

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

**Теоретические и прикладные вопросы
применения методов анализа
нуклеиновых кислот**

монография

Минск БелМАПО
2014

УДК 577.113

ББК 28.072

Т 33

Рекомендовано в качестве научного издания Советом БелМАПО
протокол № 9 от 27.11.2014 г.

Авторы:

профессор, д.м.н. *Костюк С.А.*

зав. каф. эпидемиологии и микробиологии профессор, д.м.н. *Коломиец Н.Д.*

старший научный сотрудник *Руденкова Т.В.*

научный сотрудник *Полуян О.С.*

Рецензенты:

д.б.н., наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики БелМАПО *В.С. Камышников*

д.м.н, профессор, главный научный сотрудник ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» *Н.Н. Полещук*

Т 33

Теоретические и прикладные вопросы применения методов анализа нуклеиновых кислот монография /С.А. Костюк, Н.Д. Коломиец, Т.В. Руденкова, О.С. Полуян – Минск: БелМАПО, 2014. –272с., табл. 13, ил. 106.

ISBN 978-985-499-878-7

В монографии подробно описаны методы диагностики, основанные на исследовании нуклеиновых кислот. Краткий теоретический обзор структуры и функций нуклеиновых кислот позволяет сформировать представление об объекте генодиагностики – ДНК/РНК. Анализируются различные методики экстракции нуклеиновых кислот, описываются способы исследования ДНК/РНК. В данной работе рассматриваются вопросы организации контроля качества в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Особое внимание уделено оценке параметров внутрилабораторного контроля качества исследований, а также валидации ПЦР методик.

Данная работа представляет интерес для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-вирусологов, врачей микробиологов, а также научных сотрудников, преподавателей, клинических ординаторов, аспирантов медицинских университетов и учреждений последипломного образования.

УДК 577.113

ББК 28.072

ISBN 978-985-499-878-7

© Костюк С.А., [и др.], 2014

© Оформление БелМАПО, 2014

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ...	9
1.1. История открытия дезоксирибонуклеиновой кислоты -ДНК.....	9
1.2. Структура ДНК.....	9
1.3. Свойства ДНК: денатурация и ренатурация	16
1.4. Рибонуклеиновые кислоты –РНК: строение, виды, свойства	18
1.5. Сохранение и модификация Генома. Генетический код.	22
1.6. Перенос генетической информации в клетке.....	25
ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	36
2.1. Метод выделения ДНК (РНК) с помощью фенольно-спиртовой депротеинизации.....	38
2.2. Выделение ДНК (РНК) путем гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции.....	39
2.3. Метод выделения ДНК (РНК) на колонках со специальными фильтрами.....	40
2.4. Метод выделения ДНК, предложенный R.Boom et al. (1990) ..	41
2.5. Метод сорбции на силикогеле	41
2.6. Выделение нуклеиновых кислот с применением магнитных частиц.....	41
2.7. Ионномагнитные технологии.....	43
2.8. Метод минипулов.....	43
2.9. Метод концентрирования материала	44
2.10. Выделение ДНК человека.....	44
2.11. Аппаратное обеспечение экстракции нуклеиновых кислот ...	44
2.12. Наборы для пробоподготовки.....	45
2.13. Оценка качества экстрагированной ДНК.....	45
ГЛАВА 3 КЛАССИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	46
3.1. ДНК-полимеразы	467
3.2. Рестриктазы	47
3.3. Методы гибридизационного анализа.....	488
3.4. Библиотеки генов.....	49
3.5. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот .	56
3.6. Полимеразная цепная реакция – ПЦР (PCR – polymerase chain reaction)	57
ГЛАВА 4 ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КОМПЛЕКТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ АНАЛИЗОМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	103

4.1. Общие требования к организации лаборатории для постановки ПЦР в режиме реального времени.....	103
4.2. Приборная комплектация лабораторий, использующих метод ПЦР в режиме реального времени.....	104
Оборудование для зоны пробоподготовки.....	104
Расходные материалы для зоны пробоподготовки.....	125
Автоматические системы для выделения нуклеиновых кислот	127
Оборудования для зоны приготовления реакционной смеси.....	133
Оборудования для зоны амплификации	134
Основные технические принципы работы амплификаторов для проведения ПЦР в режиме реального времени.....	141
ГЛАВА 5 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ	145
5.1. Критерии аналитической и диагностической значимости молекулярно - биологических исследований.....	147
5.2. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на пре-аналитическом этапе.....	155
5.3. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на аналитическом этапе	157
5.4. Критерии внутрилабораторного контроля качества ПЦР-исследований	160
5.5. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на пост-аналитическом этапе.....	163
5.6. Принципы организации внешнего контроля качества ПЦР-исследований	164
5.7. Контаминация в ПЦР-лабораториях и меры предупреждения.....	165
5.8. Валидация методик, основанных на ПЦР	170
ГЛАВА 6 АЛГОРИТМЫ ПЦР И ЕЕ МОДИФИКАЦИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ...	177
ГЛАВА 7 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ.....	206
ПРИЛОЖЕНИЕ	
Правила взятия и хранения биологического материала для молекулярно-биологического анализа.....	264

ВВЕДЕНИЕ

Бурное развитие науки за последние несколько десятилетий и исследования в области молекулярной биологии, медицинской генетики, биохимии, биофизики, тесно смыкающиеся с микробиологией, иммунологией, онкологией, эпидемиологией и т.д., привели к созданию и активному внедрению в практику диагностических лабораторий молекулярно-биологических методов исследований генома человека, животных, растений, бактерий и вирусов. Эти методы чаще всего называют ДНК-исследования или анализ нуклеиновых кислот.

Методы анализа нуклеиновых кислот позволяют осуществлять раннюю и более полную диагностику различных заболеваний, своевременно проводить дифференциальную диагностику и осуществлять контроль эффективности терапии. Они незаменимы в пренатальной диагностике наследственных заболеваний, позволяют проводить геномную дактилоскопию по следам крови, спермы и других тканей (выявление личности, отцовства и др.). Дополнительные возможности открываются при использовании методов генодиагностики для определения совместимости тканей по HLA-типированию первого и второго классов, значительно превосходящие по своим возможностям HLA – серотипирование лейкоцитов доноров и реципиентов. Активное развитие методов анализа нуклеиновых кислот и внедрение их в практику позволяют предположить, что недалек тот момент, когда эти методы значительно сузят круг задач более традиционных диагностических исследований, какими являются методы цитогенетики, а может, и вытеснят их из практической медицины в научную сферу.

В настоящее время имеется два направления анализа нуклеиновых кислот: гибридизационный анализ нуклеиновых кислот и диагностика с использованием полимеразной цепной реакции.

Методы молекулярной биологии получили развитие в 50-е годы XX столетия. Формальное начало – открытие наследственной трансформации бактерий под действием ДНК (1944) и расшифровка пространственной структуры ДНК (1953).

В 70-е годы для выявления инфекционного возбудителя или мутации использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации специфических олигонуклеотидных зондов, меченных радиоактивным изотопом (или флюорохромом) с образцом выделенной ДНК. Гибридизационный анализ использует способность нуклеиновых кислот в определенных условиях образовывать специфические комплексы с нуклеиновыми же кислотами, имеющими комплементарные к ним последовательности. Метод детекции инфекционных возбудителей ДНК-гибридизацией оказался крайне трудоем-

ким, длительным и дорогостоящим. На смену ему пришел метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Полимеразная цепная реакция – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить и многократно копировать с помощью термофильной ДНК-полимеразы определенный фрагмент ДНК.

Открытие метода полимеразной цепной реакции стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние 20 лет.

Впервые состав компонентов, входящих в реакционную смесь для постановки ПЦР, и основные принципы использования праймеров (коротких, искусственно синтезированных молекул ДНК) для получения копий ДНК были описаны Клерре с соавт. в 1971 г. Однако не была подчеркнута основная особенность ПЦР – экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК.

Первое сообщение о современной ПЦР было опубликовано сотрудником корпорации «Cetus» Kary Mullis и соавторами в 1985 г. в журнале «Science». Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК в миллионы раз, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Широкому использованию ПЦР способствовало развитие некоторых технологий. В частности, появление приборов, позволяющих автоматически синтезировать одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды). В тот же период были обнаружены уникальные микроорганизмы, живущие в гейзерах. Их ферментные системы, в том числе и ДНК-полимераза, выдерживают высокие температуры горячих источников (до 95°C) и при этом сохраняют свою биологическую активность. Журнал «Science» в 1989 г. назвал открытую термостабильную ДНК-полимеразу, дающую возможность автоматизировать ПЦР, молекулой года. В 1987 г. P. Chomezynski и N. Sacchi предложили одноэтапный метод выделения ДНК с помощью гуанидинтиоцианат-фенолхлороформной экстракции, а K-B. Mullis и F. A. Faloona ввели в практическую медицину метод синтеза ДНК *in vitro*.

ПЦР сразу же была внедрена в практику, что позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень. Метод стал настолько популярен, что сегодня уже трудно представить работу в области молекулярной биологии без его использования. Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были

созданы современные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Если в недавнем прошлом для расшифровки ДНК размером в 250 пар нуклеотидов (п. н.) требовалась неделя, то современные автоматические секвенаторы позволяют определять до 5000 п.н. в сутки. Это, в свою очередь, способствует значительному росту баз данных, содержащих информацию о последовательностях нуклеотидов в ДНК. В настоящее время предложены всевозможные модификации ПЦР, описаны десятки различных применений метода в том числе «лонг-ПЦР», позволяющая копировать сверхдлинные последовательности ДНК. За открытие ПЦР К. В. Mullis в 1993 году был удостоен Нобелевской премии в области химии.

Все подходы к анализу нуклеиновых кислот могут быть выделены в несколько основных групп.

1. Методы идентификации определенных участков ДНК.
2. Методы определения первичной последовательности нуклеотидов в ДНК.
3. Методы определения содержания ДНК и анализа клеточного цикла.

Методы анализа нуклеиновых кислот позволяют сегодня проводить исследование не только ДНК, но и РНК, тем самым, расширяя возможности молекулярной клинической диагностики. Анализ РНК позволил исследовать РНК микроорганизмов (РНК-вирусы), проводить идентификацию различных типов РНК, и тем самым исследовать прохождение тех или иных синтетических процессов в клетке (анализ экспрессии генов).

Контроль качества лабораторных исследований является необходимым условием улучшения общественного здравоохранения. Система обеспечения качества лабораторных исследований предполагает наличие существования трех главных составляющих, гарантирующих качество и объективность получаемых результатов: подготовка персонала, включающая обучение и совершенствование навыков работы, внутрилабораторный контроль качества работы (ВКК) и систему внешней оценки качества (ВОК).

Однако, в настоящее время в Республике Беларусь, система ВОК в отношении исследований методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) лишь начинает формироваться, и сосредоточена на создании стандартных панелей образцов для оценки качества детекции ДНК/РНК возбудителей инфекций.

Следует особо отметить, что при планировании системы ВКК необходимы четкие представления об особенностях метода ПЦР и возможности применения к нему стандартных правил. Так, преаналитическая стадия ПЦР (сбор образца, доставка, хранение) отличается рядом особенностей, не поддающихся контролю традиционными методами, хотя включение внутренних контролей для обнаружения ингибирования ПЦР или деградации ДНК спо-

собно в определенной степени решить эти проблемы. Амплификационные технологии, основанные на циклической энзиматической реакции высокочувствительны к любой контаминации, которая может генерировать «ложноположительные» результаты. Большинство негативных аспектов связано с неподходящим амплификационным протоколом, недостаточной подготовкой и количеством мишени нуклеиновых кислот, присутствие ПЦР ингибиторов, использование неэффективных реагентов и/или температурных циклов и ошибочная интерпретация результатов, что и создает много возможностей для совершения случайных и систематических ошибок.

Оптимально организованная система ВКК позволяет повысить качество проводимых лабораторных исследований, выявить возникающие при исследовании всевозможные ошибки, их характер и причины, выработать способы устранения ошибок, сократить число неправильных и обеспечить максимально быстрое получение правильных результатов, а также экономить средства путем адекватной оценки результатов, выявления ошибок до момента их сообщения.

Контроль качества лабораторных методов исследования – это система мероприятий, включающая как статистические методы анализа, так и оценку пригодности метода для данной лаборатории; квалификацию сотрудников, уровень и контроль работы оборудования, контроль проведения пре- и постаналитического этапов.

