

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Репарация ДНК.
ПЦР

Д.б.н. Сгибнев А.В.

Центральная догма описывает три процесса

1. Репликация

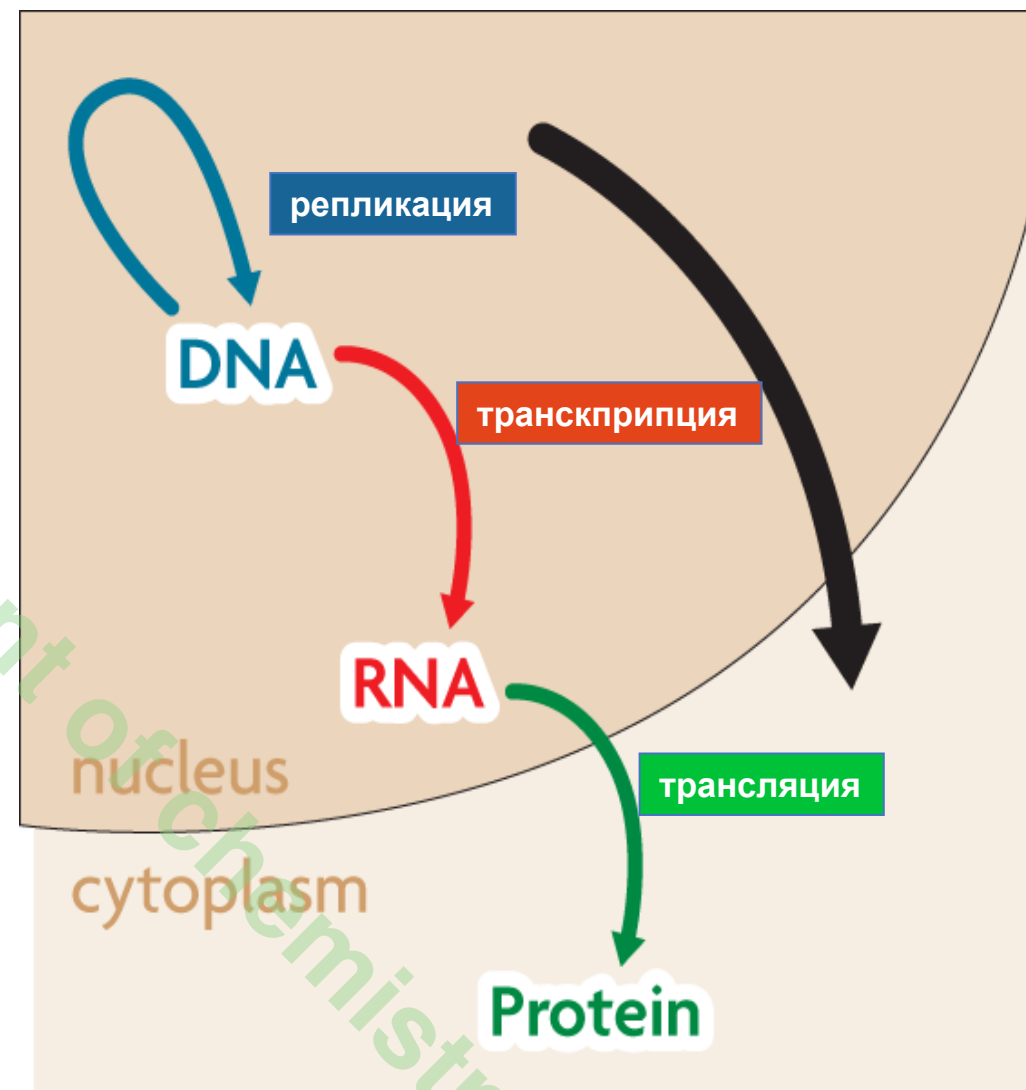
- копирование **ДНК**

2. Транскрипция

- Синтез на основе матрицы ДНК молекул **РНК**
- РНК - это связь между ДНК и белками

3. Трансляция

- Интерпретирует информацию РНК в последовательность аминокислот, которые будут составлять **белок**



Репликация ДНК

Универсальный биологический процесс передачи генетической информации в поколениях клеток и организмов, благодаря созданию точных копий ДНК.

РЕПЛИКАЦИЯ

Фазы репликации:

- Инициация
- Элонгация
- Терминация

Репликация требует наличия нескольких компонентов:

- Матрица – в ее роли выступает материнская нить ДНК
- Субстраты для синтеза – дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ,
- Источник энергии – дАТФ, дГТФ, дЦТФ, ТТФ
- Ферменты
- Факторы роста
- SSB-белки

Репликация: 1-й этап - инициация

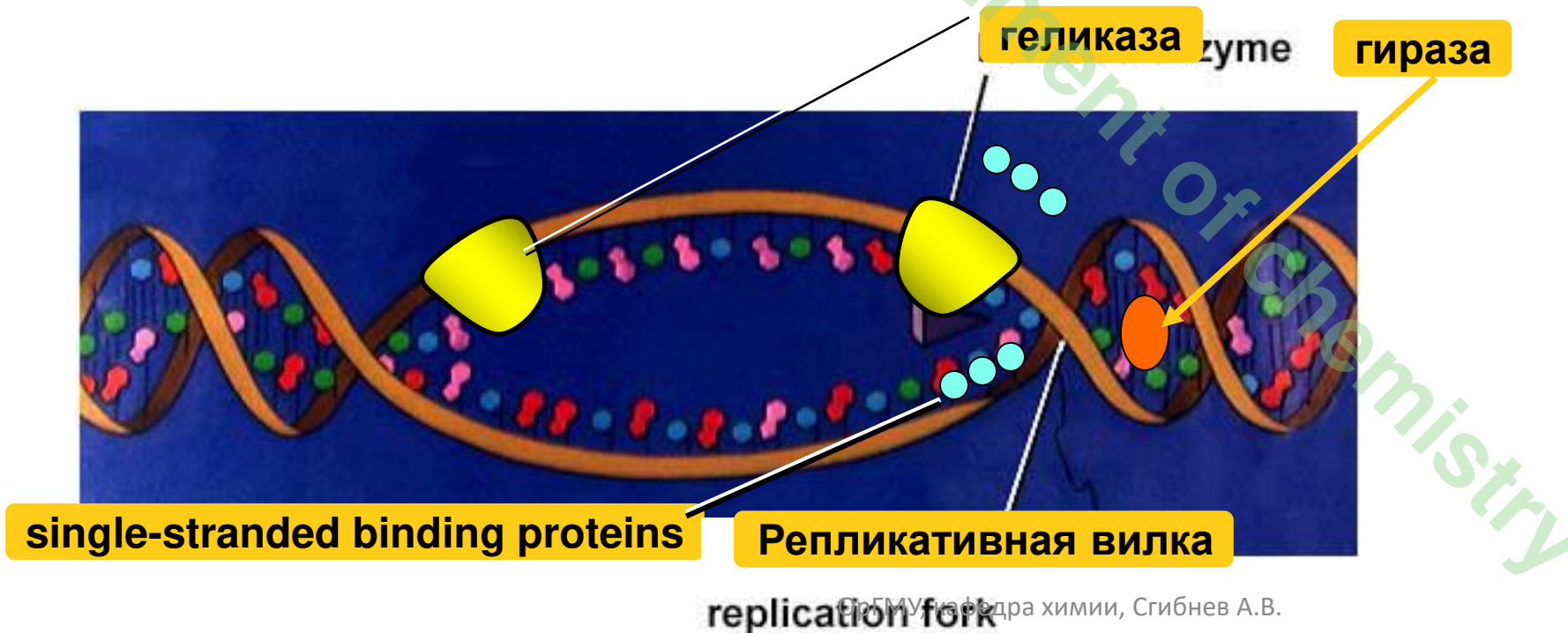
- Раскручивание ДНК

геликаза разделяет спираль двухцепочечной ДНК на одинарные цепи

- ДНК стабилизируется белками, связывающими одноцепочечные ДНК

ДНК-гираза/топоизомераза

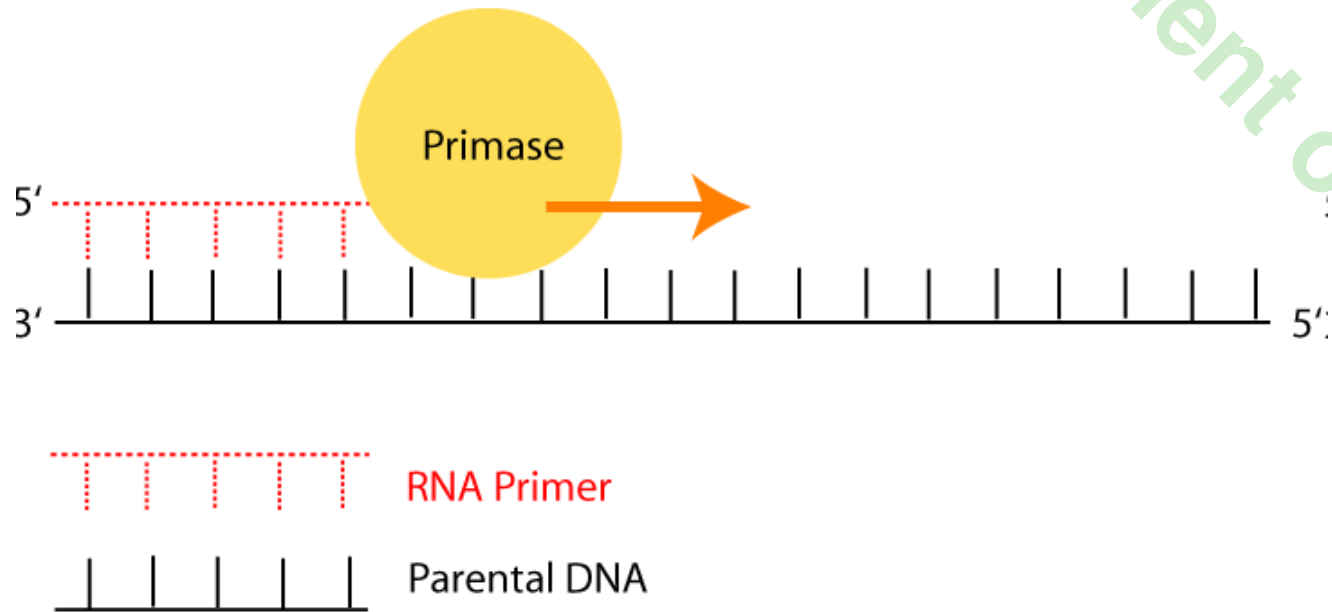
- Фермент, предотвращающий запутывание перед репликационной вилкой



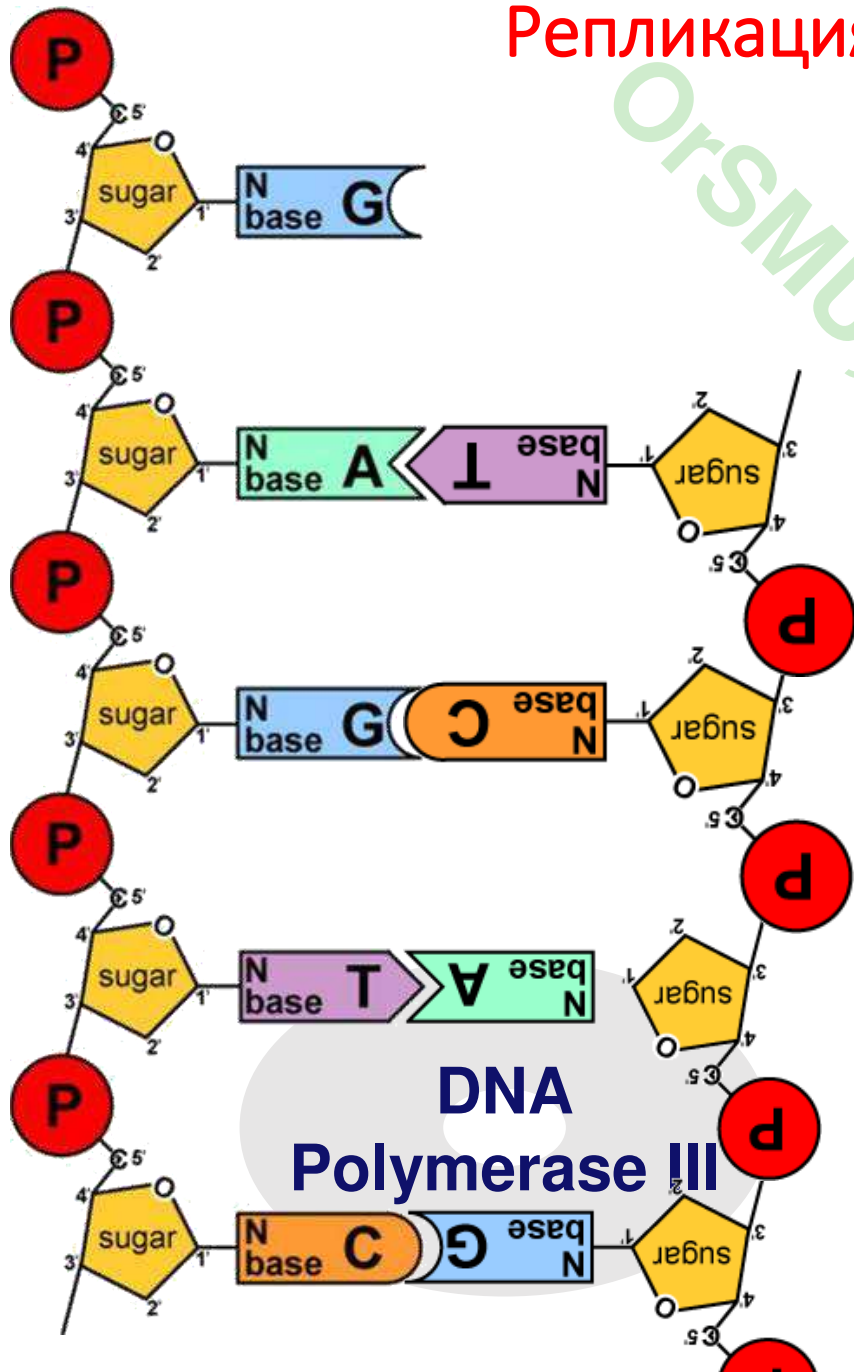
Репликация: 2-й этап - элонгация

- **РНК-праймаза/ДНК-полимераза α**
- Добавляет небольшой участок РНК (праймер РНК) к 3' концу матричной ДНК
- Зачем это нужно делать? ДНК-полимераза III/ДНК-полимераза δ (фермент, создающий новую цепь ДНК) может добавлять нуклеотиды только к существующим цепям ДНК.

DNA Synthesis Requires a RNA Primer

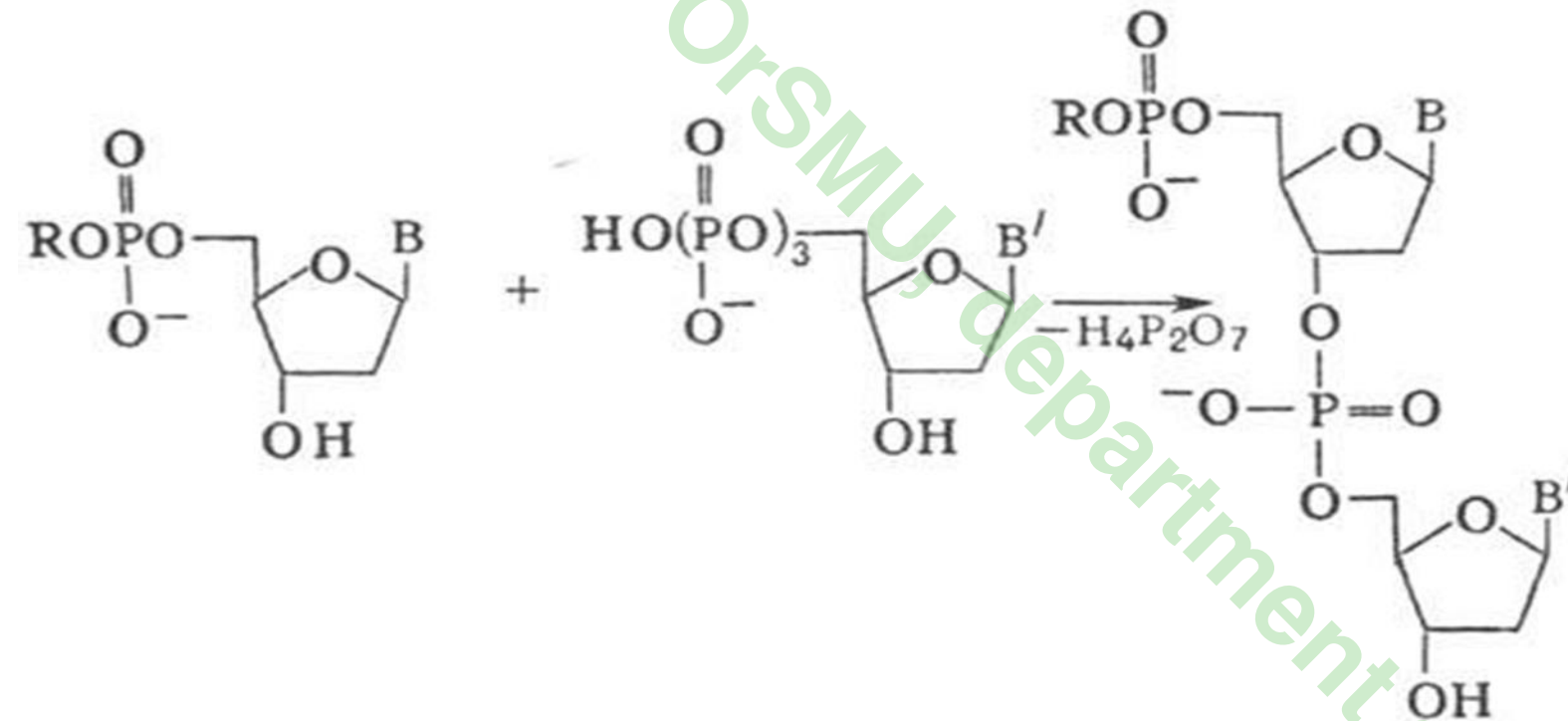


Репликация: 2-й этап - элонгация



- Построение дочерней цепи ДНК
- Добавляются новые **комплментарные основания** с помощью фермента ДНК-полимеразы III / ДНК-полимеразы δ

Реакция полимеризации нуклеотидов



- Суммарное уравнение реакции синтеза полинуклеотида:



Необходимым условием биосинтеза ДНК и РНК является использование полимеразой нуклеозидтрифосфатов в качестве низкомолекулярного субстрата и образование молекулы пирофосфата с последующим его **гидролизом пирофосфатазой**. В случае сохранения пирофосфата в среде реакция бы шла в направлении пирофосфоролиза, т.е. отщепления от ДНК (РНК) нуклеотидных звеньев с образованием нуклеозидтрифосфатов. В этом случае синтез молекул нуклеиновых кислот был бы невозможен.

Свойства ДНК-полимеразы

1. Присоединяет по одному нуклеотиду с 3' конца растущей цепочки.
2. Требуется для начала работы спаренного 3' конца.
3. Отщепляет один нуклеотид назад, если он не спарен – т.е. исправляет свои ошибки.



Частота ошибок при репликации составляет 10^{-6} - 10^{-7} .

Точность репликации обеспечивается 2-мя факторами:

- Соблюдение принципа комплементарности.
- Экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы.

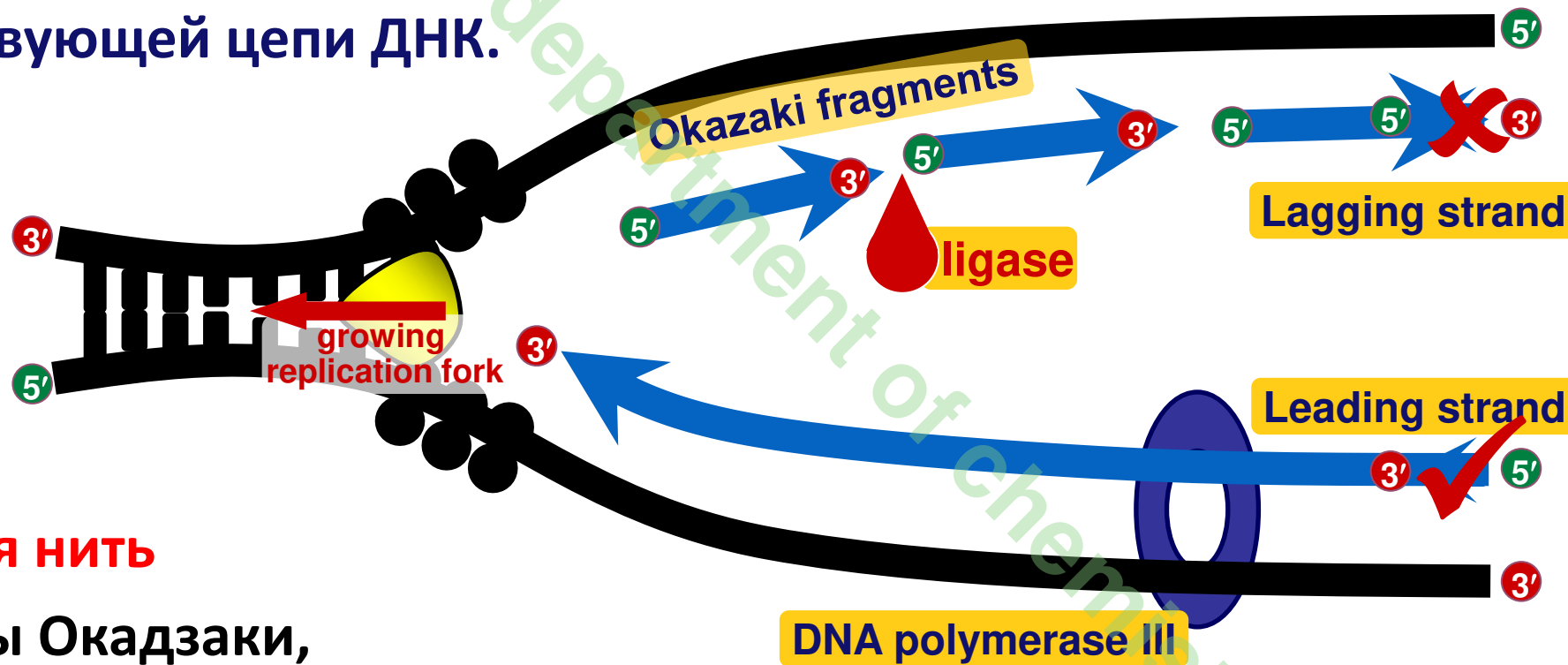
Репликация: 3-й этап терминация

- Замена праймера РНК на ДНК с помощью ДНК-полимеразы I/ДНК-полимеразы β

Ведущие и отстающие нити



Ограничение: ДНК-полимераза III/
ДНК-полимераза δ может
наращивать цепь только на 3' конце
существующей цепи ДНК.



