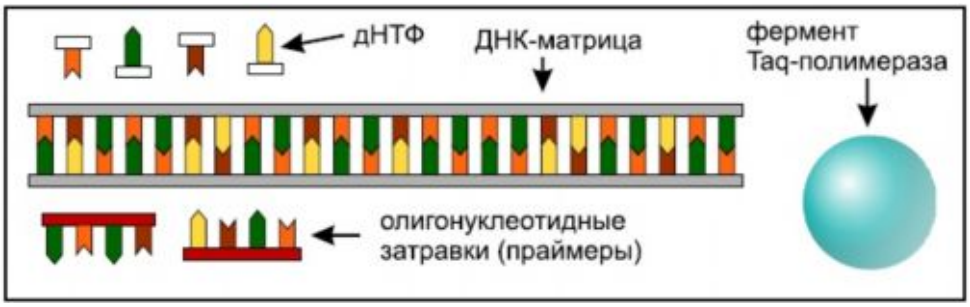
Основы метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время широко используется в исследовательских и клинических лабораториях всего мира. В основе метода ПЦР лежит процесс многократного увеличения копий (амплификации) определенных участков ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Основные компоненты реакционной среды

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



ДНК-матрица – выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент;

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его; играют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции;

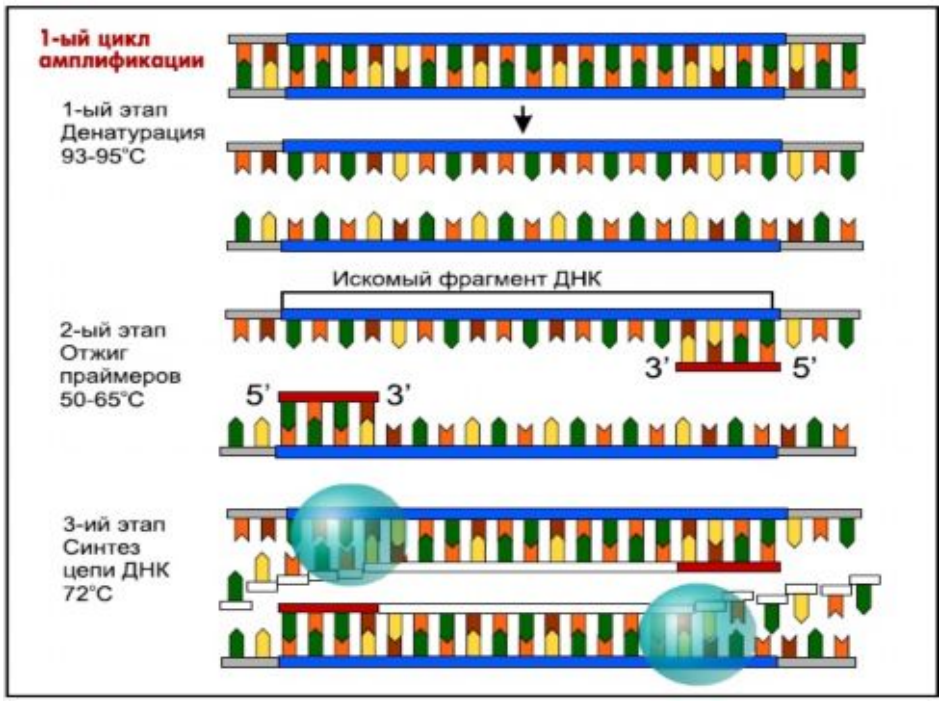
Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК

Taq-полимераза – термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК

Буферный раствор – реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы Mg^{2+}, необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента

Этапы проведения амплификации

Для получения достаточного для визуализации количества копий целевого фрагмента ДНК необходимо провести 20-40 циклов амплификации, каждый цикл включает в себя несколько стадий:



Инициация – необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы происходит с помощью нагревания при высоких температурах, реакционную смесь выдерживают при 93-96°С в течение нескольких минут.

