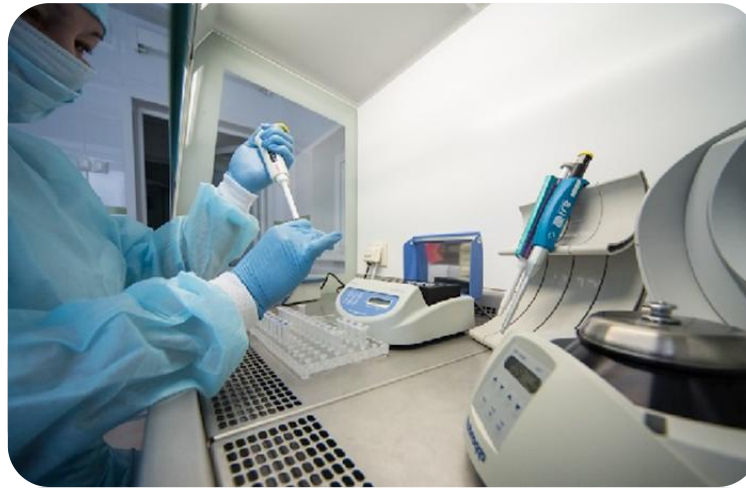


Роль сучасних молекулярно-генетичних методів в проведенні наукових досліджень і в практичній медицині



Проф. Весніна Л.Е.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або *PCR*) — експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі

Крім простого збільшення числа копій ДНК - *ампліфікації*, ПЛР дозволяє здійснювати маніпуляції з генетичним матеріалом (введення мутацій, зрощення фрагментів ДНК), і широко використовується в біологічній і медичній практиці для:

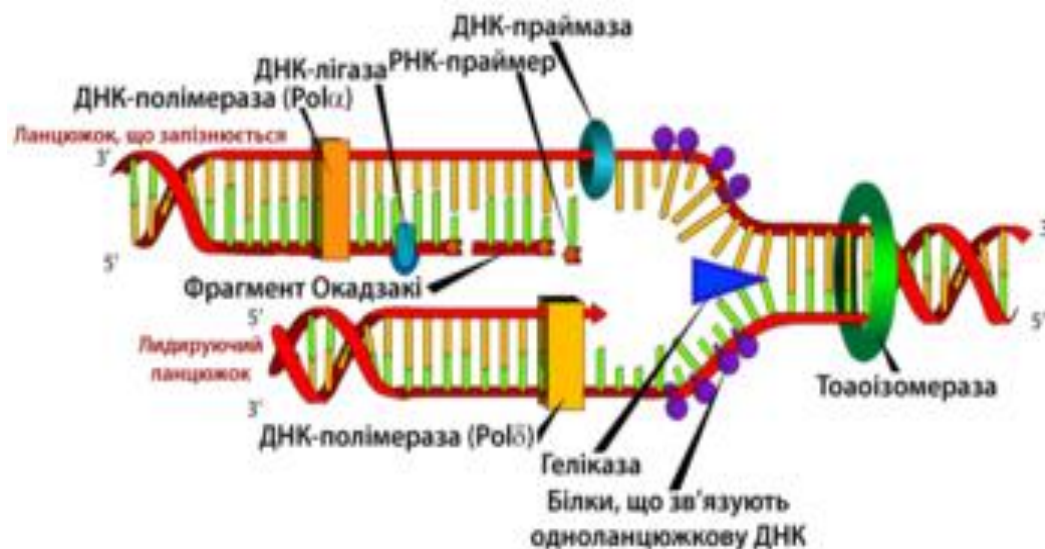
- клонування генів
- введення мутацій
- виділення нових генів
- секвенування
- створення і визначення генетично модифікованих організмів
- діагностики захворювань — спадкових, інфекційних
- ідентифікації малих кількостей ДНК
- встановлення батьківства



- Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР, PCR) винайшов у 1983 році американський вчений Кері Мюлліс (Kary Mullis)
- За це відкриття він та Майкл Сміт були нагороджені Нобелівською премією з хімії в 1993 році
- Принцип методу полягає у подвоєнні (**ампліфікації**) ділянки ДНК, обмеженої праймерами, за допомогою ферменту ДНК-полімерази
- За кожний наступний цикл ампліфікації відбувається подвоєння вихідної ділянки ДНК, так і знову синтезованих фрагментів (ампліфікатів)
- Внаслідок цього число фрагментів зростає в геометричній прогресії (ланцюгова реакція)
- Після 30 - 40 циклів їх кількість перевищує кілька мільярдів, що дає можливість їх виявлення



- **Ампліфікація** (лат. amplificatio – посилення, збільшення) у молекулярній біології – збільшення числа копій ДНК
- У клітині ампліфікація відбувається в результаті **реплікації** ДНК, у штучних умовах збільшення кількості копій ДНК досягають за допомогою полімеразної ланцюгової реакції
- **Праймер** — коротка оліго- або полінуклеотидна послідовність із вільною 3'ОН-групою, комплементарно пов'язана з одонитковою ДНК або РНК
- з його 3'-кінця ДНК-полімераза починає нарощувати полідезоксирибонуклеотидний ланцюг



- Схематичне зображення реплікації ДНК

Етапи ПЛР-дослідження

1. Виділення нуклеїнових кислот

- На першому етапі виділяється вся ДНК (для ДНК-містящих мікроорганізмів)
- або РНК (для методу NASBA або РНК-вірусів) з досліджуваного матеріалу

2. Власне ПЛР чи ампліфікація

- У розчин, що містить суміш нуклеотидів, ПЛР-буфер, полімеразу та праймери додається ДНК, виділена на першому етапі
- ПЛР проводять наступним чином: реакційну суміш нагрівають до температури 90-94° С, викликаючи денатурацію ДНК, потім температуру знижують до 50-70° С залежно від нуклеотидної послідовності праймерів, щоб відпал відбувався в строго комплементарних ділянках, і суміші встановлюють температуру, оптимальну для роботи ДНК-полімерази
- При повторенні цих циклів кількість копій ділянки ДНК, що знаходиться між місцями посадки праймерів, зростає у геометричній прогресії

