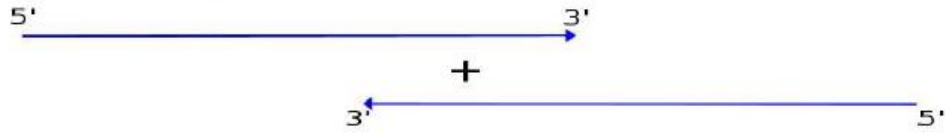


# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)



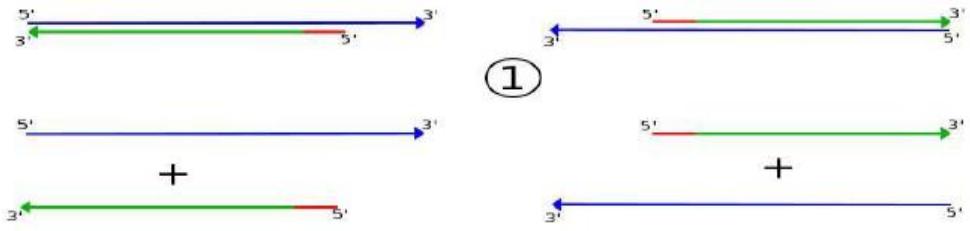
① Denaturation



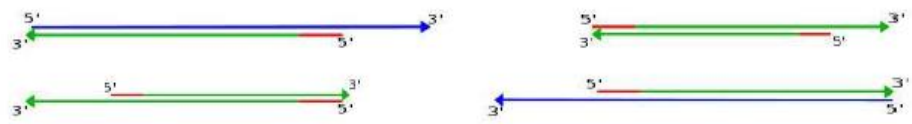
② Annealing



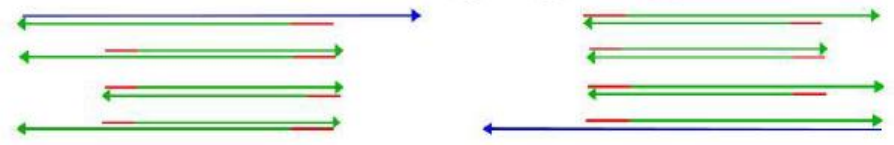
③ Elongation



② & ③



①, ② & ③



①, ② & ③





Рис.23. Исходные компоненты для реакции ПЦР.

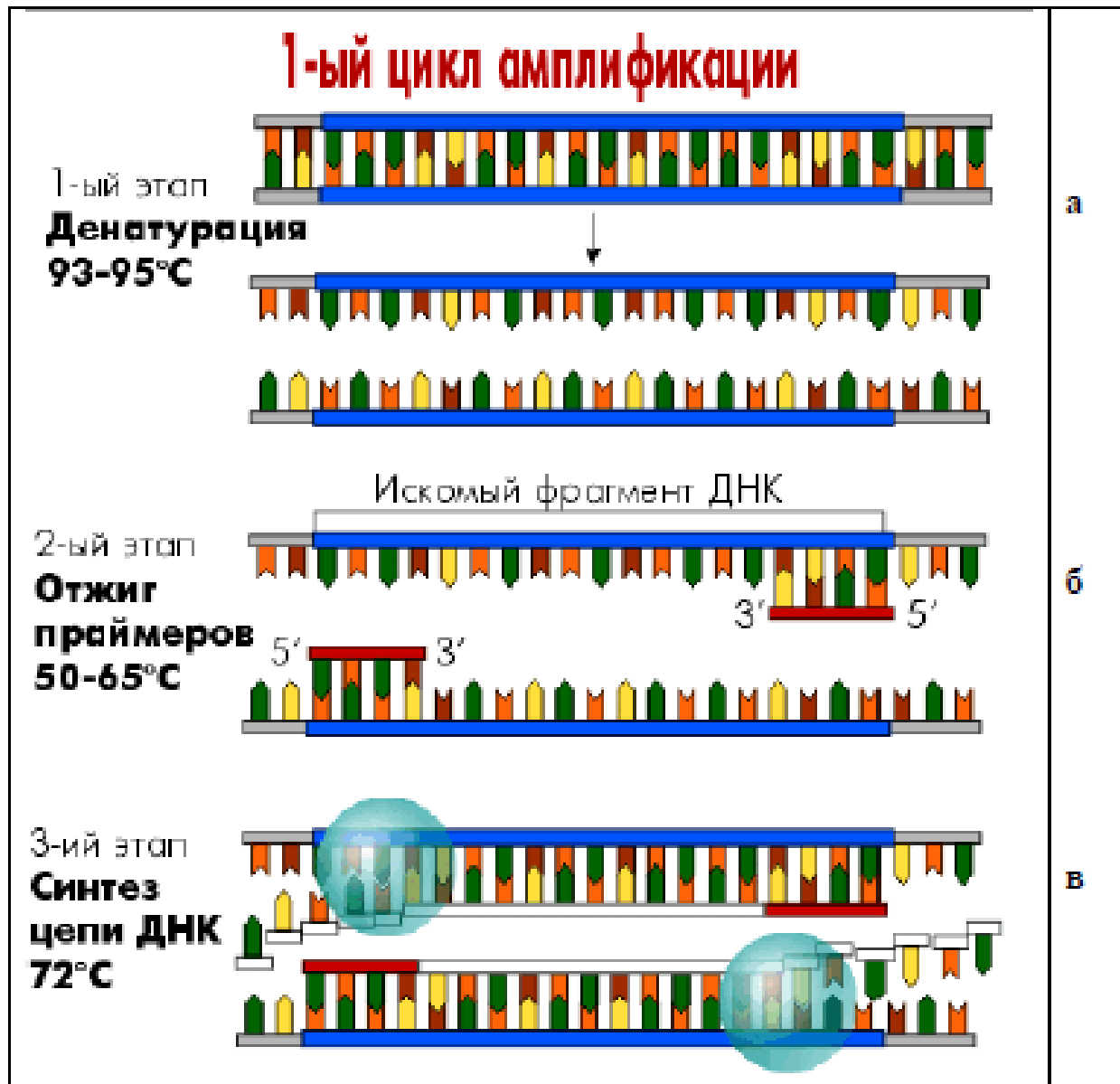
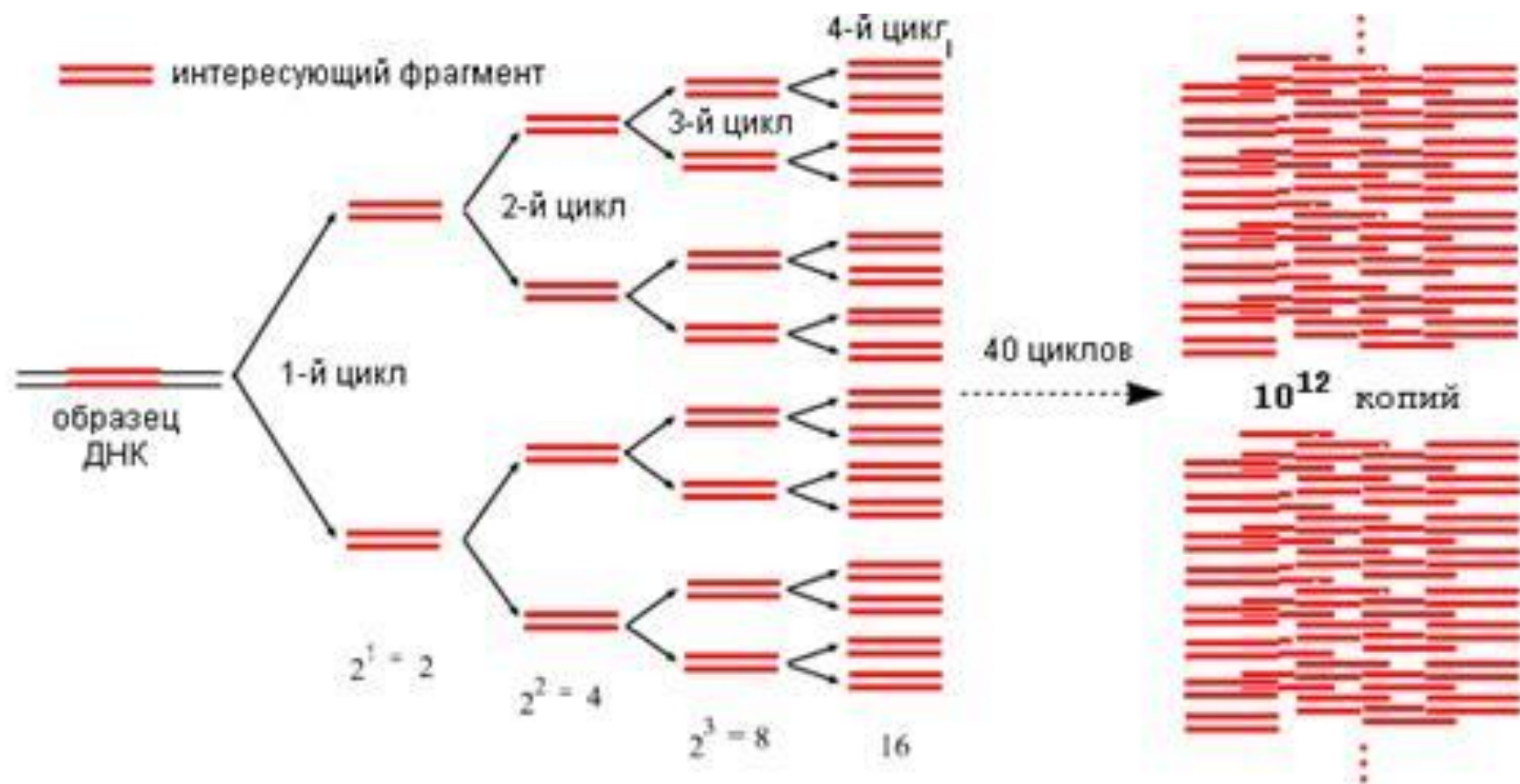
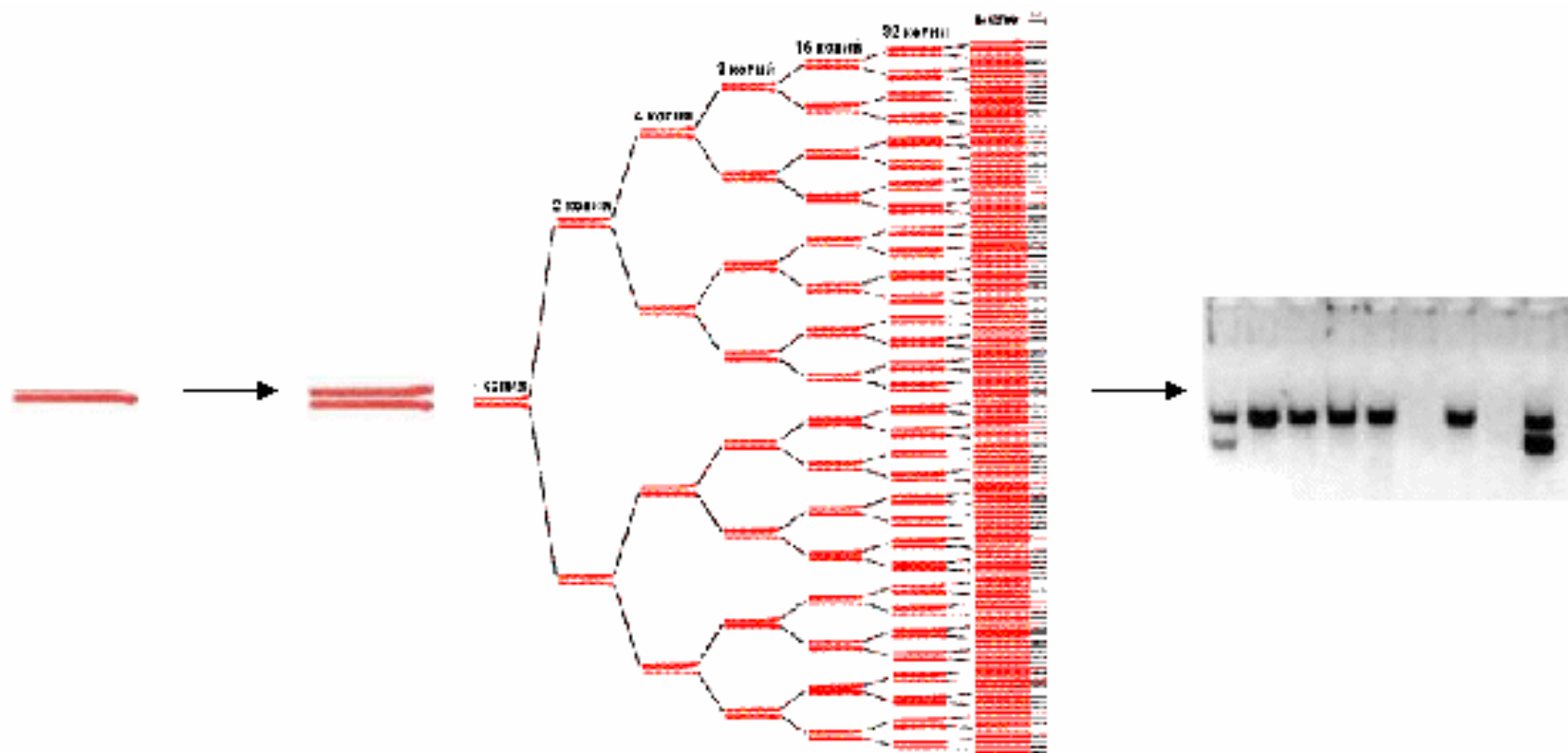


