

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

Государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра микробиологии

О.К. ДАВЫДОВА

# **ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ  
ПО ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом  
государственного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2009

УДК 579(07)  
ББК 52.64я7  
Д 13

Рецензент  
доктор медицинских наук, профессор Д.Г. Дерябин

Д 13      **Давыдова, О.К.**  
**Полимеразная цепная реакция: методические указания к лабораторному практикуму по генной инженерии / О.К. Давыдова. – Оренбург: ИПК ГОУ ОГУ, 2009. – 48 с.**

Полимеразная цепная реакция – молекулярно-биологическая реакция, позволяющая получить большое количество копий конкретного фрагмента ДНК, что позволяет обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Помимо этого, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и используется в биологической и медицинской практике для диагностики различных заболеваний, а также в криминалистике и при проведении санитарно-экологического контроля.

Методические указания предназначены для выполнения лабораторных занятий по дисциплине специализации «Генная инженерия» в 9 семестре по специальности 020209 – Микробиология.

ББК 52.64я7

© Давыдова О.К., 2009  
© ГОУ ОГУ, 2009

## Содержание

Введение.....	4
1 Общие принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	5
1.1 Принцип и параметры реакции.....	5
1.2 Основные компоненты ПЦР.....	6
1.2.1 Подбор праймеров. Характеристики праймеров.....	8
1.2.2 Выбор термостабильной ДНК-полимеразы. Характеристики ДНК-полимераз.....	9
1.3 Модификации полимеразной цепной реакции.....	10
1.3.1 Постановка ПЦР с использованием «горячего старта».....	10
1.3.2 Гнездная ПЦР.....	11
1.3.3 Полуколичественный анализ.....	12
1.3.4 ПЦР с использованием обратной транскриптазы.....	13
1.3.5 Мультипраймерная ПЦР.....	14
1.3.6 In Situ ПЦР.....	14
1.3.7 Количественная ПЦР.....	15
1.3.8 ПЦР в реальном времени.....	16
2 Этапы проведения ПЦР.....	18
2.1 Выделение ДНК из образцов.....	18
2.2 Проведение полимеразной цепной реакции (амплификация).....	22
2.3 Детекция результатов амплификации.....	26
2.3.1 Электрофоретическая детекция.....	26
2.3.2 Анализ результатов электрофореза.....	27
2.3.3 Флуоресцентная детекция.....	29
2.3.4 Использование компьютерной программы «Gene» с ПЦР-детектором «Джин».....	34
3 Интерпретация результатов ПЦР.....	40
4 Организация работы при исследованиях методом ПЦР.....	43
4.1 Принципы организации лаборатории.....	43
4.2 Обеззараживание исследуемого материала и режимы дезактивации при постановке ПЦР.....	46
5 Литература, рекомендуемая для изучения дисциплины.....	47
Приложение А Вопросы к экзамену по дисциплине «Генная инженерия».....	48

## Введение

Дисциплина «Генная инженерия» изучается студентами специальности 020209 – Микробиология в 9 семестре как дисциплина специализации (Федеральный компонент ДС.Ф.11).

Дисциплина изучается в соответствии с учебным планом специальности 020209 с учетом ГОС ВПО (раздел 4 «Общие требования к обязательному минимуму содержания основной образовательной программы по специальности (ранее 012400) - Микробиология»), введенными в действие с 10.03.2000 г. Министерством образования Российской Федерации.

Основной целью преподавания дисциплины является изучение технологий получения рекомбинантных ДНК *in vitro*, способов введения их в клетки эу- и прокариот; идентификации клеток, содержащих рекомбинантные ДНК, конструирования штаммов-продуцентов для использования в биотехнологии.

В органической связи с получением фундаментальных знаний по данной дисциплине важной целью ее изучения является формирование практических навыков использования современных методов генетического анализа и генной инженерии в научных и производственных целях. Одним из наиболее распространённых методов генетического анализа на сегодняшний день является метод полимеразной цепной реакции. Этот метод, имитирующий естественную репликацию ДНК, позволяет обнаруживать специфические молекулы ДНК в очень сложной смеси нуклеиновых кислот, что находит своё применение в лабораторной диагностике различных заболеваний, криминалистике, а также при проведении санитарного и экологического контроля.

# **1 Общие принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

## **1.1 Принцип и параметры реакции**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – молекулярно-биологическая реакция, позволяющая получить большое количество копий конкретного фрагмента ДНК. Этот метод, имитирующий естественную репликацию ДНК, позволяет обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул. Искомый фрагмент может быть частью очень сложной смеси нуклеиновых кислот.

Помимо простого увеличения числа копий ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и используется в биологической и медицинской практике (для диагностики заболеваний, для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов).

ПЦР открыта в 1980 году. Этот метод был разработан К. Мюллисом в 1983 году, за что автор в 1993 году удостоен Нобелевской премии. Появление метода ПЦР было обусловлено определенными достижениями молекулярной генетики: расшифровка нуклеотидной последовательности генов ряда микроорганизмов, описание основных принципов использования коротких, искусственно синтезированных молекул ДНК (праймеров), обнаружение уникальных микроорганизмов, ферментная система которых (ДНК-полимераза) термостабильна, что позволяет сохранять ей свою активность при 95 °С и использовать её для проведения полимеразной цепной реакции.

Метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих. Репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. Суть метода заключается в том, что маркировав такими блоками специфический только для данного вида (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести (амплифицировать) именно этот участок (рисунок 1).

Открытие возможности избирательной амплификации определённых участков ДНК с помощью ПЦР, произвело, по существу, революционный переворот во взглядах исследователей, и было взято на вооружение представителями различных дисциплин. ПЦР явилась мощной и доступной альтернативой методу клонирования, а также значительный пересмотр претерпели подходы к секвенированию ДНК, которое теперь используется и для геносистематики,

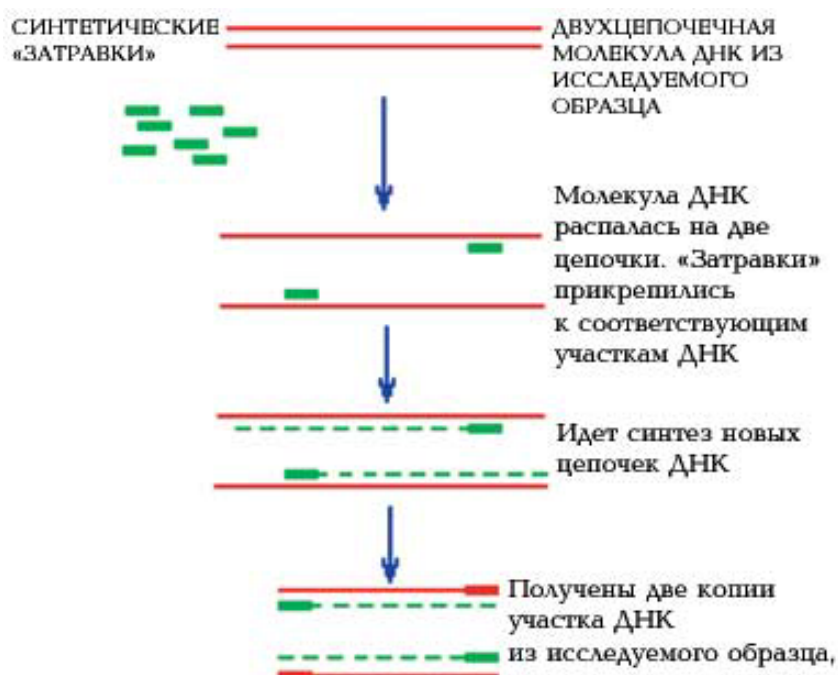


Рисунок 1 – Основной принцип ПЦР

## 1.2 Основные компоненты ПЦР

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 до-страивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

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

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH, так ионы магния выступают как катализатор работы Тaq-полимеразы.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. Длина ДНК-мишени может варьировать от 100 до 30000 п.о. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

На поверхность реакционной смеси наслаивается минеральное масло для предотвращения испарения и разбрызгивания продуктов ПЦР.

Для того чтобы осуществить такой процесс в пробирке, используют два праймера, которые и служат в качестве затравки для синтеза выбранного участка ДНК. При внесении в исследуемую пробу праймеры подобно паре генетических детективов прочесывают раствор в поисках участка, которому они комплементарны и, следовательно, способны присоединиться, образовав двунитчатый стартовый участок. После присоединения (отжига) праймеров начинается воспроизведение с помощью фермента – Таq-полимеразы, специфического фрагмента ДНК (рисунок 2). Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации – это и есть цепная реакция в ПЦР. В результате количество копий фрагмента увеличивается в геометрической прогрессии и через 25 циклов амплификации синтезируется  $10^6$  копий фрагмента.

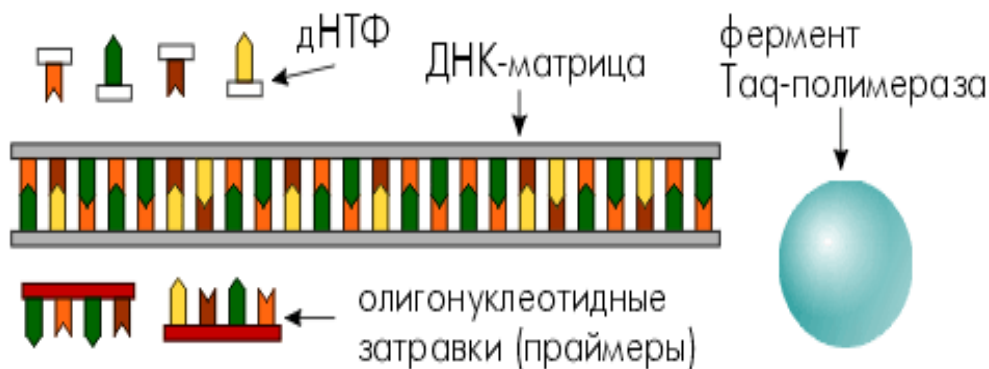


Рисунок 2 – Исходные компоненты ПЦР

В состав современных наборов для ПЦР входит также «внутренний контроль» (ВК), который представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Для инфекционных тест-систем иногда, например, используют  $\beta$ -глобиновый ген, к концам которого с помощью генно-инженерных манипуляций пришивают участки ДНК, гомологичные праймерам, входящим в состав тест-системы. Если внутренний контроль внести в реакционную смесь, то он станет такой же мишенью для отжига праймеров, как и хромосомная ДНК искомого возбудителя инфекции. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают таким образом, чтобы он был в 2 и более раз больше, чем ампликоны, образуемые от амплификации искомой ДНК микроорганизма. 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 специфических ампликонов, но значительно более длинных (тяжелых), чем ампликон микроорганизма. Наличие тяжелых ампликонов 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 наличии в анализируемом образце нежелательных примесей, от которых следует избавиться, но не об отсутствии искомой ДНК.

Флуоресцентный зонд для ПЦР также является важным компонентом реакционной смеси. Он представляет собой олигонуклеотид к которому присоединены молекула флуорофора и молекула гасителя флуоресценции. Последовательность зонда подбирается таким образом, чтобы он отжигался на матрицу между прямым и обратным праймерами.

Флуоресцентные красители (флуорофоры) - это молекулы, которые при поглощении фотона испускают свет с большей длиной волны (т.е. флуоресцируют). Существует большое число флуорофоров, отличающихся по спектру флуоресценции.

Гаситель флуоресценции - молекула, спектр поглощения которой лежит в области длин волн спектра испускания флуорофора. Тушение флуоресценции происходит благодаря безызлучательному переносу энергии от молекулы флуорофора к молекуле гасителя и рассеиванию энергии.

### **1.2.1 Подбор праймеров. Характеристики праймеров**

Праймеры - короткие синтетические олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концам амплифицируемых участков нитей ДНК, которые осуществляют поиск ДНК-мишени и затем формируют короткие зоны дуплицированной структуры и служат затравкой для работы ДНК-полимеразы.

Подбор праймеров – ключевое звено ПЦР, поскольку именно ими определяется возможность амплификации и выявления нужной последовательности, а также достаточная гибкость метода. Простое варьирование праймеров позволяет выявлять многие патогенные микроорганизмы и генетические нарушения при минимальных изменениях в методике.

Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка, поэтому в реакционную смесь вносятся два праймера. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале от 50 °С до 65 °С. Время отжига от 20 до 60 с. Разработка праймеров для ПЦР является самым ответственным звеном в создании диагностикума. Требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который бы отличался генетической консервативностью и присутствовал бы только у интересующего вида микроорганизмов или в исследуемом гене.

#### **Требования к праймерам:**

- 1) размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. Меньше 16-ти – слабая связь с целью;
- 2) разница в температуре плавления праймеров – не более 6 градусов;
- 3) Ц+Г должно быть от 50 % до 60 %.



4) для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC-основания;

5) отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимокomплементарными);

6) отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров);

7) оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически, но не должна быть больше 50 пикомолей на пробирку – иначе начнётся неспецифический отжиг праймеров;

8) упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера:

$$T_m = [(A+T) \times 2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}], \quad (1)$$

если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований и

$$T_m = 22 + 1,46([2 \times (G+C)] + (A+T)), \quad (2)$$

если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований;

9) 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.

### **1.2.2 Выбор термостабильной ДНК-полимеразы. Характеристики ДНК-полимераз**

В настоящее время используются термостабильные ДНК-полимеразы, выдерживающие повышенную температуру и сохраняющие свою ферментативную активность в течение всего процесса амплификации, в отличие от применявшегося первое время фермента – так называемого Клёновского фрагмента ДНК-полимеразы I бактерии *E.coli*, который приходилось добавлять каждый раз после очередного этапа денатурации, что резко усложняло всю процедуру.

В 1980 году полимеразная активность была открытая у некоторых форм термофильных бактерий. Таq-полимераза была выделена из бактерий вида *Thermus aquaticus*, способных расти при температуре от 70 °C до 75 °C российским учёным А.С. Калединым и его коллегами. Молекулярный вес очищенного протеина 94 кД и оптимальная температура полимеразной активности от 70 °C до 80 °C. Активность фермента уменьшается, но полимеразы не денатурирует при 90 °C, при снижении температуры до 70-80 °C уровень активности восстанавливается.

Таq-полимераза имеет очень высокую скорость синтеза. При оптимальных условиях фермент может достраивать до 150 оснований в секунду.

ду. При низкой температуре активность падает до 2 оснований в секунду. Время полужизни Taq-полимераза при 95 °C составляет 40 минут.

Впоследствии множество множество подобных ферментов было получено как из других эубактерий, так и из археобактерий, наиболее известные из них следующие виды ДНК-полимераз.

ColoredTaq-полимераза – та же Taq-полимераза, но с некой добавкой, которая позволяет наносить ПЦР-продукт в лунку агарозы без добавки красителя, что облегчает анализ, особенно при большом количестве образцов.

Tht-полимераза - обычно применяют для постановки реакции обратной транскрипции с последующей ПЦР, когда размер фрагмента не превышает 800 п.н.

Ni-Fi-полимераза - улучшенный вариант Taq-полимеразы, читает более точно и даёт выход ПЦР-продукта более высокий, чем Taq-полимераза в тех же случаях.

LR-полимераза - фермент для "длинного" чтения (более 5 тыс. п.н.). Требуется соблюдения особых условий при постановке ПЦР.

Pfu-полимераза - идеальный фермент для точного чтения коротких фрагментов (менее 2 тыс. п.н.), для последующего клонирования, экспрессии, секвенирования.

### **1.3 Модификации метода полимеразной цепной реакции**

Классический способ постановки ПЦР, принципы которого были изложены выше, нашел свое развитие в некоторых модификациях, направленных на преодоление ограничений ПЦР и повышение эффективности прохождения реакции.

#### **1.3.1. Постановка ПЦР с использованием «горячего старта»**

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции амплификации, используют подход, получивший название «горячий старт» («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 ( $T_m$ ). 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 парафиновой прослойкой на слои (в нижней части - праймеры, в верхней – Taq-полимераза)

и ДНК-мишени), которые смешиваются при расплавлении парафина (~65-75 °С).

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.

### 1.3.2. Гнездная ПЦР

Одним из способов повысить чувствительность реакции является применение метода гнездной («nested») 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 гнездной 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 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-тест-системы позволяют добиваться тех же результатов иными средствами.

Существует несколько вариантов применения гнездной ПЦР в лабораторной диагностике:

1 Согласно первому варианту проводится амплификация (15-30 циклов) с внешней парой праймеров, при этом амплифицируется основной фрагмент ДНК. Далее часть содержимого переносится в новую пробирку, содержащую реакционную смесь, в состав которой входит пара праймеров, узнающая последовательности, лежащие внутри основного ампликона. Второй раунд амплификации (реамплификации) также составляет 15-30 циклов.

2 Во втором варианте температура отжига внутренней пары праймеров подбирается с таким расчетом, чтобы при проведении первого раунда амплификации они не участвовали в реакции. Обычно температура отжига праймеров в этом варианте гнездовой ПЦР подбирается на 10-15 °С ниже, чем для внешней пары праймеров. Программа амплификации в этом слу-

чае состоит из двух программных блоков. После проведения первого программного блока амплификации температура отжига праймеров для второго раунда задается на 10 градусов ниже. Это обеспечивает эффективное участие внутренней пары праймеров во втором раунде амплификации.

Применение гнездовой ПЦР имеет свои преимущества и недостатки. Во-первых, это высокая чувствительность методики. Во-вторых, проведение гнездовой амплификации отменяет необходимость использовать другие методы, подтверждающие специфичность реакции. Кроме того, перенос продуктов реакции из одной пробирки в другую существенно снижает концентрацию ингибиторов, которые могут присутствовать в пробе после выделения нуклеиновых кислот. Однако, несмотря на ощутимые преимущества, перенос ампликона из одной пробирки в другую может приводить к появлению большого количества ложноположительных результатов вследствие перекрестной контаминации проб продуктами амплификации.

### **1.3.3. Полуколичественный анализ**

Для более точной оценки количества ДНК-мишени в реакционной смеси предпринимаются специальные подходы, известные под общим названием полуколичественного ПЦР-анализа. Приставка полу- имеет принципиальное значение из-за условной точности результатов такого анализа.

К таким подходам следует отнести использование специального приборного обеспечения, а также введение в реакционную смесь внутренних контролей с разной концентрацией.

К приборному обеспечению, позволяющему получать полуколичественные результаты ПЦР анализа, следует отнести модели амплификаторов, которые позволяют следить за кинетикой накопления продуктов амплификации. Это достигается красивым решением на стыке физики и биологии. В реакционную смесь вводят гибридационные зонды, в состав которых входят меченные особыми реактивами нуклеотиды, способные флуоресцировать лишь в свободном состоянии. На стадии отжига происходит гибридизация зондов с внутренними участками ампликонов. В процессе элонгации Taq-полимераза разрушает зонды за счет своей экзонуклеазной активности. Это приводит к попаданию меченых нуклеотидов в раствор, где они начинают флуоресцировать. Интенсивность флуоресценции фиксируется специальным детектором и соответствует количеству продуктов амплификации. Если гибридизация не проходит, то зонд остается целым, а нуклеотиды, входящие в его состав, не флуоресцируют.

При исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контролями (несколько 10-кратных разведений ДНК). Сравнение кинетики образования свободных нуклеотидов в реакционных смесях в экспериментальном образце и контрольных пробирках позволяет полуколичественно оценить концентрацию ДНК в образце в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК.

Более простым, но менее надежным вариантом оценки количества специфической ДНК является сравнение конечных результатов одновре-

менной амплификации в одной пробирке образца и контрольной ДНК (внутреннего контроля). При этом ставят несколько реакций с различными разведениями внутреннего контроля. Детекцию проводят после гибридизации с ДНК-зондами, или методом электрофореза (в последнем случае продукты амплификации исследуемой ДНК и внутреннего контроля должны отличаться по размеру).

При всей привлекательности полуколичественного анализа следует отметить некоторые его существенные недостатки:

1 Для полуколичественного анализа допускается использование только препаратов с высокой степенью очистки ДНК. Важно отметить, что существуют примеси, которые могут по-разному влиять на эффективность амплификации исследуемой и контрольной ДНК. При использовании рутинных методов выделения ДНК в большинстве случаев не представляется возможным заранее предсказать количество и состав примесей в клинических образцах.

2 Из-за существования эффекта «плато», а также конкуренции за компоненты реакции при использовании «внутренних контролей» для оценки количества ДНК необходима постановка целого ряда реакций амплификации, что делает этот метод трудоемким и дорогостоящим.

3 Известно, что в некоторых случаях возможны потери ДНК на стадии выделения, что может существенно исказить значение реального количества ДНК в образце.

4 Даже если предположить, что все компоненты, входящие в состав ПЦР-набора, идеально стандартизованы, нет гарантии, что часть ДНК не деградировала в процессе хранения образца.

5 Кроме того, 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.

Таким образом, существующие варианты полуколичественного анализа пока еще не имеют большой практической ценности для рутинного клинического тестирования и могут быть использованы только в некоторых особо сложных случаях или для научных целей.

### **1.3.4 ПЦР с использованием обратной транскриптазы**

Механизм простой полимеразной реакции не пригоден для идентификации рибонуклеиновых кислот, так как Taq-полимераза не способна катализировать синтез ДНК на матрице РНК. Вместе с тем хорошо известно, что геномы многих вирусов состоят из молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) и, вследствие этого, идентификация РНК вирусов, таких как вирус гепатита С, представляется актуальной задачей. Практически это решается с помощью нескольких приемов:

1 Использование дополнительного фермента - РНК-зависимой ДНК полимеразы – обратной транскриптазы (ОТ или RT – reverse transcriptase). Реакция, катализируемая этим ферментом, приводит к образованию одно-

нитевых фрагментов ДНК, используемых в дальнейшем в амплификации с помощью Taq-полимеразы.

2 Неспособность Taq-полимеразы катализировать процесс обратной транскрипции, то есть синтез однонитевой ДНК на РНК-матрице. В 1991 г. Маерсом и Гельфандом был охарактеризован фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза, выделенная из другого экстремального термофила *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза), которая в присутствии ионов марганца катализировала синтез на РНК однонитевой комплементарной ДНК. Последующее добавление в среду ионов магния и хелаторов ионов марганца позволяло ферменту катализировать обычную ДНК-зависимую ДНК-полимеразную реакцию, то есть этот фермент мог быть использован для одновременного синтеза комплементарных однонитевых фрагментов ДНК и для амплификации ДНК.

### **1.3.5. Мультипраймерная ПЦР**

Под мультипраймерной полимеразной цепной реакцией принято понимать процесс коампликации нескольких ДНК-матриц в одной реакционной среде с использованием нескольких пар праймеров, что позволяет проводить скрининг сразу по нескольким инфекционным возбудителям, определять одновременно наличие в биопробе комплекса факторов вирулентности и резистентности к антибактериальным и противовирусным препаратам, а также исследовать состояние нескольких аллельных генов у эукариотических организмов, включая человека.

### **1.3.6. In Situ ПЦР**

Метод In Situ (IS) – ПЦР стал активно развиваться в последнее время благодаря тому, что он, в отличие от ПЦР, проводимой в растворе, позволяет не только специфически амплифицировать какую-либо последовательность ДНК, но и локализовать ее внутри клетки. Метод характеризуется такой же высокой чувствительностью, как и ПЦР, проводимая в растворе (возможность амплификации исходно одной копии ДНК-мишени). Способность локализовать специфическую последовательность делает IS-ПЦР неоценимым как в исследовании латентных вирусных инфекций и экспрессии генов в клетке, так и в оценке эффекта действия новых лекарственных средств на клеточном и молекулярном уровне.