3. Облік результатів

- Отримані продукти ампліфікації (велика кількість копій ДНК між місцями посадки праймерів) можна виявити шляхом електрофорезу в гелі, при використанні флуоресцентно мічених зондів можливий облік результатів зміни флуоресценції щодо негативного контролю
- NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification) - на відміну від звичайної ПЛР, мішенню для NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification) служать молекули РНК рибосом мікроорганізмів, що дає низку переваг

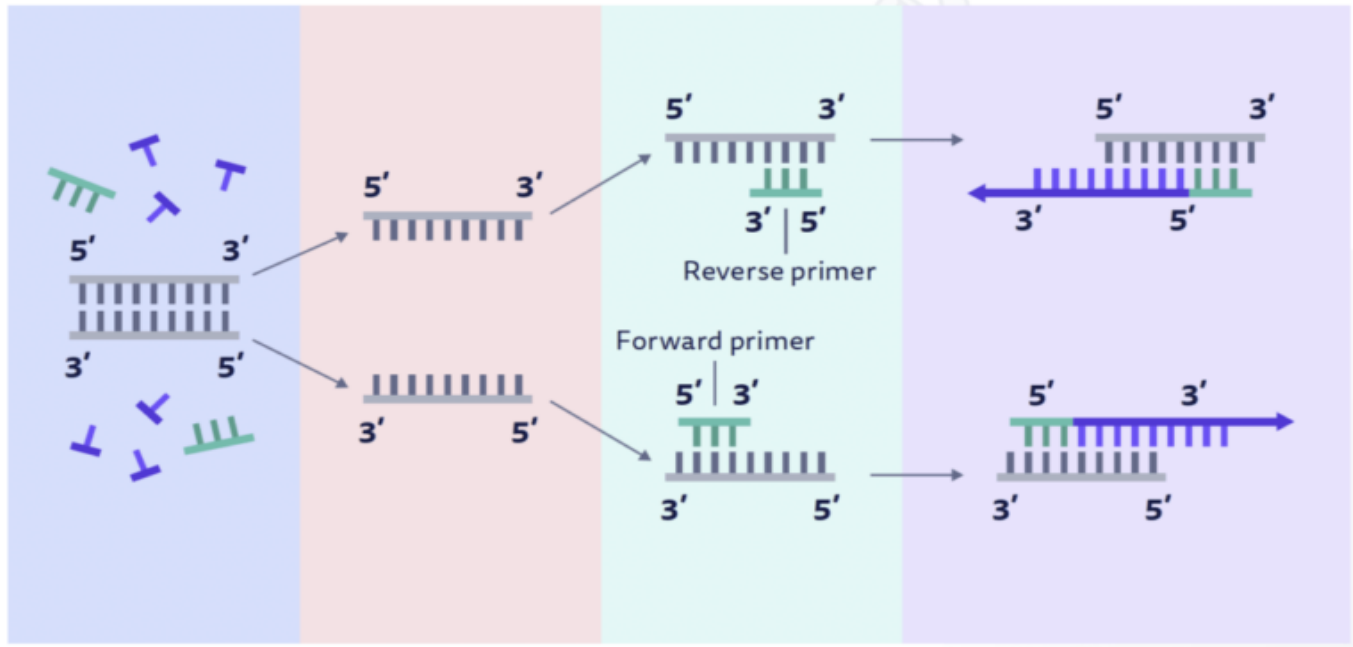
Компоненти реакційної суміші



- ДНК-матриця, що містить ту ділянку ДНК, яку потрібно ампліфікувати
- Два праймери, комплементарні протилежним кінцям різних ланцюгів необхідного фрагмента ДНК
- Термостабільна ДНК-полімераза – фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК

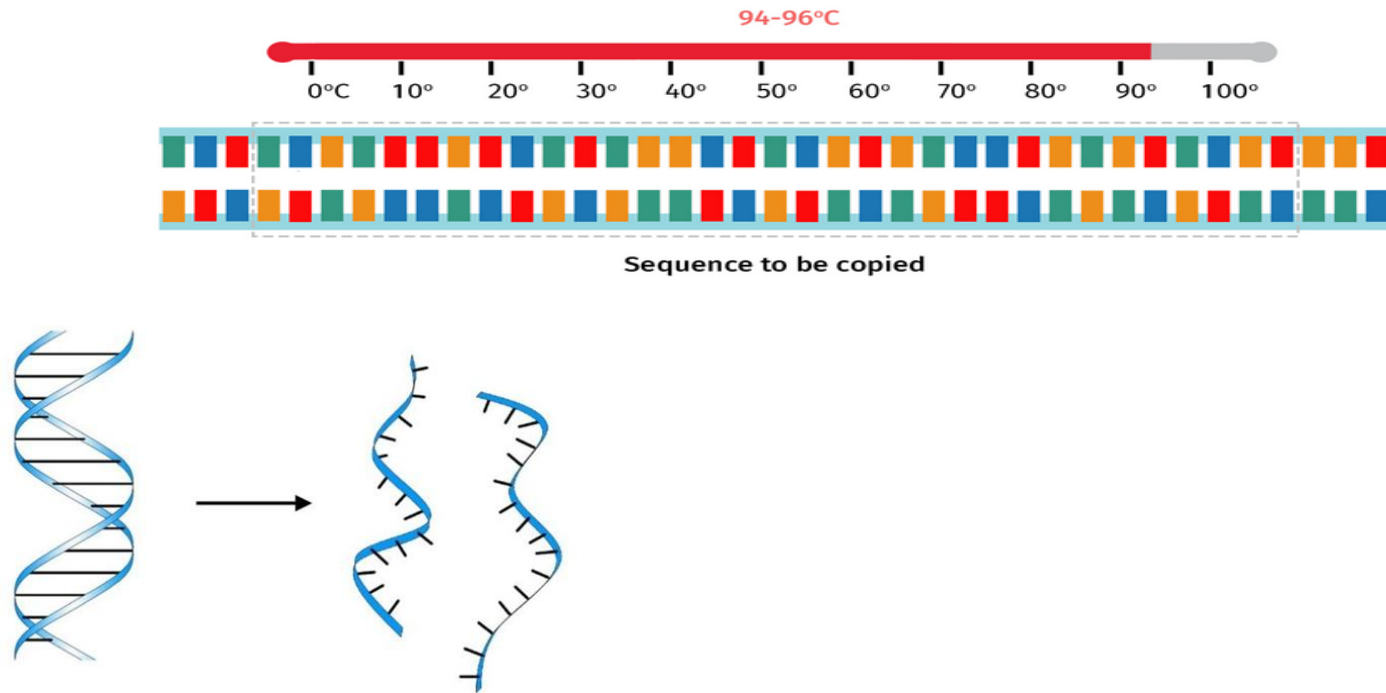
Полімераза для використання в ПЛР повинна зберігати активність при високій температурі тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з термофілів:

- *Thermus aquaticus* (Taq-полімераза)
- *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полімераза)
- *Pyrococcus woesei* (Pwo-полімераза)
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Іони Mg^{2+} , необхідні для роботи полімерази
- Буферний розчин, який забезпечує необхідні умови реакції - рН, іонну силу розчину, містить солі, бичачий сироватковий альбумін



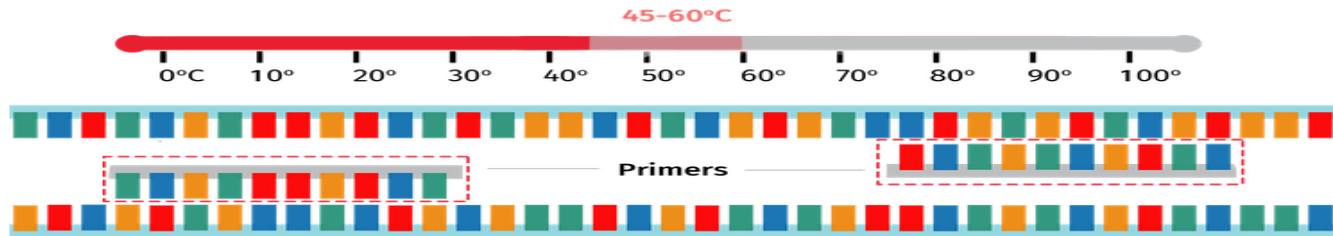
- Для того, щоб виявити та розмножити в наявній пробі саме ту послідовність ДНК, яка необхідна, потрібно знати нуклеотидні послідовності її кінців, для того щоб створити до них комплементарні короткі (18-30 нуклеотидів) фрагменти – **праймери**
- прямий та зворотній

Перша стадія - денатурація



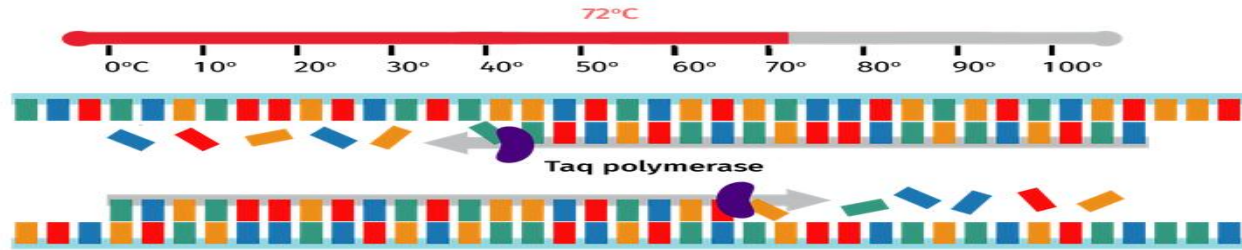
Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94-96 °C (або до 98 °C, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5-2 хв, щоб ланцюги ДНК розійшлися

Друга стадія - відпал



- Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюжковою матрицею з комплементарними ділянками ДНК
- Ця стадія - **відпал**
- Температура відпалу 40-60 ° С, залежить від складу праймерів і зазвичай вибирається на 4-5 ° С нижче за їх температуру плавлення
- тривалість - 0,5-2 хв
- Неправильний вибір температури відпалу призводить до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при підвищеній температурі), або до зв'язування в неправильному місці та появи неспецифічних продуктів (при зниженій температурі)

Третя стадія - елонгація



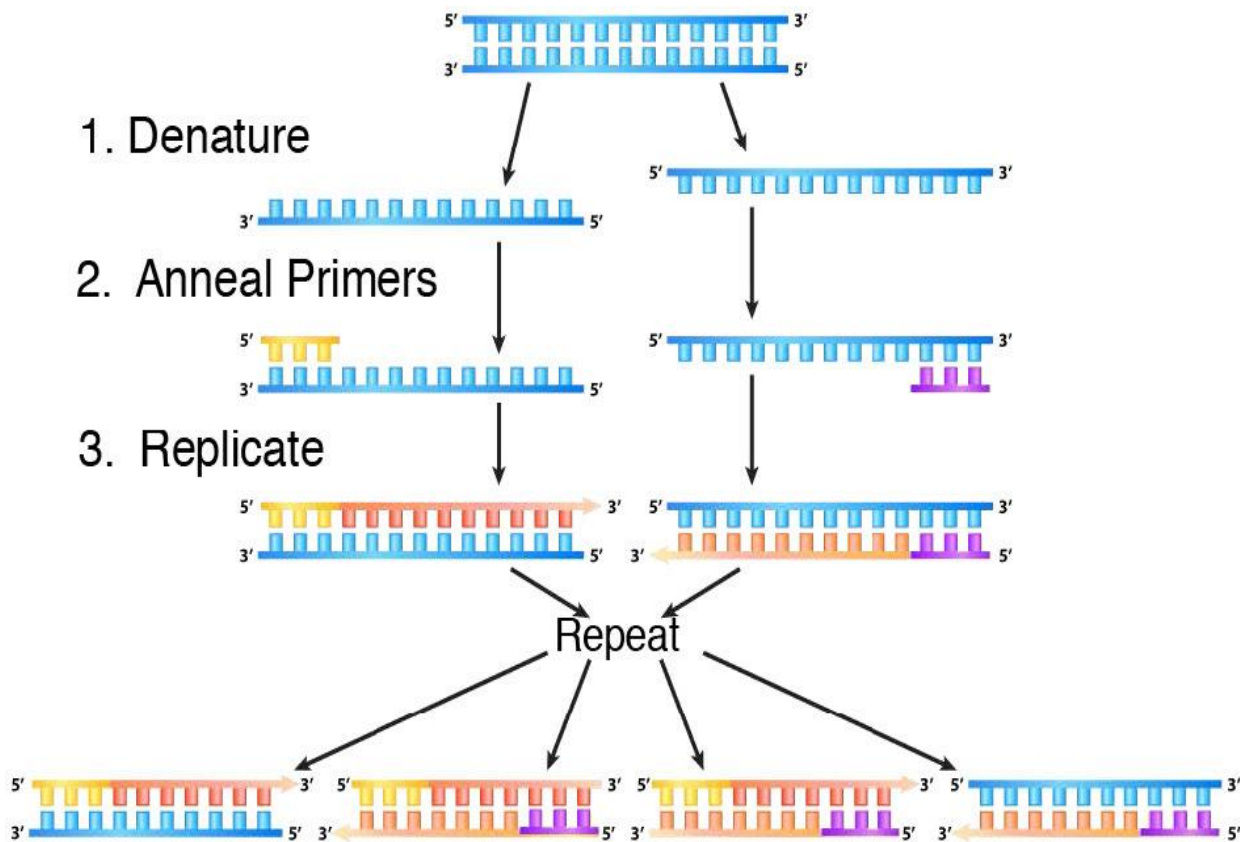
Полімерази Taq і Pfu, що часто використовуються, найбільш активні при 72 °C

