Модификации ПЦР

Выполнила: студентка 6 курса МБФ (3 группа)
Рубилкина В. С.

- ПЦР — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).
- Виды:
- 1. ПЦР в реальном времени;
- 2. ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР);
- 3. Метод NASBA;
- 4. Гнездовая ПЦР;
- 5. Инвертированная ПЦР и др;

ПЦР в реальном времени

- ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР, англ. Real-time PCR, qPCR) — лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК.
-

ПЦР в реальном времени

- Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце.

ПЦР в реальном времени

- Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации.
- Для количественного определения используют два метода:
- 1) флюоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК;
- 2) модифицированные олигонуклеотиды (ДНК-зонды), которые флюоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

ПЦР в реальном времени

- Часто ПЦР в реальном времени комбинируют с ОТ-ПЦР (обратная транскрипция) для измерения малых количеств мРНК, что позволяет исследователю получать количественную информацию о содержании данной мРНК в клетке и, соответственно, позволяет судить об уровне экспрессии данного гена в отдельной клетке или ткани

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

- представляет собой метод амплификации специфического фрагмента рибонуклеиновой кислоты (РНК).
- Одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК (cDNA) и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР.

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

- Для превращения последовательности РНК в комплементарную ДНК используют обратную транскриптазу:
- 1. Реакция первой цепочки:
- Комплементарная ДНК (cDNA) образуется на матрице мРНК из dNTP ферментом обратной транскриптазой. Компоненты реакции смешиваются с ДНК-праймером и буфером с обратной транскриптазой на один час при 37 °C.
- 2. Реакция второй цепочки:
- После того как обратная транскрипция закончена и образована cDNA на матрице мРНК, следующие циклы производятся по стандартной методике ПЦР.
- После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нужной последовательности.[

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

- ОТ-ПЦР обычно используется при изучении вируса иммунодефицита человека, так как ВИЧ является ретровирусом и поэтому использует фермент обратную транскриптазу ВИЧ для синтеза вирусной ДНК, которая затем встраивается в геном хозяина.

- Экспоненциальная амплификация при помощи ОТ-ПЦР является чувствительной методикой, с помощью которой может быть обнаружено малое количество молекул РНК.
- ОТ-ПЦР широко используется для диагностики генетических заболеваний и полуколичественного определения специфических молекул РНК в клетке или ткани как индикатор экспрессии соответствующих генов.

Метод NASBA

- Метод NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplificaition)- транскрипционный метод амплификации.
- Методика основана на выделении РНК микроорганизма из исследуемого материала, в отличие от традиционной ПЦР.

- На сегодняшний день является наиболее современным методом диагностики и контроля лечения ряда инфекций передаваемых половым путем (ИППП).

Метод NASBA

- преимущества метода NASBA:
- - высокая чувствительность
- - высокая специфичность
- - возможность раннего контроля проводимого лечения
- - диагностика скрытых, хронических и персистирующих форм заболеваний, выявление возбудителя во время инкубационного периода
- - обследование половых партнеров на носительство ИППП
- - подтверждение результатов других лабораторных методов: бактериальный посев, микроскопия, ИФА (иммуноферментный анализ), метод ПЦР и др.

Метод NASBA

- Недостатки:
- метод NASBA определяет живые микроорганизмы, в том числе и их некультивируемые формы.
- В случае гибели микроорганизмов результат NASBA будет отрицательным даже при избытке ДНК погибших клеток.

Гнездовая ПЦР

- гнездовая ПЦР (nested polymerase chain reaction, nested PCR) - вариант полимеразной цепной реакции с использованием двух пар праймеров (внешних и внутренних), одна из которых способна амплифицировать внутренний участок ампликона, полученного после первого раунда амплификации с внешней парой праймеров.

Гнездовая ПЦР

- Существует несколько вариантов применения Г.п.ц. р. в лабораторной диагностике.
- Напр., в одном из вариантов проводится амплификация (15—30 циклов) с внешней парой праймеров, при этом амплифицируется основной фрагмент ДНК.
- Далее часть содержимого переносится в новую пробирку, содержащую реакционную смесь, в состав которой входит пара праймеров, узнающая последовательности, лежащие внутри основного ампликона.
- Второй раунд амплификации (реамплификации) также составляет также 15-30 циклов.