Внутриклеточное обнаружение продуктов ПЦР может осуществляться двумя способами: через опосредованную (непрямую) In Situ гибридизацию или прямую детекцию меченых нуклеотидов, которые включаются в состав амплифицируемого продукта в процессе ПЦР (прямая IS-ПЦР). В непрямом методе гибридизация меченой ДНК-пробы с амплифицированным продуктом обеспечивает максимальную специфичность при внутриклеточной детекции ПЦР-продуктов. В первую очередь это касается протеолитической обработки гистологических срезов или клеточного монослоя. Высокая концентрация протеолитических ферментов или длительное время инкубации с ними, часто приводят к искажению морфологической

картины препарата, а низкие концентрации – к недостаточному протеолизу и, как следствие этого, к низкой проницаемости клеточной мембраны для ПЦР. При проведении IS-ПЦР также учитывается возможность получения как ложно-положительных, так и ложноотрицательных результатов. Первая группа артефактов включает в себя амплификацию неспецифической ДНК в результате ПЦР, неспецифическое включение меченого нуклеотида вследствие репаративных свойств ДНК-полимеразы клетки или используемой в реакции Taq-полимеразы, диффузию амплифицированных фрагментов ДНК из клеток. Вторая группа артефактов (ложноотрицательные результаты) особенно характерна для IS-ПЦР, выполненной на стекле. Их причина до конца не выяснена, но возможно уменьшение эффективности амплификации обусловлено физическими факторами, такими как недостаточно быстрое охлаждение и нагревание препарата, недостаточная конвекция реагентов под зажимами или возможная адсорбция ДНК-полимеразы и других компонентов на поверхности стекла, покрытой специальным агентом. Альтернативное объяснение ложно-отрицательных результатов – это потеря ПЦР-продуктов во время промывок препарата при детекции. Чтобы избежать ложноотрицательных и ложноположительных результатов обычно выполняют следующие контроли: обработка срезов или клеточного монослоя ДНК-азой (отрицательный контроль), проведение амплификации ДНК без ДНК-полимеразы; проведение амплификации ДНК без праймеров (контроль ДНК-полимеразной репарации), проведение процедуры выявления без использования антител, а также без использования щелочной фосфатазы – для регистрации содержания эндогенного биотина и эндогенной активности фермента.

### **1.3.7. Количественная ПЦР**

Для создания количественной ПЦР наиболее распространены подходы, использующие внутренние контроли – стандарты, которые, как и определяемая ДНК, участвуют в ПЦР. Используя контроли – стандарты с разным количеством копий на образец можно определить количество копий матрицы, участвующей в реакции. Внутренний контроль – стандарт выполняет несколько функций. Во-первых, он позволяет выявить возможное ингибирование реакции ингибиторами, содержащимися в выделенном клиническом образце. Во-вторых, использование контроля в ходе реакции в той же пробирке, где происходит определение испытуемой матрицы, позволяет учесть эффект неравномерности протекания реакции, так как условия амплификации стандарта и определяемой ДНК или РНК абсолютно идентичны. В третьих, использование контроля позволяет в значительной степени обособиться от изучения закономерностей протекания реакции, так как основным алгоритмом определения является совпадение интенсивности сигнала от внутреннего контроля-стандарта и сигнала от определяемого ампликона. Кроме описанного выше метода количественного ПЦР с использованием внутреннего контроля на практике используется еще один прием, получивший название «метод конечных разведений». Суть подхода

в том, что определяется конечное разведение образца ДНК или РНК, дающее положительный результат ПЦР. В каждом определении используется панель стандартов для выявления чувствительности работы тест-системы. Этот метод не дает реальной возможности контролировать процесс амплификации со всеми его отклонениями от ожидаемого, вместе с тем, техника его наиболее проста в исполнении. Из-за методической простоты некоторые лаборатории до сих пор используют этот метод для, так называемых, внутрилабораторных (in house) технологий. Такой подход неприемлем для отечественной лабораторной службы, строго регламентирующей возможность работы только с сертифицированными наборами реагентов.

### **1.3.8. ПЦР в реальном времени**

На сегодняшний день известен способ решения проблемы количественного определения ампликона в ходе реакции. Речь идет о регистрации накопления продуктов реакции в реальном времени (Real time PCR) и построении калибровочных кривых по реальным процессам, происходящим в каждой конкретной пробирке. В основе метода лежит способность Taq-полимеразы гидролизовать последовательность ДНК в направлении 5'-3'.

В ходе реакции к образцу добавляется специальный зонд, модифицированный двумя флуоресцентными красителями, имеющими близкие максимумы поглощения и флуоресценции. Расстояние между молекулами красителей на зонде подобрано таким образом, что происходит перенос энергии от одной молекулы - испускающей первичный квант флуоресценции, к другой, которая испускает квант света в более длинноволновой области спектра. Амплификация происходит в специальном приборе, который оснащен устройством освещения возбуждающим светом каждой амплификационной ячейки и многоканальным флуоресцентным детектором со спектральным разрешением анализируемого сигнала. При наличии специфической матрицы в начале амплификации происходит смещение максимума флуоресценции из-за деградации олигонуклеотидного зонда (из-за 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы) и, вследствие этого, отменой переноса энергии от одного флуорофора к другому. Анализ кинетики флуоресценции в каждой амплификационной ячейке позволяет рассчитывать количество исходной матрицы, используемой в реакции амплификации. Кроме того, анализ в реальном времени позволяет регистрировать все артефакты, связанные с вышеперечисленными причинами, и вносить необходимые поправки.

Метод ПЦР с детекцией сигнала флуоресценции в реальном времени стал в настоящее время признанным стандартом при исследовании ДНК и РНК. Он позволяет проследить кинетику реакции и на основе полученной информации судить о наличии и исходном количестве ДНК-мишени в образце. Кроме того, ПЦР в реальном времени позволяет определять известные мутации в последовательности ДНК.



Важным достоинством метода является отсутствие необходимости в постреакционных манипуляциях с образцами и, как следствие снижение риска контаминации и сокращение времени анализа.

Как правило, корректное проведение ПЦР-эксперимента требует постановки нескольких реакций в одной пробирке одновременно. Для этого необходимо использовать зонды, меченные разными флуоресцентными красителями и соответствующими гасителями флуоресценции.

Основные преимущества ПЦР в реальном времени по сравнению с методом анализа по конечной точке:

- 1) количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- 2) сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- 3) повышение специфичности реакции за счет использования гибридационных зондов;
- 4) обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- 5) исключение послеамплификационных манипуляций с продуктом и, как следствие, снижение риска контаминации, экономия времени и сокращение затрат на поддержание ПЦР-лаборатории;
- 6) автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа

Метод ПЦР в реальном времени основан на детектировании сигнала флуоресценции, позволяющем наблюдать процесс накопления продукта в процессе реакции. Сигнал флуоресценции нарастает пропорционально увеличению количества продукта амплификации в исследуемом образце. Момент заметного увеличения сигнала и отрыв его от базовой линии, так называемый пороговый цикл, зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Другими аспектами модернизации метода ПЦР являются заметное сокращение временных интервалов протекания всех стадий реакции, длившейся ранее несколько часов (25-35 стандартных циклов), а также миниатюризация специальных пробирок и уменьшение реакционных объемов, которые пока ещё составляют от 20 до 100 микролитров. Однако в последнее время появились сообщения о проведении ПЦР в субмикролитровых объемах. Так если бы объем реакционной смеси был равен всего 160 нанолитрам (что составляет, для сравнения, приблизительно 1/500 часть обычной капли), а продолжительность всей реакции (сокращенная до 10 циклов) не превышала 4-х минут без потери разрешающей способности самого метода.

## 2 Этапы проведения ПЦР

### Выделение ДНК (РНК)

На данной стадии проведения анализа клиническая проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Выбор методики выделения ДНК (РНК) в основном определяется характером обрабатываемого клинического материала.

### Амплификация специфических фрагментов ДНК

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой.

На данной стадии происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимым для их дальнейшей детекции. В большинстве методик определения специфических фрагментов генома используется т.н. «классический» вариант направленной ПЦР.

### Детекция продуктов амплификации

В большинстве методик на данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии, методом **горизонтального электрофореза в агарозном геле**. До проведения электрофоретического разделения к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены **гибридизационные схемы детекции**. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК гибридизуется (образует 2-х цепочечные комплексы – «гибриды») со специфическим олигонуклеотидным зондом. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически.

### 2.1 Выделение ДНК из образцов

Для выделения ДНК 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 ПЦР.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, описанная Дж.Мармуром. Она включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и пересаживанием ДНК спиртом. Этот метод позволяет получить чистый препарат ДНК. Однако он 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 Р.Бумом 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 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, некоторые микроорганизмы не поддаются разрушению простым кипячением. В этих случаях необходимо введение дополнительных стадий обработки образца.

При массовом скрининге, когда важно получить статистические данные, возможно 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.

Способ выделения ДНК зависит как от вида определяемого возбудителя, так и от вида клинического материала. В настоящее время разработаны специальные комплекты, содержащие готовую смесь. Необходимо только добавление материала. Это обеспечивает защиту от загрязнения. Недостатком таких комплектов является ограниченный список используемого материала. Обработка проб проводится в микроцентрифужных пробирках типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Время обработки зависит от типа используемого комплекта и фирмы-производителя.

В качестве исследуемого материала могут служить соскобы эпителиальных клеток, кровь, плазма, сыворотка, плевральная и спинномозговая жидкости, моча, мокрота, слизь и другие биологические выделения.

Образцы могут находиться при комнатной температуре не более 2-х часов. При необходимости более длительного хранения пробы могут быть помещены в холодильник с температурой от 2 °С до 8 °С на срок не более суток. Более продолжительное хранение (до 2-х недель) допустимо в замороженном виде в морозильной камере при температуре минус 20 °С. Не допускается повторное замораживание-оттаивание проб.

Эпителиальные соскобы со слизистых оболочек обычно используются для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, таких как гонорея, хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, герпетическая и другие инфекции, поражающие слизистые оболочки. Мокрота используется для диагностики туберкулеза и реже для диагностики респираторных форм хламидиоза и микоплазмоза. Кровь, плазма, сыворотка используются для ПЦР-анализа вирусов гепатитов В, С, D, G, герпеса, ЦМВ, ВИЧ, исследования генов человека (таблица 1).

Таблица 1 – Примеры биопроб и выделяемых из них возбудителей заболеваний.

Вид материала	Тип нуклеиновой кислоты
Венозная кровь	РНК вируса гепатита С ДНК вируса гепатита В ДНК вируса Эпштейна-Барр ДНК вируса простого герпеса человека 1,2 типа ДНК вируса папилломы ДНК цитомегаловируса
Мазок из урогенитального тракта	ДНК хламидии трахоматис ДНК уреаплазмы ДНК токсоплазмы ДНК трихомонады ДНК микоплазмы генеталиум, хоминис или пневмонии
Мокрота	ДНК хламидии пневмонии ДНК микоплазмы пневмонии ДНК нейссерии гонореи ДНК микобактерии туберкулеза
Ликвор	ДНК вируса герпеса человека 6 типа ДНК вируса простого герпеса 1,2 типа ДНК цитомегаловируса ДНК токсоплазмы гондии

## **Лабораторная работа №1. Выделение ДНК из биопроб**

*Цель работы* – получение навыков выделения ДНК из соскобов эпителиальных клеток, из цервикального канала, уретры, влагалища, задней стенки глотки, слюны.

Для выделения ДНК из данного типа материала используют комплекты «ДНК-экспресс», которые характеризуются простотой и удобством выполнения работы.

*Методика выполнения работы*

1 В пробирку, содержащую реактив «ДНК-Экспресс» добавить 100 мкл анализируемого материала.

2 Тщательно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 с.

3 Пробирку с перемешанным содержимым поместить в предварительно прогретый до 98 °С твердотельный термостат и прогреть при 98 °С в течение 10 минут.

4 После прогрева пробирки перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и осадить конденсат при 14000 g в течение 15 с.

Полученный в результате центрифугирования супернатант используется в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

## **Лабораторная работа №2. Выделение ДНК из крови, плазмы, сыворотки**

*Цель работы* – получение навыков выделения ДНК из крови, плазмы, сыворотки.

Для выделения ДНК из данного типа материала используют специальные комплекты, предназначенные для этих целей.

*Методика выполнения работы*

1 В чистую пробирку объемом 1,5 мл добавить 300 мкл лизирующего раствора.

2 Затем добавить 100 мкл анализируемого материала. В пробирку с отрицательным контролем вместо пробы добавить 100 мкл реагента отрицательного образца.

3 Перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

4 Поставить в термостат на 15 мин при 65 °С.

5 Добавить 300 мкл реагента для преципитации и центрифугировать 15 мин. при 14000 g.

6 Слить надосадочную жидкость и добавить 400 мкл промывочного раствора №1.

7 Перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

8 Центрифугировать 5 мин. при 14000 g.

9 Слить надосадочную жидкость и добавить 250 мкл промывочного раствора №2.

10 Перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

11 Центрифугировать 5 мин при 14000 g.

12 Слить надосадочную жидкость и подсушить осадок, поставив про-

бирки с открытыми крышками в термостат на 5 мин.

13 Добавить 40 мкл буфера для растворения нуклеиновых кислот и перемешать на вортексе.

