



Новые методы амплификации и высококочувствительной детекции нуклеиновых кислот

Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

ДНК термоциклеры

(по типу реакционных блоков, камер, ячеек)

С металлическим термоблоком (алюминий или позолоченное серебро), обычно **нагреваемым/охлаждаемым** элементами Пельтье (*обычные пробирки, время одной амплификации от 30 до 120 минут*) – производится множество моделей

Воздушная камера, обычно **нагреваемая/охлаждаемая инфракрасным светом/вентилятором** или **горячим/холодным** газами, подаваемыми под давлением (*специальные капилляры, время одной амплификации от 15 до 30 минут*) - производится ограниченное число моделей

Микрожидкостные устройства со сменой температур или с фиксированными температурами в разных зонах (*весьма сложные специальные устройства, время амплификации от 5 до 60 минут*) – опытные образцы, коммерчески не доступны

Конвекционные ячейки с разными способами нагрева/охлаждения (*сложноустроенные реакционные сосуды, время амплификации от 15 до 90 минут*) – даже не имело смысла производить

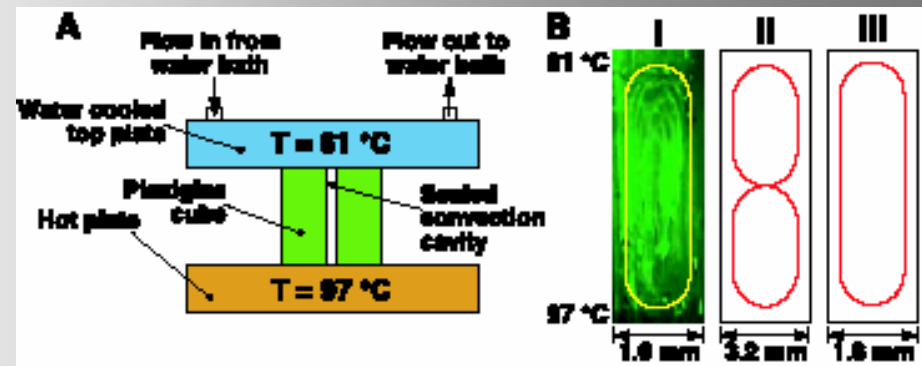


Конвекционная ПЦР



PCR in a Rayleigh-Bénard Convection Cell

Madhavi Krishnan, *et al.*
Science **298**, 793 (2002);

