УДК. 577.21

А. Н. КОНОВАЛОВА, Н. М. ГОЛОВЧЕНКО, А. Р. МАНАСЯН, Г. П. ПОГОСЯН, П. К. ЛИ

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПРИНЦИПЫ, ВОЗМОЖНОСТИ)

Карагандинский государственный университет им. Е. А. Букетова

Раскрываются принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР), ее возможности, области применения. Рассматриваются этапы и преимущества ПЦР. Описаны ферменты, праймеры и другие компоненты, используемые при постановке реакции амплификации. Среди разновидностей ПЦР указаны преимущества ПЦР в реальном времени.

Проблема качественной и быстрой диагностики в различных сферах человеческой деятельности всегда была и остается актуальной.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, совершивший переворот в клинической диагностике, определении наличия какого-либо генетического отклонения, присутствия инфекций в организме человека, определении отцовства, выявлении генетически модифицированных организмов, криминалистике и т.д.

Позиции ПЦР-метода неуклонно крепнут и с усовершенствованием методик пробоподготовки, проведения детекции продуктов амплификации различными способами, ПЦР становится надежнее и доступнее для большего круга заинтересованных в качественной диагностике врачей, криминалистов, работников СЭС, сотрудников органов надзора за качеством пищи [1].

Спектр применения ПЦР увеличивается день ото дня, поскольку высокая чувствительность и специфичность метода позволяет не только определить наличие единичных возбудителей в биологическом материале, а также присутствие генетически модифицированных компонентов в продуктах питания, но и обнаружить присутствие аномальной ДНК в ничтожно малых количествах, что обуславливает выявление мутаций, являющихся причиной наследственных и онкологических заболеваний.

ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ПЦР. ПЦР - экспериментальный молекулярно-биологический метод исследования, позволяющий добиться значительных увеличений малых концентраций определяемых фрагментов нуклеиновых кислот в биологическом материале, основанный на амплификации ДНК in vitro.

С помощью данного метода в течение нескольких часов можно выделить и размножить определённую последовательность ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определённого участка генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК [2, 3].

Один из важнейших компонентов ПЦР – термостабильная ДНК-полимераза (*Taq*-полимераза) и способ ее выделения из бактерий «Termus aquaticus» был охарактеризован русским биохимиком Алексеем Калединым в 1980 году.

В 1993 г. Мюллис получил за идею амплификации нуклеиновых кислот при помощи температурного регулирования Нобелевскую премию.

В основе метода ПЦР лежит уникальное свойство нуклеиновых кислот – способность саморепродукции, характерная как для ДНК, так и РНК. При этом синтезируются только строго специифические фрагменты нуклеиновых кислот. В связи с этим перед проведением ПЦР необходимо установить нуклеотидную последовательность искомой нуклеиновой кислоты. После этого синтезируются два коротких ДНК-зонда или праймера, которые комплементарны соответствующим участкам мишени. Праймер – самый главный элемент в ПЦР, обеспечивающий запуск и специфичность реакции [5].

Метод ПЦР обладает рядом существенных преимуществ по сравнению со многими другими видами лабораторной диагностики. Ниже представлен их перечень.

– Универсальность – метод принципиально позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК даже в тех случаях, когда другими способами это сделать невозможно;

– Высокая специфичность – обусловлена тем, что в исследуемом материале определяется уникальный фрагмент нуклеотиновой последовательности, характерный только для данного возбудителя или гена;

– Высокая чувствительность – возможность проведения не только качественной, но и количественной оценки содержания НК;

– Высокая скорость получения результата – высокая технологичность и автоматизация метода позволяет провести исследования и получить результат в рамках одного дня;

– Возможность доклинической и ретроспективной диагностики – ПЦР позволяет осуществить определение патогена или дефектного гена в организме ещё до развития заболевания;

– Проведение анализа при минимальном объеме пробы – возможно проведение ПЦР в пробе, объемом до нескольких микролитров, что крайне важно в неонатологии, судебной медицине, клинической генетике и т.п.;

– Возможность одновременной диагностики нескольких возбудителей заболеваний или аномальных генов в одной пробе без ущерба качеству результата;

– Исключение возможности инфицирования персонала – в процессе проведения ПЦР возможность инфицирования персонала исключается, т.к. материал дезинфицируется лизисом и высокой температурой;

– Прямое определение наличия возбудителей;

– Возможность диагностики острых, вялотекущих и скрытых инфекций;

– Возможность экспертизы – фотографии электрофореза, а также отчеты по результатам ПЦР сохраняются в электронном варианте.

ЭТАПЫ ПЦР. Природный процесс, лежащий в основе метода ПЦР – комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы. Естественная репликация ДНК включает в себя несколько этапов:

1. Денатурация ДНК – расхождение нитей ДНК, этот процесс протекает при 93–95°С в течение 30-40 сек. в амплификаторе. Помимо нуклеиновой кислоты, выделенной из тестируемого образца, в реакционной смеси содержится в избытке 2 праймера, термостабильная Taq-полимераза и 4 олигонуклеотида.

2. Отжиг праймеров – образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК). Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК, на границах специфического участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50-60°С. Время отжига – 20-60 сек.