ГЛАВА 1 СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1.1. История открытия дезоксирибонуклеиновой кислоты - ДНК

Современная биохимическая генетика ведет свое начало от открытия ДНК в 1869 г. Фридрихом Мишером. Он установил, что вещество, экстрагируемое из гнойной массы и клеточных ядер, химически отличается от белков как по содержанию органического фосфора, так и по устойчивости к расщеплению протеолитическими ферментами. Данное вещество, обладавшее кислотными свойствами, он назвал «нуклеином». Термин «нуклеиновая кислота» был введен в 1899г. В течение последующих 85 лет были разработаны разные методы выделения ДНК с целью исследования природы ее химических составляющих и связи между ними.

В 1901г. Альберт Кессель произвел гидролиз нуклеиновой кислоты (НК) и показал, что она состоит из остатков сахара, фосфорной кислоты и четырех гетероциклических соединений, являющихся производными пурина и пиримидина. Он же впервые доказал существование двух типов НК.

Термины «нуклеозид и нуклеотид» предложены Ф. Левеном в 1908г. Открытие строения нуклеозидов и нуклеотидов, роль фосфодиэфирной связи в полимеризации НК выяснил в 1952г. А. Тодд.

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик обобщили накопленные к тому времени данные о составе и структуре ДНК, построив ставшую теперь классической теорию двойной спирали ДНК. Эта дата является моментом рождения новой отрасли биологической науки – молекулярной биологии.

На основании модели ДНК была выдвинута гипотеза полуконсервативного способа репликации данной молекулы, которая была подтверждена в 1957г. После открытия А. Корнбергом фермента ДНК-полимеразы. Нуклеиновые кислоты играют основную роль в сохранении и реализации генетической информации. Различают два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), которые обеспечивают сохранение информации, и рибонуклеиновые кислоты (РНК), принимающие участие в процессах генной экспрессии и биосинтеза белка.

1.2. Структура ДНК

Основные структурные элементы ДНК – дезоксирибонуклеотиды. ДНК – это полимер, состоящий из четырех разных, но родственных мономеров. Мономером ДНК является нуклеотид, который содержит одно из четырех гетероциклических азотистых оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) или тимин (Т), связанное с дезоксирибозофосфатом (рисунок 1.1).



Рисунок 1.1 – Структура дезоксирибонуклеотидов

Азотистые основания — это ароматические гетероциклические соединения, производные пиримидина или пурина. Пять соединений этого класса являются основными структурными компонентами нуклеиновых кислот, общими для всей живой материи. Пуриновые основания аденин и гуанин, а также пиримидиновое основание цитозин, входят в состав ДНК и РНК. В состав ДНК входит также тимин – 5-метил-производное урацила. Основание урацил входит только в состав РНК (рисунок 1.2).

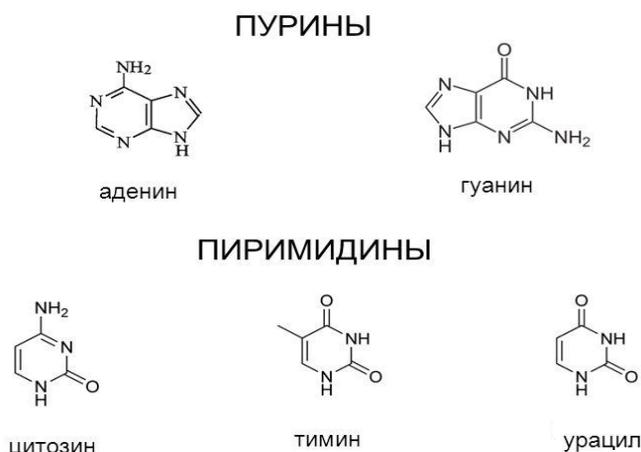


Рисунок 1.2 – Структура азотистых оснований

Соединения азотистых оснований с рибозой или 2-деоксирибозой носят название нуклеозиды. Так, например, аденин и рибоза образуют нуклеозид аденозин. Соответствующие производные других азотистых оснований носят названия гуанозин, тимидин и цитидин. Если углеводный остаток представлен 2-деоксирибозой образуется дезокси-нуклеозид, например 2'-дезоксаденозин. Если 5'-ОН-группа углеводного остатка нуклеозид этерифицирована фосфорной кислотой, то образуется производное, например 2'-дезокситимидин. Если 5'-фосфатный остаток соединяется с другими нуклеозидфосфатными остатками, получают нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфа-

ты, например АДФ и АТФ — важнейшие коферменты энергообмена. Все нуклеозидфосфаты объединяют под общим названием нуклеотиды.

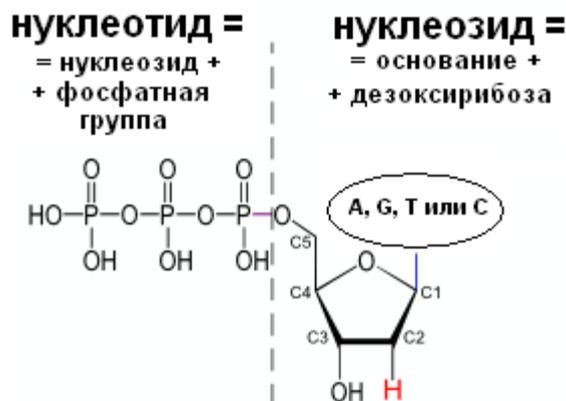


Рисунок 1.3 – Строение нуклеозидов и нуклеотидов

Каждый фосфат соединяет гидроксильную группу (ОН) при 3'-углеродном атоме дезоксирибозы одного нуклеотида с ОН-группой при 5'-углеродном атоме дезоксирибозы соседнего нуклеотида (рисунок 1.4).

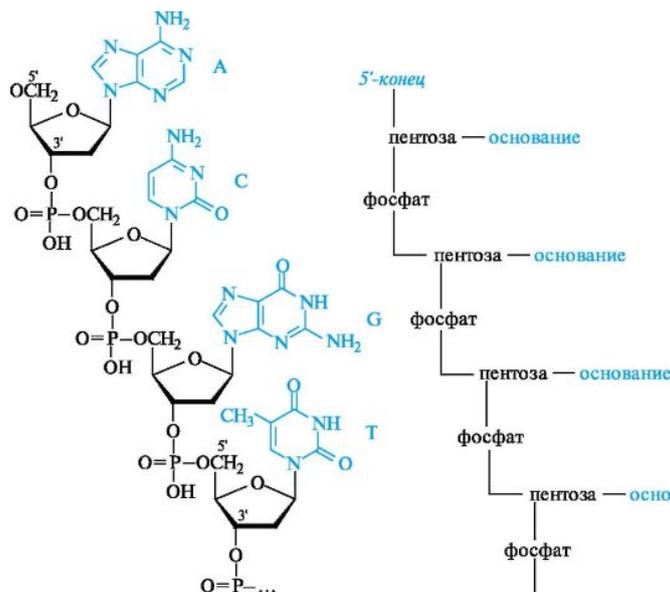


Рисунок 1.4 – Схема соединения нуклеотидов в молекуле ДНК

Согласно модели двойной спирали две цепи в молекуле ДНК – антипараллельные, т.е. идут в противоположных направлениях. Поэтому одна цепь идет в направлении от 5'-конца к 3'-концу, а другая – в направлении от 3'-конца к 5'-концу (рисунок 1.5).

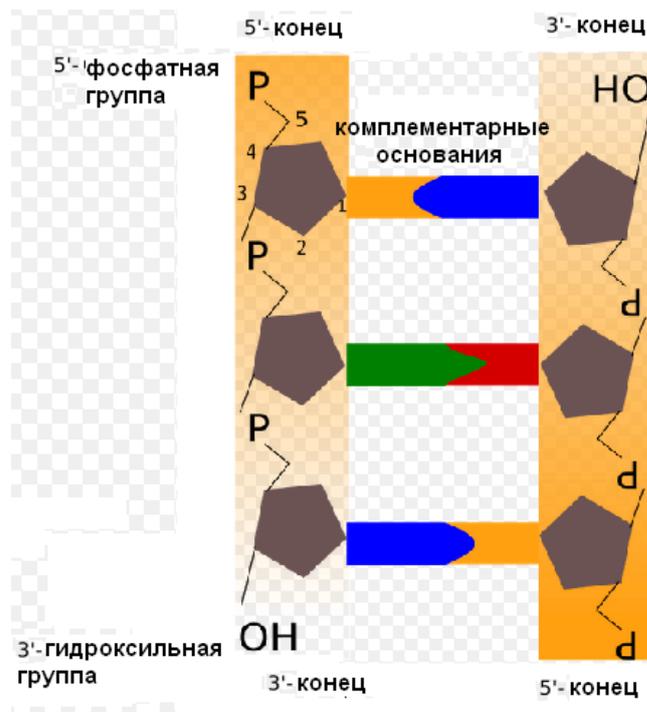


Рисунок 1.5 – Антипараллельные цепи в молекуле ДНК

Два типа пар оснований, А-Т и G-C – называют комплементарными парами – преобладают в большинстве ДНК. Реакции взаимодействия А-Т и G-C получили название спаривание оснований.

В А-Т-паре основания соединены двумя водородными связями: одна из них образуется между амино-и кето-группами, а другая – между двумя атомами азота пурина и пиримидина соответственно (рисунок 1.6).

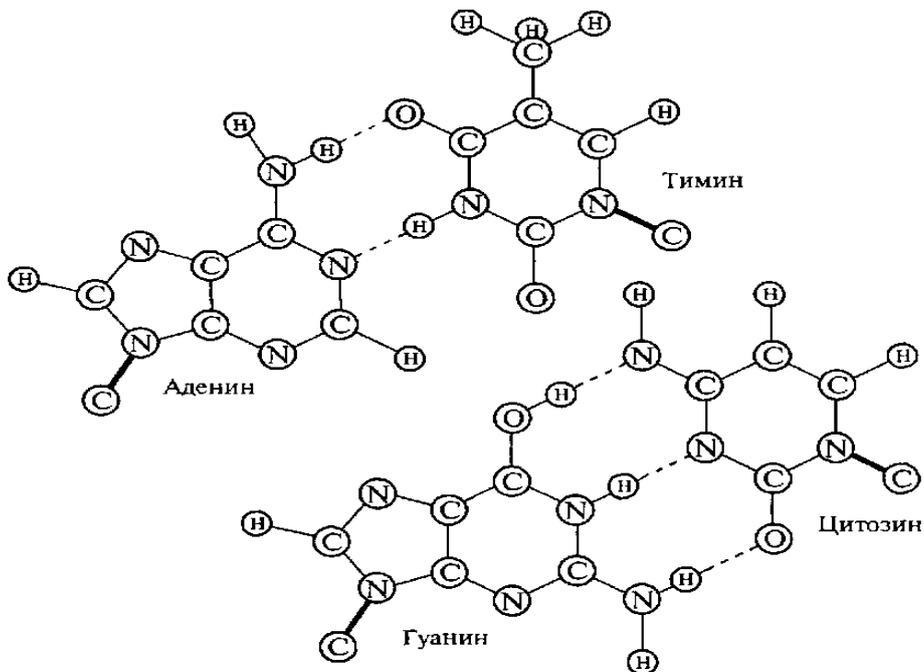


Рисунок 1.6 – Спаривание аденина с тиминном и гуанина с цитозинном

В G-C-паре имеются три водородные связи: две из них образуются между amino- и keto-группами соответствующих оснований, а третья – между атомами азота (рисунок 1.6).

Образование пар между двумя пуринами, двумя пиримидинами или некомплементарными основаниями A-C или G-C стерически затруднено, поскольку при этом не могут образовываться подходящие водородные связи, и, следовательно, нарушается геометрия спирали.

Азотистые основания четырех нуклеотидов ДНК не находятся между собой в количественном соотношении 1:1. Напротив, молярные отношения двух пуринов, A и G, и двух пиримидинов, T и C, различны для ДНК разных организмов. Соотношение между пуринами и пиримидинами постоянно и не зависит от источника ДНК: содержание пуриновых нуклеотидов (A + G) всегда равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (T + C); число A равно числу T, и аналогично для G и C (рисунок 1.7).