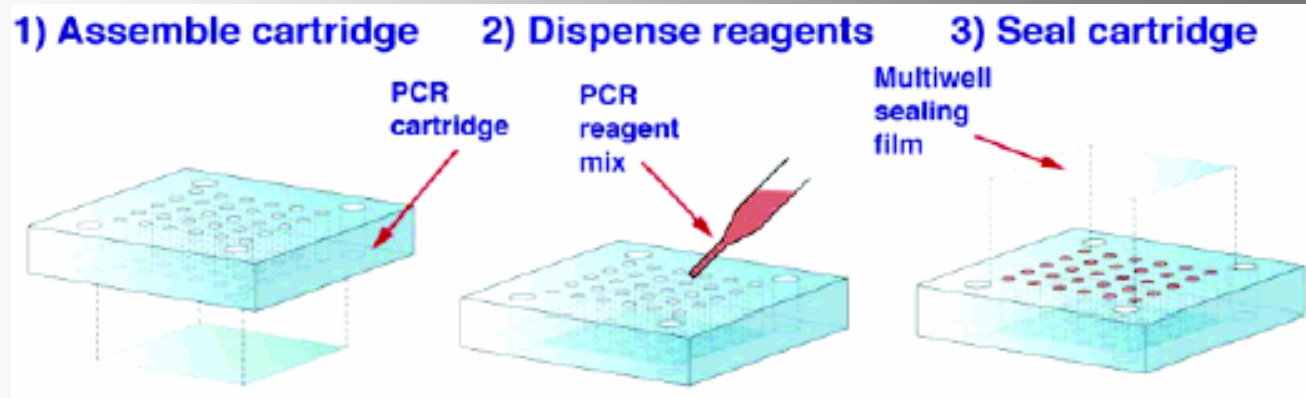




Anal. Chem. 2004, 76, 6254–6265

Reactions and Fluidics in Miniaturized Natural Convection Systems

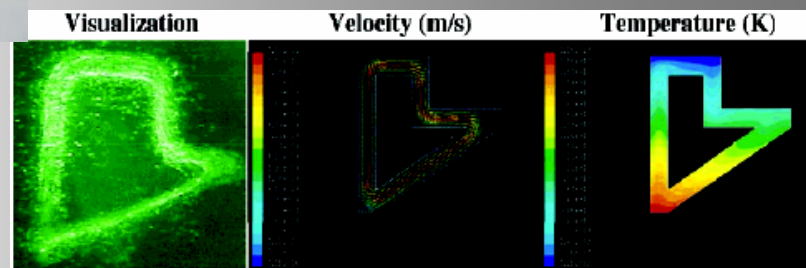
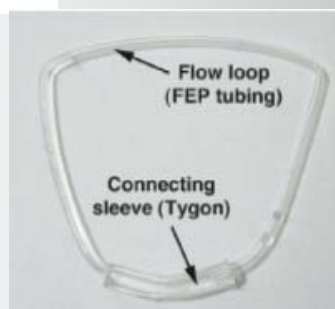
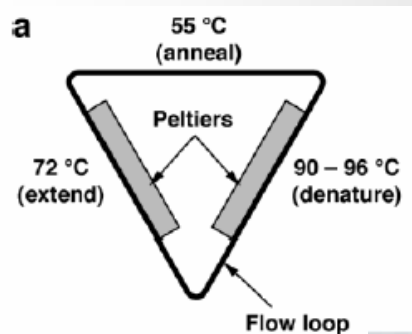
Madhavi Krishnan,^{1,†} Nitin Agrawal,⁵ Mark A. Burns,^{1,||} and Victor M. Ugaz^{*,5}





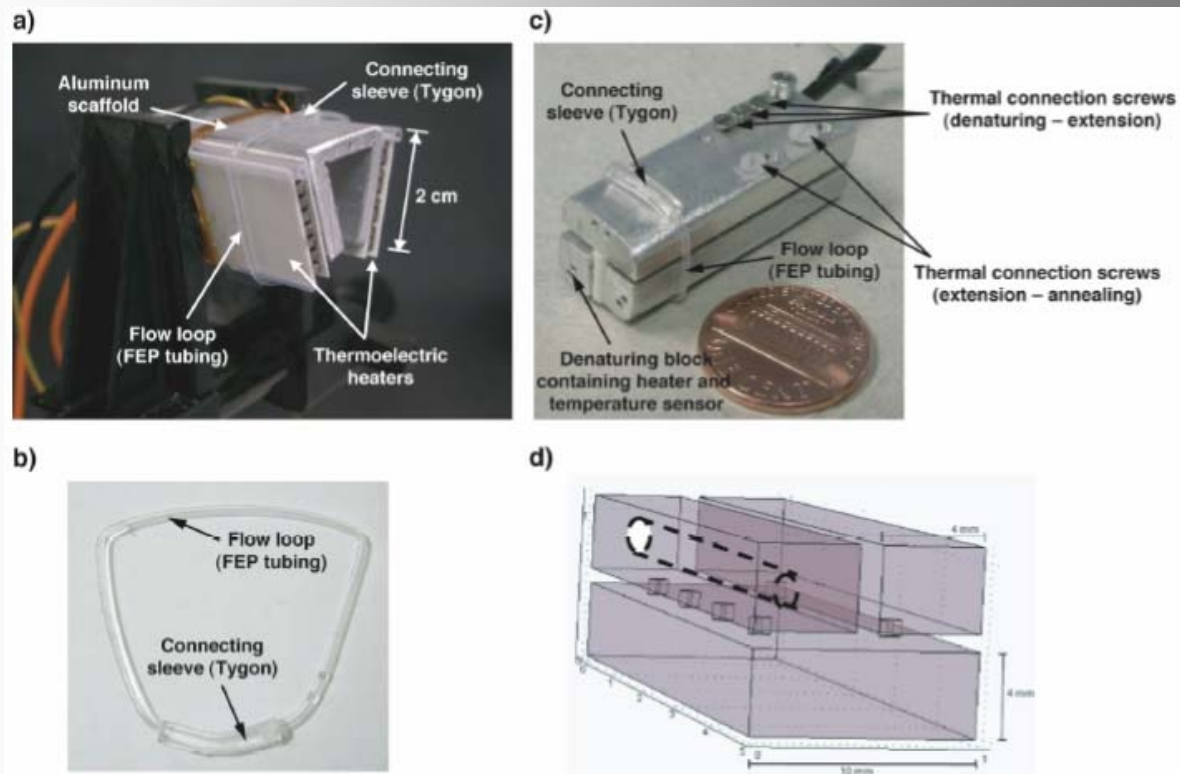
Reactions and Fluidics in Miniaturized Natural Convection Systems

Madhavi Krishnan,^{1,‡} Nitin Agrawal,[§] Mark A. Burns,^{1,||} and Victor M. Ugaz^{*,§}



A pocket-sized convective PCR thermocycler

Nitin Agrawal, Yassin A. Hassan, and Victor M. Ugaz



United States Patent

Benett et al.

(10) Patent No.: US 6,586,233 B2

(45) Date of Patent: Jul. 1, 2003

Convectively Driven Polymerase Chain Reaction Thermal Cycler

E. K. Wheeler,^{*,†} W. Benett,[†] P. Stratton,[†] J. Richards,[†] A. Chen,[†] A. Christian,[†] K. D. Ness,^{†,‡} J. Ortega,[†] L. G. Li,[†] T. H. Weisgraber,[†] K. Goodson,[‡] and F. Milanovich[†]

CONVECTIVELY DRIVEN PCR THERMAL-CYCLING

(56)

