

**Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университетінің
Биология және биотехнология факультеті**



4-СӨЖ: Классикалық ПТР. Реал-тайм ПТР.



Орындаған: Аманбаева А;
Жолдасбаева З;
Бекетай А.

Тексерген: Алтыбаева Н.

Алматы – 2017ж.

Жоспар:

I. Кіріспе

Полимеразды тізбекті реакцияға жалпы түсінік.

□ II. Негізгі бөлім:

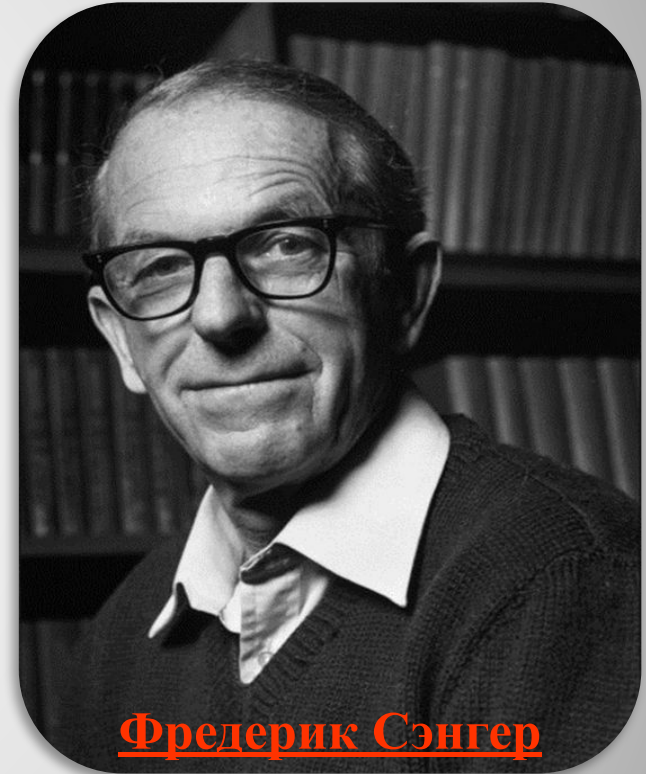
- 1) Классикалық ПТР.
- 2) Жүргізілген сараптамалар.
- 3) Реал-тайм ПТР және әдіс сипаттамасы.

III. Қорытынды

IV. Пайдаланылған әдебиеттер жиынтығы:

ДНК реттелуі

Жалпы дәл қазір ДНК диагностикасының «алтын стандарты» дәстүрлі «жүйелеу» болып қала береді. Бұл әдіс қағидаты 1970-ші жылдардың соңында F.Sanger әзірледі және модификацияланған нуклеотидтерді - диидоксинуклеотидті фосфосфаттарды (ddNTP) немесе терминаторларды қолдануды қамтиды. Нуклеотидтің дәйектілігін талдауға арналған ең таралған әдіс капиллярлы генетикалық анализаторларды пайдалану арқылы дәйектеледі



Фредерик Сэнгер



Полимеразды тізбекті реакция

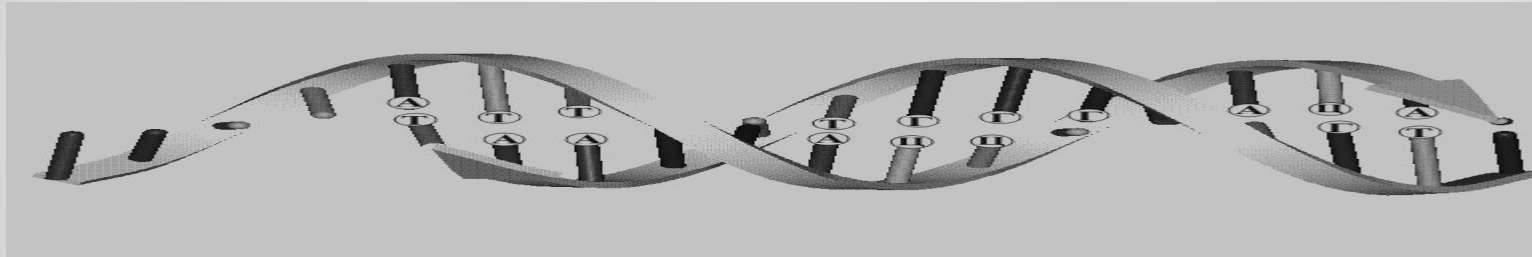
Тізбекті полимеразды реакцияны 1983 жылы Кэри Маллисом ашқан. Оның мақсаты ДНҚ ферментті полимеразаның көмегімен ДНҚ-ны амплицирлеу және ДНҚ-ң алғашқы молекуласының барысымен көптеп екі еселенуі. Тізбекті полимеразды реакция – бұл молекулалық биологияның экспериментальді әдісі, биологиялық материалда нуклеин қышқылының (ДНҚ, РНҚ) белгілі фрагменттерінің аз концентрациясын көбірек игеру.

Негізгі қолдану көрсеткіштері:

- ❑ **Инфекциялық аурулардың диагностикасы- ГЕПАТИТТІҢ БАРЛЫҚ ТҮРЛЕРІНЕ ТЕКСЕРІЛЕСІЗ.**
- ❑ **Онкологиялық аурулардың диагностикасы** (лейкемиялар және лимфомалар, сүт безі рагі қатерлі, жаңа түзілістер т.б.);
- ❑ **Генетикалық аурулар диагностикасы;**
- ❑ **жеке идентификация** (сот медицинасы және криминалистика, мүшелер мен тіндер трансплантациясы, генетикалық тест арқылы әкелікті анықтау);
- ❑ **тағам патогенділігінің диагностикасы .**

ПТР-ды іске асыру

Әдіс нуклеин қышқылының белгілі бір үлескісінің қайталанып отыратын таңдаулы көшірмеленуіне негізделген. Бұл үрдіс ферменттердің көмегімен жасанды жағдайда жүзеге асады (in vitro).



ДНҚ-ны амплификациялаудан басқа ПТР нуклеин қышқылдарына әр түрлі әсер етуге мүмкіндік береді (мутация, ДНҚ фрагменттерін тұтастыру). Сонымен қатар, ПТР биологиялық және медициналық практикада кеңінен пайдаланылады, мысалы, мирастық немесе инфекциялық ауруларды анықтау, әкелікті орнату, гендерді клондау, жаңа гендерді бөліп шығару, т.б.