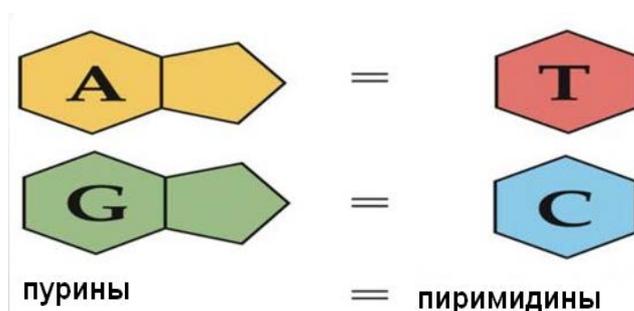


Рисунок 1.7 – Соотношение пуринов и пиримидинов

Основания имеют плоскую форму и располагаются парами в плоскости, перпендикулярной оси спирали. Вдоль спирали основания уложены стопками друг на друга и стабилизация спиральной структуры дополнительно обеспечивается межплоскостными взаимодействиями между ароматическими кольцами соседних оснований (рисунок 1.8).

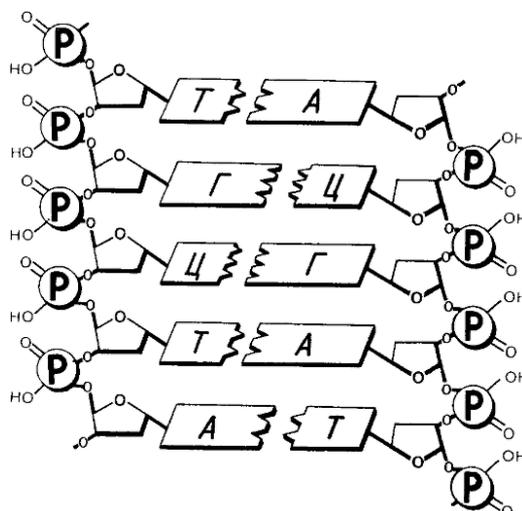


Рисунок 1.8 – Схема соединения двухцепочечной молекулы ДНК

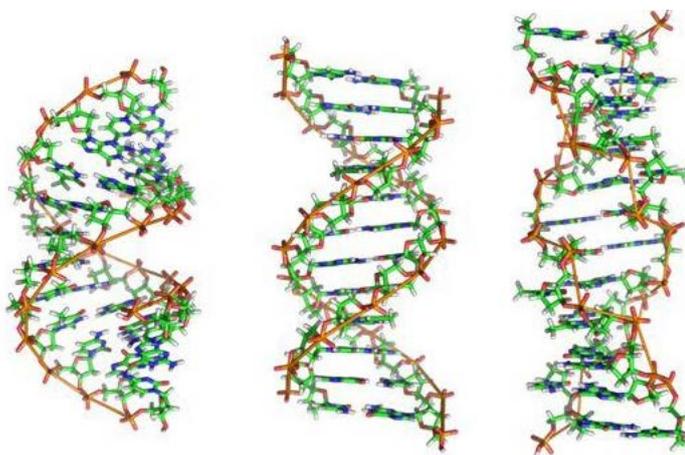
Эти специфические контакты получили название – стэкинг-взаимодействие, которые являются результатом реализации вандерваальсовых сил, возникающих за счет перекрывания п-облаков над и под двойными связями ненасыщенных колец пуринов и пиримидинов, с одной стороны, и гидрофобных взаимодействий с другой.

Каждая пара оснований повернута на 36° вокруг оси спирали относительно следующей пары и т.о. 10 п.о. составляют полный оборот в 360° .

Две цепи, образующие двойную спираль, уложены так, что наблюдаемая структура характеризуется наличием малого желобка шириной 12А и большого желобка шириной 22А. Двойная спираль правосторонняя: если смотреть вдоль спирали – повороты следуют по часовой стрелке.

Двухспиральные структуры ДНК:

1. В-форма спирали ДНК (рисунок 1.9)



	А-форма	В-форма	З-форма
• Спираль	правозакручена	правозакручена	левозакручена
• пн на оборот	10,7	10,4	12
• диаметр	25,5А	23,7А	18,4А
• вращение/пн	33,6	35,9	60,2
• наклон пн к оси	+19	-1,2	-9

Рисунок 1.9 – А, В и Z-формы двойной спирали ДНК.

Совершенная двойная спираль, геометрия которой зависит от нуклеотидной последовательности;

Каждая комплементарная пара оснований является клином, отклоняющим ось спирали в одном или другом направлении;

Наибольшее отклонение наблюдается, когда два соседних аденина одной цепи спарены с двумя тиминами другой. В этом месте происходит локальное искривление спирали;

Если такие пары встречаются с периодичностью примерно 1 раз на 10 п.н. (т.е. 1 раз на каждый виток спирали), то молекула ДНК приобретает заметно искривленную форму;

Изгибы ДНК наблюдаются в тех участках последовательности, где с необычно высокой частотой встречаются повторы А-Т, разделенные G-C богатыми участками из 4-6 нуклеотидов;

Биологическая роль искривления двойной спирали ДНК окончательно не установлена. Возможно, это имеет значение при специфическом связывании ДНК с белками в процессе регуляции экспрессии генов;

В-форма спирали характерна для волокон ДНК при очень высокой относительной влажности (92%), которые находятся в растворах с низкой ионной силой (живая клетка).

2. А-форма спирали ДНК

Обнаруживается в волокнах ДНК при пониженной относительной влажности (75%) и в присутствии ионов Na, K, Cs;

А-форма отличается от В-формы тем, что плоскости оснований составляют с перпендикуляром к спирали угол равный 20° . При этом расстояние между парами оснований по вертикали уменьшается до 0,29нм, а число пар на виток увеличивается до 11-12;

Конформация А-формы близка к структуре гибридов ДНК-РНК и структуре двухспиральных РНК;

Причина этого явления заключается в том, что 2'-ОН-группы, присутствующие в молекулах РНК препятствуют образованию классической В-формы.

3. Z-форма спирали ДНК

Z-форма двойной спирали найдена в полимерах или участках ДНК, образованных чередующимися динуклеотидами, состоящими из пар пурин-пиримидин.

Z-форма двойной спирали существует при довольно высоких концентрациях соли, что объясняется необходимостью противостоять повышенному электростатическому отталкиванию между нуклеотидами, сжатыми из-за уменьшения диаметра двойной спирали Z-ДНК;

Z-форма имеет существенное биологическое значение - повышается стабильность ДНК;

Условием для образования Z-форма *in vivo* является присутствие особых белков стабилизирующих ее структуру.

Конформационные переходы В-формы в Z-форму имеют большое биологическое значение (регуляция транскрипции отдельных генов) и происходят *in vivo* в специфических участках ДНК.

1.3. Свойства ДНК: денатурация и ренатурация

Водородные связи и межплоскостные взаимодействия, стабилизирующие двойную спираль, достаточно слабы, и при относительно небольших воздействиях происходит разделение цепей – процесс, именуемый денатурацией, или плавлением.

Двухцепочечная спиральная ДНК в растворе легко разрушается при нагревании до температур, близких к 100°C , при увеличении рН раствора до уровня, при котором разрушаются водородные связи между основаниями.

Денатурация ДНК сказывается на изменении физических свойств ДНК. Например, происходит изменение оптической плотности, гетероциклические о.н. поглощают УФ лучи с максимумом 260 нм. Но поглощение характерное для ДНК на 40% меньше, чем поглощение смеси свободных н. того же состава. Это явление - гипохромный эффект, обусловлено взаимодействием оснований в результате стэкинг-взаимодействий при параллельном расположении в двойной спирали. При плавлении двойной спирали ДНК, когда она переходит в одноцепочечную форму, оптическое поглощение при 260 нм возрастает.

Среднюю точку температурного диапазона, при котором происходит разделение цепей ДНК, называют температурой плавления и обозначают $T_{пл}$ (T_m). Точное ее значение зависит от состава оснований. Пары G-C, связанные тремя водородными связями более тугоплавки, чем пары A-T, связанные двумя водородными связями. ДНК на 40% состоящая из пары G-C плавится при $T_{пл}$ 87°C в обычных условиях, тогда как ДНК содержащая 60% G-C, при тех же условиях будет иметь $T_{пл}$ около 95°C .

Факторы, влияющие на денатурацию: одно- и двухвалентные катионы, полиамины, белки, нейтрализуют частично или полностью отрицательно заряженные молекулы.

Денатурация – процесс обратимый, последующее восстановление двухцепочечной структуры ДНК может происходить даже при полном расхождении цепей.

Процесс воссоединения, называемый ренатурацией, реассоциацией или отжигом, происходит при понижении температуры или рН (рисунок 1.10).

Диссоциация (денатурация) и реассоциация (ренатурация) ДНК в растворе являются искусственным воссозданием процессов, играющих ключевую роль в реализации разнообразных биологических функций *in vivo*.

Способность двух отдельных комплементарных цепей нуклеиновой кислоты воссоединяться с образованием исходной структуры – ключевой момент для проведения соответствующих опытов *in vitro*, а также для выделения, сравнения и идентификации специфических нуклеиновых кислот.



Рисунок 1.10 – Схема процессов денатурации и ренатурации ДНК.

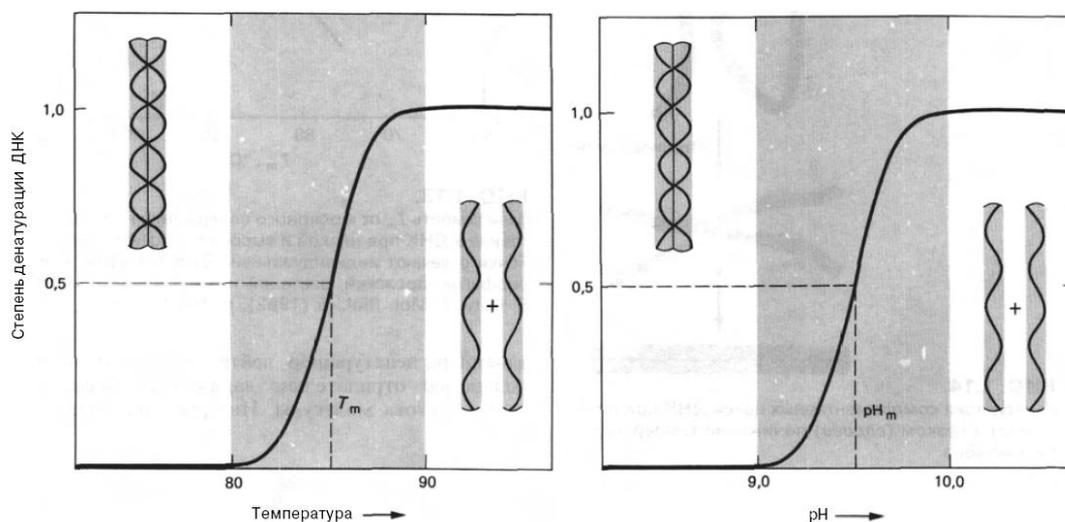


Рисунок 1.11 – Кривые денатурации двухцепочечной ДНК при изменении температуры и рН.

Экспрессия генетической информации в геномах всегда осуществляется в фазе двухцепочечной ДНК – именно она является субстратом для транскрипции последовательности ДНК в РНК.

Размеры ДНК могут меняться в гигантских пределах: от нескольких нуклеотидов до миллиардов пар оснований (п.о.). У человека большая часть ДНК – 3,2 млрд п.о. – находится в ядрах клеток в виде 46 плотно упакованных, суперскрученных за счет взаимодействий с ядерными белками структур, называемых хромосомами.

Правила ДНК:

Состав ДНК различных клеток, составляющих ткани и органы одного организма всегда одинаков;

Состав ДНК с возрастом не меняется;

Состав ДНК клеток разных видов различен;

Количество аденина всегда равно количеству тимина ($A=T$), а $G=C$;
 $A+T= G+C$.

Около 5% ДНК присутствует в митохондриях – органеллах цитоплазмы, обеспечивающих процессы дыхания и энергетического обмена клеток эукариот.

В большинстве соматических клеток ДНК представлена двумя копиями – по одной в каждой хромосоме. Таким образом, в клетках присутствуют 23 пары хромосом, 22 из которых гомологичны друг другу – аутосомы и одна пара (X и Y) – половые хромосомы.

1.4 Рибонуклеиновая кислота – РНК: строение, виды, свойства

ДНК – не единственная нуклеиновая кислота (или полинуклеотид), обнаруживаемая в клетке. Близкородственные молекулы – рибонуклеиновые кислоты (РНК) по своей структуре очень сходны с молекулами ДНК. В состав нуклеотидов молекулы РНК входят азотистое основание (аденин, гуанин, урацил, цитозин), сахара рибозы (рисунок 1.12) и фосфатной группы.