References Cited

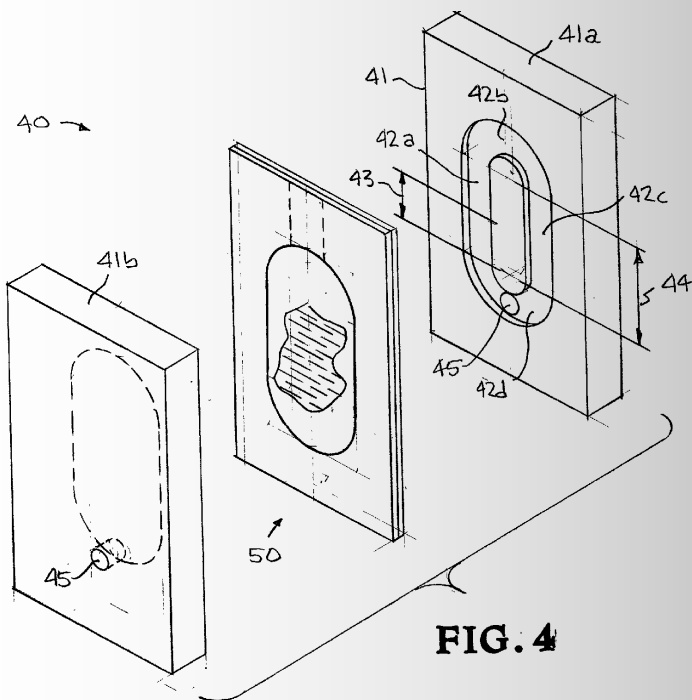
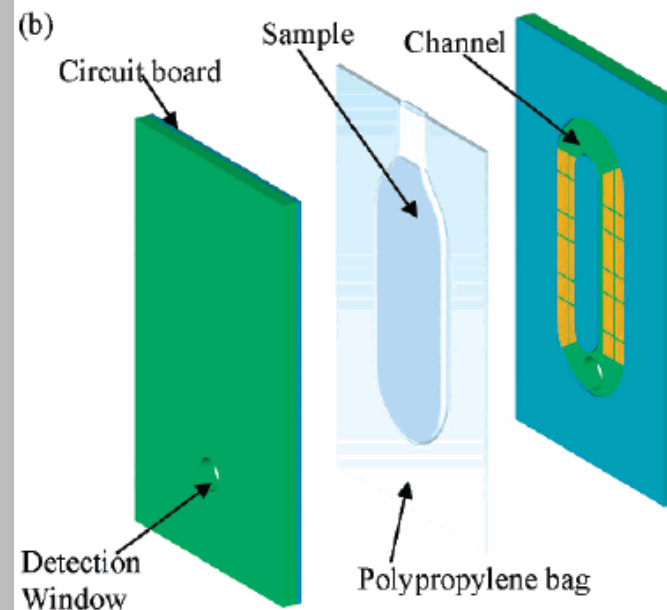
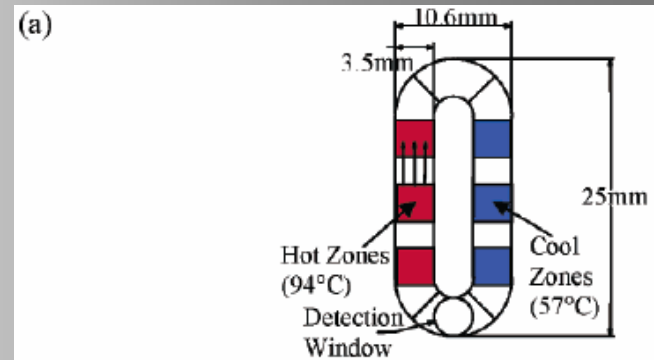


