

**Практическая работа №2
Синтез кДНК на матрице
суммарной РНК (обратная
транскрипция).**

**ПЦР. Параметры реакции. Taq-
полимераза. Праймеры. Real-time
ПЦР. Анализ нуклеотидной
последовательности
(OligoCalc, NCBI BLAST)**

Синтез кДНК на матрице суммарной РНК.

Метод template switching cDNA synthesis

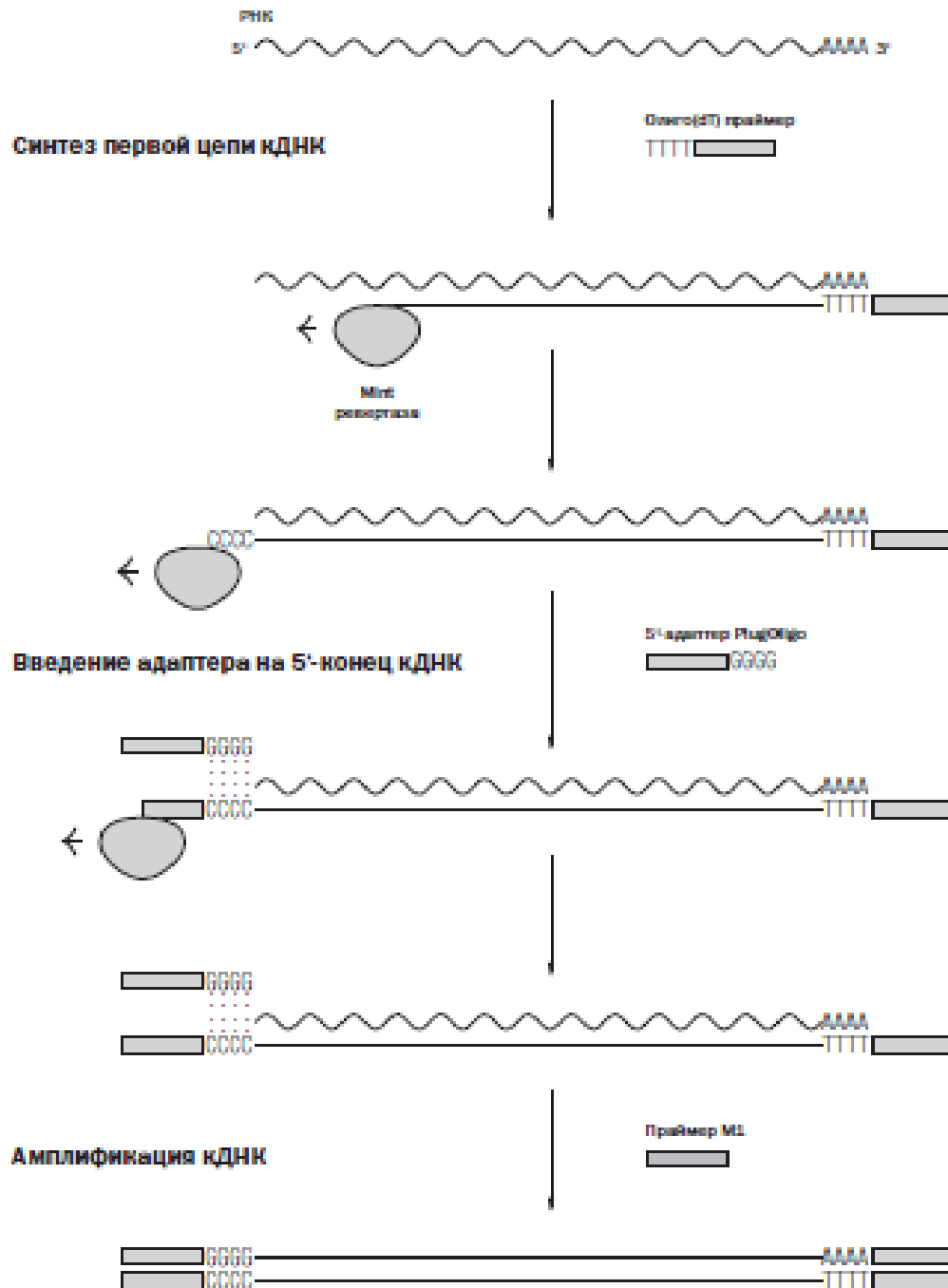
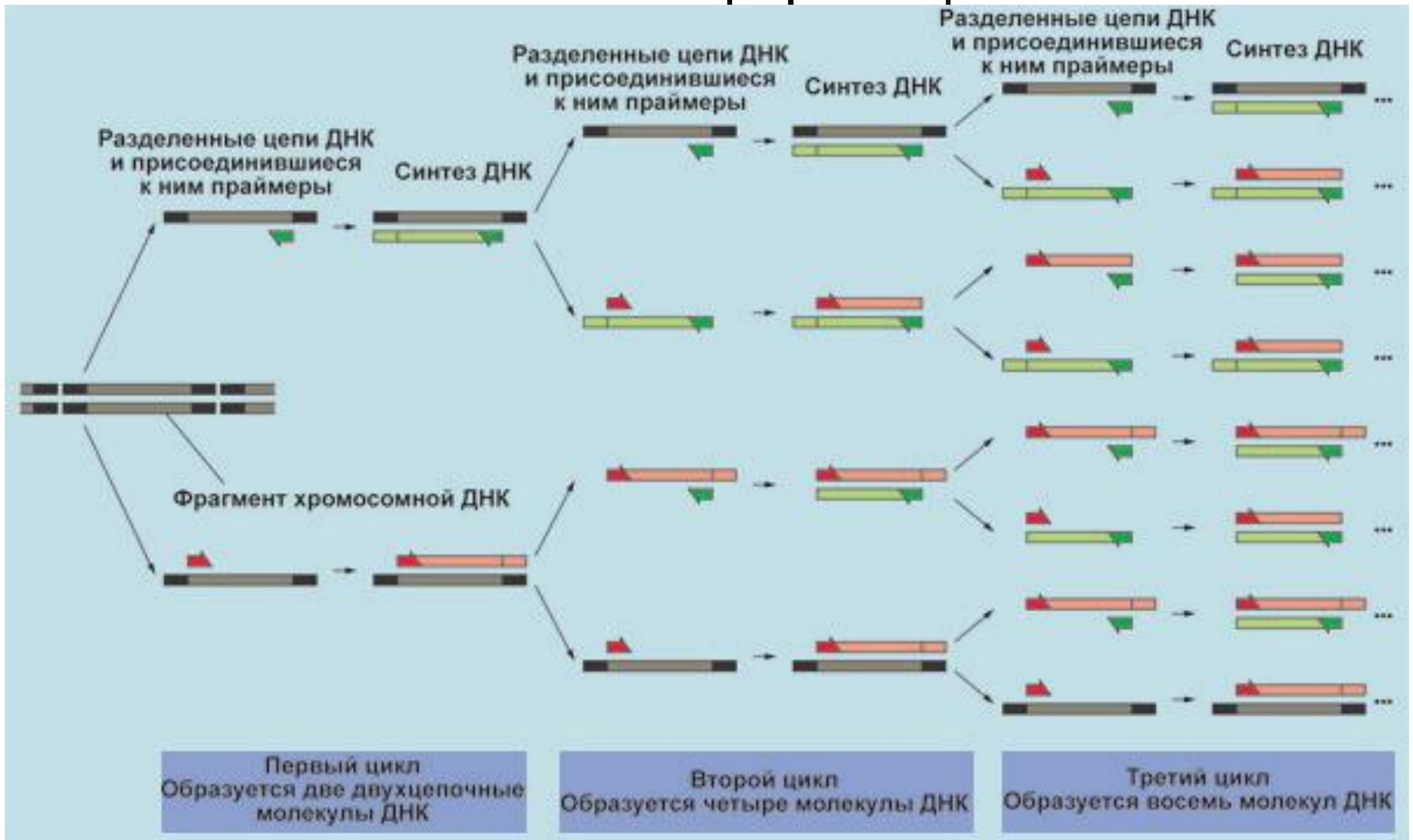


Схема ПЦР реакции



$$N = N_0 \times 2^k, \text{ где}$$

N_0 – исходное число цепей ДНК в реакции;

k - количество циклов ПЦР.

