Федеральное агентство по образованию

Государственное образовательное учреждение

Высшего профессионального образования

"Карельская государственная педагогическая академия"

Курсовая работа на тему:

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и её применение

Выполнила: студентка Корягина Валерия Александровна

Проверила: Карпикова Наталья Михайловна

Петрозаводск 2013

***Оглавление***

Введение

Глава 1. Литературный обзор

1.1 История открытия Полимеразной цепной реакции (ПЦР)

1.2 Разновидности полимеразной цепной реакции (ПЦР)

1.3 Полимеразная цепная реакция

1.4 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

1.5 Принцип метода полимеразной цепной реакции

1.5.1 Наличие в реакционной смеси ряда компонентов

1.5.2 Циклический и температурный режим

1.5.3 Основные принципы подбора праймеров

1.5.4 Эффект "Плато"

1.5.5 Подготовка пробы биологического материала

1.5.6 Амплификация

1.6 Состав стандартной реакционной ПЦР смеси

1.7 Оценка результатов реакции

Глава 2: Применение Полимеразной цепной реакции

Заключение

Список использованной литературы

# ***Введение***

Последнее двадцатилетие ознаменовалось широким внедрением в биологические, медицинские и сельскохозяйственные науки молекулярно-генетических методов.

К началу 70-х годов казалось, что молекулярная биология достигла определенной степени завершенности. В этот период главным объектом молекулярно-генетических исследований были микроорганизмы. Переход к эукариотам поставил перед исследователями совершенно новые проблемы, которые не могли быть решены с использованием существовавших в то время методов генетического анализа. Прорыв в развитии молекулярной генетики стал возможен благодаря появлению нового экспериментального инструмента - рестрикационных эндонуклеаз. В последующие годы количество методов непосредственного анализа ДНК, основанных на качественно различающихся подходах, начало стремительно увеличиваться.

Современные технологии во многих случаях позволили на более глубоком уровне начать изучение тонкой структурно-функциональной организации ядерных и внеядерных геномов различных организмов. Особое значение это имело для разработки новых методов диагностики и лечения различных заболеваний. Не менее важным оказалась возможность использования достижения молекулярной генетики в популяционной биологии и в селекции для выявления и анализа генетической изменчивости популяций, сортов и штаммов, идентификации и паспортизации хозяйственно ценных особей, создания генетически модифицированных организмов и для решения других вопросов.

Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Нет универсального метода, который мог бы позволить решить все возникающие проблемы. Поэтому выбор конкретного метода для проводимого исследования является одним из важнейших этапов любой научной работы.

# ***Глава 1. Литературный обзор***

# ***1.1 История открытия Полимеразной цепной реакции (ПЦР)***

В 1983 г. К.Б. Мюллис и др. опубликовали и запатентовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), которому суждено было оказать глубочайшее влияние на все области исследования и прикладного использования нуклеиновых кислот. Значение этого метода для молекулярной биологии и генетики оказалось столь велико и очевидно, что уже через семь лет автору была присуждена Нобелевская премия по химии.

В начале использования метода после каждого цикла нагревания-охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура проведения реакции была сравнительно неэффективной, требовала много времени и фермента. В 1986 году метод полимеразной цепной реакции был существенно улучшен. Было предложено использовать ДНК-полимеразы из термофильных бактерий. Эти ферменты оказались термостабильными и были способны выдерживать множество циклов реакции. Их использование позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа *Taq*-полимеразой.

Возможность амплификации любого сегмента ДНК, последовательность нуклеотидов которого известна, и получение его по завершении ПЦР в гомогенном виде и препаративном количестве делают ПЦР альтернативным методом молекулярного клонирования коротких фрагментов ДНК. При этом не возникает необходимости в применении сложных методических приемов, которые используют в генной инженерии при обычном клонировании. Разработка метода ПЦР во многом расширила методические возможности молекулярной генетики, и, в частности, генной инженерии, причем настолько, что это кардинально изменило и усилило научный потенциал многих её направлений.