FIG. 4



(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2004/0152122 A1**

Hwang et al. (43) **Pub. Date: Aug. 5, 2004**



(54) **METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION**

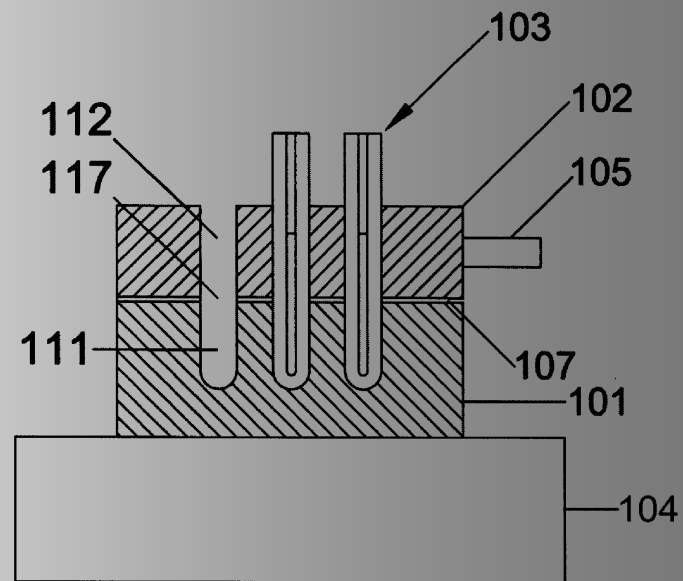
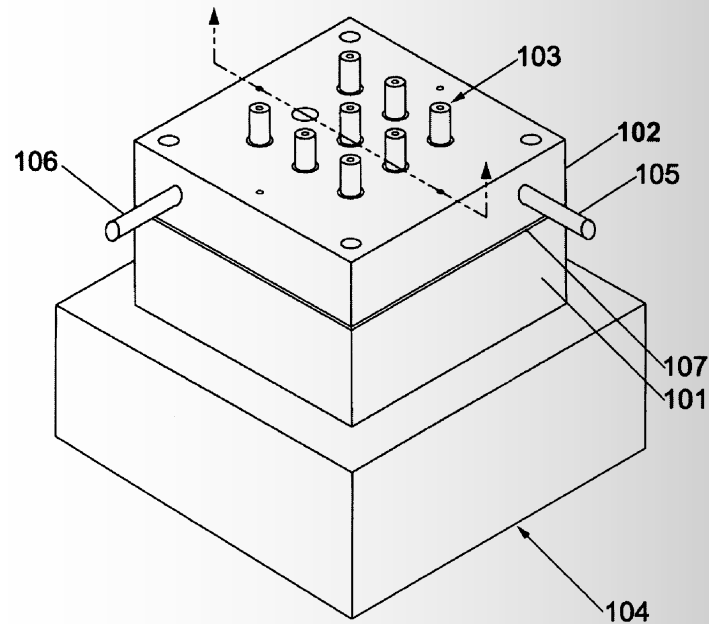
(30) **Foreign Application Priority Data**

Sep. 15, 2001 (KR)..... 10-2001-57040
Oct. 30, 2001 (KR)..... 10-2001-66943

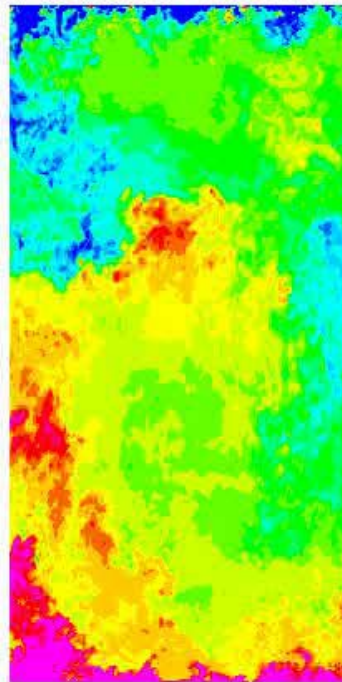
(76) **Inventors: Hyun Jin Hwang, Seoul (KR); Jeong Hee Kim, Seoul (KR); Kyunghoon Jeong, Gwangju (KR)**

Publication Classification

(51) **Int. Cl.⁷** C12Q 1/68; C12P 19/34
(52) **U.S. Cl.** 435/6; 435/91.2



Температурная конвекция в ячейке Бенара-Рэля



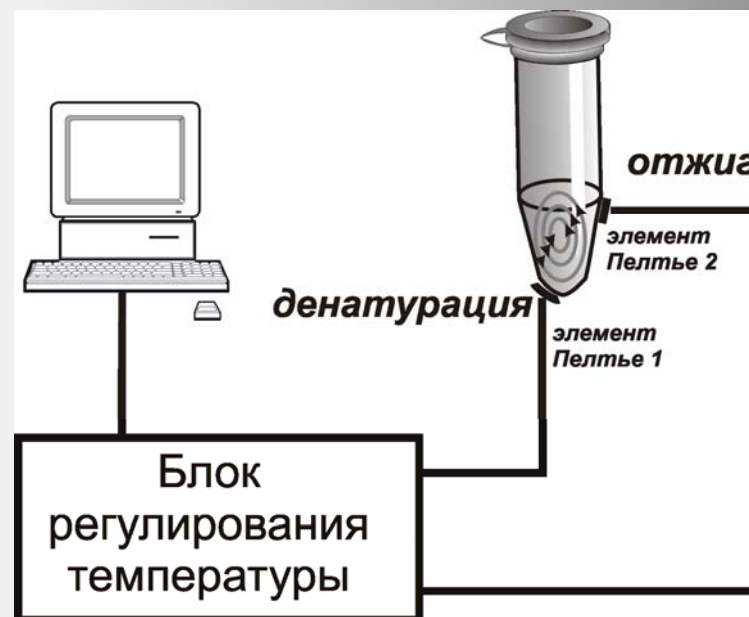
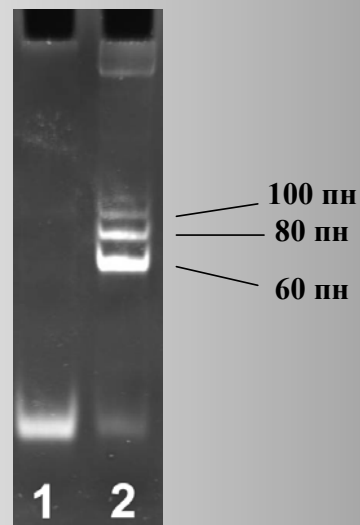


Схема приложения точек нагрева (охлаждения) в конвекционной ПЦР с наклонным градиентом температур