$$T_m = 77.1 + 11.7 \lg[K^+] + \frac{41(G + C) - 528}{L} - 0.75[\%DMSO]$$

где L — длина праймера (количество нуклеотидов);

K^+ — молярная концентрация ионов калия;

$G+C$ — сумма всех гуаниновых и цитозиновых оснований в праймере

Количество продукта ПЦР можно рассчитать по формуле:

$$N = N_0 \times 2^k,$$

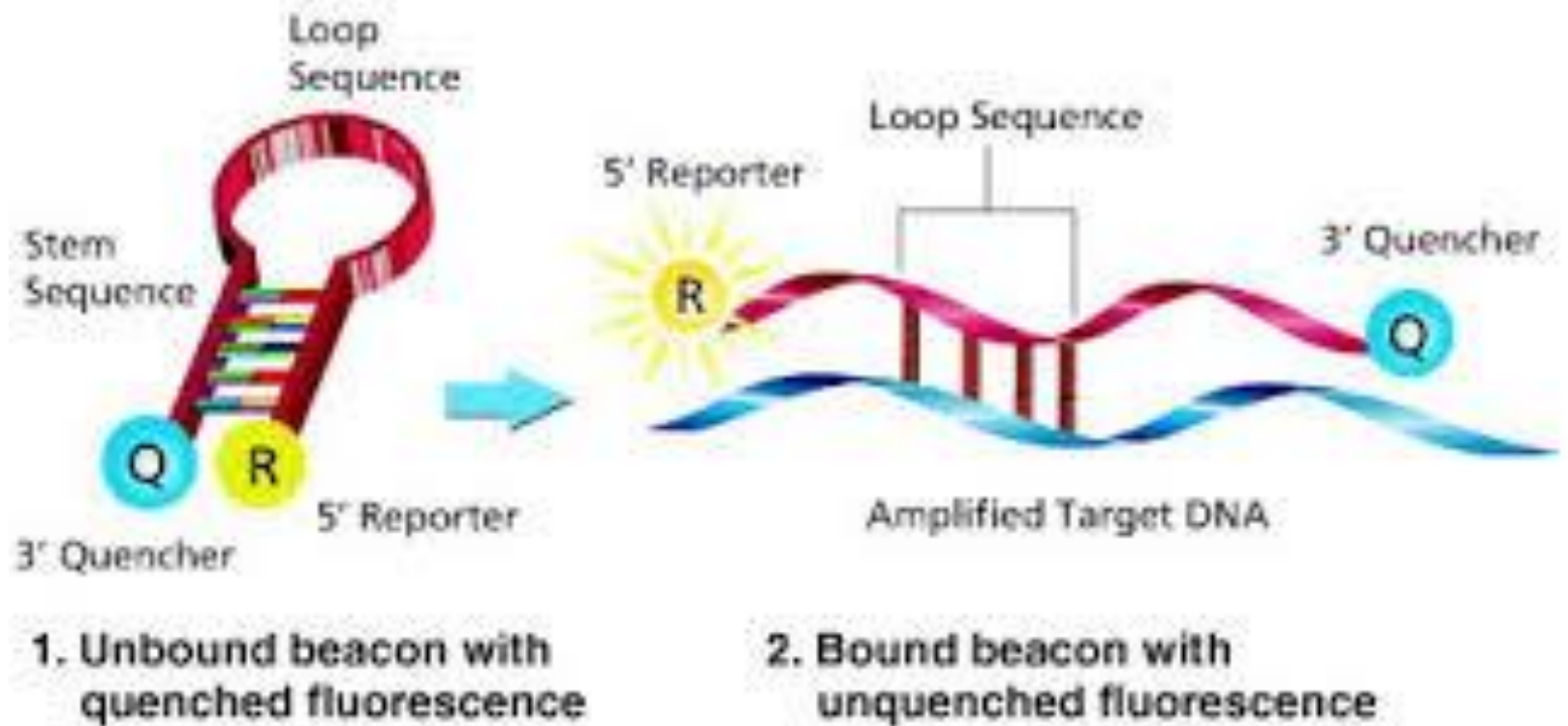
где N_0 – начальное число цепей ДНК в реакции;

k - количество циклов ПЦР.

