

Полимеразды тізбекті реакция (ПЦР)

СНЕ9131 ДНҚ технологиялары · 6B05105 Биотехнология

4-апта · Жаниязов Ж.А., аға оқытушы

Дәріс жоспары

- ПЦР идеясы және тарихы
- Реакция компоненттері
- Үш температуралық кезең және цикл
- Праймер жобалау ережелері
- ПЦР түрлері, бақылаулар, қателер

4 / 15

апта • ПЦР

ПЦР: ДНҚ-ны in vitro көбейту

1985

К. Муллис әдісті
жариялады

1993

Химия бойынша
Нобель сыйлығы

2^n

n циклдан кейінгі
көшірме саны

25–35

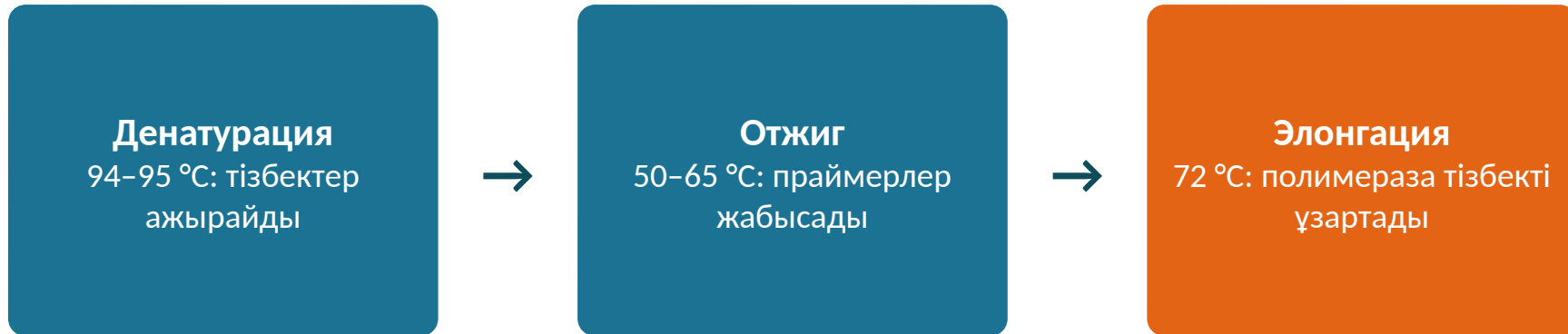
стандартты цикл саны

Бірнеше сағатта бір матрицадан миллиардтаған көшірме алуға болады.

Реакция компоненттері

Компонент	Қызметі
Матрицалық ДНҚ	Көбейтілетін ДНҚ-ның бастапқы үлгісі
Праймерлер (F және R)	Бөлектің шекарасын белгілейді, синтезді бастайды
Тақ-полимераза	Термотұрақты фермент (<i>Thermus aquaticus</i>)
dNTP	Синтезге арналған құрылыс материалы
Буфер және Mg^{2+}	Ферментке оңтайлы орта, кофактор

ПЦР циклінің кезеңдері



Отжиг температурасы әдетте праймер T_m мәнінен 3–5 °C төмен таңдалады.

Өнімнің экспоненциалды өсуі

Цикл саны	Көшірме саны (теория)
1	2
10	1 024
20	≈ 1 миллион
30	≈ 1 миллиард

Іс жүзінде тиімділік 100%-дан төмен, соңында реагенттер таусылып, өсу тоқтайды.

Праймер жобалау

- Ұзындығы 18–25 нуклеотид
- GC құрамы 40–60%
- 3' ұшында 1–2 G немесе C (GC-қысқыш)
- Екі праймердің Tm айырмасы 2–3 °C-тан аспайды
- Шаш қыстырма мен праймер-димер түзілмеуі керек

40–60%

оңтайлы GC құрамы

ПЦР түрлері

Қарапайым (end-point)

Өнім соңында геле анықталады

RT-PCR

РНҚ-ны алдымен кері транскриптазамен кДНҚ-ға айналдырады

Нақты уақыттағы ПЦР (qPCR)

Флуоресценция арқылы өнім көбеюін бақылайды, мөлшерлейді

Мультиплекс

Бір түтікте бірнеше праймер жұбы, бірнеше мақсатты бөлек

Қателер және бақылаулар

Өнім жоқ

Матрица сапасын, Mg^{2+} және отжиг температурасын тексеру

Қосымша жолақтар

Отжигті көтеру, праймерді қайта жобалау

Теріс бақылау

Матрицасыз реакция контаминацияны көрсетеді

Оң бақылау

Белгілі матрица реакцияның жұмыс істейтінін растайды

Қорытынды және бақылау сұрақтары

- ПЦР-дың үш кезеңін атаңыз
- Неге Таq-полимераза қолданылады?
- Жақсы праймердің қандай белгілері бар?
- qPCR қарапайым ПЦР-дан немен ерекшеленеді?
- Тапсырма: ПР №4 «Праймер жобалау»

50–70

бет • [1] Brown