



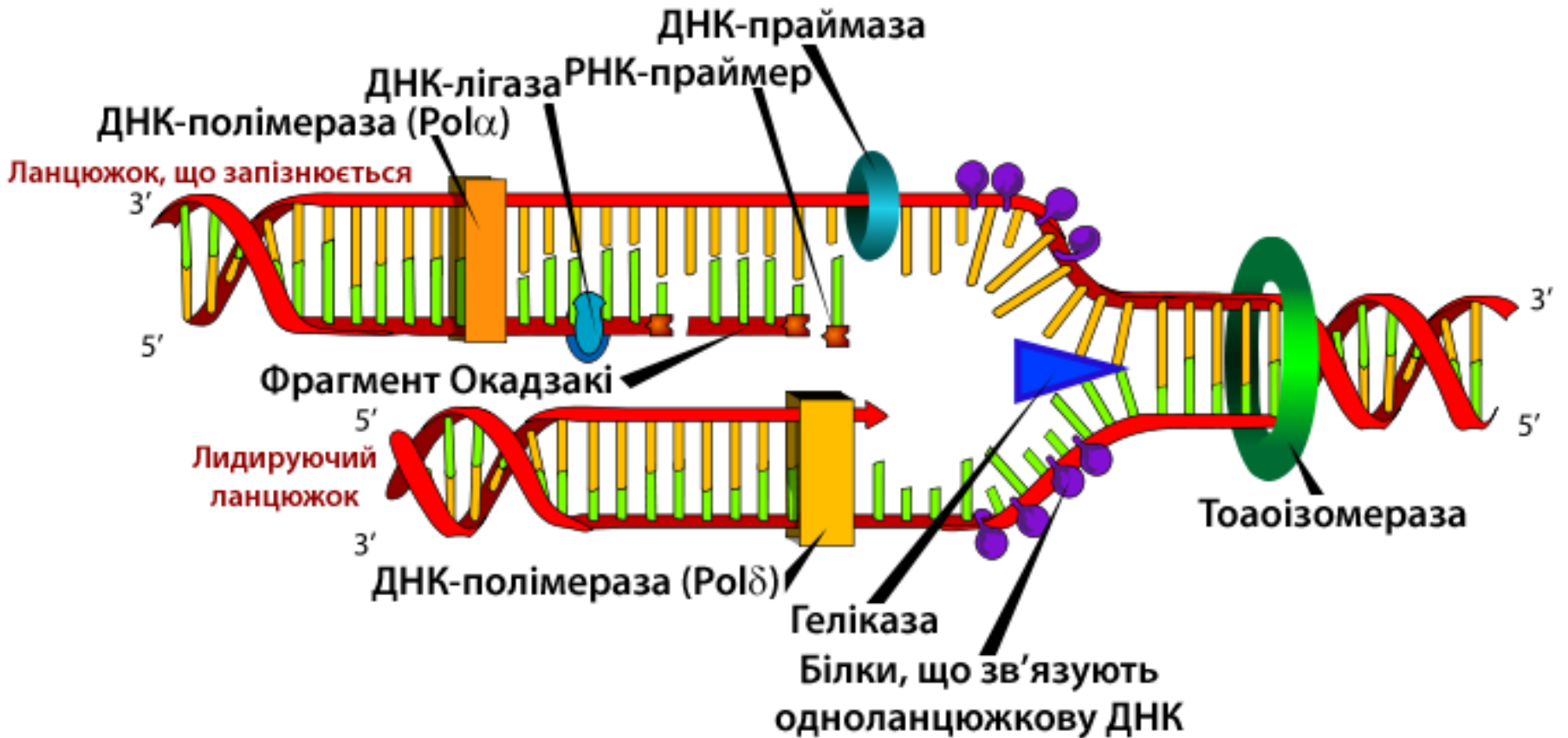
**World Health
Organization**

Ukraine

Полімеразна ланцюгова реакція

Лора Чернишова,
Офіцер з лабораторій
Бюро ВОЗ в Україні,
chernyshoval@who.int
+38-063-639-56-65

Механізм реплікації ДНК в клітині

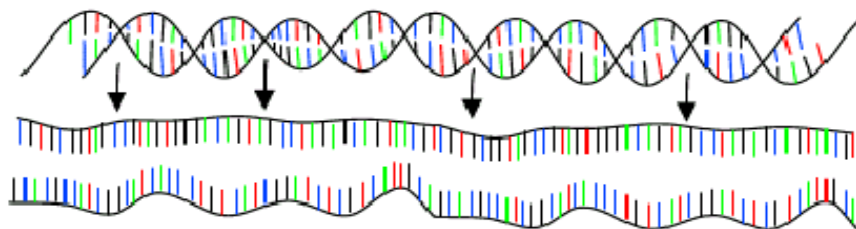


Реплікація ДНК у клітині – прообраз полімеразної ланцюгової реакції.

Полімеразна ланцюгова реакція досить точно повторює принципи реплікації ДНК в клітині. ПЛР являє собою триступеневий процес (цикл), який повторюється задану кількість разів

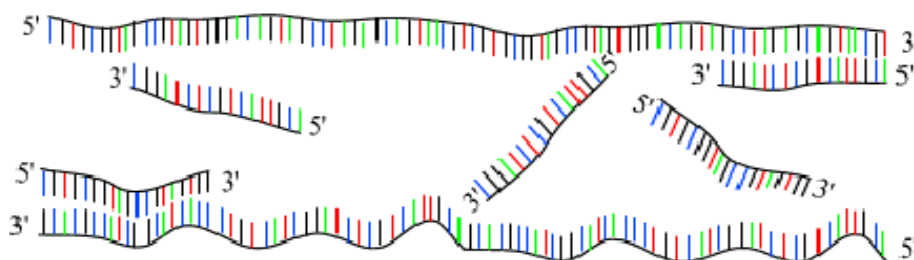
Кроки ПЛР

Денатурація
ДНК
(95°C)



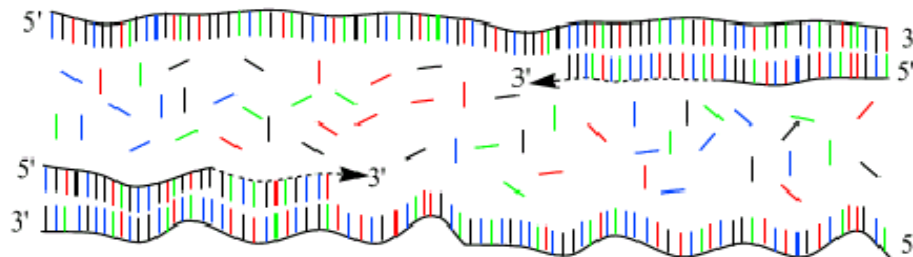
95°C

Відпалення
праймерів
(55-65°C)



60°C

Елонгація
ланцюгів ДНК
(72°C)



72°C

Відео 1

[Знайшла тут](#)

Питання 1

Виходячи з усіх наших знань про ПЛР, як ви вважаєте який характер збільшення кількості ампліфікованих фрагментів?