Рис.24. Схема реакции ПЦР





выделение  
РНК/ ДНК ВИЧ

обратная  
транскрипция  
РНК в кДНК

амплификация  
выделенного ДНК

детекция продукта  
амплификации  
(ЭФ, ГИФА, фотометрия  
при real-time ПЦР)



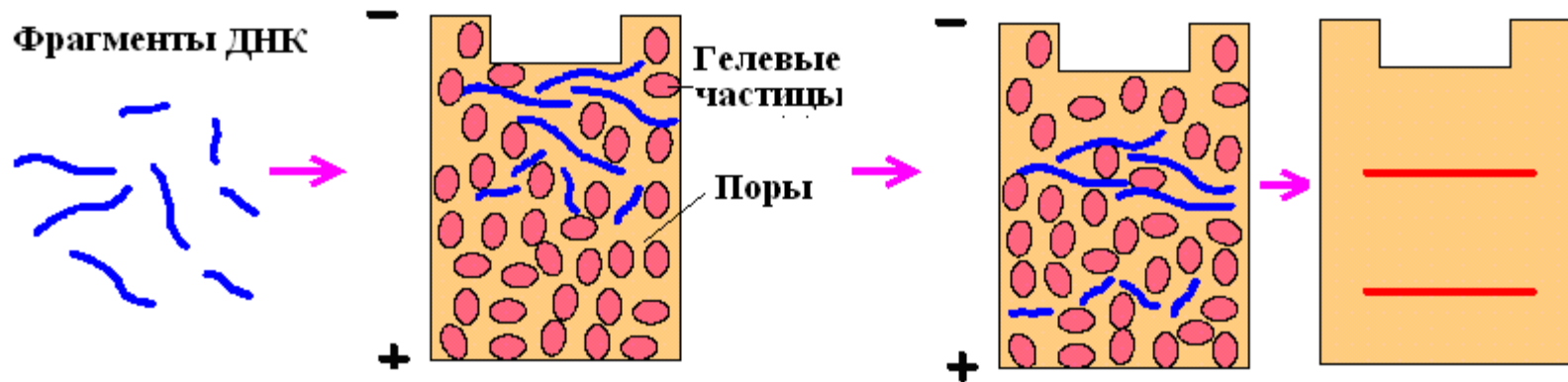
# Компоненты ПЦР

Праймеры	Определяют амплифицируемый участок Служат «затравкой» для синтеза ДНК	
dNTP	«Строительный материал»	
Буфер	KCl	Моновалентные катион необходим для оптимальной гибридации праймеров
	Tris	Поддержание оптимального для ферментативной реакции pH
	MgCl <sub>2</sub>	Бивалентный катион необходим для работы фермента
Полимераза	Осуществляет синтез ДНК	
Матрица	Анализируемый образец ДНК	



# **ГЕЛЬЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

- **РАЗДЕЛЕНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК**
- Гель-электрофорез – разделение фрагментов ДНК по размерам под воздействием электрического тока либо в агарозе, либо в полиакриламиде (ПААГ).



# *Источник питания для проведения электрофореза*



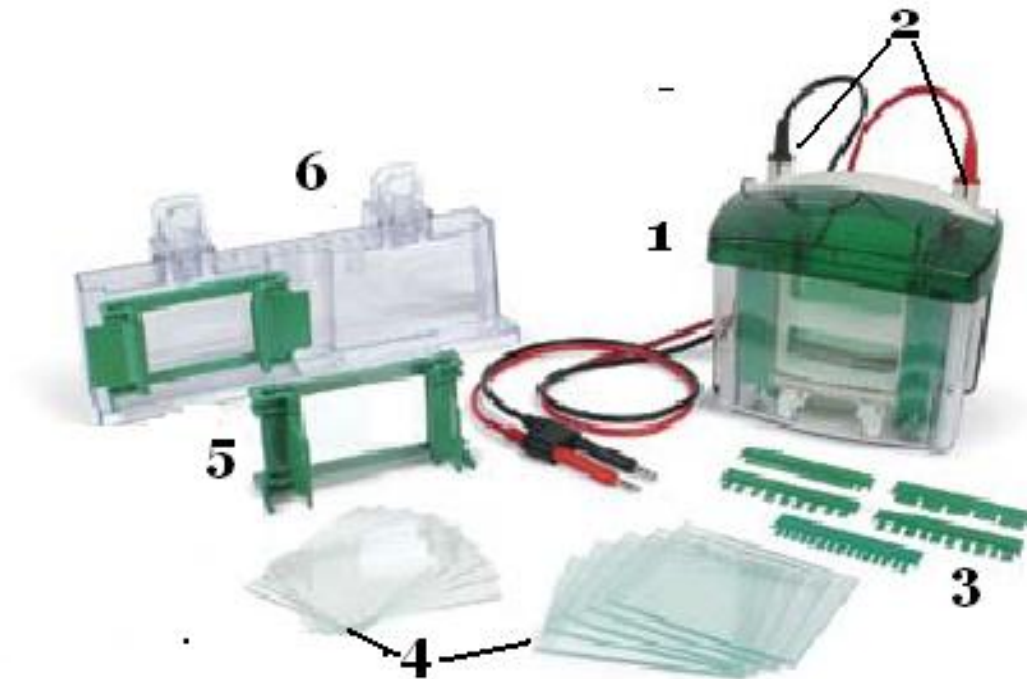
## **Output Specifications**

---

Voltage	10–300 V
Current	4–400 mA
Power	75 W (maximum)

---

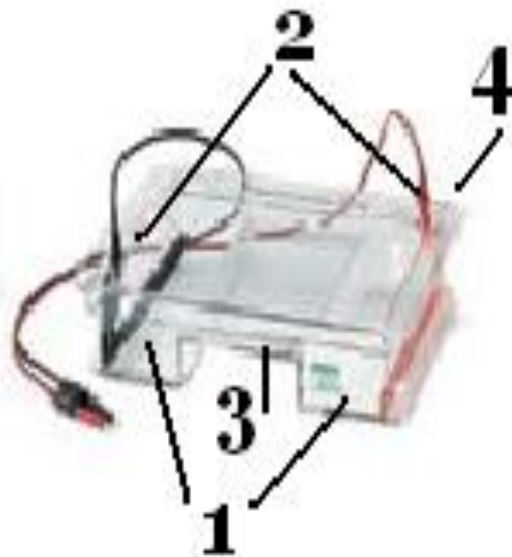
**Аппарат для вертикального гельэлектрофореза и набор  
необходимых комплектующих принадлежностей.**



**1** Камера с крышкой  
**2** Электроды  
**3** Гребенки

**4** Стекла для заливки гелей  
**5** Рамки для стекол  
**6** Держатель для рамок

## *Аппараты для горизонтального гельэлектрофореза*



**1** Камера для буфера

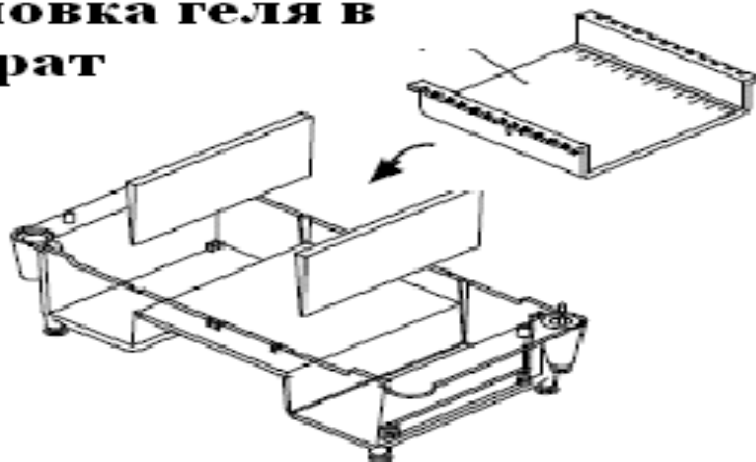
**2** Электроды

**3** Столик для геля

**4** Крышка

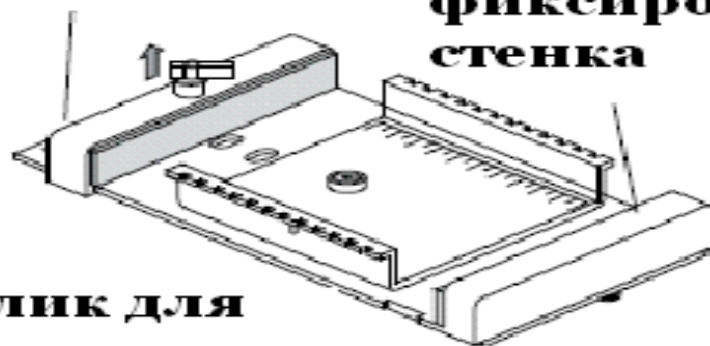
# **Схема сборки аппарата для горизонтального электрофореза**