# ***1.2 Разновидности полимеразной цепной реакции (ПЦР)***

 **Вложенная ПЦР** - применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

 **Инвертированная ПЦР** - используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезаний ДНК - рестриктазами <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B0> с последующим соединением фрагментов (лигирование <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B8%D0%B3%D0%B0%D0%B7%D0%B0>). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

 **ПЦР с обратной транскрипцией <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D0%A2\_%D0%9F%D0%A6%D0%A0>** - используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BA%D1%81%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D1%8F\_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%B2> данные гены.

 **Асимметричная ПЦР** - проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B5> и гибридизационного <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B8%D0%B1%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\_%D0%94%D0%9D%D0%9A> анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддержать эффективности реакции на протяжении всех циклов.

 **Количественная ПЦР <http://ru.wikipedia.org/wiki/Real-time\_PCR>** или **ПЦР в реальном времени <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%A6%D0%A0\_%D0%B2\_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%BC\_%D0%B2%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B8>** - используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды <http://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%B7%D0%BE%D0%BD%D0%B4%D1%8B&action=edit&redlink=1> для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления.

 **Ступенчатая ПЦР** - с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72-75°С, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60-65°С.

 **Метод молекулярных колоний (ПЦР гель) -** акриламидный гель <http://ru.wikipedia.org/wiki/SDS\_PAGE> полимеризуют <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80> со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

 **ПЦР длинных фрагментов** - модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз, одна из которых - Taq-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая - ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью.

полимеразная цепная реакция праймер

 **Групп-специфическая ПЦР** - ПЦР для родственных <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F\_(%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F)> последовательностях внутри одного или между разными видами <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9\_%D0%B2%D0%B8%D0%B4>, используя консервативные праймеры к этим последовательностям.

 **ПЦР с использованием горячего старта** - модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами или имитирующие антитела небольшими молекулами типа Affibody <http://en.wikipedia.org/wiki/Affibody\_molecule>, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95°C в течение 10 минут.

 **Виртуальная ПЦР <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%82%D1%83%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D0%B0%D1%8F\_%D0%9F%D0%A6%D0%A0> (цифровая ПЦР, электронная ПЦР) -** математический метод компьютерного <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0> анализа теоретической полимеразной цепной реакции c использованием списка последовательностей праймеров <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%B9%D0%BC%D0%B5%D1%80> (или ДНК-зондов <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%B7%D0%BE%D0%BD%D0%B4>) для предсказания потенциальной амплификации ДНК <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A> исследуемого генома <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BC>, хромосомы <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%BE%D1%81%D0%BE%D0%BC>, кольцевой ДНК <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A> или любого другого участка ДНК.

# ***1.3 Полимеразная цепная реакция***

Открытая в середине 80-х годов, полимеразная цепная реакция (ПЦР) способна увеличить количество копий исходной пробы в миллионы раз в течение нескольких часов. В ходе каждого цикла реакции из исходной молекулы образуются две копии. Каждая из синтезированных копий ДНК может служить матрицей для синтеза новых копий ДНК в следующем цикле. Таким образом, многократное повторение циклов, приводит к возрастанию количества копий в геометрической прогрессии. Из расчетов следует, что даже при наличии 30 циклов, число копий исходной молекулы составит более 1 миллиарда. Даже если учесть, что в ходе каждого цикла дуплицируются не все ампликоны, то общее количество копий, несмотря на это, составляет достаточно большую цифру.

Каждый цикл полимеразной цепной реакции (ПЦР) состоит из следующих этапов:

 Денатурация - Повышение температуры вызывает раскручивание и расщепление двухцепочечной молекулы ДНК на две одноцепочечные;

 Отжиг - Снижение температуры позволяет праймерам присоединиться к комплементарным участкам молекулы ДНК;

 Элонгация - Фермент ДНК-полимераза достраивает комплементарную цепь.

Для амплификации избранного фрагмента используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих определенный участок ДНК. Праймеры ориентированы 3’-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать. ДНК-полимераза осуществляет синтез (достройку) взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с праймеров. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь новосинтезирующихся молекул ДНК. Каждая цепь молекулы ДНК, образующаяся с помощью одного из праймеров, может служить матрицей для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью другого праймера.

