

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Воронежский государственный университет

ОСНОВЫ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

*Учебное пособие
по специальности 020201 (011600) – Биология
и направлению 020200 (510600) – Биология
для студентов 3,4 курсов д/о
и 1 курса магистратуры*

ВОРОНЕЖ 2006

Полимеразная цепная реакция	4
1.1 Механизм полимеразной цепной реакции	4
1.2 Детекция продуктов ПЦР	10
1.3 Подготовка проб биологического материала	12
1.4 Оптимизация ПЦР-реакции	14
1.5 Проблемы контаминации при использовании ПЦР	16
1.6 ПЦР в реальном времени (Real Time PCR)	17
1.7 Амплификация РНК	20
1.8 Применение ПЦР	20
Клонирование ДНК	22
2.1 Плазмидные векторы	22
Секвенирование ДНК	29
3.1 Метод полимеразного копирования (метод Сэнгера)	29
3.2 Химическое секвенирование (по Максаму-Гилберту)	31
3.3 Автоматическое секвенирование	34
Блотинг нуклеиновых кислот	36
4.1 Виды молекулярной гибридизации	36
4.2 Методы проведения гибридизации	41
4.3 Зонды, используемые при гибридизации	42

секвенирования; получения одноцепочечной кДНК; получения "тупых" 3'-концов.

Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими *праймерами* в каждом из множества повторяющихся циклов. Праймеры - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-матрицы.

Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров "узнавать" строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной комплементарности. В реакции ПЦР используется пара праймеров, которые ограничивают амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы.

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

1. Длина праймера должна быть 15 - 30 нуклеотидов. Уменьшение длины может привести к снижению специфичности связывания праймера и матрицы. Длинные праймеры увеличивают специфичность системы, но в них сильно возрастает вероятность образования вторичных структур.

2. Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, т.к. именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Это значительно усложняет оценку 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;

3. 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;

4. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону, отжига праймеров происходить не будет, и как следствие - ложноотрицательный результат.

5. Содержании ГЦ-пар в праймере должно быть около 50 %. Чем ниже содержание ГЦ-пар в праймере, тем длиннее он должен быть.

Этапы ПЦР

Для многократного увеличения количества копий исходной ДНК нужна цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов:

- 1) денатурации, или "плавления" ДНК, когда двух цепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;
- 2) связывания (*отжига*) праймеров с матричной ДНК;
- 3) элонгации, или удлинения цепи.

На стадии термической денатурации (расщепления) двуцепочечной молекулы ДНК при 93 – 95°C, происходит разделение комплементарных цепей. Затем пробы охлаждают до 45 - 60°C, что дает возможность связаться праймерам и одноцепочечным дезоксирибонуклеотидам. После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера, при этом температура реакционной смеси вновь повышается до 70 - 72°C, что необходимо для работы Taq-полимеразы. Смена этапов каждого цикла осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси.

Сначала праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, синтезированными в предыдущих циклах. При этом количество основного продукта ПЦР (копии последовательности ДНК, ограниченной праймерами) теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально.

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, когда количество ампликонов достигает 0.3 - 1 пмоль.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют: утилизация субстратов (дНТФ и праймеров); стабильность реагентов (дНТФ и фермента); количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы; неспецифические продукты или праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу; 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.

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции амплификации, используют подход, получивший название «горячий старт» (от англ. «hotstart»). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Дело в том, что в зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления (T_m), при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, т.е. температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и, таким образом, обеспечивает специфичность реакции. Существуют различные варианты реализации «горячего старта»:

1. внесение в реакционную смесь Taq-полимеразы во время первого цикла после прогрева пробирки до температуры денатурации;
2. разделение ингредиентов реакционной смеси прослойкой, например, парафина или воска на части (в нижней - праймеры, в верхней - Taq-полимераза и ДНК-мишени), которые смешиваются при достижении температуры плавления материала прослойки (~45 - 85°C);
3. использование моноклональных антител к Taq-полимеразе. Фермент, связанный моноклональными антителами, становится активным лишь после стадии первой денатурации, когда моноклональные антитела необратимо денатурируют и освобождают активные центры Taq-полимеразы.

Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

Амплификация

Стандартная ПЦР осуществляется автоматически в термоциклере в одной пробирке, содержащей около 1 мкг ДНК, 20 пикомолей каждого праймера, по 50 мкмоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и две единицы термостабильной Taq ДНК-полимеразы.

Проба со смесью помещаются в металлический блок, температура которого изменяется с помощью элемента Пельтье. Элемент Пельтье позволяет изменять температуру блока с большой скоростью, что сокращает продолжительность каждого цикла ПЦР.