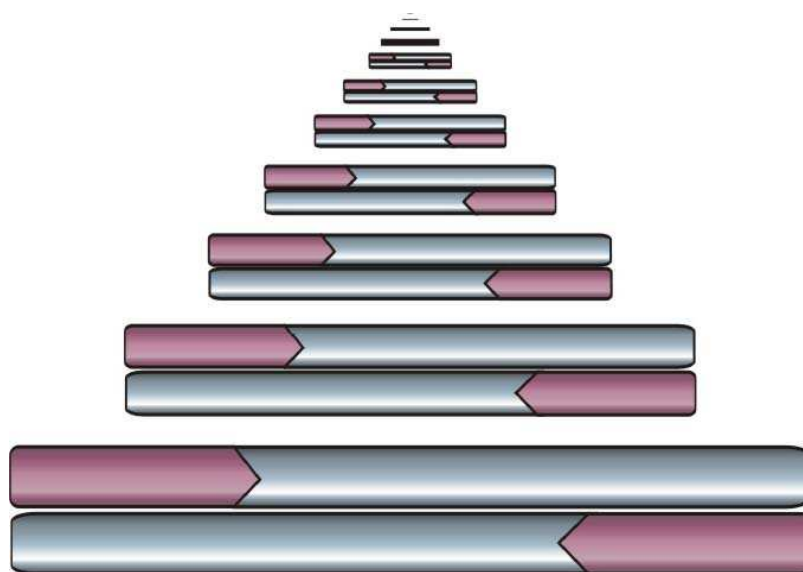


ДФК-Технология

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ



МОСКВА 1998

Введение.....	3
1. Перспективы практического использования ПЦР-диагностики.....	5
2. Механизм полимеразной цепной реакции.....	6
2.1. Компоненты реакционной смеси.....	6
2.2. Циклический температурный режим	6
2.3. «Эффект плато»	8
3. Стадии постановки ПЦР.....	8
3.1. Подготовка пробы биологического материала	8
3.2. Амплификация.....	10
3.2.1. Способ постановки ПЦР с использованием «горячего старта»	10
3.2.2. Приборное обеспечение.....	11
3.2.3. Амплификация молекул РНК.....	11
3.3. Детекция.....	12
3.3.1. Метод горизонтального электрофореза	12
3.3.2. Метод вертикального электрофореза.....	13
3.3.3. Метод гибридизационных зондов	13
4. Контроль за прохождением реакции амплификации.....	14
4.1.1. Положительные контроли.....	14

4.1.2. Внутренние контроли	14
5. «Nested» ПЦР.....	15
6. Полуколичественный анализ.....	16
7. Проблема контаминации.....	17
8. Устройство ПЦР-лаборатории	18
9. Основные принципы подбора праймеров.....	20
10. Как выбрать ПЦР-набор.....	20
Заключение	22

Введение

Полимеразная цепная реакция – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

Основные принципы использования праймеров (коротких искусственно синтезированных молекул ДНК) и состав ингредиентов, входящих в реакционную смесь для получения копий ДНК впервые были описаны *Kleppe* с соавт. в 1971 году. Однако тогда еще не была продемонстрирована основная черта ПЦР -экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК как результат реакции.

В 1983 году сотрудник фирмы «Cetus» *Kary Mullis* предложил метод, ставший в дальнейшем известным как полимеразная цепная реакция. Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Следует отметить, что этому открытию сопутствовало развитие некоторых технологий. В частности, появление приборов, позволяющих автоматически синтезировать одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды). В тот же период были обнаружены уникальные микроорганизмы, живущие в гейзерах. Их ферментативная система, в частности ДНК-полимераза, выдерживает высокие температуры горячих источников и сохраняет свою биологическую активность вплоть до 95°C, что является необходимым условием для проведения полимеразной цепной реакции.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 году *Saiki* с соавт. опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β-глобина. С этого момента количество публикаций, в которых авторы сообщали о применении ПЦР в своих работах, стало увеличиваться в геометрической прогрессии. Метод приобрел такую популярность, что сегодня уже трудно представить работу в области молекулярной биологии без его

использования. Особенно бурное развитие метод полимеразной цепной реакции получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные лазерные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Если в недавнем прошлом для расшифровки последовательности ДНК размером в 250 пар нуклеотидов (п.н.) требовалась неделя, то современные лазерные секвенаторы позволяют определять до 5000 п.н. в день. Это в свою очередь способствует значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК различных биологических объектов. В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода.

1. Перспективы практического использования ПЦР-диагностики

По данным журнала LabMedica International с 1995 года наблюдается увеличение расходов на ПЦР-диагностику, что является показателем роста использования ПЦР в практической медицине. Американские ученые отмечают, что в 1996 г. на ДНК-диагностику было потрачено 181.6 миллионов долларов, а к 2003 году, по прогнозам экспертов, затраты возрастут до 1400.0 миллионов долларов.

По данным того же журнала в настоящее время наиболее быстро развиваются пять основных направлений ПЦР-диагностики:

- . • **диагностика инфекционных заболеваний;**
- . • **диагностика онкологических заболеваний;**
- . • **диагностика генетических заболеваний;**
- . • **идентификация личности;**
- . • **диагностика патогенов в пище.**

Главным направлением развития рынка ДНК-диагностики является диагностика инфекционных заболеваний. В отличие от иммуноферментного анализа (ИФА), который широко используется в этой области, ДНК-диагностика позволяет определять непосредственно возбудителя заболевания. С помощью усовершенствованных схем постановки ПЦР можно выявлять патогенные микроорганизмы в очень низкой концентрации.

ДНК-диагностика онкологических заболеваний ограничивается небольшим, но активно возрастающим количеством сведений о генах, ассоциированных с опухолевыми заболеваниями. В рамках проекта «Геном человека» ученые продолжают поиски мутаций, ассоциированных с этой патологией.

Диагностика генетических заболеваний, также как и онкологических, может развиваться только вслед за проведением широких научных исследований генома человека. Медицинское сообщество уже осознало важность изучения генетической основы заболеваний, а также возможность диагностики и начала лечения болезни до появления ее симптомов.

По оценкам экспертов, идентификация личности, включающая судебную медицину, криминалистику, трансплантацию органов и тканей, одно из наиболее крупных и быстрорастущих направлений на рынке ДНК-диагностики. Ожидается ежегодный прирост расходов в этом секторе на 21,3%.

Рынок ДНК-диагностики патогенов в пище является самым скромным. В настоящее время на ДНК-диагностику микробного загрязнения производимых продуктов питания приходится менее 5% от общего количества методов, применяемых для тестирования загрязненности продуктов (культуральные методы и методы с использованием моноклональных антител). Однако методы ДНК-диагностики являются, по оценкам экспертов, более быстрыми, точными и информативными, что в ближайшее время, по-видимому, приведет к резкому возрастанию их доли на рынке ДНК-диагностики в этой области.

2. Механизм полимеразной цепной реакции

2.1. Компоненты реакционной смеси

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов:

Праймеры –искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Тaq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности (рис. 1, 2).

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер -смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

2.2. Циклический температурный режим

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (рис. 3):

1. **1. Денатурация.** На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.
2. **2. Отжиг.** На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название «отжиг» (от англ. «annealing»).

праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин (см. рис. 1). Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит (рис. 4).

После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с

3'-конца праймера.