Этап 1. Денатурация – реакционную смесь нагревают при 93-95°С в течение 30-40 сек., происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием одноцепочеченых молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров – происходит комплементарное связывание праймеров с ДНК-матрицей, температура отжига специфична для каждой пары праймеров и ее значения располагаются в интервале 50-65° С, реакция протекает в течение 10-40 сек.

Этап 3. Элонгация цепи – происходит синтез новых цепей ДНК Taq-полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°С, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента.

Образовавшиеся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается около 10^8 молекул ампликона. Такого количества достаточно для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Стадии проведения ПЦР-анализа

Проведение анализа с использованием метода ПЦР включает три основных этапа:

1. Выделение генетического материала из клинического образца

На данном этапе клинический образец подвергается специальной обработке, выбранная методика выделения нуклеиновых кислот зависит от характера анализируемого материала. Для проведения амплификации необходима ДНК (РНК), свободная от клеточных фракций и посторонних примесей, которые могут ингибировать реакцию ПЦР.

2. Амплификация специфического фрагмента ДНК

На данном этапе происходит накопление целевых фрагментов ДНК, процесс амплификации проводят в специальных программируемых термостатах, автоматически меняющих температуру реакционной смеси по заданной программе. Скорость «наработки» фрагмента зависит от эффективности ПЦР, при максимальной эффективности достаточно 38-40 циклов для получения 25-50 нг/мкл ампликонов из одной исходной молекулы ДНК.

3. Детекция продуктов амплификации

Можно выделить два основных метода детекции продуктов амплификации: детекция в агарозном геле и флуоресцентная схема детекции. В первом случае происходит электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле согласно размеру фрагментов ДНК. Более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. Визуализация ампликонов в геле проводится путем добавления к ним интеркалирующего агента – бромистого этидия, который встраивается в двуцепочечные цепи ДНК и флуоресцирует в оранжево-красном диапазоне видимого спектра при УФ -облучении. В зависимости от количества конечного продукта яркость свечения полос может быть различной, но дать количественную оценку ДНК-копий с помощью этого метода невозможно.

Альтернативой электрофоретическому методу является использование флуоресцентных методов, где специальные флуоресцентные зонды гибридизуются со специфической последовательностью ДНК-матрицы. Уровень флуоресценции пропорционален количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР. Детекция может проводиться либо в процессе амплификации (ПЦР в режиме реального времени), либо после завершения реакции (ПЦР с детекцией по конечной точке).

Метод ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний

Использование метода ПЦР в современной медицинской практике для диагностики инфекционных заболеваний открывает новые возможности для решения многих проблем микробиологии и эпидемиологии. Это быстрый, точный и высокочувствительный метод

выявления большинства инфекционных возбудителей бактериальной и вирусной природы, а также простейших и грибов. Применение ПЦР особенно эффективно для обнаружения трудно культивируемых и некультивируемых в лабораторных условиях видов микроорганизмов, в том числе внутриклеточных микроорганизмов, способных длительно персистировать в организме хозяина и не выявляющихся традиционными микробиологическими методами. С появлением метода ПЦР в реальном времени стала возможной оценка наличия инфекционного агента как качественно, так и количественно, что во многих случаях позволяет не только уточнить диагноз и выбрать оптимальный метод лечения, но и оценить эффективность терапии.