Отстающая нить

Фрагменты Окадзаки,
соединенные ферментом
"точечной сварки" лигазой

Лидирующая нить

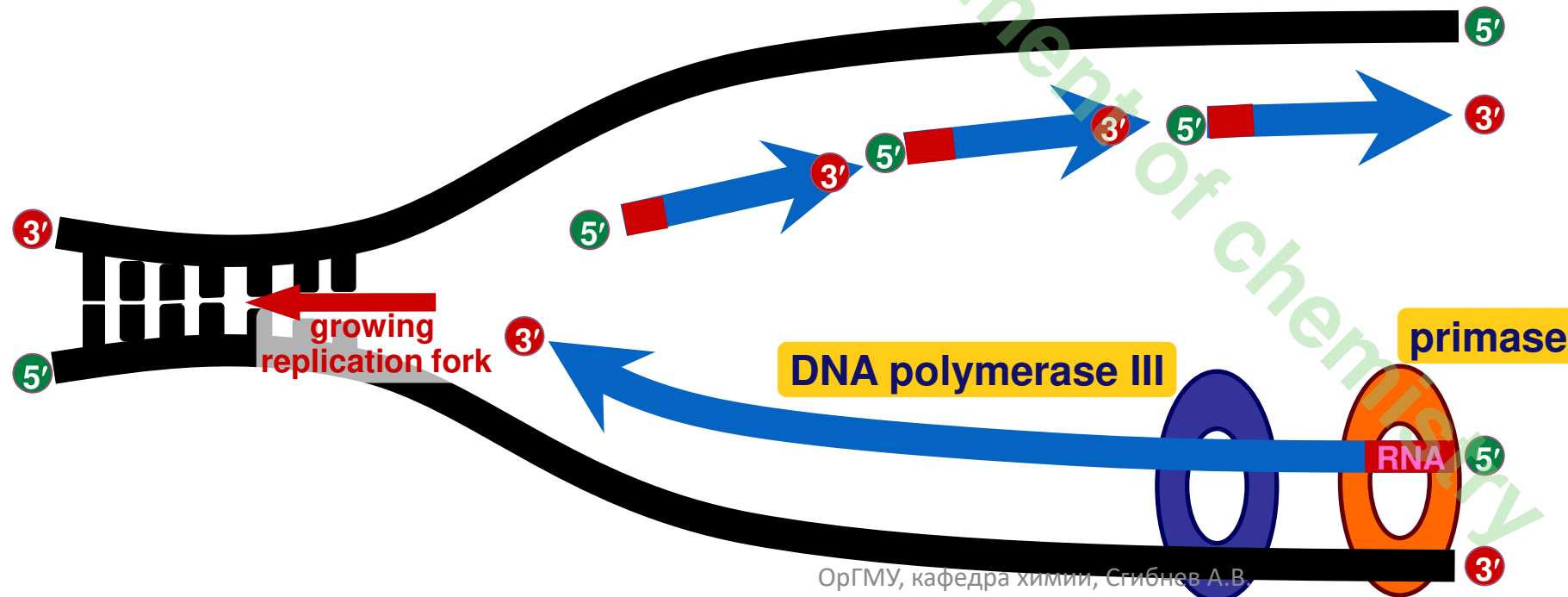
ОргМУ, кафедра химии, Сгибнев А.В. ♦ Продолжается синтез

Репликация ДНК на отстающей нити

Добавлен праймер РНК:

- создан праймазой
- служит стартовой последовательностью для ДНК-полимеразы III

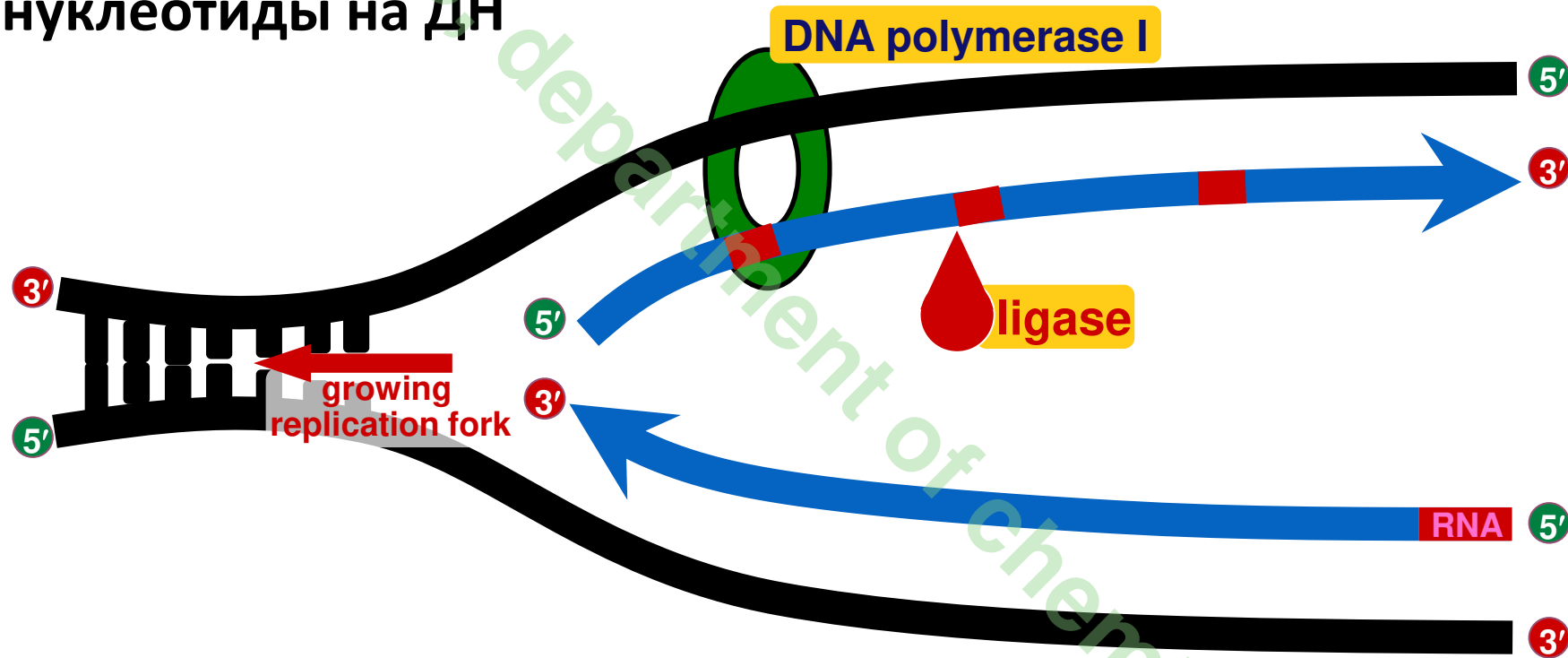
НО синтезируются короткие сегменты, называемые фрагментами Окадзаки



Замена праймеров РНК на ДНК

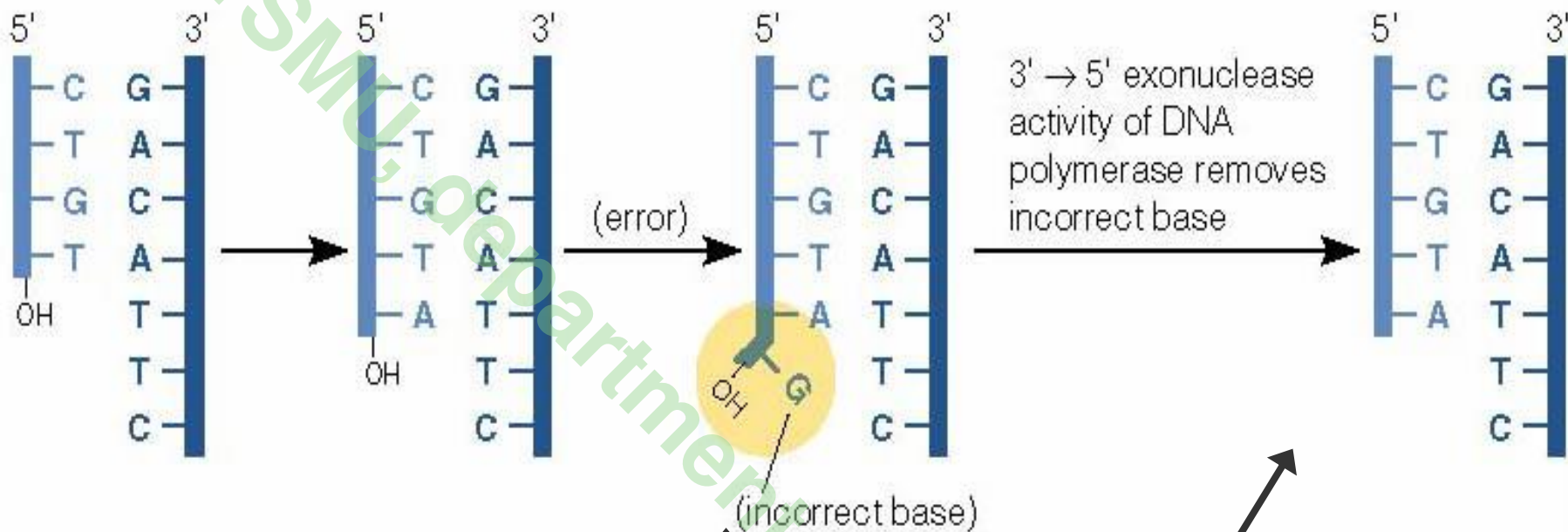
ДНК-полимераза I / ДНК-полимераза β

удаляет участки праймера РНК и
заменяет нуклеотиды на ДН



Нити склеены вместе с помощью
ДНК-лигазы

ДНК-полимераза исправляет ошибки



Если новый нуклеотид не спарен – фермент не может двигаться дальше.

Тогда он убирает неверный нуклеотид и ставит другой.

Выводы по репликации ДНК

- В результате репликации каждая дочерняя клетка получает **точную копию всей ДНК** содержащейся в материнской клетке.
- **ДНК всех клеток одного организма – одинаковая**, как по количеству молекул, т.е. хромосом, так и по их нуклеотидному составу.

OrSMU, department of chemistry

Репарация ДНК

Процесс, позволяющий живым организмам восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК, называют **репарацией**

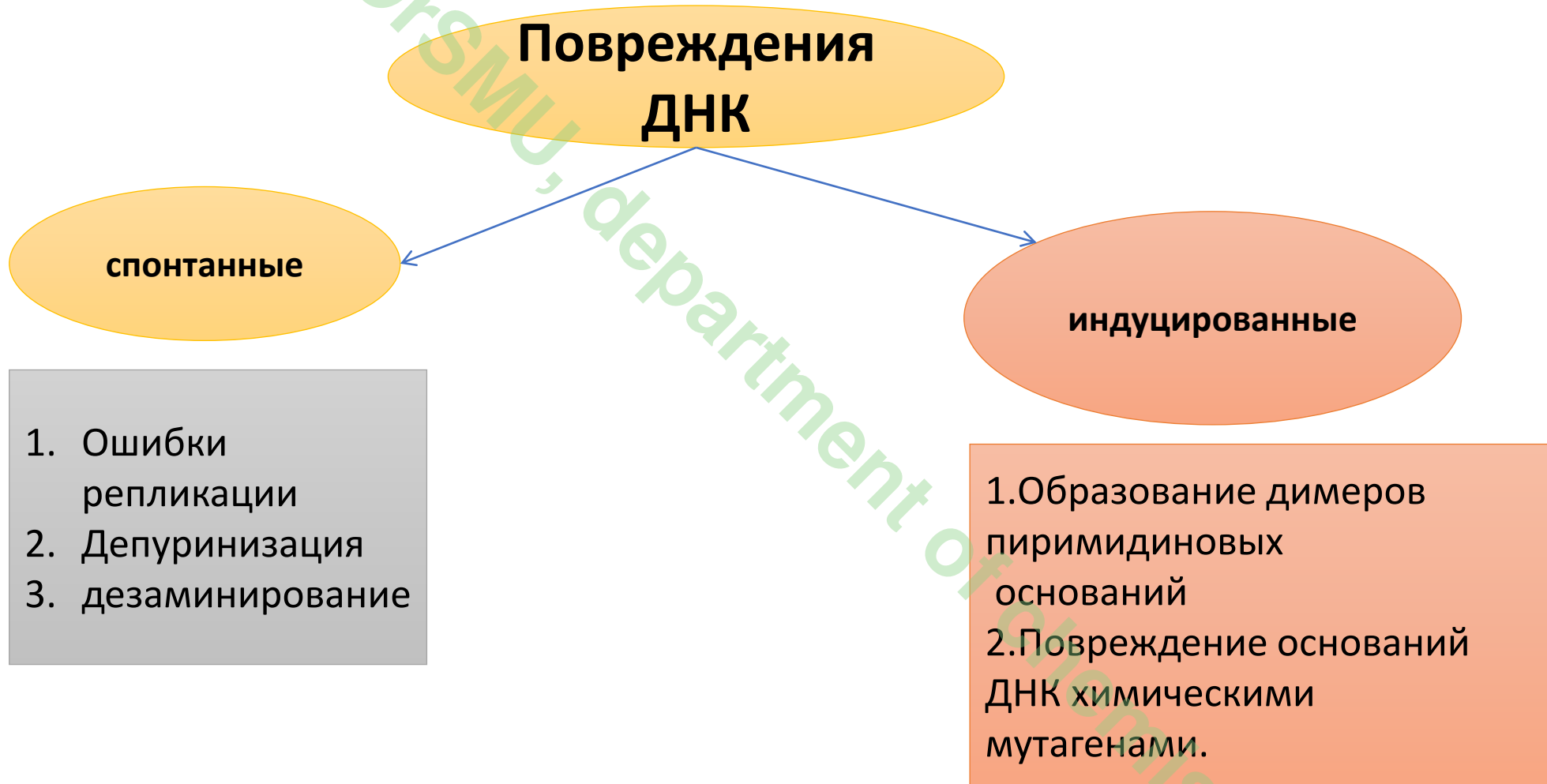
Все **механизмы репарации** основаны на том, что в ДНК есть две копии генетической информации. Если нуклеотидная последовательность одной из двух цепей оказывается повреждённой, информацию можно восстановить, так как вторая (**комплементарная**) цепь сохранена.

Процесс репарации происходит в несколько этапов:

- На **1 этапе**- выявляется нарушение комплементарности цепей ДНК
- На **2 этапе**- некомплементарный нуклеотид устраняется
- На **3-4 -этапах** идёт восстановление целостности цепи по принципу комплементарности.

Редко происходят повреждения, затрагивающие обе цепи ДНК. Повреждения в половых клетках **не репарируются**, т.к. для репарации требуется диплоидный набор хромосом.

Типы повреждений ДНК



Спонтанные повреждения - без участия повреждающих факторов

- 1. Ошибки репликации:** точность репликации ДНК велика, но один раз на 10^5 - 10^6 нуклеотидных остатков происходят ошибки спаривания. Однако **ДНК-полимеразы** способны вырезать нуклеотиды, если они не комплементарны нуклеотиду матричной цепи ДНК.
- 2. Депуринизация:** ДНК теряет за сутки около 5000 пуриновых остатков вследствие разрыва N-гликозидной связи между пурином и дезоксирибозой. В молекуле ДНК образуется участок, лишённый азотистых оснований (AP-site - апуриновый сайт). Этот тип повреждений устраняет **ДНК-инсертаза**.
- 3. Дезаминирование:** все азотистые основания - продукты дезаминирования (урацил, гипоксантин, ксантин) - нехарактерны для состава ДНК и поэтому легко распознаются ферментами репарации.

Индукцированные повреждения –возникают в ДНК в результате воздействия мутагенных факторов радиационной и химической природы.

1. Образование димеров пиримидиновых оснований- под действием УФО двойная связь между C_5 и C_6 атомами углерода (в тимине и цитозине) может разорваться. Образуются пиримидиновые димеры. Удаление димеров происходит под действием фермента фотолиазы . В фотолиазе есть участок, который сам поглощает фотоны. Свет активирует фотолиазу, которая распознаёт димеры в облученной ДНК.
2. Повреждение оснований ДНК химическими мутагенами.

Азотистые основания могут подвергаться разнообразным повреждениям – алкилированию, окислению, восстановлению и т.д.

ДНК является единственной молекулой, которая способна к репарации

Для ДНК характерно:

- Наличие большого числа репарационных систем.
- В клетках имеются белки, специально «патрулирующие» ДНК и осуществляющие поиск дефектов.
- Большинство репарационных систем удаляет не только сами поврежденные нуклеотиды, но и находящиеся рядом участки, т.е. удаляются секции поврежденных нуклеотидов.
- Поскольку ДНК – является двойной спиралью, то неповрежденная цепь служит матрицей для восстановления целостной молекулы ДНК.

Основные повреждения ДНК:

1. Изменение структуры азотистых оснований – алкилирование (чаще всего метилирование с образованием 7-метилгуанина, 1-метиладенина, 6-О-метилгуанина, а также алкилированные производные тимина, аденина и цитозина);
2. Окисление азотистых оснований (образуется 8-окси-7,8-метилгуанин);
3. Гидролиз (дезаминирование, депуринизация, депиримидинизация);
4. Димеризация пиримидинов (чаще всего тиминов, реже цитозинов);
5. Разрыв цепей (одиночные и двойные разрывы);
6. Образование аддуктов (бензо[а]пирен-диол-эпоксид-dG-аддуктов);
7. Межнитевые сшивки.
8. Сшивки ДНК-белок.

Повреждения ДНК бывают:

1. Репарируемые и нерепарируемые.
2. Спонтанные и индуцированные.
3. Индуцируемые экзогенными факторами.
4. Индуцируемые эндогенными факторами.