- Лінійний
- Логарифмічний
- Експонентний

Питання 2

Припустимо, що спочатку в розчині є 5 молекул (дволанцюгових) ДНК-матриці для ПЛР. Розрахуйте, скільки в розчині буде молекул ДНК заданого розміру, обмежених праймерами, після 10 циклів. Для цього можна скористатися формулою:

$$N = k * (2^n) - n * k - k ,$$

де **N** – кінцева кількість молекул заданого розміру

k – кількість одноланцюгових молекул ДНК-матриці

n – число циклів ПЛР

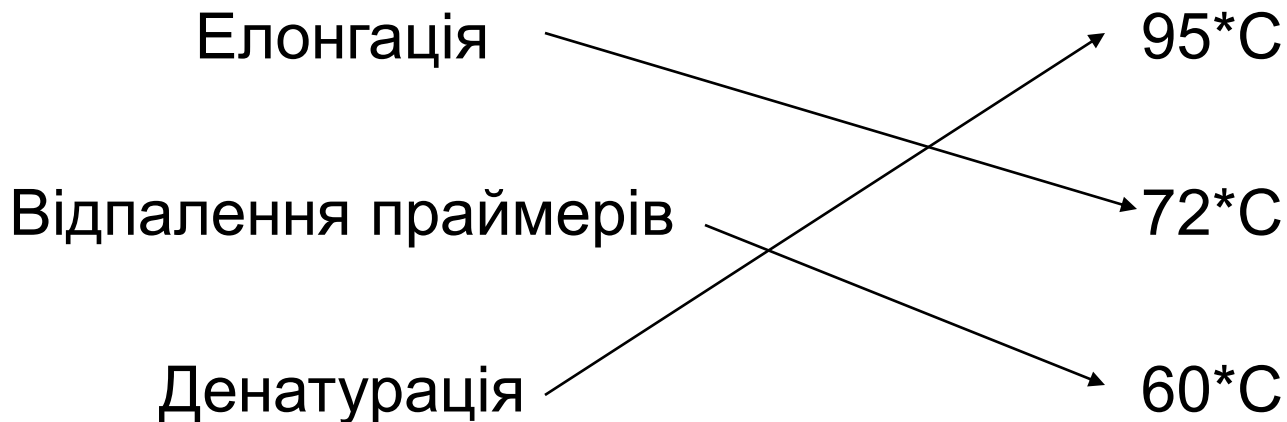
(Відповідь: 10130)

Питання 3

Співвіднесіть етап полімеразної ланцюгової реакції та температуру, при якій він відбувається.

* Температура відпалення праймерів залежить від праймерів, тому число в одному з варіантів відповіді умовне

** Вважайте, що використовується Taq-полімераза



Питання 4

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів виберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

- Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)
- ДНК-матриця для ПЛР
- Протеїназа K
- ДНКаза
- X-gal
- Амінокислоти
- Реакційний буфер
- F-праймер
- Полімераза
- R-праймер
- Топоізомераза
- РНКаза А

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність спарювання з іншими праймерами
9. Відсутність гомополімерів
10. Концентрація

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність) – праймер повинен повністю відповідати таргетній послідовності, яку він фланкує

Як підібрати праймер?

1. Заходимо до бази даних

- *BLAST*
- *HIV LANL* (ВІЛ)
- *EMBL* (Європа)
- *DDBJ* (Японія)
- *GenBank* (США)
- *SWISS-PROT*
- *PIR* та ін.

2. Знаходимо консервативний фрагмент

3. Підбираємо праймер (наприклад, за допомогою *BioEdit*). Вуаля!

Питання 5

Підберіть праймери довжиною 20 нуклеотидів до зазначеної послідовності і запишіть їх через пробіл.

**5'-CCCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAGTACTCCCC
TGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTG
ATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCACGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGC
ACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGT
GAGCAGCTGGGGCTGGAGAGACGACAGGGCTGGTTGCCAGGGTCCCCAGGCCTCTG
ATTCCTCACTGATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAA
ATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCT
ATGAGCCGCCTGAGGTCTGGTTTGCAACTGGGGT-3'**

Результат має виглядати приблизно так:

ATCGATCGATCGATCGATCG ACGTACGTACGTACGTACGT

- * Пам'ятайте, що нуклеотидні послідовності записуються від 5' до 3' кінця
- ** Послідовність має бути ампліфікована цілком, тому праймери треба підбирати до кінців представленого фрагмента ДНК

А якщо ми помилились? Домашнє завдання №1



The Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV Test, Version 2.0, Real-Time PCR Assay Accurately Quantifies Hepatitis C Virus Genotype 4 RNA

Stéphane Chevaliez,^{a,b} Magali Bouvier-Alias,^{a,b} Christophe Rodriguez,^{a,b} Alexandre Soulier,^{a,b} Jean-Dominique Poveda,^c Jean-Michel Pawlotsky^{a,b}

National Reference Center for Viral Hepatitis B, C, and Delta, Department of Virology, Hôpital Henri Mondor, Université Paris-Est, Créteil, France^a; INSERM U955, Créteil, France^b; Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise, France^c

Accurate hepatitis C virus (HCV) RNA quantification is mandatory for the management of chronic hepatitis C therapy. The first-generation Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test (CAP/CTM HCV) underestimated HCV RNA levels by $> 1\text{-log}_{10}$ international units/ml in a number of patients infected with HCV genotype 4 and occasionally failed to detect it. The aim of this study was to evaluate the ability of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HCV test, version 2.0 (CAP/CTM HCV v2.0), to accurately quantify HCV RNA in a large series of patients infected with different subtypes of HCV genotype 4. Group A comprised 122 patients with chronic HCV genotype 4 infection, and group B comprised 4 patients with HCV genotype 4 in whom HCV RNA was undetectable using the CAP/CTM HCV. Each specimen was tested with the third-generation branched DNA (bDNA) assay, CAP/CTM HCV, and CAP/CTM HCV v2.0. The HCV RNA level was lower in CAP/CTM HCV than in bDNA in 76.2% of cases, regardless of the HCV genotype 4 subtype. In contrast, the correlation between bDNA and CAP/CTM HCV v2.0 values was excellent. CAP/CTM HCV v2.0 accurately quantified HCV RNA levels in the presence of an A-to-T substitution at position 165 alone or combined with a G-to-A substitution at position 145 of the 5' untranslated region of HCV genome. In conclusion, CAP/CTM HCV v2.0 accurately quantifies HCV RNA in genotype 4 clinical specimens, regardless of the subtype, and can be confidently used in clinical trials and clinical practice with this genotype.

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С

Температура плавлення (T_m) – температура, при якій 50% праймерів у розчині будуть у двонитковому стані (тобто, відпалилися на матричний ланцюг ДНК), а 50% праймерів – в одонитковому стані.