14 Термостатировать 10 мин.

### **Лабораторная работа №3. Выделение ДНК из осадка мочи**

*Цель работы* – получение навыков выделения ДНК из осадка мочи.

Для выделения ДНК из данного типа материала используют комплекты «ДНК-ЭКСПРЕСС».

*Методика выполнения работы*

1 В центрифужную пробирку отобрать 10-15 мл мочи. Мочу предварительно взболтать.

2 Центрифугировать 15-20 мин при 3000 об/мин.

3 Слить надосадочную жидкость, стараясь не захватить осадок.

4 500 мкл суспензии осадка перенести в пробирку вместимостью 1,5 мл, пробирку плотно закрыть.

5 Центрифугировать 15 с при 12000 об/мин.

6 Тщательно удалить надосадочную жидкость.

7 Однократно промыть объемный осадок с использованием 1 мл физраствора.

8 Добавить 100 мкл осадка в пробирку «ДНК-ЭКСПРЕСС»

9 Перемешать на вортексе в течение 3-5 с.

10 Пробирку с перемешанным содержимым поместить в предварительно прогретый до 98 °С твердотельный термостат и прогреть при 98 °С в течение 10 минут.

11 После прогрева пробирки перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и осадить конденсат при 14000 г в течение 15 с.

Полученный в результате центрифугирования супернатант используется в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

### **2.2 Проведение полимеразной цепной реакции (амплификация)**

Изолированное умножение гена или его фрагмента называют амплификацией. Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающие при различных температурных режимах.

**1 этап: денатурация ДНК.** Протекает при 93-95 °С в течение 30-40 с.

**2 этап: отжиг праймеров.** Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка, поэтому в реакционную смесь вносятся два праймера. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале от 50 °С до 65 °С. Время отжига 20-60 с.

**3 этап: достраивание цепей ДНК.** Комплементарное достраивание 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. Процесс синтеза катализируется ферментом Таq-полимеразой и проходит при температуре от 70 до 72 °С. Время протекания синтеза – от 20 до 40 с.

В первом цикле двунитевые ДНК-мишени используются как матрицы с сайтами связывания праймеров, при этом ориентация 3'-концов каждого праймера навстречу друг другу. После первого цикла синтезируются две новые нити, на одних концах которых расположены праймеры, а на других концы нити ДНК различной длины (рисунок 3).

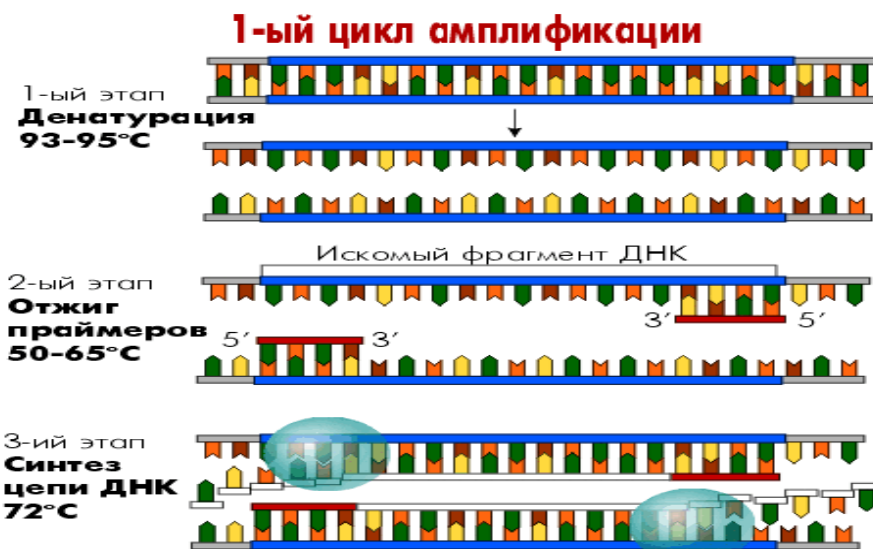


Рисунок 3 – Параметры первого цикла амплификации

Во втором цикле каждая из четырех нитей ДНК, взаимодействует с праймерами (которые присутствуют в избытке), чтобы инициировать новый раунд синтеза ДНК. Из восьми однонитевых продуктов две нити ограничены только праймерами по длине - это короткие последовательности или ампликоны, которые будут накапливаться экспоненциально в последующих циклах (рисунок 4).



Рисунок 4 – Второй цикл амплификации

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего старта», который обеспечивается приготовлением реакционной смеси, состоящей из двух слоев: нижнего (ПЦР-буфер и праймер с дНТФ) и верхнего (ПЦР-буфер и Taq-полимераза), разделенных прослойкой парафина. Смешение слоев и превращение их в реакционную смесь происходит при расплавлении парафина на стадии денатурации. Материал исследуемого клинического образца вносят на реакционную смесь под стерильное минеральное масло, которое используется для предотвращения испарения ДНК во время проведения ПЦР. Пробирки помещают в термоциклер (амплификатор). Амплификацию проводят по заданной программе в автоматическом режиме. Время проведения реакции в зависимости от заданной программы и составляет 1 час 20 мин – 1 час 30 мин. Контроль реакции осуществляется после или одновременно с постановкой ПЦР.

Результатом циклического синтеза является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой

$$A = M \times (2^n - n - 1) \sim 2^n, \quad (3)$$

где  $A$  - количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

$M$  – начальное количество ДНК-мишеней;

$n$  - число циклов амплификации.

Фактически же значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет, по некоторым данным, от 78 % до 97 %. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции это значение может быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает уравнение

$$A = M \times (1+E)^n, \quad (4)$$

где  $E$  – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты, однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле

$$K = M \times n, \quad (5)$$

где  $K$  – количество длинных продуктов амплификации;

$n$  - число циклов.

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.

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 реактантов (дНТФ и фермента), количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дууплексы, конкуренция за реактанты неспецифическими продуктами или праймер-димерами, 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.

#### **Лабораторная работа № 4. Проведение амплификации**

*Цель работы* – провести многократное увеличение количества выделенного образца ДНК.

##### *Методика выполнения работы*

1 Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл в соответствии с количеством анализируемых проб. Подготовить и промаркировать пробирки для положительного (маркировка «К+») и отрицательного (маркировка «К-») контрольных образцов и двух нормировочных пробирок – «ФОН».

2 Добавить в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы. В пробирки, маркированные «ФОН», добавить 10 мкл ПЦР-буфера.

3 Добавить 10 мкл (1 капля) минерального масла в каждую пробирку.

4 Добавить 6 мкл исследуемого образца в каждую пробирку, не повреждая слой парафина (кроме пробирок «К+», «К-», «ФОН»). В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», добавить по 6 мкл отрицательного контрольного образца, в пробирку, маркированную «К+», добавить 6 мкл положительного контрольного образца.

5 Центрифугировать пробирки при 1000 об/мин в течение 3-5 с.

6 Установить пробирки в амплификатор.

7 Режим амплификатора определить из таблицы 2.

Примечание – Приготовление отрицательного контрольного образца аналогично методике выделения, но вместо материала добавляется дистиллированная вода.

Таблица 2 – Режимы амплификации для ДНК *Chlamidia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, HPV 6,11; HPV 51,26, HCV, HAV, HDV, HGV, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae*, EBV

Для амплификаторов с активным регулированием		Для амплификаторов без активного регулирования		Кол-во повторов
Температура, °С	Время, с	Температура, °С	Время, с	
93	90	93	90	1
93	20	93	50	
64	5	64	50	5
72	5	72	50	
93	5	93	50	
64	5	64	50	40
72	5	72	50	
10	хранение	10	хранение	

## 2.3 Детекция продуктов амплификации

### 2.3.1 Электрофоретическая детекция

Электрофорез в геле позволяет легко, без применения радиоизотопов, обнаружить амплифицированную ДНК и определить ее размер. Остановимся на некоторых ее особенностях применительно к анализу ПЦР-амплифицированной ДНК.

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламидные гели. 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 используют метод горизонтального электрофореза.

10-20 мкл амплифицированной ДНК разделяют в агарозном геле с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия вместе со стандартными фрагментами размером 50-1000 п.н. В зависимости от размера образующихся в результате ПЦР ампликонов используют гель с содержанием агарозы от 1,5 % до 2,5 %. При заливке с помощью гребенки в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации.

Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гелеэлектрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрица-

тельно 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 пяти-балльной 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.

Электрофорез проводят при высоком напряжении (10-15 В/см), поскольку образующиеся при ПЦР небольшие фрагменты сложно детектировать после электрофореза в течение ночи при небольшом напряжении вследствие их интенсивной диффузии. Разрешение можно повысить, используя полиакриламидные или агарозные гели NuSieve (FMC Bio-Products, Rockland, USA) с высокой концентрацией агарозы (3-4 %). Впрочем, если анализ нужно провести быстро и при небольших затратах, вполне приемлемы 2 % агарозные гели.

Обычно при амплификации ДНК, выделенной из фиксированных тканей, выход ПЦР-продуктов ниже и они менее специфичны, чем в случае амплификации высокоочищенной ДНК.

### **2.3.2 Анализ результатов**

В первую очередь оценивают контрольные пробы. В электрофоретической дорожке, соответствующей положительному контролю, должна присутствовать оранжевая светящаяся полоса. Ее электрофоретическая подвижность должна соответствовать указанной в инструкции длине ампликона.

В электрофоретической дорожке, соответствующей отрицательному контролю, такая полоса должна отсутствовать. Наличие такой полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации – загрязнении используемых реагентов исследуемой ДНК или ампликоном. Опытные пробы оценивают по наличию в соответствующей дорожке полосы, которая располагается на том же уровне, что и полоса в положительной контрольной пробе. Интенсивность свечения полосы соответствует количеству исследуемой ДНК в пробе, что позволяет проводить полуколичественную оценку ПЦР. Обычно положительные результаты оценивают по четы-

рехбальной шкале. Если же свечение полосы в опытной пробе очень слабое, то такую пробу следует переставить.

В последнее время в коммерческие тест-системы вводят внутренний контроль, дающий на электрофореграмме отдельную полосу. Применение внутреннего контроля позволяет исключить получение ложноотрицательных результатов вследствие присутствия ингибиторов реакции.

1 В отрицательном контрольном образце (К-) для наборов с внутренним контролем должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК). Появление второй полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

Для наборов без внутреннего контроля полосы должны отсутствовать. Появление полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

2 В положительном контрольном образце (К+) для наборов с внутренним контролем должны выявляться две полосы: 1) полоса оранжево-красного цвета, соответствующая положительному контролю (ПК); 2) полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК).

Для наборов без внутреннего контроля должна выявляться одна полоса, соответствующая ПК.

3 Анализируемые пробы:

– отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контроля (ПК) свидетельствует об отсутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе;

– наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю – о присутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе.

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю ВК.

Если в анализируемом образце для наборов с внутренним контролем отсутствует как полоса положительного контроля, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР, неадекватная работа амплификатора, ошибка выполнения протокола проведения анализа).

## **Лабораторная работа № 5. Детекция результатов амплификации с помощью электрофореза**

*Цель работы* – научиться детектировать результаты ПЦР с помощью электрофореза.

*Методика выполнения работы*

1 Приготовить рабочий электрофорезный буфер (80 мл 10×ТБЕ довести до 800 мл дистиллированной водой).

2 Приготовить 1,5 % раствор агарозы (к 1500 мг агарозы добавить 100 мл буфера, расплавить до образования прозрачного однородного раствора).

3 Остудить раствор до 50 °С, добавить 320 мкл бромистого этидия, перемешать, залить в кювету, установить гребёнку для получения лунок, дать застыть. **ВНИМАНИЕ!** Бромид этидия – канцерогенное соединение, при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые промыть соответствующий участок водой.

4 Достать подложку с застывшим агарозным гелем из кюветы для заливки, осторожно вынуть гребёнку, не повредив лунки.

5 Закапать пробы в лунки по 5 мкл.

6 Залить в камеру для электрофореза 800 мл рабочего раствора буфера, добавить 320 мкл бромистого этидия, буфер должен полностью покрывать гель. Камера должна располагаться на строго горизонтальной поверхности.

7 Поместить подложку с готовым гелем в камеру (лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду), подключить камеру к источнику тока, установить режим проведения электрофореза.