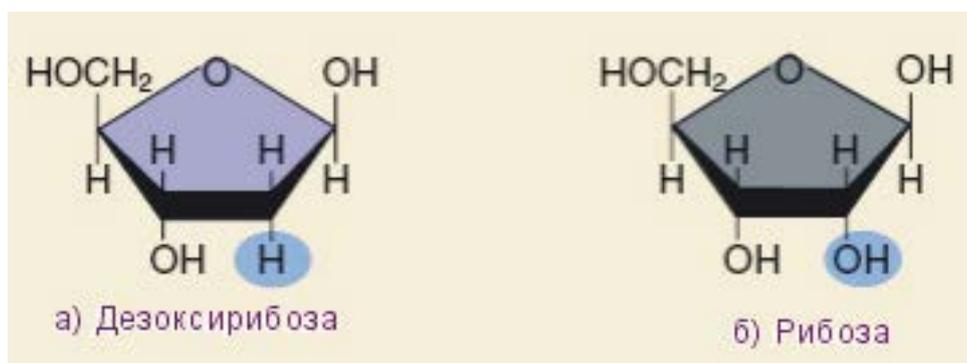


Рисунок 1.12 – Отличие дезоксирибозы, входящей в состав ДНК-нуклеотидов, и рибозы входящей в состав РНК-нуклеотидов

В молекулах РНК одно из пиримидиновых оснований – тимин – заменено на урацил. Молекулы РНК существуют только в однонитевой форме, но могут образовывать дуплексы с молекулами ДНК

Фундаментальные различия между ДНК и РНК (таблица 1.1):

ДНК – хранение генетической информации;

- РНК – передача генетической информации;
- ДНК – стабильный компонент клетки;
- РНК – нестабильный короткоживущий компонент клетки.

Таблица 1.1 – Основные отличия молекул ДНК и РНК

	ДНК	РНК
Сахар	дезоксирибоза	рибоза
Азотистые основания	А, Т, Г, Ц	А, У, Г, Ц
Количество цепей в молекуле	99,99% двойная спираль 0,01% одноцепочечная	99,99% одноцепочечная 0,01% двойная спираль
Форма молекулы	Все одноцепочечные – кольцевые. Большинство двухцепочечных – линейные, часть - кольцевые	Линейные молекулы

Во всех клетках присутствуют следующие виды РНК:

- ✓ рибосомная РНК (рРНК),
- ✓ транспортная РНК (тРНК)
- ✓ информационная, или матричная, РНК (мРНК).

Большинство клеток содержат также много других малых цитоплазматических РНК (мцРНК), а в клетках эукариот присутствует еще и множество малых ядерных РНК (мяРНК).

Содержание РНК в любых клетках в 5-10 раз превышает содержание ДНК.

Основная роль РНК – трансляция генетической информации с образованием белков.

Молекулы РНК принимают участие и в осуществлении некоторых специализированных эндонуклеазных функций, регулирующих различные этапы экспрессии генов. Молекулами РНК представлены геномы некоторых вирусов (ретровирусов и множества вирусов животных, растений и насекомых с одно- и двухцепочечным геномом).

Около 80% массы клеточных РНК составляют три или четыре вида рРНК, а около 15% – почти 100 видов тРНК. На долю нескольких тысяч различных матричных РНК приходится менее 5% клеточной РНК, а на долю малых ядерной и цитоплазматической РНК, число видов которых пока неизвестно, – менее 2% от общего количества

Большинство клеточных РНК - одноцепочечные молекулы, хотя некоторые вирусные геномы (в том числе геномы ретровирусов) представлены двухцепочечными РНК, напоминающими А-форму ДНК.

В одиночных цепях все время образуются короткие внутримолекулярные двухцепочечные участки. Это связано с тем, что в большинстве РНК

имеются небольшие комплементарные последовательности, которые спариваются и образуют петли.

Двухцепочечные области, образованные подобным образом, обычно непротяженны и прерывисты, поскольку спаривающиеся участки редко бывают абсолютно комплементарным. Укладка большинства РНК может происходить более чем одним способом, однако биологическое значение образующихся при этом изомеров установлено только в некоторых случаях.

Концепция существования иРНК. Ф.Жакоб и Ж.Моно в 1961г сформулировали концепцию о существовании короткоживущего РНК-посредника, переносящего информацию от ДНК к рибосомам. Т.к. в эукариотических клетках белки синтезируются в цитоплазме, а вещество наследственности находится в ядре, то должен существовать химический посредник, кодируемый генами и переносящий информацию к рибосомам. Данный посредник должен обладать следующими свойствами:

- он должен быть полинуклеотидом;
- его нуклеотидный состав должен соответствовать нуклеотидному составу определенного участка ДНК, который его кодирует;
- он должен иметь способность временно взаимодействовать с рибосомами;
- он должен синтезироваться и деградироваться очень быстро.
- функциональное время жизни иРНК определяется ее способностью служить в качестве матрицы для синтеза определенного белка (2 мин).

Основные особенности структуры тРНК:

❖ - молекула тРНК состоит обычно из 75-85 нуклеотидов и содержит уникальный тринуклеотид, который определяет, какую аминокислоту эта тРНК присоединяет и с каким кодоном она может спариться;

❖ - тРНК, независимо от их нуклеотидной последовательности, обладают характерной вторичной структурой, которую называют структурой «клеверного листа» из-за наличия в ней трех шпилек;

❖ - на 3'-конце молекулы всегда находится четыре неспаренных нуклеотида, причем три них – это обязательно ССА. 5'- и 3'-концы цепи РНК образуют акцепторный стебель. Цепи удерживаются вместе благодаря комплементарному спариванию семи нуклеотидов 5'-конца с семью нуклеотидами, находящимися вблизи 3'-конца;

❖ - у всех молекул имеется шпилька ТψС, обозначаемая так потому, что она содержит два необычных остатка: риботимидин (Т) и псевдоуридин (ψ). Шпилька состоит из двухцепочечного стебля из пяти спаренных оснований, включая пару G-C, и петли длиной семь нуклеотидов. Тринуклеотид ТψС всегда расположен в одном и том же месте петли;

❖ - в антикодоновой шпильке стебель всегда представлен семью спаренными основаниями. Триплет, комплементарный родственному кодону, антикодон – находится в петле, состоящей из семи нуклеотидов. С 5'-конца антикодон фланкируют инвариантный остаток урацила и модифицированный цитозин, а к его 3'-концу примыкает модифицированный пурин, как правило аденин;

❖ - еще одна шпилька состоит из стебля длиной три-четыре пары нуклеотидов и петли варьирующего размера, часто содержащей урацил в восстановленной форме – дигидроурацил (DU);

❖ - рентгеноструктурный анализ некоторых молекул тРНК позволил выявить их четвертичную структуру – эта структура более компактна, чем структура «клеверного листа»;

❖ - четвертичную структура образуется благодаря внутримолекулярным взаимодействиям, сближающим DU- и ТψС-шпильки;

❖ - молекула тРНК выглядит как из двух взаимно перпендикулярных частей в одной из них находится акцепторный участок, в другой – антикодон.

❖ - молекулы структура получила название L-конфигурации.

Денатурация и ренатурация РНК.

Двухцепочечные участки в РНК разрушаются при повышении температуры или рН, но при высоких значениях рН в РНК разрушаются и фосфодиэфирные связи (в отличие от ДНК).

Поскольку протяженность спирализованных участков в одноцепочечной РНК невелика, а сами спирали несовершенны, разрушаются они довольно легко. Полностью комплементарная двухцепочечная РНК плавится в довольно узком температурном интервале.

В результате денатурации образуются две комплементарные одиночные цепи, способные к последующему воссоединению при плавном понижении температуры.

После денатурации двухцепочечных участков одноцепочечной РНК восстановление тех же спаренных областей оказывается затрудненным, и в результате ренатурации могут образоваться структуры, отличные от исходной.

1.5. Сохранение и модификация генома. Генетический код

Генетическая программа клеточных организмов записана в нуклеотидной последовательности ДНК. Для сохранения уникальных свойств организма необходимо точное воспроизведение последовательности ДНК в каждом последующем поколении. ДНК служит матрицей и определяет порядок, в котором нуклеотиды выстраиваются в новые нуклеотидные цепочки. Обладая одинаковым аппаратом синтеза, различные ДНК осуществляют образование только подобных себе реплик.

- ✓ ДНК используется для хранения генетической информации, т.к.
- ✓ молекула ДНК более стабильна, чем молекула РНК;
- ✓ в молекуле ДНК отсутствует одна гидроксильная группа, что делает ее более устойчивой к гидролизу, чем РНК;
- ✓ ДНК существует в виде двухцепочечной молекулы, состоящей из двух комплементарных нуклеотидных цепей, что позволяет ДНК легко реплицироваться и репарировать возникающие в ней повреждения, при этом неповрежденная цепь используется в качестве матрицы для восстановления комплементарной дефектной цепи;
- ✓ используя принцип комплементарности, ДНК направляет синтез отдельных молекул РНК. Синтезированные таким образом одноцепочечные молекулы РНК выполняют две другие функции: одни направляют синтез белков, как кодирующие молекулы (информационные РНК), а другие каталитические молекулы (рибосомные и другие неинформационные РНК).

Таким образом, основная функция ДНК – хранение генетической информации, тогда как РНК – перенос информации от ДНК к месту синтеза белка и реализации данной информации в структуре полипептидной цепи белка.

Природа генетического кода.

Предположение о коллинеарности нуклеотидных и аминокислотных последовательностей было высказано в числе первых в дискуссии о природе генетического кода. Теоретический анализ привел к предположению, что наиболее подходящий размер для генетической кодирующей единицы, или кодона, является последовательность из трех нуклеотидов.

В основе этого вывода лежали три соображения:

- ✓ четыре нуклеотида, взятые по одному, могут кодировать только четыре разные аминокислоты
- ✓ сочетания из двух нуклеотидов могут кодировать только 16 аминокислот, а это меньше, чем те 20 аминокислот, которые, как было известно, присутствуют в белках

✓ только совокупности трех нуклеотидов дают 64 возможных кодона, т.е. число, более чем достаточное для кодирования 20 разных аминокислот.

Нуклеотидная последовательность считывается расположенными один за другим триплетами с фиксированной точки, полипептидные цепи синтезируются последовательно путем соединения аминогруппы одной аминокислоты с карбоксильной группой другой.

Последовательность нуклеотидов ДНК (или пар оснований) составляет информационную емкость молекулы, определяя порядок синтеза и аминокислотную последовательность белков в соответствии с универсальным для всех живых существ трехбуквенным - триплетным, генетическим кодом.

Соответствие между аминокислотами и их кодонами.

Одним из загадочных моментов кодирования было отсутствие структурной комплементарности между нуклеиновыми кислотами, с одной стороны, и аминокислотными цепочками - с другой.

Выход из этого концептуального тупика - ответ на вопрос, как аминокислоты спариваются с соответствующими кодонами,- был найден, когда появилась идея о существовании адаптера.

Согласно этой идее, аминокислоты сначала связываются с молекулами РНК, а затем такие гибриды выстраиваются вдоль мРНК, соединяясь с ней путем комплементарного спаривания нескольких оснований в адапторной молекуле РНК с соответствующим кодовым в мРНК.

Расшифровка генетического кода.

Предпосылками для расшифровки послужили два открытия:

мРНК-это информационный посредник между генами и белками;

мРНК, введенная в бактериальные экстракты, транслируется с образованием соответствующих белков.

Были проделаны эксперименты с применением смешанных полимеров с варьирующим соотношением двух и трех нуклеотидов; в результате был определен состав кодонов. Однако эти данные позволили установить лишь нуклеотидный состав кодонов, но не порядок следования нуклеотидов в них.

Свойства генетического кода:

1. Избыточность генетического кода:

✓ Все аминокислоты, кроме двух, кодируются более чем одним кодоном. Аминокислоты – цистеин, аланин, глицин, валин, а также дикарбоновые кислоты и их амиды, кодируются двумя-четырьмя кодонами каждая. Из-за избыточности разные нуклеотидные последовательности могут при трансляции давать одну и ту же аминокислотную последовательность. Таким образом, если известна нуклеотидная последовательность, то можно однознач-

но определить последовательность белка, обратное же проделать невозможно.