# ***1.4 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)***

Полимеразную цепную реакцию проводят в специальных тонкостенных полипропиленовых пробирках, совместимых по размеру с используемым термоциклером (амплификатором) - прибором, который контролирует температурные и временные характеристики этапов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

# ***1.5 Принцип метода полимеразной цепной реакции***

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - метод амплификации ДНК in vitro, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо соблюдение ряда условий:

# ***1.5.1 Наличие в реакционной смеси ряда компонентов***

Основными компонентами реакционной (ПЦР) смеси являются: Трис-HCl, KCl, MgCl2, смесь нуклеотидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ), праймеры (олигонуклеотиды), препарат анализируемой ДНК, термостабильная ДНК-полимераза. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в полимеразной цепной реакции (ПЦР), а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации.

 Трис-HCl - определяет pH реакционной смеси, создает буферную емкость. Активность ДНК-полимеразы зависит от pH среды, поэтому значение водородного показателя напрямую влияет на ход полимеразной цепной реакции. Обычно значение pH находится в пределах 8 - 9,5. Высокое значение pH берется из-за того, что при повышении температуры pH Трил-HCl буфера падает.

 KCl - концентрация хлорида калия до 50 мМ влияет на протекание процессов денатурации и отжига, концентрация свыше 50 мМ ингибирует ДНК-полимеразу.

 MgCl2 - поскольку ДНК-полимераза является Mg2+ - зависимым ферментом, то концентрация ионов магния влияет на активность фермента (Mg2+ образует комплексы с НТФ - именно эти комплексы являются субстратом для полимеразы). Высокая концентрация приводит к увеличению неспецифической амплификации, а низкая ведет - к ингибированию реакции, оптимум (для различных полимераз) находится в области 0,5 - 5мМ. Кроме того, концентрация солей магния влияет на протекание процессов денатурации и отжига - повышение концентрации Mg2+ вызывает повышение температуры плавления ДНК (т.е. температуры, при корой 50% двухцепочечных нитей ДНК разъединяются на одноцепочечные).

 НТФ - нуклеотидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нуклеиновых кислот. Для предотвращения цепной терминации рекомендуется равноколличественное соотношение всех четырех нуклеотидтрифосфатов. Низкая концентрация данных компонентов в реакционной смеси увеличивает вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК.

 Праймеры - Наиболее оптимальным является использование праймеров с разницей температур плавления не более 2 - 4oС. Иногда при длительном хранении при температуре 4oС, или после большого количества замораживаний - оттаиваний праймеры образуют вторичные структуры - димеры, снижая эффективность протекания ПЦР. Устранение данной проблемы сводится к инкубации на водяной бане (Т=95oС) в течение 3 минут и последующему резкому охлаждению до 0oС.

 Препараты ДНК - количество и качество препарата ДНК (матрицы) непосредственно влияет на ход и параметры полимеразной цепной реакции. Избыточное количество образца ДНК ингибирует полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Примеси различных веществ, находящихся в препарате ДНК, могут также уменьшить эффективность протекания полимеразной цепной реакции (ПЦР): ацетат натрия, хлорид натрия, изопропанол, этанол, гепарин, фенол, мочевина, гемоглобин и др.

 ДНК-полимераза - при использовании малого количества ДНК-полимеразы наблюдается уменьшение синтеза конечного продукта прямо пропорционально размеру фрагментов. Избыток полимеразы в 2 - 4 раза приводит к появлению диффузных спектров, а в 4 - 16 раз - низкомолекулярных неспецифических спектров. Диапазон используемых концентраций - 0,5 - 1,5 единиц активности в перерасчете на 25 мкл ПЦР смеси.