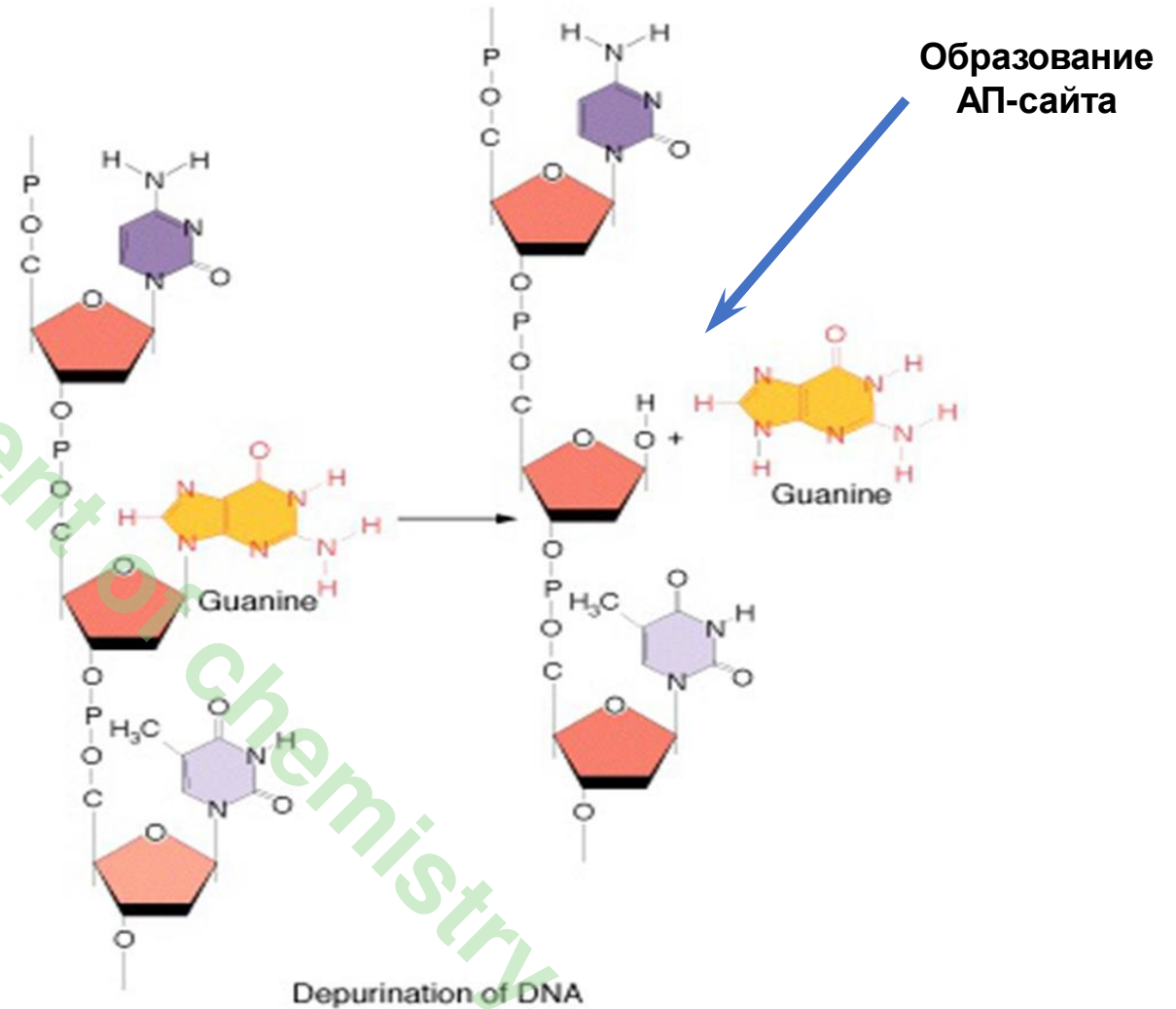
1. **Репарируемые повреждения** удаляются собственными системами клеток, например, возникающие под действием УФ-лучей.
Нерепарируемые повреждения возникают редко.

2. Спонтанные повреждения возникают без каких либо направленных воздействий, а индуцированные – под действием повышенных нагрузок факторами физической, химической или биологической природы.

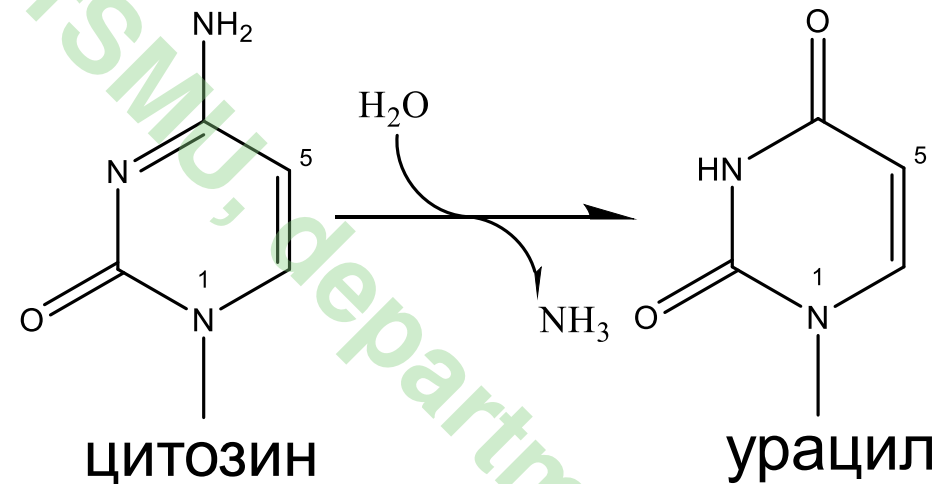
Ежедневно в каждой клетке человека от 2 до 3 тыс. пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (на гаплоидный геном) теряют свои азотистые основания.

В результате образуются АП-сайты (апуриновые и апиримидиновые).

Сохраняется только дезоксирибоза и фосфодиэфирная связь.



К спонтанным повреждениям ДНК относится также **дезаминирование** азотистых оснований:



Ежедневно в каждой клетке человека примерно 200 **ЦИТОЗИНОВ** (на гаплоидный геном) превращается в **урацил**. Кроме того:

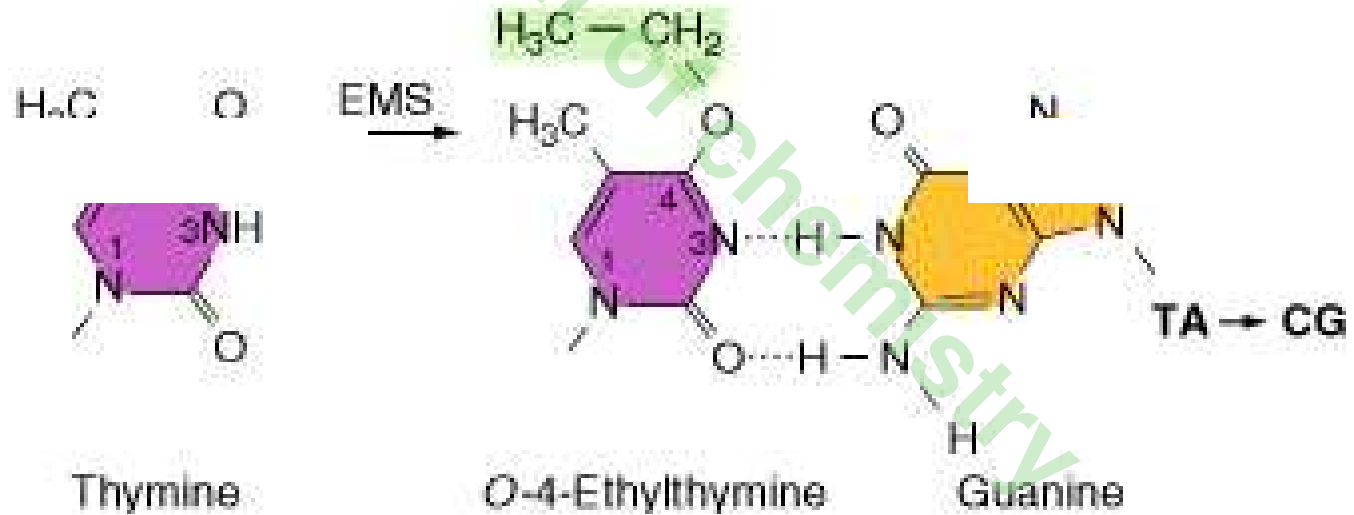
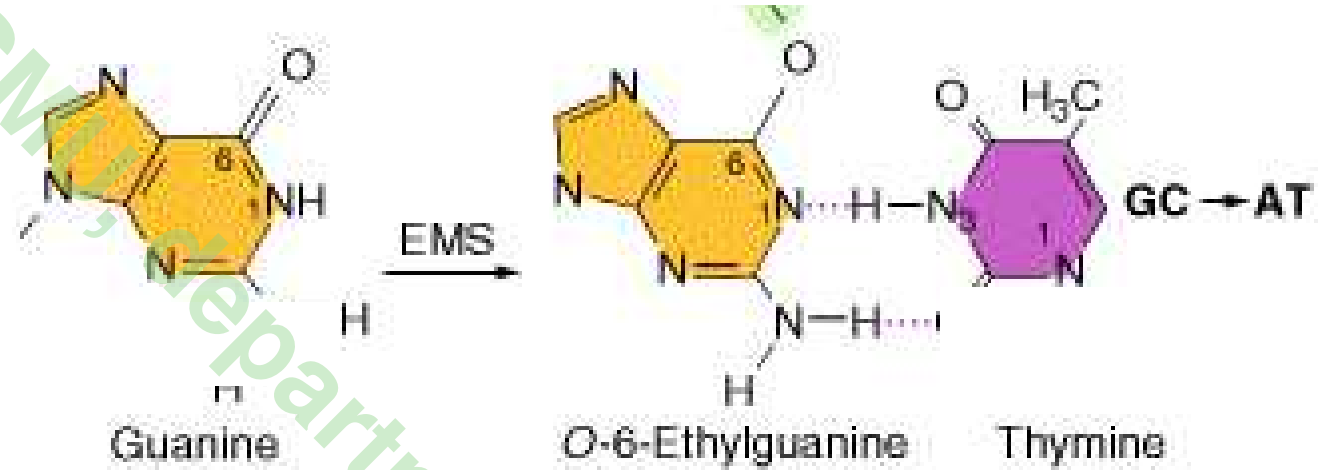
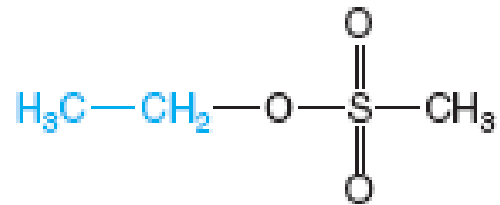
Аденин превращается в **гипоксантин**.

Гуанин – в **ксантин**.

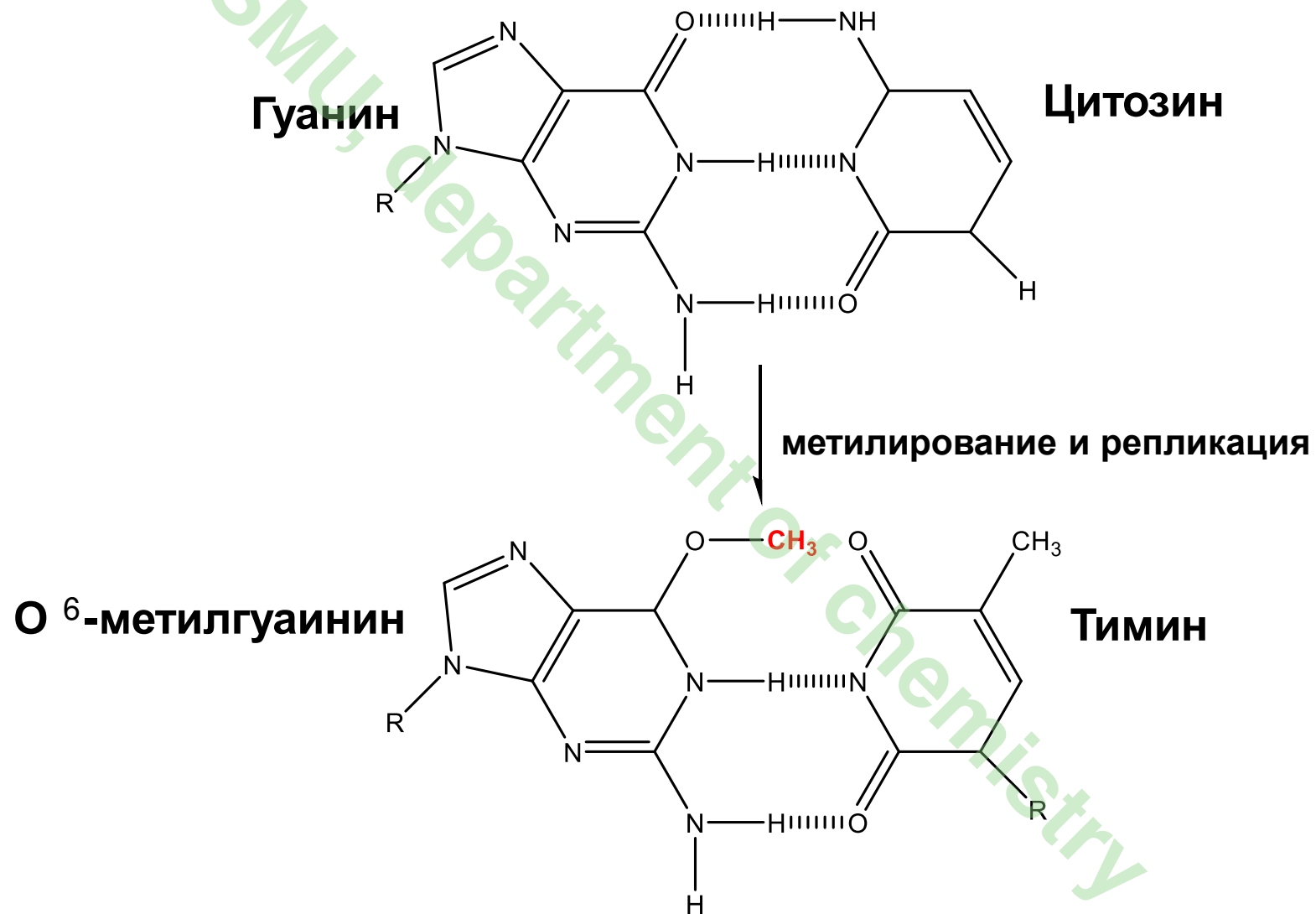
Присоединение метильной CH_3 -группы к углероду в 5-ом положении **цитозина** превращает его в **тимин**.

1.Алкилирование

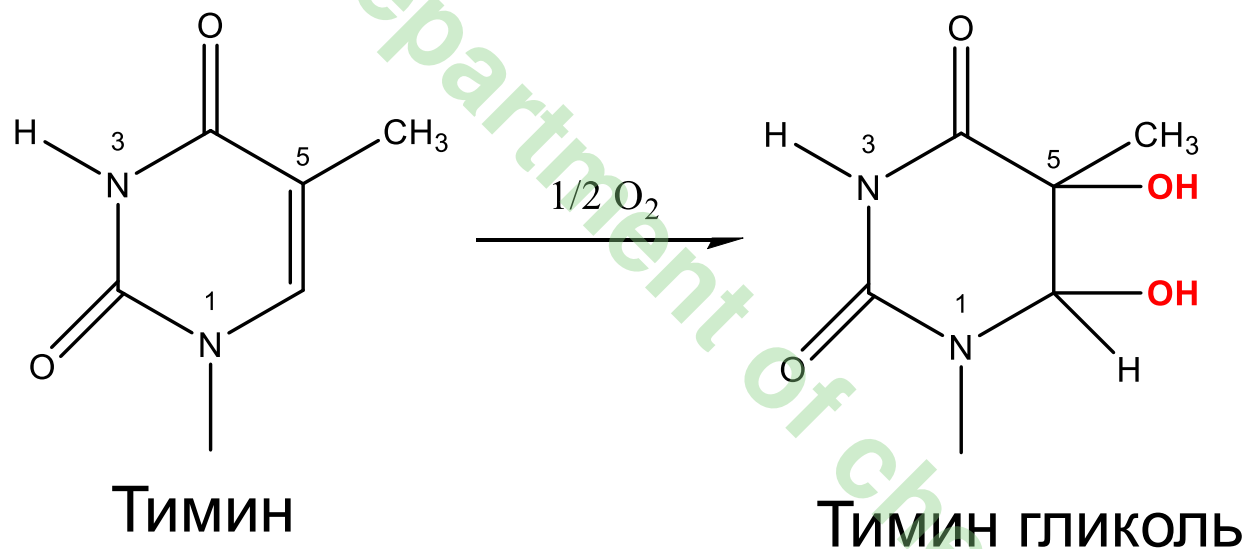
этилметансульфонат
(EMS)



1.Алкилирование: последствия

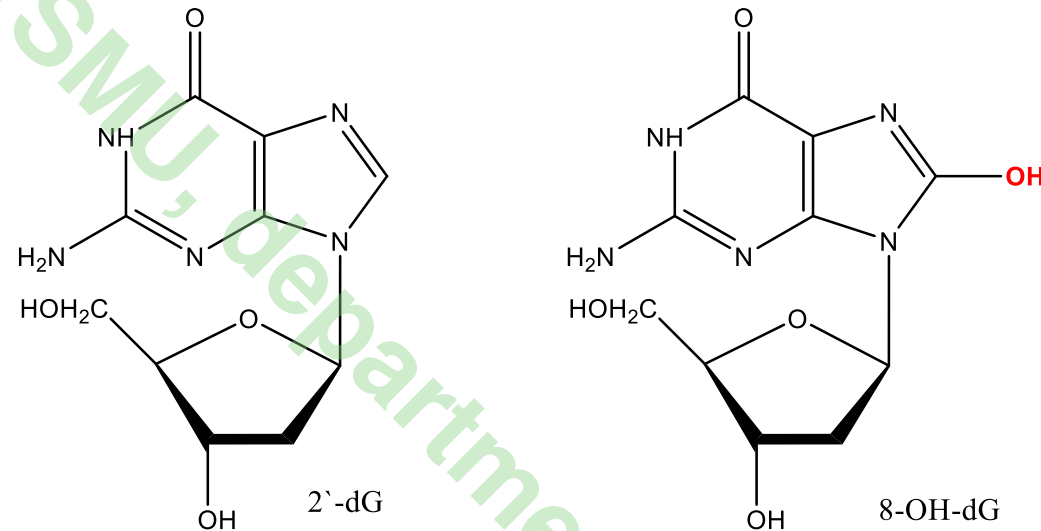


2. Окисление азотистых оснований под действием активных форм кислорода ($O\bullet$, $O-O\bullet$, $HOON$, $\bullet OH$)



При взаимодействии с активными формами кислорода и гидроперекисями образуется тимин, гидроксильированный по 5-му и 6-му положению – тимин гликоль.

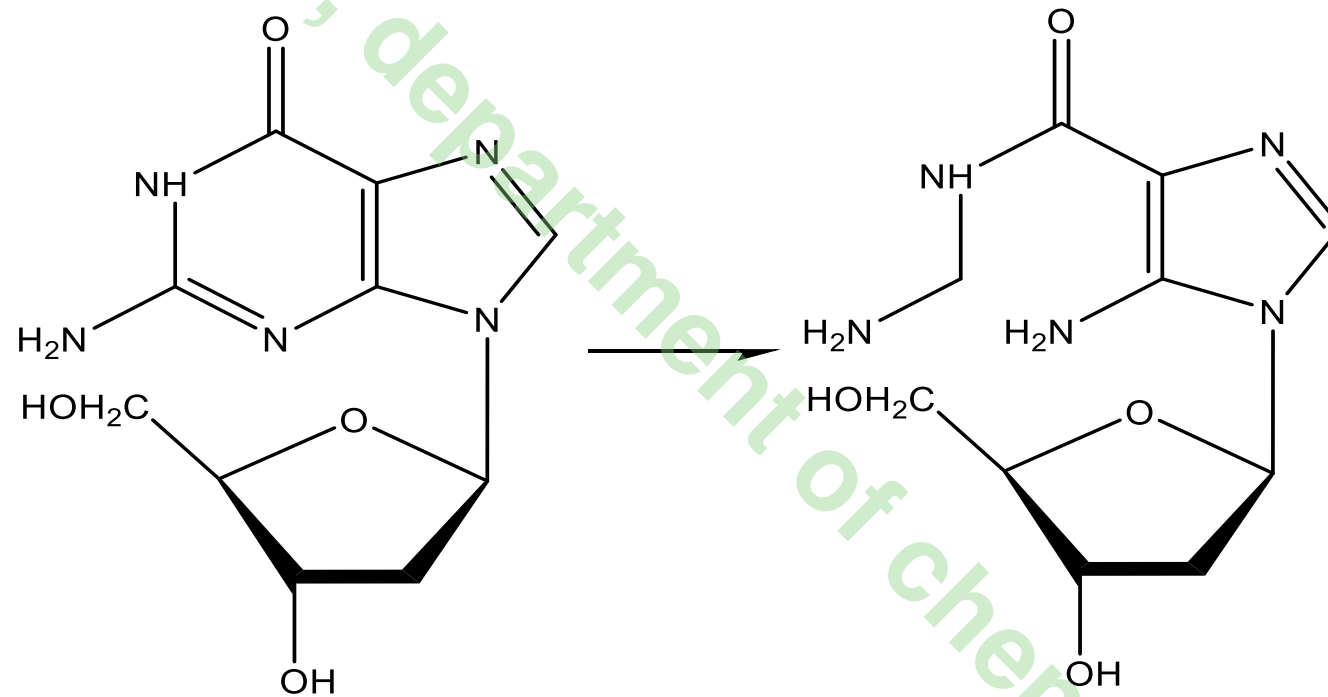
Изменение структуры оснований: окисление Образование 8-оксо-2`-деоксигуанозина



Образование 8-оксо-2`-деоксигуанозина (8-ОГ):

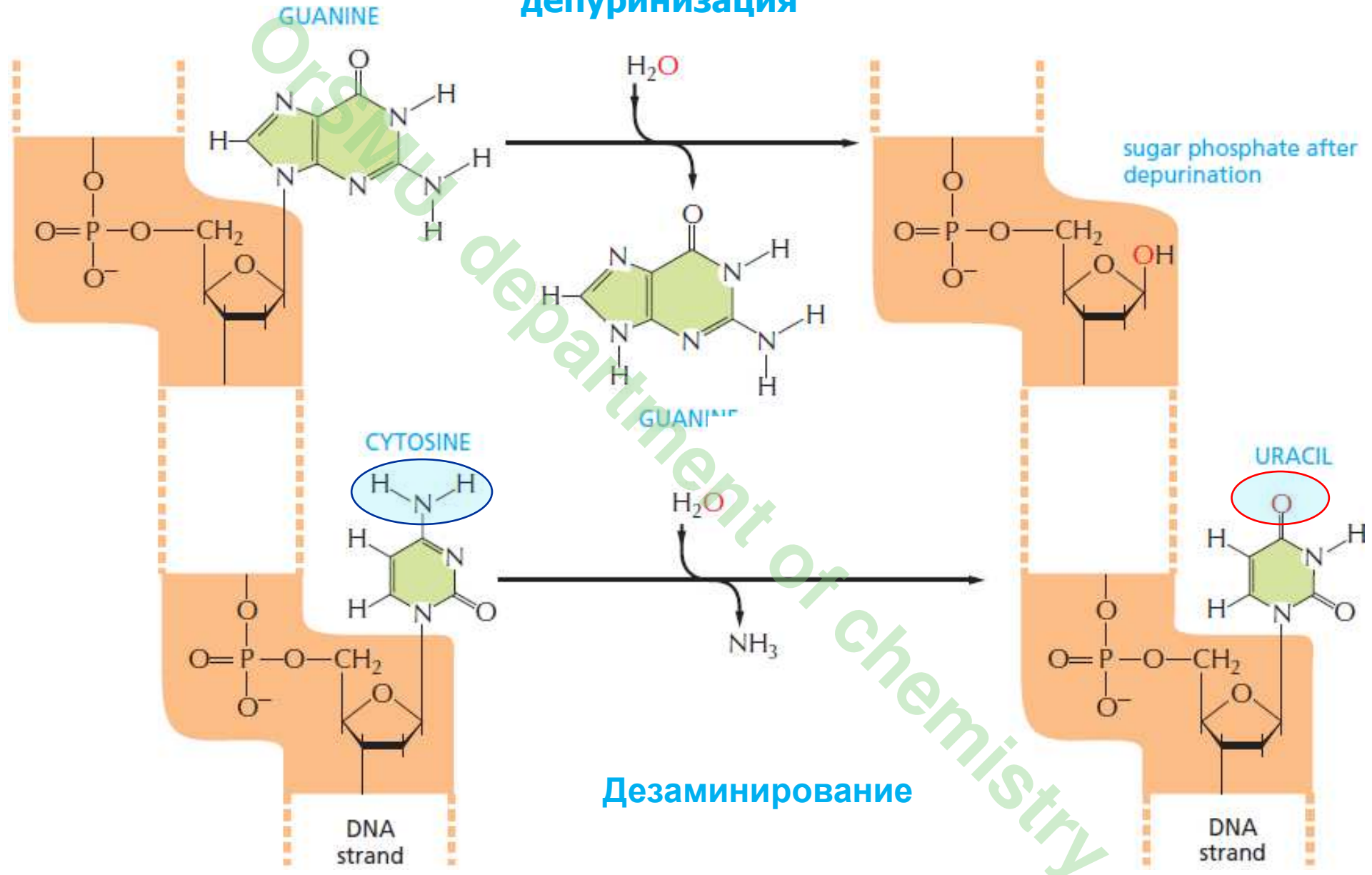
- Образуется в результате окисления гуанина
- Приводит к ошибке копирования – замене гуанина на тимин
- Образование 8-ОГ – маркер окислительного стресса
- 8-ОГ может подвергаться дальнейшему окислению. При этом образуются несколько модифицированных оснований.