- Полімераза - фермент, що добудовує другий ланцюг ДНК
- Для початку роботи їй потрібен дволанцюговий фрагмент ДНК - в цій якості виступає місце взаємодії ДНК з праймером
- Полімераза завжди добудовує ланцюг **від 5' до 3'-кінця** ці назви пов'язані з орієнтацією цукру дезоксирибози в ланцюзі;
- у звичайній дволанцюжковій ДНК ланцюга спрямовані протилежно один одному:

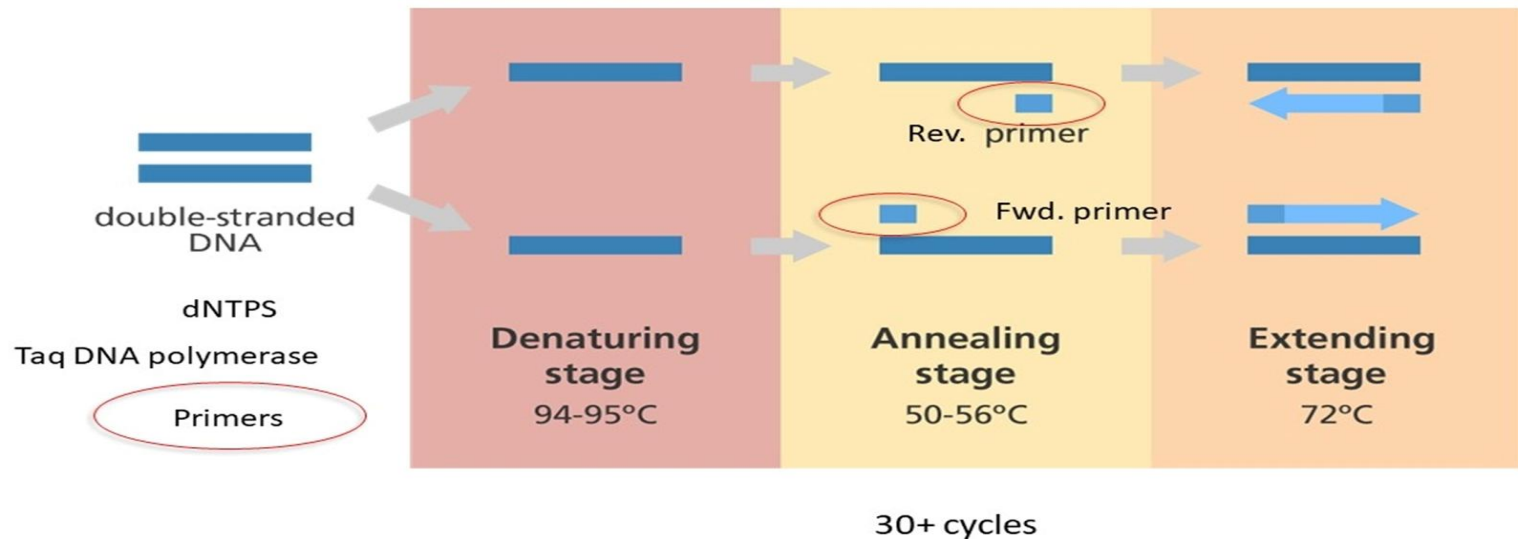
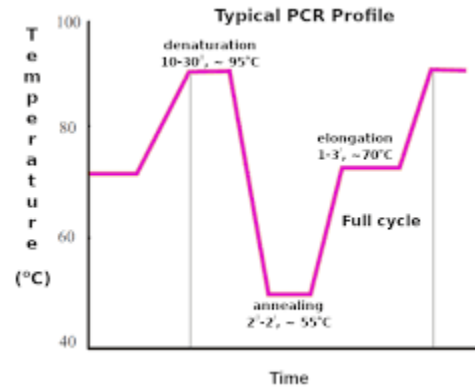
5' _____ 3'
3' _____ 5'