8 По прошествии установленного времени отключить источник тока, вынуть подложку с гелем, ополоснуть его дистиллированной водой для удаления излишков бромистого этидия.

9 Аккуратно перенести гель на трансиллюминатор. После включения трансиллюминатора использовать защитные УФ-очки.

10 Задokumentировать электрофореграмму цифровым фотоаппаратом.

11 Провести анализ результатов.

### **2.3.3 Метод флуоресцентной детекции**

В настоящее время для детекции продуктов амплификации используется метод флуоресцентной амплификации. При этом в амплификационную смесь вводятся меченые флуорофорами зонды, специфичные к продукту реакции. Таким образом, для анализа получившихся результатов исключается стадия электрофореза, поскольку детекция продуктов реакции происходит на специализированном флуориметре и занимает всего несколько секунд. В отличие от дорогостоящего ПЦР «в реальном времени» это качественный анализ, являющийся альтернативой обычной ПЦР с последующим электрофорезом.

Преимущества флуоресцентной детекции по сравнению с обычными методами:

- 1) сокращение времени анализа до 2-3 часов;
- 2) меньшая стоимость в расчете на одну пробу;
- 3) более высокая воспроизводимость и надежность результатов;
- 4) удобный формат поставки «в одной пробирке».

В основе гибридационно-флуоресцентной (ГФ) детекции лежит принцип гибридизации флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате которой происходит нарастание интенсивности флуоресценции.

Присутствие такого зонда в реакционной смеси позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации непосредственно в ходе полимеразной цепной реакции (детекция в режиме «реального времени» – «Real-time PCR») или по ее окончании (детекция по «конечной точке» – «End-point analysis») путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. В обоих случаях детекция результатов ПЦР осуществляется без извлечения продуктов реакции из пробирок, что позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами ПЦР. Дополнительным преимуществом данной модификации метода ПЦР является возможность автоматизировать учет результатов анализа, снизить субъективизм в интерпретации результатов.

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют следующие наиболее распространенные подходы:

### 1 Выщепление 5'-концевой метки (TaqMan Assay)

Данная методика основана на использовании 5'-эксонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входит флуоресцентная метка в 5'-положении и гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

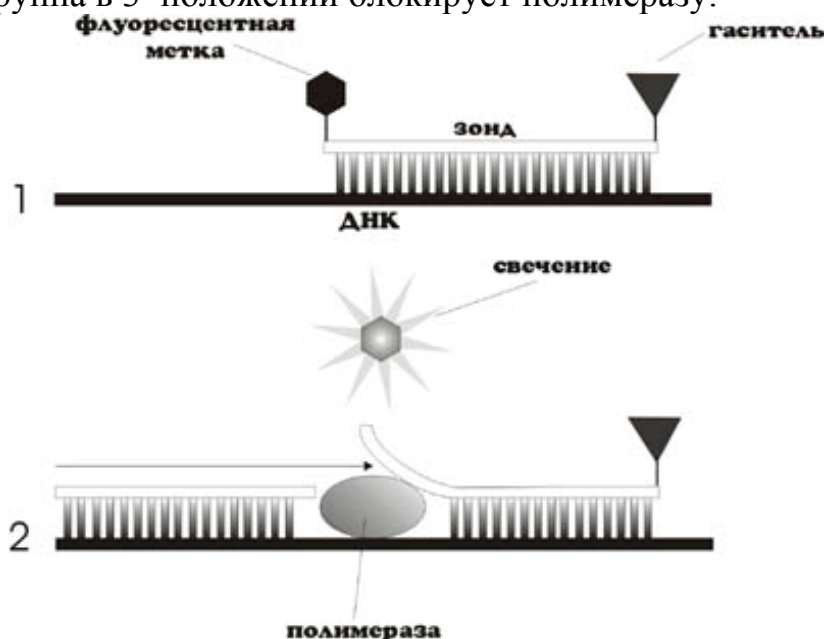


Рисунок 5 – Выщепление флуоресцентной метки в 5'-положении ДНК-полимеразой

В ходе ПЦР во время стадии отжига праймеров происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, причем чем больше продуктов амплификации образуется в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-эксонуклеазной активности. Таким образом происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детекти-

руемого свечения (рисунок 5). Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано в ходе ПЦР на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

## 2 Использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons)

Данная методика отличается от описанной выше тем, что концевые последовательности зонда представляют собой взаимно комплементарные области, поэтому при температуре отжига праймеров они схлопываются и образуют шпильки. Внутренняя область зондов содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную амплифицируемой области. При отжиге праймеров зонды, не присоединившиеся к ДНК матрице, остаются в «схлопнутом» состоянии, так что происходит тушение флуоресценции.

Те же зонды, которые отжигаются на матрицу, разворачиваются, и флуоресцентная метка и гаситель расходятся в разные стороны. Таким образом, увеличивается интенсивность свечения.

## 3 Применение двух зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay)

Данный способ детекции накопления продуктов амплификации отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флуоресценции происходит при комплементарном связывании с ампликонами сразу двух ДНК-зондов. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму флуорофору, находящемуся на 5'-конце второго зонда, причем расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида.

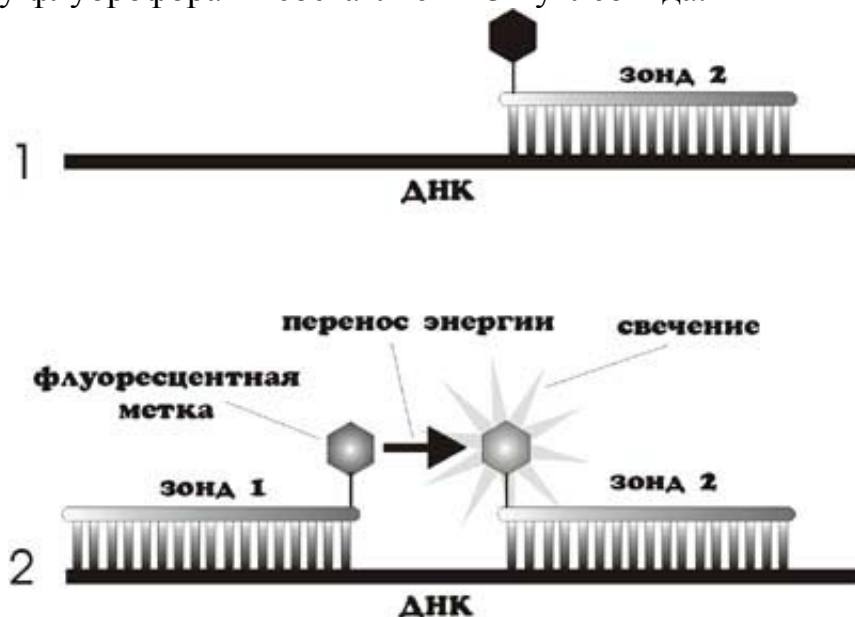


Рисунок 6 – Перенос энергии при использовании двух ДНК-зондов

При одновременном связывании обоих зондов с ДНК матрицей испускаемое первым флуорофором излучение передается на второй флуоро-

фор, а его излучение детектируется прибором. Таким образом, возрастает специфичность анализа (рисунок 6).

#### 4. Использование интеркалирующих агентов

Этот способ детекции основан на том факте, что флуоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в двухцепочечные молекулы ДНК (рисунок 7). Таким образом, можно наблюдать за накоплением продуктов амплификации.

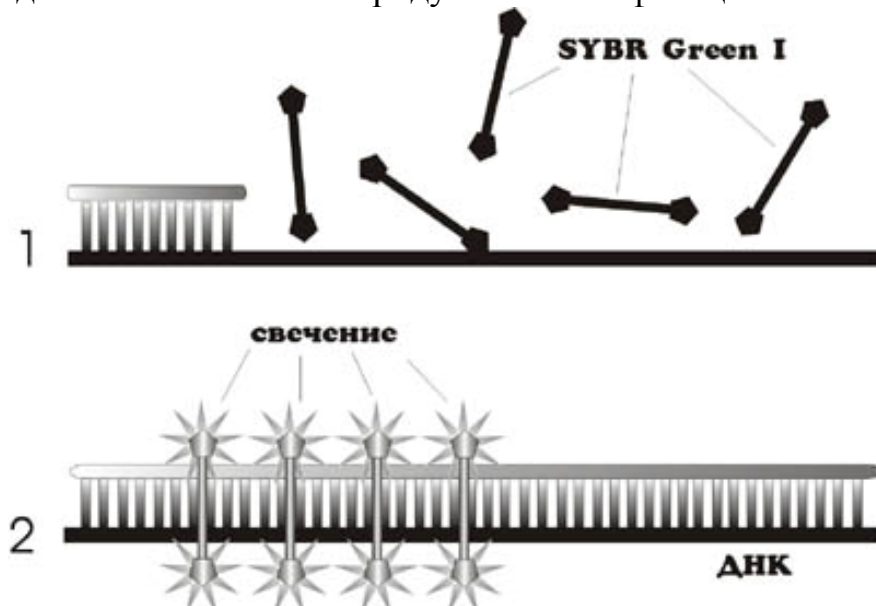


Рисунок 7 – Свечение ДНК-зондов при интеркаляции

Очень важно отметить то, что увеличение флуоресценции может быть связано как с накоплением специфического продукта, так и неспецифического (праймеры-димеры). Для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение полученных ампликонов с помощью построения так называемых «кривых плавления».

Для этого после окончания ПЦР реакционную смесь нагревают и непрерывно измеряют флуоресценцию. По достижении температуры плавления продукта амплификации флуоресценция резко снижается (рисунок 8).

Каждое резкое уменьшение флуоресценции на графике соответствует числу полосок, получаемых на электрофореze, то есть числу разных типов ампликонов. Для облегчения работы с полученной информацией проводят дифференциальный анализ кривой плавления. Такой способ визуализации полученных данных гораздо удобнее для понимания и анализа.

Применение кривых плавления не ограничивается только детекцией продуктов амплификации с помощью бромистого этидия и SYBR Green I. При использовании кривых плавления в системах с ДНК-зондами (Taqman assay, beacons) возможно различать точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда. Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления зонда и к изменениям в графике кривой плавления.



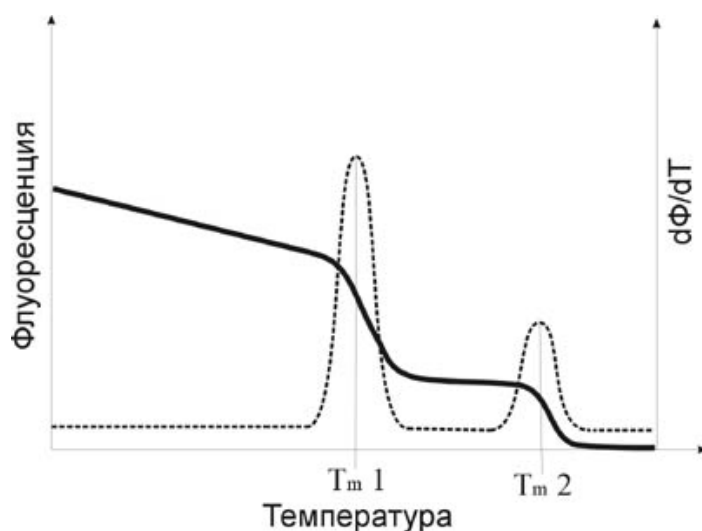
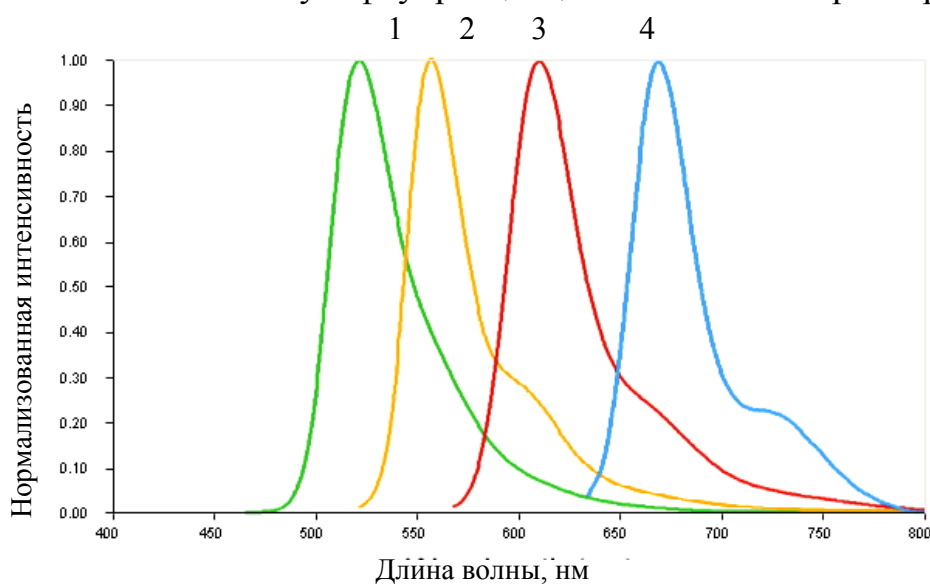


Рисунок 8 – Использование кривых плавления для детекции продуктов амплификации

В современных вариантах ПЦР в реальном времени уже достаточно давно используют одновременно несколько флуоресцентных зондов, меченных разными флуоресцентными красителями – так называемые мультиплексные варианты ПЦР в реальном времени (multiplex Real-Time PCR). Это позволяет обнаружить в одной пробирке одновременно несколько продуктов ПЦР путём детекции различных флуоресцентных красителей (рисунок 9). Для этого регистрация флуоресцентного сигнала от каждого красителя происходит в определенном для него диапазоне (канале). Диапазон этот выбирается таким образом, чтобы детектировать сигнал только одного красителя, не затрагивая области соседних.