3. Элонгация (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (см. рис. 2). Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой: $A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n$, где A - количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации; M – начальное количество ДНК-мишеней; n -число циклов амплификации. Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

n

$$A = M \cdot (1+E)^n, \text{ где}$$

E – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты (см. рис. 2), однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле

$$K = M \cdot n, \text{ где}$$

K – количество длинных продуктов амплификации.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

2.3. «Эффект плато»

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает. Это связано с так называемым «эффектом плато».

Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации, когда количество ампликонов достигает $0,3 - 1$ пмолей.

В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют: утилизация субстратов (дНТФ и праймеров); стабильность реагентов (дНТФ и фермента); количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы; неспецифические продукты или праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу; концентрация специфического продукта и неполная денатурация при высокой концентрации продуктов амплификации. Чем меньше начальная концентрация ДНК-мишени, тем выше риск выхода реакции на плато. Этот момент может наступить до того, как количество специфических продуктов амплификации будет достаточно, чтобы их можно было проанализировать. Избежать этого позволяют лишь хорошо оптимизированные тест-системы.

3. Стадии постановки ПЦР

ПЦР-анализ состоит из трех стадий (рис. 5).

3.1. Подготовка пробы биологического материала

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации.

Иногда бывает достаточно прокипятить образец в течение 5-10 минут, однако в большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная *Marmur*. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий

запах веществами, как фенол и хлороформ.

Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный *Boom* с соавторами. Этот метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента -гуанидина тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего буфера. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов. Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

Другая группа методов пробоподготовки основана на использовании ионообменников типа Chlex, которые, в отличие от стекла, сорбируют не ДНК, а, наоборот, примеси, мешающие реакции. Как правило, эта технология включает две стадии: кипячение образца, в результате чего клеточные стенки разрушаются, а нуклеиновые кислоты выходят в раствор; и сорбция примесей на ионообменнике. Метод чрезвычайно привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев он пригоден для работы с клиническим материалом. К сожалению, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников. Кроме того, клеточные стенки некоторых микроорганизмов не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

При массовом скрининге, когда важно получить статистические данные, допускается использование простых методов с применением детергентов или обработки биологического материала щелочами с последующей их нейтрализацией. В то же время, использование подобных методов пробоподготовки для клинической диагностики может приводить к ложноотрицательным результатам, вследствие использования в реакционной смеси некачественного препарата ДНК.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

3.2. Амплификация

Для проведения реакции амплификации необходимо приготовить реакционную смесь и внести в нее анализируемый образец ДНК. При этом важно учитывать некоторые особенности отжига праймеров. Дело в том, что, как правило, в анализируемом биологическом образце присутствуют разнообразные молекулы ДНК, к которым используемые в реакции праймеры имеют частичную, а в некоторых случаях значительную, гомологию. Кроме того, праймеры могут отжигаться друг с другом, образуя праймер-димеры. И то, и другое приводит к значительному расходу праймеров на синтез побочных (неспецифических) продуктов реакции и, как следствие, значительно уменьшает чувствительность системы. Это затрудняет или делает невозможным учет результатов реакции при проведении электрофореза.

3.2.1. Способ постановки ПЦР с использованием «горячего старта»

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции амплификации, используют подход, получивший название «горячий старт» (от англ. «hot-start»). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Дело в том, что в зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления (T_m), при которой образование водородных связей нестабильно. Если температура системы превышает T_m , праймер не в состоянии удерживаться на цепи ДНК и денатурирует. При соблюдении оптимальных условий, т.е. температуры отжига, близкой к температуре плавления, праймер образует двухцепочечную молекулу только при условии его полной комплементарности и, таким образом, обеспечивает специфичность реакции. Существуют различные варианты реализации «горячего старта»:

1. внесение в реакционную смесь Taq-полимеразы во время первого цикла после прогрева пробирки до температуры денатурации;
2. разделение ингредиентов реакционной смеси прослойкой, например, парафина или воска на части (в нижней - праймеры, в верхней - Taq-полимераза и ДНК-мишени), которые смешиваются при достижении температуры плавления материала прослойки (~45-85°C) (рис. 6);
3. использование моноклональных антител к Taq-полимеразе. Фермент, связанный моноклональными антителами, становится активным лишь после стадии первой денатурации,

когда моноклональные антитела необратимо денатурируют и освобождают активные центры Taq-полимеразы.

Во всех перечисленных случаях, даже если неспецифический отжиг произошел до начала температурного циклирования, элонгации не происходит, а при нагревании комплексы праймер-ДНК денатурируют, поэтому неспецифические продукты не образуются. В дальнейшем температура в пробирке не опускается ниже температуры плавления, что обеспечивает образование специфического продукта амплификации.

3.2.2. Приборное обеспечение

Важным фактором воспроизводимости реакции амплификации является приборное обеспечение. Кроме надежности амплификатора и точности поддержания температур следует упомянуть о таком важном качестве прибора, как использование «активного регулирования», позволяющего добиваться достижения нужной температуры реакционной смеси внутри пробирки в значительно более короткие сроки, чем при обычном регулировании. Тем самым, сокращается время реакции (в 1,5-2 раза); увеличивается время сохранения активности Taq-полимеразы, что позволяет увеличить количество циклов амплификации, снизить риск неспецифического отжига праймеров, а следовательно, повысить чувствительность и специфичность реакции.

К приборам такого класса следует отнести модели амплификаторов «PCR - System 2400» или «Model 9600» (Perkin-Elmer, США), «TouchDown» (HyBaid, Великобритания), «PTC 200» (MJ Research, США), «Терцик» (НПФ ДНК-Технология, Россия). При использовании приборов с «активным регулированием» следует учитывать тип ПЦР-пробирок и строго придерживаться рекомендаций фирм-изготовителей. Это объясняется тем, что при высоких скоростях изменения температуры минимальные отличия в конфигурации гнезд амплификатора и формы конуса ПЦР-пробирки могут сводить на нет преимущества «активного регулирования» и приводить к снижению чувствительности реакции из-за температурных погрешностей, связанных с ухудшением теплового контакта.

3.2.3. Амплификация молекул РНК

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода. Например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирус

инфлюэнцы, пикорнавирусы и т.д.) представлены именно РНК. В их жизненных циклах отсутствует промежуточная фаза превращения в ДНК. При выявлении РНК необходимо в первую очередь перевести ее в форму ДНК. Для этого используют фермент обратную транскриптазу, который выделяют из двух различных вирусов: *Avian myeloblastosis virus* и *Moloney murine leukemia virus*. Использование этих ферментов связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, они термолабильны и поэтому могут быть использованы при температуре не выше 42°C. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5%. Предпринимаются попытки обойти этот недостаток используя в качестве обратной транскриптазы термостабильную полимеразу, полученную из термофильного микроорганизма *Thermus Thermophilus*, проявляющую транскриптазную активность в присутствии Mn^{2+} . Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, должны присутствовать праймеры в качестве затравки и смесь 4-х дНТФ как «строительный материал».

После проведения реакции обратной транскрипции полученные молекулы кДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР.

3.3. Детекция

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в жизни встречается не часто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда из-за их присутствия не удается амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

3.3.1. Метод горизонтального электрофореза

Для визуализации результатов амплификации используют различные методы. Наиболее распространенным на сегодняшний день является метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, -например, бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гелевого электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254, 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной. Поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех-или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

3.3.2. Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид. Его проводят в специальной камере для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК разных размеров с точностью до одного нуклеотида. Приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного. Кроме того, акриламид является

токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

3.3.3. Метод гибридизационных зондов

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов (искусственно синтезированных участков ДНК) с продуктами амплификации, содержащими ту или иную метку, детектируемую специальными приборами. В этом случае чаще всего используют плащечный формат и систему детекции, аналогичную используемой в ИФА. Гибридизационные методы не получили пока широкого распространения из-за их дороговизны, длительности и трудоемкости методических манипуляций. Однако они интересны с точки зрения массового скрининга, т.к. при наличии соответствующего оборудования могут быть легко автоматизированы.