Етапи полімеразної ланцюгової реакції

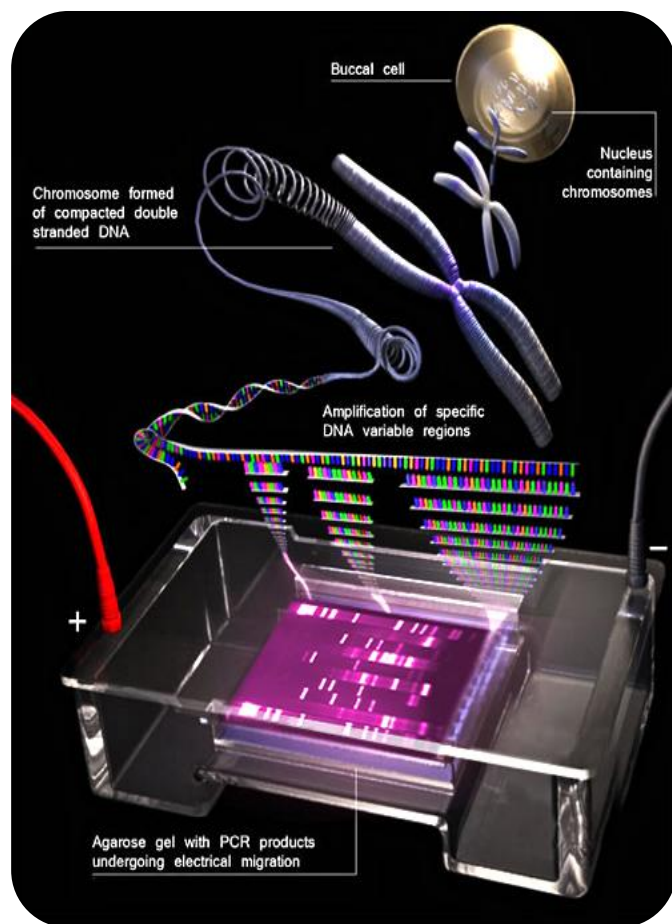
Зображення Алеї Кім



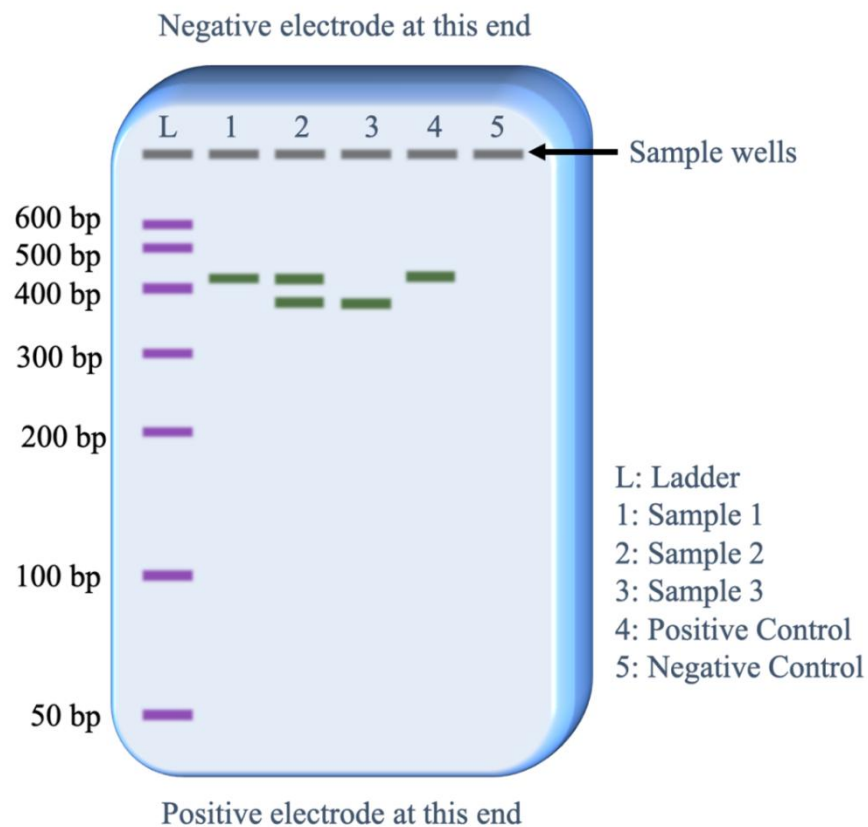
Головний елемент PCR - багаторазовий тепловий цикл, у якому зразок ДНК піддається впливу трьох різних температур



Четверта стадія - детекція



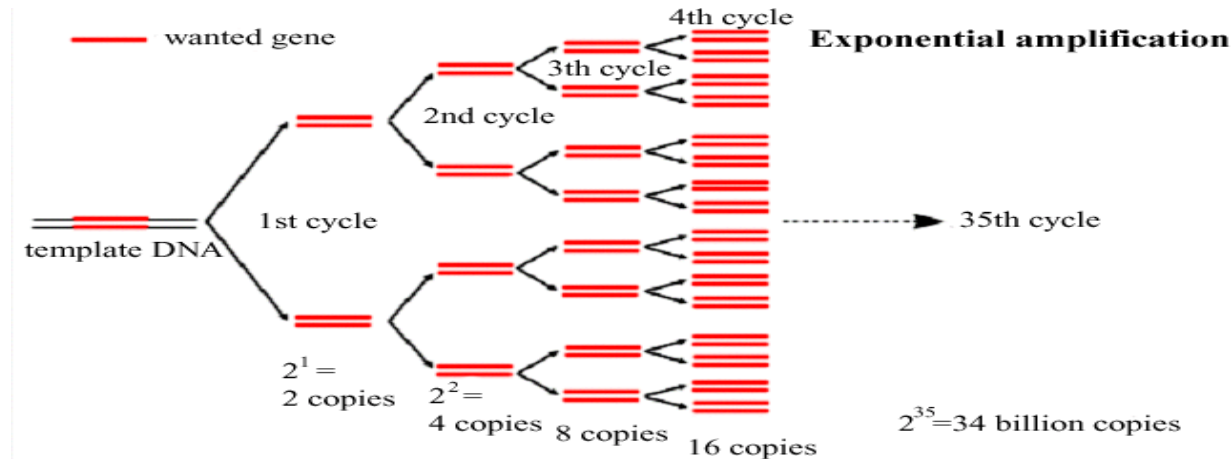
- В кінці ПЛР ми маємо розчин з великою кількістю розмножених потрібних ділянок, фрагментів ДНК
- Розчин наносять на гель, до гелю прикладають напругу
- За певний час фрагменти молекул ДНК (вони мають заряд) переміщуються в гелі на відстань, пропорційну їхній масі
- Гель кладуть під ультрафіолет і маса однакових фрагментів ДНК починає світитись в лунці знаходження
- Якщо світіння реєструється - значить у ДНК була ділянка, що відповідає праймеру, потрібний «ген»
- Якщо нічого не світиться, каламутна смужка без чіткої ділянки - потрібної ділянки в ДНК немає