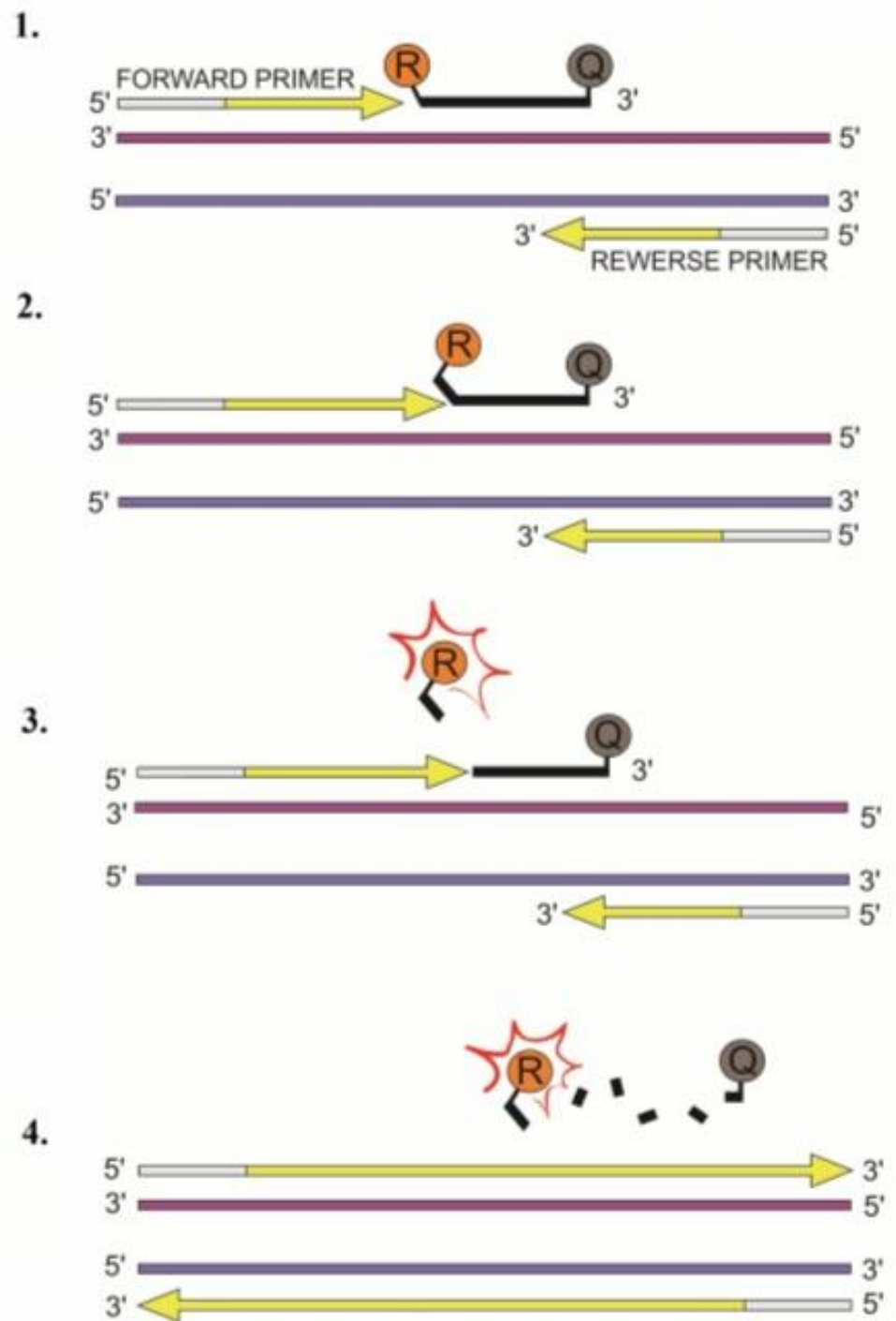
Но эффективность может быть менее 100%!