3. Элонгация – синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих нитей). ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это, так называемая, стадия элонгации. Синтез цепей ДНК происходит от 5'-конца к 3'-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат добавляемые в раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ). Процесс синтеза катализируется термостабильной ДНК-полимеразой (Taq-полимеразой) и проходит при температуре 70-72°С. Время этого этапа – 20-40 сек. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n, где n – число циклов амплификации. Поэтому даже если в исходном растворе первоначально находилась только одна двух цепочечная молекула ДНК, то за 30-40 циклов в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона. Схема прохождения 1 цикла ПЦР представлена на рис. 1.

Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов, образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы), получаемой из термофильных бактерий Thermis aquaticus,оптимум работы которой находится в области 70-72 градусов, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим и использовать его для работы in vitro.

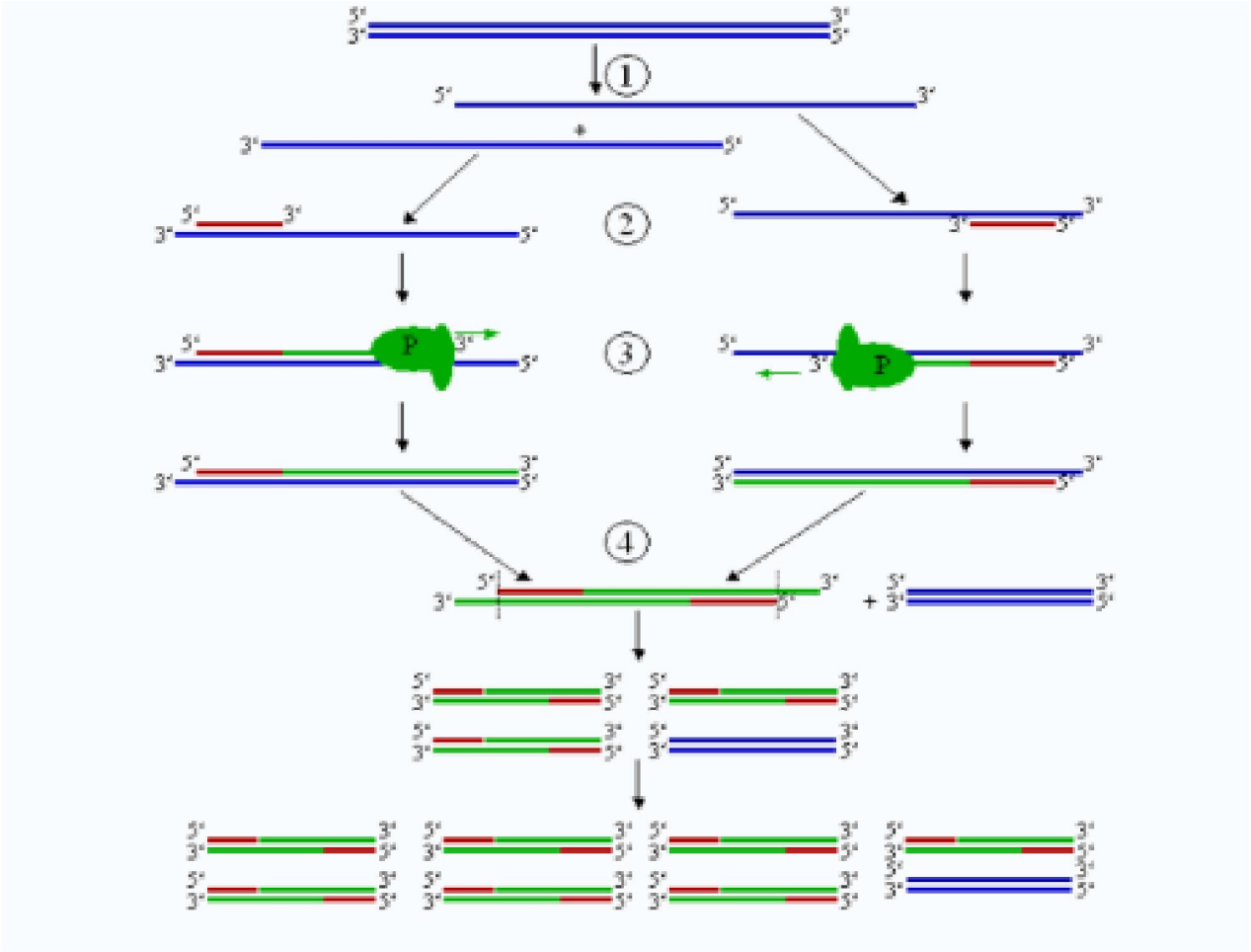

Рис. 1. Этапы прохождения 1 цикла ПЦР: (1) Денатурация при 93—95°С. (2) Отжиг при 50-60 °С. (3) Элонгация при 72 °С (Р=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается

Создание программируемых термостатов (амплификаторов) открыло возможности для широкого внедрения метода ПЦР в практику лабораторной клинической диагностики, поскольку реакция проходит здесь при автоматическом нагреве и охлаждении пробирок с реакционной смесью в очень короткое время.

При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов, получить достаточное количество ДНК-копий для идентификации их методом электрофореза. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований [5].

Комплементарное достраивание цепи начинается в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК- цепи.

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК- полимеразой.

