

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 (Klepper 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.!



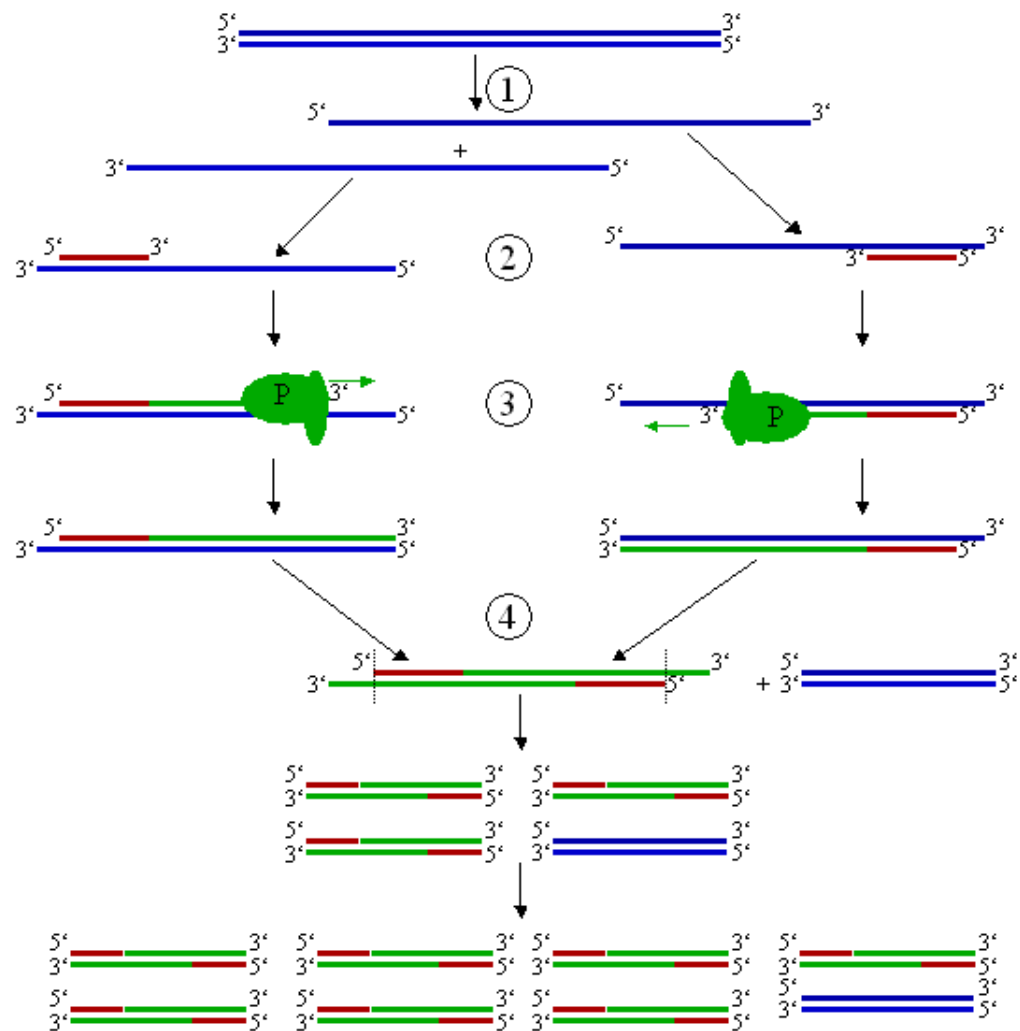
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

- ▶ 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), Хеликон (www.helicon.ru) и много других
- ▶ Есть возможность оптимизации,
- ▶ HotStart и другие модификации фермента