Если настроить прибор на детекцию сигнала в максимуме флуоресценции каждого красителя, то остальные красители в этом максимуме будут иметь очень низкую флуоресценцию и ей можно пренебречь.



1 – FAM; 2 – HEX; 3 – ROX и 4 – Cy5.

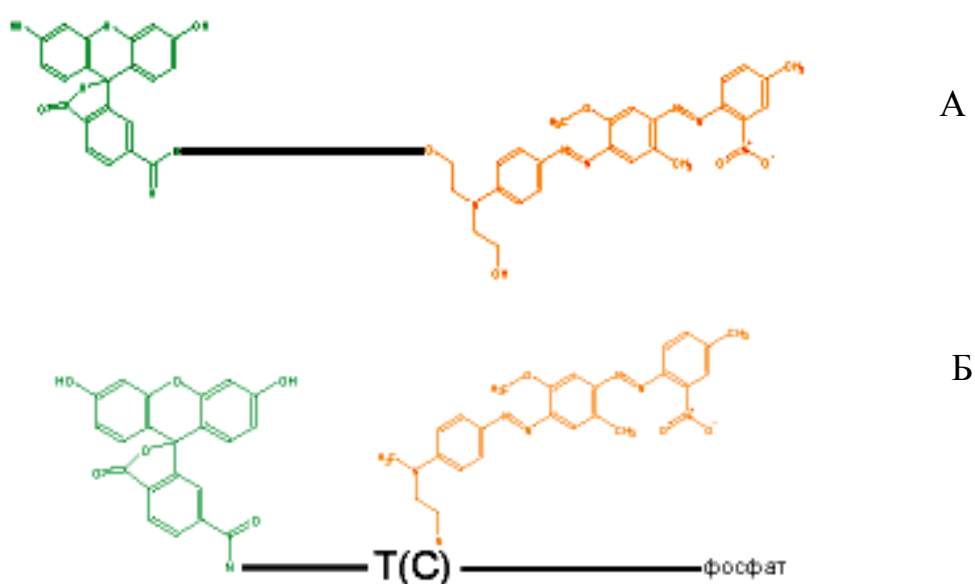
Рисунок 9 - Спектры флуоресценции для красителей

На сегодняшний день существует уже довольно много различных тушителей, которые применяют для ПЦР в реальном времени. Основная задача такого тушителя это сделать исходное (фоновое) значение флуоресценции зонда, как можно меньше, с тем, чтобы затем в результате ПЦР, зонд «разгорелся» как можно лучше. Варианты используемых красителей и тушителей представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Возможность комбинирования различных тушителей и красителей в зондах для ПЦР в «реальном времени»

Краситель/тушитель	ВНQ1	ВНQ2	ВНQ3
FAM	+	-	-
HEX	+	+	-
ROX	-	+	-
Cy5	-	+	+

В принципе, чем ближе находятся молекулы тушителя и красителя, тем лучше эффект тушения и ниже фоновая флуоресценция. Для этого, например, были сделаны варианты зондов типа Taqman, у которых молекулы красителя находятся не на 5'-конце олигонуклеотида, а встроены в середину цепи (рисунок 10), таким образом расстояние можно сократить до минимальных 6-7 нуклетидов и заметно увеличить эффективность «разгорания».



А – красители на 5' и 3' концах зонда; Б – один из красителей внутри цепи (на тимидине или цитидине).

Рисунок 10 – Варианты взаимного расположения красителя и тушителя в зонде

### 2.3.4 Использование компьютерной программы «Gene» с ПЦР-детектором «Джин»

Детекция результатов проводится в стандартной программе «Gene», используемой ПЦР-детектором «Джин». Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором «Джин» проводится согласно «Паспорту ПЦР-детектора флуо-

ресцентного «Джин». Прибор предназначен для детекции результатов ПЦР при использовании тест-систем, основанных на принципах флуоресцентной детекции. Детектор не предназначен для количественной оценки результатов ПЦР.

Прибор состоит из следующих основных частей:

- 1) двух оптических блоков;
- 2) микропроцессорного управляющего модуля;
- 3) системы позиционирования;
- 4) дисплейного модуля.

В процессе своей работы прибор регистрирует флуоресцентное излучение, возникающее в реакционной смеси при освещении образца источником возбуждающего света. Регистрация производится последовательно для каждой из пробирок при ее позиционировании относительно оптического блока с помощью шагового двигателя.

Для управления прибором на персональный компьютер должно быть установлено программное обеспечение. Программное обеспечение работает в среде Windows 98, Windows ME, Windows 2k/XP.

Для детекции и учета результатов используются стандартные настройки тестов программы «Джин», заданные по умолчанию: пороговые значения равны для «-» – 1,75; для «+» – 2,1; для «ВК» – 2,5.

Настройки теста можно просмотреть, выбрав меню «Настройки», «Список тестов» в главном меню программы. Если значения изменены, требуется восстановить начальные значения, указанные выше, и сохранить изменения при выходе из программы.

Все основные функции представлены в виде соответствующих кнопок инструментальной панели и дублируют пункты меню «Протокол» (рисунки 11,12).

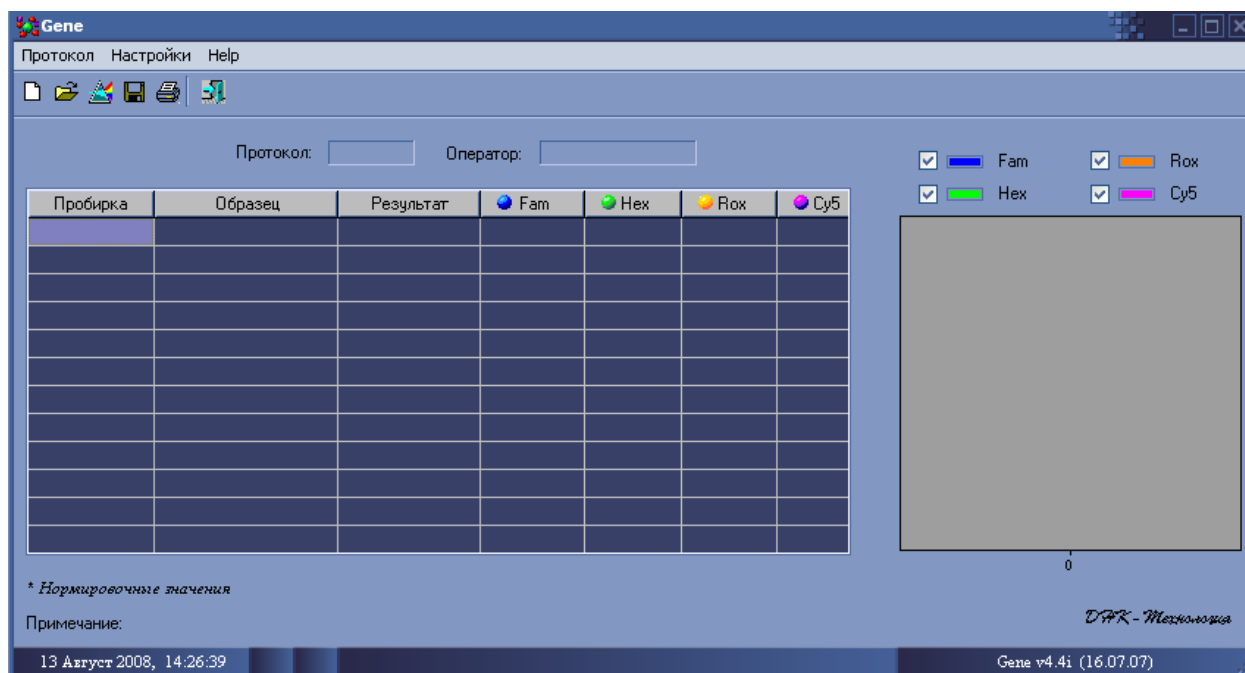


Рисунок 11 – Главное окно программы

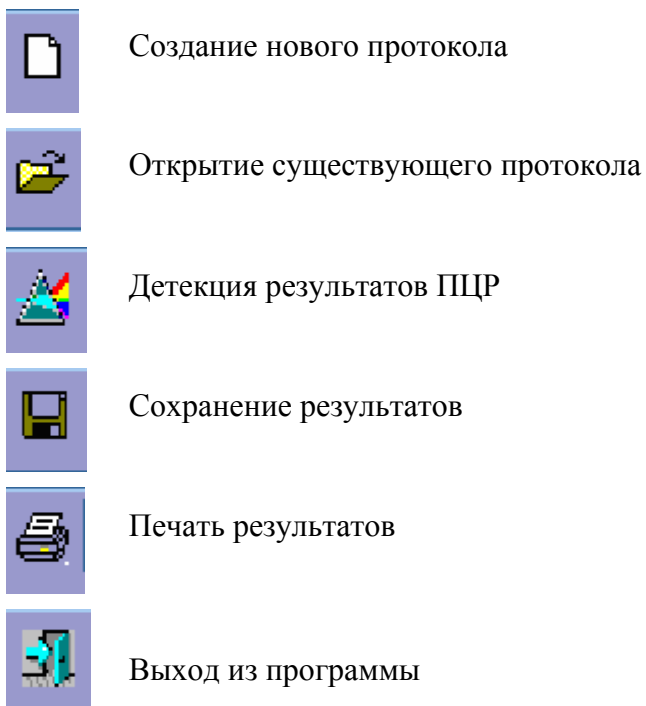


Рисунок 12 – Пункты меню

Группа пунктов меню «Настройки» позволяют адаптировать программу в соответствии с конкретными требованиями. Определяется цветовая гамма для отображения результатов детекции, типы и язык шрифтов (рисунок 13).

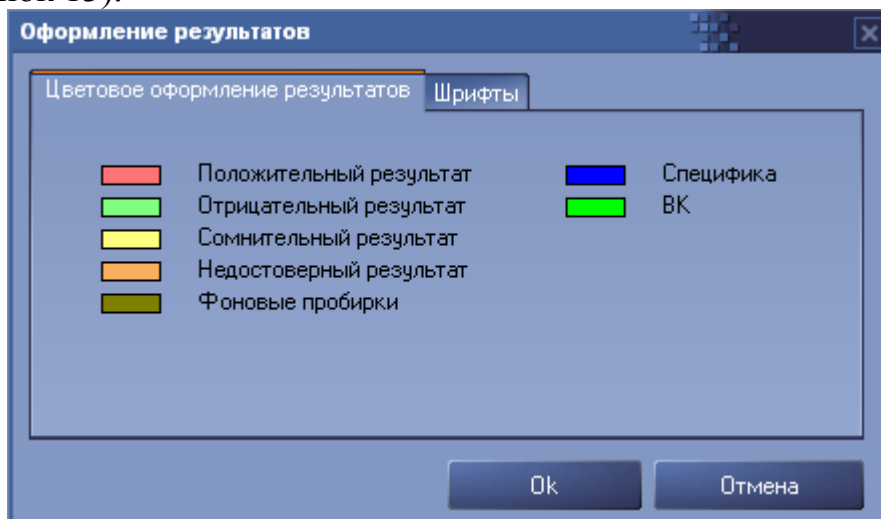



Рисунок 13 – Окно оформления результатов

Для проведения анализа необходимо создать протокол (кнопка  на инструментальной панели главного окна приложения). Для этого необходимо последовательно заполнить колонки «с» и «по» (соответственно начальный и конечный номера пробирок) для каждого выбранного теста. В колонке «Кол-во» указывается количество фоновых пробирок для данного

теста. Кнопки «Добавить» или «Удалить» и позволяют соответственно добавить новый и удалить существующий тест (рисунок 14).