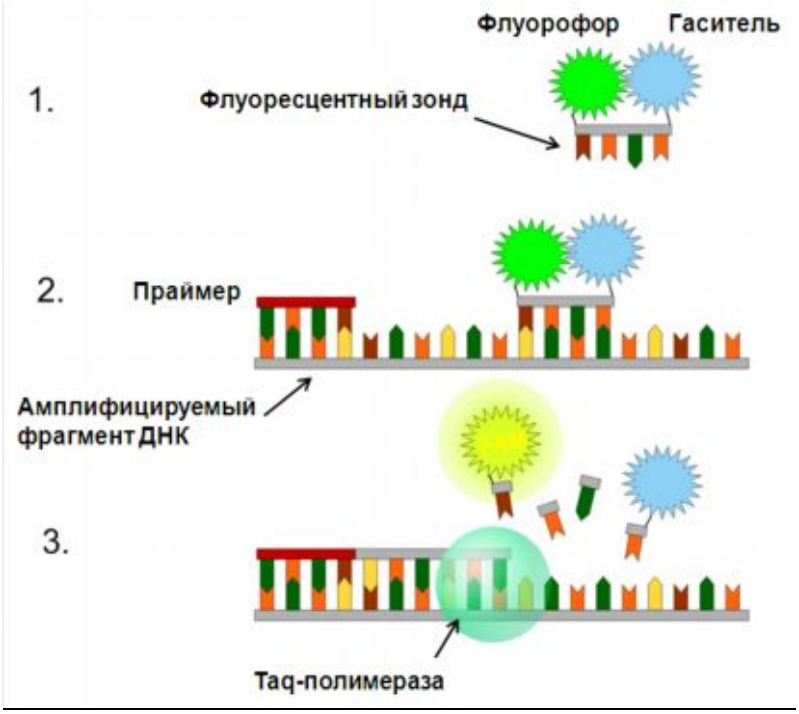
ПЦР с флуоресцентной схемой детекции результата

ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)

В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Получать и интерпретировать результаты ПЦР становится проще, быстрее и надежнее.

Одним из флуоресцентных методов является метод ПЦР в режиме реального времени. В его основе лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Детекция продуктов амплификации проводится прямо в реакционной среде через стенки или крышку закрытой пробирки.

Основные этапы ПЦР «в реальном времени»



1. В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами реакции добавлены специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3'-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5'-конце расположена молекула-"гаситель" флуоресценции. За счет близости флуорофора и "гасителя" вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на "гаситель" по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.
2. В ходе ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.
3. В процессе синтеза новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от "гасителя", расстояние между ними увеличивается, процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается.

ПЦР "в реальном времени" имеет ряд значительных преимуществ:

- Объединение этапов амплификации и детекции результатов. Появляется возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого материала
- Существенное снижение риска контаминации и ошибок при анализе результатов
- Высокая специфичность реакции за счет использования высокоспецифичных флуоресцентных зондов.
- Высокая производительность
- Упрощение требований к организации ПЦР-лаборатории
- Возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы
- Регистрация и учет данных в электронном формате

ПЦР “в реальном времени” характеризуется возможностью проведения качественного и количественного анализа. Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Для проведения анализа необходим специальный прибор - амплификатор для ПЦР в реальном времени, который совмещает в себе функции термоциклера и флуоресцентного детектора (iCycler iQ5, CFX96 (Bio-Rad); ДТ-322, ДТ-96 (ДНК-Технология); Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q (Corbett Research/Qiagen); Cobas TagMan48 (Roche)и др.

Программное обеспечение таких приборов позволяет сопоставлять кинетику реакции в исследуемых и стандартных образцах и вычислять концентрацию исходной матрицы ДНК (в присутствии стандартных образцов с известной концентрацией анализируемой ДНК). При выявлении ДНК возбудителей инфекционных заболеваний целесообразно использовать данный метод в количественной оценке только тех инфекционных агентов, количественное содержание которых в анализируемом образце действительно имеет клиническую значимость. Определение количественных характеристик инфекции позволяет судить о динамике и стадии заболевания, а также об эффективности проводимой терапии.

