ГБОУ города Москвы Гимназия №1505

«Московская городская педагогическая гимназия-лаборатория»

Реферат

**Принципы**

**полимеразной цепной реакции**

 *Автор*: ученица 9 класса «А»

Генерозова Анна

*Руководитель:* Шалимова Е.Г.

Москва

2014

**Оглавление**

Введение

1глава - «Предпосылки для разработки метода ПЦР»

2 глава- «Механизм метода ПЦР»

1.Основные компоненты для проведения реакции

2.Стадии постановки ПЦР. 3.Способ постановки.

3 глава - «Детекция ПЦР продуктов»

1.Метод горизонтального электрофореза

4 глава –« История открытия ПЦР»

5 глава - «Перспективы использования ПЦР»

Заключение

**Структура работы.** Рефератсостоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Список литературы содержит …. научных и научно-популярных источников.

**Введение**

 **Тема** моего реферата посвящена методу полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полимеразная цепная реакция — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов дезокси рибонуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Метод полимеразной цепной реакции в настоящее время широко применяется во многих областях, как в научных экспериментах, так и для проведения медицинских анализов: в диагностике инфекционных и генетических заболеваний, криминалистике и в персонализированной медицине.

**Актуальность.** Введение в медицинский арсенал молекулярных методов исследований технологии ПЦР, стало, безусловно, знаменательным событием, так как оно радикально расширило возможности изучения патогенеза заболеваний, принципиально усовершенствовало диагностику и даже обозначило новые подходы к лечению. Всё более распространённым становится метод молекулярной диагностики, основанный на ПЦР, дающей оптимальное сочетание высокой чувствительности и специфичности. В научных исследованиях ПЦР является также одним из самых востребованных методов. Таким образом, тема является актуальной для современного мира.

**Целью** моего исследования является изучить сам метод ПЦР и узнать о нём как можно больше.

**Проблема** моего проекта заключается в том, что для большинства учащихся средней и старшей школы тема молекулярной биологии является одной из сложных тем для понимания. И уж точно, большинство современных школьников вряд ли хорошо разбираются в методах молекулярной биологии, поскольку научная литература, рассказывающая об этих методах, написана тяжёлым для понимания школьниками научным языком.

**Задачей** моей работы является рассказать об основных принципах метода полимеразной цепной реакции простым языком, чтобы тема одного из самых распространённых методов в молекулярной биологии стала ясной и понятной для каждого, кто в этом заинтересован.

**1 глава**. Предпосылки для разработки метода полимеразной цепной реакции.

Метод полимеразной цепной реакции был разработан для получения большого количества специфических фрагментов молекулы ДНК . В 1953 году была открыта структура ДНК, её фрагменты и её роль как хранителя наследственной информации. Начиная с этого момента было разработано множество способов исследования ДНК.

 Но сложность этих методов заключалась в том, что для любого из них требовалось большее количество препаративных участков ДНК, то есть не весь геном, а только определённый, интересующий нас фрагмент. Для любых исследований в области ДНК(для того, чтобы читать гены, перестраивать генетические конструкции и т.п.) необходимо множество её копий. Это вызвало ряд проблем- необходимо было использовать большое количество биологического материала, проводить исследования было сложно.

 До открытия метода полимеразной цепной реакции существовали другие методы, направленные на увеличение количества копий фрагментов ДНК (например, метод клонирования бактериальной плазмиды),но они были неэффективны.

Поэтому возникла необходимость в изобретении такого метода, который позволил бы амплифицировать(т.е. умножить) какое угодно количество определённых заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

В 1955 году был открыт фермент - ДНК-полимераза, однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеотидных кислот ещё не рассматривалась ,это было обусловлено техническими трудностями ,в частности, нестабильностью фермента. Процедура была неэффективной, требовала много времени и большого количества фермента.

Таким образом, результатом открытия ПЦР американским учёным Кэрри Мюллисом в 1983 году стало почти немедленное практическое применение метода, а само изобретение метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия.

**2 глава**. Механизм полимеразной цепной реакции.

**1**.Компоненты реакционной смеси.

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов:

**Анализируемый образец -** препарат, содержащий тот участок ДНК, который необходимо амплифицировать, т.е. умножить .При его отсутствии специфический продукт амплификации не образуется.

**Два**[**праймера**](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%8C_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85_%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2#.D0.9F)**,**  [комплементарные](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%8C_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85_%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2#.D0.9A) противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК. Праймеры - это искусственно синтезированные нуклеотиды, индентичные соответствующим необходимым участкам ДНК. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации.

**Термостабильная** [***ДНК-полимераза***](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%B0) — [фермент](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82), обеспечивающий достраивание конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

 [**Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты**](http://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D0%B4&action=edit&redlink=1)**–** «строительный материал»,используемый термостабильной ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

[**Буферный раствор**](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80)- смесь катионов и анионов в определённой концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

**2.**Стадии постановки ПЦР

ПЦР- анализ состоит из трёх стадий. ПЦР проводят в  амплификаторе – приборе, в котором циклично автоматически выполняется заданный режим смены температур, позволяющий многократно последовательно проходить 1, 2, 3 стадии.



### Денатурация - расплетение цепей двунитевой ДНК - не ферментативный процесс, который идет при температуре 950С

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °C (или до 98 °C, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется *денатурацией*, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно, перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров, так как, в зависимости от состава и размера, праймеры имеют определённую температуру плавления, при которой образование водородных связей нестабильно, т.е, праймер образует двуцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и таким образом обеспечивает специфичность реакции.

### Отжиг

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом.. Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °C и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60-72 °C.

Для начала процесса репликации в ПЦР используют праймеры -. Они специфично (по принципу комплементарного спаривания) присоединяются к коротким участкам, ограничивающим выбранную мишень. Эта стадия не является ферментативной и проходит в процессе инкубации реакционной смеси при 55-650С. Праймеры присоединяются только к выбранным специфичным для данного возбудителя фрагментам ДНК и не взаимодействуют ни с какими другими последовательностями ДНК (а в клинической пробе очень много ДНК, как человека, так и различных микроорганизмов). Именно этим обеспечивается абсолютная специфичность диагностической ПЦР- тест- системы. Избыточное количество ДНК праймеров по отношению к матричной ДНК обеспечивает высокую чувствительность метода. То есть праймеры в исходном для ПЦР растворе со 100% вероятностью найдут мишень для присоединения.

В результате присоединения праймеров образуются структуры [ДНК-матрица + праймер], являющиеся «затравочными» комплексами. Начинается достраивание праймеров, начиная с 3’-концов, путём комплементарного синтеза на матрицах одноцепочечных фрагментов ДНК. Этот процесс осуществляется с помощью специального фермента - Taq-полимеразы (термоустойчивой ДНК-полимеразы) и нуклеотидов (в качестве строительного материала).

### Элонгация

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5' к 3' концу. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 мин.

Вновь синтезированные двуцепочечные ДНК после стадии денатурации [1] снова связывают праймеры, которые находятся в смеси в избытке [2]. Полученные структуры после достраивания [3] образуют специфические фрагменты ДНК, ограниченные последовательностями праймеров. Таким образом, даже если исходной для ПЦР была только одна молекула ДНК, то в течение 25 – 40 циклов происходит амплификация, т.е. синтезируется большое количество (108-109 копий) специфических фрагментов ДНК

**3**.Способ постановки.

**Глава 3.** Детекция ПЦР - продуктов.

1.Метод горизонтального электрофареза.