

# Введение в ПЦР и методы, основанные на ПЦР

Прикладная генетика для зоологов, лекция 3  
Мюге Н.С.

- 
- Введение в ПЦР и методы основанные на ПЦР: микросателиты (STR),
  - AFLP,
  - RAPD,
  - PCR-RFLP,
  - Inter-SINE PCR и т.п.
  - Правила написания праймеров. Интерпретация данных «фрагментного анализа». Использование ДНК-маркеров в популяционной генетике, сравнение возможностей микросателлитного и изоферментного анализа.
- 



# История ПЦР

---

- Первоначально искусственный синтез ДНК с использованием олигонуклеотидов был предложен в 1971 (!) г. но не нашел применения (Kleppre et al., 1971)
- Предложен в 1983 г Кэрри Маллисом (Kary Mullis, (публикация 1985г).
- Нобелевская премия по химии 1993 г.
- Патент Cetus Corporation, затем продан за 300000 Hoffmann-La Roche. Значительно тормозил развитие методов, основанных на ПЦР, неоднократно оспаривался в судах (Du Pont, Promega)
- Патент истек в 2005 г.!



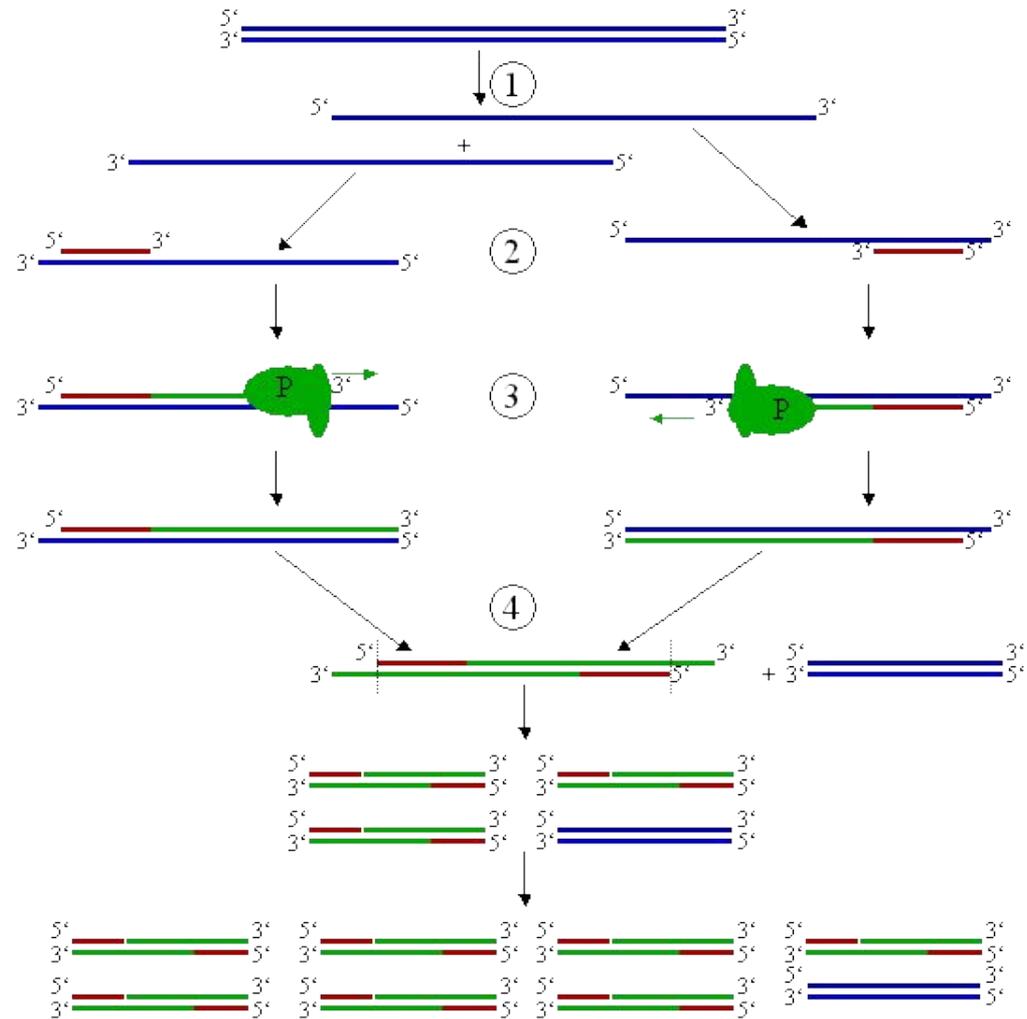
# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