- Зображення гелю для електрофорезу з шістьма лунками для зразків, які були завантажені або драбинкою розміру ДНК (лунка L), або зразком з пробігу ПЛР (1-5.) Гель піддавався фарбуванню ДНК барвником
- Зображення Марджорі Ханнеман

Схема подвоєння фрагментів ДНК в ПЛР

(Andy Vierstraete, 2001)



- Для процесу ампліфікації необхідно щоб структура праймерів була ідентична (комплементарна) ділянці вихідної ДНК
- Якщо цього немає (відсутня специфічна ДНК), то подвоєння ДНК немає
- Якщо розчині не виявиться жодної молекули ДНК з ділянкою, комплементарним внесеним праймерам, то реакція ПЛР не піде, навіть попри те, що у розчині плаватиме мільйон інших молекул ДНК
- Цим обумовлена **висока специфічність** методу ПЛР

Переваги методу ПЛР

1. **Універсальність.** За допомогою ПЛР можна визначати ДНК у будь-яких біологічних зразках. Причому це однаково відноситься як до ДНК мікроорганізмів, так і до ДНК людини
2. **Висока специфічність.** Специфіка визначається тим, що в ПЛР визначається унікальна ділянка гена, характерна тільки для даного збудника. Для підвищення специфічності можна визначати кілька різних генів одного мікроба. Так, наприклад, визначення *Ureaplasma urealyticum* можна виявляти як ген 16S-RNA, так і ген уреази. А для ідентифікації *Chlamydia trachomatis*, крім визначення хромосомальної ДНК та ДНК криптичної плазмід, стало можливим виявляти рибосомальну РНК (NASBA). Це значно підвищує достовірність дослідження
3. **Висока чутливість.** Полімеразна ланцюгова реакція здатна виявляти поодинокі копії ДНК. У середньому поріг чутливості більшості сучасних тест-систем становить від 10 до 100 копій ДНК. Це значно перевищує чутливість культуральних методів дослідження
4. **Мінімальний обсяг біологічного матеріалу.** Проведення аналізу можливе в мінімальному обсязі проби (до кількох мікролітрів), що вкрай важливо у педіатрії, неонатології, неврології, судовій медицині
5. **Можливість діагностики** не тільки гострих, а й латентних інфекцій. Особливо ефективний метод ПЛР для діагностики важко культивованих, некультивованих та персистуючих форм мікроорганізмів, з якими часто доводиться стикатися при латентних та хронічних інфекціях