4. Контроль за прохождением реакции амплификации

4.1.1. Положительные контроли

Положительный контроль позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. Для этого используют препарат ДНК, содержащий сайты для отжига праймеров: например, ДНК искомого микроорганизма или клонированные специфические участки его генома. Неспецифические ампликоны отличаются по размеру от ампликонов, образуемых в результате амплификации с контрольным препаратом ДНК. Они могут быть как большего, так и меньшего размера по сравнению с положительным контролем. В худшем случае их размеры могут совпадать и читаются в электрофореze как положительные.

Для контроля специфичности образуемого продукта амплификации можно использовать гибридизационные зонды, меченые флюоресцентными метками или радиоактивными изотопами и взаимодействующими с ДНК в соответствии с теми же принципами, что и праймеры.

4.1.2. Внутренние контроли

Препарат ДНК, подготовленный к ПЦР из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого

возбудителя. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этой цели в каждую пробирку добавляют дополнительный, так называемый внутренний контроль. Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Для инфекционных тест-систем иногда используют, например, β -глобиновый ген, к концам которого с помощью генно-инженерных манипуляций «пришивают» участки ДНК, гомологичные праймерам, входящим в состав тест-системы (рис. 7).

При отсутствии полосы внутреннего контроля и специфической полосы ДНК результат следует считать недостоверным. В этом случае для данного исследуемого образца рекомендуется перевыделить ДНК.

Если внутренний контроль внести в реакционную смесь, то он станет такой же мишенью для отжига праймеров, как и ДНК искомого возбудителя инфекции. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз. В результате, если внести ДНК внутреннего контроля в реакционную смесь вместе с испытуемым образцом, то независимо от наличия микроорганизма в биологическом образце, внутренний контроль станет причиной образования ампликонов, отличающихся по размеру от специфических ампликонов, получаемых после постановки ПЦР в присутствии специфической ДНК микроорганизма. Наличие ампликонов внутреннего контроля в реакционной смеси будет свидетельством нормального прохождения реакции амплификации и отсутствия ингибиторов. Если ампликоны нужного размера не образовались, но не образовались также и ампликоны внутреннего контроля, можно сделать вывод о возникшей проблеме при прохождении ПЦР как следствие наличия в анализируемом образце нежелательных примесей, от которых следует избавиться, либо технологических нарушениях. В любом случае результат реакции следует признать недостоверным.

Важно отметить, что если в реакционной смеси находится нужная ДНК, то эффективность ее амплификации может заметно снижаться из-за конкуренции за праймеры с ДНК внутреннего контроля. Это особенно заметно при низких концентрациях ДНК в испытуемом образце и может приводить к ложноотрицательным результатам. Поэтому концентрация внутреннего контроля должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомым молекул ДНК. При этом следует быть готовым к тому, что количество образцов, в которых внутренний контроль не будет срабатывать, и, следовательно, подлежащих перестановке, будет изменяться пропорционально

используемому методу пробоподготовки, в соответствии с качеством получаемого препарата ДНК.

5. «Nested» ПЦР

Одним из способов повысить чувствительность реакции является применение метода «nested» (гнездной) амплификации. Суть его заключается в последовательном использовании двух пар праймеров – внешней и внутренней. После использования первой пары праймеров продукт амплификации переносят в другую пробирку с внутренней парой праймеров. Иногда вместо «nested» амплификации используют процесс реамплификации. В этом случае проводят дополнительный раунд амплификации, в котором используют прежнюю пару праймеров, а в качестве ДНК-мишени – продукт первой реакции амплификации.

Такая схема постановки амплификации более трудоемка, поскольку, как правило, делает необходимым постановку двух реакций амплификации вместо одной и требует особенно тщательного обустройства лабораторных помещений, позволяющих гарантированно избегать контаминации продуктами реакции после использования внешней пары праймеров. К «гнездной» амплификации или реамплификации прибегают лишь в особых случаях, так как современные ПЦР-наборы позволяют добиваться тех же результатов иными средствами.

6. Количественный ПЦР анализ

Для оценки количества ДНК-мишени в реакционной смеси используют специальные подходы, известные под общим названием количественного ПЦР-анализа. Для проведения количественного анализа используют специальные ДНК-амплификаторы с оптической насадкой (амплификаторы с детекцией в реальном времени, Real-Time PCR Cyclers), позволяющей детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки. Для калибровки количественных тест-систем используют препараты специфической ДНК с известной концентрацией (точно определенной другими методами).

К приборам, позволяющим получать количественные результаты ПЦР анализа, следует отнести модели «iCycler IQtm» (Био-Рад, США), «COBAS Amplicor» (Roche, США), «ABI PRISM 7000» (ABI, США), «RotorGene» (Corbett Research, Австралия), Smart Cycler (Cepheid, США), «ДНК-Технология, модель 322» (ДНК-Технология, Россия) и целый ряд других. Эти приборы позволяют следить за кинетикой накопления продуктов амплификации. Обычно для этого в реакционную смесь вводят гибридизационные зонды, в состав которых

входят нуклеотиды, меченные особыми реактивами – флуорофором и тушителем. Флуорофоры способны излучать энергию лишь в свободном от тушителя состоянии. На стадии отжига происходит гибридизация зондов с внутренними участками ампликонов. В процессе элонгации Таq-полимераза разрушает зонды за счет своей экзонуклеазной активности. Это приводит к попаданию меченых нуклеотидов в раствор, где они начинают флуоресцировать (рис. 8). Интенсивность флуоресценции фиксируется специальным детектором и пропорциональна количеству продуктов амплификации. Если гибридизация не проходит, то зонд остается целым, а флуорофоры, входящие в его состав, не дают излучения.

При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами в которых заведомо известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Более трудоемким и менее надежным вариантом оценки количества специфической ДНК является метод разведений. Детекцию продуктов амплификации проводят методом электрофореза или гибридизацией с ДНК-зондами (ГиФА анализ), определяя количество работающих разведений и сравнивая их с контрольными образцами с известной концентрацией ДНК.

Следует отметить, что для выполнения количественного ПЦР анализа допускается использование только препаратов ДНК с высокой степенью очистки, поскольку существуют примеси, которые по-разному влияют на эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК. При использовании упрощенных методов выделения ДНК в большинстве случаев не представляется возможным заранее предсказать количество и состав примесей в клинических образцах.

Известно, что в некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, что может существенно исказить значение реального количества ДНК в образце. Для контроля за такими потерями в образец перед пробоподготовкой вносят внутренний контроль, количество которого определяют вместе с количеством ДНК инфекционного агента.

Однако, даже точное знание количества возбудителей в конкретном клиническом образце далеко не всегда может дать полное представление об инфекционном процессе, например, из-за различной локализации и вирулентности микроорганизмов, а также состояния иммунной системы организма хозяина. В настоящее время идет активное накопление данных по использованию результатов количественной ПЦР в диагностических

целях.

Таким образом, существующие варианты полуколичественного анализа пока еще не имеют большой практической ценности для рутинного клинического тестирования. В то же время их польза неоспорима при оценке эффективности терапии при некоторых инфекционных заболеваниях.