Флуоресцентное детектирование -

1. Интеркалятор дцДНК
2. Molecular beacon

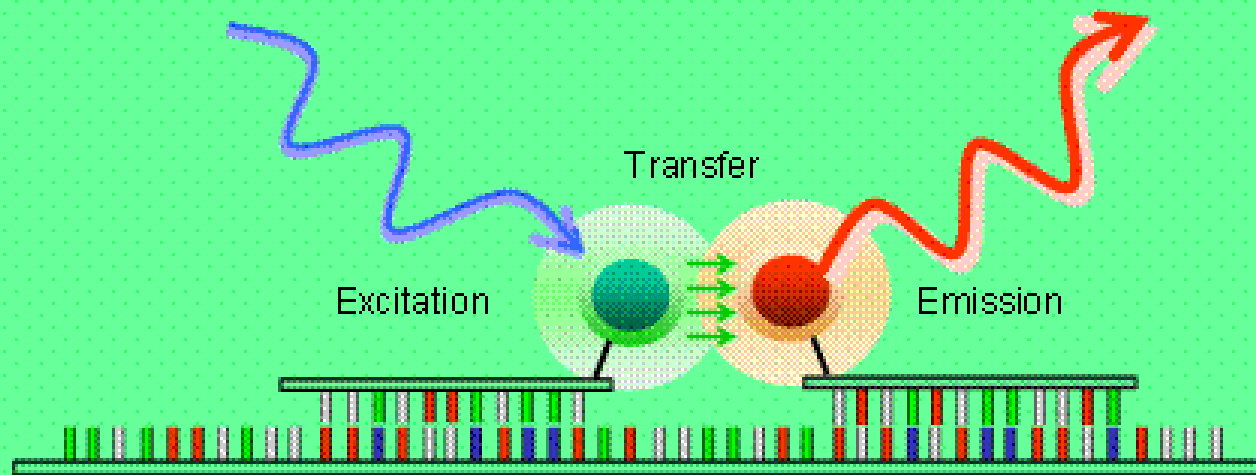


3. Taqman

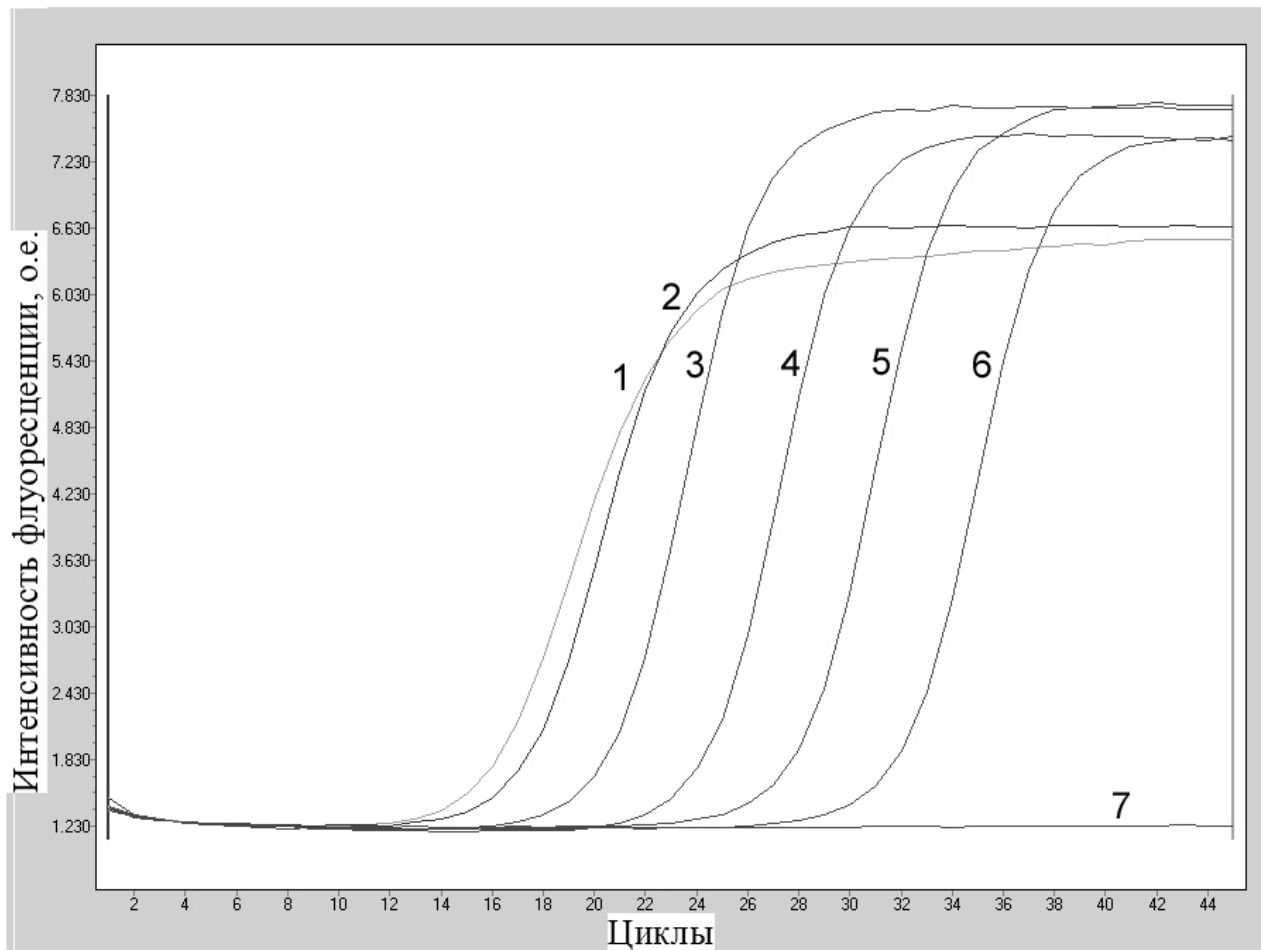


4. FRET-Probe

FRET Probes



Real-time PCR. Анализ формы кинетической кривой



$$N = N_0 \cdot (1+E)^K$$

Где, N – концентрация амплифицированного продукта в каждом цикле ПЦР;

N_0 – исходная концентрация матрицы;
E – эффективность системы;

K – номер цикла.

