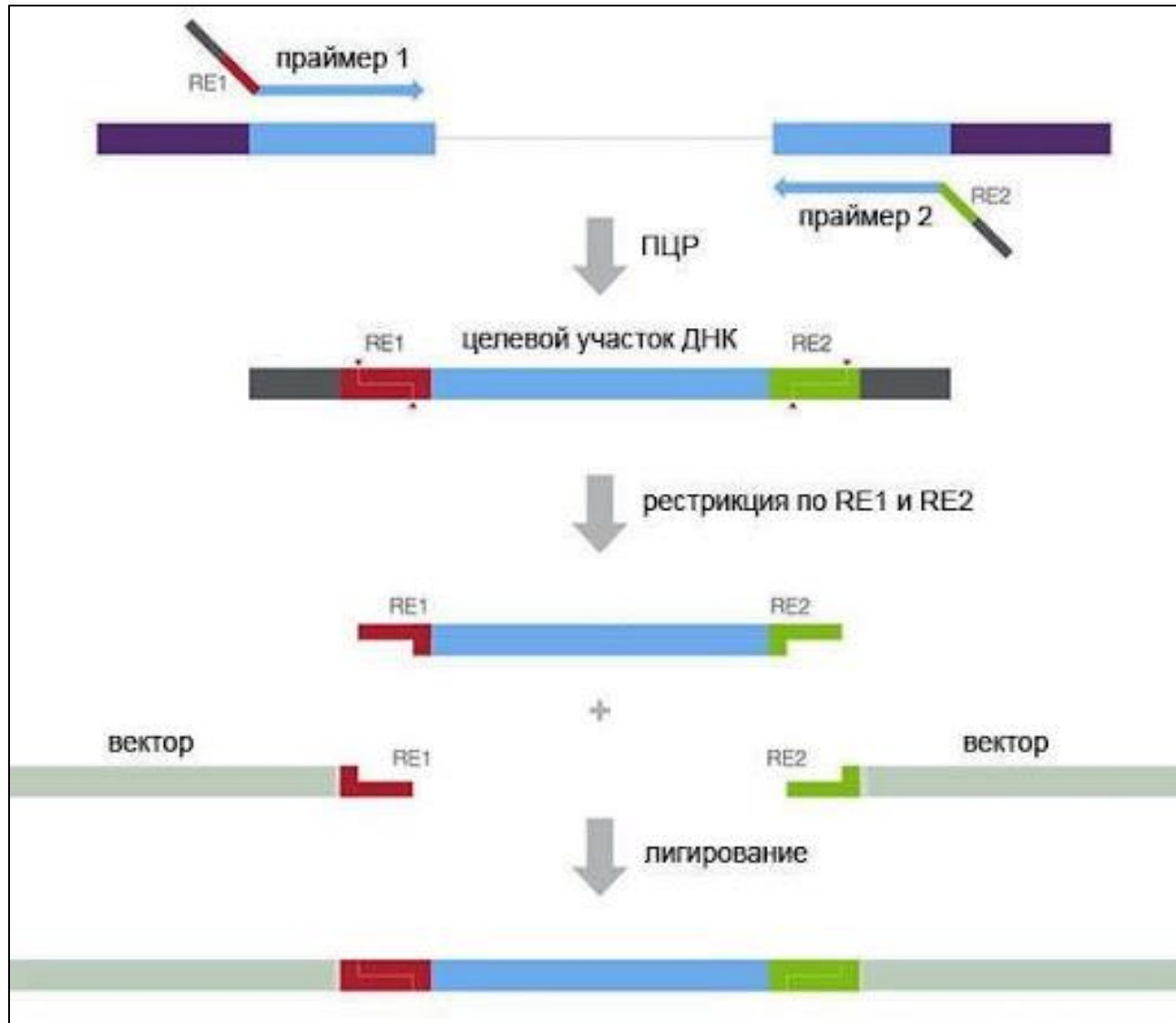
- **ПЦР в реальном времени** (real - time PCR) не требует визуализации продуктов реакции с помощью гель-электрофореза — их накопление фиксируют в реальном времени оптические датчики, вмонтированные в амплификатор и настроенные на определенную длину волны, испускаемую флуоресцирующими метками.
- **ПЦР с обратной транскрипцией** (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) ПЦР может проходить лишь на матрице ДНК, поэтому если в исследовании есть только мРНК, поэтому ее нужно «перевести» в ДНК. Обратная транскрипция в это случае является основным методом с использованием фермента обратная транскриптаза, которая выстраивает по матрице РНК комплементарную ДНК.
- **Иммуно-ПЦР в реальном времени** (Real-time immuno-PCR) гибридный метод включающий иммуноферментный анализ (ИФА) и ПЦР. Пробы с нужной молекулой (гормон, токсин и т.п.), помещают в специальные пробирки, материал которых обладает высокой антигенсвязывающей способностью и термостойкостью. Далее к пробам добавляют специфические антитела с «пришитыми» к ним ДНК-метками длиной 150–300 п.н. Затем в эти же пробирки заливают смесь для qPCR (с интеркалирующим агентом или зондом) во время которой амплифицируются ДНК-метки на антителах, связанных с антигенами.
- Варианты проведения ПЦР: *ПЦР с горячим стартом (hot start PCR), ступенчатая ПЦР (touchdown PCR), COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR), long-range PCR, мультиплексная ПЦР (multiplex PCR), Random Amplification of Polymorphic DNA...*