ПЦР с детекцией по «конечной точке» (End Point)

Детекция продуктов амплификации с флуоресцентной меткой также может проводиться после окончания амплификации (ПЦР с детекцией «по конечной точке», или метод “Flash”). ПЦР с детекцией «по конечной точке» позволяет проводить только качественный анализ. Интенсивность флуоресцентного сигнала измеряется после окончания ПЦР в специальном флуоресцентном детекторе. Детекция результата также проводится в закрытой пробирке. Метод характеризуется простотой и относительной быстротой получения результата в виде ответа «+» или «-» (наличие или отсутствие ДНК возбудителя в исследуемом образце). По сравнению с методом ПЦР “в реальном времени” он является более простым и производительным и не требует столь дорогостоящего оборудования. В то же время имеется риск получения ложных результатов, поскольку процесс накопления ПЦР-продуктов нельзя проследить.

Для проведения анализа необходимы обычный амплификатор (например, “Терцик” (ДНК-Технология)) и специализированный детектор флуоресценции (“Джин”, “Джин - 4” (ДНК-Технология); “АЛА-1/4” (Biosan) и др.).

Принципы организации ПЦР-лаборатории

Для организации ПЦР-лаборатории необходимы следующие рабочие зоны:

Для регистрации поступающего в лабораторию материала, его временного хранения и подготовки анализируемых образцов необходимо выделить специальную *зону приема, регистрации и первичной обработки образцов*. Данная зона должна быть расположена в отдельном помещении и оснащена ламинарным шкафом (II-III класс защиты).

Зона пробоподготовки предназначена для выделения нуклеиновых кислот из исследуемых образцов, а также временного хранения выделенных проб.

Зона постановки реакции амплификации предназначена для сборки компонентов смеси для проведения ПЦР. Данную зону можно организовать, используя специальный ПЦР-бокс.

Зона проведения амплификации и *детекции* предназначена для проведения ПЦР и анализа полученных данных. При использовании флуоресцентных методов детекции можно совместить данные этапы, при использовании же электрофоретического метода требуется отдельное помещение для проведения электрофореза.

Проведение ПЦР-диагностики возбудителей инфекций связано с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, – возможностью контаминации. Попадание в реакционную смесь следовых количеств ДНК приводит к накоплению в процессе ПЦР нецелевых фрагментов ДНК. Контаминация может быть перекрестной (от

пробы к пробе) и приводить к появлению ложноположительных результатов. Однако наибольшее значение имеет контаминация продуктами амплификации, т.к. в процессе амплификации фрагменты ДНК накапливаются в огромных количествах и несут большой риск реамплификации. Во избежание загрязнения реакционных смесей и рабочих поверхностей ампликонами необходимо соблюдать ряд требований при проведении ПЦР.

Основные требования проведения ПЦР-анализа:

Рабочие зоны должны быть изолированы, снабжены коротковолновыми ультрафиолетовыми лампами. Зона электрофоретической детекции продуктов должна располагаться как можно дальше от других и желательно иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции.

Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть оснащена определенным набором лабораторного оборудования и расходных материалов. Необходимо избегать перемещения приборов и реактивов из одной зоны в другую.

Все этапы работы проводить только с использованием одноразовых расходных материалов: наконечников для микропипеток, пробирок, перчаток и т.д. Обязательно нужно менять наконечники при переходе от пробы к пробе. Желательно использовать наконечники с аэрозольным фильтром.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и одноразовых перчатках. Желательно, чтобы на разных этапах проведения ПЦР-анализа работали разные сотрудники.

Основные нормативные документы, регламентирующие работы в ПЦР-лаборатории

- Методические указания «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности» МУ 1.3.1888-04-М., 2004.

- Методические указания «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами I-II групп патогенности» МУ 1.3.1794-03-М., 2003.

- Методические указания «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности, при работе методом ПЦР» МУ 3.5.5.1034-01-М., 2001.

- Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами» СП 1.2-98-М., 1999.

- Методические рекомендации «Организация работы лаборатории, использующей для проведения исследований метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени» М., 2008.

- Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I- IV групп патогенности» МУ 1.3. 2569 -09-М.,2009.

- Санитарно-эпидемиологические правила (СП 1.3.2322-08) «Безопасность работы с микроорганизмами III- IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» .