7. Проблема контаминации

Потенциально высокая чувствительность полимеразной цепной реакции делает совершенно необходимым особенно тщательное устройство ПЦР-лаборатории. Это связано с наиболее острой проблемой метода – контаминацией.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Таковыми мишенями могут быть продукты реакции, попадающие во внешнюю среду на этапе детекции из пробирок, в которых успешно прошла амплификация, либо специфическая ДНК из образцов на этапе пробоподготовки.

Существует несколько способов борьбы с этим неприятным явлением. Одним из них является использование фермента N-урацил-гликозилазы (УГ). В основе этого метода лежит способность УГ расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на дУТФ (урацил), и после термоциклирования все образующиеся в пробирке ампликоны будут содержать урацил. Если до амплификации в реакционную смесь добавить УГ, то попавшие в реакционную смесь ампликоны будут разрушены, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации.

Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, которые активируются кратковременным облучением ультрафиолетовым светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации.

Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идет со 100% эффективностью и, соответственно, после инактивации продуктов амплификации из миллиардов копий амплифицированного фрагмента хотя бы несколько останутся целыми, что существенно снижает ценность такого подхода. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе пробоподготовки.

Таким образом, оба эти метода лишь в некоторой степени позволяют устранить источник контаминации и не гарантируют от ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Есть третий способ борьбы с результатами контаминации, рассматриваемый скорее как казусный – значительное уменьшение количества циклов реакции (до 25-30 циклов). Но даже при таком подходе риск получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов велик.

Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать отрицательными контролями. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать воду из комнаты пробоподготовки (после каждого десятого клинического образца желательно обрабатывать вместо биологического образца пробирку с водой).

Все реактивы рекомендуется хранить разлитыми на отдельные порции (аликвоты).

Если все же, несмотря на принятые меры, обнаружены следы контаминации, то все используемые порции реактивов следует заменить на новые, а все поверхности помещения, оборудования, пипеток и пр. необходимо обработать 0,1 М HCl, либо хлорсодержащими препаратами, например, ДП-2Т, рекомендуемым Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии.

Таким образом, несмотря на пользу преамплификационных мероприятий, направленных на инактивацию молекул ДНК, служащих причиной возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, наиболее радикальным средством является заранее *ТЩАТЕЛЬНО ПРОДУМАННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ*.

8. Устройство ПЦР-лаборатории

ПЦР-лаборатория должна быть разделена на три зоны – по числу технологических операций:

- . • Зона подготовки реакционной смеси («чистая» зона);
- . • Зона пробоподготовки;
- . • Зона детекции.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксиками. Полезно иметь устройство фильтрации воздуха.

Если первую и вторую зоны в крайнем случае допускается объединить (при наличии специальных боксов), то *зона детекции должна размещаться как можно дальше от двух других зон (другой этаж, другое здание) и иметь не связанную с другими зонами систему*

вентиляции. Это является одним из наиболее категорических требований при организации ПЦР-лаборатории.

Кроме того, желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Все производственные комнаты должны быть снабжены коротковолновыми ультрафиолетовыми лампами.

Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в направлении из «чистой» зоны в зоны пробоподготовки и детекции.



Клинический материал, поступивший в лабораторию, должен быть как можно быстрее обработан в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью из «чистой» зоны для внесения в них препаратов ДНК. После этого пробирки помещают в амплификатор и, по окончании термоциклирования, не открывая крышек, переносят в зону детекции

Все операции (пробоподготовка, подготовка реакционной смеси, электрофорез) должны выполнять разные люди.

Для обработки клинических образцов должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие вертикальный поток воздуха для безопасности персонала при работе с инфекционным материалом, а также предусматривающие возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

Инактивацию биологического материала проводят в автоклаве в течение 1 часа при 1,5 атм. Допускается использование настольных автоклавов.

Запрещается внесение пробирок с положительными контролями или клиническими образцами как до, так и после обработки, в комнату подготовки реакционной смеси («чистую» зону).

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

9. Основные принципы подбора праймеров

При создании ПЦР-тест-системы одной из основных задач является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

1. 1. Праймеры должны быть специфичны. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, т.к. именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Если их специфичность недостаточна, то, вероятно, что в пробирке с реакционной смесью будут происходить нежелательные процессы, а именно синтез неспецифической ДНК (коротких или длинных фрагментов). Они видны на электрофореze в виде тяжелых или легких дополнительных полос, иногда шмеров, выглядящих сплошным мазком на электрофореze. Это мешает оценке результатов реакции, т.к. легко перепутать специфический продукт амплификации с синтезированной посторонней ДНК. Часть праймеров и дНТФ расходуется на синтез неспецифической ДНК, что приводит к значительной потере чувствительности;
2. 2. Праймеры не должны образовывать димеры и петли, т.е. не должно образовываться устойчивых двойных цепей в результате отжига праймеров самих на себя или друг с другом;
3. 3. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону, отжига праймеров происходить не будет, и как следствие -ложноотрицательный результат. Иными словами, если предполагается разработать видоспецифическую тест-систему на какой-либо микроорганизм, выбирается именно та зона, которая удовлетворяет этим требованиям в пределах нуклеотидных последовательностей генома данного вида. И наоборот, в этих последовательностях должны быть как можно более существенные отличия среди всех близкородственных видов.

10. Как выбрать ПЦР-набор

С ростом популярности метода ПЦР неизбежно растет и предложение тест-наборов, в том числе и отечественного производства. Неподготовленному потребителю довольно трудно разобраться в качестве того или иного предлагаемого на рынке диагностического набора, независимо от наличия прилагаемых документов и коммерческой активности фирмы-производителя. В такой ситуации можно лишь порекомендовать потребителям самим

испытать разные тест-системы и сравнить их качество.

Критериями такой проверки служат, в первую очередь, специфичность и чувствительность тест-наборов. К сожалению, далеко не все тест-наборы имеют заявляемые характеристики.

Чувствительность можно проверить, приготовив несколько десятикратных разведений выделенной ДНК (например, из коллекционного штамма микроорганизма или из клинического образца, в котором достоверно имеется искомый возбудитель, что подтверждено альтернативными методами исследований) и сравнив результаты амплификации. Если при этом один набор, уступая другому по чувствительности, дает больше положительных результатов на клинических образцах, следует задуматься о его специфичности.

Вероятны случаи, когда положительные результаты, полученные после амплификации с использованием разных тест-систем, частично или полностью не совпадают. Производитель, защищая свою продукцию, может утверждать, что даже при отсутствии клинических признаков, получаемые положительные результаты лишь свидетельствуют о высокой чувствительности тест-системы. При несовпадении результатов с другим, более чувствительным, набором необходимо все же убедиться, что выявляется именно искомый микроорганизм, а не что-то иное.

Следует также помнить, что наличие только одних клинических признаков не может служить доказательством присутствия предполагаемого микроорганизма. На первых порах для подтверждения качества используемой тест-системы рекомендуется сравнивать получаемые результаты с альтернативными методами исследований.

Возможна и обратная ситуация, когда выигравшая по чувствительности тест-система недостаточно специфична. В этом можно убедиться, проводя реакцию используя панель близкородственных микроорганизмов.

В некоторых случаях при использовании тест-системы, имеющей высокую чувствительность, возможно недовыявление положительных образцов, как следствие выбора праймеров в регионах ДНК, где вероятны мутации. Иногда критичной для реакции становится замена нуклеотидов в местах отжига праймеров.