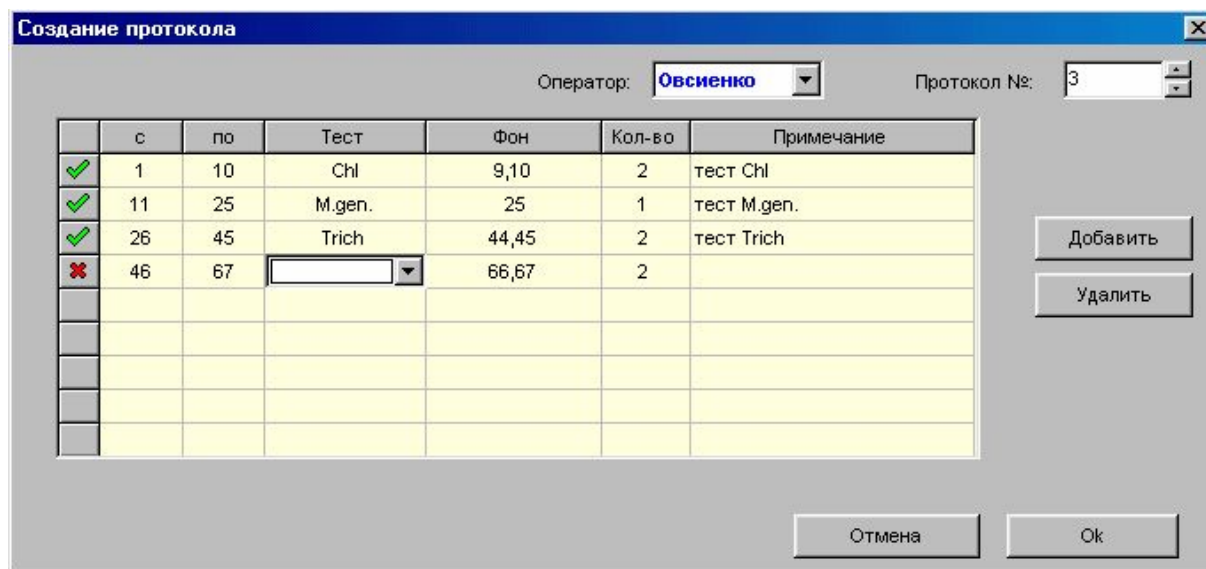



Рисунок 14 – Создание протокола

После создания протокола к номеру каждой пробирки прибавляется «/номер протокола», т.е. идентификация пробирки выглядит как: «номер пробирки/номер протокола».

Далее можно приступать к детекции результатов ПЦР (кнопка  на инструментальной панели главного окна приложения). Необходимо убедиться, что прибор подключен к компьютеру. После успешного обнаружения прибора открывается окно «Детекция результатов ПЦР», на котором представлены протокол испытаний в табличном формате, гистограмма сигналов флуоресценции по каналам текущего цикла измерений. Для проведения цикла детекции необходимо установить пробирки в соответствующие лунки барабана прибора и запустить процедуру детекции с помощью кнопки ОК. После завершения цикла детекции программой будет предложено извлечь пробирки и перейти к следующему циклу. Можно повторить предыдущий цикл детекции или отказаться от дальнейшей работы и выйти из программы без сохранения результатов.

Результаты обработки сигналов представлены в виде таблицы и гистограммы нормированных величин сигналов: специфика и ВК, комбинация которых относительно соответствующих сигналов фоновых пробирок позволяет выдать результат детекции ПЦР в главном окне приложения (рисунок 15).

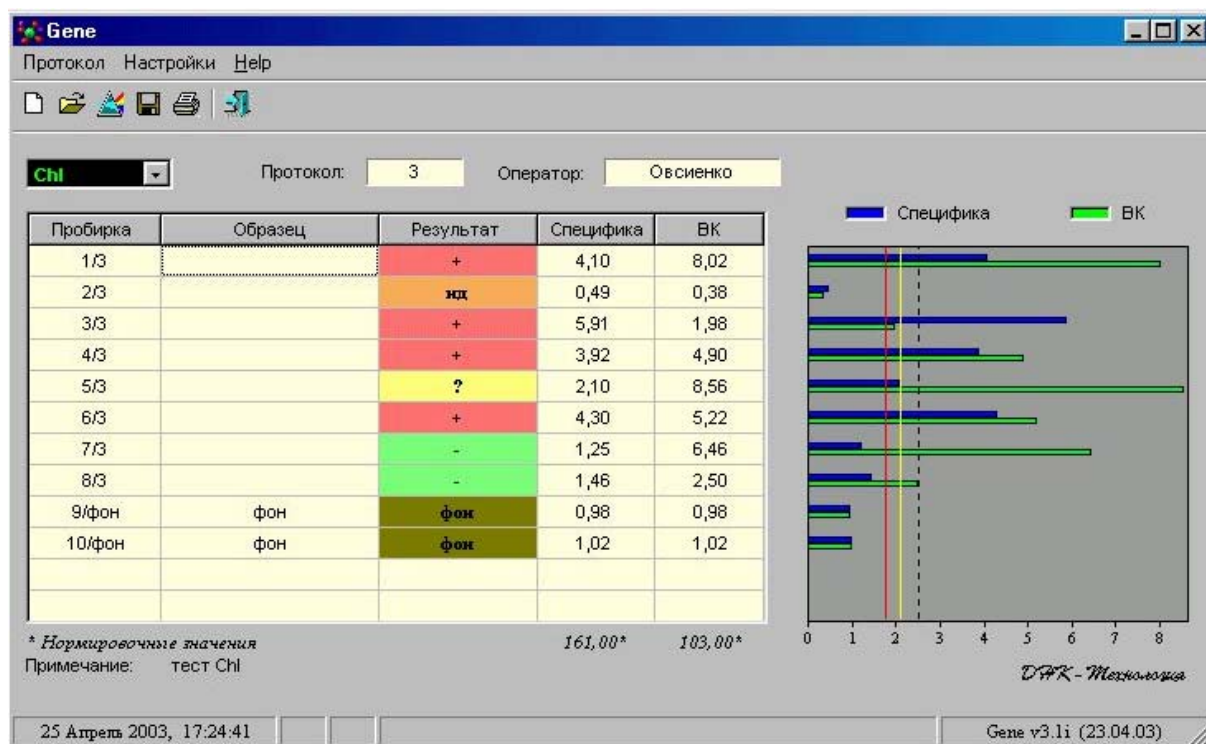


Рисунок 15 – Главное окно программы с результатами анализа.

Полученные данные интерпретируются программой автоматически (колонка «Результат» на экране). Положительные образцы, в которых обнаружена ДНК анализируемого возбудителя, обозначаются знаком «+» на красном фоне; отрицательные образцы – знаком «-» на зеленом фоне; образцы, для которых получен сигнал, который нельзя однозначно интерпретировать, требующие повторного анализа, обозначены знаком «?» на желтом фоне; и образцы, в которых не детектируется (не превышает фона) как специфический сигнал, так и сигнал ВК, требующие повторного анализа, обозначены знаком «нд» на желтом фоне. В правой части окна программы (рисунок 15) вертикальная красная линия определяет пороговое значение для сигнала «Специфика», ниже которой результат детекции ПЦР интерпретируется как «отрицательный (-)». Жёлтая вертикальная линия является пороговым значением для сигнала «Специфика», выше которого результат рассматривается как «положительный (+)». Пунктирная линия – третье пороговое значение, определяющее границу достоверности работы внутреннего контроля. Если величина сигнала «ВК» при отрицательном результате «Специфика» меньше этого значения, то результат интерпретируется как «недостоверный (нд)».

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля (ОК) выделения ДНК (таблица 4)

Таблица 4 – Оценка результатов анализа контрольных точек

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат
ОК	Выделение ДНК	«-» (отрицательный)
К-	ПЦР	«нд» (отрицательный)
К+	ПЦР	«+» (положительный)

### Лабораторная работа № 6. Анализ результатов ПЦР с помощью флуоресцентного детектора «Джин».


*Цель работы* – научиться детектировать результаты ПЦР с помощью флуоресцентного детектора «Джин».


*Методика выполнения работы*

1 Подключите прибор к компьютеру с помощью USB кабеля и запустите программу Gene.

2 Установите пробирки в приборе так, чтобы каждому виду теста соответствовали 2 фоновые пробирки.

3 Закройте крышку прибора.

4 Создайте протокол, нажав на значок . Внесите количество измеряемых образцов (включая фоновые пробирки), выберите нужную инфекцию в списке тестов в графе «Тест», кликните «ОК» и введите последовательность детектируемых образцов (в колонке «Образец»).

5 Поставьте пробирки в ячейки модуля прибора «Джин» в соответствии с заданной последовательностью (группами по 12 образцов) и запустите измерение. Начните детекцию, нажав значок . По окончании измерения выньте пробирки и кликните кнопкой мыши кнопку «ОК».

6 После появления в информационном окне надписи «Детекция закончена» подтвердите окончание работы и переходите к анализу результатов. Сохраните полученные результаты, выбрав в меню значок сохранения файла (или выбрав вкладку «Протокол», затем «Сохранить»), и задав имя файла.

### **3 Интерпретация результатов ПЦР**

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая нас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность метода и неподвижный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров или гибридизационного зонда может дать ложноотрицательный результат. В случае загрязнения образцов и случайной гомологии между зондом, праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты.

Очень важным для правильной интерпретации результатов является выбор контролей. Положительные и отрицательные контроли должны быть хорошо охарактеризованы. Часто используют ДНК из клеточных линий, заведомо содержащих или не содержащих последовательность-мишень. В каждом анализе нужны как минимум три контроля:

- 1) положительный контроль;
- 2) отрицательный контроль;
- 3) бланк-контроль или фоновая пробирка (фон).

Положительный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца вносится контрольный образец – копии ДНК исследуемого возбудителя.

Отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо клинического материала включается соответствующее количество деионизированной воды. Отрицательный контроль необходим, чтобы проверить компоненты реакции на отсутствие в них ДНК или клеток возбудителя и исключить ложноположительный результат.

Фон – это реакционная смесь, в которой присутствуют все компоненты, за исключением ДНК; он является индикатором загрязнений.

В некоторых случаях амплификация вообще не идет, и если есть основания думать, что полученный результат ложноотрицательный, очень трудно определить, по какой именно причине. Чтобы решить эту проблему, каждый образец необходимо тестировать, проведя амплификацию какой-нибудь геномной последовательности, т.е. с «внутренним контролем». При этом размер геномной последовательности-мишени должен быть немного больше, чем исследуемой; это позволит убедиться, что ДНК образца не слишком сильно деградирована. Отсутствие амплификации может означать ингибирование фермента, сильную деградацию ДНК или то, что ее слишком мало. В этом случае надо повторить амплификацию образца, увеличив и уменьшив количество ДНК-матрицы или увеличив концентрацию ДНК-полимеразы Taq.

#### **Возможные проблемы**

Наборы с ВК с детекцией электрофорезом:



1 Для некоторых образцов на дорожке в геле нет ни специфической полосы, ни полосы для внутреннего контроля.

2 Решение: Отсутствие полосы, соответствующей ВК (при отсутствии специфического фрагмента) означает, что реакция в данной пробирке не прошла. Необходимо повторить исследование образца начиная с этапа пробоподготовки (при этом желательно использовать другую методику пробоподготовки).

3 Для всех образцов, включая положительный контрольный образец, на дорожках в геле нет ни специфической полосы, ни полосы для внутреннего контроля.

4 Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе амплификации. Поставьте исследование с другой серией реактивов для амплификации.

5 Для всех образцов, кроме положительного контрольного образца, на дорожках в геле нет ни специфической полосы, ни полосы для внутреннего контроля.

6 Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе пробоподготовки. Поставьте исследование с другой серией реактивов для пробоподготовки.