Окисление может привести к разрыву колец оснований

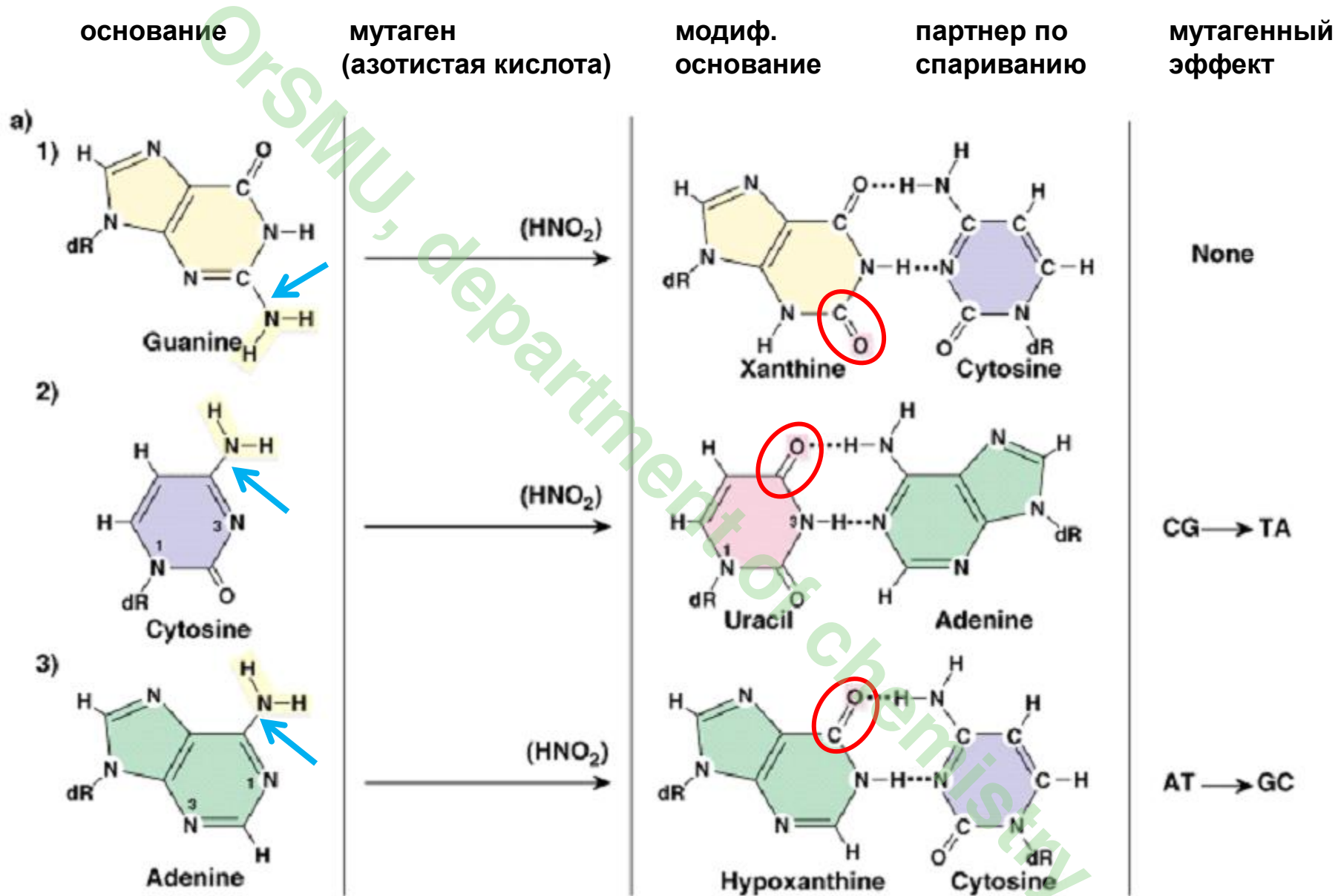


3. Гидролиз

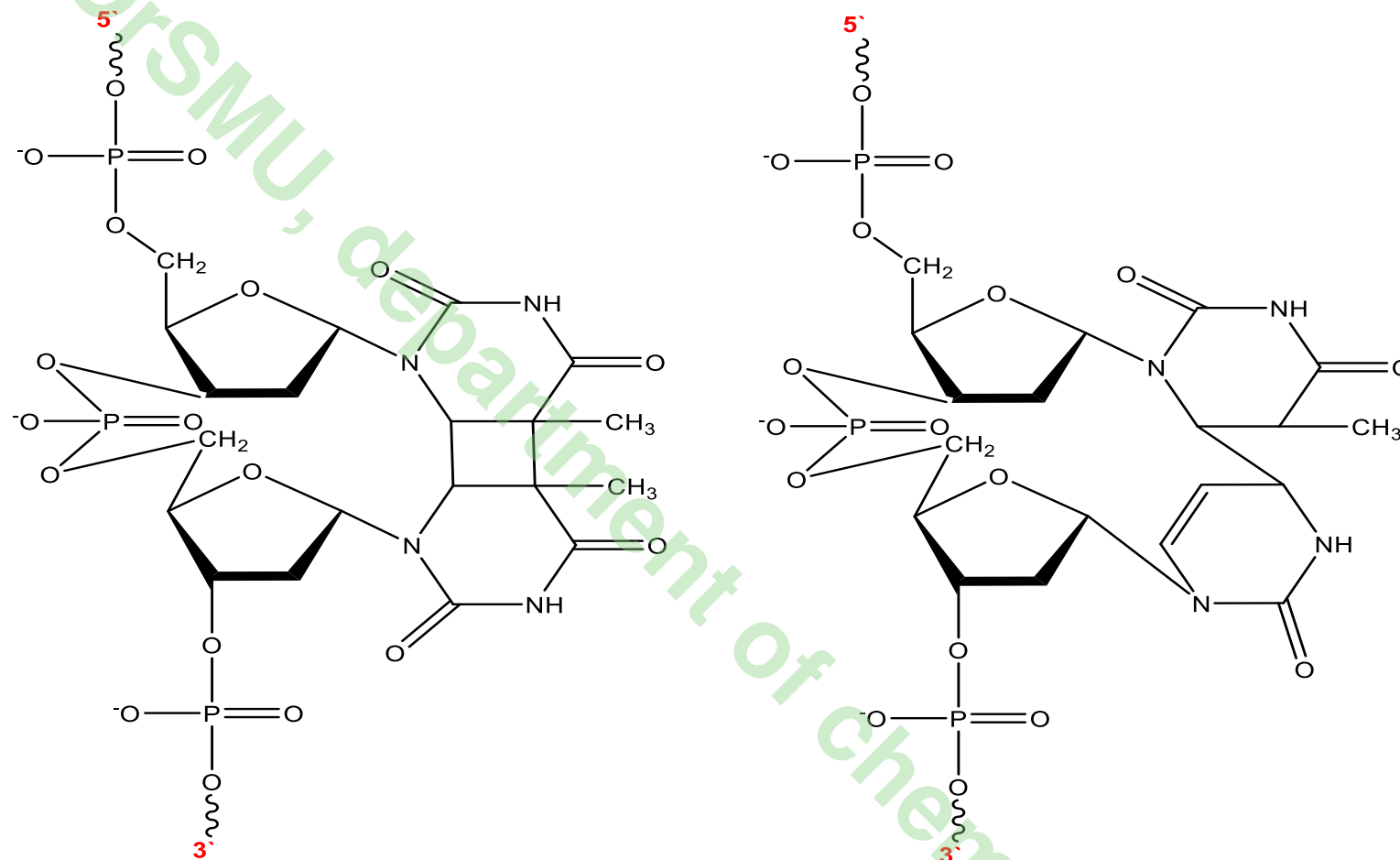
Спонтанная депуризация



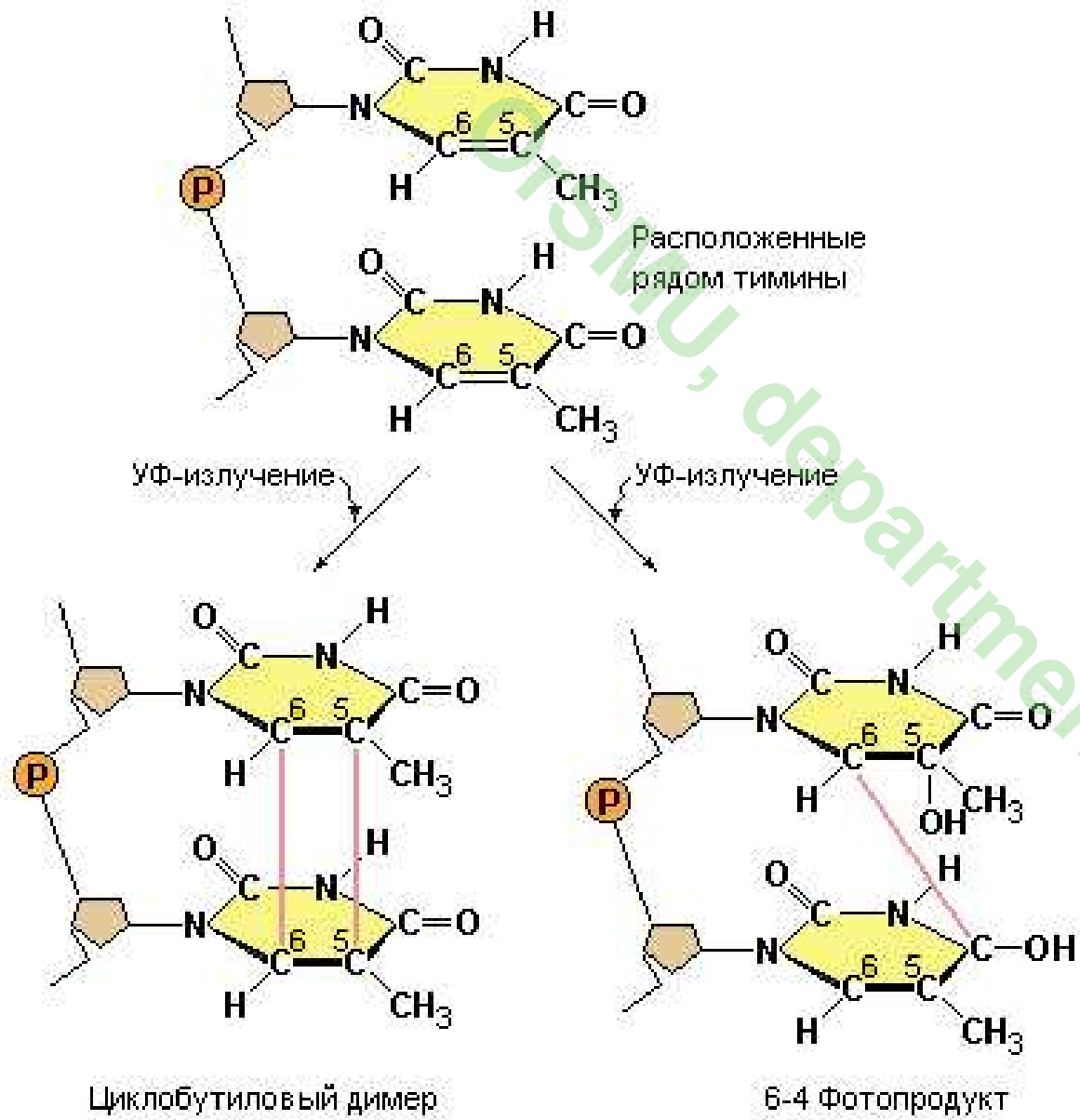
Дезаминирование



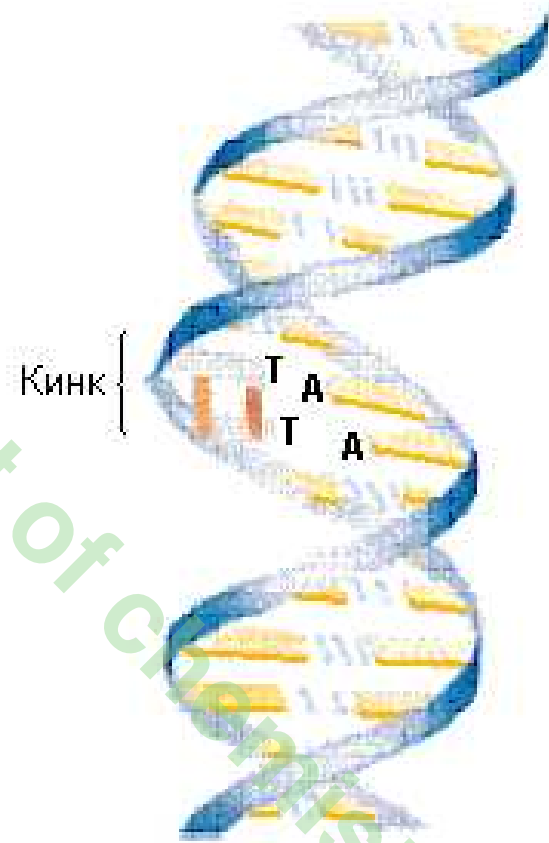
4. Образование тиминовых димеров



Образование димеров вызывается УФ-светом (УФ-С –длина волны менее 280 нм) и УФ-В (длина волны 280-320 нм)

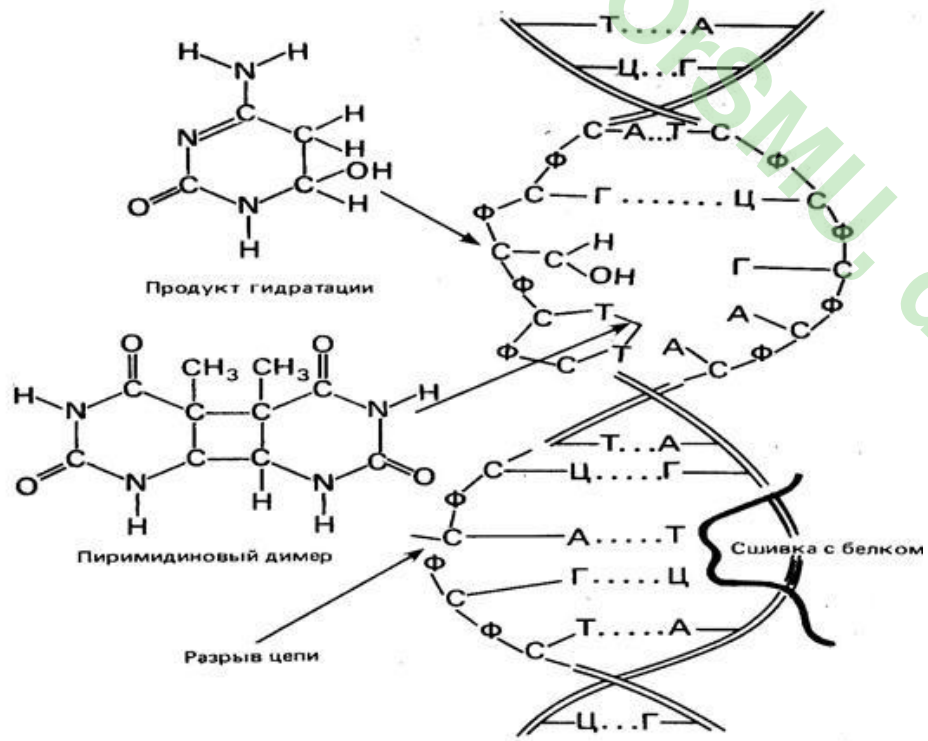


(a)

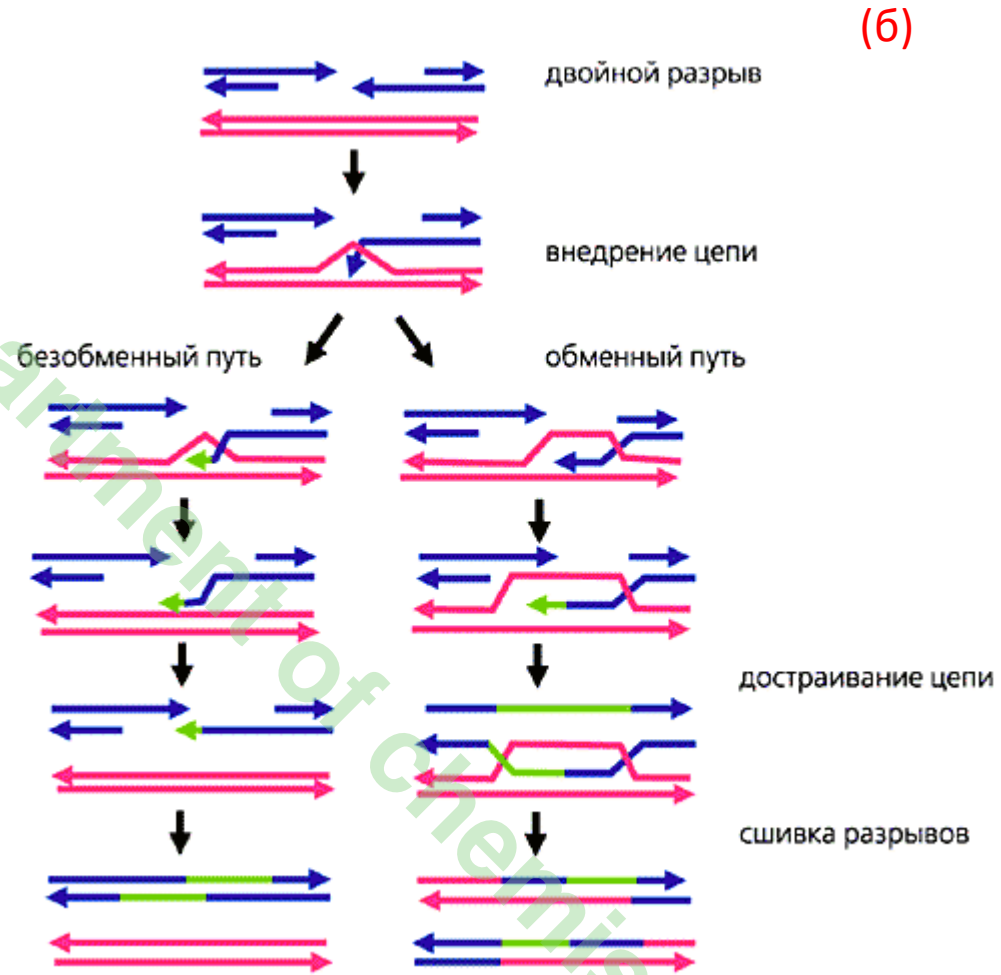


(b)