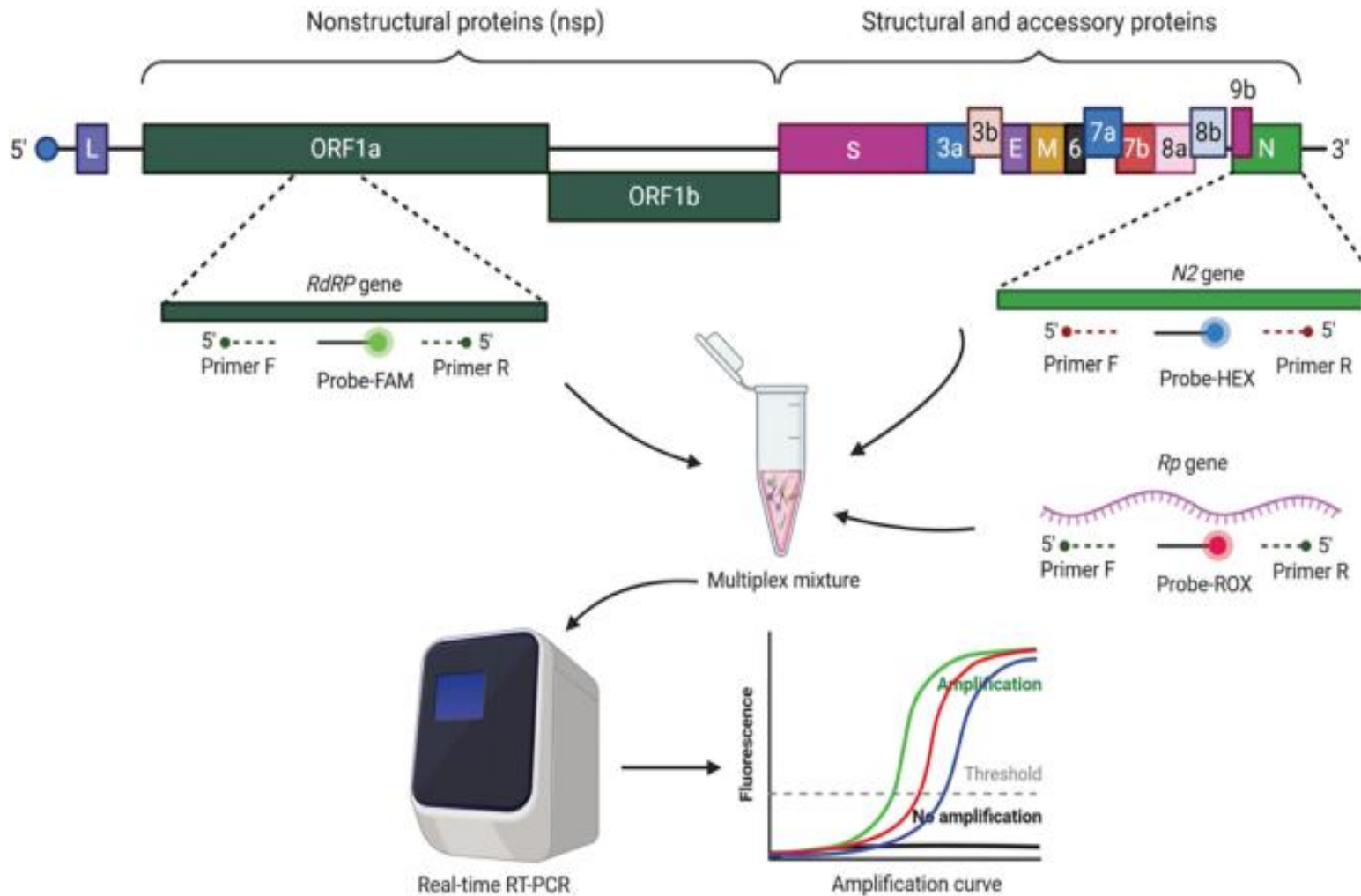
Недоліки методу ПЛР

1. Ампліфікується ДНК як живого, так і загиблого мікроорганізму. Це накладає певні вимоги при використанні ПЛР контролю ефективності лікування. У випадку подібний контроль повинен проводитися через проміжок часу, протягом якого відбувається повна елімінація збудника. Однак метод NASBA виявляє РНК тільки живих мікроорганізмів і дозволяє уникнути цих обмежень
2. Висока чутливість. Ряд мікроорганізмів (умовно - патогенна флора, УПФ) в нормі може існувати у людини в малій кількості. За допомогою методу ПЛР визначаються навіть найменші кількості УПФ, навіть за відсутності патології. Однак цю проблему вирішено з появою методу кількісного визначення ДНК (Real-time PCR)
3. Відмінності під час використання різних тест систем. Для ампліфікації можна використовувати різні ділянки геному збудника. Однак у разі різних мутації мікроорганізмів можлива зміна чи втрата генів. Це призводить до різних результатів при використанні тест-систем різних виробників

ПЛР у реальному часі

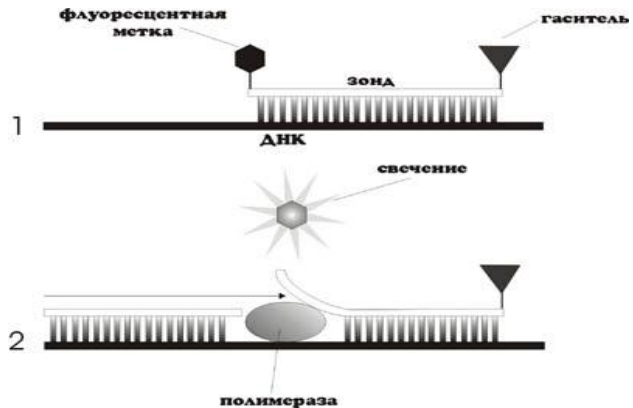
- Принцип методу ПЛР у реальному часі (Real-Time PCR) ґрунтується на детекції продуктів ампліфікації вже в процесі реакції та проведення моніторингу кінетики накопичення ампліконів
- Це означає, що облік результату ПЛР (числа ампліконів) відбувається після кожного циклу ампліфікації, а не в кінці, як за звичайної ПЛР
- Чим більше у вихідній пробі була специфічна ДНК, тим раніше і більше збільшиться кількість специфічних фрагментів
- "ПЛР у реальному часі" (Real-Time PCR) дозволяє здійснювати кількісну оцінку вмісту ДНК у досліджуваному матеріалі

Multiplex ПЛР у реальному часі



From: [Multiplex real-time RT-PCR method for the diagnosis of SARS-CoV-2 by targeting viral N, RdRP and human RP genes](#)

Детекція продуктів ампліфікації



1. Вищеплення 5' кінцевої мітки (TaqMan Assay). Ця методика заснована на використанні 5'-екзонуклеазної активності полімерази
2. У реакційну суміш додають ДНК-зонди, до складу яких входить флуоресцентна мітка в 5'-положенні і гасник флуоресценції в 3'-положенні, а також фосфатна група в 3'-положенні

Ці зонди мають місця посадки всередині області, що ампліфікується

Гасник поглинає випромінювання, що випускається флуоресцентною міткою, а фосфатна група в 3'-положенні блокує полімеразу

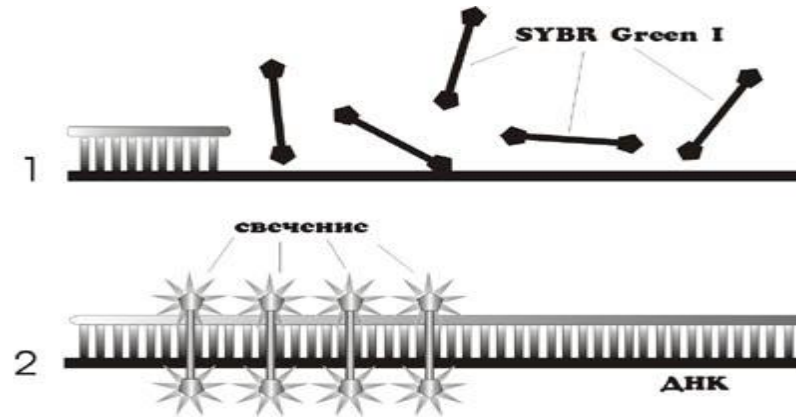
У ході ПЛР під час стадії відпалу праймерів відбувається приєднання ДНК-зонда до комплементарного ланцюга ДНК, причому чим більше продуктів ампліфікації утворюється в ході ПЛР, тим більше зондів молекул зв'яжеться з відповідними ампліконами

Під час стадії елонгації полімераза синтезує комплементарний ланцюг ДНК і при досягненні зонда починає розщеплювати його завдяки наявності 5'-екзонуклеазної активності

Таким чином відбувається роз'єднання флуоресцентної мітки і гасника, що призводить до збільшення свічення, що детектується

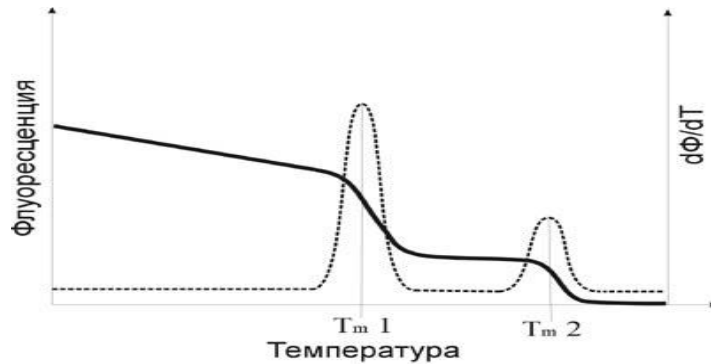
Очевидно, що чим більше ампліконів було напрацьовано в ході ПЛР на даний момент часу, тим інтенсивнішим буде свічення