ПЦР в реальном времени

- ❑ **Полимеразная цепная реакция в реальном времени (qPCR)** — это метод амплификации ДНК, при котором накопление продукта реакции **отслеживается в реальном времени** с помощью флуоресцентных меток.
- ❑ В отличие от традиционной ПЦР, где результаты фиксируются только после завершения реакции на геле, qPCR позволяет **количественно определять количество целевой последовательности** на каждом цикле.
- ❑ Флуоресцентные красители (например, SYBR Green) связываются с двойной цепью ДНК, или используются специфические зонды (TaqMan), которые выделяют сигнал только при амплификации целевого фрагмента, обеспечивая высокую специфичность и чувствительность.
- ❑ Основные преимущества qPCR включают **точное количественное определение исходного количества ДНК или РНК**, возможность анализа экспрессии генов и диагностики инфекций, а также уменьшение времени и риска контаминации, так как реакция проводится в закрытой пробирке без последующего геле-анализа.
- ❑ Метод широко применяется в молекулярной биологии, медицине, ветеринарии и биотехнологии для **измерения экспрессии генов, выявления патогенов, мониторинга трансгенов и проведения генетических исследований.**



Клонирование генов



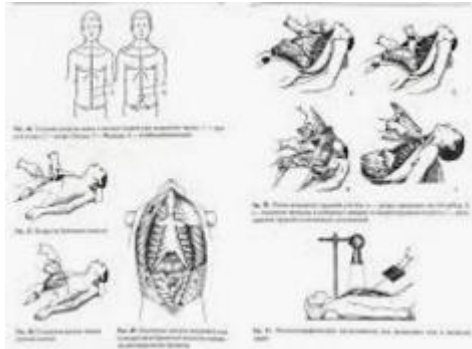
Клонирование генов с использованием праймеров
Клонирование генов — это процесс получения множества копий определённого гена и его вставки в **вектор** для последующей экспрессии или анализа. **Праймеры** играют ключевую роль на этапе **амплификации гена методом ПЦР** перед его переносом в вектор.

Преимущества использования праймеров при клонировании:

- ✓ Позволяют **точно выделить нужный ген** даже из сложного генома.
- ✓ Обеспечивают возможность **вставки дополнительных последовательностей**, необходимых для экспрессии или анализа белка.
- ✓ Ускоряют процесс клонирования, делая его более специфичным и контролируемым.

Применение ПЦР

- медицина (судебная),
- молекулярная биология,
- генная инженерия,
- криминалистика
- ветеринария
- фитосанитария и в мн. др. сферах.