КОМПОНЕНТЫ РЕАКЦИИ. Для проведения ПЦР требуются следующие составляющие:

– ДНК-мишень длиной от 100 до ~35000п.н.;
– ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;

– два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим последовательность-мишень; их 3'-гидроксильные концы после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу;

– термостабильная ДНК-полимераза – фермент, катализирующий реакцию полимеризации ДНК и не теряющий своей активности при температуре 95° и выше длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов - Thermus aquaticus (Taq-полимераза), Pyrococcus furiosus (Pfu-полимераза), Pyrococcus woesei (Pwo-полимераза) и другие;

– дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

– ионы Mg^{2+}, необходимые для работы полимеразы;

– буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции - pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

Праймеры. Выбор праймеров является ключевым звеном ПЦР, поскольку именно ими определяется возможность амплификации и выявления необходимой последовательности. Простое варьирование праймеров позволяет выявить многие патогенные микроорганизмы и генетические изменения при минимальных модификациях методики.

Праймеры (или амплимеры) используются для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними. Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов. Кроме того, на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами основана специфичность ПЦР. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двухцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка. После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной матрицы [6, 7].

Важнейшая характеристика праймеров – температура плавления комплекса праймер-матрица, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80°С. Кроме того, существует вероятность отжига праймеров друг с другом, что приводит к образованию праймер-димеров, что приводит к значительному расходу праймеров и синтезу неспецифических продуктов реакции. Данные явления делают невозможным чтение результатов при их детекции.

Фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе реакции, имеют разные размеры, лежащие в пределах 100-300 нуклеотидов, в редких случаях возможна амплификация последовательностей мишеней длиной в 1000 п.н.

В условиях большинства крупных исследовательских лабораторий праймеры синтезируют с помощью автоматических синтезаторов ДНК. Количества получаемых таким образом олигонуклеотидов (0,2–1 мкмолей) обычно достаточно для проведения нескольких тысяч ПЦР-реакций.

В соответствии с вышеизложенным можно определить ряд требований, предъявляемых к праймерам:

– Специфичность праймеров. Наиболее важными здесь являются 3'-концы праймеров, поскольку именно с них начинается достраивание комплементарной цепи ДНК Taq-полимеразой. Желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной. Неспецифичность праймеров

проявляется при детекции продуктов амплификации. Так, при анализе электрофореграммы она проявляется в виде дополнительных полос различной длины, а также шмеров (сплошных размазанных туманных полос ДНК, идущих со старта до финиша, на фоне которых разглядеть интересующий фрагмент весьма проблематично). Данные дефекты препятствуют корректной интерпретации результатов, что приводит к необходимости проводить повторный анализ.

– Необходимо исключить возможность образования димеров и петель, т.е. устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров на самих себя или друг с другом.

– При разработке видоспецифичных тест-систем на обнаружение какого-либо микроорганизма, например, необходимо избегать попадания области отжига праймеров в зону мутаций, делеций или инверсий в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров специфичности, поскольку при попадании на такую зону отжиг праймеров происходить не будет, что приведет к ложноотрицательным результатам [8].

Tag-Полимераза. Первоначально, после каждого цикла нагревания/охлаждения приходилось добавлять в реакционную смесь ДНК-полимеразу, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Данная процедура, безусловно, была малоэффективной, требовала много времени и фермента. При модификации методики было предложено использовать термостабильные, способные выдерживать множество циклов реакции ДНК-полимеразы. Полимеразная активность была выявлена у некоторых форм термофильных бактерий еще в 1980 году, а широко применяемая в настоящее время в ПЦР-анализе Taq-полимераза была выделена из бактерий Termus aquaticus, проявляющих способность к росту при температурах 70-75°С. Молекулярный вес очищенного протеина составляет 94кД, оптимальная температура полимеразной активности наблюдается при 70-80°С. При повышении температуры до 90°С активность фермента падает, что однако не приводит к денатурации полимеразы, а при снижении температуры до 70-80° уровень активности восстанавливается. Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у неё достаточно высока, так как у этого фермента отсутствует корректирующая 3'→5' экзонуклеазная активность и частота ошибок при считывании достигает 1/10000 нуклеотидов. Однако этой точности (хотя она ниже, чем у многих других полимераз) достаточно для того, чтобы возникающие при репликации последовательности мишени- ошибки не создавали особых проблем. Полимеразы Pfu и Pwo, выделенные из архей, обладают таким механизмом, их использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Taq. Сейчас применяют смеси Taq и Pfu, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

Средняя скорость репликации с помощью ДНК-полимеразы Taq составляет 35-100 нуклеотидов в секунду, однако при оптимальных условиях реакции скорость синтеза возрастает до 150 оснований в секунду. При низкой температуре активность падает до 2 оснований в секунду [9].

Число циклов. Чувствительность метода возрастает с повышением числа циклов реакции, однако максимальной чувствительности только таким путем достичь нельзя, поскольку необходимо оптимизировать другие параметры, для повышения эффективности каждого цикла.

Число циклов зависит от содержания в образце нужной последовательности. Так, при выявлении уникальных генов, присутствующих в каждой клетке (при диагностике наследственных заболеваний), достаточно 20-30 циклов, если же выявляемая последовательность-мишень локализуется лишь в части клеток исследуемого клинического образца (в случае вирусной инфекции или в опухолях), то число циклов возрастает до 30-50.