К сожалению, далеко не всегда и не у всех есть возможность экспериментировать с приобретаемыми тест-наборами. В этом случае весьма полезно попытаться выяснить у производителя как создавалась и проверялась предлагаемая тест-система.

Заключение

Мы надеемся, что изложенная в этой брошюре информация будет полезна для Вас и, возможно, поможет избежать некоторых ошибок и трудностей, возникающих на первых этапах организации и работы ПЦР-лабораторий.

Остается пожелать Вам сделать удачный выбор тест-наборов и получать только положительные эмоции при работе с ними.

С уважением,

Коллектив фирмы «НПФ ДНК-Технология»

Рис.1. Принципы комплементарности и антипараллельности цепей ДНК

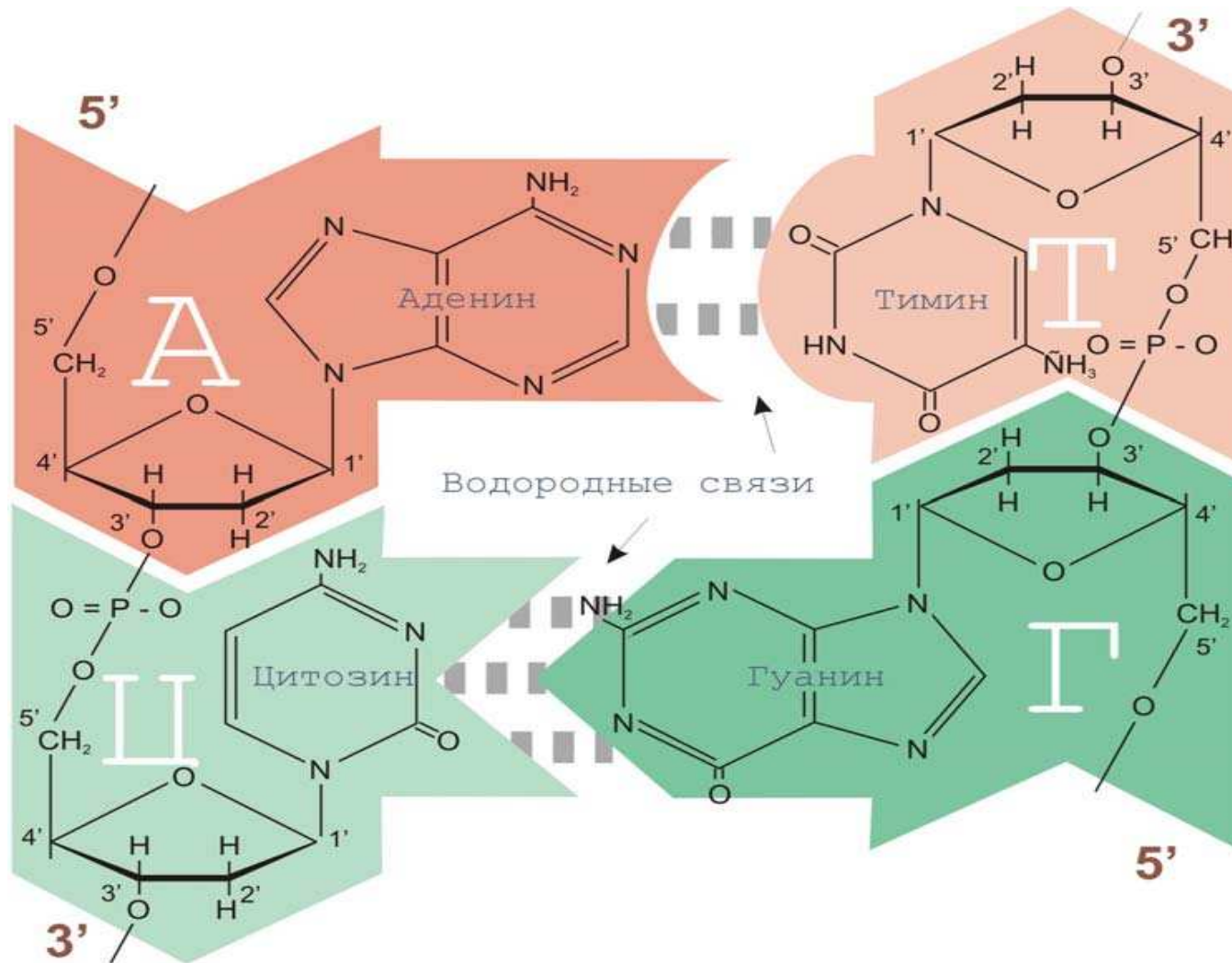


Рис.2. Накопление продуктов амплификации.

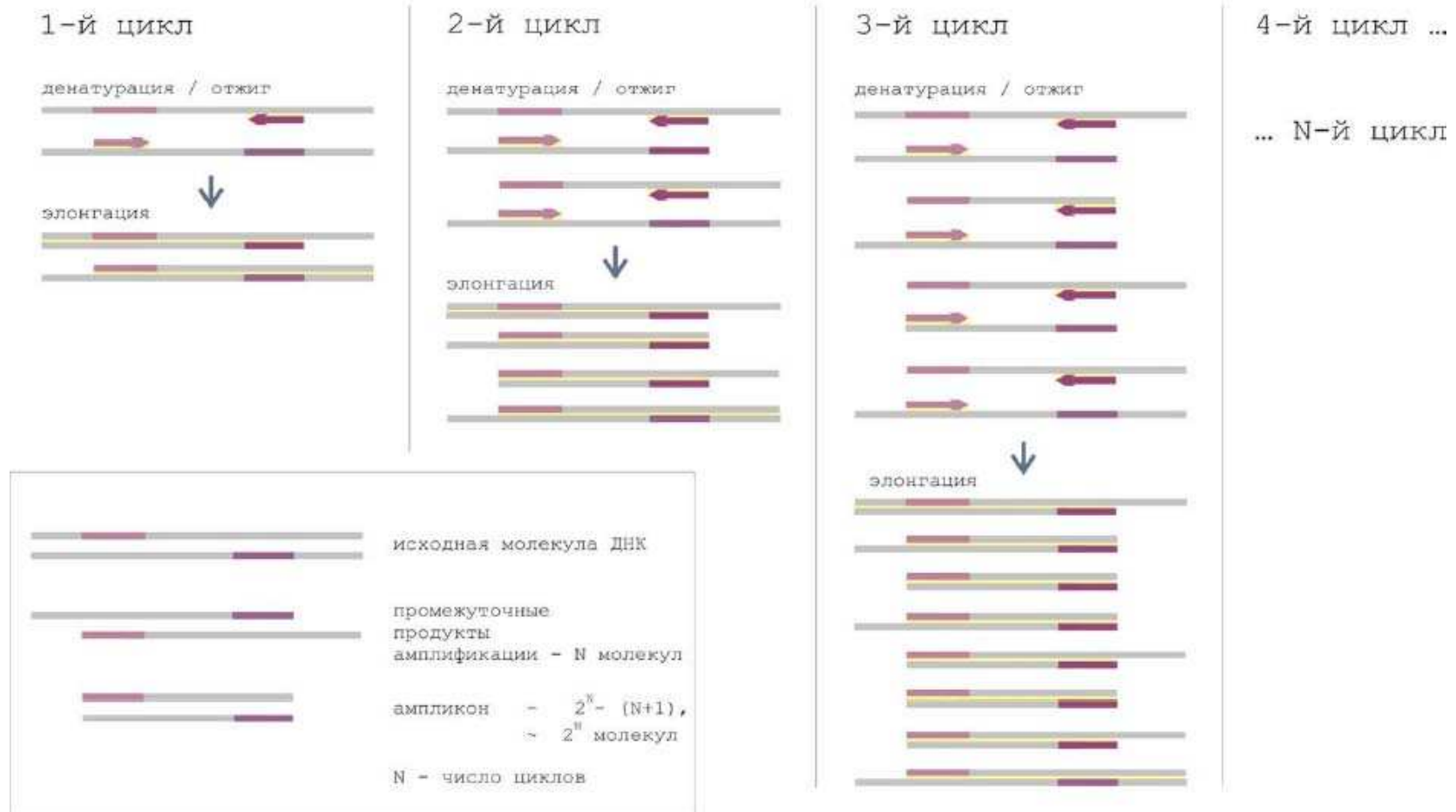


Рис.3. Принцип полимеразной цепной реакции.