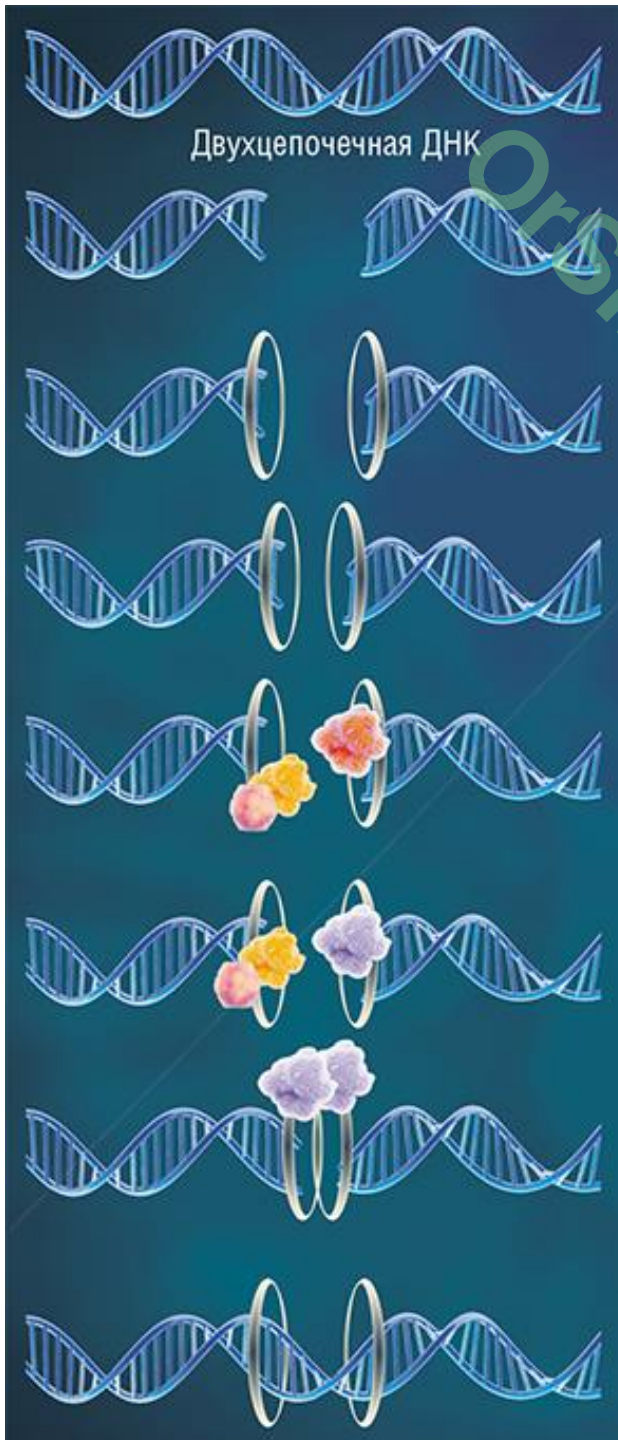
5. Разрывы цепей одиночные (а) и двойные (б)



(а)



5. Разрывы цепей одиночные и двойные



Возникновение двухцепочечного разрыва

Начало репликации: Ки-антиген узнает двухцепочечные концы ДНК

Ки-антиген сближает двухцепочечные концы

Нуклеазы «подрезают» концы ДНК

ДНК-полимеразы заново синтезируют участки ДНК

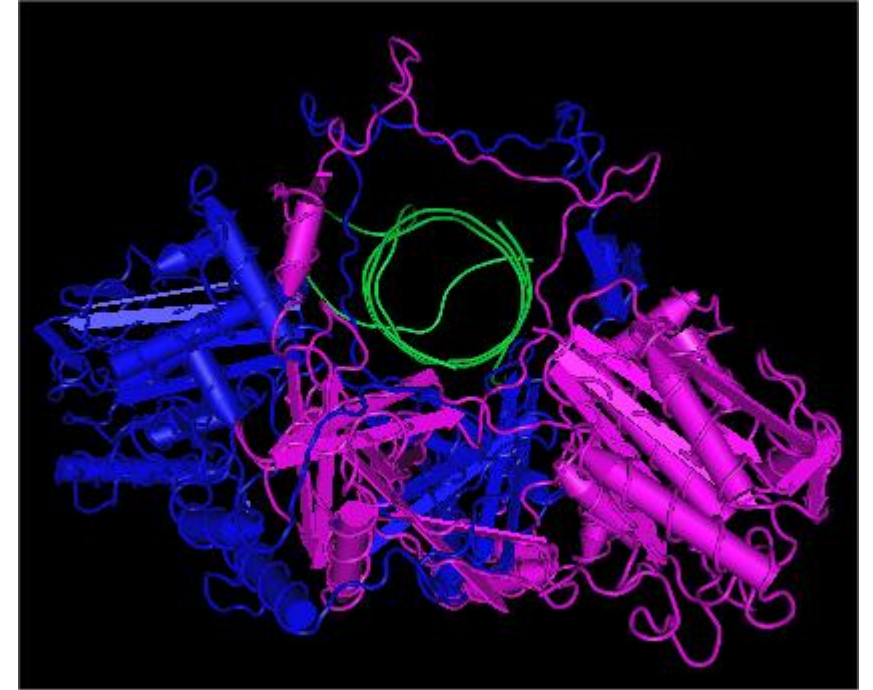
ДНК-лигазы заново «сшивает» ДНК

Восстановленная ДНК

5. Разрывы цепей одиночные и двойные

Ku — белок, связывающийся с двуцепочечными разрывами в структуре ДНК.

- необходим для репарации ДНК по пути нехомологичного соединения концов (NHEJ). Эволюционно Ku консервативен. Бактериальный Ku является гомодимером, эукариотический гомолог Ku — гетеродимер, состоящий из двух полипептидов — Ku70 и Ku80 (молекулярная масса 70 и 80 кДа, соответственно). Субъединицы Ku образуют корзиноподобную структуру, закрепляющуюся на конце молекулы ДНК.
- После связывания Ku может скользить по цепочке ДНК, на конец которой могут нанизываться новые молекулы Ku. У высших эукариот Ku образует комплекс с каталитической субъединицей ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs) и образует полную ДНК-зависимую протеинкиназу, DNA-PK.
- Ku, по-видимому, функционирует как молекулярный остов, к которому прикрепляются другие белки, принимающие участие в процессе пути нехомологичного соединения концов.



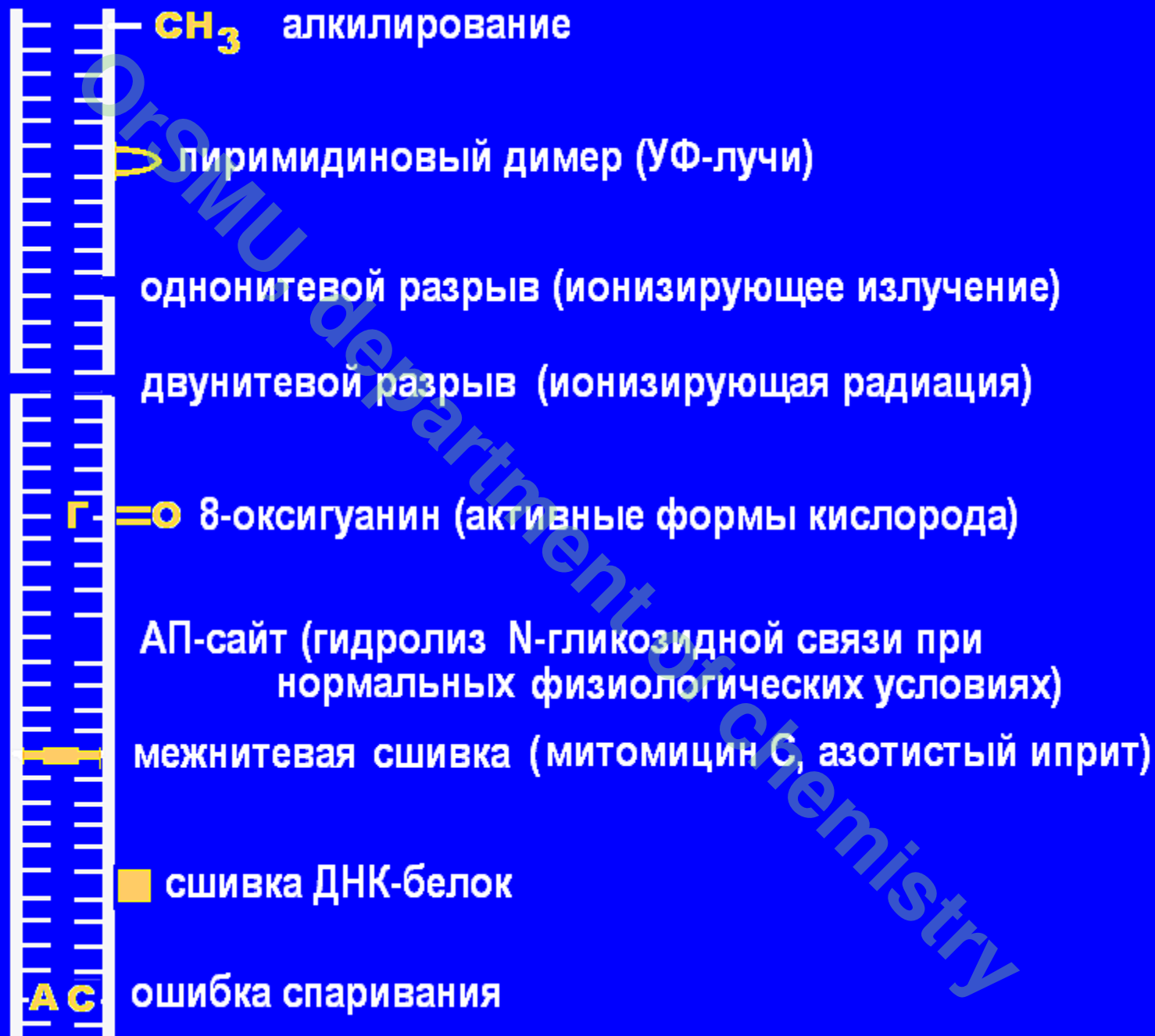
Кристаллическая структура Ku человека, связанного с ДНК. Ku70 показан фиолетовым цветом, Ku80 - синим, а цепь ДНК - зеленым.

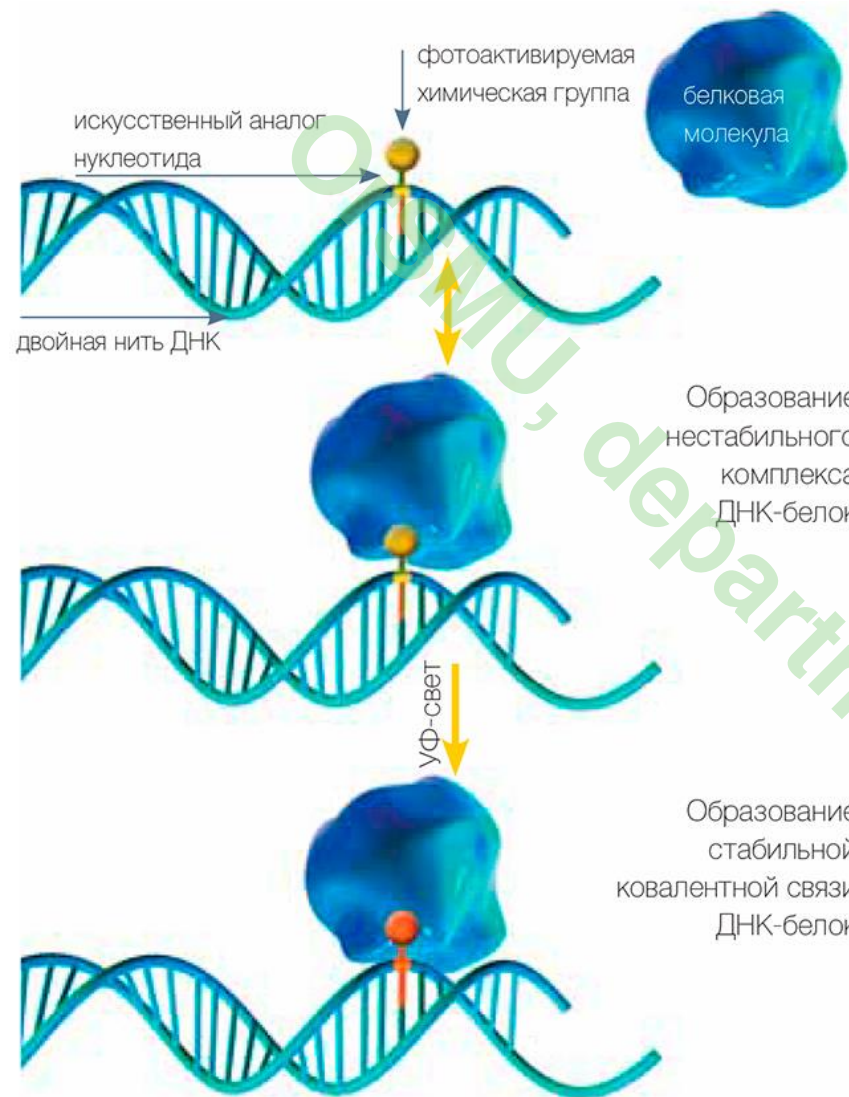
6. Образование межнитевых сшивок ДНК



Типы повреждений ДНК
и межнитевая сшивка

- Ковалентные связи между основаниями двух разных нитей ДНК
- Количество межнитевых сшивок возрастает при облучении ультрафиолетом, а также увеличивается в течении жизни
- Соединения, вызывающие формирование сшивок: циклофосфамиды, псорален
- Блокируются обе цепочки двойной спирали, по этой причине нить не может быть реплицирована и репарирована по комплементарной нити



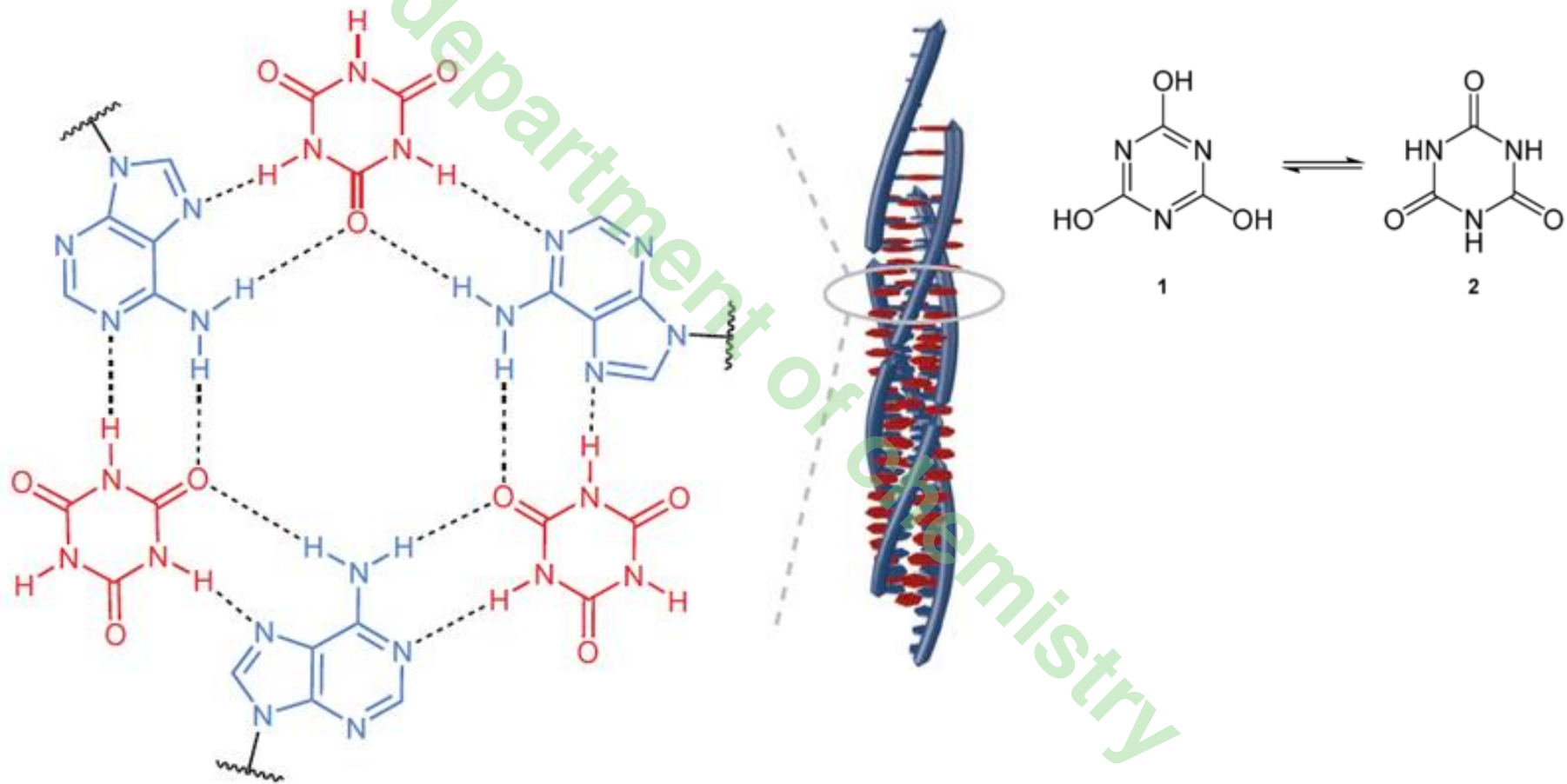


7. Образование ковалентных связей между основанием ДНК и белком

- Возникают при образовании топоизомеразных ковалентных связей с основаниями ДНК
- Образуются между цепью ДНК и каким-либо белком хромосомы

Образование тройной нити ДНК при взаимодействии с циануровой кислотой

Циануровая кислота – дезинфектант, используемый в бассейнах, по крайней мере в эксперименте, повреждает ДНК, образуя тройную нить



Типы репарационных систем

- Прямая репарация ДНК.
- Фотореактивация.
- Эксцизионная репарация ДНК.
- Пострепликативная репарация ДНК.
- SOS-репарация.
- Репарация, склонная к ошибкам.
- Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair).
- Репарация одно- и двунитевых разрывов ДНК.

Распространенность типов репарации у про- и эукариот

У прокариотических организмов:

- Фотореактивация
- Эксцизионная репарация
- Пострепликативная репарация
- Репарация, склонная к ошибкам
- SOS-репарация

У эукариотических организмов:

- Эксцизионная репарация
- Пострепликативная репарация
- Репарация, склонная к ошибкам
- Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов
- Репарация одно- и двунитевых разрывов

Биологический смысл репарации

В репарации ДНК участвуют более 150 генов .

Репарация устраняет повреждения молекул ДНК, предотвращая образование наследственно закрепленных нарушений генетического материала – мутаций.

Приблизительно каждые 9 секунд ДНК повреждается в процессе жизнедеятельности. Каждое из повреждений быстро ликвидируется, если клетке, в которой оно произошло, не предназначено погибнуть.

Нарушение репарации ДНК является одной из причин возникновения ряда наследственных заболеваний и раковых опухолей.

Репарация AP -сайтов

- Образовавшиеся в результате удаления пурина AP-сайты могут быть залечены ферментами инсертазами (от англ. insert - вставлять).
- Эти ферменты могут встраивать в брешь, присоединив к дезоксирибозе, такое же основание, какое было до поражения. В результате структура ДНК восстанавливается.



Эксцизионная репарация нуклеотидов

Удаляет:

- химические аддукты;
- димеры пиримидинов.

Для эксцизионной репарации необходима интактная неповрежденная комплементарная нить ДНК.

Эксцизионную репарацию нуклеотидов, т. е. связанную с полным удалением поврежденных нуклеотидов из поврежденной цепи ДНК, называют также репарацией по типу выщепления-замещения или более образно «механизма режь — латай».

Эксцизионная репарация

В настоящее время известно два типа эксцизионной репарации:

1. **Эксцизия азотистых оснований** с помощью специальных ферментов – гликозилаз с последующим восстановлением нативной структуры ДНК;
2. **Эксцизия нуклеотидов** из цепи ДНК. После удаления поврежденных нуклеотидов из цепи ДНК происходит ее застройка помощью ДНК-полимеразы I.

Экцизионная репарация представляет собой многоэтапный процесс и включает:

- 1) «Узнавание» тиминового димера.
- 2) Инцизию – надрезание одной цепи ДНК вблизи димера.
- 3) Экцизию – удаление сегмента ДНК с поврежденными нуклеотидами (тиминовым димером).
- 4) Ресинтез ДНК.
- 5) Восстановление непрерывности репарируемой цепи за счет образования фосфодиэфирных связей.

Таким способом репарируются следующие повреждения ДНК, включение:

- урацила вместо тимина;
- гипоксантина;
- формамидопиримидина;
- 5,6 тимина гидрата;
- 8-окси-гуанина;
- 5-метил-цитозина;
- алкил-аденина;
- 3-метил-аденина;
- 7-метил-гуанина.