✓ Сигналом для остановки синтеза белка служит любой из трех кодонов: UAA, UAG или UGA.

✓ Кодон AUG выполняет двойную функцию: детерминирует аминокислоту метионин и в определенных последовательностях обозначает начало сегмента, кодирующего белок.

✓ Избыточность кода имеет одну особенность: наибольшее число вариаций в кодонах, детерминирующих данную аминокислоту, приходится на третью позицию (3'-конец триплета).

2. Универсальность генетического кода:

Генетический код универсален для всех живых существ — это одно из его главных свойств. Универсальность генетического кода служит наиболее веским аргументом в пользу гипотезы об едином источнике возникновения жизни на земле и о филогенетическом родстве всех видов живых существ. Именно это свойство обеспечивает возможность прочтения в любых модельных клеточных системах искусственно введенной генетической информации, сконструированной из фрагментов ДНК разного видового происхождения. Вся геновая инженерия основана на универсальности генетического кода (рисунок 1.13).

UUU	<u>Phe</u>	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	<u>Cys</u>
UUC	“	UCC	“	UAC	“	UGC	“
UUA	<u>Leu</u>	UCA	“	UAA	<u>Och</u>	UGA	<u>Umb</u>
UUG	“	UCG	“	UAG	<u>Amb</u>	UGG	<u>Trp</u>
CUU	<u>Leu</u>	CCU	Pro	CAU	His	CGU	<u>Arg</u>
CUC	“	CCC	“	CAC	“	CGC	“
CUA	“	CCA	“	CAA	<u>Gln</u>	CGA	“
CUG	“	CCG	“	CAG	“	CGG	“
AUU	Ile	ACU	<u>Thr</u>	AAU	<u>Asn</u>	AGU	Ser
AUC	“	ACC	“	AAC	“	AGC	“
AUA	“	ACA	“	AAA	Lys	AGA	<u>Arg</u>
AUG	Met	ACG	“	AAG	“	AGG	“
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	<u>Gly</u>
GUC	“	GCC	“	GAC	“	GGC	“
GUA	“	GCA	“	GAA	<u>Glu</u>	GGA	“
GUG	“	GCG	“	GAG	“	GGG	“

Рисунок 1.2 – Таблица универсального генетического кода ДНК

3. Вырожденность генетического кода:

Вырожденность заключается в том, что все аминокислоты (кроме двух) кодируются несколькими вариантами триплетов. Генетический словарь состоит из 64 кодонов, каждый из которых представлен тремя последовательно расположенными нуклеотидами в цепи ДНК, при этом 61 из 64 триплетов кодируют аминокислоты, однако каждый триплет - только одну аминокислоту.

Генетический код вырожден, поскольку одной и той же аминокислоте может соответствовать более чем один кодон; но, код не двусмысленный, потому что любой кодон обозначает только одну аминокислоту. Вырожденность генетического кода приводит к тому, что нельзя однозначно перевести аминокислотную последовательность данного белка в нуклеотидную последовательность соответствующей мРНК.

Зная нуклеотидную последовательность кодирующего участка ДНК, можно однозначно прогнозировать аминокислотную последовательность соответствующего полипептидного фрагмента, тогда как одна и та же аминокислотная последовательность может кодироваться различным образом. Число возможных вариантов кодирующих ДНК резко возрастает с увеличением длины полипептида.

Расшифровка кода с помощью тРНК.

Аминокислоты не взаимодействуют с соответствующими им кодонами непосредственно. Каждая аминокислота вначале связывается с адаптером – родственной тРНК, и образуемая при этом аминоацил-тРНК узнает «родственный» кодон путем комплементарного спаривания оснований. Декодирование осуществляется с помощью спаривания оснований триплетных кодонов мРНК с триплетными антикодонами в аминоацил-тРНК. Присоединение аминокислот к родственным тРНК осуществляется с помощью специфических ферментов.

1.6. Перенос генетической информации в клетке

Генетическая информация у всех клеток закодирована в виде последовательности нуклеотидов в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Фенотипические признаки любого организма в конечном счете проявляются в разнообразии и количестве белков, кодируемых ДНК.

В основе переноса информации от ДНК к РНК или от РНК к ДНК лежит универсальная способность нуклеиновых кислот служить матрицей. Нуклеиновые кислоты направляют сборку идентичных или родственных молекул и непосредственно участвуют в процессе синтеза белка. Белки помимо самосборки осуществляют важнейшую функцию катализа и информационного переноса между нуклеиновыми кислотами. Репликация, с помощью кото-

рой создаются идентичные копии родительской молекулы ДНК, обеспечивая генетическую непрерывность в ряду поколений. Транскрипция ДНК с образованием РНК опосредует трансляцию (перевод) этой информации на уровень белков. Только у эукариот информация может передаваться в обратном направлении, от РНК к ДНК, посредством процесса, именуемого обратной транскрипцией (рисунок 1.14).

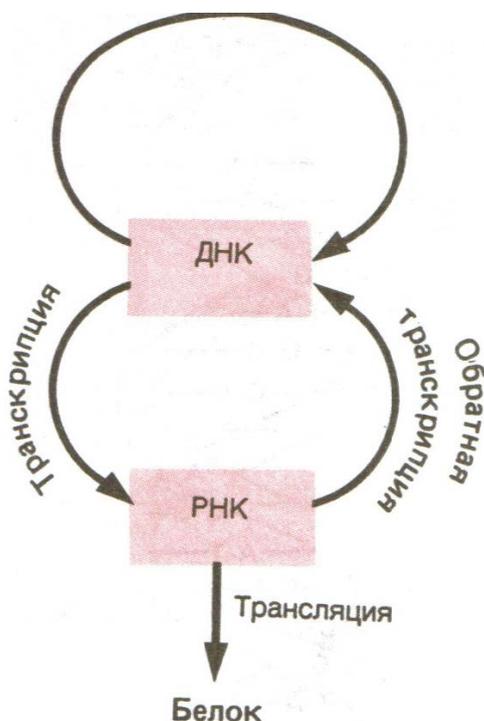


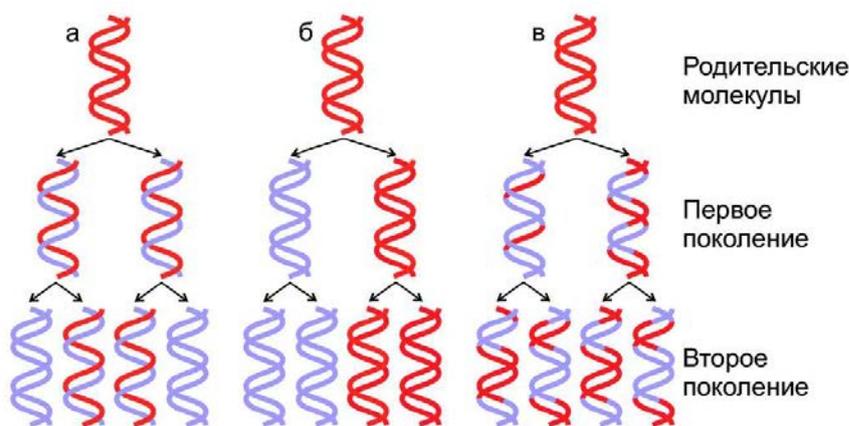
Рисунок 1.13 – Информационная связь между молекулами генетического аппарата-ДНК, РНК и белками

Репликация ДНК

1953 г., Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик писали «Мы не могли не осознавать, что специфическое спаривание (оснований), постулированное нами, подразумевает наличие какого-то механизма копирования генетического материала»

Уотсон и Крик предположили, что для удвоения ДНК должны произойти разрыв водородных связей, удерживающих вместе спиральный дуплекс, и расхождение цепей.

Они также высказали мысль, что каждая цепь дуплекса служит матрицей при синтезе комплементарной цепи и в результате образуются две пары цепей, в каждой из которых только одна является родительской. Таков механизм точного воспроизведения последовательности нуклеотидных пар в двойной спирали (рисунок 1.15).



а – реальный полуконсервативный механизм; б – консервативный;
в- дисперсионный

Рисунок 1.14 – Модели репликации ДНК в теории.

Согласно модели, репликация всех двухцепочечных ДНК полуконсервативна. После одного раунда репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекул является родительской, т.е. консервативной, а другая – синтезированной заново.

Если геном представлен одноцепочечной ДНК (как в некоторых вирусах), то эта единственная цепь служит матрицей для образования комплементарной цепи, с которой она образует дуплекс, а затем на этом дуплексе синтезируются либо дочерние дуплексы, либо одноцепочечные копии одной из матричных цепей.

При репликации в особом участке двойной спирали ДНК происходит расплетание цепей (рисунок 1.16).

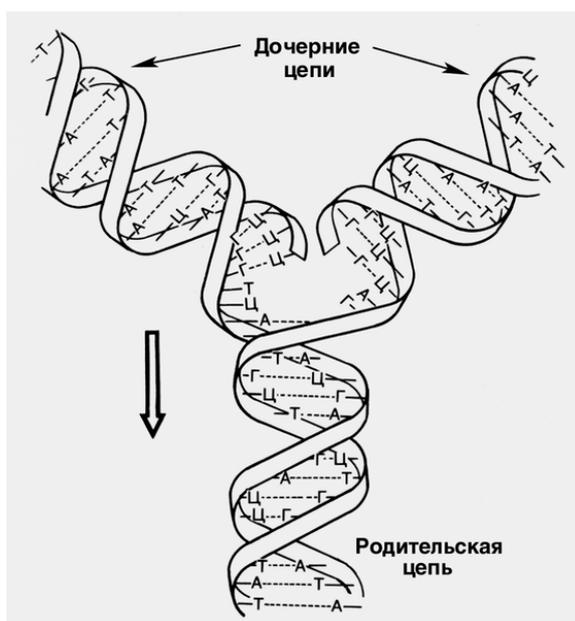


Рисунок 1.15 – Схема реплицирующей молекулы ДНК

В результате каждая цепь начинает функционировать как матрица, на которой синтезируется новая, комплементарная цепь. Таким образом, каждая из обеих образовавшихся дочерних спиралей получает одну цепь от родительской спирали, а другую - образованную в результате синтеза *de novo*.

Процесс репликации в действительности очень сложен и для его осуществления необходимо множество белков. Важнейшими из них являются ферменты, называемые ДНК-полимеразами. Их роль в репликации состоит в сборке полинуклеотидных цепей из отдельных моноклеотидов (дезокси-нуклеотидтрифосфатов). Все ДНК-полимеразы удлиняют полинуклеотидную цепь последовательным добавлением отдельных дезоксинуклеотидов.

Репликация ДНК состоит из следующих этапов:

1. Начало репликации (*origin*). Репликация ДНК начинается не в любой случайной точке молекулы, а в специфических местах, называемых точками начала репликации. Процесс копирования продолжается через образование репликативных вилок в одном или обоих направлениях до тех пор, пока ДНК полностью не удвоится.

2. Комплементарное копирование оснований, перенос дезоксинуклеотидов и лигирование ДНК при репликации:

Нуклеотидная последовательность матричной цепи задает порядок расположения нуклеотидов в новосинтезируемых цепях ДНК. Реакция присоединения нуклеотида обратима, но она смещена в сторону синтеза, поскольку неорганический фосфат в клетках быстро разрушается. Ферменты, катализирующие праймерзависимую, детерминированную ДНК-матрицей реакцию присоединения дезоксинуклеотидов, называются ДНК-полимеразами.

Гипотеза – механизм репликации ДНК заключается в непрерывном однонаправленном росте обеих цепей по мере передвижения репликативной вилки. В этом случае с учетом антипараллельности цепей в исходной ДНК, одна из дочерних цепей должна расти в направлении $5' \rightarrow 3'$, а другая - $3' \rightarrow 5'$. Однако все полимеразы обладают единым свойством – они способны синтезировать ДНК посредством присоединения последующего dNTP только к $3'$ концу уже имеющейся цепи, называемой праймером.

Вывод - цепи синтезируются в направлении $5' \rightarrow 3'$ и наращивание полинуклеотидов в другом направлении не происходит никогда.