T_m залежить від GC-складу праймера

$$t \text{ плавлення} = (G+C)*4 + (A+T)*2$$

Питання 6

Розрахуйте температуру плавлення даного праймера за формулою

$$t \text{ плавлення} = (G+C)*4 + (A+T)*2$$

5'-АСТАТСАТГСТАГСАТГСТТТСГ-3'

*(Відповідь: 66*С)*

Домашнє завдання №2

Є й інші методи розрахувати температуру плавлення праймера. На цей раз скористаємося однією з найвідоміших програм для підбору праймерів - Primer3plus).

Розрахуйте з її допомогою температуру плавлення праймера

5' АСТАТСАТГСТАГСАТГСТТТСГ 3'

Для цього в випадаючому меню Task необхідно вибрати *Primer_check*, в рядок (*Primer to test*) вставити послідовність нашого праймера та натиснути на зелену кнопку *Check Primer*. Серед інших параметрів праймера знайдіть *Tm* і це буде відповіддю на дане завдання

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

Task Primer_Check ▾ *Evaluate a primer of known sequence with the given settings.* Check Primer Reset Form

Main Settings **Advanced Settings** Internal Oligo Penalty Weights Sequence Quality

Sequence Primer_Check

Primer to test:
ACTATCATGCTAGCATGCTTTTCG



Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

Left primer is unacceptable: High self complementarity/High end self complementarity

< Back

Oligo: Primer

Sequence: ACTATCATGCTAGCATGCTTTTCG

Length: 23 bp
Tm: 60.8 °C
GC: 43.5 %
ANY: 12.0
SELF: 6.0
3' Stability: 9.0 ΔG

Send to Primer3Manager Reset Form

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60% (або GC: AT = 1:1)

(G+C) \ загальна кількість нуклеотидів

Питання №8

Розрахуйте GC-склад праймера та запишіть відповідь у відсотках.

5' АСТGGAAАСТАGСТАGСТАС 3'

Домашнє завдання №3

Маючи послідовності праймерів та матричної ДНК, можна передбачити, які фрагменти у нас вийдуть. Для цього скористаємося ресурсом

UCSC Genome Bioinformatics site -> tools -> in silico PCR

Використовуючи представлену пару праймерів, визначте розмір ПЛР-фрагменту:

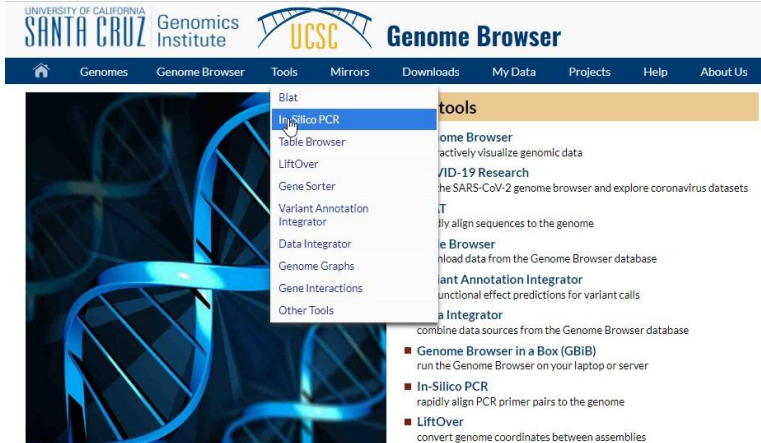
F_primer: СТТСССАГГАСГГТГАСА

R_primer: СТСССААСАТТГСАТТССТА

У випадяючому меню *Genome* виберіть *Cat* і в меню *Assembly* останню збірку геному (за листопад 2017). У рядки *Forward primer* та *Reverse primer* вставте послідовності F- та R-праймера відповідно. Інші параметри залиште за замовчуванням.

Наведіть розмір отриманого фрагмента в парах нуклеотидів (наприклад: 150)

Домашнє завдання №3



UNIVERSITY OF CALIFORNIA SANTA CRUZ Genomics Institute UCSC Genome Browser

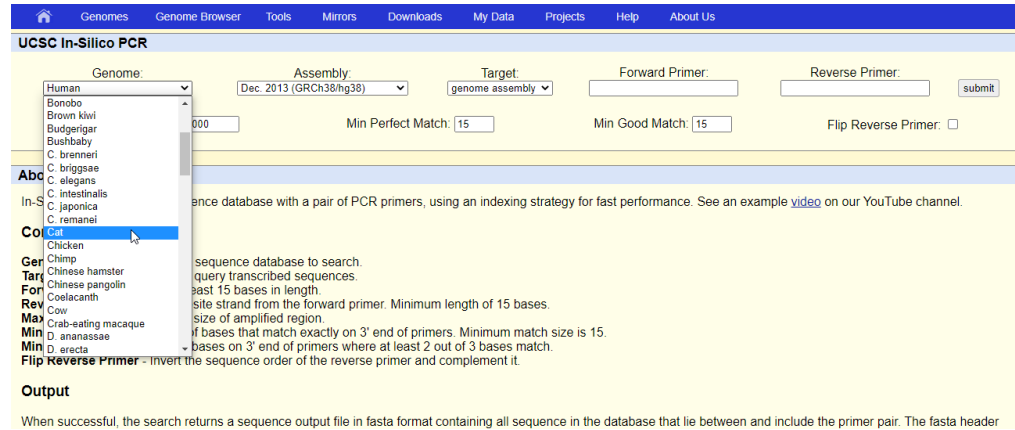
Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

Tools

- Blat
- In-Silico PCR**
- Table Browser
- LiftOver
- Gene Sorter
- Variant Annotation Integrator
- Data Integrator
- Genome Graphs
- Gene Interactions
- Other Tools

tools

- Genome Browser actively visualize genomic data
- VID-19 Research the SARS-CoV-2 genome browser and explore coronavirus datasets
- IT
- ly align sequences to the genome
- Genome Browser
- load data from the Genome Browser database
- Variant Annotation Integrator functional effect predictions for variant calls
- Integrator
- combine data sources from the Genome Browser database
- Genome Browser in a Box (GBIB) run the Genome Browser on your laptop or server
- In-Silico PCR rapidly align PCR primer pairs to the genome
- LiftOver convert genome coordinates between assemblies



UCSC In-Silico PCR

Genome: **Human** Assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Target: genome assembly Forward Primer: Reverse Primer: submit

