

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR)

- Метод основан на многократном избирательном ферментативном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.
- Первоначально сам принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) был разработан Кэри Мюллісом в 1983г. Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии, и за разработку ПЦР-анализа Кэри Мюлліс в 1993 г. был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Компоненты, необходимые для ПЦР :

- 1) молекула ДНК, содержащая исследуемый фрагмент.
- 2) ДНК-полимераза, то есть фермент для производства копий ДНК. Процедура ПЦР включает несколько высокотемпературных этапов, поэтому используются термостабильные ДНК-полимеразы; они выделяются из термостойких бактерий, живущих в горячих источниках при температурах до 90°C; чаще всего это Taq-полимераза бактерий *Thermus aquanticus*.
- 3) смесь нуклеотидов, используемая ДНК-полимеразой для синтеза ДНК.
- 4) праймеры ПЦР – пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов (размер от 15 до 30 пар нуклеотидов), идентичные исследуемым участкам ДНК.

Приборы для ПЦР

Процесс ПЦР требует постоянной смены циклов с несколькими разными температурами.

Современные аппараты для ПЦР – термоциклеры - работают в режиме быстрого изменения температуры реакционной смеси по заданной программе и способны амплифицировать (умножать) фрагмент ДНК в течение нескольких часов.



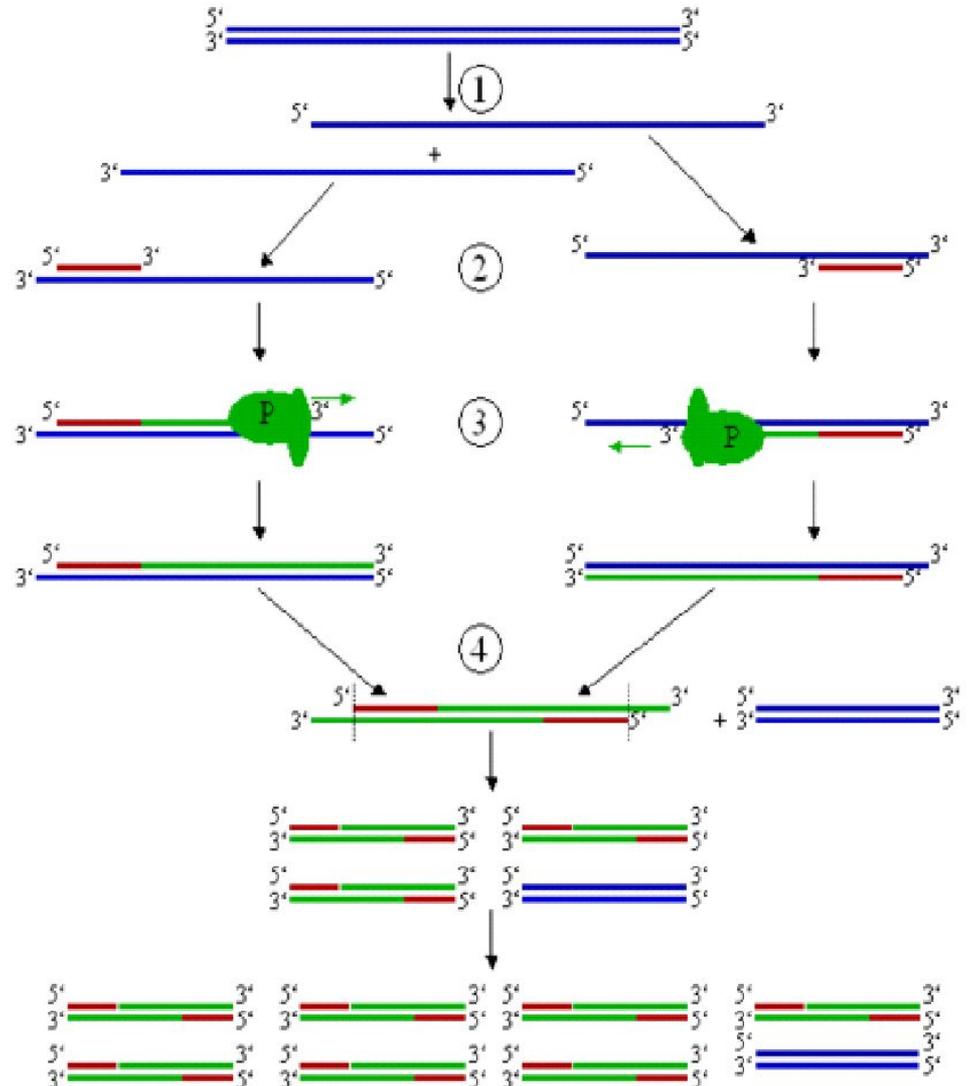
Этапы ПЦР-анализа:

- 1) Выделение ДНК - специальная обработка диагностического материала реагентами для выделения молекул ДНК или РНК и растворения органических веществ (липиды, аминокислоты, пептиды, углеводы, белки и полисахариды) мешающих «чистоте» проведения реакции. Количество времени, затраченного на выделение ДНК, зависит от вида возбудителя инфекции и от исследуемого материала. Например, для выделения ДНК из крови требуется 1,5-2 часа.
- 2) Денатурация ДНК, находящейся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95° С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Этот процесс длится не менее 1 минуты.