ВИДЫ ПЦР. В настоящее время классический вариант метода полимеразной цепной реакции постоянно подвергается модернизации в целях увеличения спектра применения данного вида анализа, улучшению параметров реакции для исключения неточностей результатов, усовершенствования методик проведения этапов выделения нуклеиновых кислот исследуемых образцов, проведения амплификации и последующей детекции ее продуктов. В связи с этим можно выделить ряд разновидностей ПЦР:

– «Вложенная» ПЦР (Nested PCR (англ.)) - применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

– «Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR (англ.) используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезаний ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

– ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR (англ.) используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены. Данный вид анализа широко применяется при диагностике так называемых ретровирусов, к которым относятся, в частности, гепатит С и ВИЧ. Экспоненциальная амплификация при помощи ОТ-ПЦР является чувствительной методикой, с помощью которой может быть обнаружено малое количество РНК.

– Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR (англ.) проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке.

– Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.) используется для быстрого измерения количества определенной ДНК, кДНК или РНК в пробе.

– Количественная ПЦР в реальном времени (Quantitative real-time PCR (англ.) в этом методе используют флуоресцентно меченые реагенты для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления. Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР лаборатории [10].

– Touchdown (Stepdown) ПЦР (Touchdown PCR (англ.) с помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Первые циклы проводят при температуре выше температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру снижают. При определённой температуре система пройдёт через полосу оптимальной специфичности праймеров к ДНК.

– Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле. Polony - PCR Colony (англ.) акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

– ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR(англ.).

– ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR(англ.) модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч оснований и больше). Используют две полимеразы, одна из которых - Taq-полимераза с высокой процессивностью (т.е. способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая - ДНК полимераза с 3'-5' эндонуклеазной активностью. Вторая полимераза необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесенные первой.

– ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК - RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA PCR (англ.) используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (20-25 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удается добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

В молекулярной биологии ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР) характеризуется как лабораторный метод, основанный на методе ПЦР, используемый для одновременной амплификации и измерения количества заданной молекулы ДНК. Метод ПЦР Real Time включает в себя одновременно детекцию и измерение непосредственного количества копий, либо измерение копий относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов специфической последовательности ДНК в образце, т.е. позволяет оценивать ее количество - бактериальную или вирусную нагрузку.

ПЦР в реальном времени использует флуоресцентно меченые олигонуклеотидные зонды для детекции ДНК в процессе ее амплификации. Он позволяет провести полный анализ пробы в течение 20-60 мин и теоретически способен детектировать даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе.

Количество амплифицированной ДНК при ПЦР RT измеряется после каждого цикла амплификации. Для определения количества используется 2 метода:

1. Флюоресцентные красители, интеркалирующие в двух цепочечные молекулы ДНК;

2. Модифицированные дезокси-нуклеотиды, которые флюоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Часто ПЦР в RT комбинируют с ОТ-ПЦР (обратная транскрипция) для измерения малых количеств мРНК, что позволяет получать количественную информацию о содержании данной мРНК в клетке и, соответственно, позволяет судить об уровне экспрессии данного гена в отдельной клетке или ткани.

Принцип работы ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов. ПЦР в реальном времени использует TaqMan систему, контролирующую кинетику ПЦР непосредственно в ходе амплификации с использованием резонансного тушения флуоресценции. Принцип ПЦР RT показан на рис. 2. Для детекции используется зонд, несущий флуорофор и тушитель, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента. Когда флуорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Во время процесса амплификации за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы флуоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с тушителем, и генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплификата, т.е. при образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

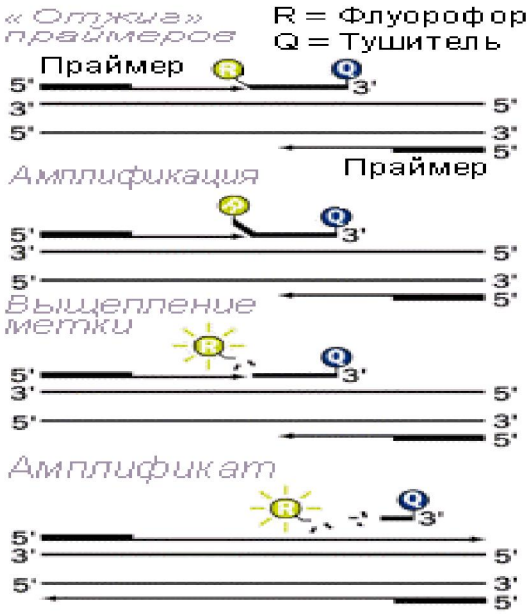

Рис. 2. Схема прохождения RT ПЦР

Преимуществами ПЦР «в режиме реального времени» являются:

– Высокая чувствительность, специфичность и универсальность;

– Гарантированное отсутствие контаминации (загрязнения образцов), так как регистрация результата анализа осуществляется непосредственно через стенку реакционной пробирки;

– Возможность наблюдения за процессом на мониторе компьютера;

– Возможность анализа точечных мутаций;

– Упрощение технологического процесса и сокращение времени анализа;

– Автоматизация и стандартизация регистрации результатов;

– Возможность количественной оценки исходной ДНК-матрицы;

– Сокращение времени анализа до 2-3 часов;

– Регистрация и учет данных в электронном формате.