---

- Выделенная ДНК
- Буфер
- Mg
- dNTPs (dA, dC, dT, dG)
- Taq-полимераза
- Праймеры («туда и обратно»)
- Амплификатор
  
- Набор на 100 реакций – от 900 до 2000 руб



# Схема ПЦР



---

□ Ролик про ПЦР с диска



# Эволюция ПЦР. Возможно, «самый первый»

---



# Эволюция ПЦР. Амплификатор Терцик

---



# Эволюция ПЦР. Амплификатор “Tetrad Thermal Cycler” (MJ Research PTC-225, USA)



# Термостойкая ДНК-полимераза

---

- ▣ *Taq*-полимераза - *Thermus aquaticus*
- ▣ *Pfu*-полимераза - *Pyrococcus furiosus*
- ▣ *Pwo*-полимераза- *Pyrococcus woesei*
  
- ▣ *И др.*
- ▣ *А также смеси в различных сочетаниях*



# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

## наборы реактивов для ПЦР

---

- «Сухие ядра Гаджи Омаровича» (ИОГЕН, БИОКОМ) -  
«...просто добавь воды»
  - готовый сухой премикс в разовых пробирках
  - дилуэнт (разбавитель)
  - праймеры
  - ДНК Вашего организма

Плюсы: работает как зверь, не безумно дорого (15р реакция), не требует (?) морозильника.

Минусы: нет возможности оптимизации по Mg, объему и т.п.



# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

## наборы реактивов для ПЦР

---

- Наборы для ПЦР
- Силекс ([www.sileks.com](http://www.sileks.com)), Хеликон ([www.helicon.ru](http://www.helicon.ru)) и много других
- Есть возможность оптимизации,
- HotStart и другие модификации фермента



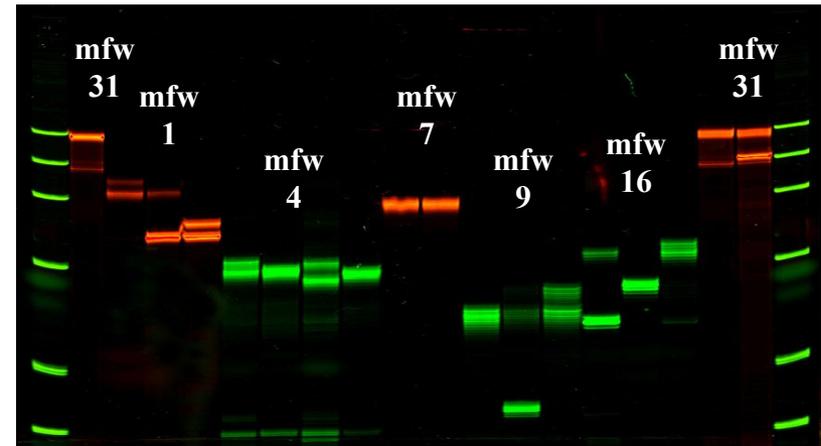
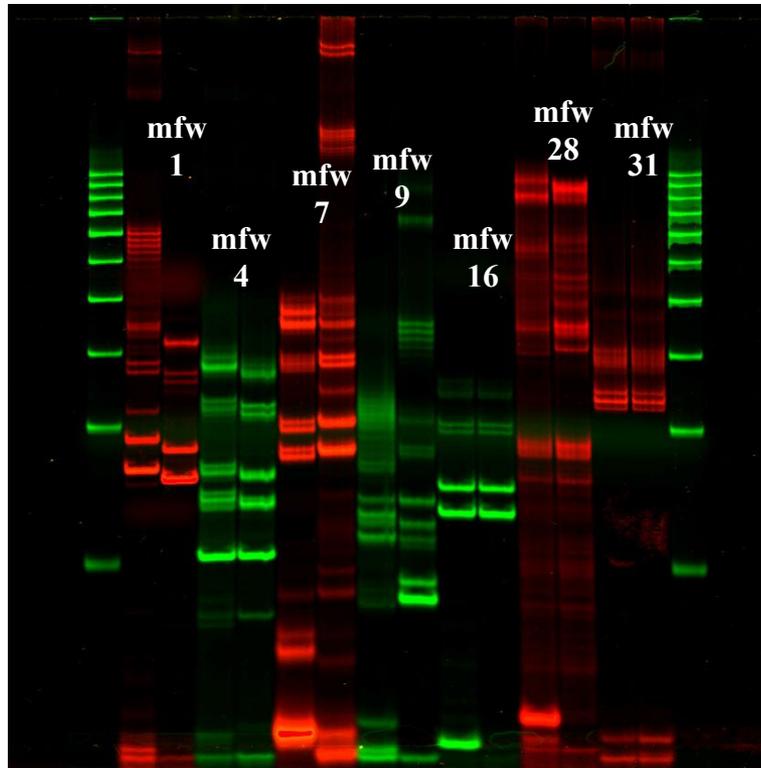
# Оптимизация ПЦР