Указанное противоречие разрешено в 1967г. Р. Оказаки в эксперименте – синтез одной цепи, называемой лидирующей происходит действительно непрерывно, а синтез другой – отстающей – фрагментарно, т.е. посредством образования фрагментов Оказаки. Лидирующая цепь растет от $5' \rightarrow 3'$ концу в направлении движения репликативной вилки и нуждается только о одном акте инициации. Рост отстающей цепи также идет в направлении $5' \rightarrow 3'$, но в направлении противоположном движению репликативной вилки. Синтез от-

стающей цепи иницируется многократно, в результате чего при импульсном копировании цепи ДНК образуется множество фрагментов Оказаки, которые должны впоследствии объединиться в непрерывную отстающую цепь. Эта реакция осуществляется ДНК-лигазами-ферментами, катализирующими ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе; ДНК-лигазы играют ключевую роль не только в репликации, но и в репарации повреждений и рекомбинации ДНК.

Механизмы инициации синтеза ведущей цепи в точке начала репликации и при инициации фрагментов Оказаки в отстающей цепи аналогичны, но имеются несколько отличий. В обоих случаях необходимо образование коротких РНК-праймеров, спаренных с матричной цепью ДНК и образующих свободную ОН' концевую группу.

Это характеризует второе базовое свойство всех ДНК-полимераз, которые не способны осуществлять синтез полинуклеотидов *de novo*, т.е. ДНК-полимеразы могут только удлинять уже существующие цепи, причем даже это они могут делать исключительно в присутствии цепи, играющей роль матрицы.

Синтез РНК-праймеров катализируется компонентом реплисомы – праймазой, в дальнейшем короткие РНК-вставки, служащие началом фрагмента Оказаки, замещаются участками ДНК под действием ДНК-полимеразы I.

В отличие от РНК, синтез которой иницируется РНК-репликазами и РНК-полимеразами, для инициации синтеза ДНК требуется затравка (праймер) В отличие от РНК, синтез которой иницируется РНК-репликазами и РНК-полимеразами, для инициации синтеза ДНК требуется затравка (праймер). Сначала синтезируются короткие РНК-праймеры, которые затем наращиваются в виде цепей ДНК. При переводе кольцевой одноцепочечной ДНК фага M13 в двухцепочечную репликативную форму для синтеза коротких сегментов РНК в точке начала репликации используется РНК-полимераза-холофермент.

При репликации других одноцепочечных кольцевых фаговых ДНК (G4) РНК-праймер синтезируется специальной РНК-полимеразой, называемой праймазой. У другого фага с одноцепочечной кольцевой ДНК (φX174) мультиферментный комплекс, содержащий от 15 до 20 полипептидных цепей (праймосома), активирует матричную цепь, в результате чего праймаза синтезирует РНК-затравку.

Репарация ДНК.

ДНК – это единственная макромолекула клетки, которая способна устранять (репарировать) повреждения, возникающие в ее структуре. В ней

закодирована информация о механизмах самых разнообразных репарационных процессов.

Изменения в структуре ДНК происходят под действием химических веществ, присутствующих в окружающей среде:

✓ алкилирующие агенты (например, азотистые соединения, алкилсульфонаты и нитрозомочевина), которые модифицируют предпочтительно гуаниновые остатки; соединения, встраивающиеся между соседними парами оснований и приводящие к появлению вставок и делеций во время репликации;

✓ бифункциональные агенты, способные образовывать ковалентные сшивки между двумя цепями ДНК и блокировать их расхождение при репликации.

При физическом воздействии:

❖ поглощение тиминным или цитозинным основанием ультрафиолетового света может приводить к образованию циклобутановых димеров между соседними пиримидинами

❖ под действием ионизирующей радиации, например космических лучей, могут образовываться высокорекреационноспособные свободные радикалы, оказывающие на ДНК самые разнообразные воздействия;

❖ при облучении рентгеновскими лучами в медицинских целях в ДНК могут возникать одно- и двухцепочечные разрывы, а также другие повреждения, характерные для воздействия на ДНК свободных радикалов.

Правило комплементарности обеспечивает большую надежность процесса копирования.

Комплементарное спаривание лежит в основе не только репликации ДНК, но и процесса восстановления исходной структуры ДНК при репарации повреждений, затрагивающих остов молекулы, модификаций того или иного основания или ошибочного спаривания при рекомбинации.

Одновременное повреждение обеих цепей в одном месте и двухцепочечные разрывы часто оказываются летальными для ДНК, поскольку такие дефекты репарируются лишь в редких случаях

Из-за случайных флуктуации в структуре присоединяемых оснований и оснований, входящих в состав матричной цепи, могут происходить ошибочное спаривание и включение неправильных нуклеотидов. При включении неправильного нуклеотида дальнейший рост цепи обычно останавливается.

Известны два основных типа репарационных процессов:

1. непосредственное исправление модификаций или неправильных спариваний, не требующее репликации для восстановления исходной структуры;

2. удаление нуклеотидов, окружающих ошибочно спаренные или измененные пары оснований, и ресинтез этого участка путем репликации.

Транскрипция.

Транскрипция – передача информации о нуклеотидной последовательности ДНК на уровень РНК – процесс, ответственный за синтез всех типов клеточных РНК как у про-, так и у эукариот.

Двухцепочечная молекула ДНК – это физиологическая матрица для синтеза всех клеточных РНК. Если геном, как у некоторых вирусов, представлен одноцепочечной ДНК, последняя перед транскрипцией обязательно переходит в двухцепочечную репликативную форму.

Транскрибируемая может быть любая из двух цепей геномной ДНК, однако матрицей при транскрипции отдельного гена обычно служит только какая-то одна из них. В основе механизма копирования при транскрипции лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований, что и при репликации.

Транскрипция идет от начала транскрипционной единицы до ее конца, она осуществляется ферментами РНК-полимеразами синтезирующими РНК на ДНК-матрице из рибонуклеозидтрифосфатов с участием многочисленных факторов транскрипции - регуляторных белков, осуществляющих высокоспецифические белок-белковые и белково-нуклеиновые взаимодействия. Синтез молекул РНК начинается в определенных местах ДНК, называемых промоторами и завершается в терминаторах.

Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции – транскриптон. В пределах каждого транскриптона копируется только одна из двух нитей ДНК, которая называется значащей или матричной. Во всех транскриптонах, считываемых в одном направлении, значащей является одна нить ДНК; в транскриптонах, считываемых в противоположном направлении, значащей является другая нить ДНК. Соседние транскриптоны могут быть отделены друг от друга нетранскрибируемыми участками ДНК, а могут и перекрываться, в частности так, что в пределах участка перекрывания матричными оказываются обе нити. Разбиение ДНК на множество транскриптонов обеспечивает возможность независимого считывания разных генов, их индивидуального включения и выключения.

У эукариот в состав транскриптона, как правило, входит только один ген. Термины "транскрипционная единица" или "транскриптон" по смыслу близки термину "ген", но они не всегда совпадают. Транскрипционные единицы прокариот, как правило, заключают в себе генетическую информацию нескольких генов и называются оперонами. Продуктами транскрипции опе-

ронов являются полицистронные мРНК, в результате трансляции которых рибосомами образуется несколько белков. Белки, кодируемые полицистронными мРНК, обычно функционально связаны друг с другом и обеспечивают протекание какого-либо метаболического процесса, например, биосинтеза определенной аминокислоты или утилизацию углеводов в качестве источника углерода. Организация генов в виде оперонов облегчает координированную регуляцию их экспрессии на уровне транскрипции.

Чтобы могло происходить комплементарное спаривание каждого следующего нуклеозидтрифосфата с матричным транскрибируемым основанием, спираль ДНК во время транскрипции должна раскручиваться с помощью ДНК-полимеразы. РНК-полимеразы катализируют реакцию присоединения 3'-ОН-группы нуклеотида, находящегося на растущем конце цепи, к а-фосфату следующего рибонуклеозид-5'-трифосфата. Многократное повторение этой реакции приводит к постепенному удлинению цепи РНК.

Согласованная регуляция транскрипции многих генов, не образующих одного оперона, чаще всего осуществляется специфическими белками-регуляторами, которые взаимодействуют с гомологичными регуляторными нуклеотидными последовательностями, маркирующими гены данной группы. Первичный РНК-транскрипт, или про-мРНК, синтезированный на транскрипционной единице, в большинстве случаев длиннее, чем последовательность нуклеотидов, соответствующая конечному продукту (полипептиду, тРНК, рРНК).

У эукариот первичный транскрипт (молекулярная масса от 10^6 до $1.5 \cdot 10^7$) может быть в 10 раз длиннее, чем мРНК, поступающая для трансляции.

Отличие транскрипции от репликации:

Транскрипция – процесс консервативный, в котором сохраняется двойная спираль ДНК, а синтезированная цепь РНК отделяется. Транскрипция у эукариот происходит в клеточном ядре, а последующая трансляция – в цитоплазме на рибосомах. Репликация ДНК полуконсервативна, поскольку обе цепи исходного дуплекса распределяются по двум дочерним спиральям.

Кроме этого, существенное различие между репликацией и транскрипцией ДНК состоит в том, что репликация не может начаться без затравки-прайма, а инициация синтеза РНК с помощью РНК-полимеразы происходит, начинаясь с рибонуклеозидтрифосфата, соответствующего первому нуклеотиду в цепи РНК.

Процессинг.

РНК-транскрипт в форме рибонуклеопротеиновых частиц попадает в цитоплазму и претерпевает ряд изменений, которые называют посттранскрипционными процессами или процессингом.

При процессинге к нему сначала присоединяются колпачок и poly(A), а затем в результате многократного сплайсинга он укорачивается, и одновременно происходит внутреннее метилирование с образованием 6-метиладенозина. Про-мРНК и мРНК всегда соединены ионными связями с белками и образуют рибонуклеопротеиновые частицы.

Зрелая мРНК эукариот наряду с основной последовательностью нуклеотидов, в которой закодирована информация о последовательности аминокислот в соответствующем белке, содержит целый ряд некодирующих последовательностей, присутствие которых необходимо для ее трансляции рибосомами. Эти последовательности часто содержат регуляторные сигналы, обеспечивающие определенный уровень трансляции мРНК рибосомами.

Участок мРНК, расположенный между кэп-группой и первым инициирующим кодоном основной открытой рамки считывания (ОРС), которая и несет информацию о последовательности аминокислот в белке, получил название (5'UTR - 5' untranslated region), или лидерной последовательности.

Ее функции: она включает в себя регуляторные последовательности, распознаваемые трансдействующими белковыми факторами и обеспечивает регулируемую трансляцию мРНК (и координированную экспрессию соответствующих генов) в онтогенезе многоклеточных организмов.

Сегмент мРНК, расположенный между последним терминирующим кодоном основной ОРС и началом поли(А)- последовательности, называют (3'UTR).

Последовательности 5'UTR, как правило, способны образовывать сложные вторичные структуры типа "стебель-петля" и содержать, которые оказывают сильное влияние на эффективность трансляции мРНК. 3'UTR оказывает влияние на состояние рибосом после терминации синтеза полипептидных цепей и участвует в инициации трансляции.

Трансляция.

Процесс трансляции последовательности нуклеотидов матричной РНК в белковую цепь очень сложен и состоит из множества повторяющихся этапов.

Ключевой момент трансляции – перевод генетической информации, закодированной в триплетных кодонах матричной РНК, в специфические аминокислоты – зависит от комплементарного спаривания оснований.

Каждая аминокислота присоединяется к особой, родственной ей транспортной РНК (тРНК), содержащей триплет (антикодон), комплементарный кодоновому триплету в матричной РНК.

Благодаря спариванию оснований между кодоном мРНК и антикодоном тРНК нужная аминокислота занимает свое место в растущей полипептидной цепи. За один цикл перемещения рибосомы по всей длине молекулы мРНК, кодирующей данный белок, образуется одна молекула этого белка.

Имеются три «рамки считывания», при которых может осуществляться перевод последовательных нуклеотидных триплетов мРНК в аминокислоты. Выбор рамки считывания зависит от того, какое сочетание из трех последовательных нуклеотидов выбрано в качестве первого кодона. Обычно аминокислотной последовательности кодируемой полипептидной цепи соответствует только одна из рамок. У всех организмов, изученных к настоящему времени – бактерий, вирусов и эукариот - правильная рамка считывания определяется с помощью механизма, распознающего специфический кодон, который детерминирует концевую аминокислоту синтезируемого белка.

Почти всегда таким кодоном является триплет А1Ю, отвечающий метионину. Образующийся полипептид неизменно содержит на 1-конце метионин, но при последующем удалении аминоконцевой последовательности на М-конце конечного белкового продукта оказывается аминокислота, находящаяся изначально внутри синтезированной полипептидной последовательности.