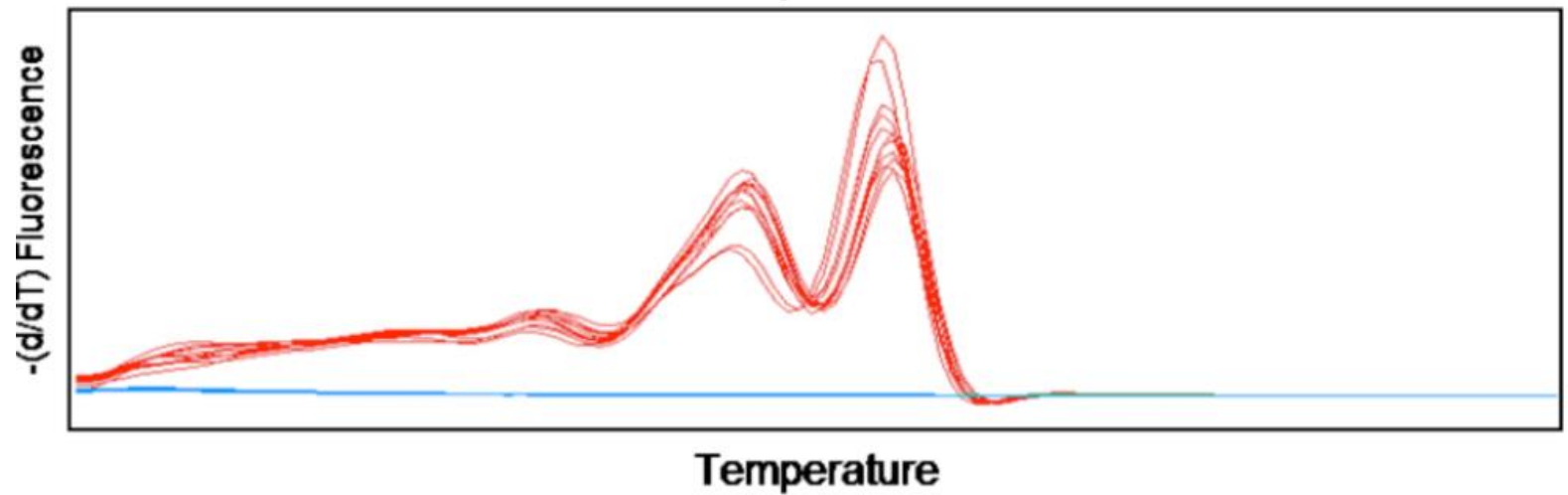
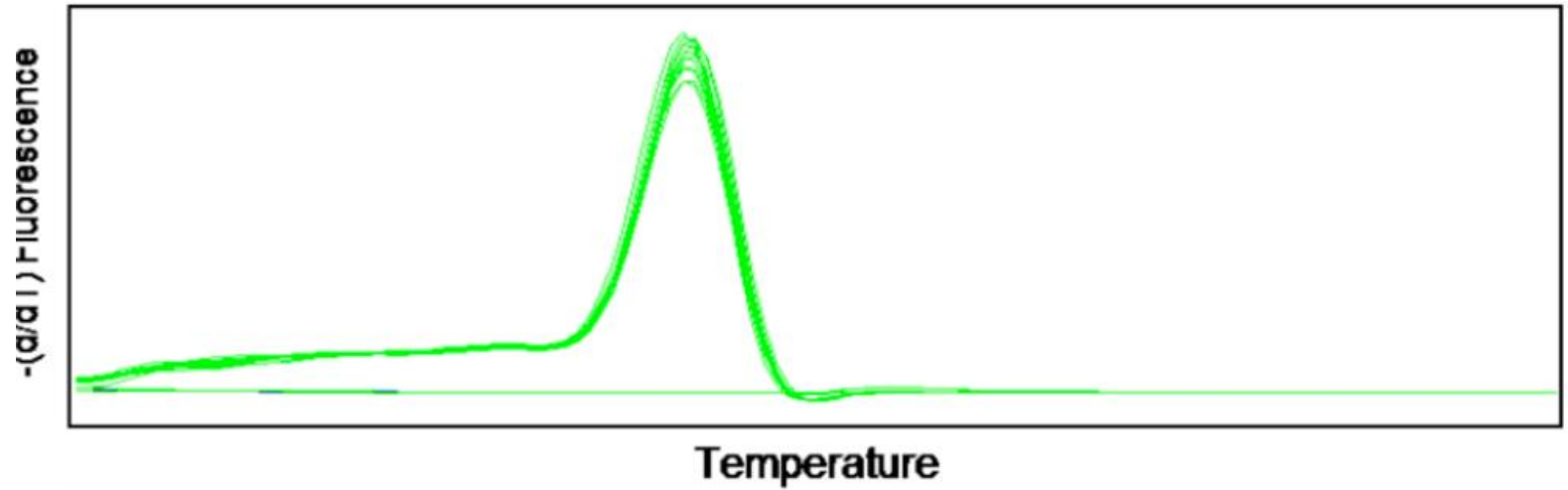
Кинетические кривые амплификации (Roche)

1, 2 – исследуемые образцы

3-6 последовательные разведения контрольной кДНК 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000,

7 – отрицательный контроль

Анализ кривой плавления (Melting curve)



Достоверность околичествления

$$C(T) = - (1/\log E) * \log P_0 + \log PC(T)/\log E$$

результаты real-time PCR с данной парой праймеров (зондом) и серийными разведениями субстрата должны ложиться на прямую в координатах $C(T) - \log P_0$

$$C(T) \text{ 20-30 , } R^2 (\text{min}) > 0.975$$

Определение эффективности амплификации

$$E = 10^{-1/k},$$

где k берется из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \log P_0 + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных.

При $E = 2$ (максимально теоретически возможном значении) $k \sim -3.32$.

Значения $k < -3.32$ соответствуют более низкой эффективности реакции.

1.7 - 1.8 (k не меньше -4 — -4.2)

$k > -3.32$, что соответствует теоретически невозможной ситуации $E > 2$. ($-3.32 < k < -2.8$) - может быть отнесено на счет погрешности измерений.

Самостоятельная работа

- <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=

Пользуясь онлайн-сервисами (ссылки приведены на слайде) для пары праймеров определить

- $T_m(F)$ – температуру плавления для прямого праймера
- $T_m(R)$ – температуру плавления для обратного праймера
- Host: организм
- Gene: ген
- L(bp): длину амплифицируемого фрагмента ДНК