---

- Подбор температуры отжига
- Титрование по магнию (1.0 – 3.5 mM)
  
- Если не помогло:
- Touch-Down PCR с широким диапазоном  $t$
- Удлинение отжига и синтеза (до 2 минут)
- Работа с матрицей и с методом экстракции ДНК (пересаживание (доп. очистка), концентрация, разбавление, вырезание из агарозы крупных фрагментов и т.д.)
- Использование других праймеров
- Nested PCR



# Оптимизация ПЦР – титрование по Mg. и температуре отжига



Strictly following the protocol in original

► publication Grooijmans et. al. 1997

- Adjusted:
- Touchdown
  - Annealing  $t^{\circ}$
  - Mg<sup>2+</sup>
  - etc.

# ПЦР: правила «хорошего тона»

---

- Всегда ставить отрицательный контроль (вода вместо ДНК)
- Ставить положительный контроль (с заведомо работающей ДНК)
- ПЦР-гигиена - не допускать попадания ПЦР-продукта в зону, где Вы собираете реакцию
- Иметь «свой» набор реактивов и праймеров, пипетки должны быть четко маркированы (до и после ПЦР разные комплекты)
- ПЦР продукты хранятся в отдельном холодильнике, и берутся другим комплектом рук.



# Вещества, улучшающие специфичность (и/или) выход PCR реакции

| Вещество                     | Сток      | Используемые концентрации    | Механизм действия   |
|------------------------------|-----------|------------------------------|---|
| BSA                          | 10 µg/ µl | ~0.1 µg/ml                   | стабилизация фермент  |
| DMSO                         | 100%      | 2.0-15%<br>(оптимально ~5%)  | повышение растворимости   |
| Glycerol                     | 100%      | 5-20%<br>(оптимально 10-15%) | стабилизация фермента   |
| Formamid                     | 100%      | 1-5%                         |   |
| Pyrophosphatase thermostable | 5 u/µl    | 0.001 - 1 u/реакцию          | устранение пирофосфатов, которые могут обращать реакцию полимеризации |



# Влияние на ПЦР реакцию:

| Вещество               | действие  |
|------------------------|---|
| Агароза                | не мешает до ~1%.   |
| AcONa (pH 5.0)         | начинает ингибировать при $\geq 5\text{mM}$ .   |
| EDTA                   | связывается с $\text{Mg}^{2+}$ стехиометрически, начинает ингибировать при $\geq 0.5\text{mM}$ , PCR не идёт при $1\text{mM}$ . |
| DEPC                   | ингибирует реакцию, лучше не использовать в PCR-реакции растворы, обработанные DEPC.  |
| Желатин                | $10\mu\text{g/ml}$ - не мешает.   |
| Изопропанол            | ингибирование при концентрациях $\geq 1\%$ (более сильный ингибитор, чем этанол).   |
| Масло, покрывающее PCR | может устранять ингибирующий эффект некоторых загрязнений.  |
| NaCl                   | заметно ингибирует при $25\text{mM}$ , PCR не идёт при $50\text{mM}$ .  |
| Сахароза               | не мешает до 30%.   |
| Фенол                  | уменьшает выход при $>0.2\%$ , PCR не идёт при $0.5\%$  |
| Этанол                 | для некоторых реакций - стимулирующий эффект при 1%, для других - ингибирование при концентрациях $> 1\%$                       |