000 Min Perfect Match: 15 Min Good Match: 15 Flip Reverse Primer:

Abc

Cat

Chicken

Chimp

Chinese hamster

Chinese pangolin

Coelacanth

Cow

Crab-eating macaque

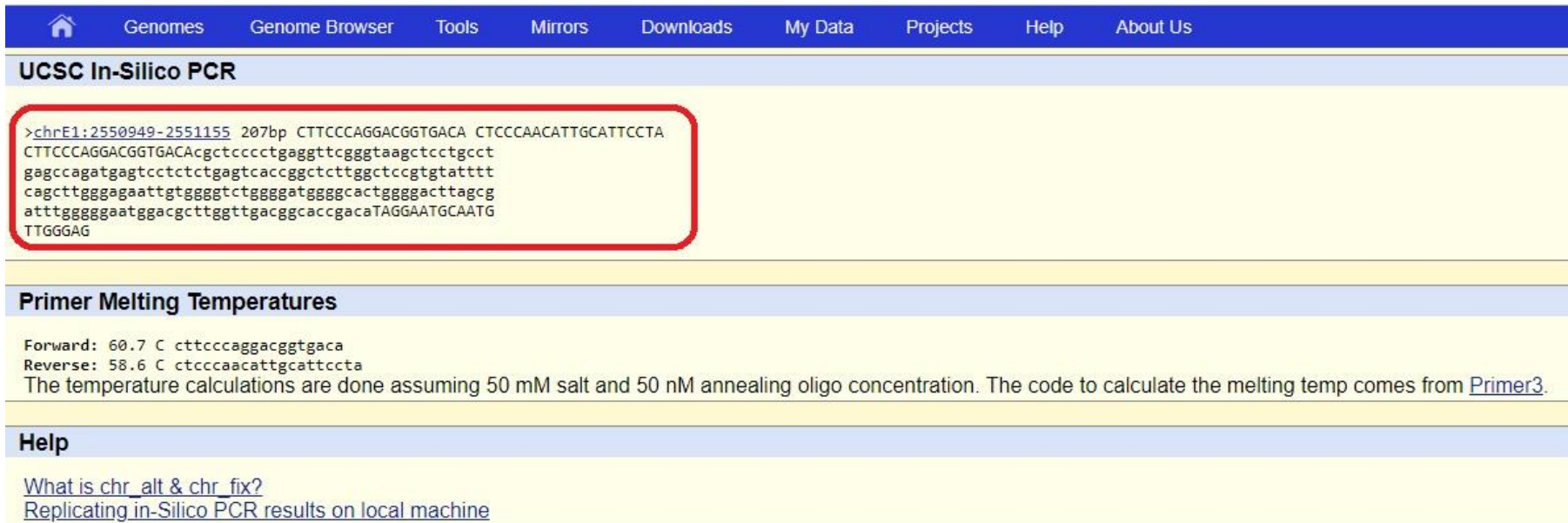
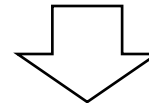
D. ananassae

D. arctica

Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.

Output

When successful, the search returns a sequence output file in fasta format containing all sequence in the database that lie between and include the primer pair. The fasta header



Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

UCSC In-Silico PCR

```
>chrE1:2550949-2551155 207bp CTTCCACAGGACGGTGACA CTCCAACATTGCATTCTCA  
CTTCCACAGGACGGTGACA cgtcccctgaggttcgggtaagctcctgcct  
gagccagatgagtcctcctgagtcaccggctcttggtcctcggtatattt  
cagcttgggagaattgtggggtctggggatggggcactggggacttagcg  
atttgggggaatggagccttggtgacggcaccgacaTAGGAATGCAATG  
TTGGGAG
```

Primer Melting Temperatures

Forward: 60.7 C cttcccaggacggtgaca
Reverse: 58.6 C ctccaacattgcattctca
The temperature calculations are done assuming 50 mM salt and 50 nM annealing oligo concentration. The code to calculate the melting temp comes from [Primer3](#).

Help

[What is chr_alt & chr_fix?](#)
[Replicating in-Silico PCR results on local machine](#)

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці (3'-clamp)

Питання №9

Forward:

20 нуклеотидів

G\C склад — 50%

Tm - 60°C

Revers:

20 нуклеотидів

G\C склад — 25%

Tm - 40°C

Що можна зробити?

1. Подовжити реверс-праймер
2. Перенести місце відпалення реверс-праймера в більш G\C-багату ділянку геному

Дизайн праймерів


1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок

Шпилька - вторинна структура ДНК\РНК, що виникає за рахунок комплементарної взаємодії в межах одного ланцюга ДНК
Заважає посадці праймера на ДНК-мішень

AC**TTTTT**G**AAAAA**GCAGTAC

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)

F: ACGT**GACTGCTC**

R: AGCAG**GAGCAGTC**

.....3'-GGACCAATCATTA-5
5'-ATTAATAACCAGG-3' _ _ _ _ _

Дизайн праймерів

1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)
9. Відсутність гомополімерів, динуклеотидних повторів