Конвекционная ПЦР

с предложенным нами наклонным градиентом температур, благодаря которому смена температур в разных местах реакционной смеси происходит за счет образующегося конвекционного потока жидкости, основанного на силе плавучести, возникающей ввиду разницы между архимедовой силой и силой тяжести, является самой быстрой ПЦР
(время одной амплификации в стандартных пробирках составляет 1 – 2 минуты)



Электрофоретический анализ продуктов конвекционной ПЦР с наклонным градиентом температур в 8%-ном полиакриламидном геле, амплифицированных с помощью термостабильной Vent exo⁻ ДНК полимеразы.
1. праймеры; 2. продукты ПЦР разного размера, начиная с 60 пар нуклеотидов, с увеличением на 20 пар нуклеотидов (видны не полностью израсходованные праймеры)



Компьютерная симуляция конвекционной ПЦР вертикальная ячейка, “подогрев” сверху и снизу (видно хаотичное и медленное движение жидкости)

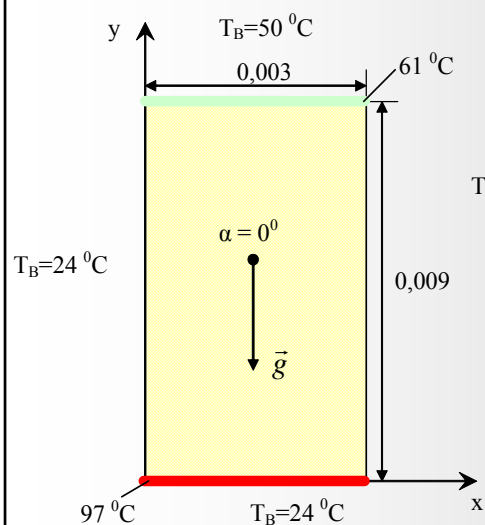
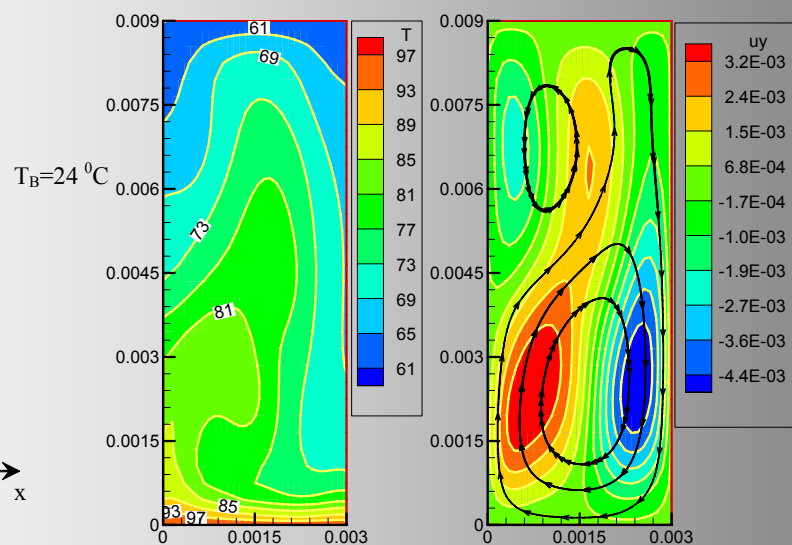
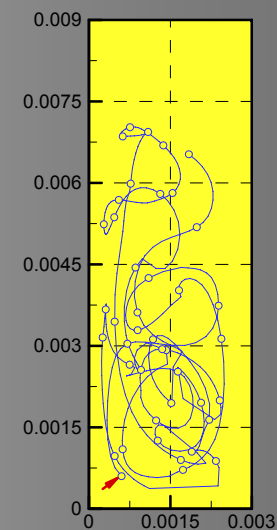


Схема расчетной области



Температурное поле и линии тока



Траектория частицы



Температурное поле и линии тока в модели с наклонным градиентом температур (видно направленное и быстрое движение жидкости)