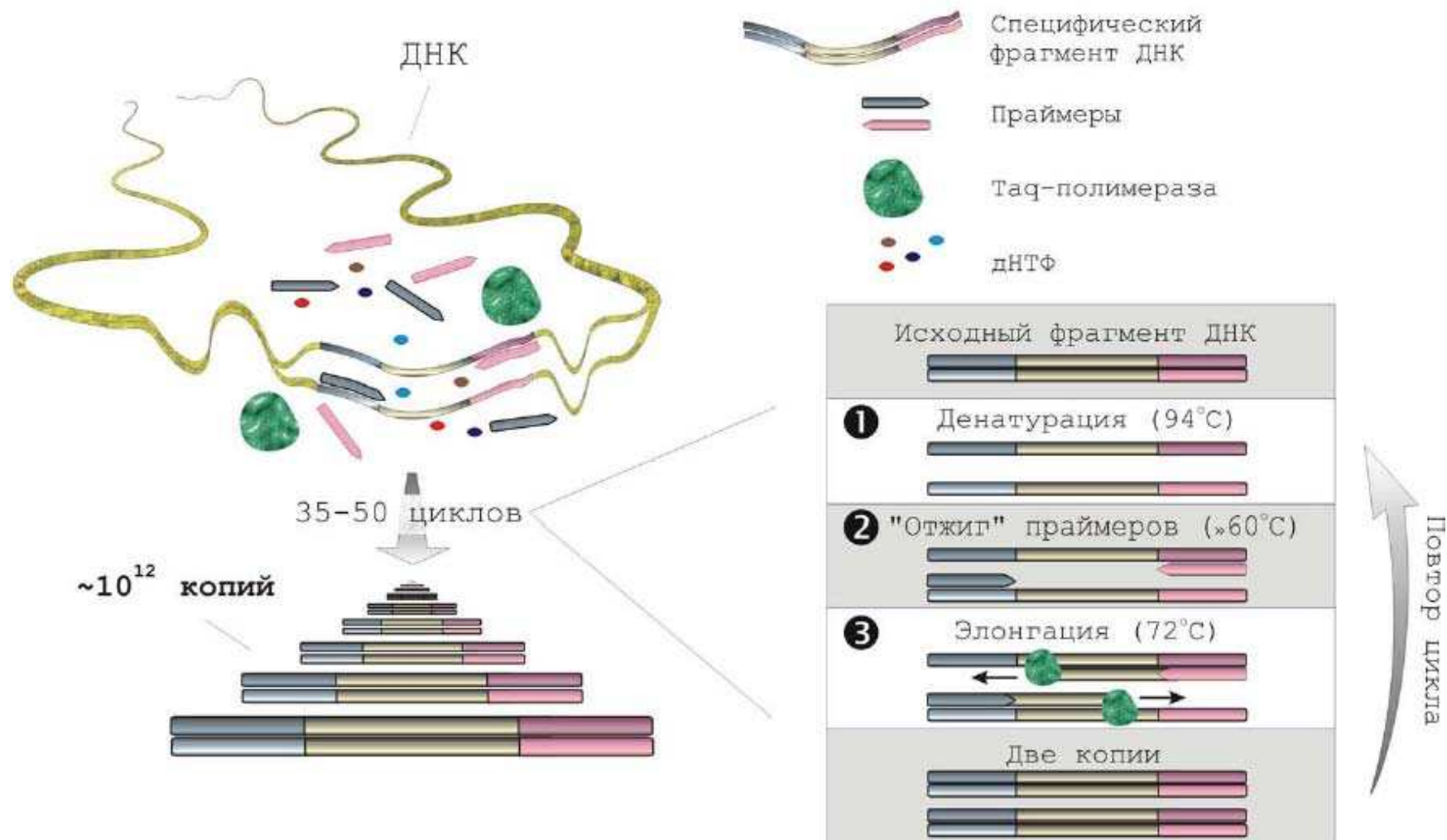
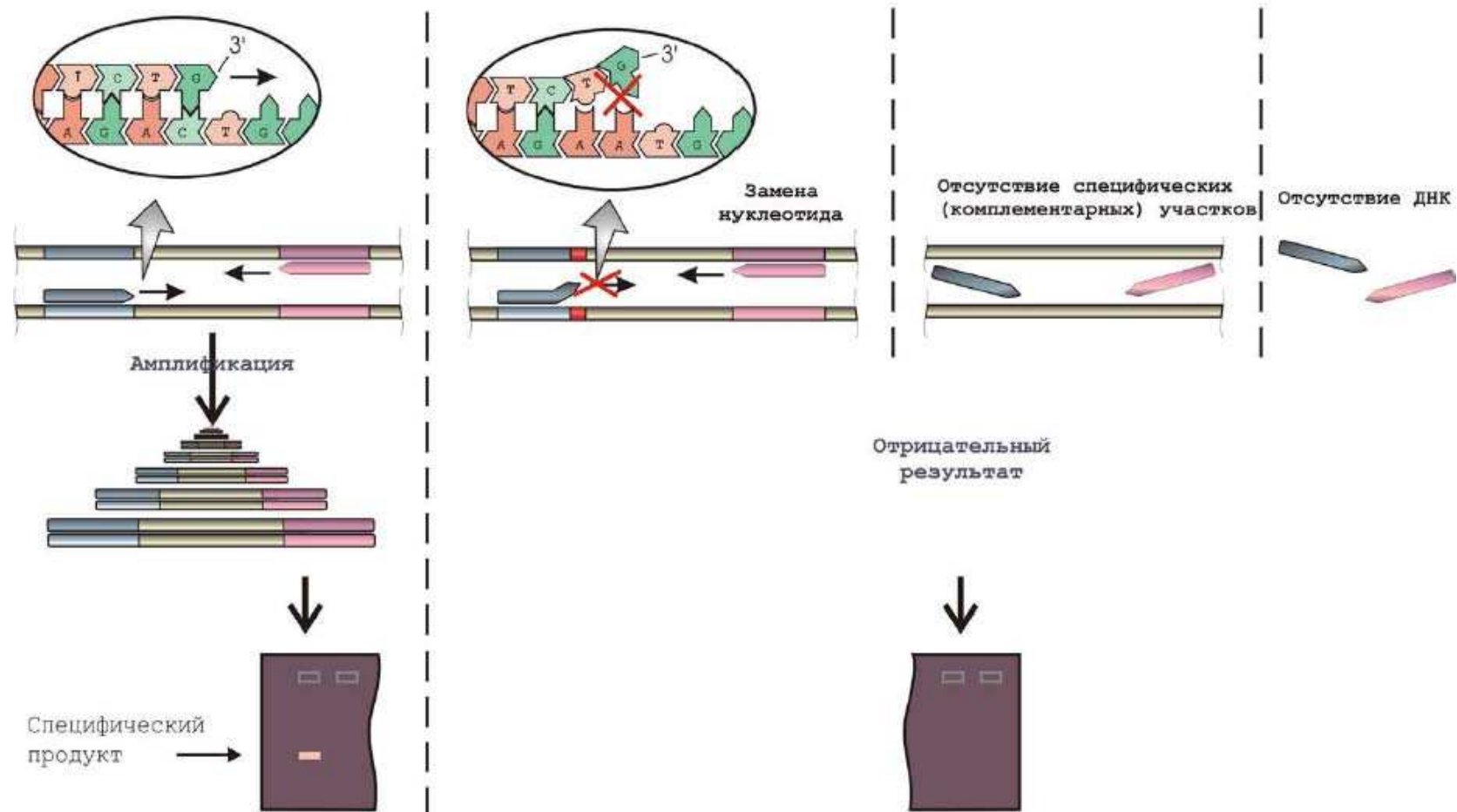