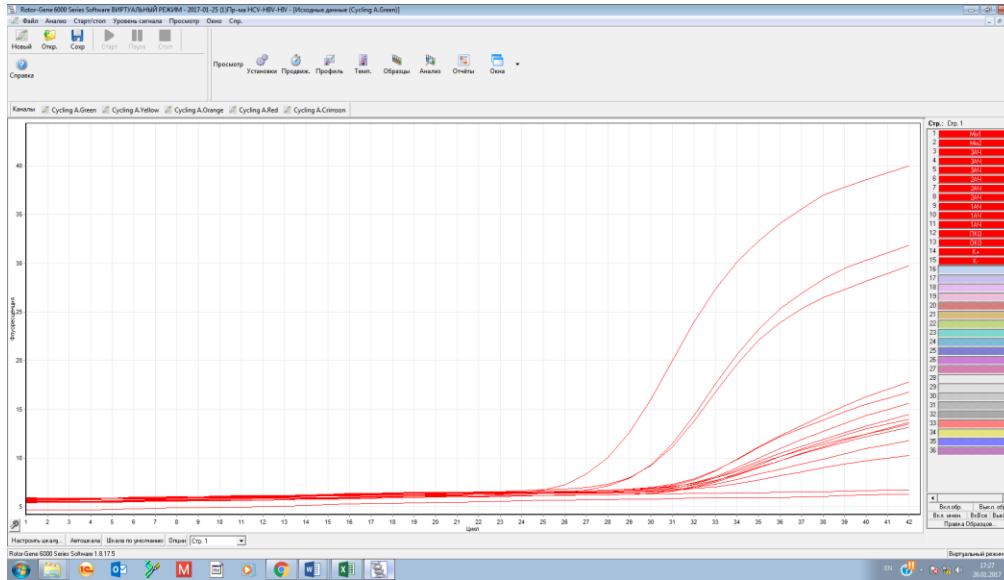
ACTACGTACCCCCCCCAT

ATCAGTATATATATATATC

Дизайн праймерів

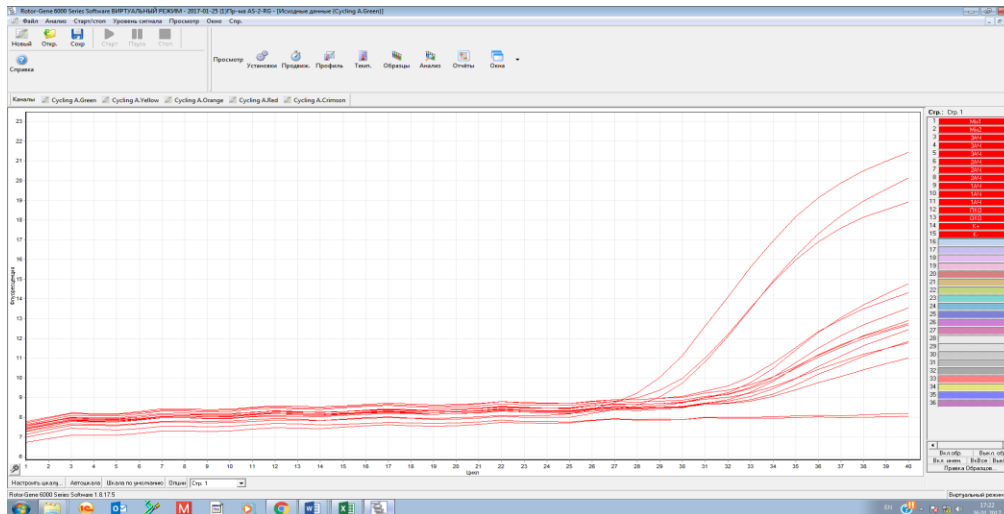
1. Відповідність послідовності (специфічність)
2. Довжина 17-35 нуклеотидів
3. Температура плавлення 55-75*С
4. Різниця у температурі плавлення між праймерами не більше 5*С
5. GC-склад - 40-60%
6. Наявність 1-2 G\C (але не більше 3) на 3'-кінці
7. Відсутність шпильок
8. Відсутність парування з іншими праймерами (праймер-димери)
9. Відсутність гомополімерів, динуклеотидних повторів
10. Концентрація праймерів (зазвичай знаходиться в діапазоні 0,1-1 пМ/мкл). Зависока концентрація –ризик утворення неспецифічних продуктів ампліфікації. Занизька концентрація – зниженн аналітичної чутливості методу

Практичний кейс 1. Адаптація набору реагентів під нову програму ампліфікації



Програма ампліфікації «АмпліСенс HBV / HCV / HIV» для приладів роторного типу

	Температура, °C	Час	Вимірювання флуоресценції	Кількість циклів
1	50	20 хв	–	1
2	95	15 хв	–	1
3	95	20 с	–	4
	46	40 с	–	
4	95	5 с	–	42
	60	40 с	–	
	45	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red, Cy5,5/Crimson	

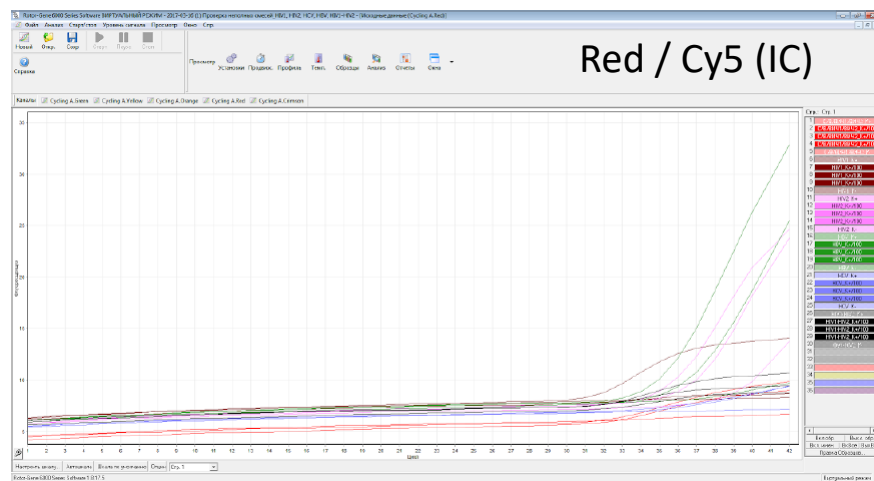
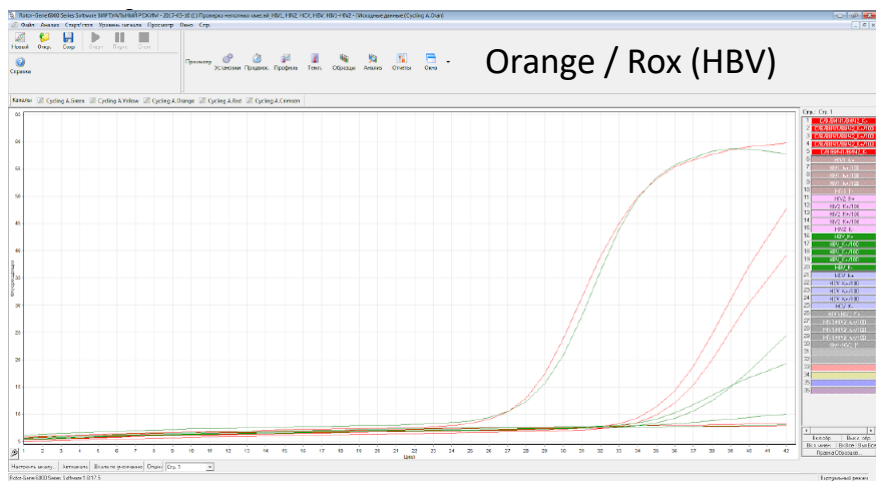
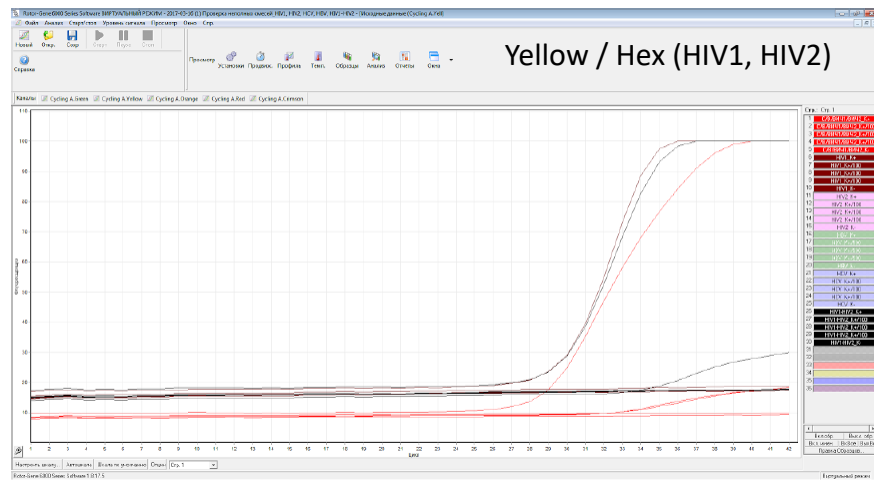
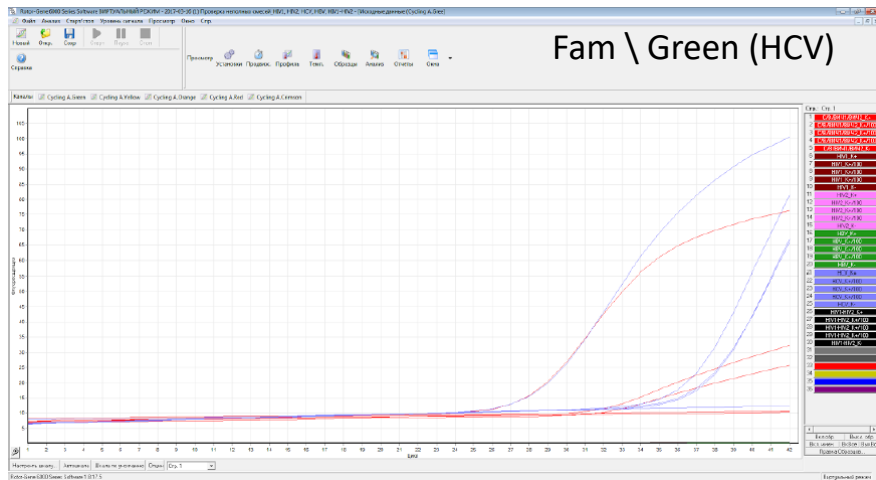