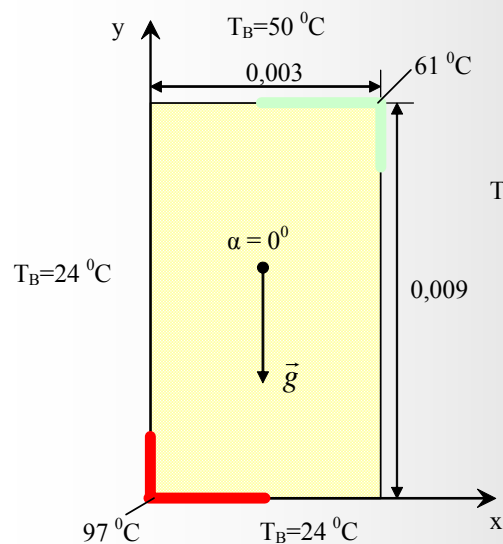
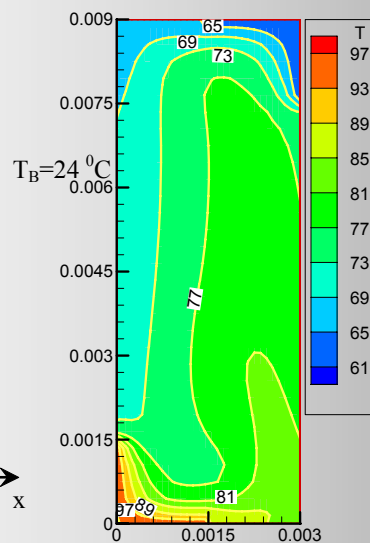
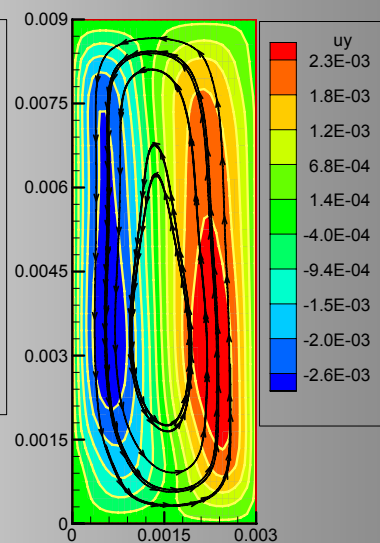


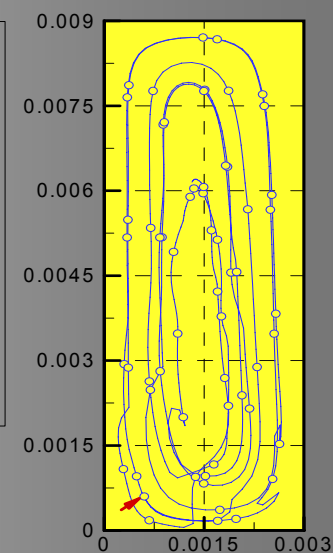
Схема расчетной области



Температурное поле и линии тока



Траектория частицы





~~CONVENTIONAL~~ PCR



Рекуррентная Цепная Реакция



РЦР - Рекуррентная Цепная Реакция

это

**Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР)
с увеличивающимся с каждым циклом**

или

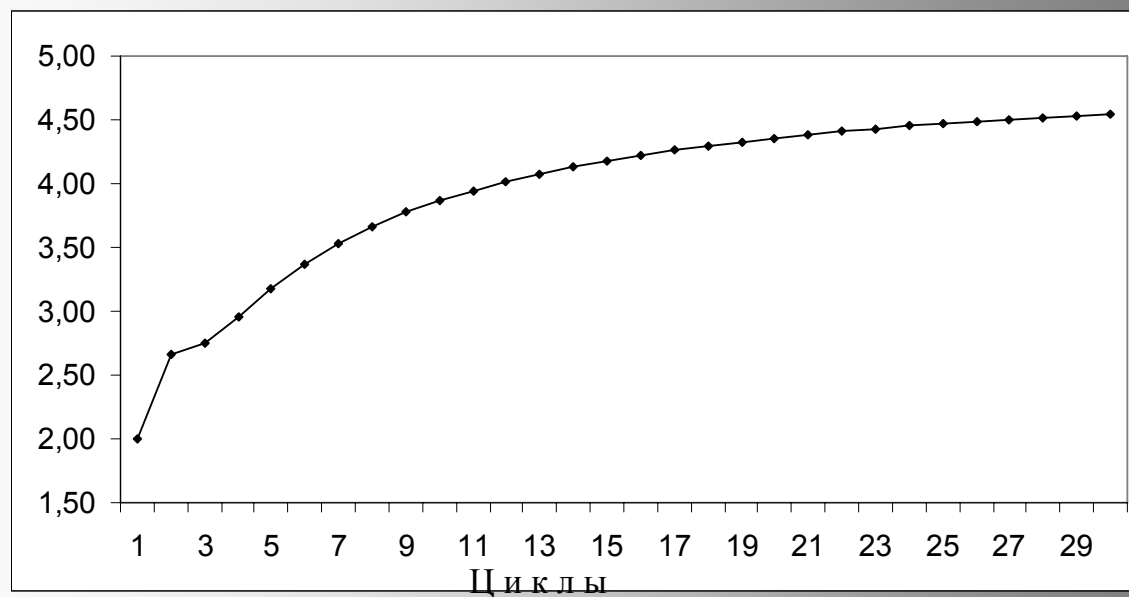
**... коэффициентом размножения
молекул ДНК**