- 3) Отжиг праймеров. На этом этапе температуру смеси понижают до 55°C . Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК.
 - 4) Элонгация (синтез). Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы + 75°C , и начинается синтез комплементарной цепи ДНК.
- Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термоциклер. Смена температурного режима и его поддержание осуществляется автоматически.
 - Этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается: например, после первого цикла в пробирке уже есть 2 фрагмента, после второго цикла - 4, после третьего - 8, после четвертого - 16, затем 32, 64, 128, 256... С каждым циклом происходит удвоение числа копий, и после двадцати циклов счет уже идет на миллионы, а после тридцати - на миллиарды.

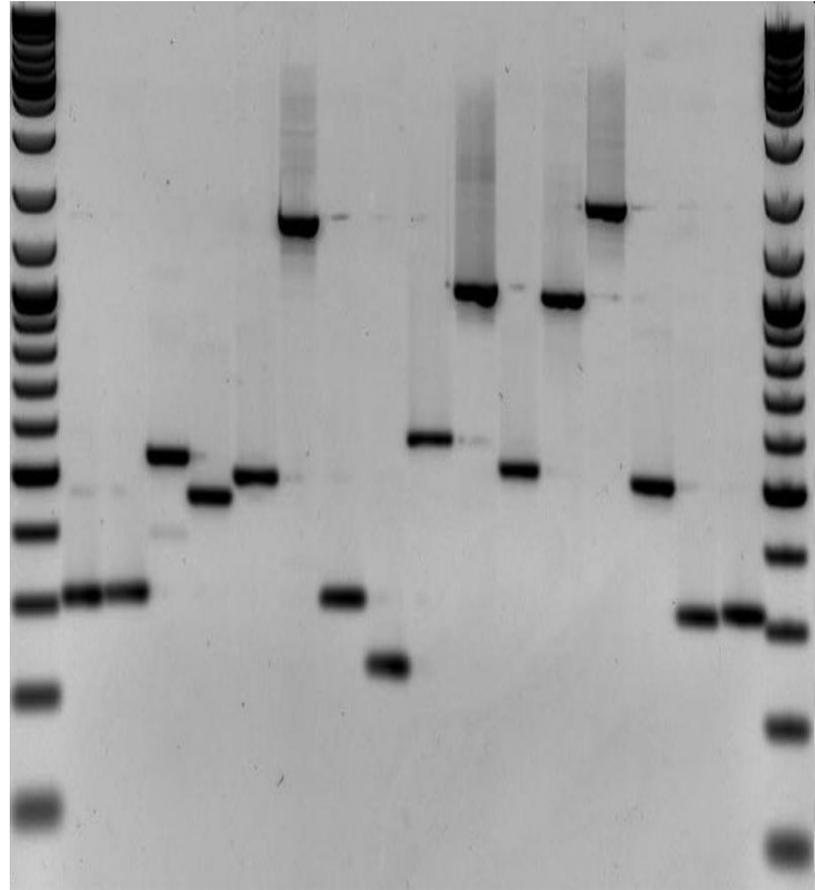
Схематическое изображение цикла ПЦР:

- 1) Денатурация при +94+96 °С.
- 2) 2) Отжиг праймеров при +68 °С.
- 3) Элонгация при 72 °С (P – Taq-полимераза).
- 4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается



Оценка результатов реакции

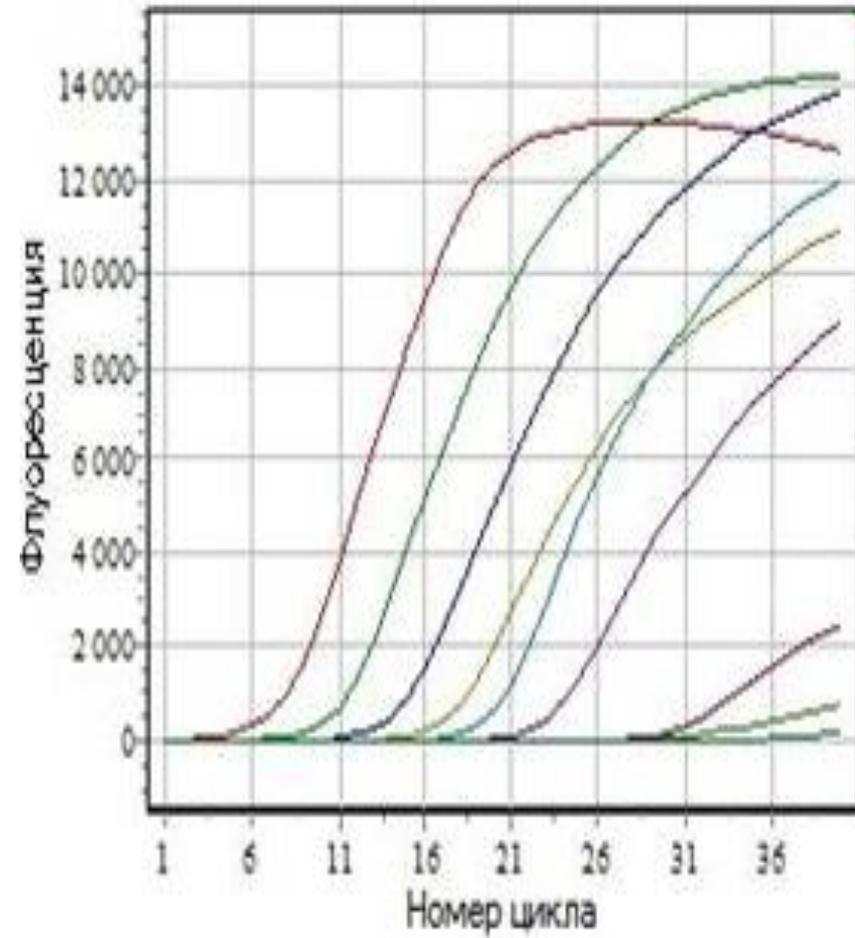
- Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов.
- Метод электрофореза основан на разделении молекул ДНК по размеру. В пластине агарозного геля со специальным красителем ДНК формируют специальные лунки, в которые вносят продукты амплификации.
- Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-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. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254 - 310 нм). Краситель флуоресцирует в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).



ПЦР в реальном времени (или количественная ПЦР, англ. Real-time PCR, qPCR)

- Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно амплификацию и измерение количества данной молекулы ДНК.
- Количество амплифицированной ДНК измеряется в реальном времени после каждого цикла амплификации.
- Для определения используют два метода:
 - флюоресцентные красители, интеркалирующие (т.е., встраивающиеся между основаниями ДНК) в двуцепочечные молекулы ДНК,
 - модифицированные олигонуклеотиды (ДНК-зонды), которые флюоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Наращение флюоресценции каждого вида красителя отображается на мониторе термоциклера в виде графика. Благодаря этому можно наблюдать за ходом реакции в реальном времени.



Метод ПЦР (в диагностике инфекционных заболеваний) обладает следующими преимуществами:

1. Прямое определение возбудителей инфекционных заболеваний: прямое указание на присутствие в забранном у пациента материале специфического участка ДНК возбудителя болезни.
2. Высокая специфичность ПЦР-диагностики. В исследуемом материале выделяется фрагмент ДНК, специфичный, т. е. присущий только конкретному возбудителю - только определенной бактерии или вирусу. Данный участок ДНК уникален и не характерен ни для одной инфекции на земле.
3. Высокая чувствительность ПЦР. Обнаружение инфекции теоретически возможно даже в том случае, если в забранном у пациента материале содержится лишь одна клетка бактерии или вируса. Чувствительность ПЦР-анализа — 10—100 клеток в пробе, другие методы - 10^3 — 10^5 клеток.
4. Универсальность ПЦР-анализа. Для ПЦР-исследования может применяться практически любые материалы, в том числе недоступные для исследования другими методами: слизь, моча, кровь, сыворотка, мокрота...
5. Высокая скорость получения результата ПЦР-анализа (4—5 часов). На культуральные методы исследования затрачивается гораздо больше времени — от нескольких дней до нескольких недель.

Недостатки метода ПЦР:

- Необходима высокая квалификация лабораторного персонала. Чрезвычайная чувствительность метода требует строгого соблюдения специального технологического режима, тщательного выполнения всех этапов анализа.
- Необходима правильная организация ПЦР-лаборатории, поскольку существует риск загрязнения реакционных смесей летучими продуктами амплификации, что приводит к **ложноположительным** результатам.
- Выявление ДНК возбудителя не всегда говорит о его жизнеспособности, а также о непосредственной связи выявленного инфекционного агента с конкретным патологическим процессом.
- Методики, используемые при выделении нуклеиновых кислот, должны максимально удалять вещества, ингибирующие амплификацию (например, гепарин, остатки гема и т.д.), иначе возможны **ложноотрицательные** результаты.

Перспективы практического использования ПЦР-диагностики

В настоящее время наиболее быстро развиваются следующие направления использования ПЦР:

- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика онкологических заболеваний (лейкемии и лимфомы, рак груди, другие злокачественные заболевания);
- диагностика генетических заболеваний;
- трансплантация органов и тканей;
- идентификация личности;
- судебная медицина, криминалистика;
- определение отцовства.