Реакция компоненттері

ПТР-ды ең қарапайым жағдайда жасау үшін келесі компоненттер керек болады:

- Амплификация жасалатын ДНҚ үлескісі бар ДНҚ-матрица.
- Талап етілетін ДНҚ фрагменті әр түрлі тізбектерінің ұштарына комплиментарлы екі праймер.
- Жоғары температураға тұрақты ДНҚ-полимераза - ДНҚ полимеризациясын катализдейтін фермент.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаттар (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Полимеразаның қызметіне қажетті Mg^{2+} иондары.
- Реакцияға қажетті жағдайларды (рН, ерітіндінің иондық күші) қамтамасыз ететін буферлік ерітінді.

ПТР-НЫҢ ЖҮРУУІ ҮШІН ҚАЖЕТ КОМПОНЕТТЕР:

1. Праймерлер. Шамамен 15 -30 нуклеотидтерден тұратын, жасанды арнайы синтезатордың көмегімен синтезделетін қысқа олигонуклеотидтер. Праймерлер амплификация үшін керек. Праймер матрицалық ДНҚ молекуласының белгілі –бір бөлігіне комплементарлық принцип бойынша жабысып, ары қарай ДНҚ полимераза ДНҚ бөлігін синтездейді.

2. Тақ-полимераза – температураға төзімді фермент, негізінен комплементарлы принципте 3' - соңына жабысады да, тізбекті құрастыруға кіріседі.

3. Дизоксинуклеотидүшфосфаттар қосындысы (dNTP): dATP , dGMP, dTTP, dCTP , болуы керек. ДНҚ молекуласының екінші комплементарлы тізбегін Тақ-полимераза ферменті арқылы синтездеуге қолданылатын «құрылыс материалы».



Бастапқы ПЦР компоненттері.

Классикалық

ПТР

Классикалық форматтағы полимеразды тізбекті реакция. ДНҚ және ДНҚ құрамды микроорганизмдердің күдікті мутацияларын анықтауға қолданылған. Ол оның бастапқы фрагменті ген-спецификалық праймерлердің көмегімен амплифицирленеді. Реакцияның соңғы нәтижесі зерттелетін материалдағы ДНҚ нысанасының бар екендігін көрсетеді.

Кері транскрипциясы бар полимеразды тізбекті реакция. РНҚ құрамды вирустардың геномының арнайы учаскелерін анықтау немесе нысана-геннің транскрипциясын зерттеу үшін, алдымен ревертаза ферментімен катализдейтін қайтымды транскрипция реакциясын пайдаланып, РНҚ-матрицадан ДНҚ-көшірмесін алады. Осылайша синтезделген қосымша ДНҚ-лар ПТР-де ген-спецификалық праймерлер үшін матрицалар болып табылады.

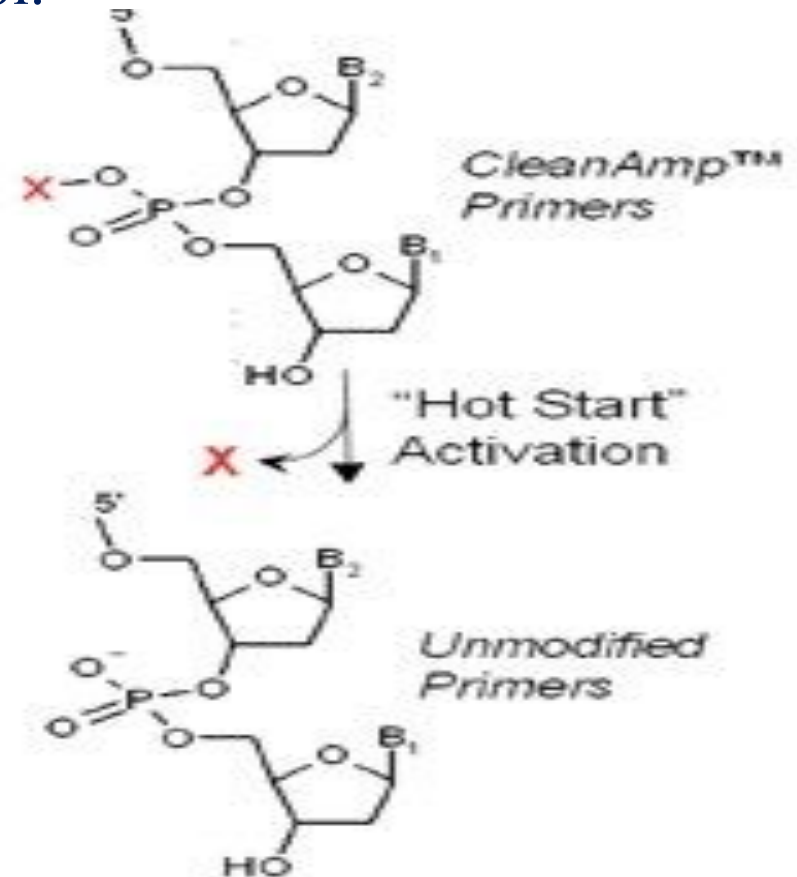
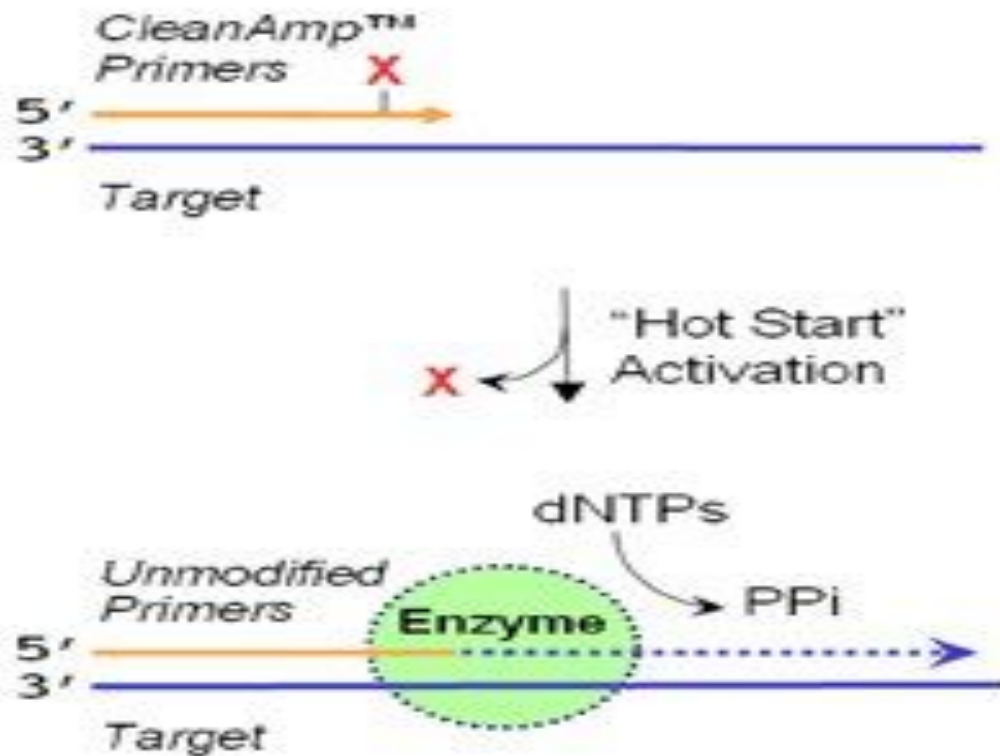
ПТР жүргізетін шарттар