Кроме основных компонентов ПЦР смеси, используют ряд дополнительных веществ, улучшающих качественные и количественные показатели ПЦР: ацетамид (5%) - увеличение растворимости основных компонентов; бетаин (натриевая соль) - стабилизация ДНК-полимеразы, понижение температуры плавления ДНК, выравнивание температуры плавления; альбумин бычий (10-100 мкг/мл) - стабилизация ДНК-полимеразы; диметилсульфоксид (1-10%) - повышение растворимости основных компонентов; формамид (2-10%) - увеличение специфичности отжига; глицерин (15-20%) - увеличение термостабильности фермента, понижение температуры денатурации образца ДНК; сульфат аммония - снижение температуры денатурации и отжига.

# ***1.5.2 Циклический и температурный режим***

Общий вид программы полимеразной цепной реакции (ПЦР) следующий:

этап. Длительная первичная денатурация препарата ДНК.1 цикл

этап. Быстрая денатурация препарата ДНК. Отжиг праймеров. Элонгация.30 - 45 циклов.

этап. Длительная элонгация. Охлаждение реакционной смеси.1 цикл.

Каждый элемент этапа - денатурация, отжиг, элонгация - имеет индивидуальные температурные и временные характеристики. Параметры температуры и времени протекания каждого элемента подбирают эмпирически, в соответствии с качественными и количественными показателями продуктов амплификации.

Денатурация. В ходе данного элемента полимеразной цепной реакции происходит расщепление двухцепочечной молекулы ДНК на две одноцепочечные. Температурные параметры денатурации находятся в области 90 - 95oС, но в случае ДНК-образца с большим содержанием гуанина и цитозина, температура должна быть увеличена до 98oС. Температура денатурации должна быть достаточной для полной денатурации - расщепления нитей ДНК и избежания "внезапного охлаждения" или быстрого отжига, однако, термостабильная ДНК-полимераза менее устойчива при высоких температурах. Таким образом, подбор оптимальных температурных параметров денатурации для соотношения праймер/образец (препарат ДНК) является важным условием при проведении амплификации. Если температура денатурации на первом этапе выше 95oС, рекомендуется добавлять ДНК-полимеразу в реакционную смесь после первичной денатурации. Продолжительность данного элемента этапа в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) должна быть достаточной для полной денатурации ДНК, но в то же время не оказывать существенного влияния на активность ДНК-полимеразы при данной температуре.

Отжиг. Температура отжига (Та) - один из важнейших параметров полимеразной цепной реакции. Температура отжига для каждого конкретного праймера подбирается индивидуально. Она зависит от длинны и нуклеотидного состава праймера. Обычно она ниже на 2 - 4oС значения температуры плавления (Тm) праймера. Если температура отжига системы ниже оптимальной, то число неспецифических амплифицированных фрагментов возрастает и, наоборот, более высокая температура уменьшает количество амплифицированных продуктов. При этом концентрация специфических ампликонов может резко снижаться, вплоть до ингибирования полимеразной цепной реакции (ПЦР). Увеличение времени отжига также приводит к увеличению количества неспецифических ампликонов.

Элонгация. Обычно каждый вид термостабильной ДНК-полимеразы имеет индивидуальный температурный оптимум активности. Скорость синтеза ферментом комплементарной нити ДНК также является величиной специфичной для каждой полимеразы (в среднем она составляет 30 - 60 нуклеотидов в секунду, или 1 - 2 тыс. оснований в минуту), поэтому время элонгации подбирается в зависимости от типа ДНК-полимеразы и длинны амплифицируемого региона.

# ***1.5.3 Основные принципы подбора праймеров***

При создании ПЦР-тест-системы одной из основных задач является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

. Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3’-концам праймеров, т. к именно с них начинает достраивать комплементарную цепь ДНК Taq-полимераза. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно, синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Она видна на электрофорезе в виде тяжелых или легких дополнительных полос. Это мешает оценке результатов реакции, т. к легко перепутать специфический продукт амплификации с синтезированной посторонней ДНК. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности.

. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом.

# ***1.5.4 Эффект "Плато"***

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает. Это связано с так называемым эффектом "плато".

Термин эффект “плато” используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения эффекта “плато” влияют утилизация субстратов (дНТФ и праймеров), стабильность реактантов (дНТФ и фермента), количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы, конкуренция за реактанты неспецифическими продуктами или праймер-димерами, концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации.