Эксцизия азотистых оснований

Удаляет специфические повреждения в азотистых основаниях ДНК. Основной фермент – **гликозилаза**.

Имеется несколько типов гликозилаз.

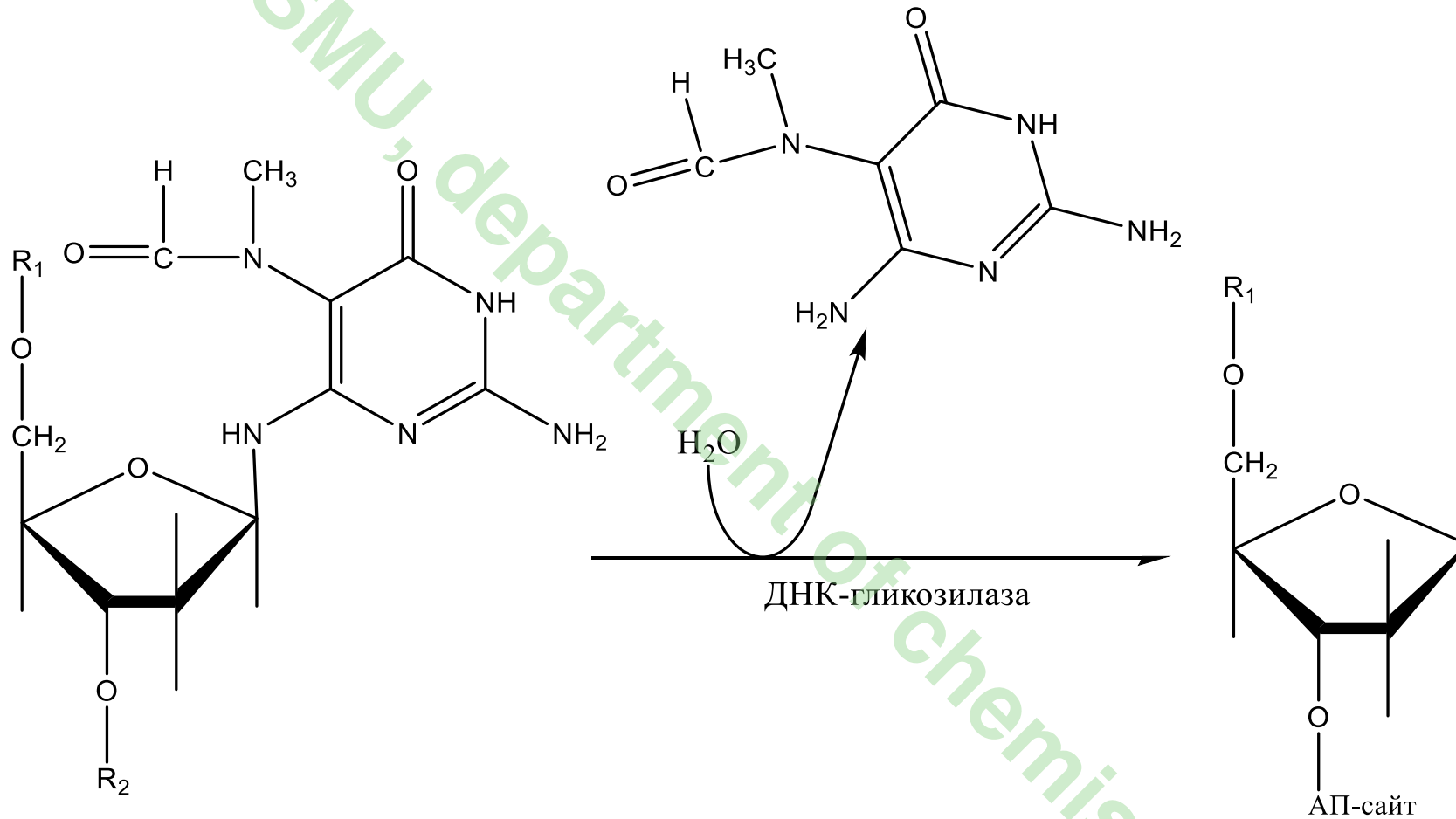
У человека ДНК-N-гликозилазы обладают высокой субстратной специфичностью.

У бактерий ДНК-N-гликозилазы такой субстратной специфичностью не обладают.

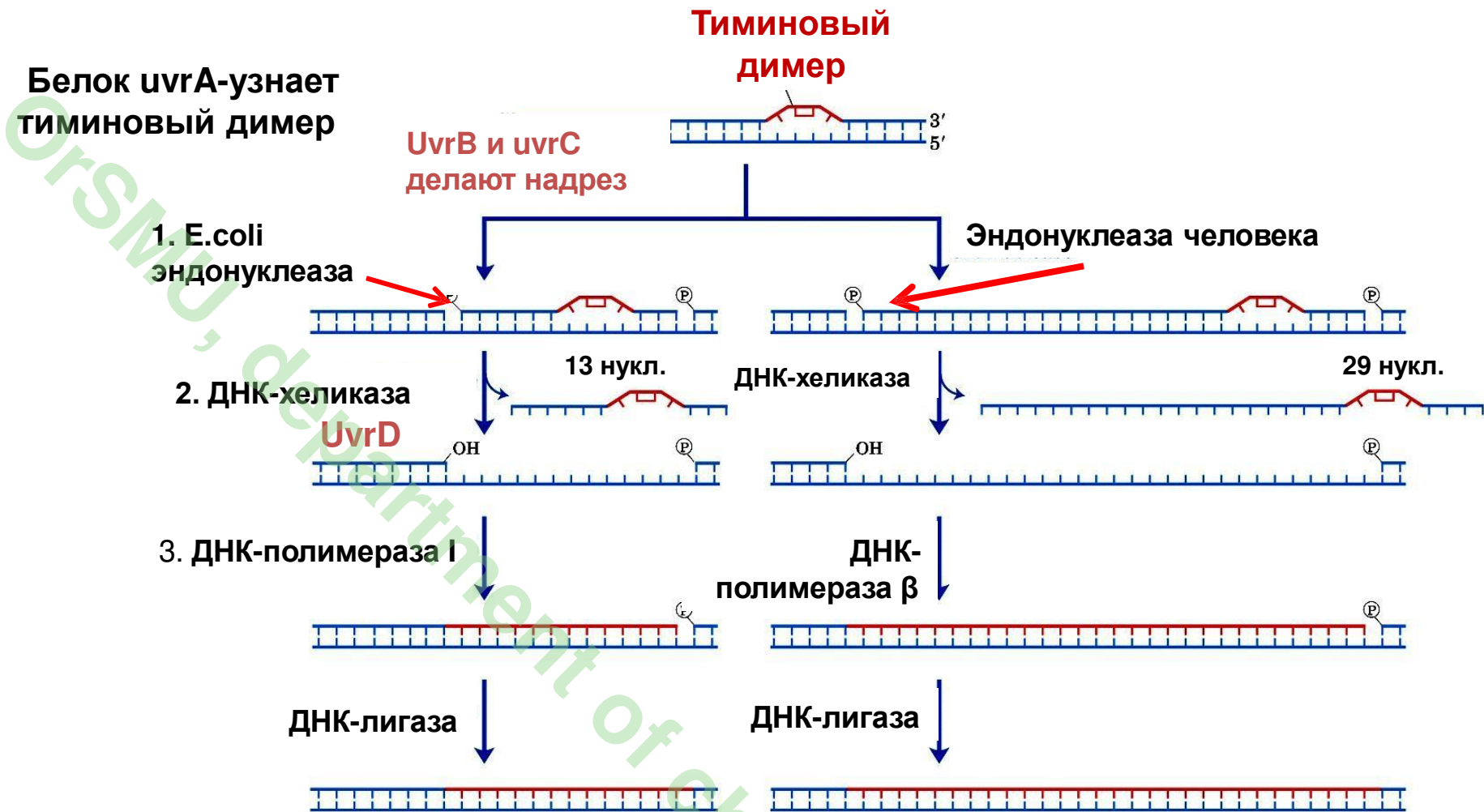
Основные этапы:

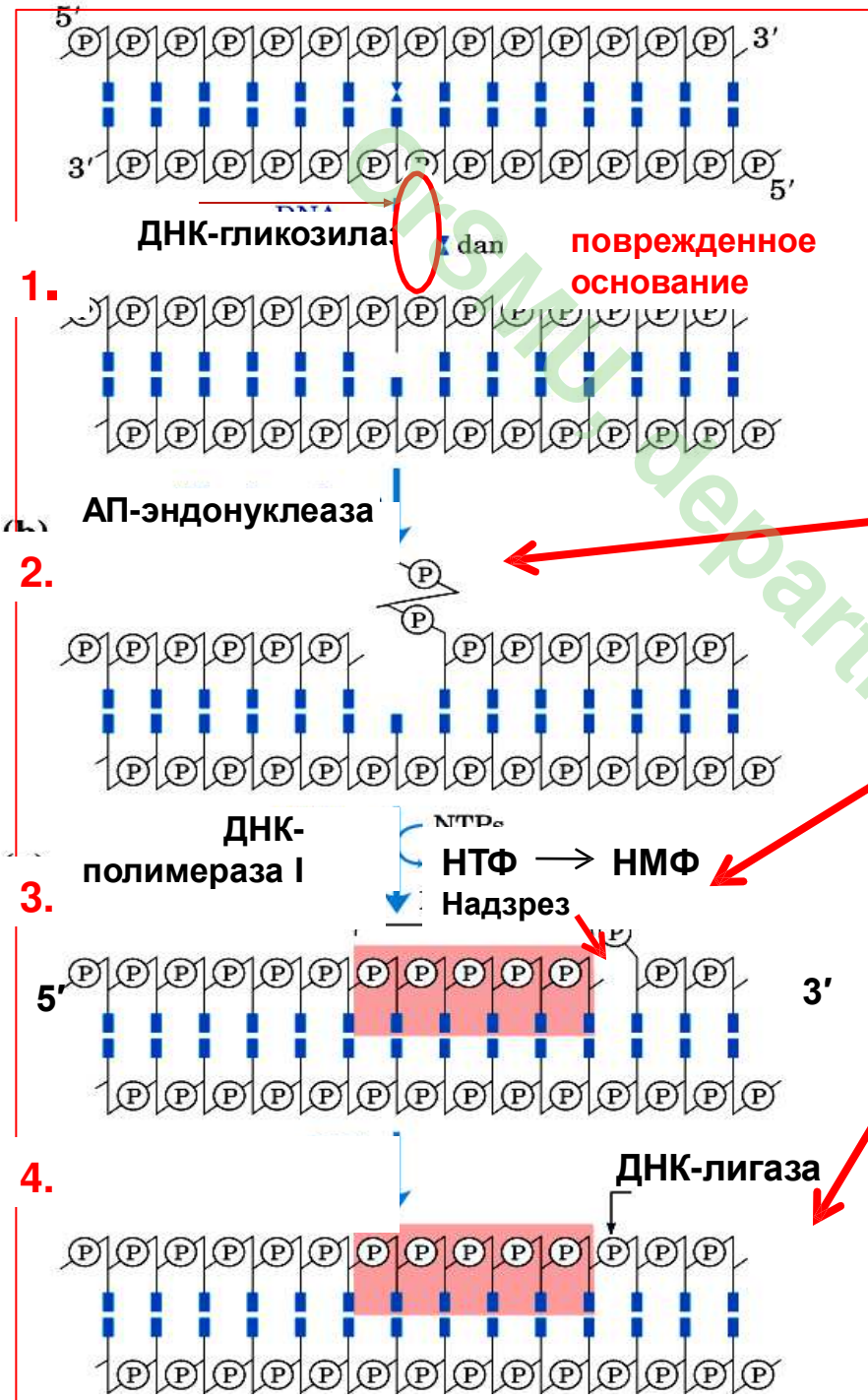
1. Удаление поврежденного азотистого основания соответствующей гликозилазой с образованием АП-сайта;
2. АП-эндонуклеаза делает надрез на 5'-конце АП-сайта для образования 3'-ОН конца;
3. Нарращивание 3'-ОН конца с помощью ДНК-полимеразы;
4. Зашивание надреза ДНК-лигазой.

Пример действия ДНК-гликозилазы



Эндонуклеаза UvrABC представляет собой мультиферментный комплекс бактерий, участвующих в репарации ДНК путем эксцизионной репарации нуклеотидов, поэтому ее иногда называют эксинуклеазой.





1. DNK-гликозилаза узнает поврежденное азотистое основание и удаляет его с образованием АП-сайта. Сахарофосфатный остов сохраняется.

2. АП-эндонуклеаза разрезает фосфодиэфирную связь около АП-сайта, делая надрез в цепи ДНК.

3. DNK-полимераза I инициирует синтез ДНК от 3'-конца этого надреза, заменяя участок поврежденной ДНК в направлении 5' → 3' неповрежденной ДНК.

4. Надрез, оставшийся после работы DNK-полимеразы I, зашивается DNK-лигазой.

Репарация ошибок репликации

Поскольку ошибки возникают на дочерней цепи, система репарации только на ней должна проводить замену некомплементарных оснований.

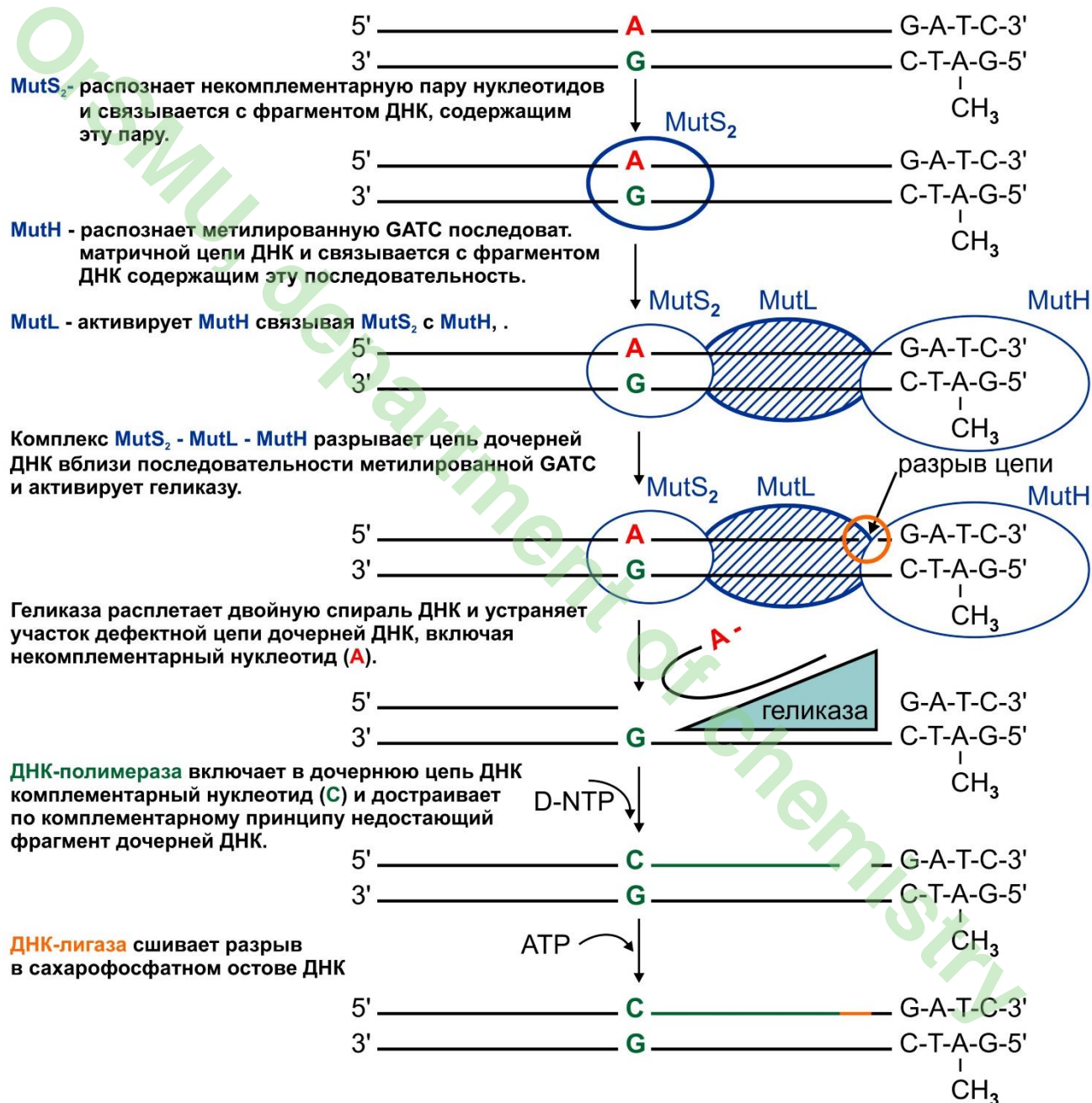
С целью распознавания материнской и дочерней цепей ДНК система репарации использует различие в их структуре.

В материнской цепи ДНК часть азотистых оснований аденина метилирована, в то время как в дочерней цепи сразу после репликации они еще не метилированы.

И только через некоторое время после окончания репликации метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательностях ГАТЦ. Пока они остаются неметилированными, система репарации распознает дочернюю цепь и исправляет ошибки.

**СХЕМАТИЧЕСКОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПРОЦЕССА РЕПАРАЦИИ ДНК,
СОДЕРЖАЩЕЙ НЕКОМПЛЕМЕНТАРНУЮ (ДЕФЕКТНУЮ) НУКЛЕОТИДНУЮ ПАРУ**

Белки репарации
ошибочного
спаривания ДНК



Репарация неспаренных оснований

Перед репликацией ДНК находится в метилированной форме, вновь синтезированная цепь – неметилирована



Упрощенная схема репарации неспаренных оснований ДНК (mismatch repair – MMR), модель Холлидея 1964 г

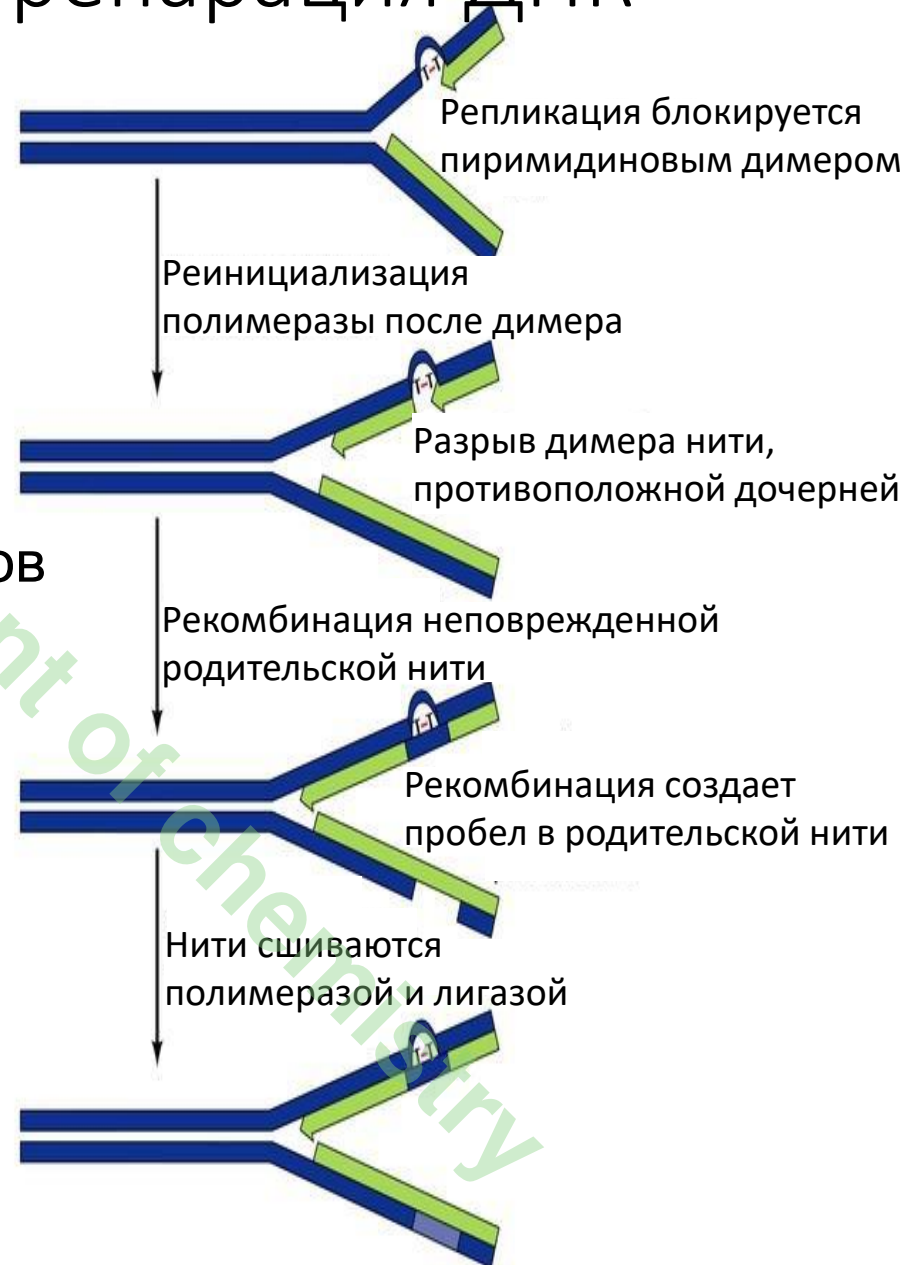
Пострепликативная репарация ДНК

Пострепликативная репарация происходит когда в ДНК возникает так много повреждений, что в ходе эксцизионной репарации клетка не успевает их полностью устранить, а также если повреждены гены, контролирующие синтез ферментов, участвующих в эксцизионной репарации.