Таким образом, благодаря экономии производственных площадей, уменьшению количества персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК, этот метод в последние годы успешно применяется в крупнейших санитарно-эпидемических, диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира, замещая ПЦР в ее сегодняшнем ("классическом") формате.

Применение RT ПЦР в отношении выявления ДНК или РНК - возбудителей инфекционных заболеваний целесообразно использовать в ряде конкретных случаев:

1. При оценке уровня условно-патогенных бактерий, количественное содержание которых в анализируемом образце имеет клиническую значимость. Например, в диагностике бактериального вагиноза, когда необходимо иметь достоверную информацию не только о качественном, но и о количественном составе условно-патогенных микроорганизмов, вовлеченных в патологический процесс. Применение обычного «качественного» ПЦР- анализа не дает полной диагностической информации в данном случае, так как общая встречаемость условно-патогенных микроорганизмов, например, таких как уреаплазмы, гарднереллы - более чем у 50% пациентов [11].

2. Применение ПЦР «в реальном времени» позволяет своевременно определить тактику ведения пациента, назначить лечение нуждающимся, избежать гипердиагностики и нерационального назначения антибактериальной терапии у здоровых пациенток. Метод позволяет более достоверно оценивать эффект от проводимой терапии по снижению концентрации возбудителя даже при получении повторно положительного результата ПЦР - анализа при проведении тестов-контроля излеченности [12].

3. В диагностике безусловных патогенов, таких как хламидия трахоматис, микоплазма гениталиум. Установлена прямая связь концентрации возбудителя в цервикальном канале с уровнем воспалительной реакции (числом лейкоцитов в мазках) и клиническими проявлениями инфекции. Величина бактериальной нагрузки при этом свидетельствует о степени цитопатического эффекта, позволяет определяться с тактикой лечения, оценивать риск восходящего инфицирования у беременных [13].

4. В диагностике вирусных инфекций – вируса простого герпеса (ВПГ), цитомегаловируса (ЦМВ) [14], вируса гепатитов В и С. ПЦР - диагностика ДНК ЦМВ и ВПГ в крови беременных используется как маркер возможного инфицирования плода, причем при концентрациях вируса менее 103 коп/мл, инфицирование менее вероятно, риск инфицирования увеличивается при возрастании вирусной нагрузки. Обнаружение ДНК ЦМВ в крови свидетельствует о манифестной инфекции, при этом антенатальное инфицирование плода наблюдается в 60% случаев. При исследовании проб из урогенитальных соскобов величина вирусной нагрузки свидетельствует о степени цитопатического эффекта [15, 16].

5. При выявлении наличия различных генетических аномалий, таких как транслокации, инверсии и т.д. [17].

RT ПЦР явился радикальным решением проблемы контаминаций продуктами, ПЦР стал переход к флуоресцентной детекции продуктов амплификации в закрытой системе, что исключает необходимость открывать крышки пробирок, а также трудоемкую стадию гель-электрофореза. Однако вследствие дороговизны приборов для Real Time ПЦР был создан более простой вариант детекции продуктов ПЦР в закрытой системе флуорометрии после ПЦР [18].

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПЦР. Спектр применения различных вариантов метода ПЦР неуклонно растет день ото дня, что связано с его высокими показателями чувствительности и точности результатов, о которых было сказано выше. ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах: в экологии (как способ мониторинга состояния и качества окружающей среды и продуктов питания), фармакологии, ветеринарии.

В настоящее время ПЦР широко применяется для ***обнаружения наличия генетически модифицированных компонентов*** в продуктах питания: сои, кукурузы, картофеля, томатов, риса, сахарной свеклы. И это далеко не весь перечень ГМИ растительного происхождения, определение которых возможно с помощью данного метода. Кроме того, возможно количественное определение компонентов генетически-модифицированных сельскохозяйственных культур методом ПЦР в «реальном времени» [18]. В наших исследованиях определены генетически модифицированные организмы в продуктах (колбасах, шоколадных продуктах, фруктовых соках и т.д.). Применялись тест-системы: «ПЛАНТ-СКРИН», «Терминатор Nos», «ГМ-соя-40-3-2», позволяющие определять наличие фрагментов ДНК трансгенных сои и кукурузы [19, 20].

Помимо вышеперечисленного, ПЦР-метод применяется при определении совокупности бактерий, вызывающих порчу пива, соков, вина, проведении микробиологических исследований (обнаружение E.coli, сальмонеллы, клостридии и тд.), для идентификации тканей животного происхождения (крупного рогатого скота, свинины, курицы, индейки, кролика), при идентификации фальсификаций сортов сельскохозяйственных культур (ячменя, пшеницы и др.) [21].

Криминалистика. ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления – кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически – одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью ДНК-электрофореза. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (genetic fingerprint (англ.)). ПЦР-метод применяется также для идентификации личности [22].

