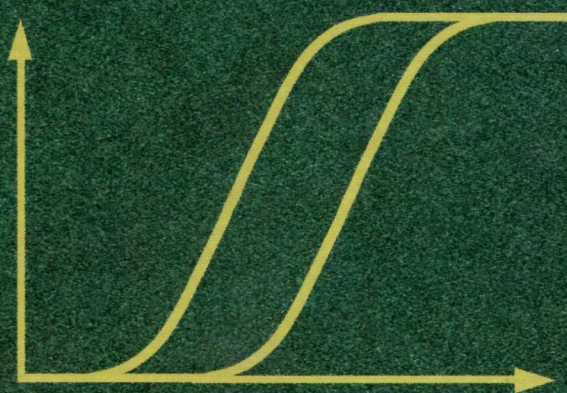


ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

УДК 577.21
ББК 28.04
П11

Авторы:

Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, П. А. Семёнов,
А. М. Савилова, И. А. Кофиади, Д. Д. Абрамов

Под общей редакцией Д. В. Ребрикова

ПЦР в реальном времени / Д. В. Ребриков [и др.] ;
П11 под ред. д. б. н. Д. В. Ребрикова. — 5-е изд. — М. : БИНОМ.
Лаборатория знаний, 2014. — 223 с. : ил.
ISBN 978-5-9963-1203-0

Рассмотрены различные варианты и особенности оборудования для проведения ПЦР «в реальном времени», даны рекомендации по выбору амплификатора. Разобраны особенности систем флуоресцентной регистрации накопления ДНК. Рассмотрены ключевые факторы, определяющие выбор последовательности олигонуклеотидов и параметры программ амплификации. Уделено внимание подготовке проб и особенностям анализа получаемых данных, что необходимо для получения наиболее достоверных результатов. Отдельные главы посвящены применению ПЦР «в реальном времени» для решения различных задач: определения уровня представленности транскриптов, вирусной нагрузки, нуклеотидного полиморфизма, относительного содержания нуклеиновых кислот на примере ГМО.

Для сотрудников генно-инженерных и медицинских диагностических лабораторий, а также для преподавателей и студентов, специализирующихся в области молекулярной биологии.

УДК 577.21
ББК 28.04

Научное издание

Ребриков Денис Владимирович
Саматов Герман Альфредович
Трофимов Дмитрий Юрьевич и др.

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Ведущий редактор канд. биол. наук *Л. А. Аксёнова*
Художник *Н. А. Новак*. Технический редактор *Е. В. Денюкова*
Корректор *Е. Н. Климина*

Компьютерная верстка: *Л. В. Катуркина*

Подписано в печать 28.11.13. Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. 14,00. Тираж 1000 экз. Заказ 452.

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>

При участии ООО Агентство печати «Столица»

www.apstolica.ru, e-mail: apstolica@bk.ru

Отпечатано в ОАО «Первая Образцовая типография».

филиал «УЛЬЯНОВСКИЙ ДОМ ПЕЧАТИ». 432980, г. Ульяновск, ул. Гончарова, 14

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие Л. А. Остермана	6
Предисловие Е. Д. Свердлова	7
Список сокращений	8
Перечень компаний, упомянутых в тексте	9
Глава 1. Что такое ПЦР	10
1.1. Изобретение ПЦР	10
1.2. Изобретение ПЦР «в реальном времени»	12
1.3. Отличие анализа продуктов ПЦР «по конечной точке» и «в реальном времени»	14
1.4. Развитие ПЦР «в реальном времени» как диагностического инструмента	14
Глава 2. Основы полимеразной цепной реакции	19
2.1. Общие сведения о ПЦР	19
2.2. Организация ПЦР-лаборатории	20
2.3. Оборудование и материалы для ПЦР	22
2.4. Свойства олигонуклеотидов (праймеров и проб)	26
2.5. Влияние ионов Mg^{2+}	29
2.6. Свободные дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTPs) ..	29
2.7. Влияние pH	30
2.8. Минеральное масло	30
2.9. Другие компоненты, добавление которых влияет на ПЦР	30
2.10. Ферменты, используемые в ПЦР	31
2.11. Программы амплификации	32
2.12. «Горячий старт» (hot start)	36
Глава 3. Оборудование для ПЦР «в реальном времени»	39
3.1. Устройство детектирующих амплификаторов	39
3.2. Основные функциональные узлы	39
3.3. Обзор характерных разновидностей приборов	52
3.4. Тенденции развития оборудования для ПЦР «в реальном времени»	64
Глава 4. Визуализация накопления ДНК при проведении ПЦР «в реальном времени»	65
4.1. Флуоресценция	65
4.2. Флуорофоры	66
4.3. Гасители флуоресценции	69