- Биологиялық материалдарды дайындау
- ПТР қою
- Нәтижелерді талдау

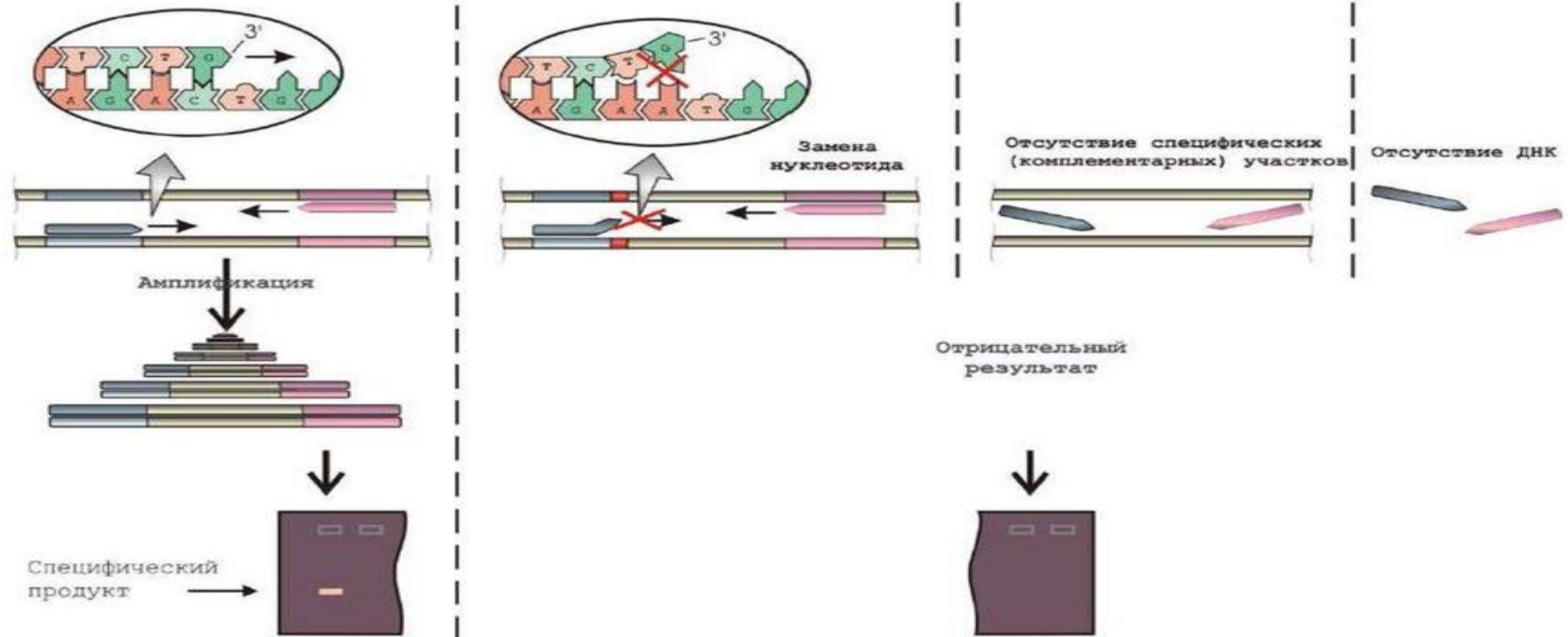
Кері транскрипция арқылы жүретін ПТР (RT-PCR) Кері транскрипция арқылы жүретін ПТР (RT-PCR) – геномы РНҚ молекуласынан тұратын организмдерді зерттеуде кеңінен қолданылады. Бірінші кезеңде аРНҚ молекуласын матрица ретінде қолдана отырып ревертаза (кері транскриптаза) ферменті арқылы біртізбекті ДНҚ молекуласын синтездейді.

Бұл синтезделген ДНҚ молекуласы келесі реттегі реакцияға қолданылады. Ол үшін екі вирустан бөлініп алынған кері транскриптаза ферменттерін қолданылады. Бұл ревертазаларды қолдану бірнеше қиындықтарды тудырады. Біріншіден олар жоғары температурада төзімсіз, яғни 42° жоғары температурада жоғары белсенділігі төмендейді.

ПТР жүргізу. “Ыстық” нүктеден басталатын ПТР (hot-start PCR) – праймерлердің арнайы жабысуына қажетті температураға дейін ДНҚ полимераза ферментінің белсенділігін бастай отырып жүргізілетін ПТР әдісінің жетілдірілген түрі.

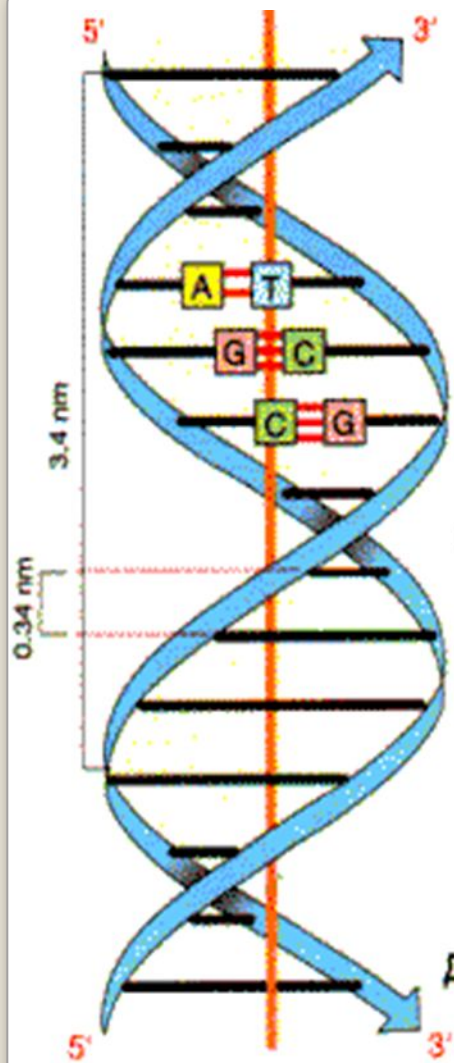


ПТР реакциясының өтуіне бақылау.