Установление отцовства. Хотя «генетические отпечатки пальцев» уникальны (за исключением случая однояйцевых близнецов), родственные связи все же можно установить, сделав несколько таких отпечатков. Тот же метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов. Ребенок наследует некоторые особенности генетического отпечатка обоих родителей, что даёт новый, уникальный отпечаток [22].

Клонирование генов. Клонирование генов (не путать с клонированием организмов) – это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций получение большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор - фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена - РНК или, чаще всего, белка. Таким образом, в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др. /23,24/. Схематично клонирование гена представлено на рис. 3.

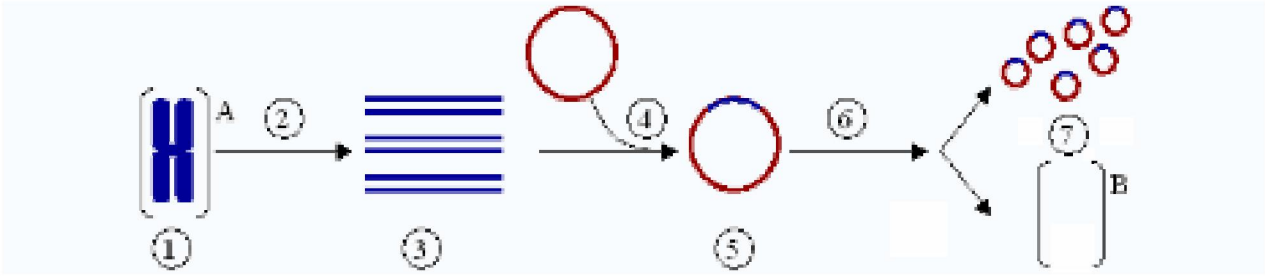

Рис. 3. Клонирование гена с использованием плазмиды. (1) Хромосомная ДНК организма А. (2) ПЦР. (3) Множество копий гена организма А. (4) Вставка гена в плазмиду. (5) Плазмида с геном организма А. (6) Введение плазмиды в организм В. (7) Умножение количества копий гена организма А в организме В

Секвенирование ДНК. Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот - ДНК и РНК) - определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от англ. sequence - последовательность). В результате получается линейное символьное описание, которое сжато резюмирует атомную структуру молекулы.

В методе секвенирования с использованием меченых флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотидов ПЦР является неотъемлемой частью, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются производные нуклеотидов, меченые флуоресцентной или радиоактивной меткой. Это останавливает реакцию, позволяя определить положения специфических нуклеотидов после разделения синтезированных цепочек в геле [25].

В настоящее время ПЦР стала основным методом проведения мутагенеза. Использование ПЦР позволило упростить и ускорить процедуру проведения мутагенеза, а также сделать её более надёжной и воспроизводимой [25].

Практическое здравоохранение. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику различных заболеваний: онкологических, генетических, инфекционных и вирусных.

Амплификация гена или его фрагмента для доказательства наличия инфекционного возбудителя или идентификации генетической мутации - наиболее удобный и доступный метод в современной диагностике. До ПЦР и других методов амплификации нуклеиновых кислот для целей использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации меченых радиоактивным изотопом или флуоресцентным веществом специфических олигонуклеотидных зондов с

образцом выделенной ДНК. Однако ДНК - зондовая диагностика имеет существенные ограничения как по своей чувствительности, так и по трудоемкости и длительности: для ее осуществления необходимо выделить достаточно интактную ДНК из не менее чем 10 000 клеток, а сам процесс гибридизации не может быть полностью автоматизирован. Тогда как при ПЦР предварительная быстрая амплификация in vitro позволяет детектировать единичные микробные или мутантные клетки и в большинстве случаев делает необязательным применение для детекции ДНК-гибридизацию. Амплифицированная ДНК без предварительного клонирования может быть подвергнута секвенированию для идентификации точечных мутаций [26].

Тест-системы, основанные на принципе амплификации ДНК, позволяют обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.

Нами определялась распространенность в Карагандинской области методом ПЦР таких инфекционных агентов, как возбудители хламидиоза, микоплазмоза, уреаплазмоза, гарднереллеза, трихомониала, гепатитов B, C, D, G, цитомегаловируса и др. [27].

Персонализированная медицина. Известно, что большинство лекарств действуют не на всех пациентов, для которых они предназначены, а лишь на 30-70 % их числа. Кроме того, многие лекарства оказываются токсичными или аллергенными для части пациентов. Причины этого - отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого - менее. Для того чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием (англ. *prospective genotyping*).

Применение ПЦР анализа в службе крови. Применение метода ПЦР для подтверждения отсутствия инфекций или вирусов в донорской крови особенно актуально в период «серонегативного окна» (ранние сроки после заражения от 2 до 6 недель, характеризующиеся отсутствием выработки антител к антигенам), когда обычные серологические методы не работают, содержание вирусов гепатитов B, C или ВИЧ в крови может быть весьма велико из-за отсутствия иммунного ответа. Однако именно в этот период существует риск клинического заражения реципиентов вируссодержащей кровью [28].

ПЦР-анализ в онкологии. Согласно медицинской статистике раковые заболевания являются одной из основных причин смертности среди населения стран бывшего СССР, что обусловлено воздействием последствий аварии на Чернобыльской АЭС, воздействием ионизирующей радиации Семипалатинского испытательного ядерного полигона и многими другими обстоятельствами [29, 30].