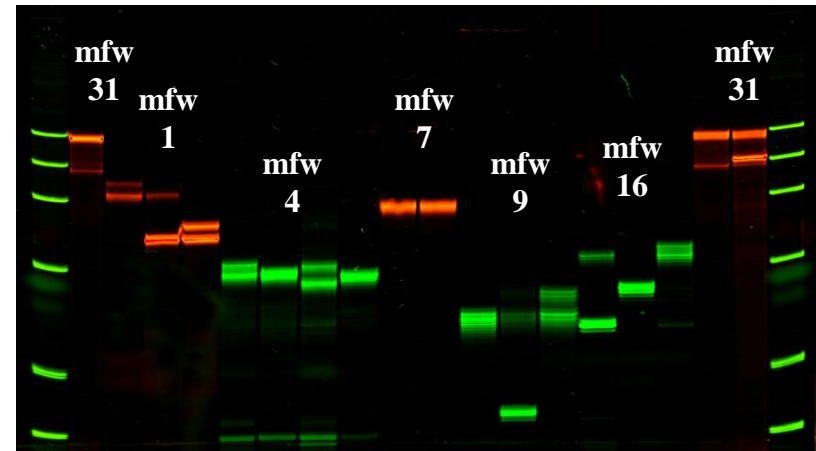
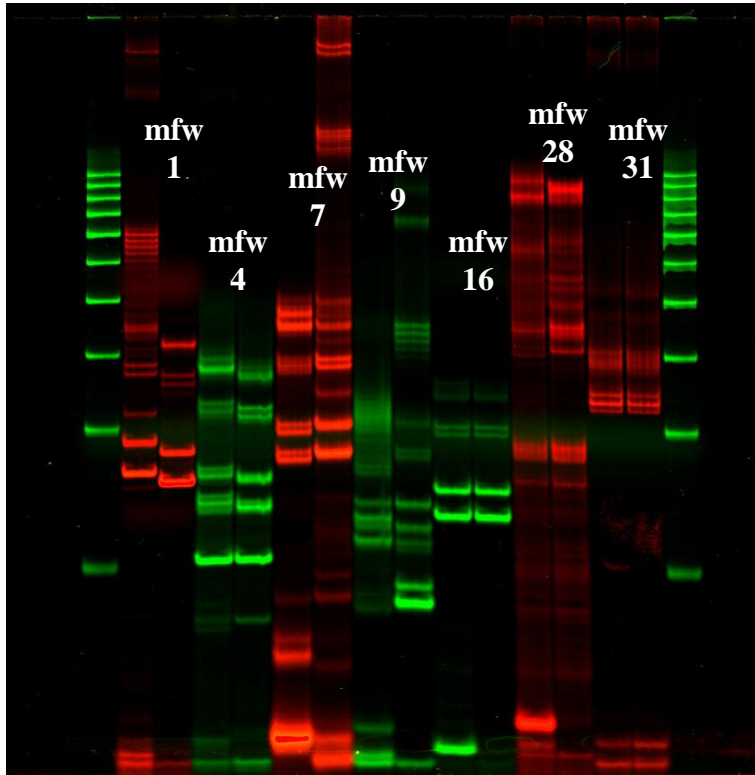


Оптимизация ПЦР

- ▶ 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°
- Mg^{2+}
- 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | $\sim 0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ | стабилизация фермент |
| DMSO | 100% | 2.0-15% (оптимально $\sim 5\%$) | повышение растворимости |
| Glycerol | 100% | 5-20% (оптимально 10-15%) | стабилизация фермента |
| Formamid | 100% | 1-5% | |
| Pyrophosphatase thermostable | 5 $\text{u}/\mu\text{l}$ | 0.001 - 1 $\text{u}/\text{реакцию}$ | 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 Mg^{2+} стехиометрически, начинает ингибировать при $\geq 0.5\text{mM}$, PCR не идёт при 1mM . |
| 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 25mM , PCR не идёт при 50mM . |
| 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 $\geq 1\%$. |

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



C:\Documents and Settings\All Users\Главное меню\Программы\Lasergene

Файл Правка Вид Избранное Сервис Справка

Назад Поиск Папки

Адрес: C:\Documents and Settings\All Users\Главное меню\Программы\Lasergene

Переход

Задачи для файлов и папок











- Создать новую папку
- Опубликовать папку в вебе
- Открыть общий доступ к этой папке