**установка геля в аппарат**



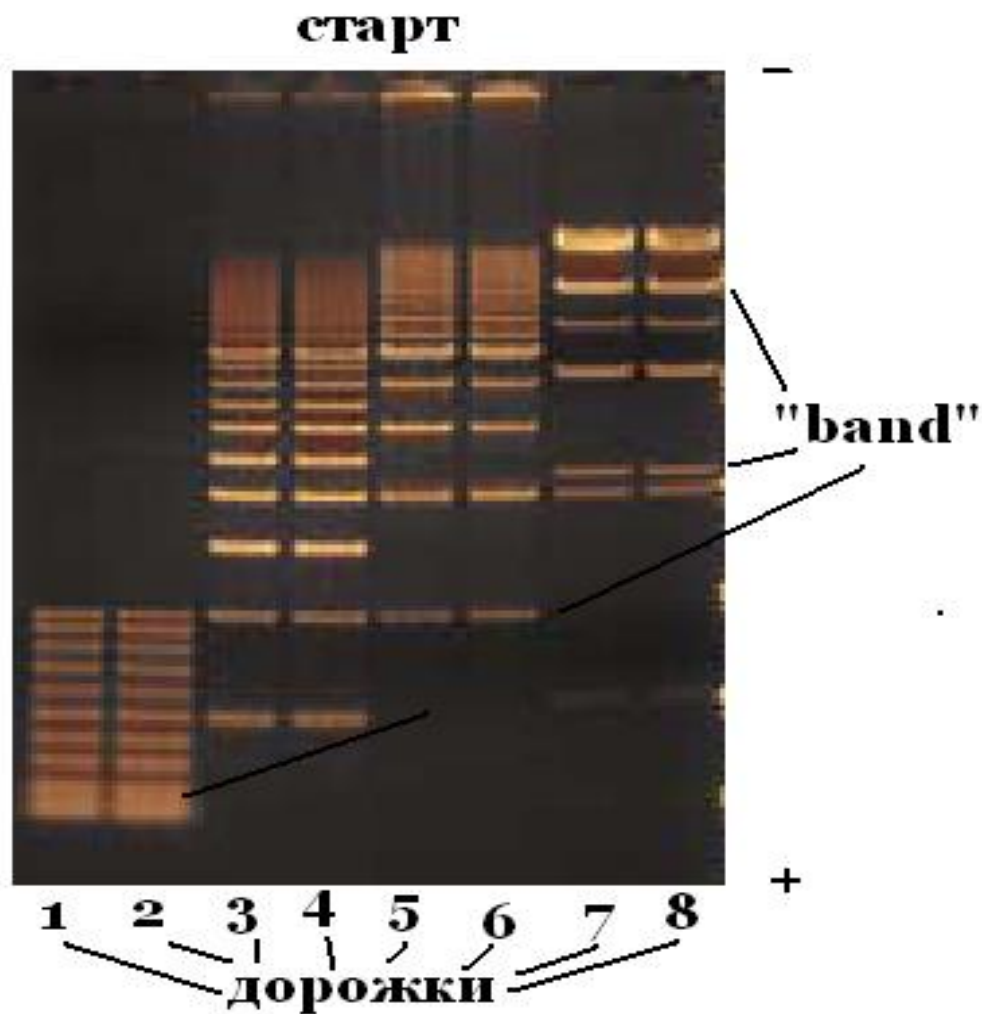
**подвижная стенка**

**фиксированная стенка**

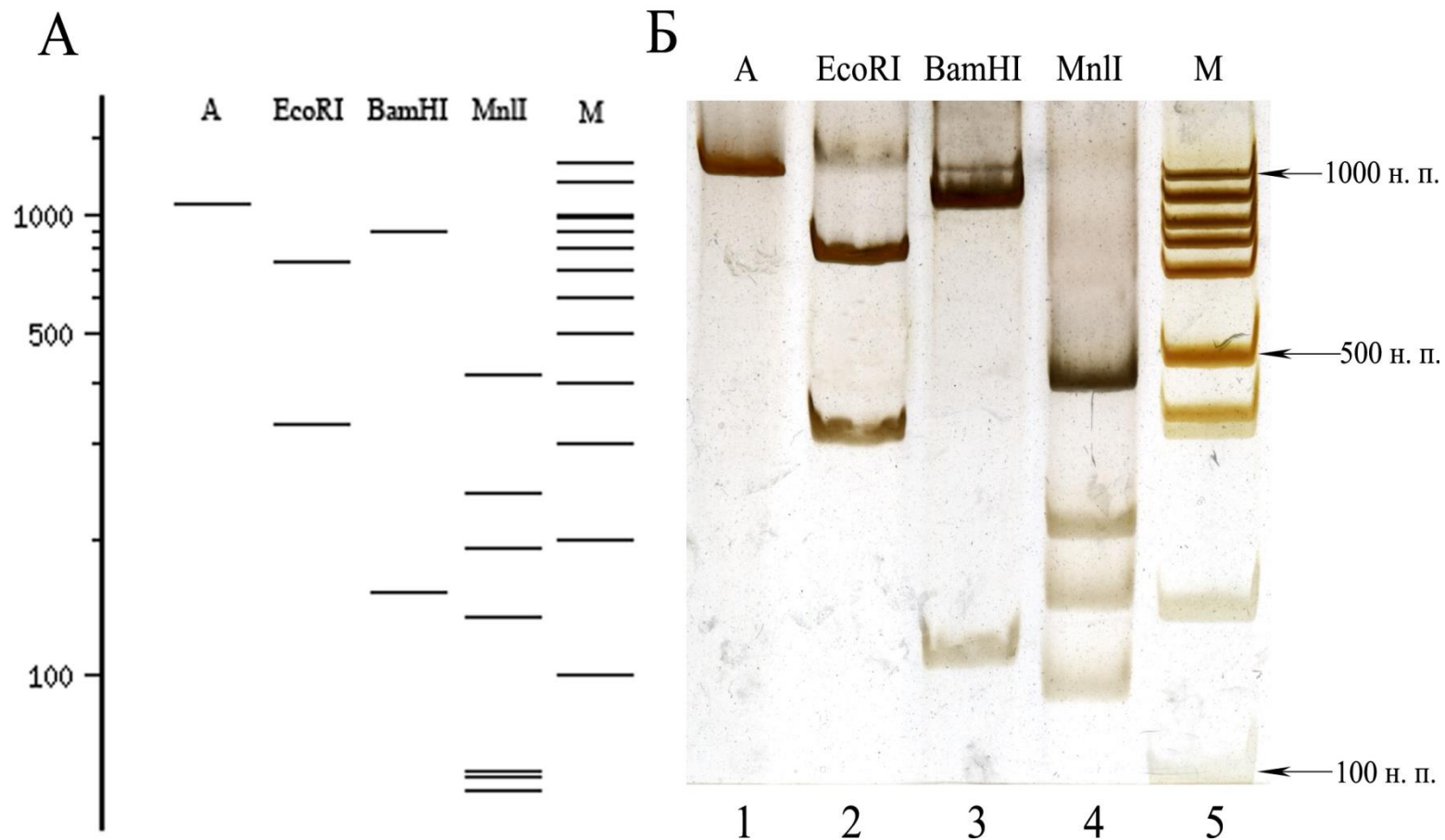


**столлик для заливки геля**

**Окрашивание фрагментов ДНК с помощью EthBr и  
визуализация окрашенных зон под УФ**

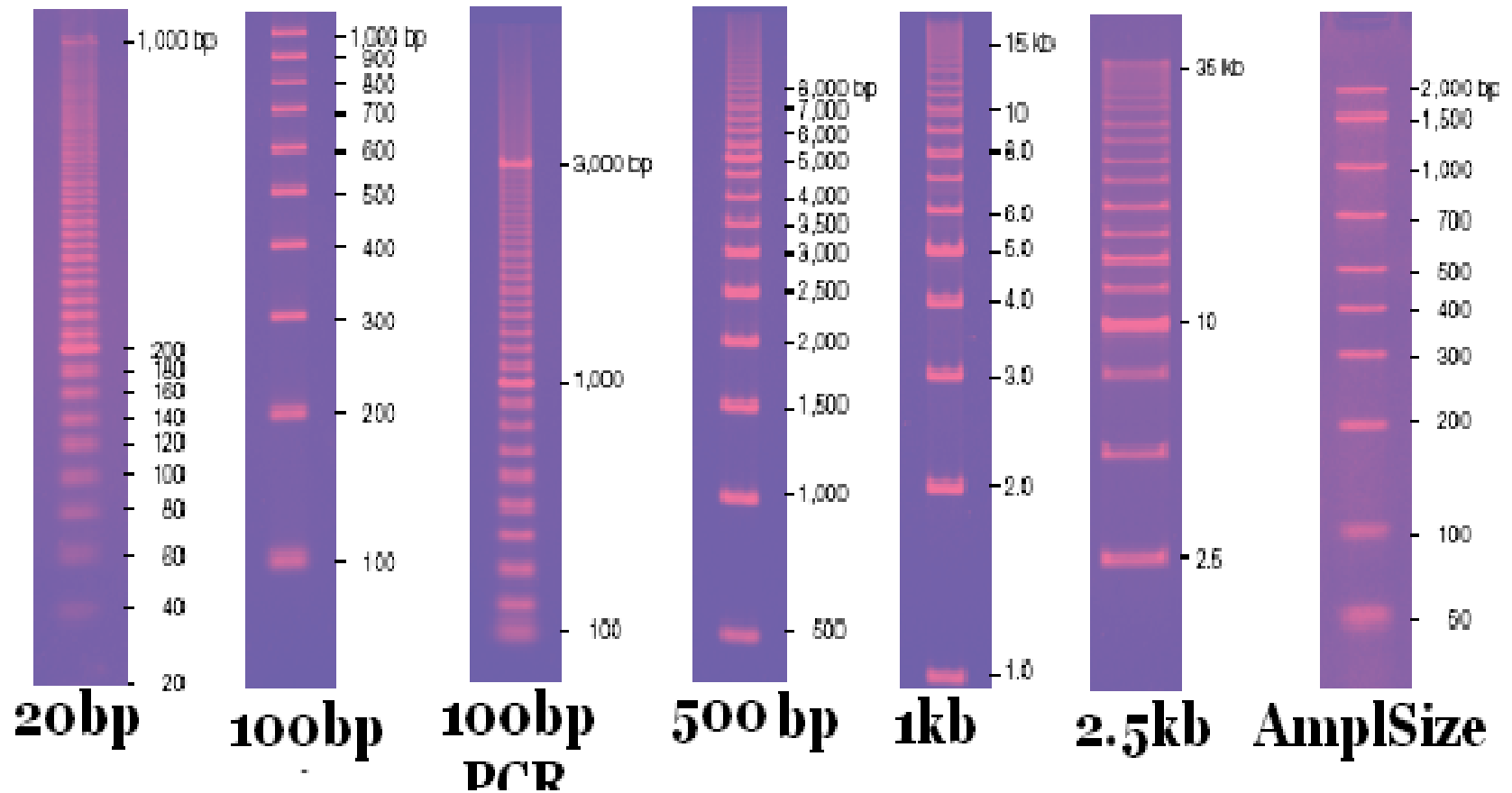


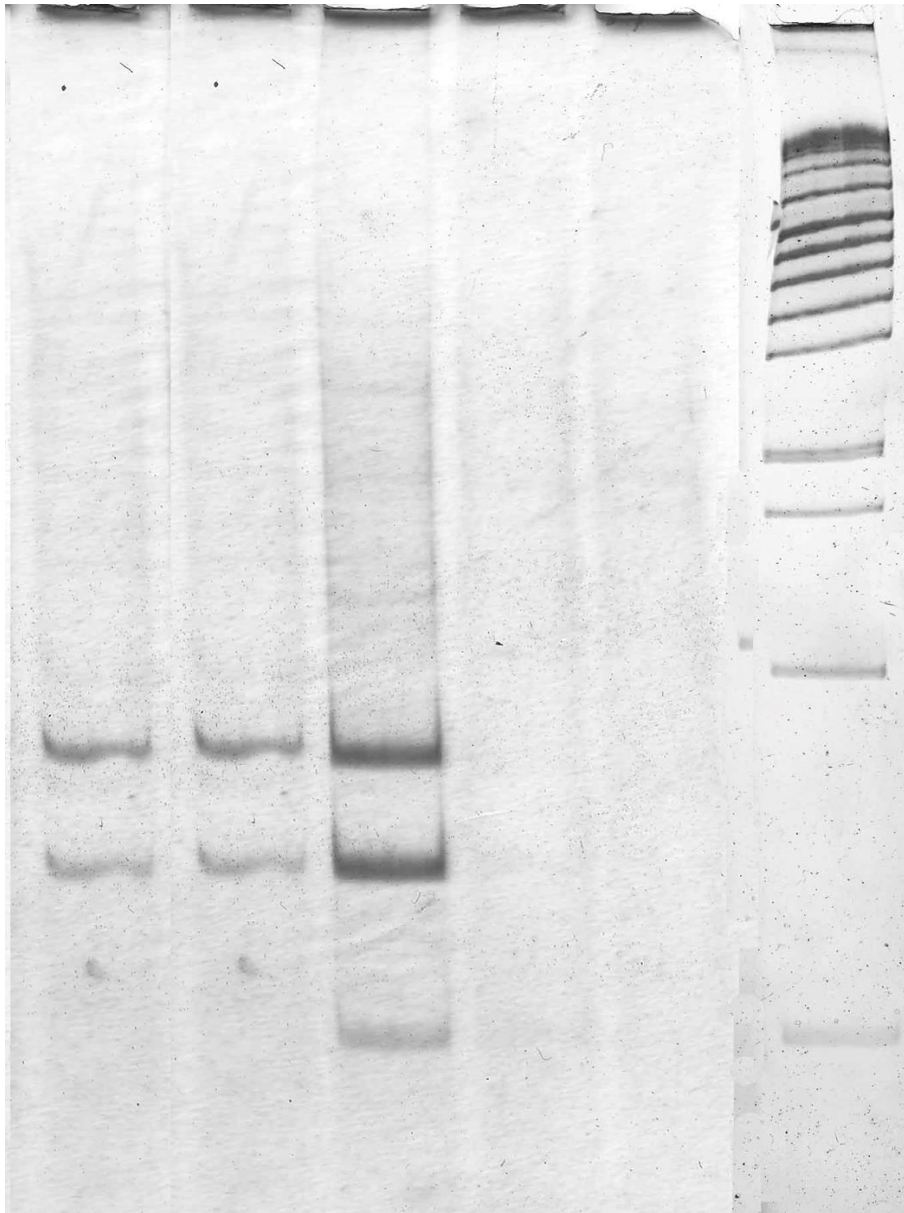