Програма ампліфікації «АмпліСенс-2 RG» для приладів роторного типу

Етап	Температура, °C	Час	Вимірювання флуоресценції	Кількість циклів
Hold/Утримання температури	50	15 хв	–	1
Hold/Утримання температури	95	15 хв	–	1
Cycling/Циклювання	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/Циклювання 2	95	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	–	

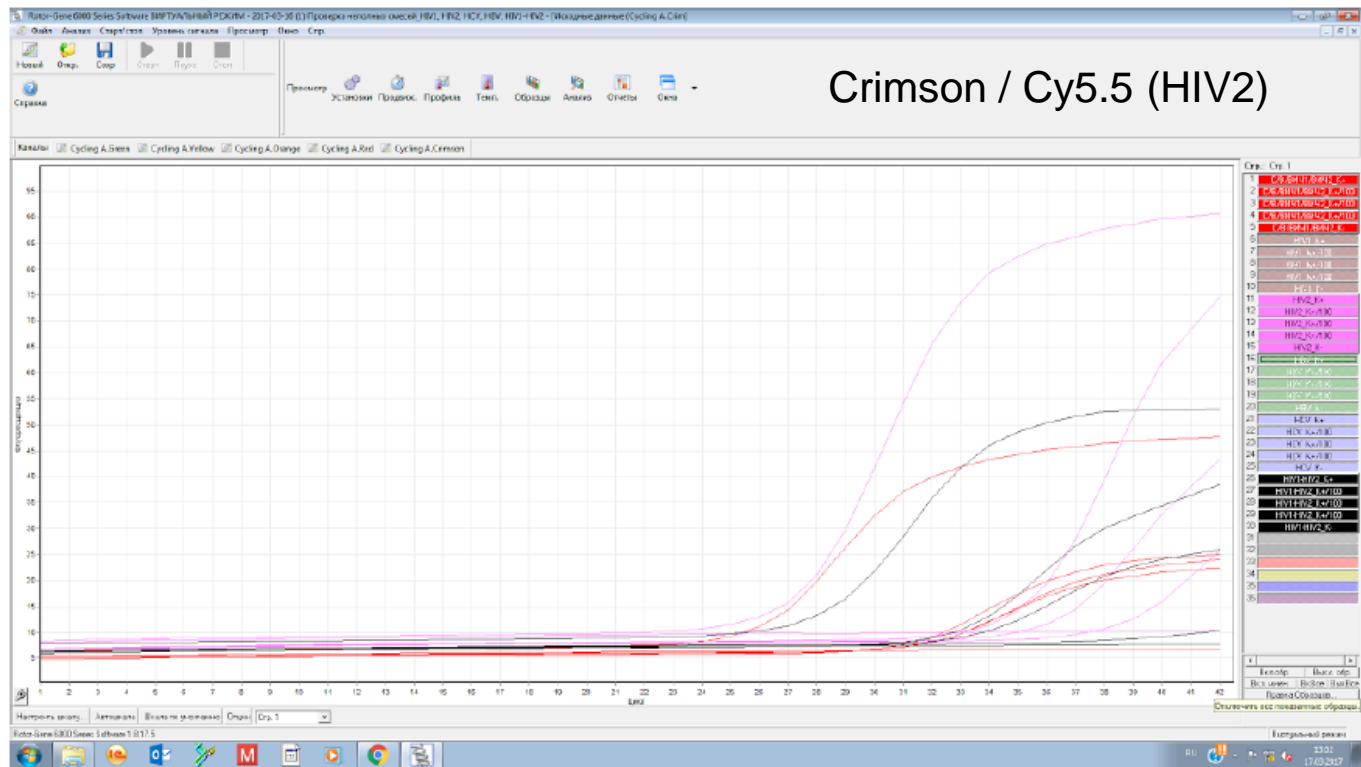
Практичний кейс 2. Тестування «неповних» сумішей

Файл №1 (суміші праймерів до ВІЛ1, ВІЛ2, HBV, HCV, IC)



