

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
Глава 8. Определение уровня представленности транскриптов. . .	135
8.1. Организация эксперимента.	135
8.2. Абсолютное определение уровня представленности транскриптов	145
8.3. Относительное определение уровня представленности транскриптов	149
8.4. Нормировка данных	150
8.5. Внутренний контрольный образец	154
8.6. Отрицательный контрольный образец	155

Глава 9. Количественное определение вирусной нагрузки	159
9.1. Количественное определение вирусной нагрузки	159
9.2. Источники погрешностей и варианты учета потерь и эффективности реакции	176
Глава 10. Использование ПЦР «в реальном времени» для определения однонуклеотидного полиморфизма	182
10.1. Однонуклеотидный полиморфизм последовательностей ДНК	182
10.2. Идентификация ОНП с помощью аллель-специфичных праймеров	184
10.3. Дифференциация аллелей с помощью олигонуклеотидных проб	190
10.4. Генотипирование ОНП методом плавления ДНК-дуплексов.	193
Глава 11. Определение относительного содержания нуклеиновых кислот на примере генетически модифицированных источников.	196
11.1. Общие сведения о ГМИ	196
11.2. Классификация существующих методов определения ГМИ в продуктах питания	196
11.3. Организация чужеродной ДНК в геноме растений.	199
11.4. Выбор последовательностей-мишеней для выявления чужеродной ДНК в геноме растения	199
11.5. Тест-системы для определения процентного содержания чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений.	201
11.6. Выбор чужеродной и нормировочной ДНК для количественного определения ГМИ.	204
11.7. Калибровочные образцы	205
11.8. Точность метода определения процентного содержания генетически модифицированных ингредиентов в пище с помощью метода ПЦР «в реальном времени»	206
Предметный указатель	210