- Денатурация - ДНҚ-ны қос талшықты формасынан бірқалыпты нысанға ауыстыру, егер жоғары температуралардың әсерінен қосымша қосалқы базалық жұптар арасындағы сутегі байланыстары
- Күйіп кету - праймерлерді бір жақты ДНҚ мақсатына қосу. Примерлар таңдалған фрагментті шектеп, ДНҚ-ның қарама-қарсылығын толықтыратын етіп таңдалады. Күйіп кету Chargaff's complementarity ережесіне сәйкес жүзеге асырылады.
- Элонгация (синтез) - праймер синтезінен кейін ДНК-ның екінші шоғырлануын полимеразы ДНҚ-ның 3' аяғынан аяқтайды

ПТР сатылары



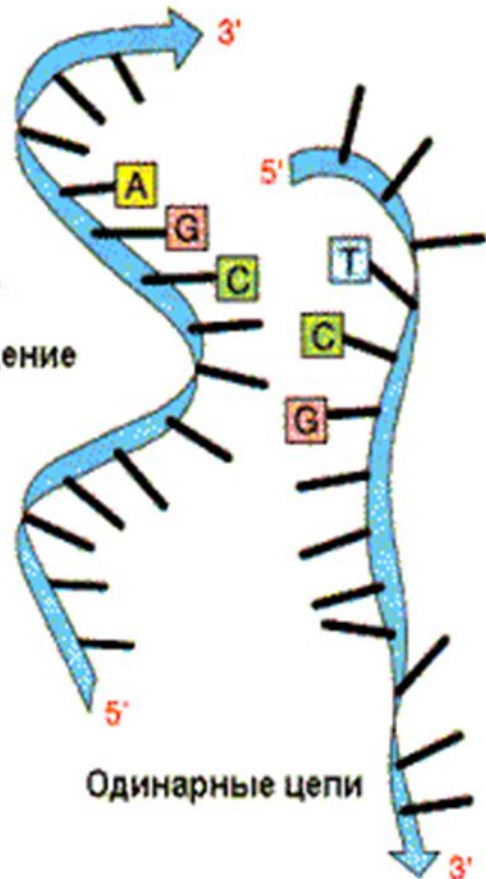
Денатурация

Нагревание

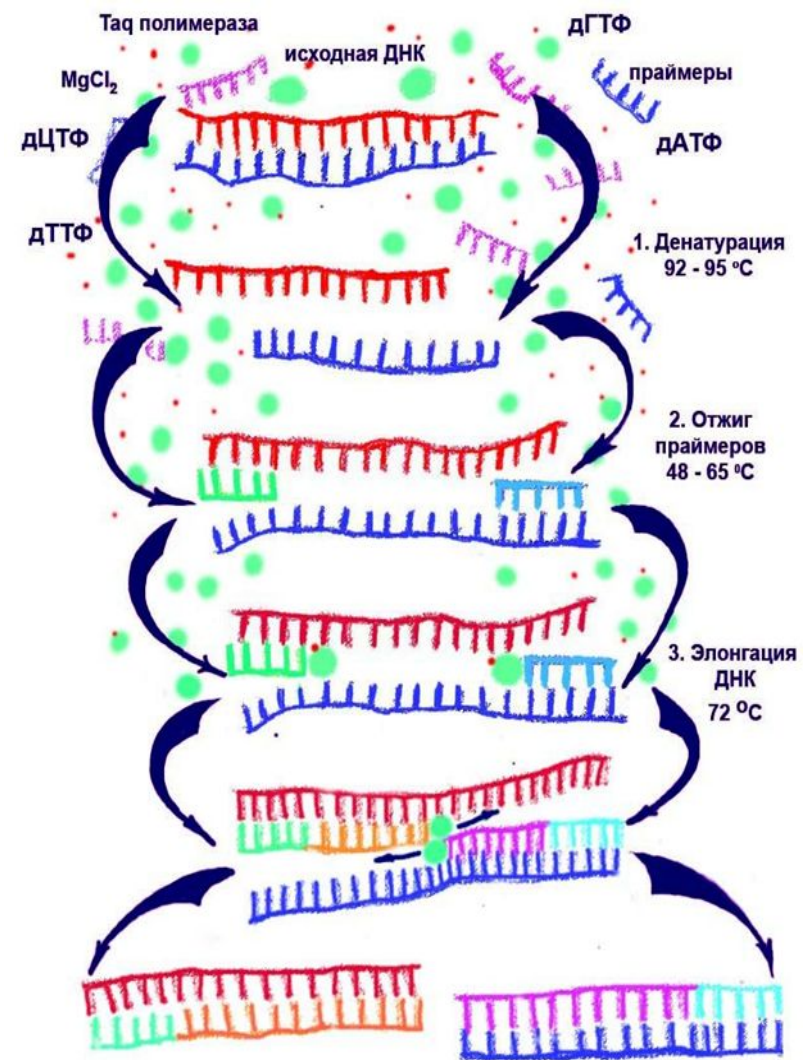
← Медленное охлаждение