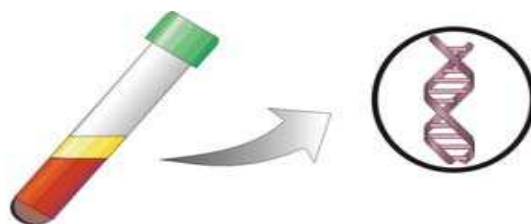
Рис.4. Специфичность ПЦР.



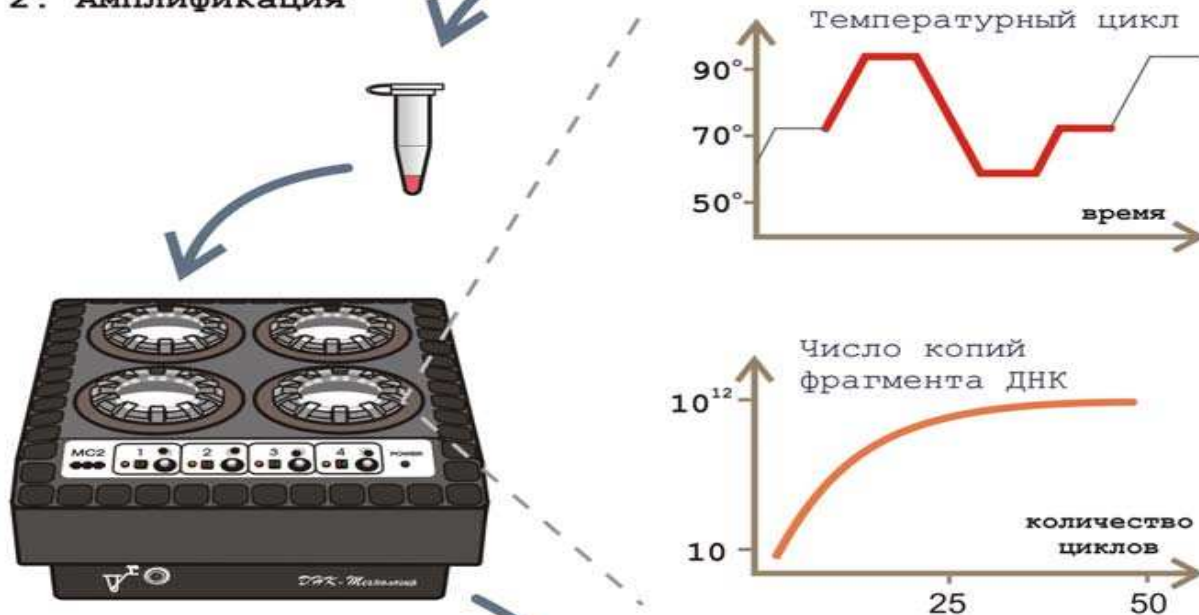
ДНК-Технология

Рис. 5. Стадии ПЦР-анализа.

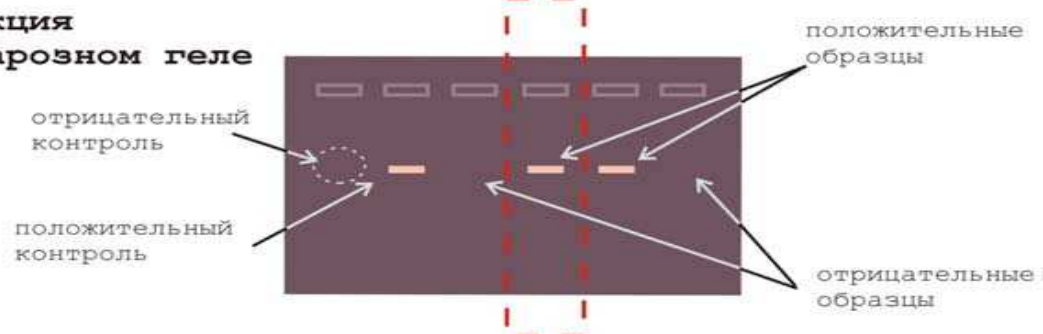
1. Пробоподготовка



2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле



DPK-Технология

Рис.6. Горячий старт.