В результате после репликации такой ДНК в дочерней цепи на месте повреждений, имеющих в материнской нити, образуются «бреши».

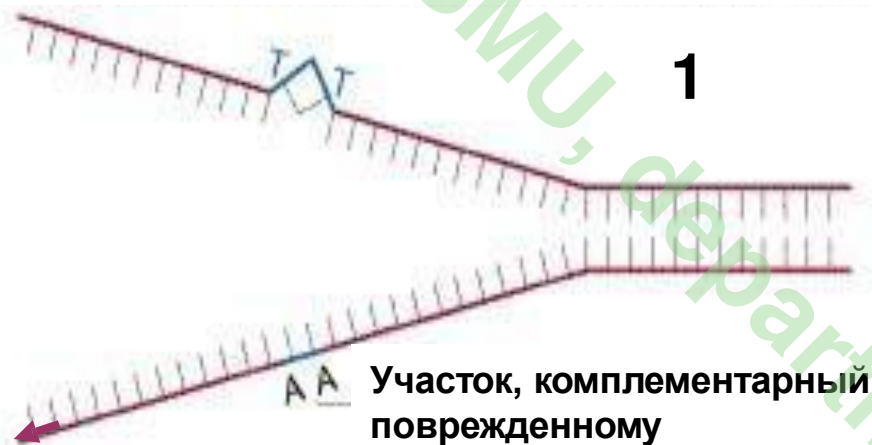
Пострепликативная репарация ДНК

- Пиримидиновый димер задерживает продвижение ДНК-полимеразы в ходе репликации. Она останавливается.
- Продолжение репликации происходит с участием фрагментов Оказаки.

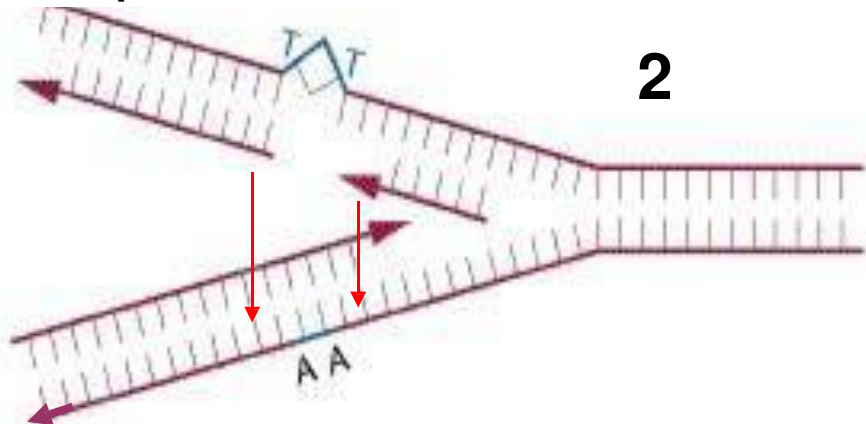


Пострепликативная репарация

Повреждение возникает в ДНК еще до начала репликации



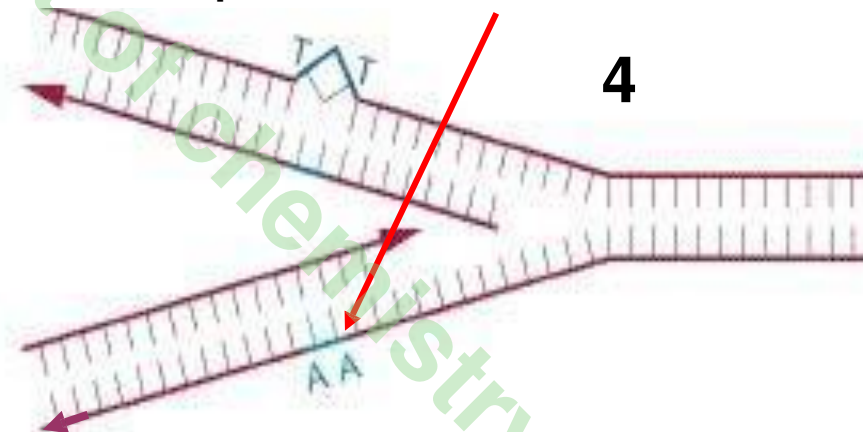
ДНК-полимераза обходит тиминный димер



Неповрежденная цепь ДНК в отреплицированной молекуле рекомбинирует с поврежденной



Новый пробел зашивается



SOS-репарация

Существование этой системы впервые постулировал М. Радман в 1974 г. Он же дал название этому механизму, включив в него международный сигнал бедствия "SOS" («спасите наши души»).

И действительно, эта система включается тогда, когда **повреждений в ДНК становится настолько много, что угрожает жизни клетки.** В этом случае происходит индукция разных генов, задействованных в различных клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК. Включение тех или иных генов, определяемых количеством повреждений в ДНК, приводит к разным по значимости клеточным ответам (начиная со стандартной **репарации поврежденных** нуклеотидов и кончая **подавлением** клеточного деления).

Наиболее изучена **SOS-репарация** у *E. coli*, главными участниками которой являются белки, кодируемые **генами Rec A и Lex A**.

Первый из них представляет собой полифункциональный **белок Rec A**, участвующий в рекомбинации ДНК.

Второй (**белок Lex A**) является **репрессором** транскрипции большой группы генов, предназначенных для **репарации ДНК**. При его ингибировании или разрушении **SOS-репарация активируется**.

Связывание **Rec A с Lex A** приводит к расщеплению последнего и соответственно к **активации транскрипции генов репарации**.

SOS-система репарации выявлена не только у бактерий, но и у животных, и человека.

Начало SOS- ответа определяется взаимодействием белка RecA с белком репрессором LexA. Ответ клетки на повреждающее воздействие начинается с активации протеазной активности белка RecA.

Активирующим сигналом может быть присутствие одноцепочечной области в сайте повреждения. Активируясь, RecA-протеаза разрезает белок-репрессор LexA. Белок LexA в неповрежденных клетках функционирует как репрессор многих оперонов, гены которых отвечают за различные репарационные функции.

Протеолитическое разрезание репрессора (белка LexA) индуцирует все эти опероны. В настоящее время идентифицировано около 40 генов, которые участвуют в SOS-ответе в результате активации их продуктов. Все эти гены являются индуцибельными.

Установлено, что белок LexA репрессирует гены-мишени, связываясь с последовательностью ДНК длиной около 20 пар оснований, названной SOS-блоком.

Одной из функций белка RecA является включение генов **umuD** и **umuC**, которые способны замедлять процесс синтеза ДНК при наличии повреждений ДНК. Эти белки могут присоединяться к **ДНК-полимеразе III**, снижая ее корректорские функции.

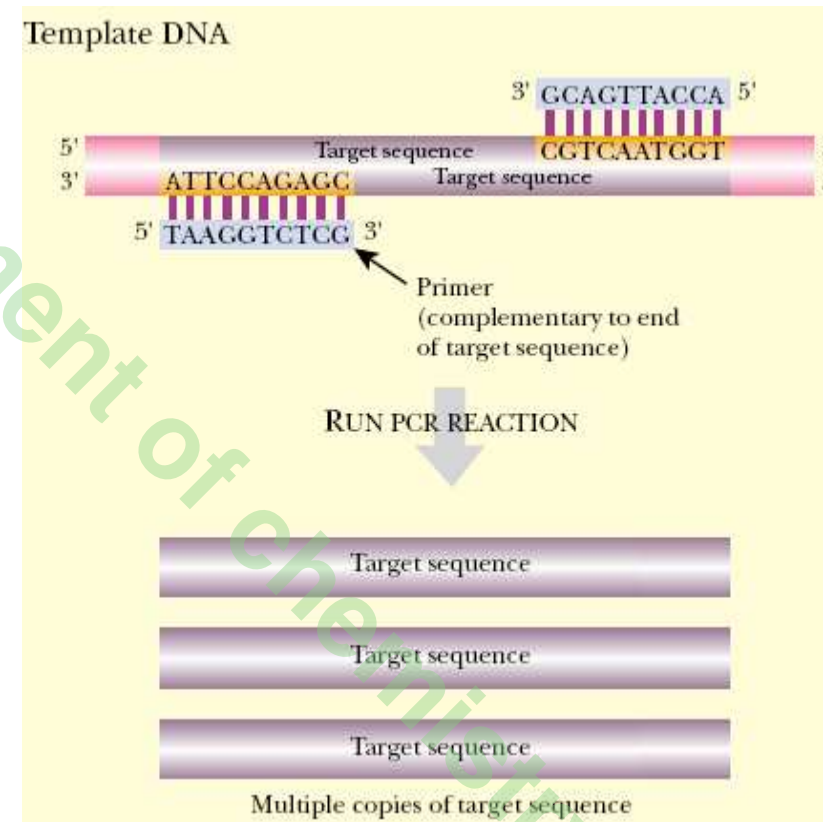
Измененный репликационный комплекс продолжает синтез дочерней цепи ДНК на поврежденной матрице, подставляя нуклеотиды случайным образом. В результате дочерние цепи ДНК накапливают ошибки репликации напротив поврежденных нуклеотидов.

Вот почему этот тип репарации ДНК называют «репарацией, склонной к ошибкам» (***mismatch repair***).

Полимеразная цепная реакция

Метод **ПЦР** представляет собой синтез *in vitro* (в пробирке) множества копий определенного целевого фрагмента ДНК, присутствующего в составе молекул ДНК в исследуемом образце, с помощью фермента ДНК-полимеразы при особом температурном режиме.

- Выбор копируемого фрагмента ДНК и его границы определяются парой коротких синтетических олигонуклеотидов (праймеров), которые связываются с заданным участком в составе молекул ДНК в образце по принципу комплементарности, у его начала и конца, на противоположных цепях ДНК и служат затравками (началом) синтеза новых цепей.
- Чувствительность метода такова, что позволяет обнаружить целевую последовательность, даже если она встречается однажды в образце из миллионов других молекул.



Полимеразная цепная реакция

Применение метода ПЦР

1. Диагностика

- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика онкологических заболеваний;
- диагностика генетических заболеваний;
- обнаружение микроорганизмов (в природных образцах, продуктах питания);
- обнаружение генномодифицированных организмов и их компонентов в составе продуктов питания;
- обнаружение целевых генов.

2. Идентификация

- идентификация микроорганизмов;
- идентификация личности;
- установление родства.

3. Клонирование (сборка) генов, модификация генов

4. Исследование структуры генов и геномов

5. Мутагенез и изменение свойств природных белков

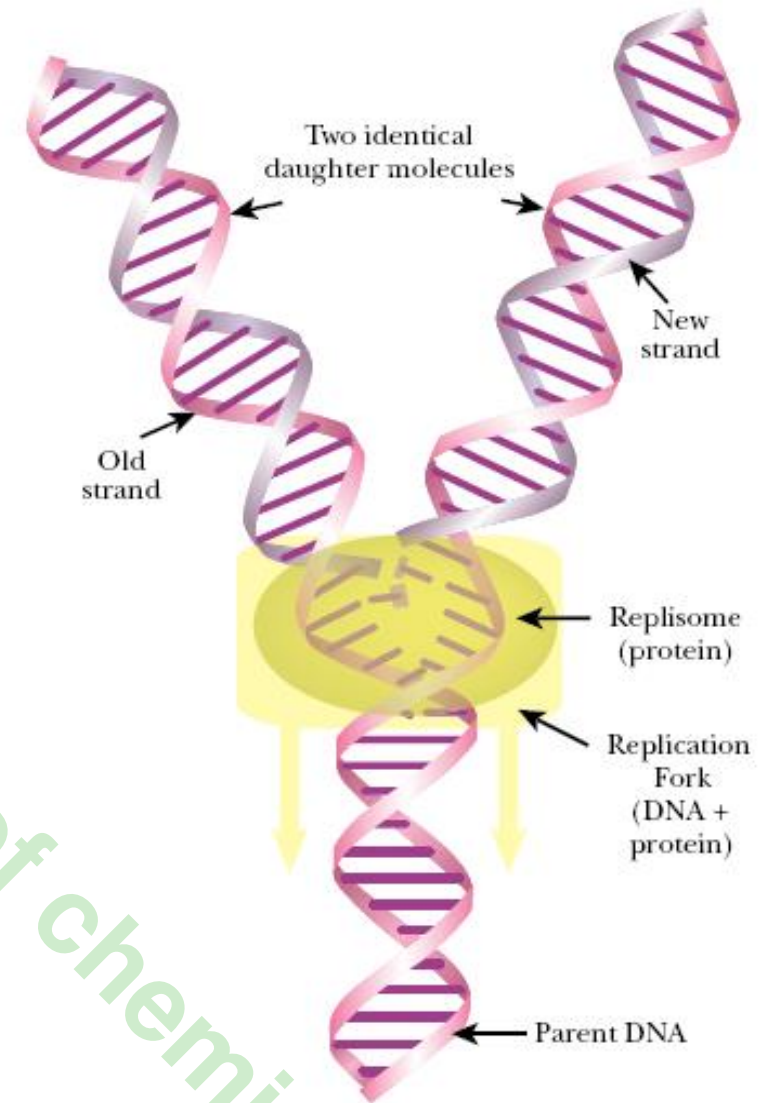
Полимеразная цепная реакция

Репликация (удвоение) ДНК

ПЦР моделирует в пробирке природный процесс репликации ДНК.

Особенности процесса репликации:

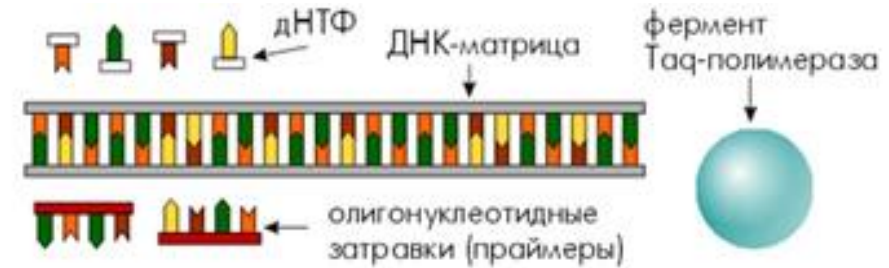
1. Катализируется ДНК-полимеразами
2. Полуконсервативность
3. Необходимость в затравке
4. Комплементарность
5. Последовательность нуклеотидов в матричной цепи считывается в направлении $3' \rightarrow 5'$
6. Новая (дочерняя) цепь синтезируется в направлении $5' \rightarrow 3'$



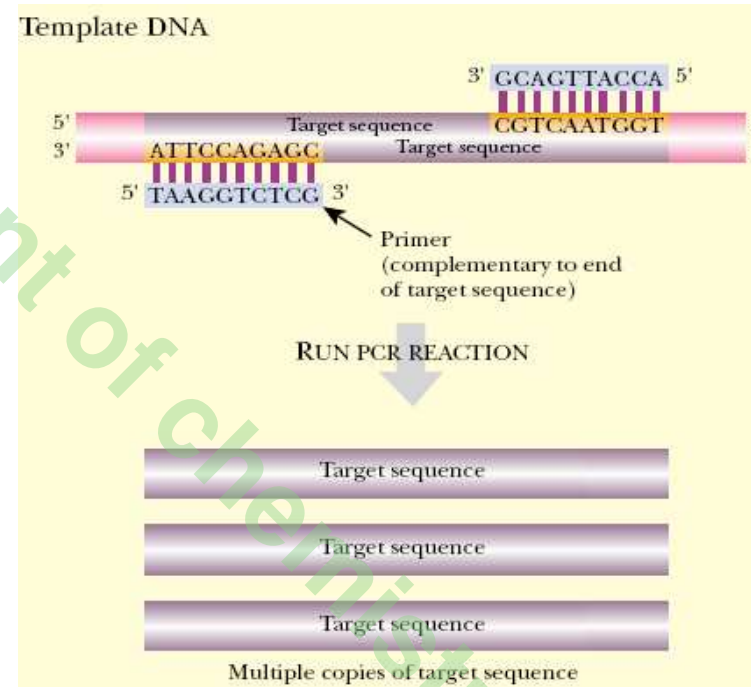
Полимеразная цепная реакция

Компоненты реакционной смеси

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы
3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, dNTP)
4. Праймер 1 f (forward)
5. Праймер 2 r (reverse)
6. Образец ДНК
7. ДНК-полимераза



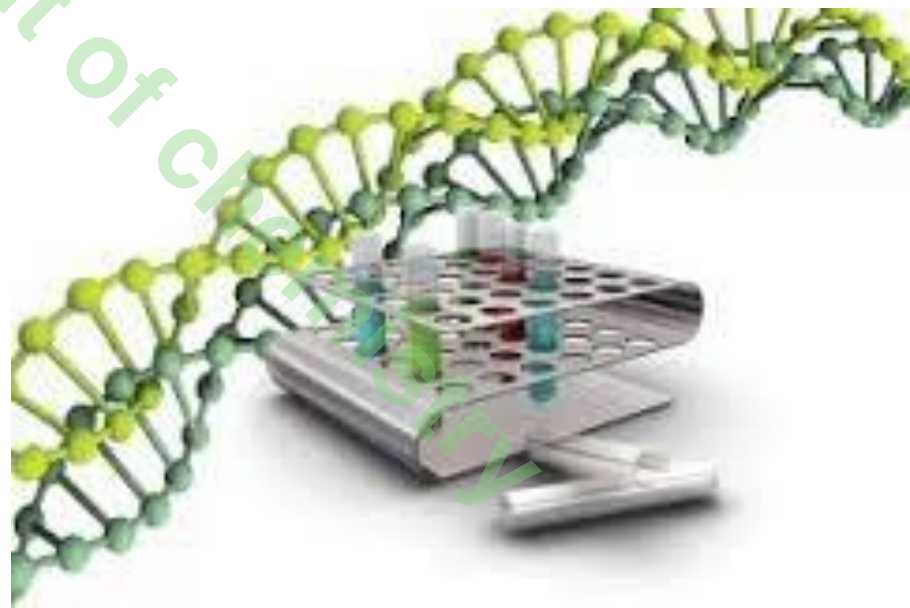
Исходные компоненты ПЦР



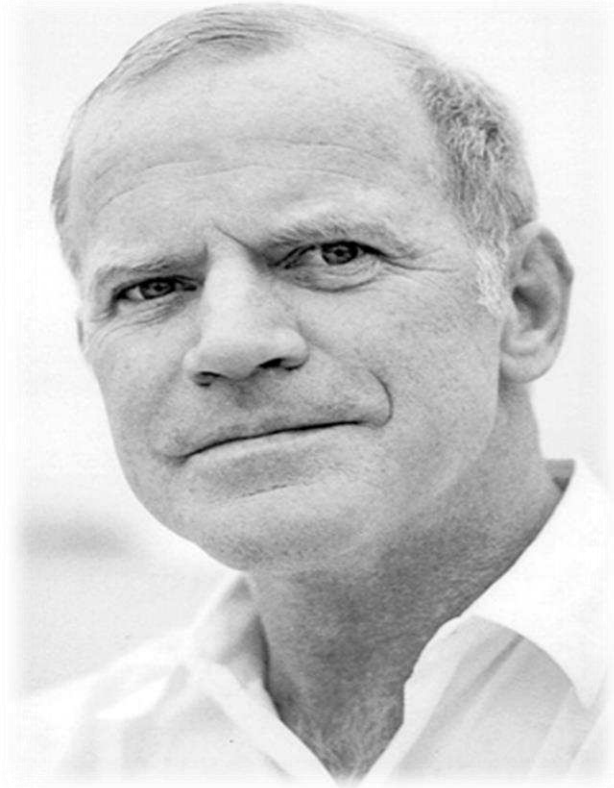
Полимеразная цепная реакция

Метод ферментативной наработки *in vitro* определённых, сравнительно коротких (до нескольких тысяч пар нуклеотидов), двуцепочечных фрагментов ДНК.

В основе реакции лежит механизм репликации молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой.