Ренатурация

Двойная спираль



Одинарные цепи



дочерние дуплексы ДНК

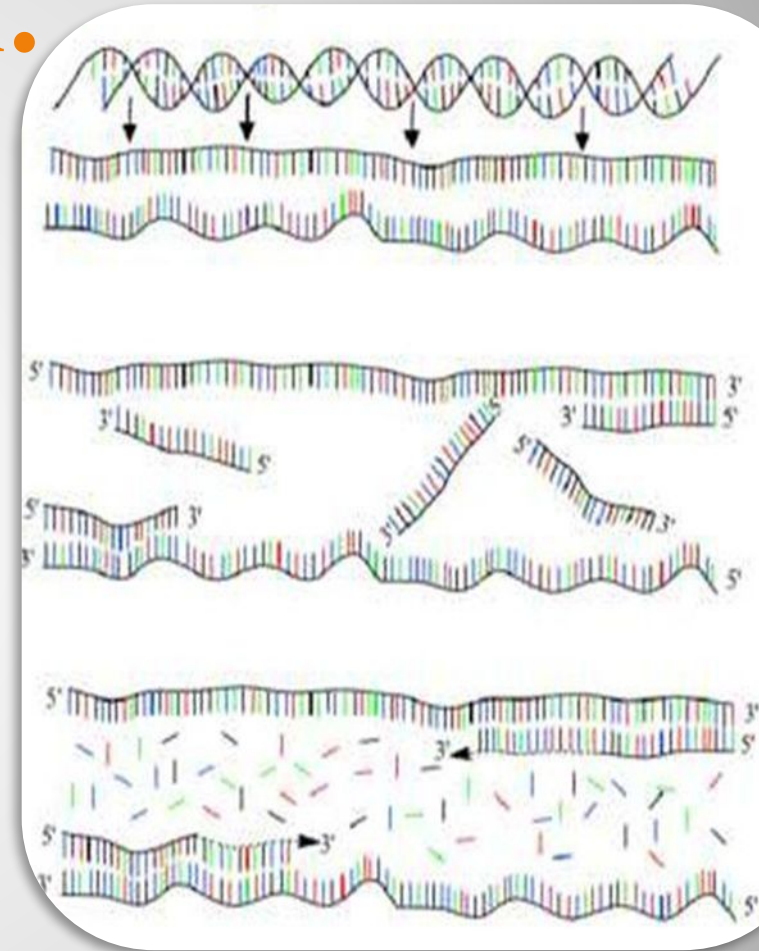
Зат	Қолданылатын концентрация	Әсер ету механизмі
Acetamide	~5%	Еруінің жоғарылауы
Betaine Na	0,5-2M	Ферменттің тұрақтылығы, Tm AT- и GC-ға бай келесі түзелулер
DMSO	2-15%	Еруінің жоғарылауы
Formamide	1-5%	
Glycerol	5-20%	Ферменттің тұрақтылығы
Twin 20, Triton X-100	0,1-0,5%	Ферменттің тұрақтылығы
BSA	0,1	Ферменттің тұрақтылығы

ПТР сатылары.

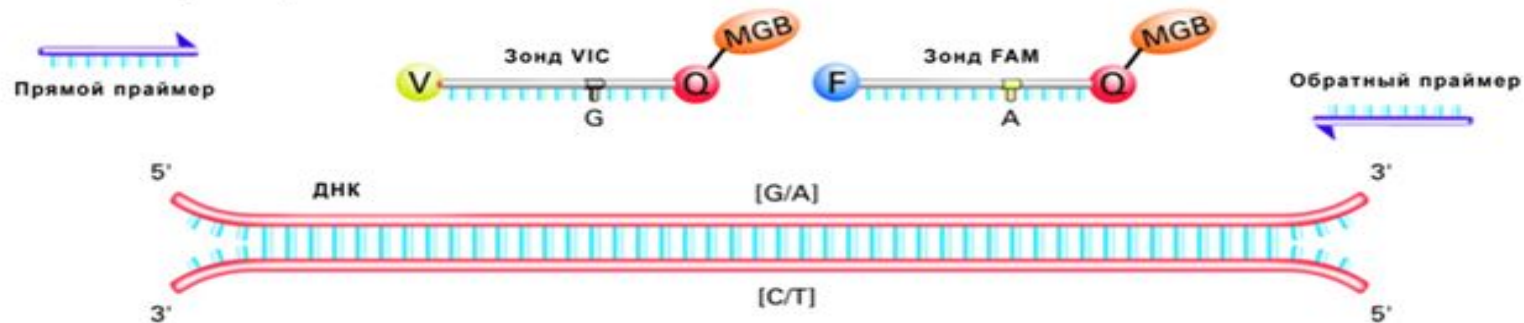
1) Денатурация ДНК (95°C)

2) Праймерлардың күйіп кетуі ($55-65^{\circ}\text{C}$)

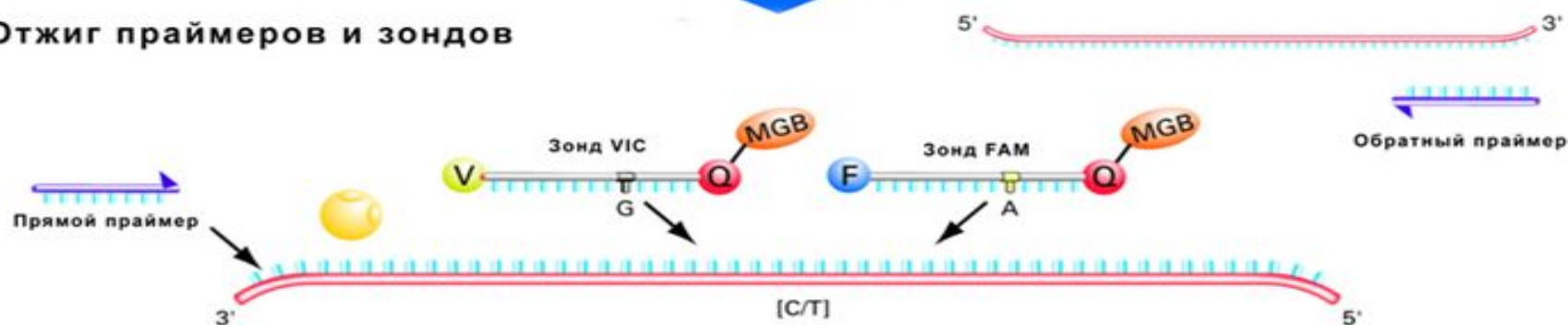
3) ПТР (72°C)