или иначе

**... числом мест для отжига праймеров
в составе ампликонов**

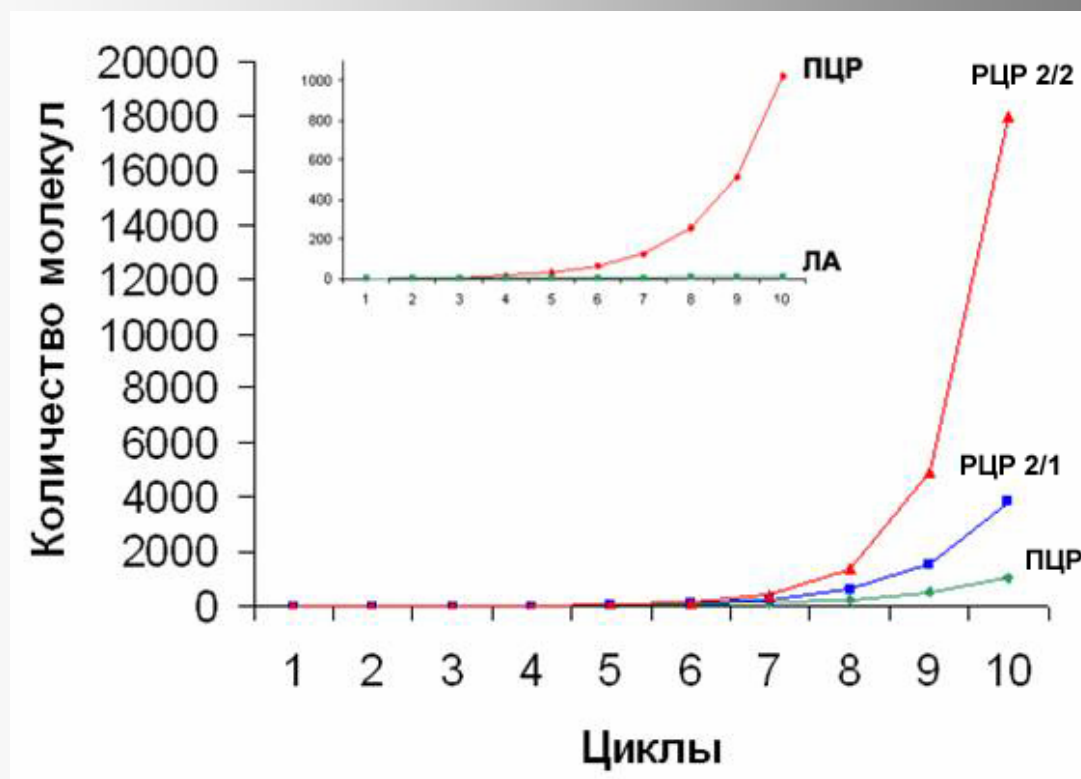


Рост коэффициента размножения молекул ДНК в РЦР 2/2





Характер увеличения числа ампликонов для линейной амплификации (ЛА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и для двух вариантов рекуррентной цепной реакции (РЦР 2/1 и РЦР 2/2)





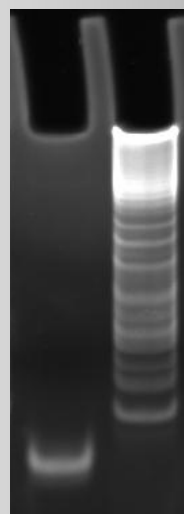
Расчетные количества ампликонов в ПЦР (2ⁿ) и РЦР 2/2

Циклы	ПЦР	РЦР 2/2
1	2	2
2	4	4
3	8	8
4	16	18
5	32	46
6	64	132
7	128	412
8	256	1 386
9	512	4 888
10	1 024	17 898
11	2 048	67 538
12	4 096	261 228
13	8 192	1 031 428
14	16 384	4 144 322
15	32 768	16 904 266

16	65 536	69 858 184
17	131 072	292 026 920
18	262 144	1 233 223 282
19	524 288	5 255 278 886
20	1 048 576	97 713 629 060
21	2 097 152	425 716 579 522
22	4 194 304	1 866 042 900 576
23	8 388 608	8 224 980 357 766
24	16 777 216	36 438 812 597 104
25	33 554 432	162 194 699 196 090
26	67 108 864	725 101 404 987 682
27	134 217 728	3 254 720 966 296 116
28	268 435 456	14 664 232 555 697 516
29	536 870 912	66 301 832 687 887 794
30	1 073 741 824	300 755 224 948 472 080
31	2 147 483 648	1 368 461 352 615 996 062

