

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет имени
И. М. Сеченова»

НАУЧНАЯ РАБОТА

по дисциплине «Молекулярная медицина»

на тему «Основы полимеразной цепной реакции. Компоненты реакционной
смеси ПЦР»

Выполнила студентка
2 курса ИКМ группы 01-05
Панчук Анна Олеговна

Научный руководитель –
кандидат биологических наук
Данилевский Михаил
Игоревич

Москва
2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР	4
МОДИФИКАЦИИ ПЦР	8
ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	12
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	13

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод молекулярной биологии, который используется для значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Данный метод основан на реакции, протекающей в каждой живой клетке – репликации ДНК.

ПЦР изобрел американский биохимик Кэри Муллисом в 1983 году. Целью ученого было создание метода, который позволил бы амплифицировать ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК. Первая публикация по методу ПЦР появилась в журнале «Science» в 1985 году. Открытие метода оказало значительное влияние на развитие молекулярной биологии и медицины. В 1993 году Кэри Муллис получил за это Нобелевскую премию по химии.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР

Процесс полимеразной цепной реакции можно условно подразделить на два этапа – подготовительный и основной. Во время первого подготовительного этапа, который длится примерно до часа, осуществляется приготовление реакционной смеси в специальных пробирках. Во время второго этапа пробирки с реакционной смесью помещают в специальный прибор – амплификатор, где происходит собственно ПЦР, и оставляют на 3-5 часов.

1. Подготовительный этап.

В специально предназначенные для ПЦР тонкостенные пробирки типа Эппендорф объемом 200 микролитров последовательно добавляют все компоненты реакционной смеси в определенном подсчитанном объеме для получения необходимой финальной концентрации.

1.1. Компоненты реакционной смеси.

- 1) ДНК-матрица, которая содержит необходимый для многократного копирования фрагмент. Матрицей может служить любая молекула ДНК любого живого организма, при этом концентрация может быть очень низкой – всего несколько копий ДНК.
- 2) Фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза, который необходим для построения новой цепи ДНК. При полимеразной цепной реакции применяют особый термоустойчивый фермент – Таq-полимеразу, который обеспечивает достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Этот фермент был получен из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, благодаря которой и получил свое название.
- 3) Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ), которые являются источником новых нуклеотидных звеньев в строящейся ДНК и энергии за счет своих

макроэргических связей между остатками фосфорной кислоты. Благодаря этому АТФ в реакционную смесь не добавляют.

- 4) Два праймера – прямой и обратный, которые при проведении ПЦР определяют начало репликации.

Праймер – относительно короткий (от 15 до 30 нуклеотидов) искусственно синтезированный одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный одной из цепей ДНК-матрицы. Праймер служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы подобно РНК-затравке в естественном процессе репликации.

Прямой праймер «садится» на транскрибируемую (матричную) цепь в начале фрагмента и обеспечивает синтез дочерней цепи в направлении от начала к концу. Обратный праймер соединяется с нетранскрибируемой цепью ДНК в конце фрагмента и обеспечивает синтез другой дочерней цепи в направлении от конца к началу.

Праймеры играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.

- 5) Ионы Mg^{2+} , которые необходимы для поддержания функциональной активности фермента ДНК-полимеразы. Поэтому ионы магния, обычно в составе $MgCl_2$, обязательно добавляют в пробирку.
- 6) ПЦР-буфер, который обеспечивает поддержание определенного уровня рН для оптимальной активности фермента ДНК-полимеразы.
- 7) Вода как среда протекания реакции. От уровня ее чистоты зависит эффективность ПЦР, поэтому в данном методе используют дважды дистиллированную воду свободную от нуклеаз.

2. Основной этап.

Пробирку с полученным раствором помещают в программируемый термостат (ДНК-амплификатор) и выбирают необходимую программу циклической смены температуры и длительности каждого шага реакции. Общий объем реакционной смеси обычно составляет от 10 до 100 мкл. Выбор оптимального

режима работы определяется длиной амплифицируемого участка ДНК, характеристиками олигонуклеотидных праймеров и свойствами используемой ДНК-полимеразы.

Основной этап состоит из 20 – 40 циклов. Каждый цикл протекает по одной и той же схеме и состоит из трех стадий – денатурация, отжиг (или гибридизация) праймеров, элонгация. Каждая стадия протекает при строго определенной температуре.

2.1. Денатурация (плавление).

Это процесс разрушения водородных связей в ДНК-матрице под действием высоких температур – 94-98 °С, вследствие чего ДНК переходит из двухнитевой формы в однонитевую, что позволяет праймерам присоединяться к комплементарным участкам.

Во время стадии денатурации крайне важна термоустойчивость фермента Таq-полимеразы, так как использование обычной термочувствительной ДНК-полимеразы привело бы к ее необратимой денатурации, так как она по своей химической природе является белком. Продолжительность данной стадии составляет от 10 секунд до 15 минут.

2.2. Отжиг (гибридизация) праймеров.

Это процесс присоединения праймеров к одноцепочечной ДНК-матрице, для которого необходимо понижение температуры до 50-60 °С. Подбор оптимальной температуры для отжига праймеров очень важен. Если температура ниже оптимальной, то праймеры будут присоединяться в местах, которые не полностью им комплементарны, что приведет к амплификации неспецифических участков ДНК. В случае более высокой температуры праймеры, наоборот, с трудом будут присоединяться к ДНК-матрице или не будут присоединяться вовсе.

2.3. Элонгация.

После присоединения праймеров к комплементарным участкам в начале и конце одноцепочечного фрагмента, температуру повышают до 72 °С, так как эта температура оптимальна для функционирования Таq-полимеразы.