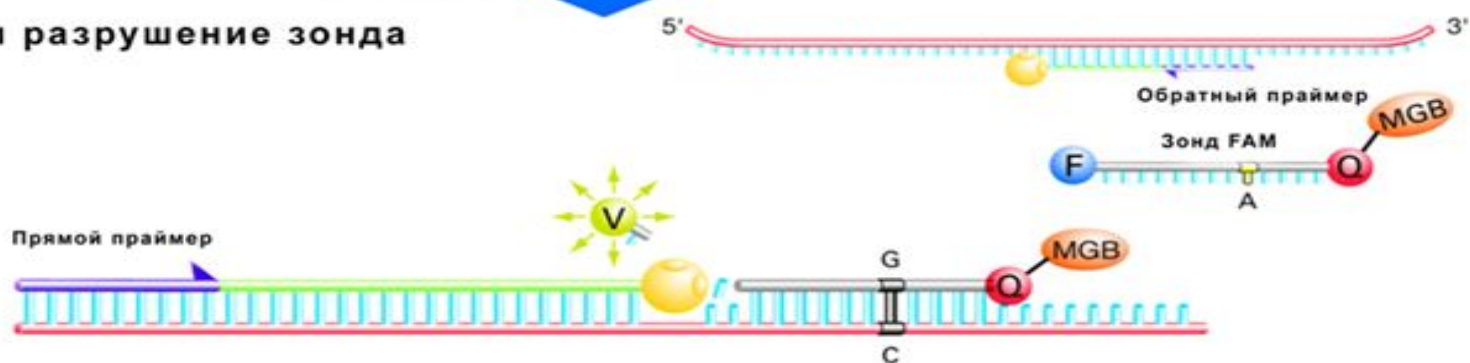
1. Компоненты реакции



2. Отжиг праймеров и зондов



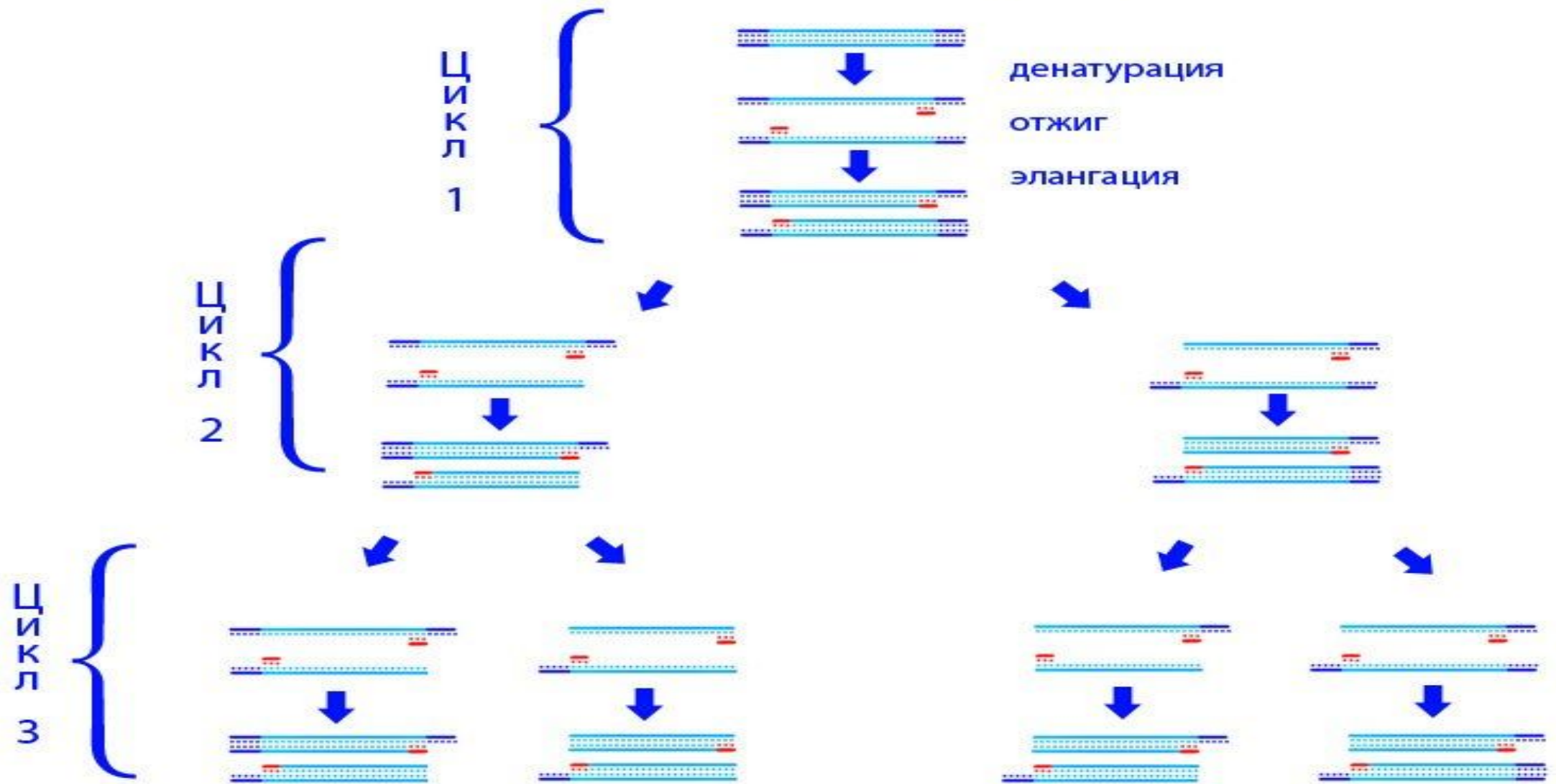
3. Элонгация и разрушение зонда



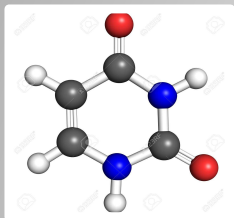
Обозначения

- V Краситель VIC
- F Краситель FAM
- Q Гаситель
- MGB MGB
- Taq-полимераза
- Зонд
- Праймер
- Образец ДНК
- Удлиненный праймер

Полимеразная цепная реакция



ПТР циклі.