4.4. Неспецифичные системы детекции	73
4.5. Специфичные системы детекции	76
Глава 5. Дизайн праймеров и проб, программы амплификации ...	85
5.1. Параметры, влияющие на взаимодействие олигонуклеотида и ДНК	85
5.2. Выбор последовательности проб	94
5.3. Программное обеспечение для дизайна праймеров и проб	95
5.4. Особенности систем праймеры-проба	96
5.5. Особенности программ амплификации для ПЦР «в реальном времени»	96
Глава 6. Особенности очистки нуклеиновых кислот для ПЦР «в реальном времени»	101
6.1. Общие принципы очистки нуклеиновых кислот для использования в ПЦР	101
6.2. Особенности взятия биоматериала для клинических ПЦР-исследований и риск контаминации	103
6.3. Особенности методов очистки НК для ПЦР «в реальном времени»	105
6.4. Типовые ошибки использования ПЦР «в реальном времени», связанные с количеством нуклеиновых кислот, забираемых в реакцию	106
Глава 7. Анализ данных ПЦР «в реальном времени»	109
7.1. Методы и средства анализа графиков накопления ДНК	109
7.2. Простая модель ПЦР	111
7.3. Связь флуоресцентного сигнала и накопления ДНК в ходе ПЦР	113
7.4. Пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК (C_t)	114
7.5. Определение эффективности ПЦР	118
7.6. Недостатки порогового метода и пути их преодоления ...	122
7.7. Методы прямого сравнения графиков накопления ДНК (C_p)	129
7.8. Комбинация методов C_t и C_p	134
Глава 8. Определение уровня представленности транскриптов ...	141
8.1. Организация эксперимента	141
8.2. Абсолютное определение уровня представленности транскриптов	151
8.3. Относительное определение уровня представленности транскриптов	155
8.4. Нормировка данных	156
8.5. Внутренний контрольный образец	160

8.6. Отрицательный контрольный образец	161
Глава 9. Количественное определение вирусной нагрузки	165
9.1. Количественное определение вирусной нагрузки	165
9.2. Источники погрешностей и варианты учета потерь и эффективности реакции	182
Глава 10. Использование ПЦР «в реальном времени» для определения однонуклеотидного полиморфизма	188
10.1. Однонуклеотидный полиморфизм последовательностей ДНК	188
10.2. Идентификация ОНП с помощью аллель-специфичных праймеров	190
10.3. Дифференциация аллелей с помощью олигонуклеотидных проб	196
10.4. Генотипирование ОНП методом плавления ДНК-дуплексов.	199
Глава 11. Определение относительного содержания нуклеиновых кислот на примере генетически модифицированных источников.	202
11.1. Общие сведения о ГМИ	202
11.2. Классификация существующих методов определения ГМИ в продуктах питания	202
11.3. Организация чужеродной ДНК в геноме растений	205
11.4. Выбор последовательностей-мишеней для выявления чужеродной ДНК в геноме растения	205
11.5. Тест-системы для определения процентного содержания чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений	207
11.6. Выбор чужеродной и нормировочной ДНК для количественного определения ГМИ.	210
11.7. Калибровочные образцы	211
11.8. Точность метода определения процентного содержания генетически модифицированных ингредиентов в пище с помощью метода ПЦР «в реальном времени»	212
Предметный указатель	216