# Окрашивание фрагментов ДНК с помощью $AgNO_3$



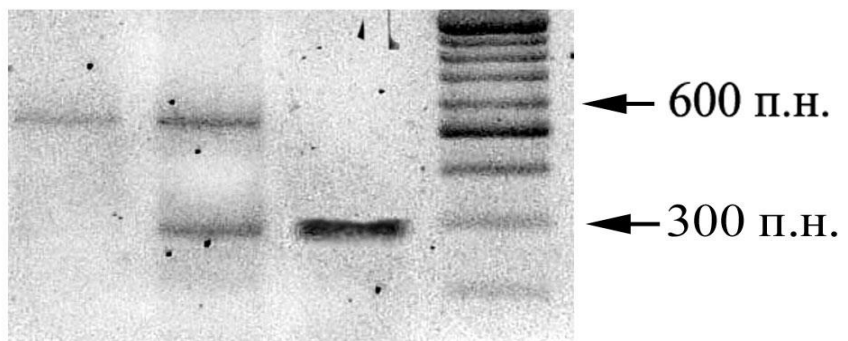
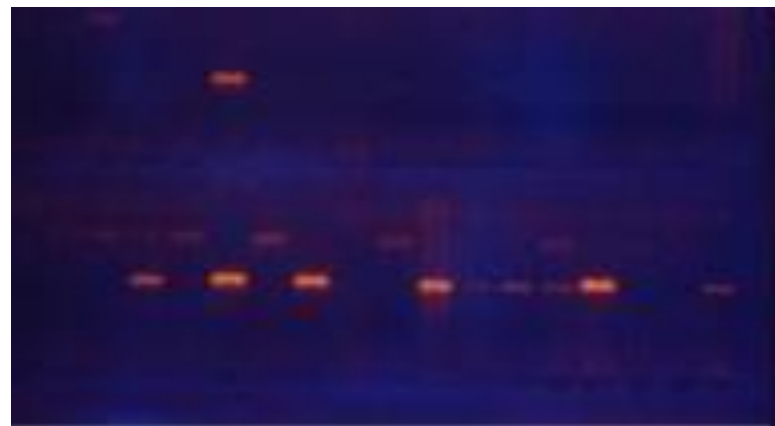
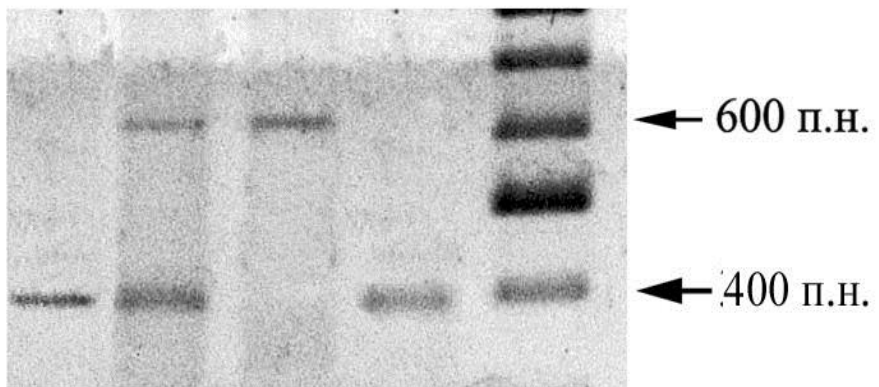


# ***ДНК -маркеры для гельэлектрофореза (синтетические полинуклеотиды)***





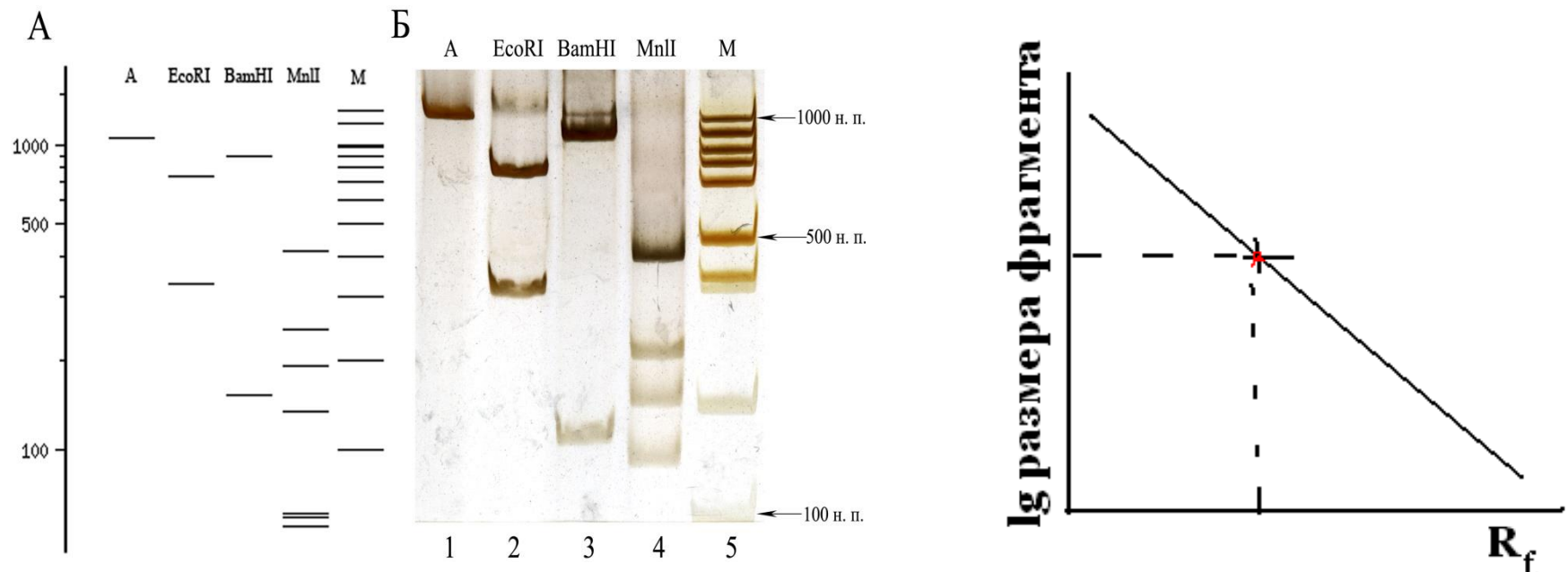
**Электрофорез ПЦР-  
продуктов, полученных с  
праймером G7 на ДНК  
моллюсков *Planorbarius corneus***