Компоненттер



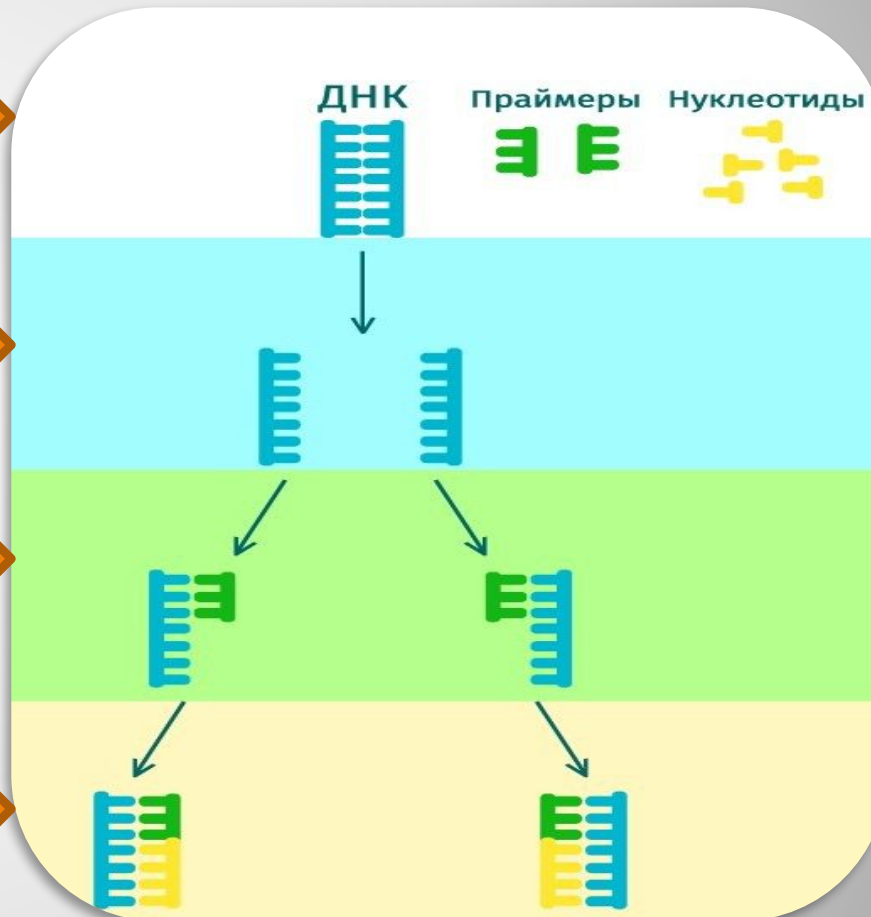
Денатурация



Праймерлерді 40-75
градуска ДНҚ тізбектеріне
байлау

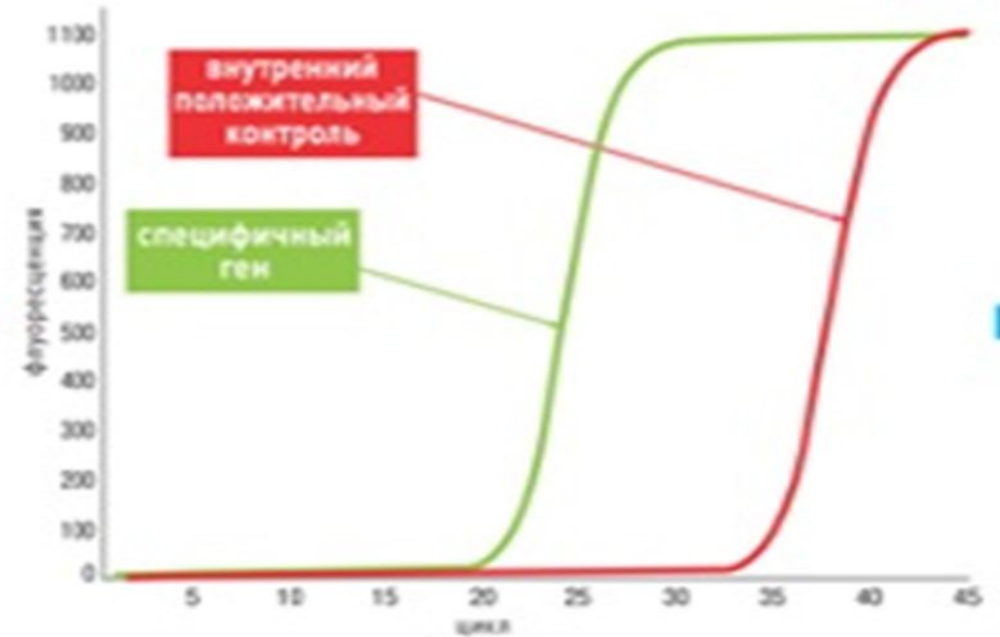
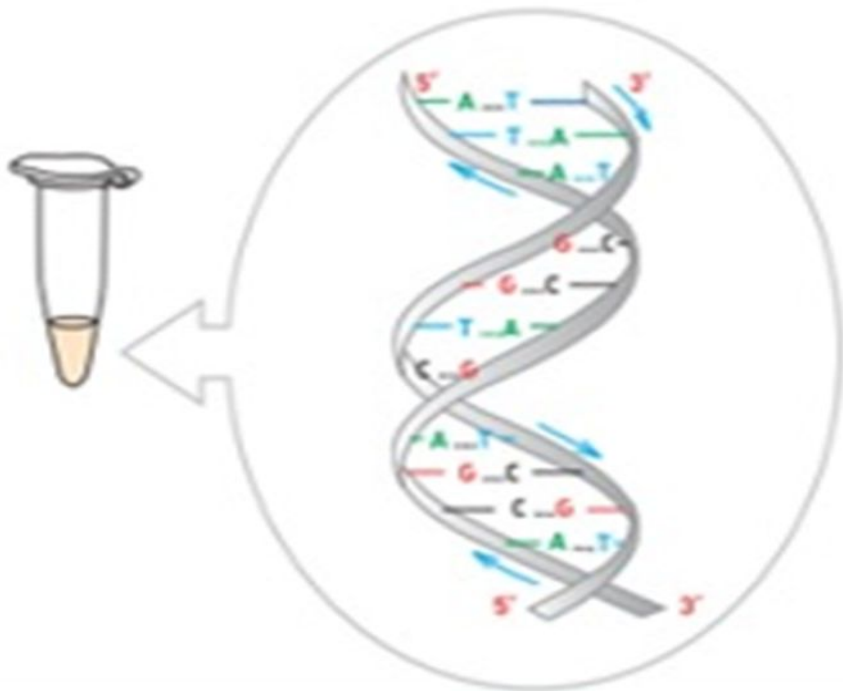


60-75 градуска қосымша
тізбектерді құрастыру



I-саты.
ДНК/РНК-ның
бөлінуі.

II-саты.
Нақты уақыттағы
ПТР.



Реал-тайм ПТР

Молекулярлық биологияда реал-тайм ПТР (немесе сандық ПТР, нақты уақыттық ПТР, qPCR, qRT-ПТР) - бір мезгілде берілген ДНҚ молекуласының мөлшерін өлшеу үшін полимеразды тізбекті реакция әдісіне негізделген зертханалық әдіс..

Бұл әдіс ПТР-дың жалпы принциптерінде қолданады. Негізгі айырмашылығы, амплификацияланғаннан кейін ДНҚ көлемі нақты уақытта өлшенеді. Сандық көрсеткішті анықтау үшін екі әдіс қолданылады: екі еселенген ДНҚ молекулаларымен араласқан флуоресцентті бояғыштар, гибридизациядан кейін ДНҚ-ның комплементарлы учаскілерімен флуоресценцияланатын модификацияланған олигонуклеотидтер. Жиі нақты уақыттық ПТР КР-ПТР (кері транскрипция) сәйкестендіріледі, бұл аз мөлшерде мРНҚ көлемін өлшеу үшін, зерттеушіге жасушада осы мРНҚ мазмұны туралы сандық ақпаратты және ген экспрессиясы туралы ақпарат алуға мүмкіндік береді.