# Влияние красителей на PCR.

---

□ Красители:

❖ Cresol red 0.2mM

❖ Бромфеноловый синий <20µg/ml

❖ EtBr~ 0.1 µg/ml

Вывод – краситель и утяжелитель (глицерин, сахароза) можно добавлять непосредственно в ПЦР реакцию (обле



# Праймеры для ПЦР

---

Длина 18-30 пар оснований

- GC-состав ~ 40—60 %;
- близкие  $T_m$  праймеров (отличия не более, чем на 5 °C);
- Температура отжига более 55C и менее 60C (если возможно)
- $T_m = 2 \cdot (n_A + n_T) + 4 \cdot (n_G + n_C)$
- отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров;
- желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

Если используем ранее опубликованные праймеры:

- Внимательно читать раздел методы !
- Не верить условиям ПЦР в разделе «методы» (требуется оптимизация под Ваши реактивы и оборудование)



---

# Праймеры для ПЦР

## «Универсальные»

### □ Баркодинг: COI (Folmer et al., 1994)

□ HCO2198      TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA

□ LCO1490      GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

### □ Simon 1991, 1994 – universal primers for arthropods

Molecular Ecology (2005) 14, 891–899

doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02448.x

## Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets

L. E. BLANKENSHIP and A. A. YAYANOS

*Marine Biology Research Division, Scripps Institution of Oceanography, 9500 Gilman Dr. 0208, La Jolla CA, 92093, USA*