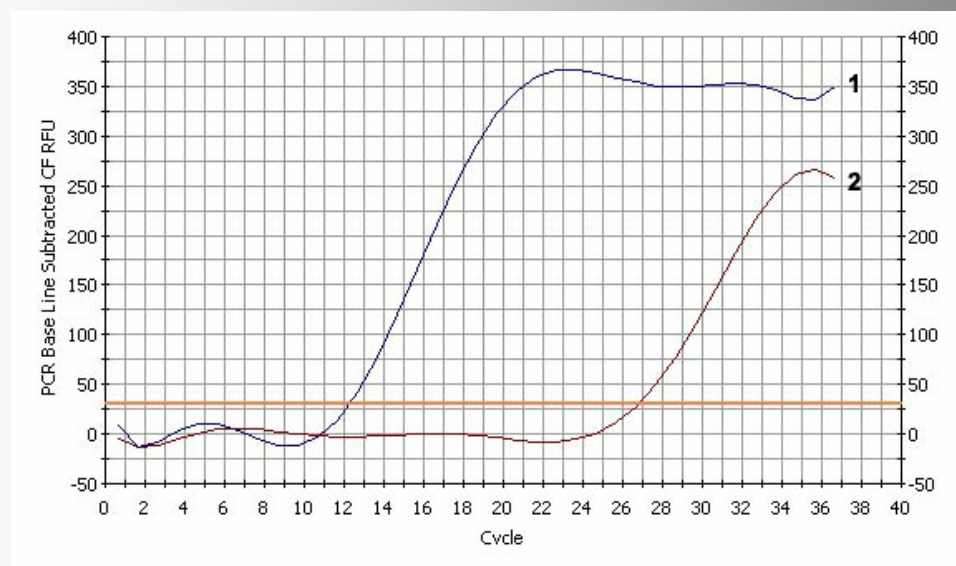
2,1 x 10⁹

1,4 x 10¹⁸

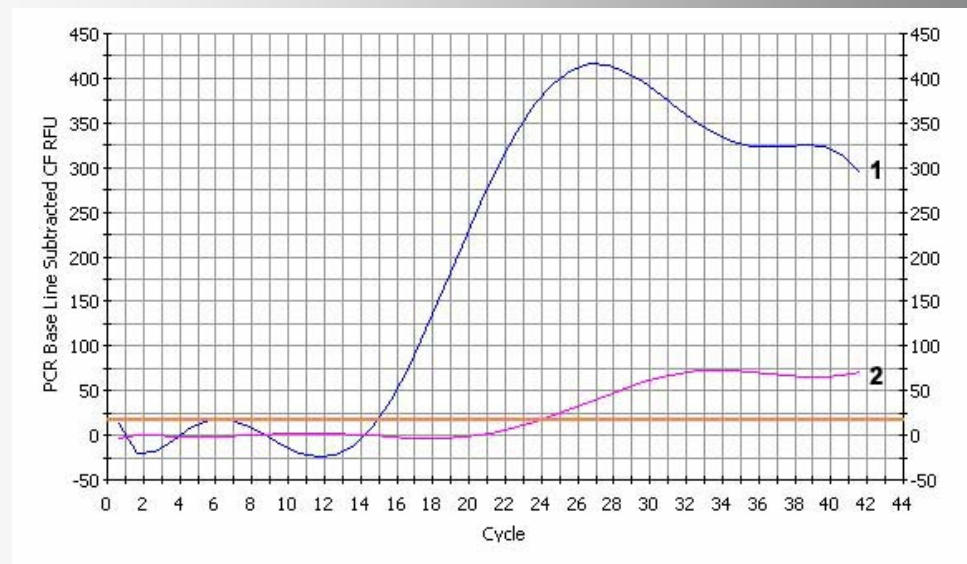


1 2

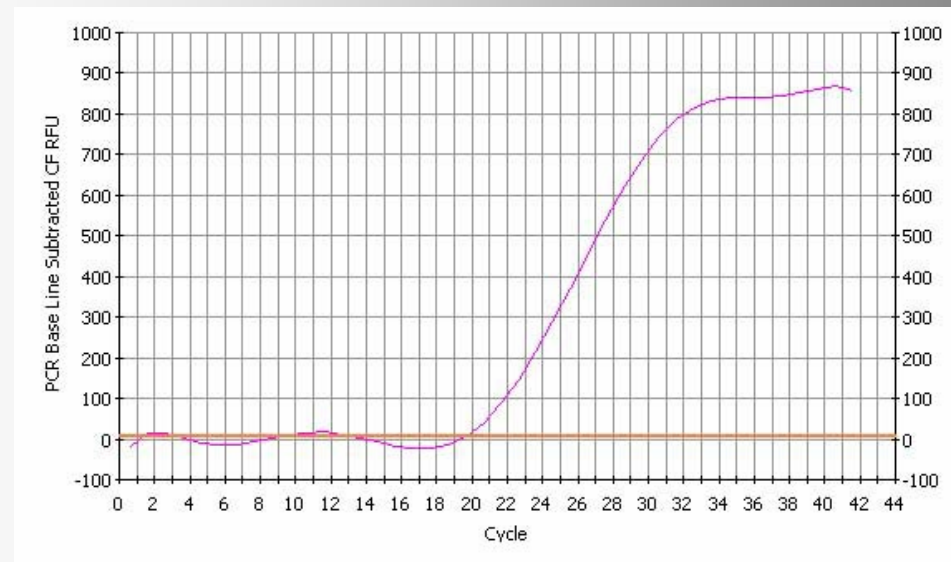
Электрофоретический анализ продуктов ПЦР и РЦР в 10% полиакриламидном геле, амплифицированных с помощью термостабильной Vent exo⁻ ДНК полимеразы. 25 циклов.
1. ПЦР; 2. РЦР 2/1



Рост кривых флуоресценции в РЦР и в ПЦР, регистрируемый с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green I
1. РЦР 2/1; 2. ПЦР



Рост кривых флуоресценции в РЦР 2/2 и в ПЦР, регистрируемый с помощью FRET-эффекта
1 – РЦР; 2 - ПЦР



Рост кривой флуоресценции в том же эксперименте в ПЦР, регистрируемый с помощью FRET-эффекта, после удаления из рассмотрения значений для ПЦР 2/2



Благодарю за внимание