Основными участниками процесса считывания информации, закодированной в последовательности мРНК, являются аминоацил-тРНК - синтетазы, тРНК, рибосомы, белки, связанные с рибосомами, и некоторые другие белки. Они ответственны за инициацию, элонгацию и терминацию сборки полипептида. Последовательное спаривание разных аминоацил-тРНК с кодонами мРНК и рост полипептидной цепи осуществляются с помощью целой серии взаимно согласованных реакций

Функционирование тРНК при трансляции сводится к двум уникальным процессам:

1. присоединение аминокислоты к 3'-концу родственной тРНК с помощью специфической аминоацил-г РНК –синтетазы;
2. специфическое связывание аминоацил-тРНК с соответствующим кодоном мРНК, находящейся в комплексе с рибосомой.

Ключевая особенность обеих реакций – специфичность, поскольку сбой в образовании аминоацил-тРНК или связывании аминоацил-тРНК с соответствующим кодоном приведут к ошибкам в экспрессии генов.

Рибосомы, несущие особую инициаторную метионил-тРНК, находят инициаторный кодон в мРНК, АиС, и связываются с ним. С рибосомой связывается аминоксил-тРНК, соответствующая второму кодону, и при участии рибосомной ферментативной активности остаток метионина соединяется со второй аминокислотой, все еще связанной со «своей» тРНК. В результате образуется дипептидил-тРНК. По мере продвижения рибосомы по цепи мРНК и считывания каждого последующего кодона полипептидная цепь удлиняется на одну аминокислоту за один шаг.

Элонгация прекращается в тот момент, когда рибосома достигает одного из трех терминирующих кодонов. Завершенная полипептидная цепь тотчас же высвобождает последнюю тРНК, и происходит разделение рибосомы и мРНК.

Список литературных источников:

1. Аппель Б., Бенке И., Бенсон Я., Нуклеиновые кислоты от А до Я / под ред. С. Мюллер. – М.: Бином, 2012. – 352 с.
2. Бартон Д., Оллис У.Д. Общая органическая химия / Д. Бартон, У.Д. Оллис. – М.: Химия, 1986. – Т. 10. – 704 с.
3. Бокуть С.Б., Герасимосвич Н.В., Милютин А.А. Молекулярная биология: молекулярные механизмы хранения, воспроизведения и реализации генетической информации: учебн. пособие / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимосвич, А.А. Милютин. – Мн.: Выш. шк., 2005. – 463 с.
4. Ферменты и нуклеиновые кислоты / Под ред. С. Н. Лызловой, В. Г. Владимирова. – СПб:СПбГУ, 1997. – 151 с.
5. Drew H.R., Dickerson R.E. Conformation and dynamics in a Z-DNA tetramer / H.R. Drew, R.E. Dickerson // J Mol Biol. 1981. – Vol. 152(4) – P. 723–736/
6. Molecular Biology of the Cell (4th ed.) / B. Alberts [et al.] // New York NY: Garland Science, 2002 – 704 p.
7. Polymorphism of DNA double helices / A.G. Leslie [et al.] // J Mol Biol. 1980. – Vol. 143(1). – P. 49–72.
8. Tateishi-Karimata H., Sugimoto N. Structure, stability and behaviour of nucleic acids in ionic liquids / H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42(14). – P. 8831-44.
9. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA / R.E. Dickerson [et al.] // Science, 1982. - Vol. 216 – P. 475–85.

ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Этап, предшествующий непосредственно исследованию нуклеиновых кислот – выделение ДНК (РНК) из биологического материала.

Для выделения ДНК (РНК) из клеток их необходимо предварительно лизировать. Пробоподготовка проводится также для удаления из полученного материала ингибиторов Таq-ДНК-полимеразы (гемоглобина и др.) и различных РНКаз. Обработка проб проводится в микроцентрифужных пробирках типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Время обработки в зависимости от метода доходит до 3–4 ч. Выбор метода обработки зависит как от вида возбудителя, так и от вида клинического материала.

Разработан ряд методов для выделения ДНК (РНК) (рисунок 2.1).

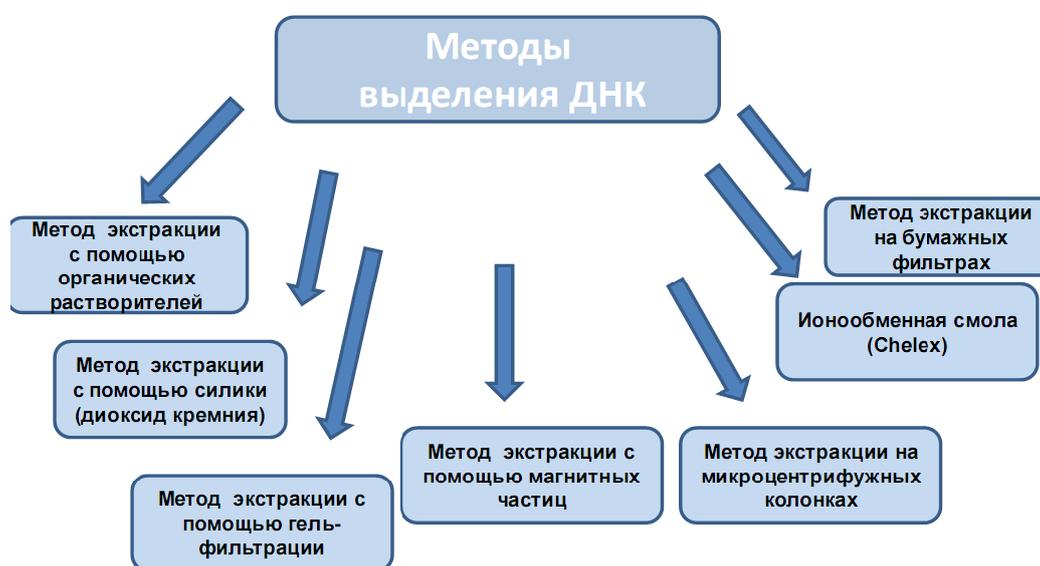


Рисунок 2.1 – Методы выделения ДНК

В ходе выделения нуклеиновых кислот проводят несколько этапов:

1. лизис клеточной и ядерной мембран;
2. удаление ингибиторов и нуклеаз из раствора;
3. отмывка нуклеиновых кислот от клеточной массы;
4. очистка и концентрирование нуклеиновых кислот.

Процедура лизиса может выполняться:

- ✓ механически (измельчение в ступке или с применением ультразвука);
- ✓ химически (применение детергентов, хаотропных агентов – мочевины, гуанидинтиоцитрат);
- ✓ ферментативно (протеиназа К).

После процедуры лизиса, удаление клеточной массы может быть выполнено с применением методов фильтрации или осаждения (центрифугирования).

2.1. Метод выделения ДНК (РНК) с помощью фенольно-спиртовой депротенизации

Данный метод получил широкое распространение, и его модификации используются в качестве основных способов экстракции ДНК (РНК).

Реактивы.

Гуанидинизотиоцианат.

0,1 М Трис-НСI буфер с рН 6,4.

0,2 М раствор ЭДТА с рН 8,0.

Тритон XI00.

Суспензия сорбента: 60 г оксида кремния (SiO_2) суспендируют в 500 мл дистиллированной воды, оставляют на 24 ч при комнатной температуре. Удаляют 440 мл надосадочной жидкости и вносят в колбу 500 мл деионизированной дистиллированной воды, энергично встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 5 ч. Удаляют 440 мл надосадочной жидкости и вносят в колбу 0,6 мл соляной кислоты (32% вес/объем) для доведения рН до 2,0.

Отмывающий раствор: 120 г гуанидинизотиоцианата растворяют в 100 мл 0,1 М трис-НСI буфера с рН 6,4.

Элюирующий буфер: 10 мМ трис-НСI –1 мМ ЭДТА (рН 8,0).

Фенол.

Ход выполнения.

В пробирки «Эппендорф» вносят 0,9 мл лизирующего буферного раствора, 22 мл 0,2 М раствора ЭДТА, 2,6 г Тритона X 100 и 40 мкл суспензии сорбента, встряхивают на вортексе и прибавляют 50 мкл крови, сыворотки или мочи. Встряхивают на вортексе 5 с, оставляют при комнатной температуре на 15 мин, вновь встряхивают на вортексе 5 с и центрифугируют 15 с при 12 000 об./мин. Супернатант удаляют, осадок сорбента отмывают дважды, сначала 90-100% этанол, изопропанол, а затем 2 раза 70% этанолом (все промывающие жидкости вносят в пробирку в объеме 0,5 мл). Затем пробирки с открытыми колпачками прогревают в течение 10 мин при 56°C в микротермостате. К высушенным осадкам добавляют 50–75 мкл элюирующего буфера. При экстракции РНК добавляют ингибиторы РНКаз. Пробирки закрывают крышками и недолго встряхивают на вортексе, инкубируют при 56°C в течение 10 мин, вновь встряхивают на вортексе и центрифугируют 2 мин при 12 000 об./мин. Супернатант содержит ДНК и РНК и пригоден для амплификации.

При выделении ДНК/РНК с использованием данной методики, получают раствор ДНК/РНК хорошего качества и высокой концентрации. Также необходимо отметить, что данный метод применим ко многим объектам исследования, выделенные нуклеиновые кислоты стабильны и хорошо хранятся. Однако, используемые в ходе выполнения методики реактивы очень токсичны, сама методика достаточно трудоемка и занимает много времени.

2.2. Выделение ДНК (РНК) путем гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции

Метод применяется для выделения клеточной мРНК, вирусных ДНК и РНК, в настоящее время он упрощен благодаря комбинации денатурирующего агента (гуанидинтиоцианата) и фенола в одном растворе. В пробирку «Эппендорф» помещают 3 мкл носителя нуклеиновых кислот. Затем добавляют 900 мкл денатурирующего раствора и через 15 мин – 200 мкл хлороформа. Центрифугируют 12 000 об./мин в течение 5 мин. Полученный супернатант переносят в другую пробирку с 700 мкл изопропанола, оставляя растворы на 15 мин при комнатной температуре. Затем пробу центрифугируют 10 мин при 12 000 об./мин, удаляют супернатант и осадок обмывают 0,5 мл 70% этанола. Центрифугируют 5 мин при 12 000 об./мин и удаляют супернатант. Высушивают полученный осадок, а затем растворяют в 30 мкл буфера для растворения. Оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем перемешивают и центрифугируют 5–10 с. Фирма «Sigma» (США) предложила вместо хлороформа, который является высокотоксичным веществом, использовать 1-бром-3-хлоропропан, не уступающий по своим свойствам, но значительно менее опасный.

Однопробирочный метод выделения ДНК (РНК) – (лизирующий раствор, изопропанол, буфер)

Является модифицированной методикой прямого осаждения вирусной ДНК- Основными достоинствами метода являются простота, быстрота и отсутствие переносов из пробирки в пробирку, а также одновременное выделение ДНК и РНК всех вирусов.

Объем плазмы, обрабатываемой данным методом, ограничен только емкостью пробирки для центрифугирования, которая для высокоскоростных лабораторных настольных центрифуг составляет 1,5 мл.

В пробирку типа «Эппендорф» добавляют 3 мкл РНК-носителя, 550 мкл лизирующего раствора и 200 мкл исследуемого материала и инкубируют 15 мин при 60°C. К полученному лизату добавляют 750 мкл изопропанола и 15 мин выдерживают при комнатной температуре. Центрифугируют 10 мин при 12 000 об./мин, затем супернатант удаляют. Обмывают осадок 0,5 мл промывочного раствора и центрифугируют 10 мин при 12 000

об./мин. Супернатант удаляют. Осадок высушивают на воздухе и добавляют к нему смесь, состоящую из 31 мкл буфера для растворения и 0,2 мкл ингибитора рибонуклеаз (RNAsin, 40 МЕ/мл). Смесь перемешивают, сохраняют 15 мин при комнатной температуре, центрифугируют 1 мин при 12 000 об./мин и используют для амплификации только жидкую фазу.

2.3. Метод выделения ДНК (РНК) на колонках со специальными фильтрами.

Метод работает по схеме – сорбция РНК из лизата – промывание – элюция, при этом метод осуществляется на колонках со специальными фильтрами (Например, колонки Qiagen, Ambion и др.).