Применение метода ПЦР в области диагностики новообразований стало новой вехой в лечении онкологических заболеваний, поскольку тестирование молекулярно-генетических онкомаркеров предполагает выявление дефектов структуры и функциональную активность нуклеиновых кислот протоонкогенов, антионкогенов и биологических канцерогенов (вирусов) [31]. Высокая чувствительность данного метода позволяет определить аномальную ДНК в ничтожно малых количествах, что означает выявление неопластических клеток на доклинической стадии опухолевого процесса [32].

ПЦР в диагностике лейкозов. Еще в конце 80-х - начале 90-х годов был сделан вывод о том, что хромосомный анализ является одним из важнейших прогностических методов для выявления причин возникновения различных форм лейкозов. Этот вывод подтвержден данными больших многоцентровых исследований самых последних лет [33].

Цитогенетические изменения, выглядящие при световой микроскопии абсолютно идентичными, оказываются разными, когда для их изучения используются молекулярно-генетические методики, такие как флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) и полимеразная цепная реакция (PCR). С помощью этих методов установлено, что при лейкозах имеют место более разнообразные генетические изменения, чем это было обнаружено при стандартном хромосомном анализе [34]. В настоящее время проводятся исследования на предмет обнаружения транслокаций, приводящих к развитию различных форм лейкозов [35].

Применение ПЦР позволяет не только определять широкий спектр транслокаций, что важно для постановки диагноза и прогноза рецидива, а также отслеживать эволюцию опухоли.

Заключение. На вооружении ученых, врачей, работников СЭС из многих сфер развития науки и в практической повседневной деятельности на сегодняшний день находятся самые разнообразные лабораторные методы исследования. Однако ПЦР-анализ обладает рядом существенных преимуществ перед остальными методами лабораторной диагностики.

Универсальность метода ПЦР делает возможным его применение как в медицинской диагностике различных инфекционных, онкологических, наследственных заболеваний; в генной инженерии при клонировании генов растительных, животных и микроорганизмов, так и в работе различных организаций по контролю за качеством поступающей на наши рынки импортных и отечественных продуктов питания.

Высокая чувствительность и специфичность ПЦР - метода, проверенные временем и тщательно апробированные на практике, позволяют применять его при изучении минимальных объемов образца практически любого биологического материала, будь то слюна, кровь, биоптаты тканей живого организма, или определять аномальную ДНК, что означает выявление мутаций, являющихся причинами наследственных и онкологических заболеваний, либо же генетически-модифицированные ингредиенты, входящие в состав различных пищевых продуктов.

Спектр применения ПЦР-анализа неуклонно расширяется год от года, что связано, прежде всего, с тем, что данный метод зарекомендовал себя как наиболее простой, быстрый, специфичный и высокоточный метод современной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1 Mulis K.B., Ferre F. The polymerase chain reaction // Birkhauser, Boston, Mass. – 1994. – P. 241-255.

2 Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – М.: Мир, 2002. – 589 с.

3 Жимулев И.Ф. Общая молекулярная генетика. – Новосибирск: Сибирское университетское издание, 2003. – 478 с.

4 K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase//Science. – 1988. – Vol. 239. – P. 487-491.

5 Venter J. et al. The sequence of the human genome // Science. – 2001. – Vol. 291. – P. 1304-1311.

6 Kleppe K. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // J. Mol. Biol. – 1971. – Vol. 56. – P. 341-361.

7 Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж и др. Молекулярная биология. – М.: Мир, 1994. – Т. 3. – 312 с.

8 Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П. Биохимия. – М.: Мир, 2001. – Т. 66, № 3. – С. 293-317.

9 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stofel S., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a termostable DNA polymerase // Science. – 1988. – Vol. 239. – P. 478-491.

10 Ёлова А.А., Федороф Н.А., Жибурт Е.Б. Внедрение ПЦР в службу крови проблемы и перспективы. Центр крови Минздрава России, Москва. – http: // www. transfusion.ru

11 Морс С., Бек-Сагю К.М., Мардх П.А. Рекомендации по лабораторной диагностике заболеваний, передаваемых половым путем. Заболевания, передаваемые половым путем / Под ред. К. М. Холмс. – Мир, 1998. – Т. 53. – 324 с.

12 Федоров Н.А. Генодиагностика инфекций методом ПЦР // Педиатрия. – 1995. – № 4. – С. 69-70.

13 Жданов А.В., Малинина Э.В., Файзуллин Л.З. Выявление хламидий методом полимеразной цепной реакции при патологиях репродуктивной системы мужчин и женщин // Бюллетень экспериментальной биологии. – 1996. – № 5. – С. 547-550.

14 Bosch F.X., Manos M.M. and Munoz N. Prevalence of HPV in cervical cancer: a World Wide perspective // J. of the National Cancer Institute. – 1995. – Vol. 87. – P. 796-802.

15 Zur Hausen H. and de Villiers E.M. Human papillomavirus // Annual Reviews in Microbiology. – 1994. – V. 48. – P. 427-447.

16 H.R. Mc Murray, D. Nguyen, T.F. Westbrook et al, Biology of human papillomaviruses // Int. J. of Exp. Path. – 2001. – Vol. 82. – P.15-33.