Другие места

- Программы
- Мои документы
- Мой компьютер
- Сетевое окружение

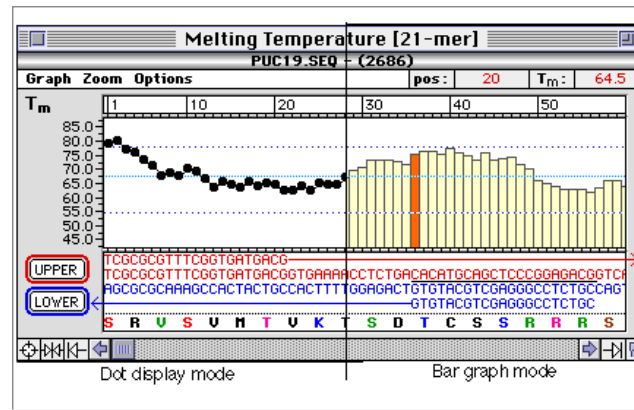
Подробно

Lasergene
Папка с файлами
Изменен: 15 февраля 2008 г., 22:51

| | | | |
|---|---|---|--|
|  | Commuter License Manager Ярлык 1 КБ |  | GeneQuest Ярлык 1 КБ |
|  | License Manager Ярлык 1 КБ |  | MegAlign Ярлык 1 КБ |
|  | PrimerSelect Ярлык 1 КБ |  | Protean Ярлык 1 КБ |
|  | SeqBuilder Ярлык 1 КБ |  | SeqMan Ярлык 1 КБ |
|  | EditSeq Ярлык 1 КБ |  | Uninstall Lasergene 7 Ярлык 1 КБ |

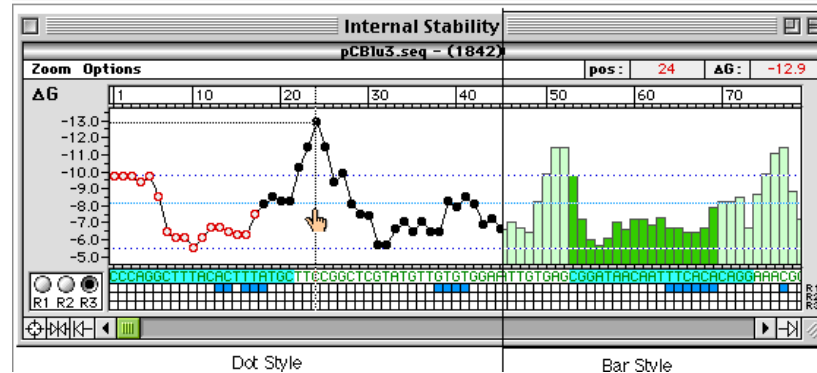


Разработка праймеров – температура отжига



The Melting Temp oligonucleotides w depending upon th 21-mer oligonucle of the entire file, y presentation of da "Options" submen "Lower") by clickir several Analysis c

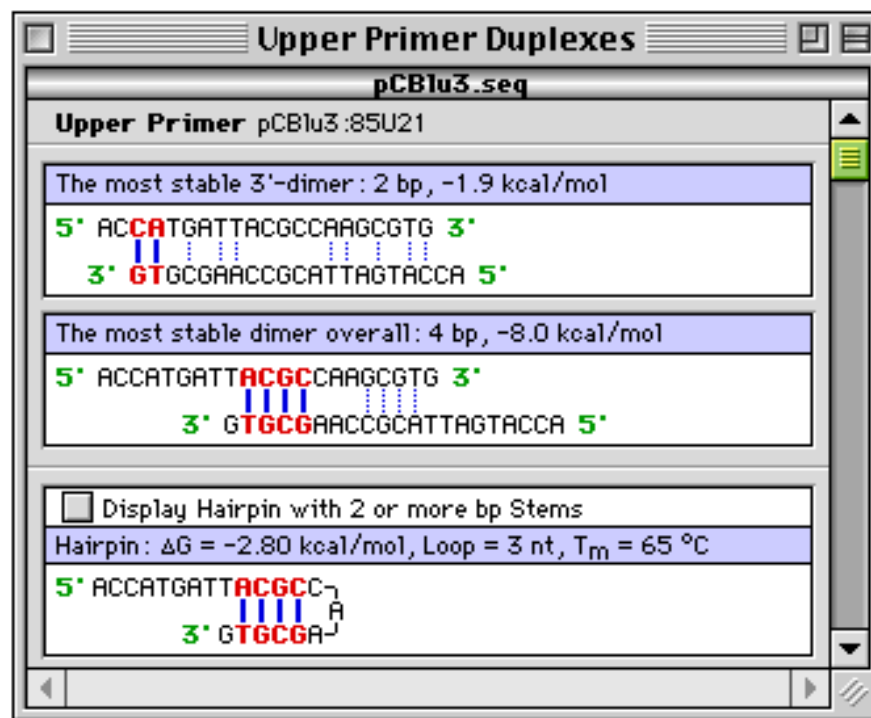
The horizontal line degeneracy or %C sequence (both st the codon usage).