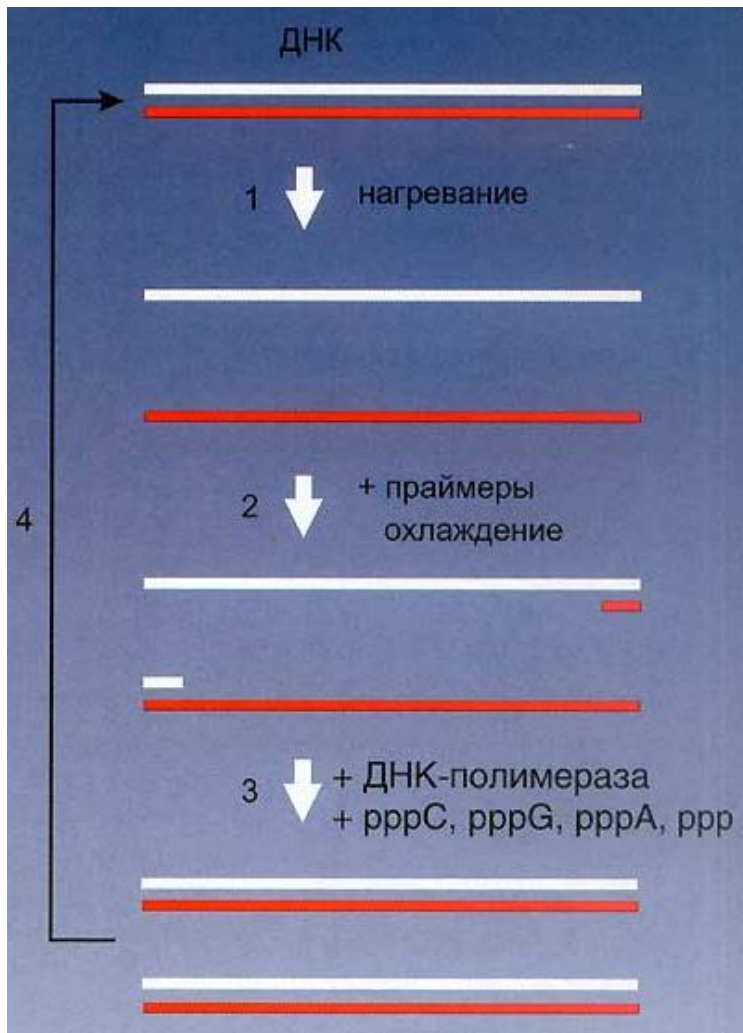


# Определение размера фрагмента ДНК по его подвижности в геле

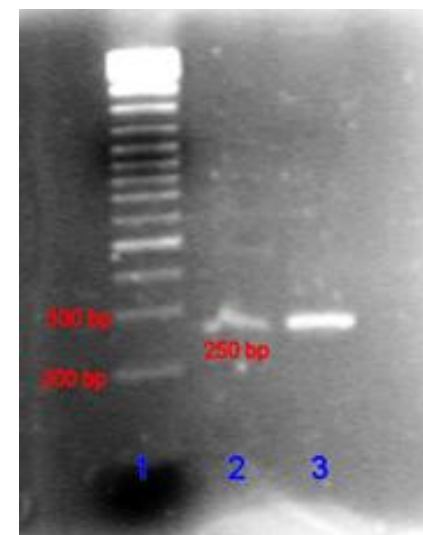
Логарифм относительной молекулярной массы маркера линейно связан с его электрофоретической подвижностью  $R_f$  — величиной, равной отношению расстояний, пройденных маркерной молекулой и красителем (фронтом растворителя).

Построив график зависимости логарифма относительных молекулярных масс маркеров от  $R_f$ , можно найти относительную молекулярную массу каждого компонента образца.





Амплификатор для проведения ПЦР



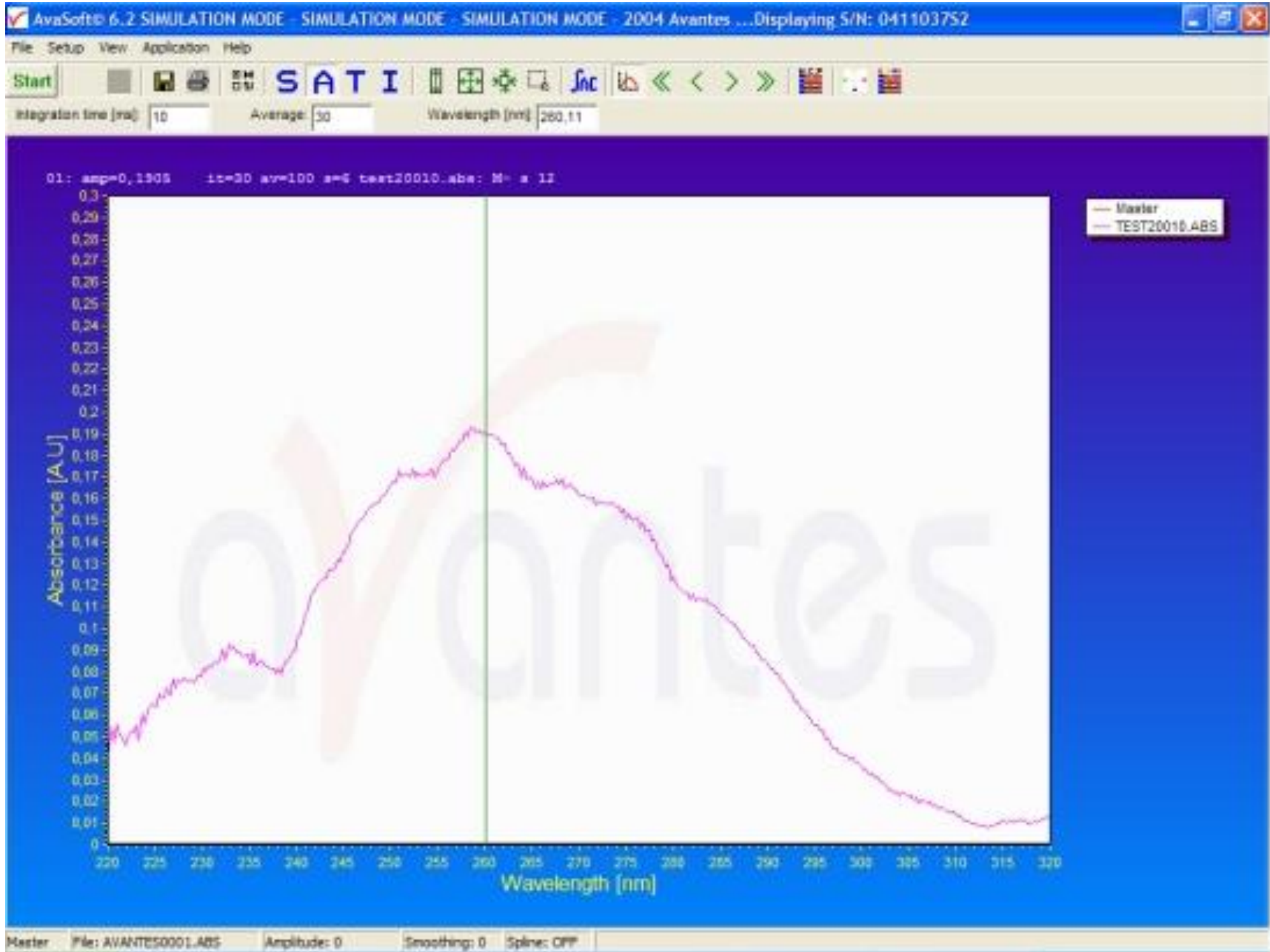
Фотография геля, содержащего маркерную ДНК (1) и продукты ПЦР-реакции (2,3). Цифрами показана длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов

В основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит способность фермента ДНК-полимеразы с фантастической скоростью синтезировать из мономеров-нуклеотидов комплементарные цепочки ДНК.

# Спектрофотометрический анализ нуклеиновых кислот

**Количественный анализ нуклеиновых кислот** — определение концентрации ДНК или РНК в смеси или чистом препарате.

**Чистота образца** – содержание примеси белков и других органических веществ



# Коэффициенты пересчета

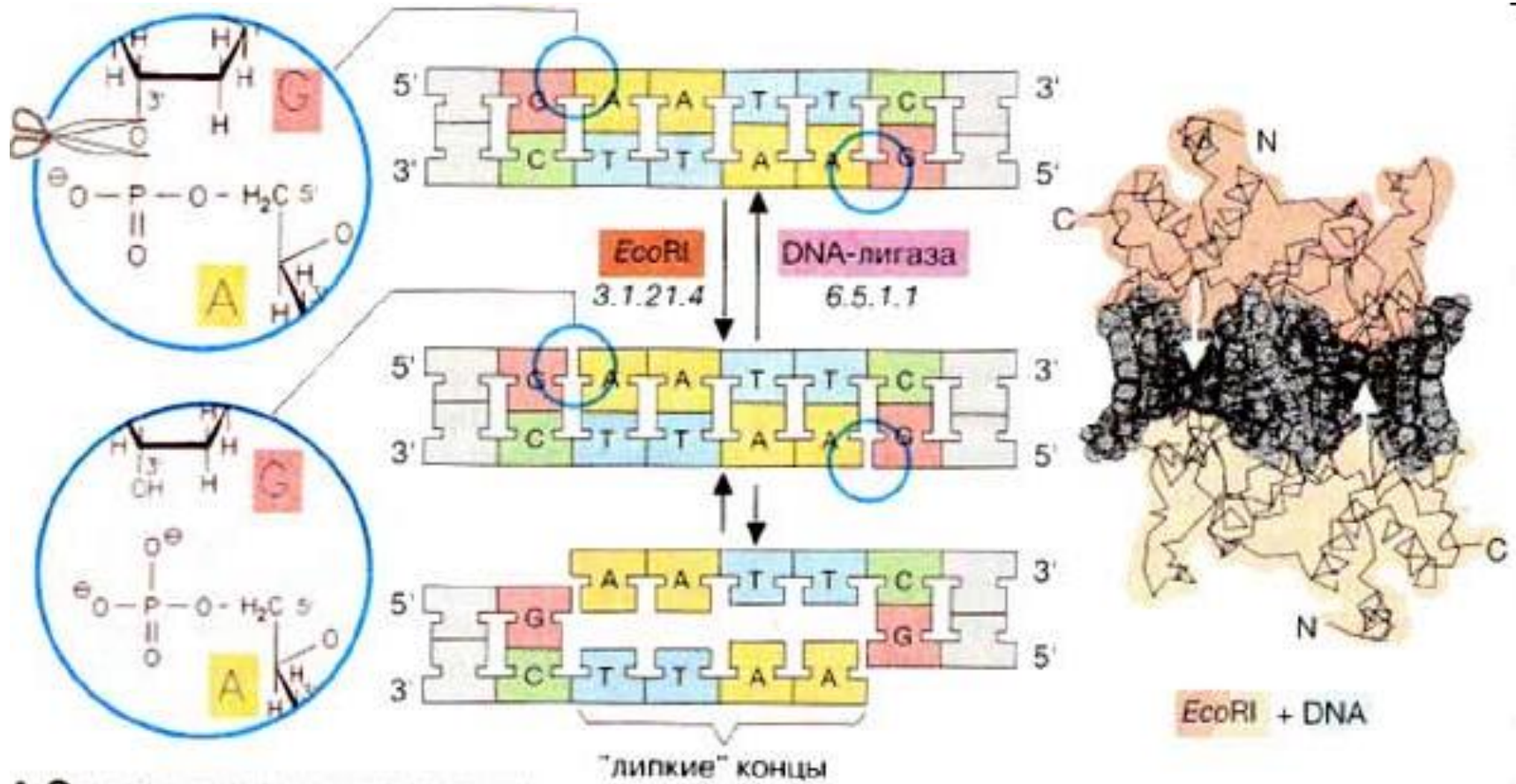
Тип нуклеиновой кислоты	Коэффициенты пересчета Концентрация (мкг/мл) для 1 единицы A260
dsDNA (двуцепочечная ДНК)	50
ssDNA (одноцепочечная ДНК)	37
ssRNA (одноцепочечная РНК)	40