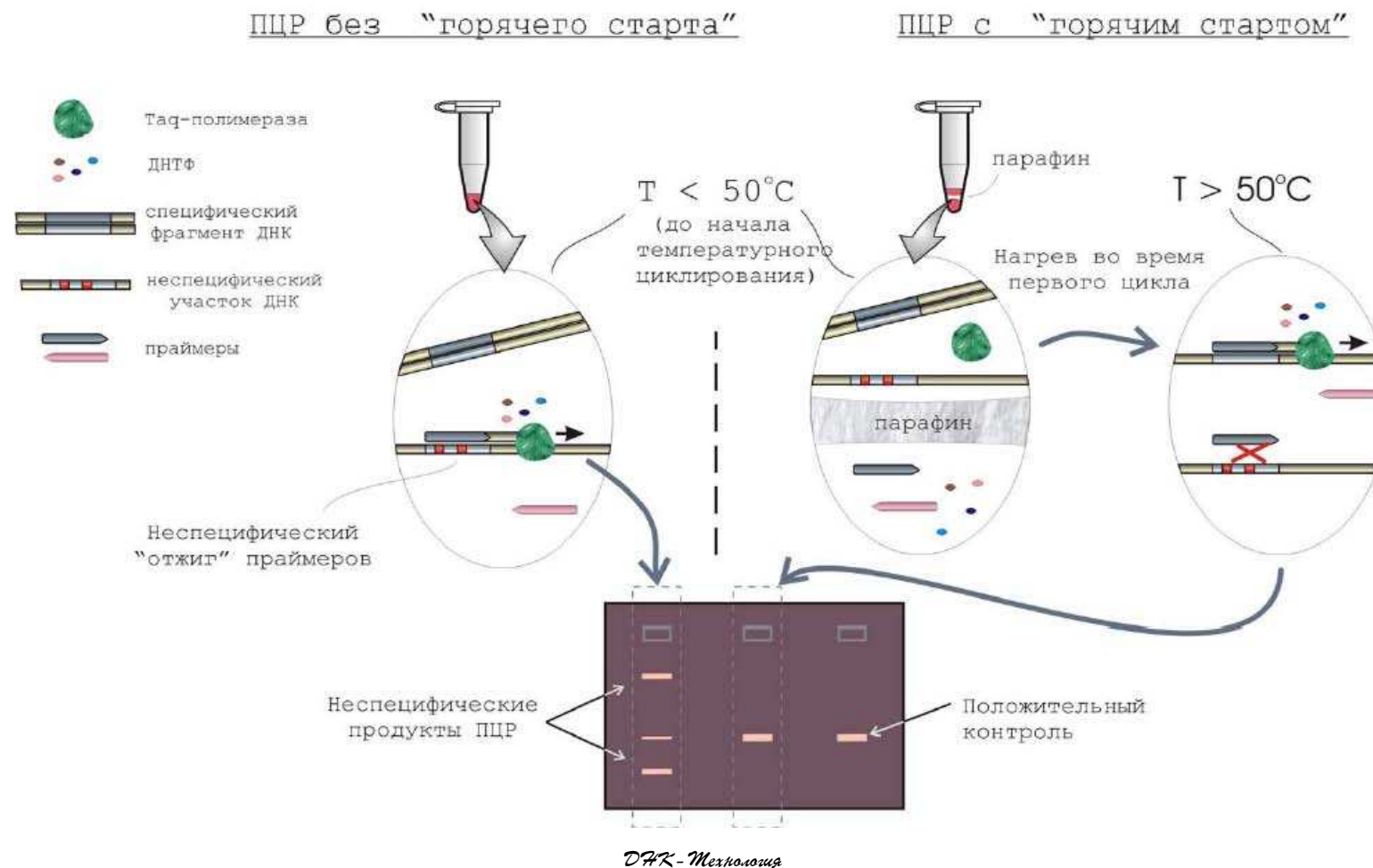


Рис. 7. Электрофорез продуктов амплификации

Дорожки № 1,2 – отрицательные образцы. Видны только полосы внутреннего контроля, свидетельствующие о прохождении ПЦР;
Дорожки № 3-9 – положительные образцы. Интенсивность свечения внутреннего контроля может отличаться

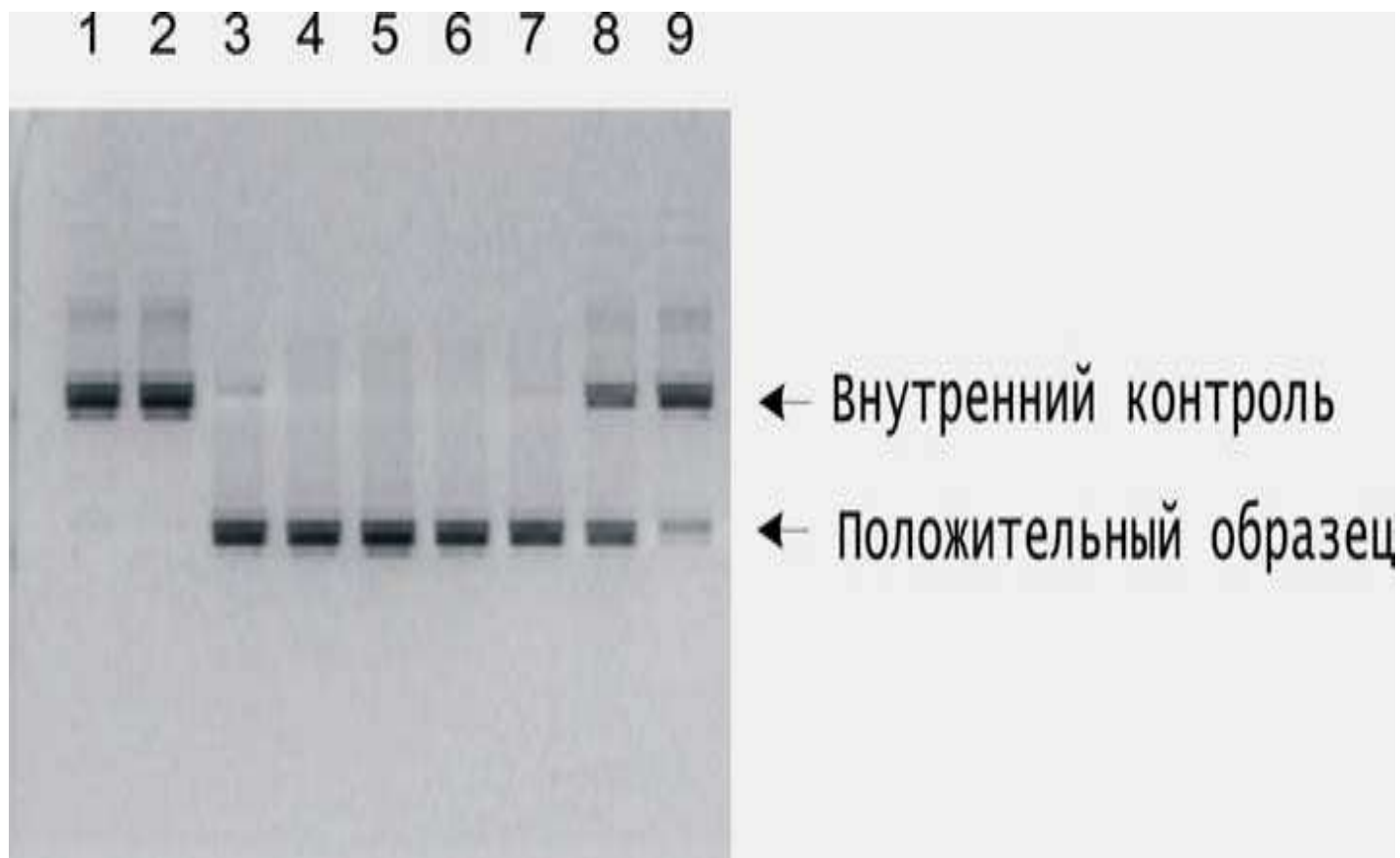
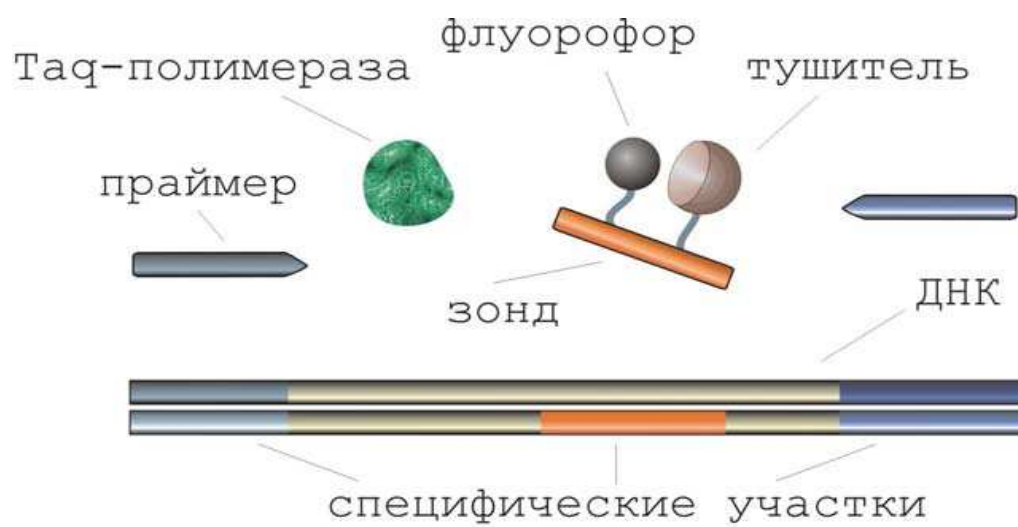


Рис.8. Технология использования флуоресцентных зондов в процессе амплификации.



стадия элонгации