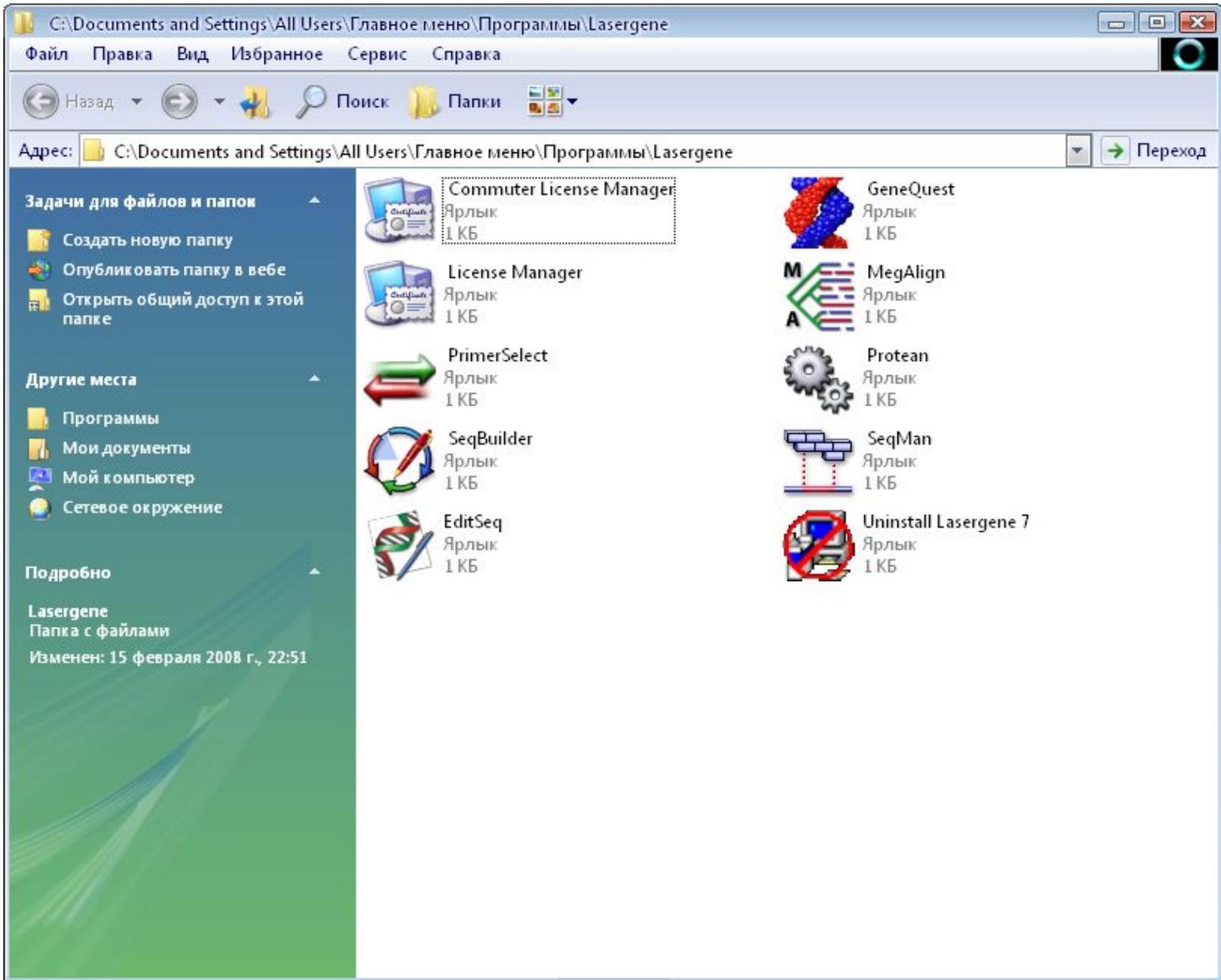
---

# Праймеры для ПЦР

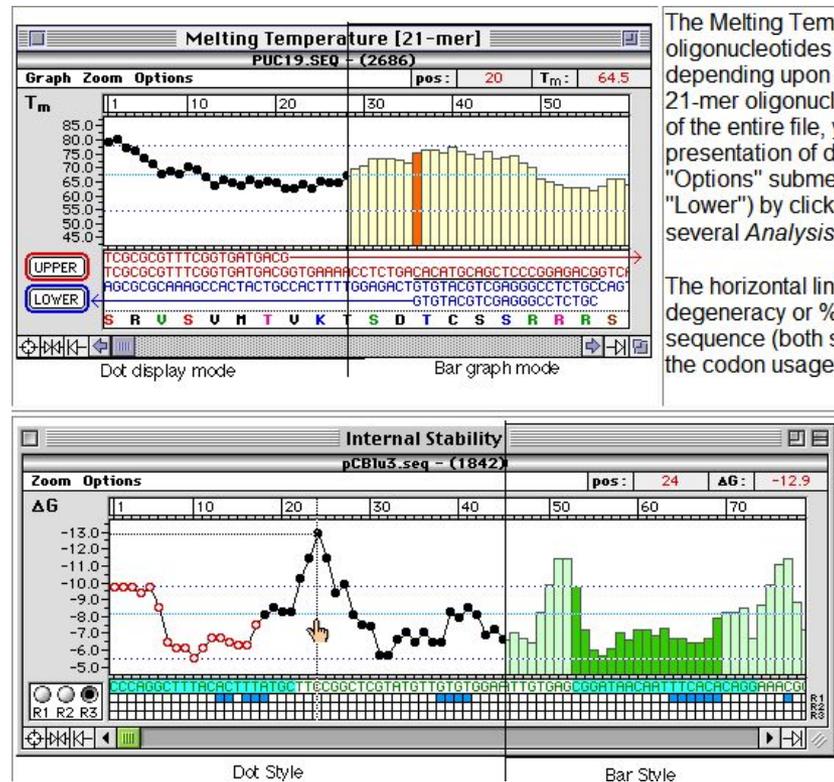
---

- Создание своих праймеров
- Программы: PrimerSelect (DNASTAR), Oligo
- Необходимо знать последовательность (генбанк)
- Размер фрагмента
- Проверка на димеры и шпильки
- Проверка на ложные сайты отжига