# **Рестрикционный анализ**

# Рестрикция ДНК



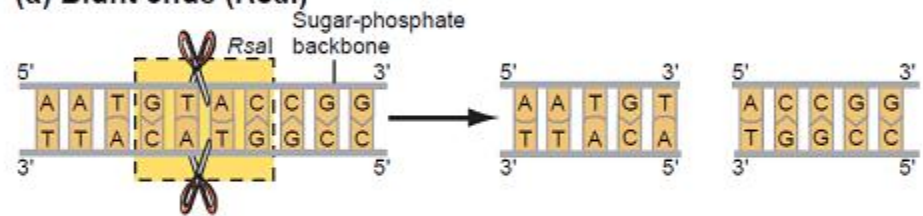
# Рестриктазы Type IIR

(обнаружено несколько тысяч)

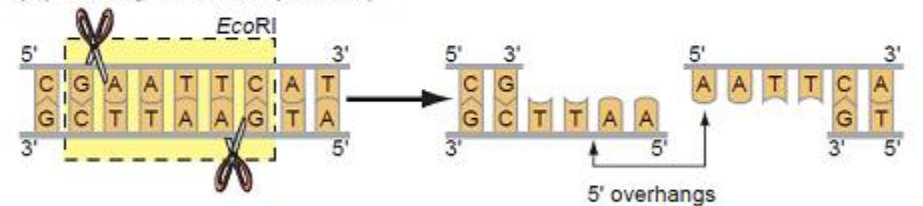
Enzyme	Sequence of Recognition Site	Microbial Origin
<i>TaqI</i>	5'-TCGA-3' 3'-AGCT-5'	<i>Thermus aquaticus</i> YTI
<i>RsaI</i>	5'-GTAC-3' 3'-CATG-5'	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>
<i>Sau3AI</i>	5'-GATC-3' 3'-CTAG-5'	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	<i>Escherichia coli</i>
<i>BamHI</i>	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.
<i>HindIII</i>	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>KpnI</i>	5'-GGTACC-3' 3'-CCATGG-5'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8
<i>Clal</i>	5'-ATCGAT-3' 3'-TAGCTA-5'	<i>Caryophanon latum</i>
<i>BssHII</i>	5'-GCGCGC-3' 3'-CGCGCG-5'	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>NotI</i>	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCTGGC-5'	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>

Образуются «липкие» или «тупые» концы

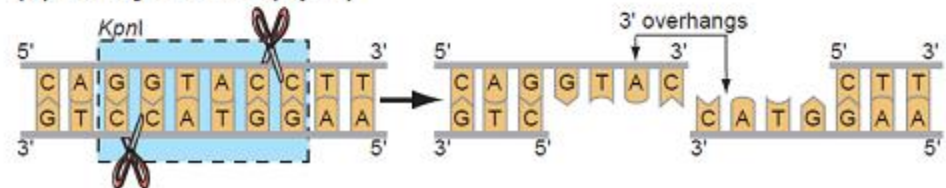
(a) Blunt ends (*RsaI*)

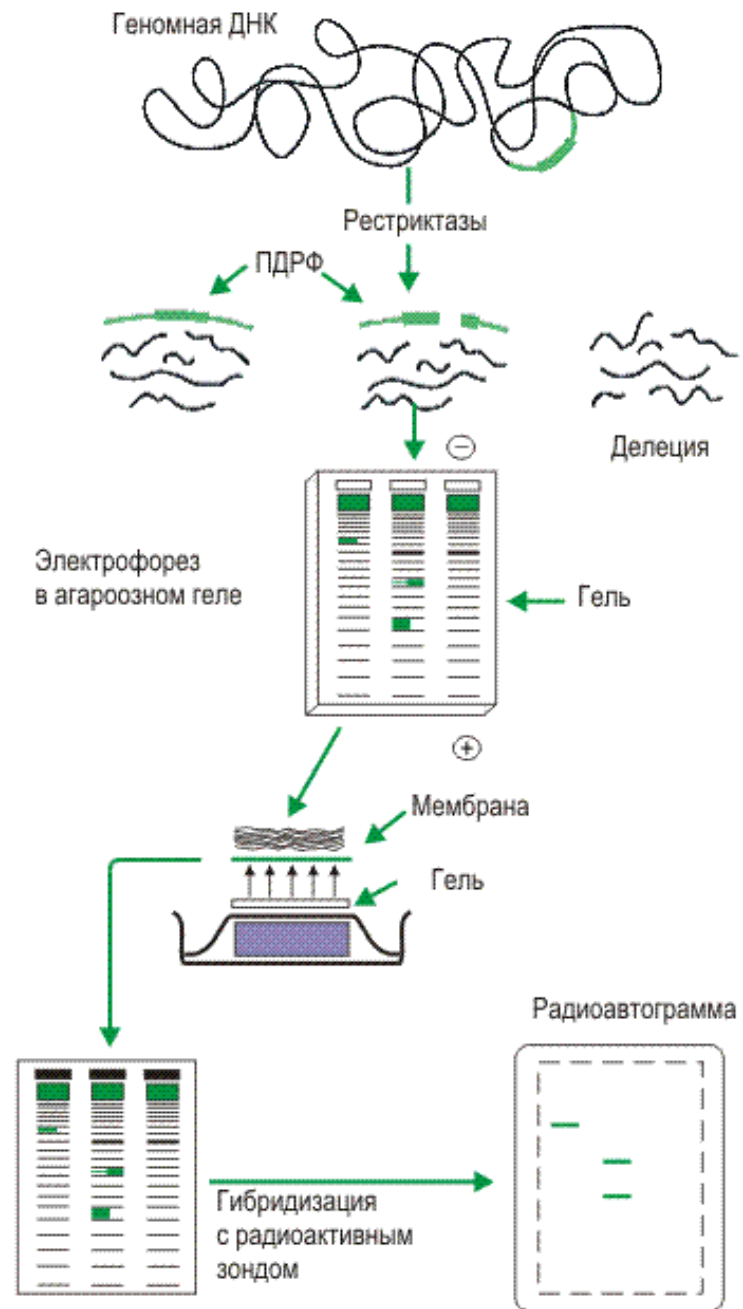


(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)





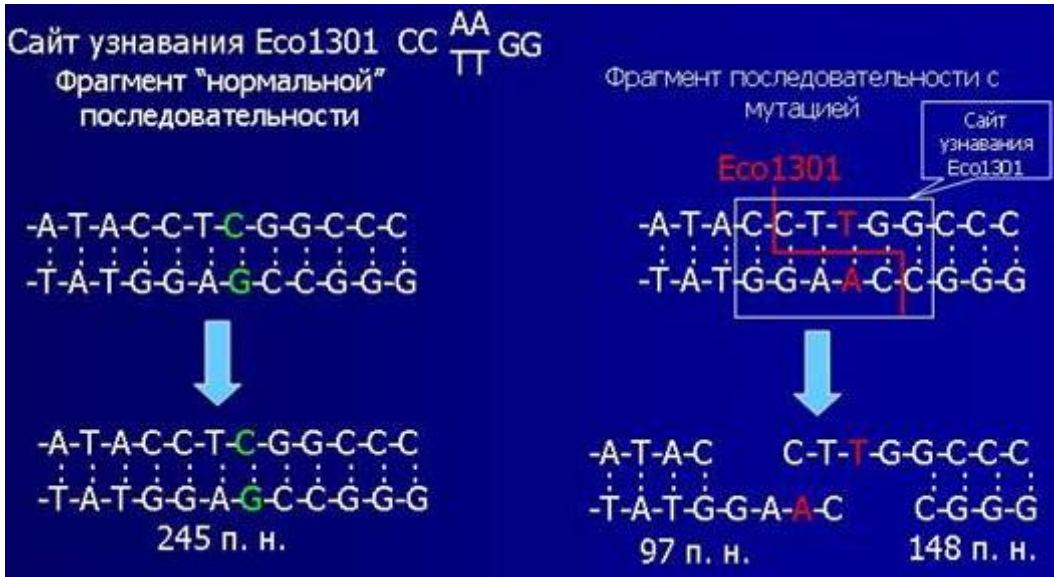
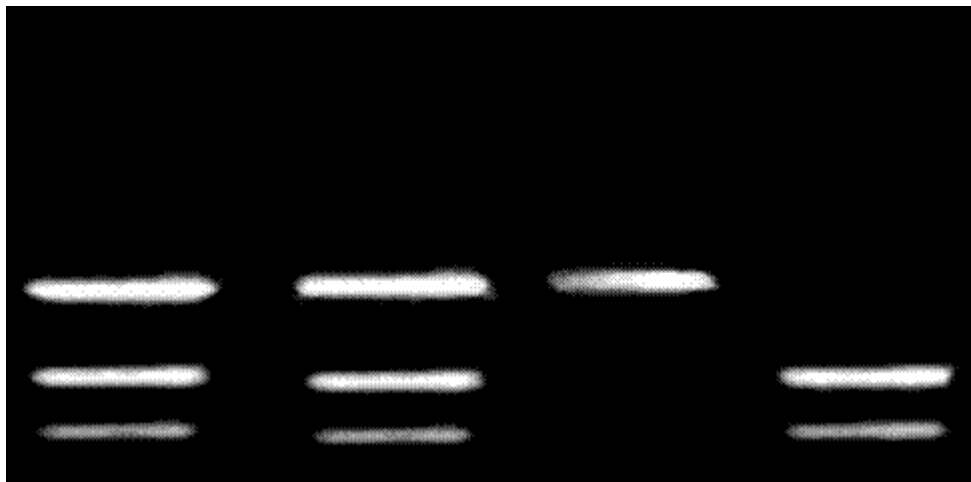