7 На дорожке в геле полоса, соответствующая специфическому фрагменту видна очень слабо (нет уверенности, что она действительно есть).

Решение: Можно нанести на свежий гель в 2-3 раза больше продукта амплификации. Если сомнения остаются, необходимо повторить исследование образца начиная с этапа амплификации.

8 Отрицательный результат для положительного контрольного образца.

Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе амплификации. Поставьте исследование с другой серией реактивов для амплификации.

9 Положительный результат во всех образцах, включая отрицательный контрольный образец.

10 Решение: Возможно, произошло загрязнение образцов нуклеиновой кислотой определяемого инфекционного агента на одном из этапов исследования. Необходимо заменить все реактивы, используемые на этапах пробоподготовки и амплификации, провести влажную уборку помещения и повторить исследование.

Наборы с флуоресцентной детекцией:

1 Недостоверный результат измерения («нд» в графе «Результат» ) для некоторых образцов.

2 Решение: Недостоверный результат означает, что реакция в данной пробирке не прошла. Необходимо повторить исследование образца начиная с этапа пробоподготовки (при этом желательно использовать другую методику пробоподготовки).

3 Недостоверный результат измерения на «Джине» ( «нд» в графе «Результат» ) для всех образцов, включая положительный контрольный образец.

Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе амплификации. Поставьте исследование с другой серией реактивов для амплификации.

4 Недостоверный результат измерения на «Джине» («нд» в графе «Результат») для всех образцов, кроме положительного контрольного образца.

Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе пробоподготовки. Поставьте исследование с другой серией реактивов для пробоподготовки.

5 Сомнительный результат ( «?» в графе «Результат» ) для некоторых образцов.

6 Решение: Сомнительный результат означает, что значение для спецификации выше фонового значения, но слишком мало, чтобы считаться достоверно положительным (попадает в « серую» зону). Необходимо повторить исследование образца начиная с этапа амплификации.

7 Отрицательный результат для положительного контрольного образца.

Решение: Проверьте правильность всех операций на этапе амплификации. Поставьте исследование с другой серией реактивов для амплификации.

8 Положительный результат во всех образцах, включая отрицательный контрольный образец.

9 Решение: Возможно, произошло загрязнение образцов нуклеиновой кислотой определяемого инфекционного агента на одном из этапов исследования. Необходимо заменить все реактивы, используемые на этапах пробоподготовки и амплификации, провести влажную уборку помещения и повторить исследование.

Возможные варианты результатов, полученных с помощью электрофоретической детекции и измерения флуоресценции, представлены на рисунке 16.

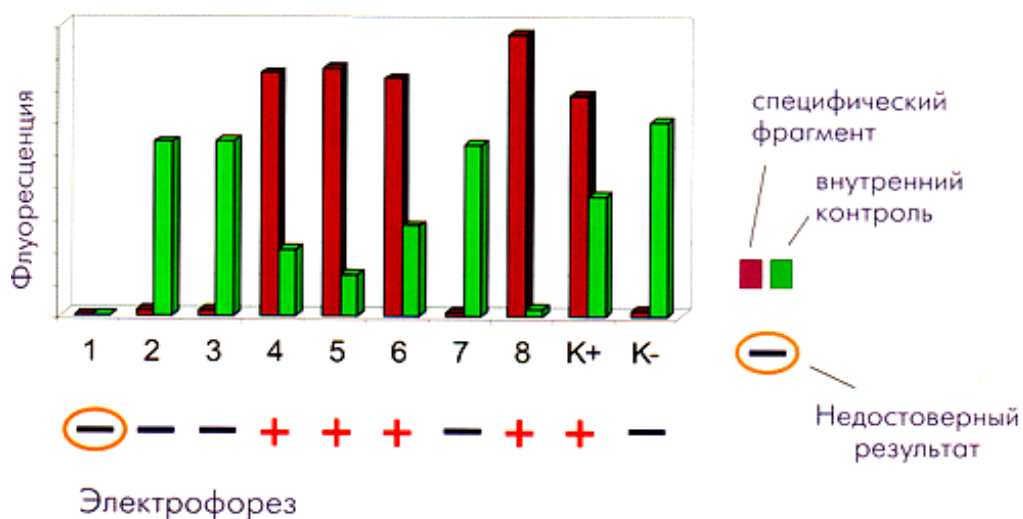


Рисунок 16 – Сопоставление результатов, полученных с помощью различных способов детекции

## 4 Организация работы при исследованиях методом ПЦР

### 4.1 Принцип организации лаборатории

При работе методом ПЦР в лаборатории специалист сталкивается с целым рядом проблем: ложноположительные результаты из-за контаминации, сверхчувствительность (когда обнаруживается крайне малое количество патогенных микроорганизмов у пациента без клинических проявлений), проблемы мониторинга лечения (поскольку могут выявляться не только живые, но и погибшие микробы), наличие ингибиторов ПЦР в образце и др. Из всех этих проблем наиболее существенное значение имеет в лаборатории контаминация компонентов реакции и инструментария ранее амплифицированным материалом. Поэтому при проведении ПЦР анализа требуется территориальное разделение выполнения отдельных процедур в лаборатории на 3 зоны. **Первая зона** предназначена для приготовления и розлива ПЦР-реактивов («чистая зона»). Во **второй зоне** производится выделение образца ДНК из биологического материала (зона пробоподготовки), в ней располагаются центрифуга, термоблок или водяная баня, встряхиватель «вортекс», ламинарный шкаф и возможно другие приборы, необходимые для выделения в зависимости от того, какие наборы используются. В этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории. **В третьей зоне** находится термоциклер и оборудование для детекции. В этом помещении допускается использовать другие методы детекции инфекций. Указанное разделение на зоны рекомендуется при работе с любыми ПЦР-наборами. Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками. Полезно иметь устройство фильтрации воздуха.

Если первую и вторую зоны, в крайнем случае, допускается объединить (при наличии специальных боксов) в пре-ПЦР-помещение, то комната для детекции результатов ПЦР 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 одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться.

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 комнату для детекции результатов.

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

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.

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.

#### **Необходимое оборудование для пре-ПЦР-помещения:**

- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99 °С;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8-12 тыс.об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин (или вортекс);
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- холодильник с морозильной камерой для хранения клинического материала;
- одноразовые перчатки;
- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- программируемый термостат амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5-50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема ( 0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов;

- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого возбудителя).

### **Необходимое оборудование для пост-ПЦР-помещения:**

- отдельный стол;
- камера для горизонтального электрофореза с гребенками для формирования кармашков в пластине геля;
- источник постоянного тока для электрофореза;
- ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей;
- весы с точностью взвешивания до 10 мг;
- посуда: мерные цилиндры на 50 мл, 1 литр; колба на 200 мл из термостойкого стекла;
- электроплитка или микроволновая печь для плавления агарозы;
- отдельный набор автоматических пипеток переменного объема;
- штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема;
- одноразовые резиновые перчатки;
- отдельный халат.

Ультрафиолетовые лампы должны быть расположены так, чтобы прямому облучению подвергались поверхности рабочих столов, оборудование и материалы. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых перчатках, так как анализируемые биопробы являются потенциально опасным инфицированным материалом. Обработка одежды из разных помещений должна производиться отдельно. Желательно, чтобы на разных этапах проведения ПЦР-анализа работали различные сотрудники.

Следует использовать отдельные наборы дозаторов, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток предназначенные для различных стадий анализа и не переносимые из одного помещения в другое. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

Все этапы работы проводить только с использованием одноразовых расходных материалов: наконечников для автоматических пипеток, про-

бирок, перчаток. Обязательно менять наконечники при переходе от пробы к пробе. Желательно использовать наконечники с фильтром - аэрозольным барьером для предотвращения попадания микрокапель раствора в пипетку. Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор. Клинические образцы следует хранить отдельно от реагентов.

Для обработки и уборки рабочего места необходимо в каждом помещении иметь ватно-марлевые тампоны (салфетки), пинцет, дезинфицирующий и инактивирующий растворы.

#### **4.2 Обеззараживание исследуемого материала и режимы дезактивации при постановке ПЦР**

К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия до концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 65 °С в течение 30 мин. После обработки мертиолятом натрия 100 мкл образца переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мкл, добавляют лизирующий раствор на основе 6М гуанидинтиоизоцианата, в объеме, указанном в инструкции к тест-системе, и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Необходимыми реагентами для обеззараживания буфера и гелей, содержащих бромистый этидий, в пересчете на 1 л являются: 0,5М перманганат калия – 1 л, 2,5 М соляная кислота – 1 л, 2,5 М NaOH – 1 л. Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора перманганата калия и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М NaOH, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

Пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе после первого этапа амплификации из зоны проведения ПЦР собирают в одноразовые пластиковые емкости и выносят в зону детекции результатов для последующей инактивации.

В зоне детекции результатов наконечники, пробирки с ампликонами (с предварительно открытыми крышками), перчатки, ветошь после окончания работы погружают на 1 час в одноразовую пластиковую емкость, содержащую 5% раствор хлорамина Б или 0,2 % раствор ДП-2Т.

По истечении времени экспозиции дезинфицирующий раствор сливают, открытую емкость с обработанным материалом помещают в плотный термостойкий пакет для последующего обеззараживания материала паром под давлением 0,2 МПа, при температуре (132±2) °С, в течение 60 мин. После обеззараживания пакет с инактивированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов.

Смену рабочей одежды проводят не реже одного раза в неделю. В зоне детекции результатов желательно использовать одноразовую рабочую одежду. Стирку рабочей одежды проводят в прачечной организации или в лаборатории. Не допускается одновременно производить стирку одежды разных зон. Рабочую одежду сотрудников подвергают замачиванию в емкостях с дезинфицирующим раствором (раствор ДП-2Т, хлорамин Б) По окончанию дезинфекции белья проводят стирку при температуре от 95 °С до 100 °С.

## **5 Литература, рекомендуемая для изучения дисциплины**

4.1 **Ашмарин, И.П.** Молекулярная биология / И.П. Ашмарин. – М.: Медицина, 1974. – 360 с.

4.2 **Коничев, А.С.** Молекулярная биология / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: ИЦ «Академия», 2005. – 400 с.

4.3 **Жимулев, И.Ф.** Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сибирское ун-ое изд-во, 2006. – 479 с.

4.5 **Иванов, В.И.** Генетика / В.И. Иванов [и др.]. – М.: ИЦ «Академ-книга», 2006. – 638 с.

4.6 **Маниатис, Т.** Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сембрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

4.7 **Молекулярная клиническая диагностика. Методы** / под ред. Херрингтон С, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

4.8 **Щелкунов С.Н.** Генетическая инженерия: учеб.-справ. пособие / С.Н. Щелкунов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.

Приложение А  
(обязательное)

**Вопросы к экзамену по дисциплине «Генная инженерия»**

1. История и развитие генетической инженерии. Определение генетической инженерии. Теоретические основы генетической инженерии. Отличия от классической селекции.
2. Генная инженерия как наука, методы. Возможности, достижения и перспективы генной инженерии.
3. Рестриктазы. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз. Сайты узнавания. Изошизомерия. Построение рестрикционных карт.
4. Структура и функции ДНК-полимеразы I E.coli и обратная транскриптаза. ДНК-лигаза. Терминальная трансфераза.
5. Создание рекомбинантных ДНК коннекторным методом, рестриктазно-лигазным методом и с помощью линкерных молекул.
6. Требования к векторной ДНК, её свойства. Гены-маркеры. Типы векторов: бактериальные плазмиды, вирусы, транспозоны, фаговые векторы, космиды и фазмиды.
7. Способы введения ДНК в клетку. Трансформация. Механизм трансформации. Компетентность. Электропорация. Микроинъекция. Метод «мини-клеток». Упаковка в липосомы. Метод биологической баллистики.
8. Методы отбора, основанные на фенотипическом различии рекомбинантных и нерекомбинантных клонов. Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот. Метод прямой селекции рекомбинантных клонов по комплементации. Иммунологические методы анализа рекомбинантных клонов.
9. Секвенирование ДНК. Сущность методов Максама-Гилберта и Сэнгера. Автоматизация секвенирования. Применение метода.
10. Гибридизация ДНК и блоттинг. Блоттинг по Саузерну. Применение метода блоттинга.
11. Теория ПЦР. Этапы, условия проведения ПЦР и режимы. Термостабильные ДНК-полимеразы. Применение ПЦР.