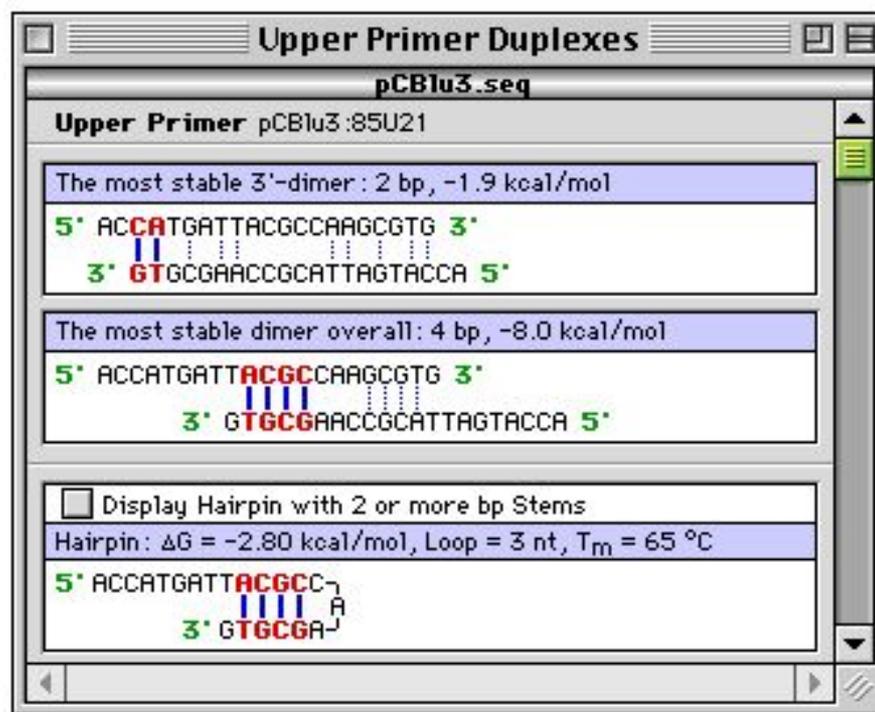




# Разработка праймеров – температура отжига



# Разработка праймеров – шпильки и димеры



# Разработка праймеров – ложные сайты отжига

**Lower Primer False Priming Sites**

**M13MP18**

**Lower Primer - M13MP18:6310L19 (positive strand)**  
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

**Priming efficiency : 428 (above the threshold)**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(6328) ccaaaaagggtcagtgctgc (6310)5'

**Priming efficiency : 205 (above the threshold)**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(626) agcaaatggtc--tgc tgc (610)5'

**Priming efficiency : 194 (above the threshold)**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(808) gtaatatggtcagtcctgc (790)5'

**Priming efficiency : 185 (above the threshold)**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(5125) tctaagtggtcagtg-tgc (5108)5'

**Priming efficiency : 121**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(5989) agaaaagtggtc-gctctgc (5971)5'

**Lower Primer - M13MP18:6310L19 (negative strand)**  
Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

**Priming efficiency : 76**

5'(6328) GGTTTTCCAGTCACGACG (6310)3'  
3'(5744) ccaaaaagcgggaaactgc (5762)5'