Фермент начинает удлинять праймеры в обоих направлениях. Длительность этого этапа определяется длиной фрагмента, который необходимо амплифицировать. На каждую тысячу пар нуклеотидов отводится в среднем 1 минута.

Таким образом, в одном температурном цикле вновь синтезируется два новых фрагмента ДНК, а за 25-35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК.

В идеальном случае, наработка специфического фрагмента подчиняется закону 2^n , где n – число циклов, а 2 – количество исходной двухцепочечной ДНК. После проведения 25-30 циклов происходит увеличение фрагмента в 10^6 - 10^8 раз.

3. Недостатки метода.

К недостатку ПЦР относят высокую вероятность контаминации – перекрестного загрязнения между исследуемыми образцами, что приводит к ложноположительным результатам.

Для предотвращения контаминации необходимо соблюдать несколько требований:

- 1) Использовать одноразовые пробирки и наконечники, предпочтительнее с аэрозольными фильтрами, не содержащие нуклеаз;
- 2) Этапы очистки нуклеиновых кислот, приготовления реакционных смесей и анализа результатов реакции проводят с применением отдельных комплектов автоматических дозаторов в отдельных помещениях;
- 3) Каждый этап проводится в новых одноразовых перчатках;
- 4) В каждый эксперимент включают отрицательный и положительный контроли.

МОДИФИКАЦИИ ПЦР

- 1. Обратная транскрипция – ПЦР** – применяется для исследования РНК. ПЦР протекает только на матрице ДНК, поэтому для исследования РНК перед ПЦР проводят реакцию обратной транскрипции, которая является методом синтеза комплементарной ДНК на матрице РНК и в ходе которой одноцепочечная молекула РНК превращается в комплементарную одноцепочечную ДНК, которую затем амплифицируют, используя традиционную ПЦР. Такой синтез возможен только с участием фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).
- 2. ПЦР с плавным снижением температуры отжига праймеров** – используется для повышения специфичности реакции. В первых циклах ПЦР температура отжига праймеров превышает расчетную, что снижает вероятность неспецифического отжига праймеров. Последовательное снижение температуры в каждом цикле приводит к увеличению доли специфического фрагмента ПЦР.
- 3. Протяженный ПЦР** – используется для амплификации длинных участков ДНК. При этом методе чаще всего используют смесь ДНК-полимераз. Также из-за протяженности ДНК-матрицы существенно увеличивается время элонгации.
- 4. ПЦР в ткани** – проводится в образцах тканей фиксированных на предметном стекле и позволяет изучать процессы внутриклеточного размножения и развития вирусов, экспрессии генов в различных клетках ткани.
- 5. ПЦР в одной клетке** – это ПЦР, в которой в качестве матрицы используется нуклеиновая кислота, полученная из одной клетки. Применяется в экспериментах по генетике человека и животных, в перинатальной диагностике.

6. Множественная ПЦР – это ПЦР, в которой одновременно используют более одной пары праймеров, что приводит к одновременной амплификации нескольких фрагментов ДНК, что позволяет экономить время и реактивы.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР

Метод ПЦР широко используется во многих областях для проведения анализов, научных экспериментов, молекулярно-генетических исследований.

1. Применение в криминалистике.

ПЦР используют для сравнения «генетических отпечатков пальцев». Найденный на месте преступления образец генетического материала (кровь, волосы, слюна, сперма и т. п.) сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Для этого достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически – одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, а затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью электрофореза ДНК. Полученную картину расположения полос ДНК и называют «генетическим отпечатком пальцев».

2. Медицинская диагностика.

ПЦР дает возможность значительно ускорить и облегчить диагностику широкого спектра наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР, а затем секвенируют для определения мутаций.

2. Персонализированная медицина.

В некоторых случаях лекарственные препараты оказываются аллергенными или даже токсичными для некоторых пациентов. Причина заключается в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных, которые определяются на генетическом уровне. Для того, чтобы предотвратить негативное влияние лекарств на организм проводят ПЦР-анализ перед применением препарата. Такой анализ называют предварительным генотипированием.

4. Клонирование генов.

Клонирование генов – это процесс выделения генов и последующего получения большого количества продукта данного гена в результате генноинженерных манипуляций. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор – фрагмент ДНК,

переносимый чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена – РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

5. Мутагенез.

ПЦР – основной метод для внесения изменений в нуклеотидную последовательность ДНК. Использование ПЦР позволило упростить и ускорить процедуру проведения мутагенеза, а также сделать её более надёжной и воспроизводимой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На настоящее время полимеразная цепная реакция имеет огромное научное и прикладное значение: с её помощью были проведены масштабные исследования в области медицины и биологии, был совершен прорыв в диагностике широкого спектра инфекционных и генетических заболеваний, онкопатологий.

С момента изобретения метода ПЦР прошло сравнительно немного времени, однако данная технология совершила огромный рывок и стала неотъемлемой частью лабораторной практики, продолжая при этом совершенствоваться и развиваться.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / под ред. С. Е. Северина. – 2-е изд., испр. и доп. – М. :ГЭОТАР-Медиа, 2013.
2. Методическое пособие. Основы полимеразной цепной реакции – Зорина Виктория Владимировна.
3. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: Учебно-методическое пособие. Авторы: А.Д. Перенков, Д.В. Новиков, С.Г. Фомина, Л.Б. Луковникова, А.В. Калугин, Е.С. Касатова, В.В. Новиков: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015.
4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – от теории к решению олимпиадных задач – Скриган Екатерина Анатольевна.
5. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. –
URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Полимеразная_цепная_реакция