Схема рестрикционного анализа для детекции мутаций R408WR408W (мутация гена фенилаланингидроксилазы, ассоциированная с фенилкетонурией)

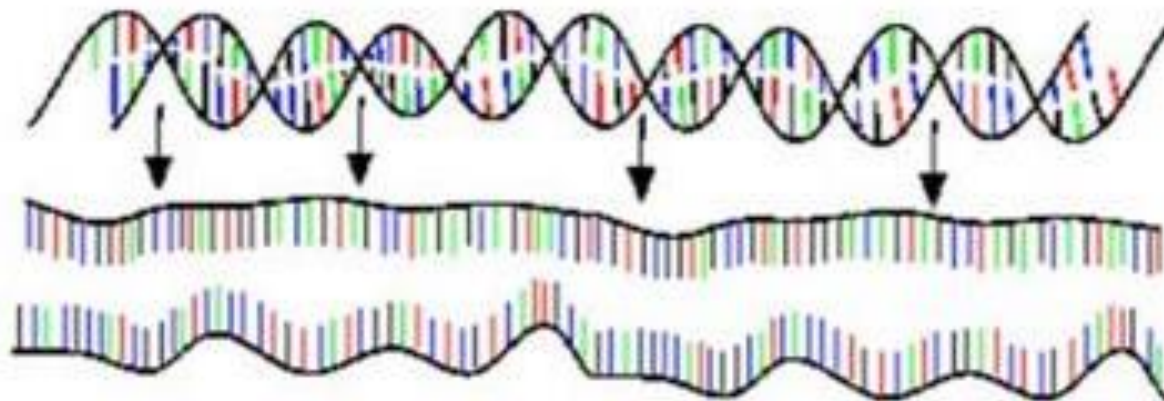


мать                      отец                      пробанд                      проба без мутации