Dot Style

Bar Style

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) ccaaaagggtcagtgctgc (6310)5'

Priming efficiency : 205 (above the threshold)

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

Priming efficiency : 194 (above the threshold)

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

Priming efficiency : 185 (above the threshold)

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

Priming efficiency : 121

5'(6328) GGTTTTC-CCAGTCACGACG (6310)3'
3'(5989) agaaaagtggctc-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 (DNASar).

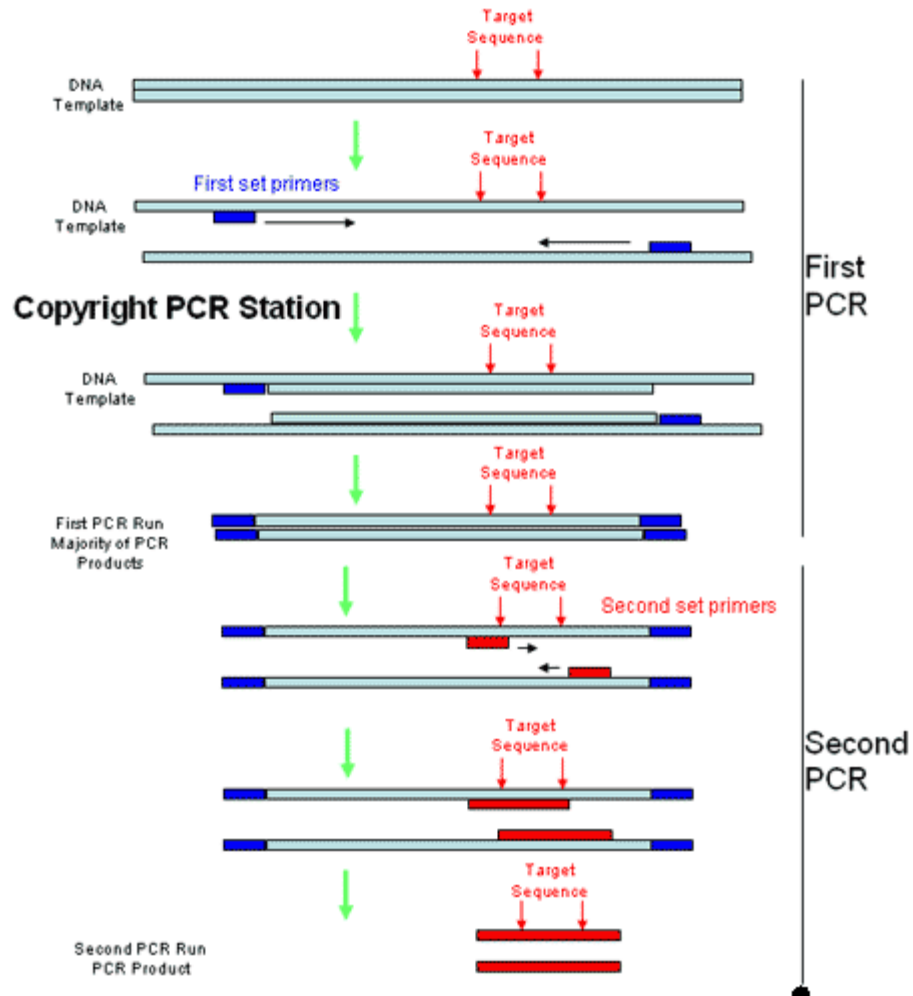
The screenshot displays the DNASar software interface. The main window title is "Intron 2 minisat-2.pcr". Below the title bar, there is a selection bar showing "Selection -> 96...753". The main area shows a sequence alignment for "Chlamydia exon 2 minisat2.seq" with a scale from 100 to 700. A green bar represents the sequence, and a red bar represents the primer binding site. An "Amplification Summary" dialog box is open, showing the following information:

Amplification Summary

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

