

документации.

Для оценки эффективности амплификации следует использовать положительные и отрицательные стандартные и/или контрольные образцы, указанные в фармакопейной статье и нормативной документации или в инструкции по применению набора реагентов.

ПЦР осуществляют в автоматическом режиме на специальных программируемых приборах – амплификаторах, контролирующих заданные параметры реакции: температуру и длительность отдельных этапов цикла (денатурация, гибридизация и синтез цепи ДНК), число циклов и т.д.

*Денатурация.* Выдерживание при температуре от 94 до 96 °С в течение установленного времени; при этом двойная цепь денатурируется (расплетается) с образованием двух одноцепочечных молекул ДНК.

*Гибридизация (отжиг).* При температуре 45 – 65 °С в течение установленного времени происходит гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК-матрицы, в процессе которого праймеры распознают комплементарные им участки матричной ДНК.

*Синтез цепи ДНК (элонгация).* При температуре 65 – 72 °С в течение установленного времени происходит репликация (дистраивание) одной из одноцепочечных ДНК от точки связывания праймера «вправо» (для одной цепи ДНК) и «влево» (для другой цепи ДНК). В результате вновь синтезируемые молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий.

Продолжительность цикла составляет 0,5 - 5 мин. Сразу после окончания первого цикла процедура повторяется и происходит экспоненциальное увеличение содержания фрагментов ДНК. Обычно ПЦР состоит из 25–40 циклов. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка ДНК, приводящее к увеличению в геометрической прогрессии общего содержания продуктов реакции.

Эффективность ПЦР и количество синтезированного при этом заданного фрагмента ДНК зависит от многих факторов, среди которых