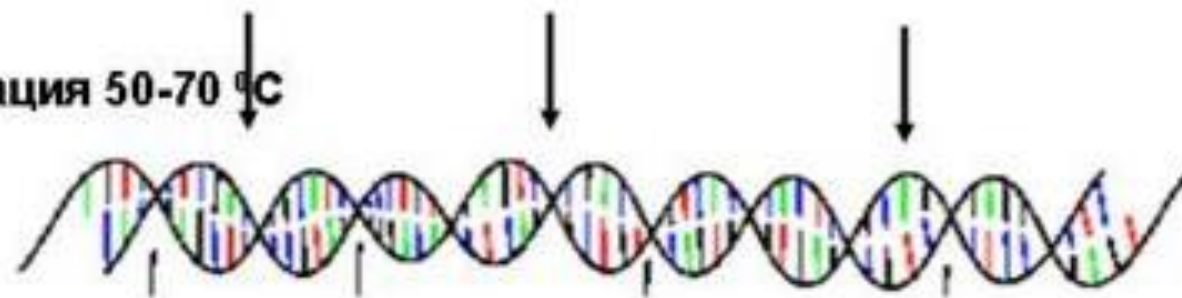
1,8 %-ный агарозный гель

# Гибридизация ДНК

Денатурация 90-100 °C

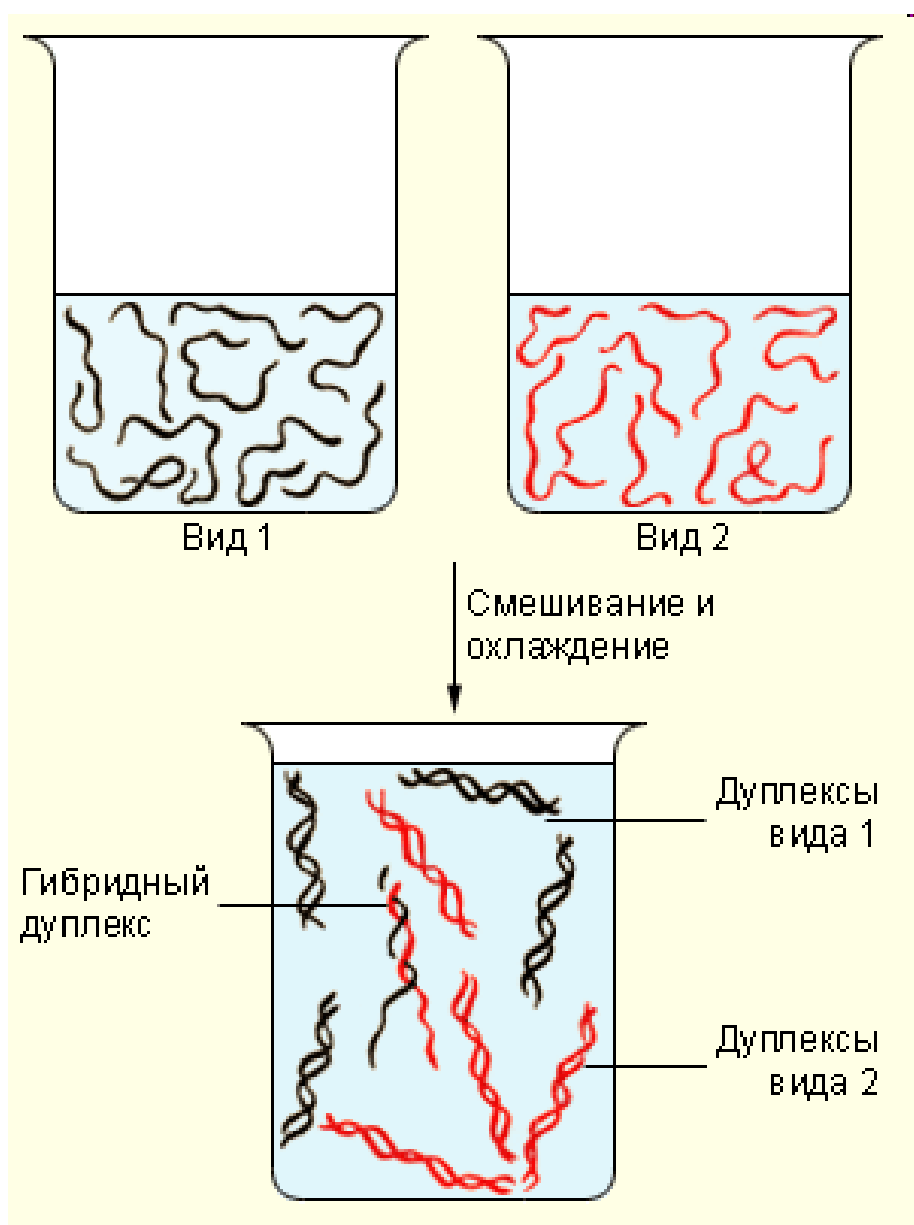


Гибридизация 50-70 °C

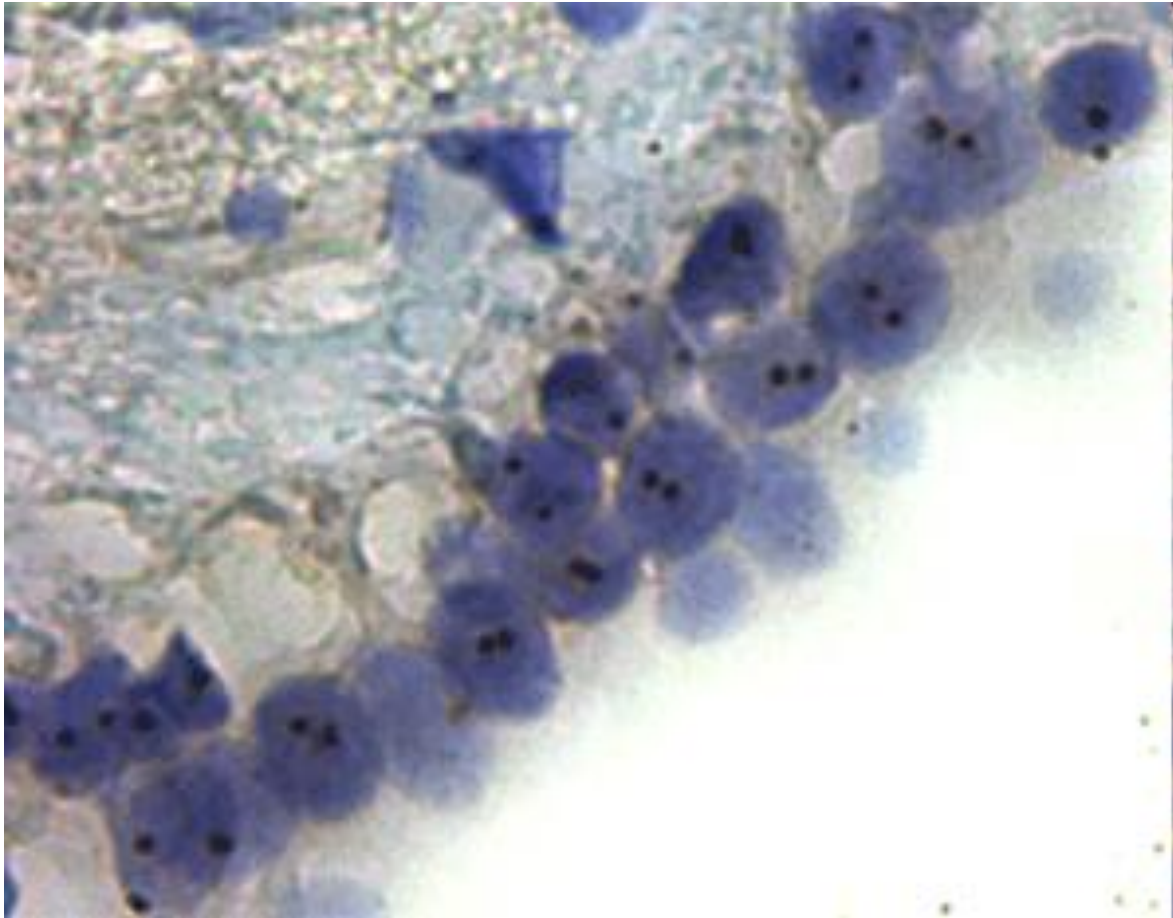


ДНК||ДНК

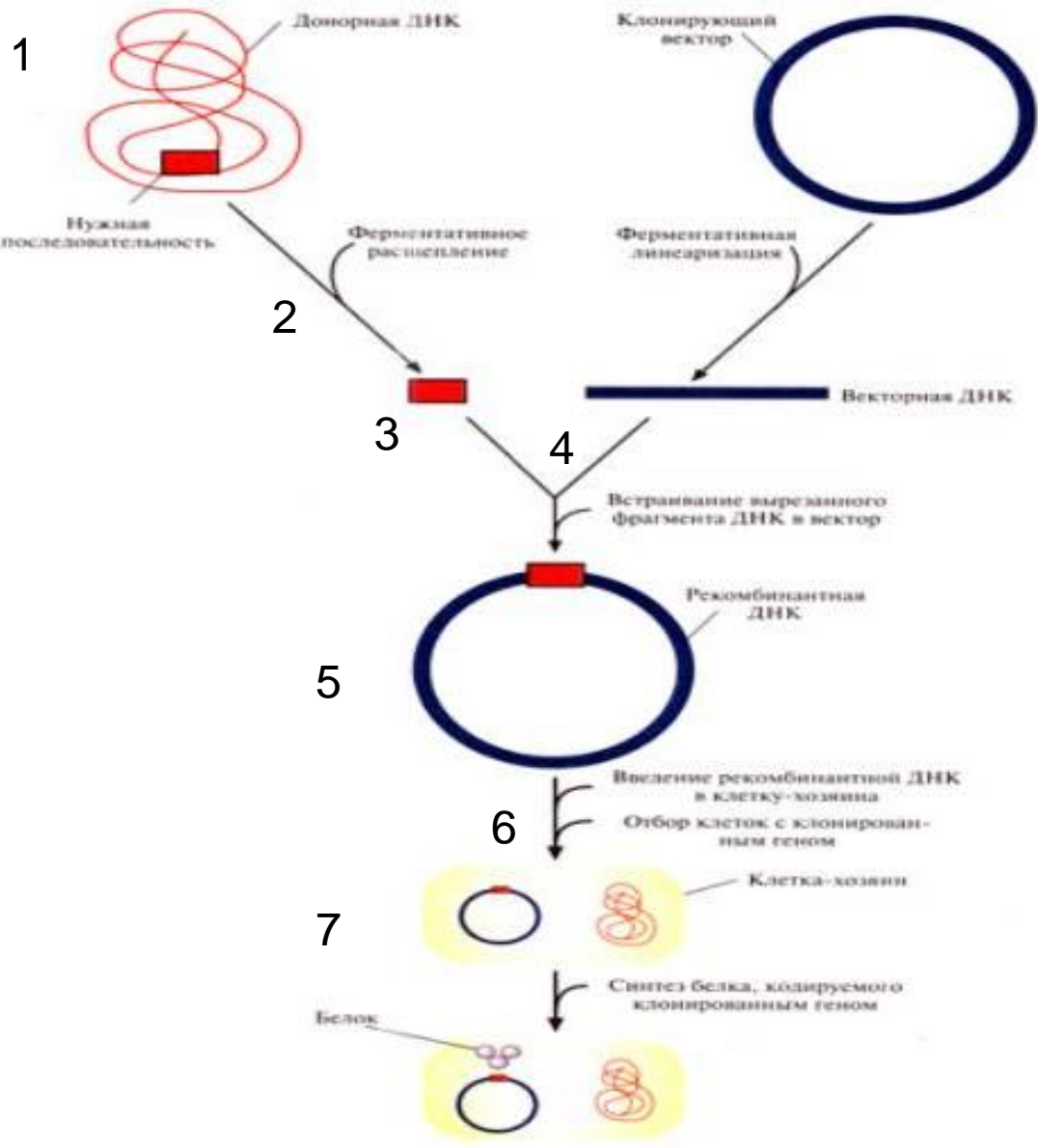
ДНК||РНК







In situ - гибридизация онкогена ERBB2 в эпителиальных клетках протока молочной железы в ядрах эпителиальных клеток четко определяются две метки коричневого цвета в виде точек – результат комплементарного взаимодействия ДНК-зонда, связанного с красителем, с геном ERBB2



Клонирование гена с использованием плазмиды. .  
 (1) Хромосомная ДНК организма А. (2) ПЦР. (3) Множество копий гена организма А. (4) Вставка гена в плазмиду. (5) Плаزمида с геном организма А. (6) Введение плазмиды в организм В. (7) Умножение количества копий гена организма А в организме В.

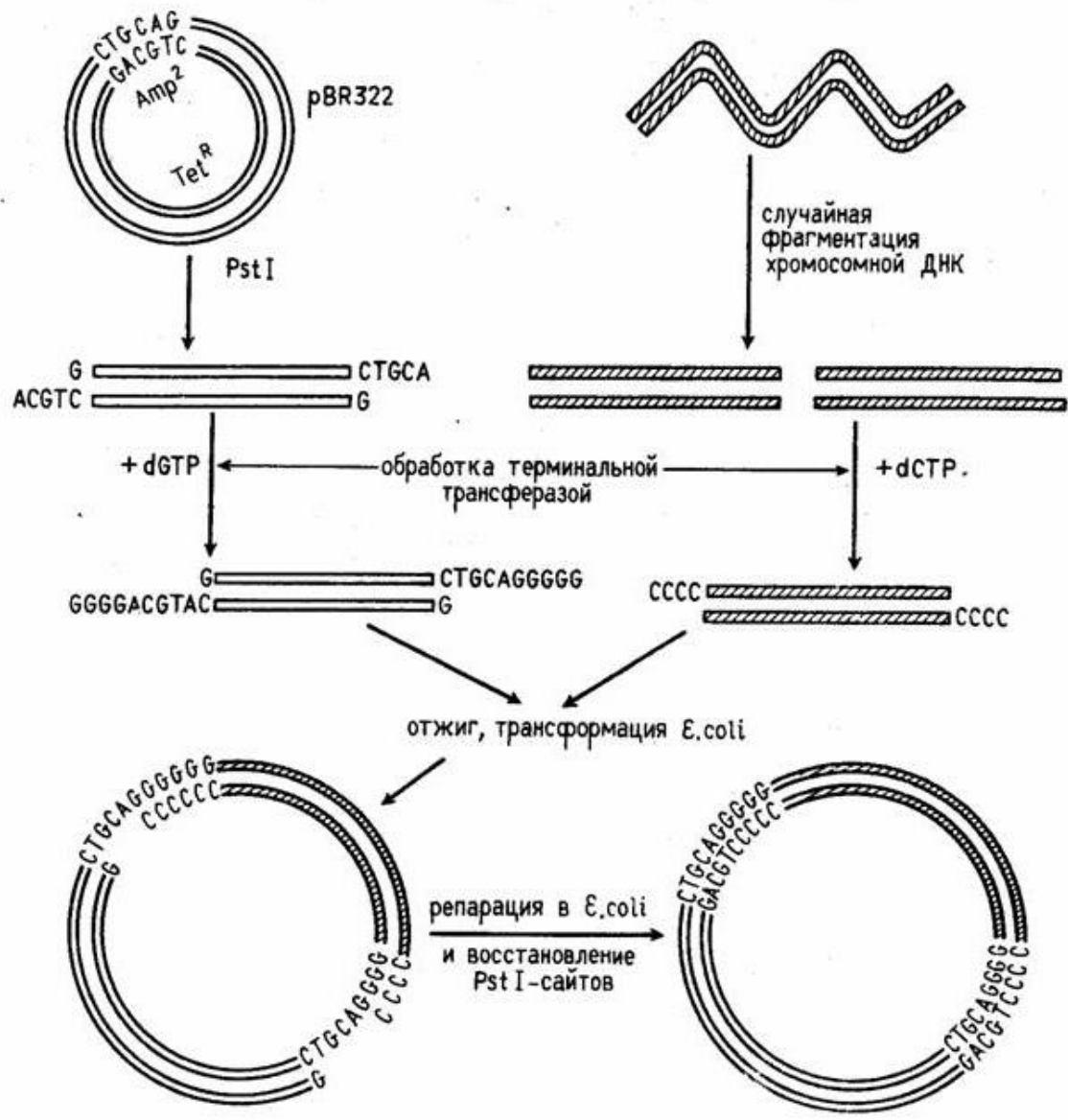
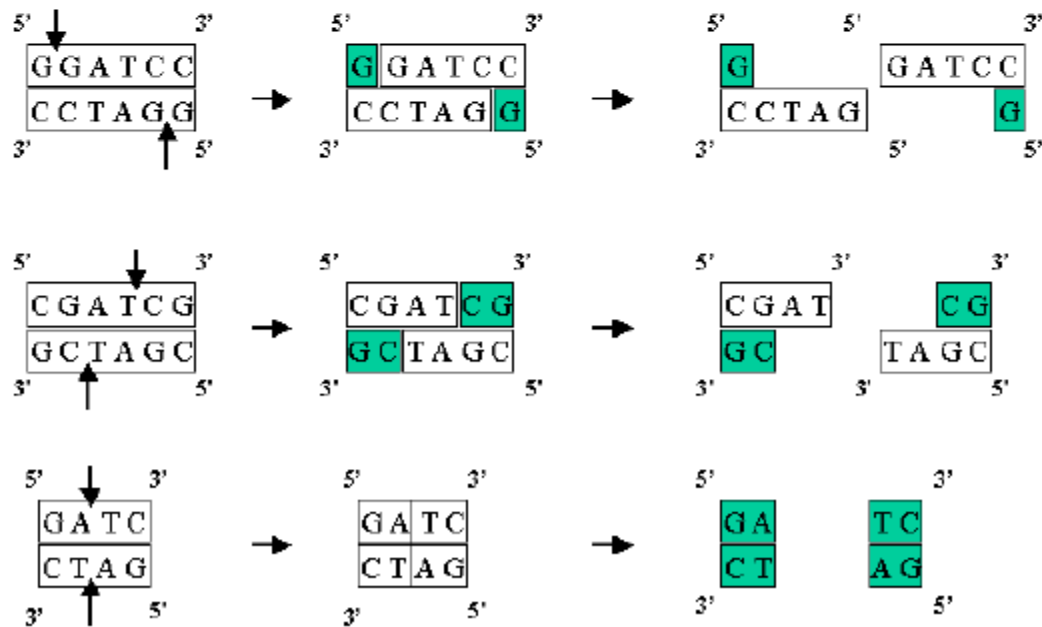


Схема конструирования рекомбинантной ДНК с помощью рестриктаз PstI и поли(G)- поли(C)-линкера

# Сайты рестрикции

- Когда делаете ПЦР своего гена, подбираете праймеры к концам вашего фрагмента так, чтобы на них были сайты узнавания рестриктазы (см. следующие слайды).



рестриктазы  
и реакции,  
которые они  
катализируют

BamHI

PvuII

DpnI



Рис. 26. Центрифужная пробирка с раствором ДНК-белок до и после центрифугирования