Використання інтеркалюючих агентів



- Цей спосіб детекції заснований на тому, що флуоресценція бромистого етидію і SYBR Green I значно зростає при їх впровадженні в молекули ДНК
- Таким чином можна спостерігати за накопиченням продуктів ампліфікації. Збільшення флуоресценції може бути пов'язане як з накопиченням специфічного продукту, так і неспецифічного - праймери-димери, шмери
- Для отримання коректних результатів необхідне додаткове вивчення отриманих ампліконів за допомогою побудови кривих плавління (melting curves)

Криві плавління

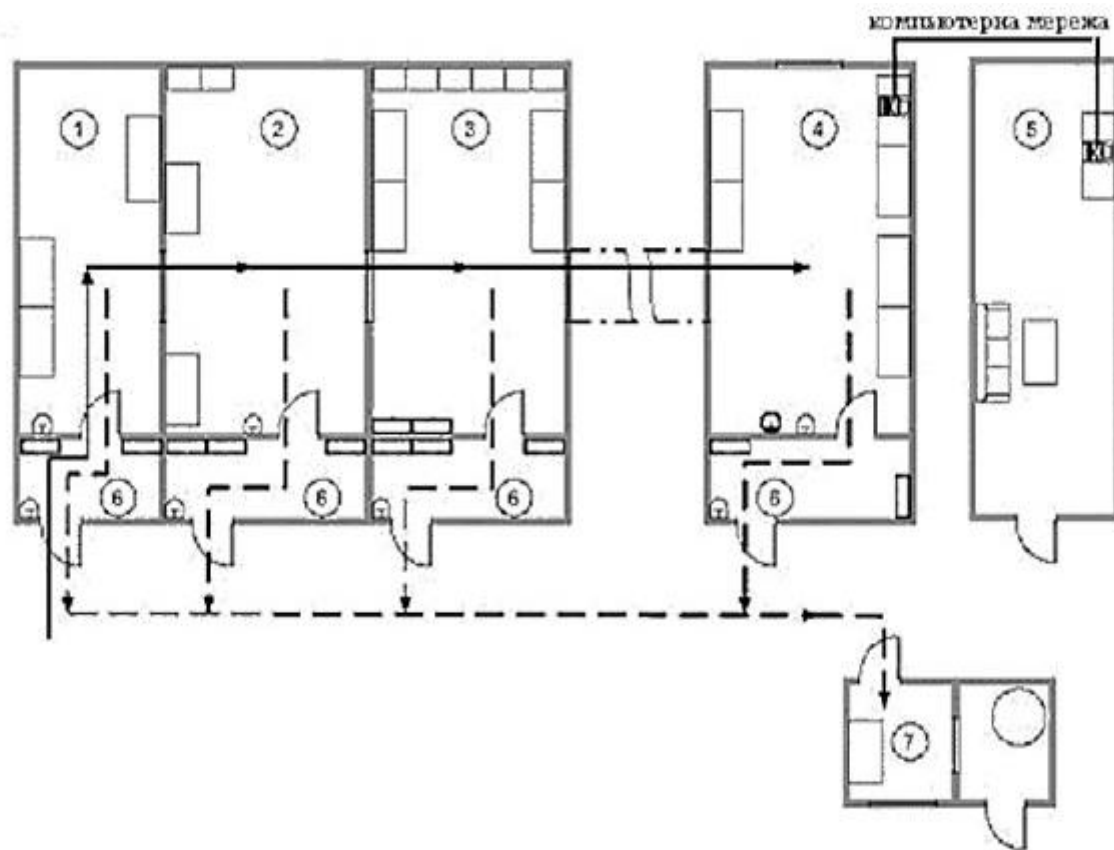


- Після закінчення ПЛР реакційну суміш нагрівають і безперервно вимірюють флуоресценцію
- Після досягнення температури плавління продукту ампліфікації флуоресценція різко знижується
- Кожне різке зменшення флуоресценції на графіці відповідає числу смужок, одержуваних на електрофорезі, тобто різних типів ампліконів

Різновиди ПЛР

- 1. «Вкладена» ПЛР (Nested PCR) – є друга пара праймерів, яка ампліфікує шматочок отриманого шматочка
- 2. "Інвертована" ПЛР (Inverse PCR) - перед проведенням ПЛР за допомогою серії ферментативних реакцій як би приклеюють відомі фрагменти на кінці невідомого, щоб можна було його ампліфікувати
- 3. ПЛР із зворотною транскрипцією (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) - береться РНК (молекула, яка є проміжним етапом між ДНК та білками в живій клітині), а з неї за допомогою ферменту зворотної транскриптази отримують ДНК, з якої вже проводять ПЛР . Це зручно, наприклад, щоб виявити, які саме гени в цій клітині експресуються
- 4. Асиметрична ПЛР (Assymetric PCR) - якщо потрібні продукти ампліфікації переважно одного з двох ланцюгів ДНК. Додають нерівну кількість праймерів
- 5. Кількісна ПЛР в реальному часі (Quantitative real-time PCR) - використовуються флуоресцентно мічені реагенти, і спеціальний прилад розглядає пробірку, в якій йде реакція, і повідомляє: "готово стільки продукту! а тепер уже вдвічі більше!"
- 6. ПЛР довгих фрагментів (Long-range PCR) - щоб ампліфікувати довгий (більше 10 тисяч пар основ) фрагмент, використовують ПЛР з двома полімеразами: одна з них, Taq-полімераза, може синтезувати довгий ланцюг, а друга, ДНК-полімераза з 3'5'-екзонуклеазною активністю, може виправити помилки, допущені першою
- 7. Multiplex PCR - додають кілька пар праймерів та одночасно ампліфікують кілька фрагментів

Схема організації ПЛР-лабораторії



Обладнання



Ламінарний бокс
II класу захисту



Детектуючий ампліфікатор
(Real-time)



Швидкісна
центрифуга



Твердотільний
термостат



Вортекс



Дякую за увагу!