17 Radich J. P., Gehly G., Gooley T., Bryant E., Clift R. A., Collins S., Edmands S., Kirk J., Lee A., Kessler P., Schoch G., Buckner C. D., Sullivan K. M., Appelbaum F. R., Thomas E. D. Polymerase Chain Reaction Detection of the BCR-ABL Fusion Transcript After Allogeneic Marrow Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia: Results and Implications in 346 Patients // Blood. – 1995. – Vol. 85(9). – P. 2632-8.

18 Лебедев В. Генетическая трансформация растений // Наука и жизнь. – 2003. – № 11. – С. 6-14.

19 Головченко Н.М., Погосян Г.П., Ли К.Г.Изучение генетически модифицированных ингредиентов в колбасных продуктах // IV междунар. научно-практич. конф. «Научное пространство на «Европа – 2008» (15-30 апреля). – Т. 21. – София, 2008. – С. 20-24.

20 Коновалова А.А., Погосян Г.П., Ли К.Г. Изучение генетически модифицированных ингредиентов в шоколадных продуктах // IV mezinarodni vedecko-prakticka konference "Vedecke myslene inflacniho stoleti – 2008", «Научная мысль информационного века» (15-31 марта). – Прага, 2008. – С. 6-8

21 Лихтенштейн К., Дрейпер Дж. Генетическая инженерия растений//Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. – М.: Мир, 1988. – С. 315-380.

22 Erlich H.A., Gelfard D., Sninsky J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction // Science. – 1991. – Vol. 252. – P. 1643-1651.

23 Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. – М.: Мир, 1989. – 368 с.

24 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

25 Черемис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. – М.: Наука, 1999. – 429 с.

26 Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. Cancer incidence, mjrtality and prevalence worldwide. Version 1.0 / I ARC Cancer Base 5. Lyon: IARCPress.

27 Погосян Г.П., Ли К.Г., Жумина А.Г. Изучение амплификации ДНК некоторых бактериальных агентов, вызывающих урогенитальные заболевания // Междунар. науч.-прак. конф. «Повышение качества образования и науч. исследований» в рамках VI Сатпаевских чтений (12-14 апреля). – Екибастуз, 2007. – С. 744-749.

28 Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов. Молекулярно-клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. – С. 395-425.

29 Тургунова Л.Г., Умбеталина Н.С., Досмагамбетова Р.С. Заболеваемость лейкозами в Республике Казахстан // Гематология и трансфузиология. – 2006. – Т. 51, № 2. – С. 18-22.

30 Wingo P.A., Tong T., Bolden S. Cancer Statistics // CA Cancer J. Clin. – 1995. – Vol. 45. – P. 8-30.

31 Black R.J., Bray F., Ferlay J., et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990 // European J. of Cancer. – 1997. – Vol. 33. –P.1075-1107.

32 Злокачественные новообразования в России в 1998 г. (заболеваемость и смертность) // Под ред. В. И. Чиссова, В. В. Старинского, П. В. Ременник. – М.:Мир, 2000. – 36 с.

33 Radich J. P., Gooley T., Bryant E., Chauncey T., Clift R., Beppu L., Edmands S., Flowers M. E. D., Kerkof K., Nelson R., Appelbaum F. R. The Significance of Bcr-Abl Molecular Detection in Chronic Myeloid Leukemia Patients "Late," 18 Months or More After Transplantation // Blood. – 2001. – Vol. 98(6). – P. 1701-1707.

34. Radich J.P., Gooley T., Bryant E., Chauncey T., Clift R., Beppu L., Edmands S., Flowers M.E.D., Kerkof K., Nelson R., Appelbaum F.R. The Significance of Bcr-Abl Molecular Detection in Chronic Myeloid Leukemia Patients "Late," 18 Months or More After Transplantation//Blood. – 2001. – Vol. 98(6). – P. 1701-1707.

35. Коновалова А.А., Погосян Г.П., Ли К.Г. Молекулярно-генетический анализ транслокаций 9;22 у больных лейкозами, проживающих в Карагандинской области // Вестник КарГУ. Серия Биология, медицина, география. – 2009. – № 1(53). – С. 42-46.

А. А. Коновалова, Н. М. Головченко, А. Р. Манасян, Г. П. Погосян, П. К. Ли

ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯ (МҮМКІНДІК ПРИНЦИПТЕРІ

Мақалада полимеразды тізбекті реакцияның принциптері ашылып айтылады (ПТР), оның мүмкіндіктері, қолдану шектері, ПТР-ның ерекшелігі және кезеңдері қарастырылады. Амплификация реакциясы кезінде қолданылатын праймерлер және басқа да компоненттер, ферменттер сипаттамасы, ПТР-дың әртүрлі ортасында нақты уақыт кезіндегі ПТР-дың ерекшелігі көрсетілген.

A. A. Konovalova, N. M. Golovchenko, A. R. Manassyan, G. P. Pogossyan, P. C. Lee

POLIMERASE CHAIN REACTION (PRINCIPLES, POSSIBILITIES)

The article describes principles of polimerase chain reaction (PCR) and its possibilities. Stages and advantages of PCR are also discussed. They describe ferments, primers and other components used at reactions of amplification. They present kinds of PCR and advantages of real-time methods.