Кері транскрипция реакциясы бар нақты уақыттық ПТР

- ✓ Нақты уақыт ішінде стандартты ПТР жүргізу алдында ДНҚ синтезі үшін кері транскрипция реакциясын жүргізу керек. Кері транскрипция реакциясы кері-транскриптазамен ферментпен орындалады. Реакцияны праймерді қоспай, жүзеге асыруға болады, алайда, праймер қосылған кезде ең үлкен тиімділікке қол жеткізіледі. Праймерлердің үш негізгі түрі бар:
 1. Олиго dT праймеры
 2. Кездейсоқ жүйе. Әдетте, немесе гексамер немесе нонамер пайдаланылады.
 3. Ген-спецификалық праймер, мРНК зерттеу үшін қолданылады.

Әдістің сипаттамасы

- ✓ Бұл процедура классикалық ПТР әдісіне өте ұқсас, яғни, барлық реакциялық сатылар (ДНҚ-ны балқыту, денатурациялау) 95°C температурада өтеді, егер Тақ полимераза қолданылса, праймерлерді (пайдаланылатын праймерлерге байланысты) қыздыру және элонгация 72°C температурада өткізіледі. Бүгінгі күні бұл жоғары арнайы флуоресцентті зондтардың арқасында мүмкін. Осындай зондтарда жарық жасаудың екі негізгі тәсілі бар – қыздыру мен элонгация кезінде, бірақ екі жағдайда да флюоресценция әр жаңа циклмен күшейтіледі. Осылайша, сигнал күші молекуланың бастапқы мөлшерін көрсетеді.

- ✓ Алғашқы сатыларда флуоресценция әлсіз, өйткені өнім әлі де көп емес, сондықтан оны фоннан ажырату қиын. Өнім жинақталған сайын, сигнал бірінші экспоненциалдық түрде өседі, содан кейін платоға өтеді. Платоға шығу реакцияның бір немесе басқа компонентінің жоқтығымен түсіндіріледі - праймерлер, нуклеотидті дифосфаттар және жапсырма (метка) аяқталуы мүмкін. Егер реакция өнімі өте көп жинақталған болса, онда фермент шектеулі факторға айналуы мүмкін, содан кейін өнімнің циклге тәуелділігі сызықты болады. Айта кету керек, стандартты ПТР реакциясында нақты уақыт режимінде барлық сынамалар платоға жетіп, шамамен бір сигнал деңгейіне жетеді.
- ✓ Осылайша, соңғы нүкте зерттелетін үлгінің бастапқы көлемі туралы ештеңе айтпайды. Екінші жағынан, экспоненциалдық кезеңде өнімнің өсу қарқынының айырмашылығы байқалады. Молекулалардың бастапқы санындағы айырмашылықтар шу деңгейінен жоғары флуоресцентті арттыру үшін қажетті циклдардың санын қамтиды.
- ✓ Флуоресцентті шекті деңгейге (шудан жоғары) жету үшін қажетті циклдардың саны CT -мәні деп аталады. Шекті деңгей қатаң анықталған мән емес, әр жағдайда жеке таңдауға болады.

Зондтардың әртүрлілігі

Екі еселенген ДНҚ-ны таңбалау

- ✓ Бұл жағдайда затбелгі (метка) ДНҚ қос спиральына араласуға қабілетті химиялық қосылыс болып табылады. Мұндай зонд, PCR өнімдерімен өзара әрекеттескенде конформациясын өзгертіп, флуороформға айналады. Детекция әр циклдың соңында денатурация басталмай тұрып өткізіледі. Осындай бояуларға мысал ретінде кеңінен қолданылатын **syberGreen** болуы мүмкін.

Элонгация кезіндегі таңбалау

- ✓ 5' және 3' аяғы флуорофор мен сөндіргіші тігілген зонд қолданылады. Егер зондтың реттілігі өте ұзақ болмаса, тіпті ДНҚ-байланыстағы күйде, екі химиялық реактивтер бір-бірімен өзара әрекеттесе алады және флуоресценция шығарылмайды. Элонгация кезінде 5'-3'-экзонуклеазалық белсенділігі бар ДНҚ полимераза, бір нуклеотидтен зондты мақсатты ДНҚ-дан ажыратады. Осы процестің нәтижесінде флуорофор да, оның сөндіргіші де ерітіндіге сіңіп табылу ықтималдығы кішкентай болады және флуоресценция қалпына келеді

Диагностикалық сынақтар



- ✓ Сандық ПТР жұқпалы аурулардың белгілері, генетикалық бұзылыстар және т.б. гендерді немесе ДНҚ үзінділерін жылдам анықтау үшін қолданылады. Осы әдісті клиникалық зертханаларға енгізу инфекциялық ауруларды диагностикалау сапасын айтарлықтай жақсартты. ПЦР-ді қолдану сандық өлшеу мен вирустың генотиптілігін анықтайды (штамдарды сипаттау), мысалы, гепатит В вирусын. Сандық ПТР-де қатты ісіктерден және тіпті лейкоздың кейбір түрлерінен ісік жасушаларын анықтау үшін кеңінен қолданылады
- ✓ Нақты уақыттағы ПТР азық-түлік қауіпсіздігі, су сапасы және денсаулық сақтау саласындағы микробиологиялық жұмыстар үшін де қолданылады.

Қорытынды

Бүгінгі күні технология ДНК-диагностикалық әдістерді қолданумен көптеген ауруларды анықтауға мүмкіндік береді. Бұған мүмкіндік беретін бірнеше әдіс бар. Жыл сайын адамзат ағзасындағы аурудың өте жылдам кезеңдерде болуын анықтауға немесе аурудың алдын-алу мүмкіндігін болжауға жақындай түседі. Бүгінде ғалымдар ауруды анықтауға арналған әдістер мен жабдықтарға ие, бірақ диагностика мен емдеуге жұмсалған уақыт пен ақшалар әлі де үлкен. Дегенмен, егер сіз сол бағытта дамыған болсаңыз, таяу болашақта әрбір адам тұқым қуалаушылық және басқа ауруларға және оның келесі ұрпақтарына қандай қауіп төндіретінін анықтауға болатын әдістерді пайдалана алады.

Пайдаланылған әдебиеттер:

- “ Молекулалық биология ”
Бисенбаев А.К
- “ Молекулалық биология және генетика ”
Сәтбай Әбілаев 2010ж
- “Интернет жүйесі”