Чем меньше начальная концентрация ДНК-мишени, тем выше риск выхода реакции на “плато". Этот момент может наступить до того, как количество специфических продуктов амплификации будет достаточно, чтобы их можно было проанализировать. Избежать этого позволяют лишь хорошо оптимизированные тест-системы.

# ***1.5.5 Подготовка пробы биологического материала***

Для выделения ДНК используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки ПЦР.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, описанная Мармуром. Она включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Этот метод позволяет получить чистый препарат ДНК. Однако он довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий запах веществами, как фенол и хлороформ.

Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Boom с соавторами. Этот метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное "молоко" и. т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников типа Chilex, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а наоборот, примеси, мешающие реакции. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом. К сожалению, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, некоторые микроорганизмы не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

# ***1.5.6 Амплификация***

Для проведения реакции амплификации необходимо приготовить реакционную смесь и внести в нее анализируемый образец ДНК. При этом важно учитывать некоторые особенности отжига праймеров. Дело в том, что, как правило, в анализируемом биологическом образце присутствуют разнообразные молекулы ДНК, к которым используемые в реакции праймеры имеют частичную, а в некоторых случаях значительную, гомологию. Кроме того, праймеры могут отжигаться друг с другом, образуя праймер-димеры. И то, и другое приводит к значительному расходу праймеров на синтез побочных (неспецифических) продуктов реакции и, как следствие, значительно уменьшает чувствительность системы. Это затрудняет или делает невозможным чтение результатов реакции при проведении электрофореза.

# ***1.6 Состав стандартной реакционной ПЦР смеси***

х ПЦР буфер (100 мМ р-р Трис-HCl, pH 9,0, 500 мМ р-р KCl, 25 мМ р-р MgCl2) …….2,5 мкл

Вода (MilliQ) ……………………………………………………….18,8 мкл

Смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ)

мМ р-р каждого……………………………………….……….0,5 мкл

Праймер 1 (10 мМ р-р) ………………………………………….….1 мкл

Праймер 2 (10 мМ р-р) ………………………………………….….1 мкл

ДНК-полимераза (5 ед. /мкл) ………………………………………0,2 мкл

Образец ДНК (20 нг/мкл) …………………………………………..1 мкл

# ***1.7 Оценка результатов реакции***

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в жизни встречается не часто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда, из-за их присутствия не удается амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

# ***Глава 2: Применение Полимеразной цепной реакции***

ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах.

**Криминалистика**

ПЦР используют для сравнения так называемых "генетических отпечатков пальцев". Необходим образец генетического материала с места преступления - кровь, слюна, сперма, волосы и т.п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически - одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью электрофореза ДНК. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев.

**Установление отцовства**

Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР. Отец. Ребенок. Мать. Ребенок унаследовал некоторые особенности генетического отпечатка обоих родителей, что дало новый, уникальный отпечаток.

Хотя "генетические отпечатки пальцев" уникальны, родственные связи все же можно установить, сделав несколько таких отпечатков. Тот же метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов.

**Медицинская диагностика**

ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

**Персонализированная медицина**

Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого - отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром может быть более активен, у другого - менее. Для того, чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием.

**Клонирование генов**

Клонирование генов - это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор - фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. 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.

**Секвенирование ДНК**

В методе секвенирования с использованием меченых флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотидов ПЦР является неотъемлемой частью, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются производные нуклеотидов, меченые флуоресцентной или радиоактивной меткой. Это останавливает реакцию, позволяя определить положения специфических нуклеотидов после разделения синтезированных цепочек в геле.

**Мутагенез**

В настоящее время ПЦР стала основным методом проведения мутагенеза. Использование ПЦР позволило упростить и ускорить процедуру проведения мутагенеза, а также сделать её более надёжной и воспроизводимой.