Composition of the PCR Master Mix (2X)

0.05 U/ μ L *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP).

PROTOCOL

1. Gently vortex and briefly centrifuge PCR Master Mix (2X) after thawing.
2. Place a thin-walled PCR tube on ice and add the following components for each 50 μ L reaction:

PCR Master Mix (2X)	25 μ L
Forward primer	0.1-1.0 μ M
Reverse primer	0.1-1.0 μ M
Template DNA	10 pg - 1 μ g
Water, nuclease-free	to 50 μ L
Total volume	50 μ L

3. Gently vortex the samples and spin down.

5. Perform PCR using the recommended thermal cycling conditions outlined below:

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	1-3 min	1
Denaturation	95	30 s	25-40
Annealing	T _m -5	30 s	
Extension	72	1 min/kb	
Final Extension	72	5-15 min	1

GUIDELINES FOR PRIMER DESIGN

Use the Thermo Scientific RReviewer primer design software at www.thermoscientific.com/reviewer or follow the general recommendations for PCR primer design as outlined below:

- PCR primers are generally 15-30 nucleotides long.
- Differences in melting temperatures (T_m) between the two primers should not exceed 5°C.
- Optimal GC content of the primer is 40-60%. Ideally, C and G nucleotides should be distributed uniformly along the primer.
- Avoid placing more than three G or C nucleotides at the 3'-end to lower the risk of non-specific priming.
- If possible, the primer should terminate with a G or C at the 3'-end.
- Avoid self-complementary primer regions, complementarities between the primers and direct primer repeats to prevent hairpin formation and primer dimerization.
- Check for possible sites of undesired complementary between primers and template DNA.
- When designing degenerate primers, place at least 3 conserved nucleotides at the 3'-end.
- When introducing restriction enzyme sites into primers, refer to the table "Cleavage efficiency close to the termini of PCR fragments" located on www.thermoscientific.com/onebio to determine the number of extra bases required for efficient cleavage.

Estimation of primer melting temperature

For primers containing less than 25 nucleotides, the approx. melting temperature (T_m) can be calculated using the following equation:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T),$$

where G, C, A, T represent the number of respective nucleotides in the primer.

If the primer contains more than 25 nucleotides we recommend using specialized computer programs e.g., RReviewer™ (www.thermoscientific.com/reviewer) to account for interactions of adjacent bases, effect of salt concentration, etc.

Removal of genomic DNA from RNA preparations

1. Add to an RNase-free tube:

RNA	1 µg
10X Reaction Buffer with MgCl ₂	1 µL
DNase I, RNase-free (#EN0521)*	1 µL (1U)
Water, nuclease-free	to 10 µL

* Do not use more than 1 U of DNase I, RNase-free per 1 µg of RNA.

2. Incubate at 37°C for 30 min.

3. Add 1 µL 50 mM EDTA and incubate at 65°C for 10 min. RNA hydrolyzes during heating with divalent cations in the absence of a chelating agent (1).

Alternatively, use phenol/chloroform extraction.

4. Use the prepared RNA as a template for reverse transcriptase.

PROTOCOLS

I. First Strand cDNA Synthesis

After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA or poly(A) mRNA or specific RNA	0.1 ng - 5 µg 10 pg - 0.5 µg 0.01 pg - 0.5 µg
Primer	Oligo (dT) ₁₈ primer or Random Hexamer primer or gene-specific primer	1 µL 1 µL 15-20 pmol
Water, nuclease-free		to 12 µL
Total volume		12 µL

2. Optional. If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Total volume	20 µL

4. Mix gently and centrifuge briefly.

5. For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C. For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C. Note. For GC-rich RNA templates the reaction temperature can be increased up to 45°C.

6. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

Список источников и литературы

- https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/430350/Kari_Mallis_izobretatel_PTsR
- <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
- <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- <https://yandex.kz/images/search?text=%D0%B0%D0%B3%D0%B0%D1%80%D0%BE%D0%B7%D0%BD%D1%8B%D0%B9%20%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D1%8C&from=tabbar>
- https://www.google.com/search?q=pcr+cycle&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjZmPLBvMTnAhVJxaYKHVvmCwAQ_AUoAXoECA8QAw&biw=1301&bih=580#imgsrc=3Ku-pvmv7CJ2gM
- https://www.dna-technology.ru/files/images/d/PCR_A5_083-2.pdf
- <https://www.tiensmed.ru/news/polimerazreak1.html>
- <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D1%83%D0%BB%D0%BB%D0%B8%D1%81,%D0%9A%D1%8D%D1%80%D0%B8https://www.invitro.ru/library/labdiagnostika/16110/>
- https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F