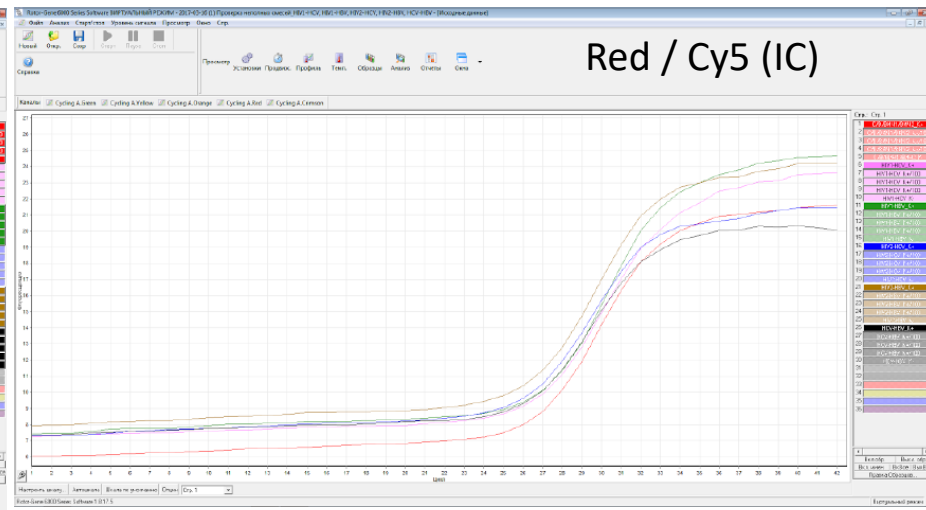
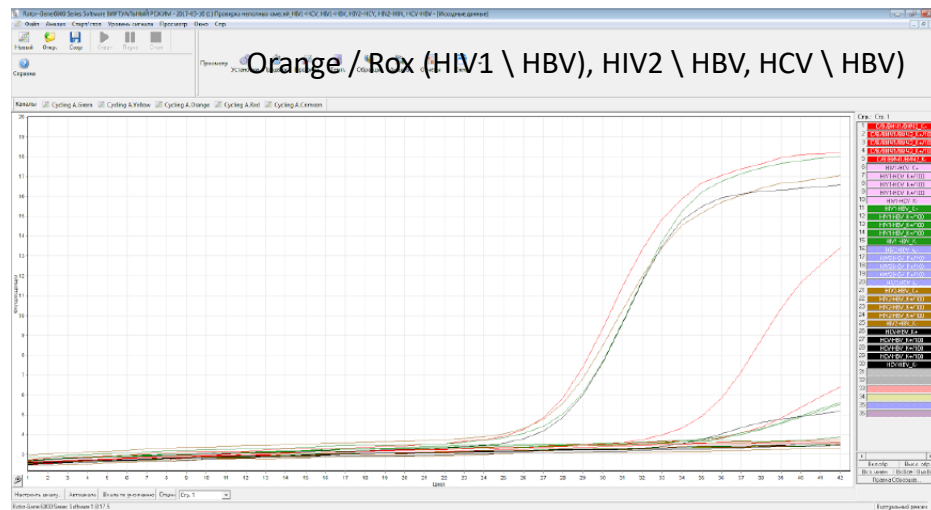
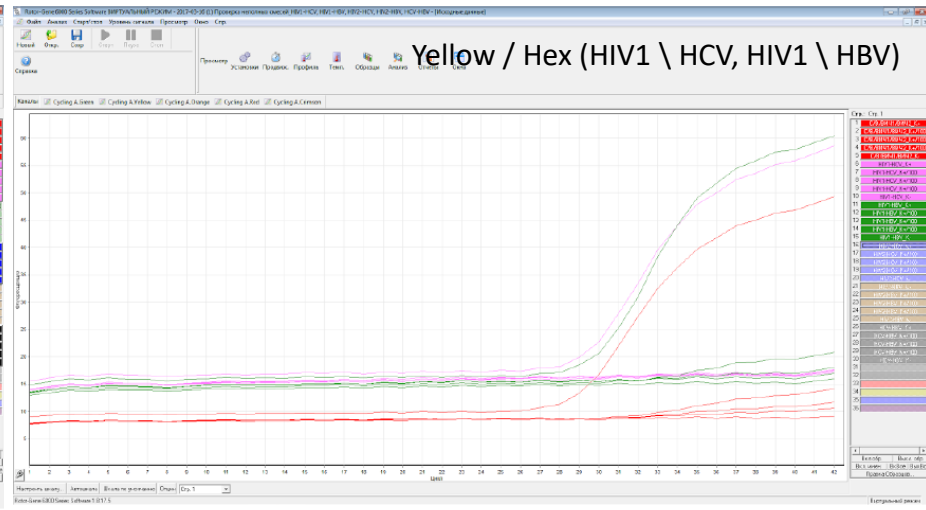
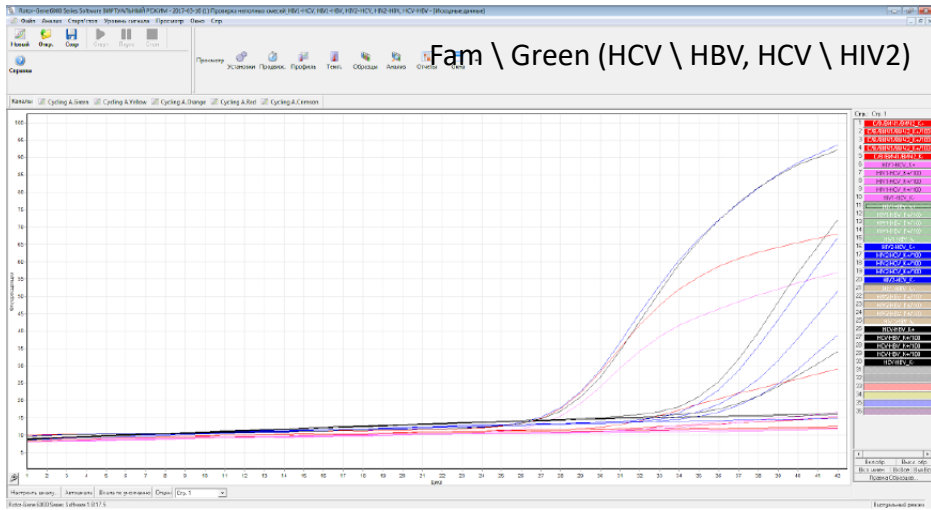
Практичний кейс 2. Тестування «неповних» сумішей

Файл №1 (суміші праймерів до ВІЛ1, ВІЛ2, НВУ, НСУ, ІС)