Метод ПЦР позволил проанализировать наличие последовательностей вирусов папилломы человека в срезах биопсий новообразований шейки матки человека, залитых парафином за 40 лет до данного исследования. Более того, с помощью ПЦР удалось амплифицировать, и клонировать фрагменты митохондриальной ДНК из ископаемых останков мозга человека возраста 7 тысяч лет!

На лизатах индивидуальных сперматозоидов человека продемонстрирована возможность одновременно анализировать два локуса, расположенных на разных негомологичных хромосомах. Такой подход обеспечивает уникальную возможность тонкого генетического анализа и изучения хромосомной рекомбинации, ДНК-полиморфизма и др. Метод анализа индивидуальных сперматозоидов сразу нашел практическое применение в судебной медицине, так как HLA-типирование гаплоидных клеток позволяет определять отцовство или выявлять преступника (комплекс HLA представляет собой набор генов главного комплекса гистосовместимости человека; локусы комплекса HLA - наиболее полиморфные из всех известных у высших позвоночных: в пределах вида в каждом локусе существует необычайно большое число разных аллелей - альтернативных форм одного и того же гена).

Используя ПЦР, можно выявлять правильность интеграции чужеродных генетических структур в заранее определенный район генома изучаемых клеток. Суммарная клеточная ДНК отжигается с двумя олигонуклеотидными затравками, одна из которых комплементарна участку хозяйской ДНК вблизи точки встраивания, а другая - последовательности интегрированного фрагмента в антипараллельной цепи ДНК. Полимеразная цепная реакция в случае неизмененной структуры хромосомной ДНК в предполагаемом месте встройки приводит к образованию фрагментов одноцепочечной ДНК неопределенного размера, а в случае запланированной встройки - двухцепочечных фрагментов ДНК известного размера, определяемого расстоянием между местами отжига двух праймеров. Причем степень амплификации анализируемого района генома в первом случае будет находиться в линейной зависимости от количества циклов, а во втором - в экспоненциальной. Экспоненциальное накопление в процессе ПЦР амплифицируемого фрагмента заранее известного размера позволяет визуально наблюдать его после электрофоретического фракционирования препарата ДНК и делать однозначное заключение о встройке чужеродной последовательности в заданный район хромосомной ДНК.

# ***Заключение***

Самое широкое распространение метод ПЦР в настоящее время получил как метод диагностики различных инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет выявить этиологию инфекции даже если в пробе, взятой на анализ, содержится всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР широко используется в ранней диагностики ВИЧ-инфекций, вирусных гепатитов и т.д. На сегодняшний день почти нет инфекционного агента, которого нельзя было бы выявить с помощью ПЦР.

# ***Список использованной литературы***

1. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно - генетического анализа. - Мн.: Юнипол, 2007. - 176 с.

2. ПЦР "в реальном времени"/ Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.; под ред. д. б. н. Д.В. Ребрикова; предисл. Л.А. Остермана и акад. РАН и РАСХН Е.Д. Свердлова; 2-е изд., испр. и доп. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.

. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. - М.: Наука, 2005. - В 2 т

. Б. Глик, Дж. Пастернак Молекулярная биотехнология. Принципы и применение 589 стр., 2002 г.

5. *Щелкунов С.Н. <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A9%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D1%83%D0%BD%D0%BE%D0%B2,\_%D0%A1%D0%B5%D1%80%D0%B3%D0%B5%D0%B9\_%D0%9D%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%B0%D0%B5%D0%B2%D0%B8%D1%87>* Генетическая инженерия. - Новосибирск: Сиб. унив. издательствово, 2004. - 496 с.

. Под редакцией А.А. Ворбьева <http://www.ozon.ru/context/detail/id/2195774/> "Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии"; Медицинское информационное агентство <http://www.ozon.ru/context/detail/id/856850/> - 72 стр.

. http://ru. wikipedia.org <http://ru.wikipedia.org>

. http://scholar. google.ru <http://scholar.google.ru>

. <http://www.molbiol.ru>

. <http://www.muldyr.ru>

. http://www.med2000.ru/n1/n12. htm <http://www.med2000.ru/n1/n12.htm>

12. http://prizvanie. su/ <http://prizvanie.su/> - медицинский журнал