Изобретение ПЦР



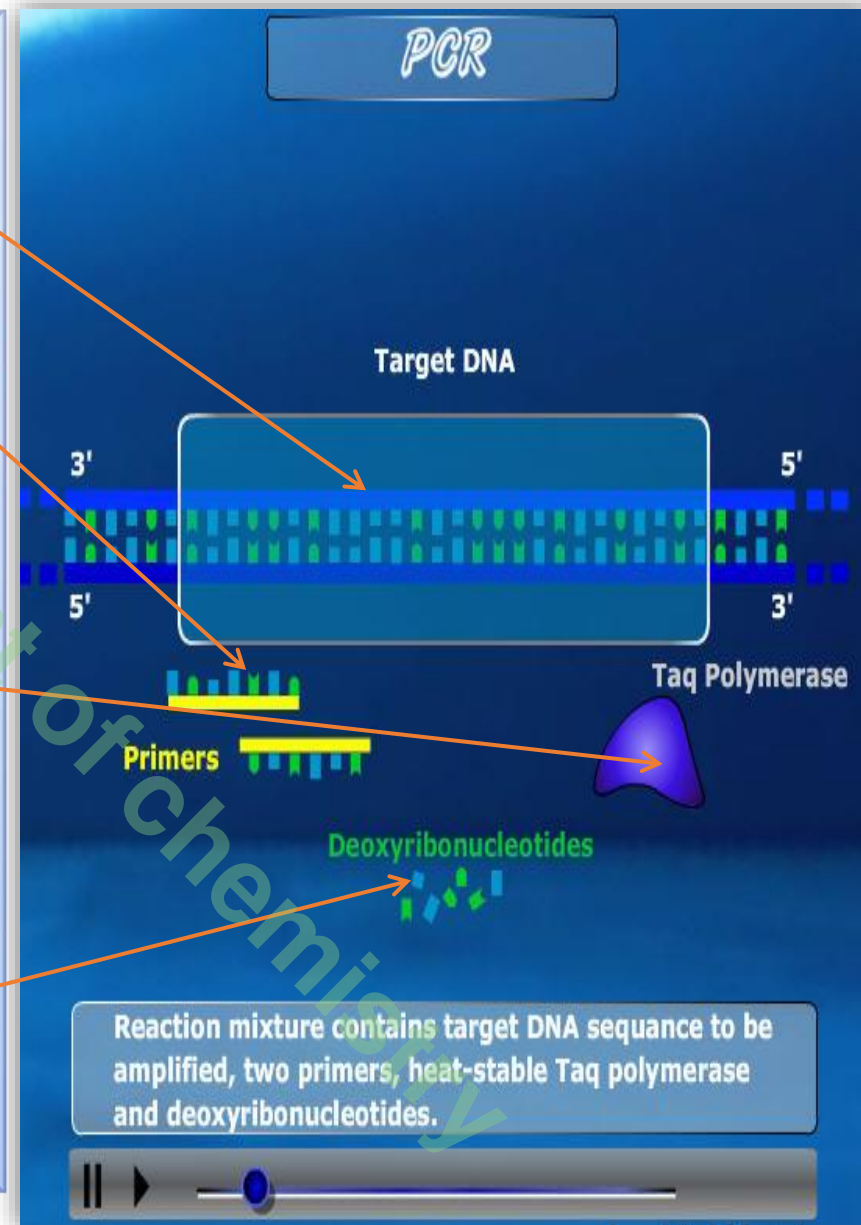
Kary Mullis, Лауреат Нобелевской премии 1993 г. по химии

В 1983 г. химик компании Cetus, **Кэри Маллис**, оптимизируя метод олигомерной рестрикции для идентификации точечных мутаций в ДНК, придумал как многократно увеличить количество копий определённого участка ДНК.

Суть метода олигомерной рестрикции состоит в ферментативном удлинении олигонуклеотида, направленного на участок ДНК, прилегающий к участку мутации. Если дезоксинуклеотиды добавлять в реакцию не все сразу, а по одному, то удлинение олигонуклеотида будет происходить только тогда, когда добавляемый дезоксинуклеотид комплементарен участку мутации. При этом используется один прямой праймер. Если используется геномная ДНК, то доля исследуемого фрагмента крайне мала и эффективность и специфичность реакции становится очень низкой. Маллису пришла идея добавить второй праймер с другой стороны, и если обе реакции провести в одной пробирке, то кол-во исследуемого фрагмента увеличится в двое. Если повторить реакцию – в четверо и т.д. Через несколько месяцев творческих поисков удалось создать оптимальные условия и совершить удачную ПЦР реакцию.

Для ПЦР необходимы:

- **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- **Два праймера**, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- **Термостабильная ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Тaq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- **Дезоксинуклеозидтрифосфаты** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).



**ПЦР осуществляется в ходе
трехэтапного циклического процесса:**

✓ **Денатурация**

✓ **Ренатурация**

✓ **Синтез**

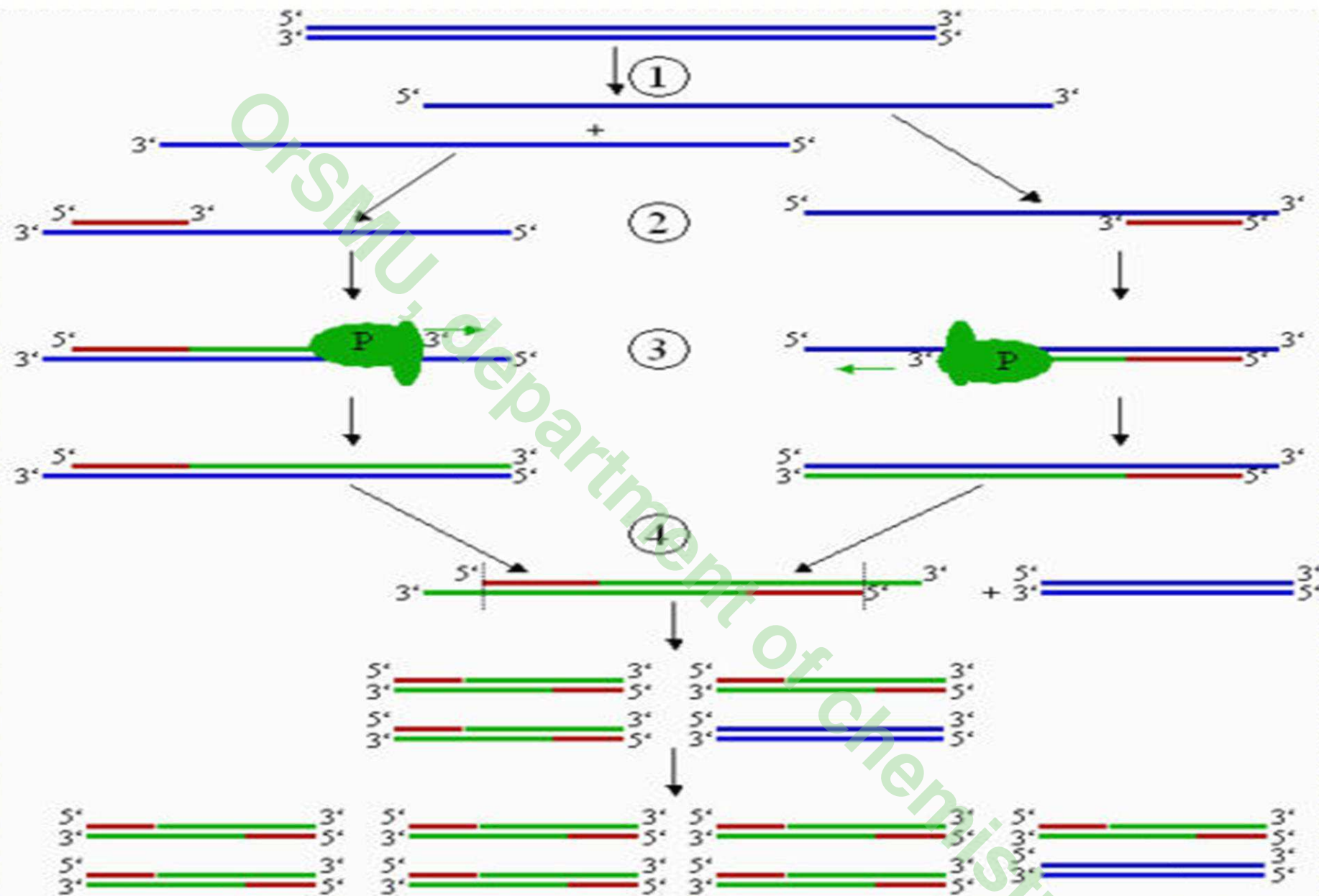


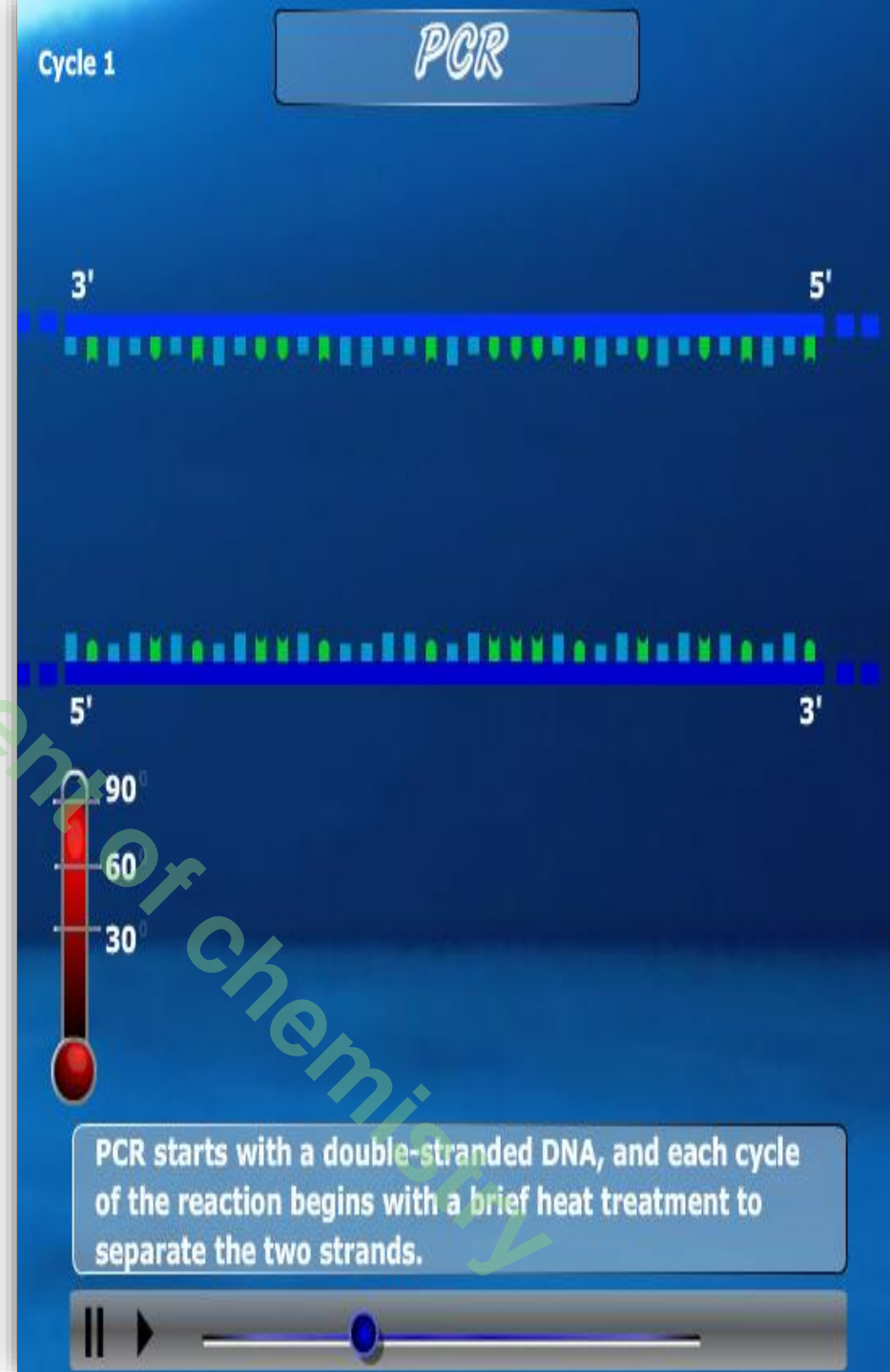
Рис. 2: Схематическое изображение первого цикла ПЦР. (1) Денатурация при 94—96°C. (2) Отжиг при 68 °С (например). (3) Элонгация при 72 °С (P=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

Денатурация

• Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до $94\text{--}96^\circ\text{C}$ (или до 98°C , если используется особенно термостабильная полимераза) на $0,5\text{--}2$ минут, чтобы цепи ДНК разошлись.

• Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК.

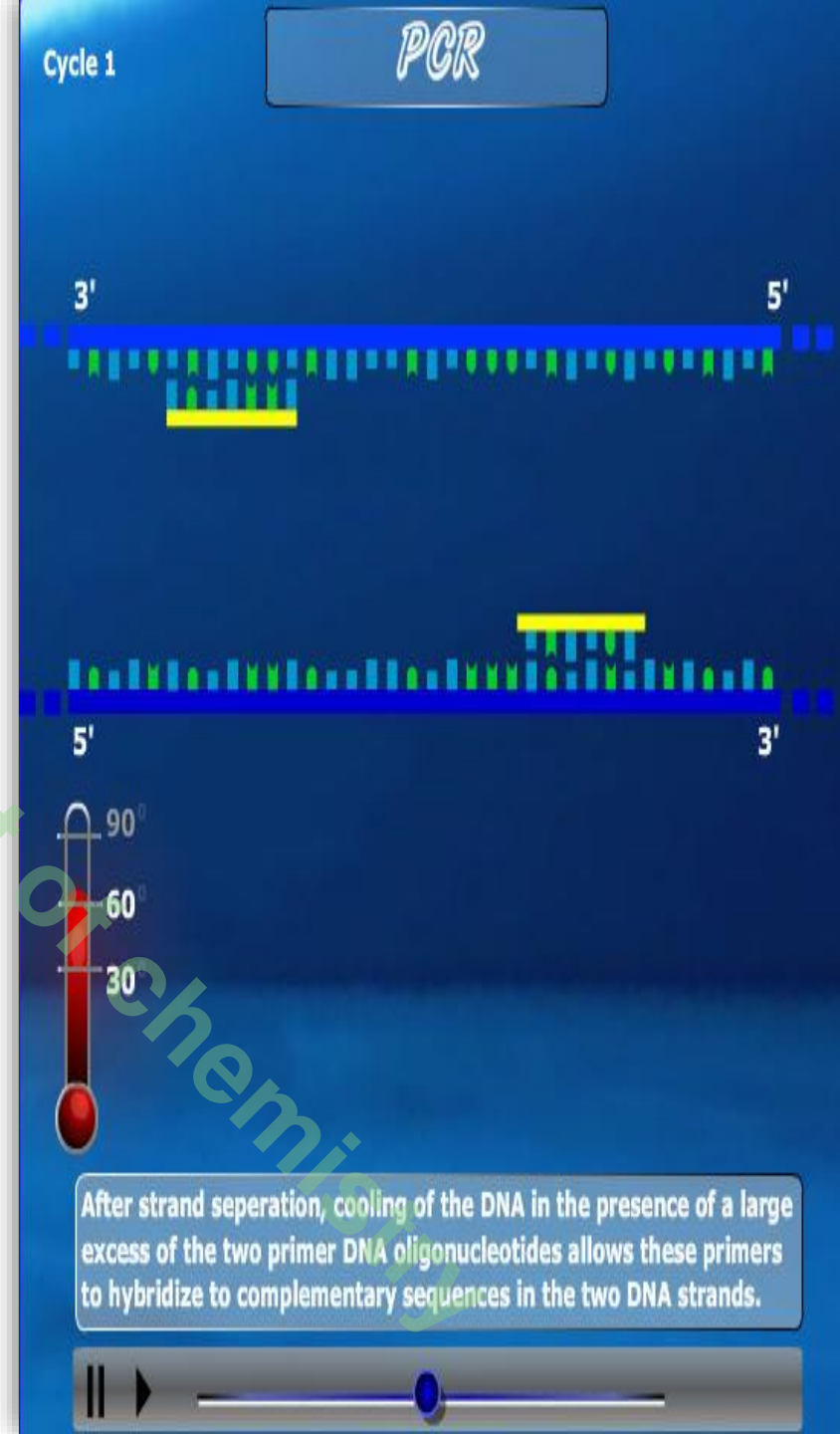
• Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение $2\text{--}5$ минут для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется *горячим стартом*, он позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.



The diagram illustrates the denaturation step of PCR. At the top, a blue box labeled "PCR" is shown. Below it, "Cycle 1" is indicated. A double-stranded DNA molecule is shown with the top strand labeled 3' on the left and 5' on the right, and the bottom strand labeled 5' on the left and 3' on the right. The strands are represented by blue and green bars. A red thermometer on the left shows a temperature of 90°C. A text box at the bottom explains: "PCR starts with a double-stranded DNA, and each cycle of the reaction begins with a brief heat treatment to separate the two strands." A playback control bar is at the bottom.

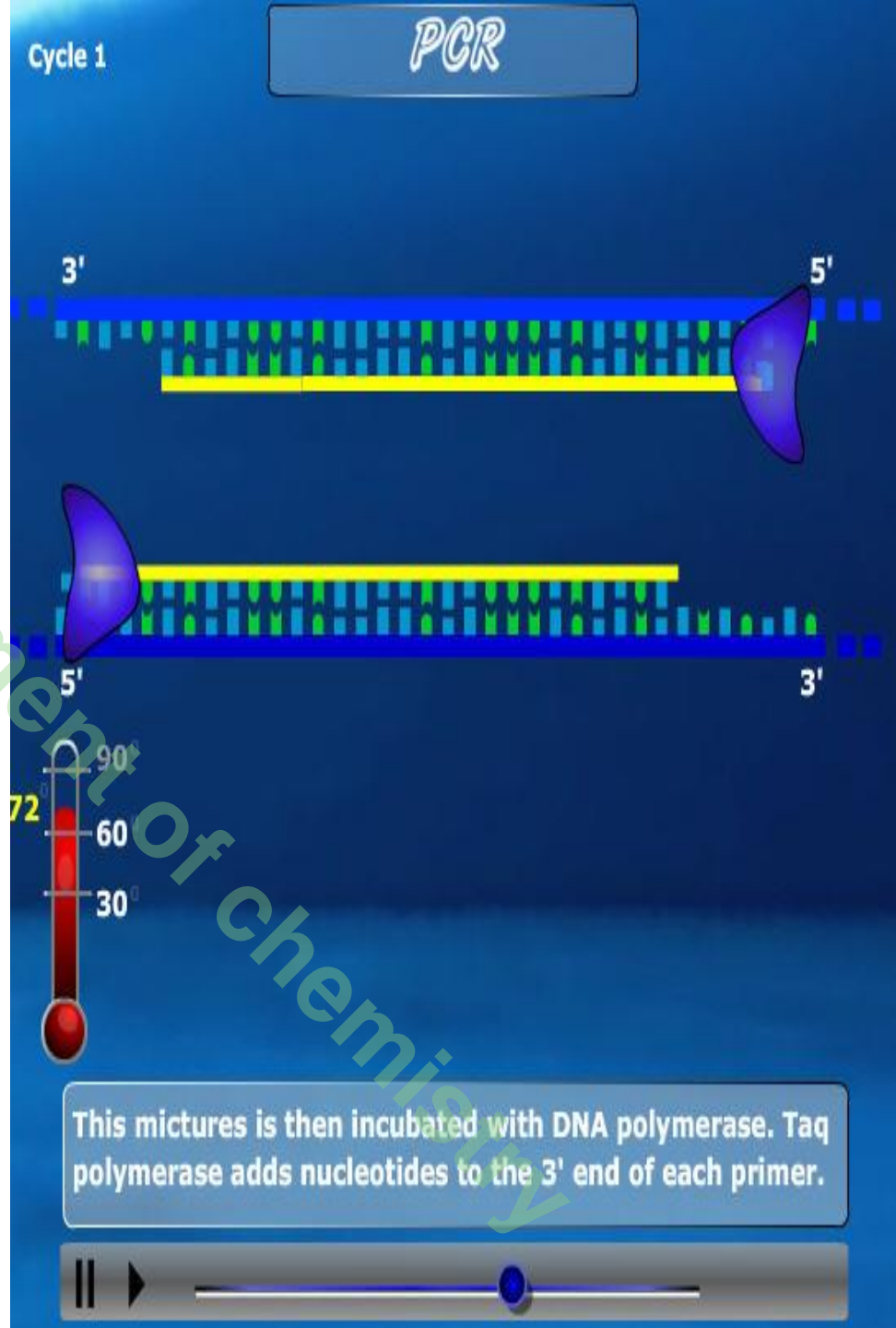
Ренатурация (Отжиг)

- Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*.
- Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 4—5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5—2 минут.
- Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).



Синтез (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.
- Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °C.



Состав реакционной смеси

Исследуемая ДНК

ДНК-зависимая-ДНК-полимераза

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP)

ДНК-затравки (праймеры)

Буферный раствор с $MgCl_2$

Интеркалирующий краситель
(обычно SYBR Green)

или

Флуоресцентно меченные
ДНК-зонды

93-96 °C

1-10 минут

«Горячий старт» -
активация полимеразы,
размешивание
компонентов

93-96 °C

5-15 секунд

Разрушение
водородных связей
между цепями ДНК
(денатурация)

40-75 °C

30 секунд

Гибридизация
праймеров на ДНК
(отжиг праймеров)

60-75 °C

0-15 секунд

Синтез
комплементарных
цепей ДНК
(элонгация)



Полимеразная цепная реакция с
возможностью детекции продукта в
реальном времени (RT-PCR).

Секвенирование по Сенгеру



Прикладное применение ПЦР

- Анализ содержания ГМО в продуктах питания;
- Установление отцовства;
- Криминалистика:
 - «Генетические отпечатки пальцев»;
- В медицине:
 - Диагностика наследственных заболеваний;
 - Диагностика инфекционных заболеваний;
 - Контроль эффективности лечения;
 - Персонализированная медицина.



OrSMU, department of chemistry

Спасибо за внимание!