# Создание праймеров на фланкирующие области в программе PrimerSelect (DNAStar).

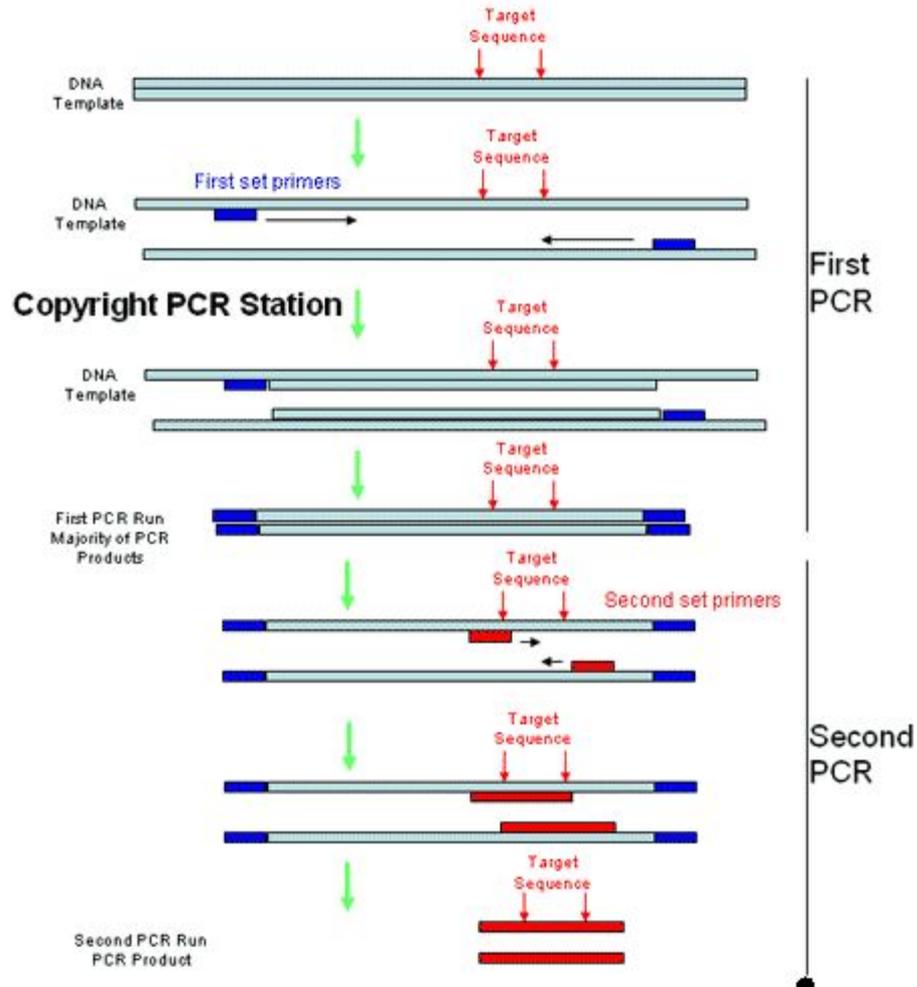
The screenshot displays the PrimerSelect software interface. The main window shows a sequence alignment for 'Chlamydia exon 2 minisat2.seq' with a scale from 100 to 700. A selection range is indicated from 96 to 753. An 'Amplification Summary' dialog box is open, providing details for the selected primers and the resulting PCR product.

**Amplification Summary**

Upper Primer: Chlin2F2 27-mer 5' CGAGTGTCTGGTTTATGGTGCTGTTGT 3'  
Lower Primer: Chlin2R2 23-mer 5' CTGGGAAGAAGGGACGGAAGA 3'

| DNA 250 pM, Salt 50 mM        | Upper Primer   | Lower Primer   |
|-------------------------------|----------------|----------------|
| Primer Tm                     | 61.3 °C        | 61.3 °C        |
| Primer Overall Stability      | -48.6 kcal/mol | -47.1 kcal/mol |
| Primer Location               | 96..122        | 753..731       |
| Product Tm - Primer Tm        | 15.7 °C        |                |
| Primers Tm Difference         | 0.1 °C         |                |
| Optimal Annealing Temperature | 57.3 °C        |                |
| Product Length                | 658 bp         |                |
| Product Tm (%GC Method)       | 76.9 °C        |                |
| Product GC Content            | 44.1%          |                |
| Product Tm at 6xSSC           | 98.5 °C        |                |

# Nested PCR (гнездовой ПЦР)



# Touch-Down PCR

---

- Уменьшение температуры отжига на каждом цикле
- Удлинение времени отжига на каждом цикле
- Иногда – уменьшение также и температуры синтеза на каждом цикле



# Hot-Start PCR

---

- Добавление полимеразы после предварительного прогрева
- Или: активация инактивированной белками полимеразы предварительным длительным прогревом (10-15 минут)
- Или: использование плавких разделителей между полимеразой и матрицей
  
- Позволяет избежать удлинения неспецифически севших праймеров, повышает специфичность реакции



# Анализ ПЦР реакции

---

- Агарозный электрофорез
- Акриламидный электрофорез
- Капиллярный электрофорез

Нужно:

- Гель
- Камера
- Блок питания
- Трансиллюминатор