Гнездовая ПЦР

- В другом варианте температура отжига внутренней пары праймеров подбирается с таким расчетом, чтобы при проведении первого раунда амплификации они не участвовали в реакции.
- Обычно температура отжига праймеров в этом варианте подбирается на 10—15°С ниже, чем для внешней пары праймеров.
- программа амплификации в этом случае состоит из двух программных блоков.
- После проведения первого программного блока амплификации температура отжига праймеров для второго раунда задается на 10 градусов ниже, что обеспечивает эффективное участие внутренней пары праймеров во втором раунде амплификации.
- По сравнению со стандартной полимеразной цепной реакцией Г.п.ц.р. имеет более высокую чувствительность и специфичность.

Инвертированная ПЦР (Inverse PCR)

- 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 с последующим соединением фрагментов (лигирование).
- В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR)

- проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК.
- Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа.
- ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.
- Модификаций этого метода является англ. Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR), в котором используются праймеры с разной концентрацией, и праймер с низкой концентрацией подбирается с высокой (температурой плавления), чем праймер с высокой концентрацией. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддержать эффективности реакции на протяжении всех циклов.

Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR)

- 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.

Виртуальная ПЦР

- математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции, использующий данные о нуклеотидных последовательностях праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации фрагментов исследуемого генома, хромосомы, или любого другого участка ДНК.
- Этот инструмент используют для оптимизации подбора праймеров или ДНК-зондов к ДНК-мишени.
- Праймеры анализируются на наличие участков связывания и определяется степень их комплементарности к ДНК-мишени.

Виртуальная ПЦР

- Некомплементарные основания в участке связывания праймера с ДНК-мишенью снижают стабильность праймера, так как снижают температуру плавления, а также некомплементарные основания в 3'-конце праймера ингибируют инициацию синтеза ДНК в ПЦР с помощью ДНК-полимеразы Taq, которая не обладает корректирующей 3',5'-экзонуклеазной активностью.
- Если же некомплементарные основания находятся только на 5'-конце праймера и праймер стабилен при конкретной температуре отжига, то в этом случае Taq-полимераза будет использовать данный праймер как затравку для начала синтеза ДНК, комплементарной ДНК-мишени.

- Результат ПЦР in silico с помощь
  jPCR.
- Показаны места отжига прайме
  потенциальный ПЦР-продукт

Другие виды ПЦР

- **Групп-специфическая ПЦР** (англ. group-specific PCR) — ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям.
- Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера:
- последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов.
- Противоположный этому методу является — уникальная ПЦР (англ. unique PCR), в котором задача состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

Другие виды ПЦР

- **Вложенная ПЦР** (Nested PCR) — 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.

Другие виды ПЦР

- **ПЦР длинных фрагментов** (Long-range PCR) — модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований).
- Используют смесь двух полимераз, одна из которых — Taq-полимераза с высокой процессивностью (т.е. способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая — ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это Pfu полимераза.
- Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой, так как Taq-полимераза останавливает синтез ДНК если был добавлен не комплементарный нуклеотид. Этот не комплементарный нуклеотид удаляет Pfu полимераза.
- Смесь полимераз берется в отношении 50:1 или даже меньше 100:1, где Taq-полимераза берётся в 25—100 раз больше по отношению к Pfu-полимеразе.

Другие виды ПЦР

- **ПЦР с использованием горячего старта (англ. Hot-start PCR)** — модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами или имитирующие антитела небольшими молекулами типа Affibody, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95 °C в течение 10 минут.

Другие виды ПЦР

- **RAPD (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA)**, ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы.
- В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов.
- Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

Другие виды ПЦР

- **Метод ПЦР с детекцией по "конечной точке" (FLASH - Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization)** позволяет учитывать результаты ПЦР не открывая пробирки, непосредственно после проведения ПЦР, что исключает возможность загрязнения ПЦР-лаборатории ампликонами.
- ПЦР в модификации FLASH исключает стадии анализа продуктов ПЦР методом электрофореза и гель-документации результатов электрофореза, что позволяет сократить время полного ПЦР-анализа до 2-3 часов и снизить стоимость комплекта оборудования для ПЦР-лаборатории.
- Регистрация флуоресценции при FLASH-детекции происходит по окончании реакции ПЦР (по "конечной точке" - "end-point detection") на детекторе флуоресценции, который регистрирует флуоресцентное свечение реакционной смеси в пробирках непосредственно после проведения ПЦР.