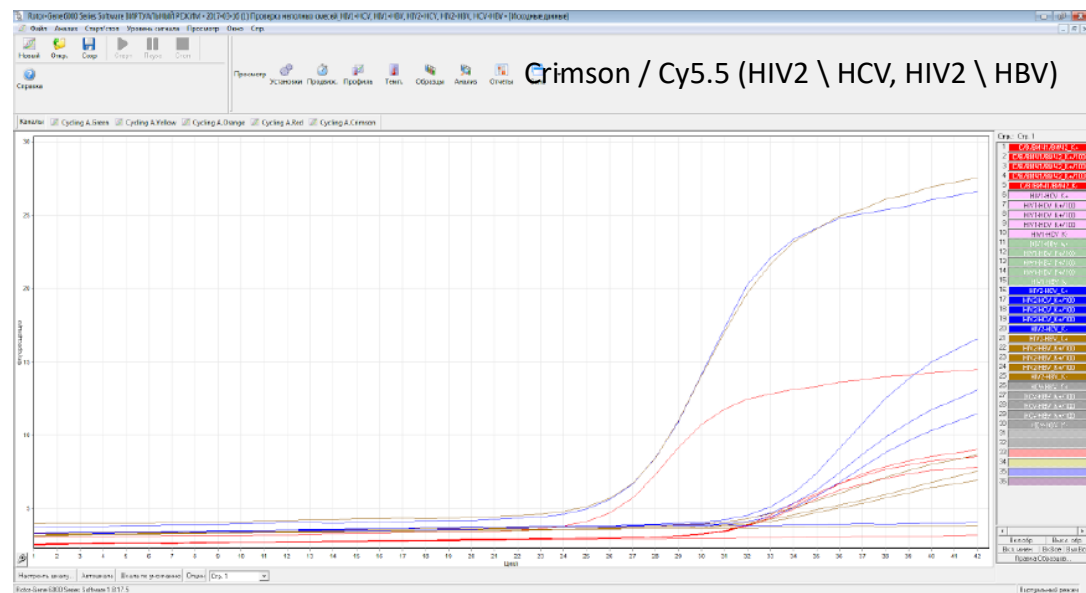
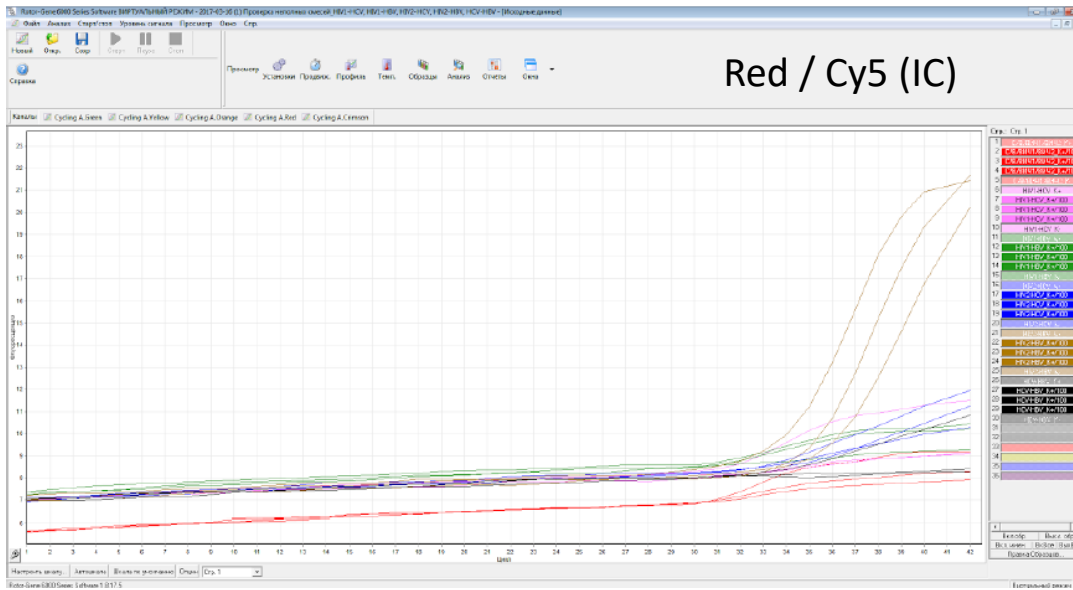
Практичний кейс 2. Тестування «неповних» сумішей

Файл №2 (смеси HIV1 \ HCV, HIV1 \ HBV, HIV2 \ HCV, HIV2 \ HBV, HCV \ HBV)



Практичний кейс 2. Тестування «неповних» сумішей

Файл №2 (смеси HIV1 \ HCV, HIV1 \ HBV, HIV2 \ HCV, HIV2 \ HBV, HCV \ HBV)



Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів оберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)

ДНК-матриця для ПЛР

Реакційний буфер для полімерази

✓ F_праймер

Полімераза

✓ R_праймер

Відео 2

Варіанти «гарячого старту»

1. Розділенн шаром парафіну
2. Інгібування полімерази антитілами
3. Хімічна модифікація полімерази формаліном або іншими інгібіторами (напр., модифікованими олігами)

Запитання:

1. У яких випадках гарячий старт може не спрацювати?
2. Як може виглядати протокол постановки?
3. Як виправити ситуацію? (а краще – запобігти)

Для постановки полімеразної ланцюгової реакції необхідний певний набір реагентів. Серед запропонованих варіантів оберіть лише ті компоненти, які потрібні для постановки реакції.

Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (ДНТФ)

ДНК-матриця для ПЛР

Реакційний буфер для полімерази (іони Mg^{2+})

✓ F_праймер

✓ Полімераза

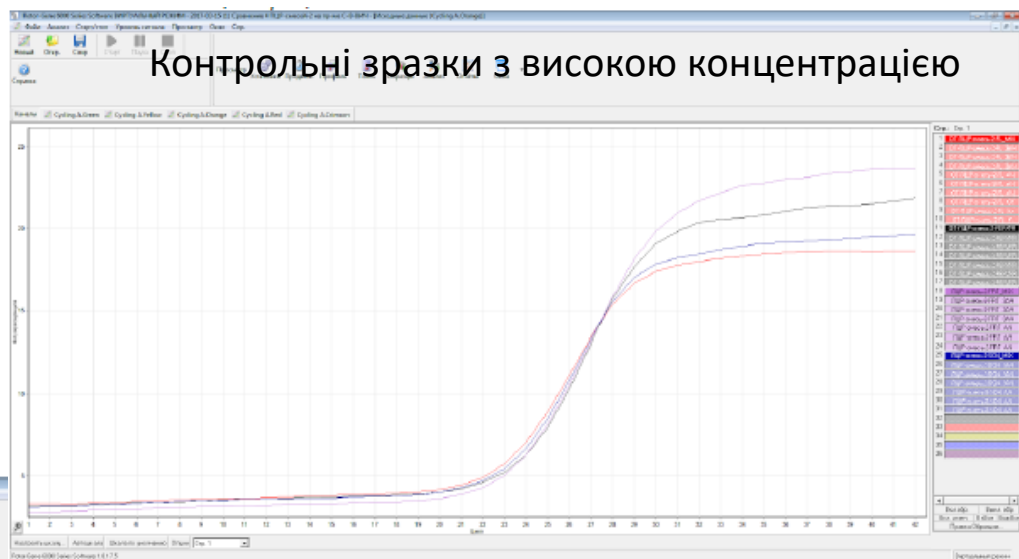
✓ R_праймер

Реакційний буфер для полімерази (іони Mg^{2+})

1. Утворюють розчинні комплекси з дНТФ
2. Оптимальна концентрація 1-5 мМ (підбираємо емпірично)
3. Підвищують температуру плавлення матричної ДНК
4. Багато іонів – гарне розгорання, але багато «неспецифік»
5. Мало іонів – слабке розгорання

Практичний кейс 3. Тестування різних буферів для полімерази:

1. Буфер 1 (концентрація іонів Mg 20 мМ\мл)
2. Буфер 2 (стандартна; концентрація іонів Mg 15 мМ\мл)
3. Буфер 3 (концентрація іонів Mg 15 мМ\мл, змінений йонний склад за рахунок SO4)



Питання №10

1. Чи можливо в умовах діагностичної лабораторії змінити концентрацію магнію у суміші?
2. Як може виглядати протокол постановки у цьому випадку?
3. Як виправити ситуацію?

**Практичний кейс 4. Складіть програму ампліфікації
для наборів праймерів \ зондів та набору для
проведення ОТ-ПЛР**

Основні характеристики ПЛР

- Висока чутливість, заснована на експонентному принципі накопичення продукту.
- Висока специфічність, заснована на виявленні унікальних для мікро-(макро)-організму ділянок генетичного матеріалу.
- Метод прямого виявлення збудника, заснований на універсальності способу зберігання та передачі генетичної інформації живої матерії.