При использовании набора Recover All Total Nucleic acid isolation kit (Ambion) для выделения РНК необходимо провести следующие этапы:

1. Разрушение протеаз путем добавления к пробе соответствующих объемов буферного раствора и протеаз. После перемешивания пробы прогревают 15 мин при 50°C, а затем 15 мин при 80°C (затягивание прогрева при 80°C более чем на 2 мин может привести к деградации РНК).

2. Выделение РНК, для чего к пробе добавляют изолирующий агент и этанол. Далее для каждого образца собирают отдельную колоночную систему включающую Filter Cartridge и Collection tubes. В колонки вносят до 700 µL образца, закрывают крышку и центрифугируют при 10 000 об/мин 30 с, чтобы жидкость прошла через фильтр. Жидкость из Collection tubes удаляют и вставляют Filter Cartridge обратно. Если необходимо (в пробирке еще осталась часть пробы), процедуру повторяют еще раз. Далее следет ряд отмывок с применением отмывочных растворов. После чего, колонки центрифугируют при 10 000 об/мин 30 с, чтобы подсушить фильтр.

3. На следующем этапе проводят разрушение нуклеаз и окончательную очистку РНК. Для этого на фильтр в колонки вносят DNase mix, включающий 10X DNase buffer, DNase и Nuclease-free water. Закрытые колонки с образцами инкубируют 30 мин при комнатной температуре (22-25°C). Далее проводят ряд отмывок путем внесения в колонку отмывочных растворов. После чего, колонки центрифугируют при 10 000 об/мин 30 с, чтобы подсушить фильтр. Далее Filter Cartridge помещают в новые чистые Collection tubes, вносят раствор для элюции или Nuclease-free water на центр Filter Cartridge., закрывают крышку и инкубируют образцы 1 мин при комнатной температуре.

Образцы центрифугируют 1 мин на максимальной скорости (14 000 об/мин), элюат содержит РНК, хранить полученный раствор необходимо при -20°C или ниже.

2.4. Метод выделения ДНК, предложенный R.Boom et al. (1990)

Лизис клеток с помощью сильного хаотропного агента гуанидина тиоционата (GuSCN), сорбция ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и др.)

Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Недостатки метода:

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.

Даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов.

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.

2.5. Метод сорбции на силикагеле

Метод предполагает лизис клеток в концентрированном растворе гуанидин тиоционата, кроме этого обеспечивается сорбция ДНК или РНК на частицах силикагеля в суспензии. Далее после ряда промывок и центрифугирования суммарная нуклеиновая кислота элюируется с высушенного силикагеля водой или слабосолевым буфером. Сорбентный метод выделения ДНК в различных модификациях являлся наиболее распространённым и предпочтительным для ПЦР-диагностики.

Преимуществами такого подхода являются:

- ✓ возможность длительного хранения пробы в замороженном состоянии, поскольку ДНК сорбируется на носителе и лизис клеток при оттаивании проб не оказывает особого влияния на получаемый результат;
- ✓ удаление в процессе выделения ДНК некоторых ингибиторов ДНК-полимеразы;
- ✓ возможность автоматизации процесса;
- ✓ быстрота и простота выполнения методики.

К недостаткам данной методики можно отнести потери ДНК в процессе выделения, а также сложность работы с малым количеством биологического материала.

2.6. Выделение нуклеиновых кислот с применением магнитных частиц

Данные методики основаны на внесении в образец после лизиса клеток магнитных шариков, которые сорбируют ДНК. После отмывки клеточ-

ных флементов и ингибиторов ДНК элюируют. Использование данной методики предполагает наличие не только наборов реагентов содержащих магнитные частицы, но также и магнитных штативов, используемых при проведении процедуры выделения нуклеиновых кислот, либо приборов для автоматической экстракции, которые работают на основе данной технологии.

Примером выделения нуклеиновых кислот с применением магнитных чатиц является наборы ЗАО «ВеторБест» (РФ), ЗАО «Силекс», приборы MagMAX™ Express Magnetic Particle Processors (Applied Biosystems), NucliSENS miniMAG и NucliSENS easyMAG (bioMérieux).

Выделение нуклеиновых кислот из биопроб с использованием набора реагентов «Экстракция 100» ЗАО «ВекторБест»

В пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО и 100 мкл анализируемых образца (для увеличения чувствительности можно использовать 200 мкл исследуемого образца). В пробирку добавить 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин в течение 10 мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок. В случае, если образец лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок. В пробирку с анализируемым образцом внести 400 мкл осадителя нуклеиновых кислот. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать в течение 5 мин при 13000 об/мин при комнатной температуре. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или аспиратором) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

В пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирки на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Не взбалтывая осадок, установить пробирку в магнитный штатив. Удалить надосадочную не задевая осадок. К осадку в пробирке добавить 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать 2 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге. Установить пробирку в магнитный штатив. Удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок.

Высушить осадок в открытой пробирке при комнатной температуре (18–25) °С в течение 2-3 мин. К осадку добавить элюирующий раствор. Если из выделенной биопробы будет производиться от 1 до 3 определений возбудителей инфекций следует добавить 200 мкл элюирующего раствора. Если определений будет производиться больше – добавить 600 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере при 65 °С с частотой вращения 1300

об/мин в течение 5 мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин 1 мин.

Пробы готовы к постановке ПЦР или ОТ-ПЦР-анализа.

2.7. Ионообменные технологии

Метод экстракции нуклеиновых кислот, основанный на использовании хелатообразующих смол, которые имеют высокую афинность к поливалентным ионам металлов. Связывание ионов металлов (например ионов магния) в пробе, приводит к ингибированию нуклеаз, что предотвращает дегградацию ДНК. При использовании ионообменников типа Chlex 100 (США) в пробирку с образцом добавляют смолу Chlex, инкубируют, прогревают при 56°C и 100°C, центрифугируют. Полученный супернатант содержит выделенную ДНК.

Метод привлекателен простотой исполнения. В большинстве случаев пригоден для работы с клиническим материалом. Однако, иногда встречаются образцы с такими примесями, которые невозможно удалить с помощью ионообменников.

2.8. Метод минипулов

В последние годы для подготовки материала к амплификации многими зарубежными и некоторыми отечественными центрами по переливанию крови предложен метод минипулов. Этот метод применяется в банках крови ряда стран Европы в течение двух последних лет и хорошо зарекомендовал себя для скрининговых исследований донорской крови на ВИЧ, гепатиты В, С. По сути ручной метод представляет собой сбор нескольких (до 10) аликвот в одну пробирку – пулы первого уровня. Из пулов первого уровня подобным образом готовят пулы второго уровня и т. д. После чего проводят пробоподготовку с целью выделения ДНК (РНК). Метод минипулов можно использовать и в автоматическом режиме с применением специальных приборов, осуществляющих приготовление аликвот исследуемых образцов плазмы. Детальное описание ручного метода минипулов представлено в методическом пособии Н. А. Федорова с соавт. Метод также используется и при скрининговых исследованиях в широкопрофильных лечебных учреждениях для диагностики туберкулеза, гепатитов В и С.

2.9. Метод концентрирования материала

Целесообразно метод минипулов совмещать с методами концентрирования возбудителя в приготовленном минипуле для более эффективного осаждения клеток и материала или использовать его в качестве отдельного метода перед подготовкой образцов к выделению ДНК (РНК). Рекомендуют использовать ультрацентрифугирование при 12 000 об./мин в течение 15 мин или 8000 об./мин в течение 30 мин в случаях использования однородного биологического материала и приготовление суспензии в случаях применения неоднородного материала.

Хроматографические методы очистки ДНК

Принципиально отличный подход, применяемый для очистки исследуемых в ПЦР образцов от нежелательных примесей, основан на использовании приемов хроматографии и различных нуклеосорбентов.

D.M.Olive et all. (1989) использовали для этой цели колонку производства Molecular Biosystem. Inc., на которой очищали образцы стула, предварительно лизированные в буфере с протеиназой К

При помощи приемов хроматографии Y-L.Tsai et all. (1993) успешно очищали образцы почвы и сточных вод от ингибирующих ПЦР веществ и детектировали штаммы кишечной палочки.

Главные преимущества всей этой группы методов:

- относительная простота;
- достаточно высокая эффективность;
- легкость стандартизации методик.

2.10. Выделение ДНК человека

Собирают от 5 до 20 мл венозной крови в стерильную пробирку с раствором, препятствующим коагуляции (глюгициром или гепарином), отделяют лейкоциты. Разрушают клеточные и ядерные мембраны добавлением буферных растворов, содержащих денатурирующие агенты (наилучшие результаты при выделении ДНК дает применение протеиназы К с последующей фенол-хлороформной экстракцией разрушенных белков). ДНК осаждают в этаноле и растворяют в буферном растворе.

2.11. Аппаратное обеспечение экстракции нуклеиновых кислот

Для подготовки материала необходимо минимальное аппаратное обеспечение: вортекс – для перемешивания материала; микроцентрифуга, развивающая скорость до 14 000 об./мин; термостат для пробирок типа «Эппендорф» объемом 0,2-1,5мл с возможностью изменения температуры от +20

до +99°C или водяную баню, вортекс, аспиратор, набор дозаторов переменного объема.

2.12. Наборы реактивов для пробоподготовки (выделения ДНК/РНК)

Для проведения этапа пробоподготовки большинство лабораторий использует коммерческие наборы для выделения ДНК/РНК. Многие зарубежные и отечественные компании производят наборы, укомплектованные всеми необходимыми реагентами и подробной инструкцией для экстракции нуклеиновых кислот из различных видов биологического материала. Эффективность выделения ДНК/РНК с применением наборов различных фирм-производителей варьирует, потери ДНК/РНК могут составлять до 50%, что негативно сказывается на чувствительности метода ПЦР в целом.

На начальном этапе отработки методики ПЦР, целесообразным является использование для этапа пробоподготовки нескольких наборов одновременно для одних и тех же биологических образцов, и сравнение конечных результатов ПЦР. Таким образом, можно определить тот набор реагентов, который будет наиболее оптимально подходить для работы в конкретной лаборатории, оснащенной тем или иным оборудованием.

Среди коммерческих наборов для экстракции нуклеиновых кислот из биологического материала в нашей стране используют:

2.13. Оценка качества экстрагированной ДНК

Оценку качества экстрагированной ДНК проводят спекрофотометрически на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения.

Чистые образцы ДНК:

$$A(260)/A(280) > 1,8$$

где $A(260)$ и $A(280)$ - оптическая плотность раствора при длине волны 260 и 280 нм, соответственно.

Если полученные цифры не укладываются в номотив, процедуру очистки необходимо повторять, так как для успешного использования и хранения ДНК белки должны быть полностью удалены.

Список литературных источников:

1. Гудер В., Бютнер Й. Клиническая химия в лабораторной медицине Европы: прошлое, настоящее, будущее // Клини. лаб. диагностика. –1998. – № 10. – С. 35–40.
2. Дубинина И. Г. Использование метода полимеразной цепной реакции в клинико-диагностических лабораториях // Лаборатория. – 1996. – №4. – С. 3–6.
3. ЗАО «ВекторБест» [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.vector-best.ru>
4. Компания Ambion (Life Technologies) [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.lifetechnologies.com>
5. Компания Applied Biosystems [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.appliedbiosystems.com>
6. Компания bioMérieux [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.biomerieux.com>
7. Компания Chelix [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.chelix.com>
8. Компания QIAGEN [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.qiagen.com>
9. Федоров Н.А., Суханов Ю. С, Асади-Мобархан А.Х., Артемьев М. И. Полимеразная цепная реакция (ПЦР): принципы и практические рекомендации. – М., 1996. – 34 с.
10. Ферменты и нуклеиновые кислоты / Под ред. С. Н. Лызловой, В. Г. Владимирова. – СПб:СПбГУ, 1997. – 151 с.
11. Щербо С. Н. ДНК и РНК-технологии в современной лабораторной диагностике. // Лабораторная медицина. – 1998. – № 1. – С. 81–83.
12. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M. M. M., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol.28, №3, – P. 495–503.
13. Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanat-phenol-chloroform extraction // Analit. Bio-chem. – 1987. – Vol.11, №2. – P. 156–159.
14. Ishizawa M., Kobayashi Y., Miyandira T., Matsuura S. Single procedure of DNA isolation human serum// Nucleic Acids Res. –1991. – Vol. 19, №20. – P. 5792.
15. Newton C.R., Graham A. PCR / Newton C.R., Graham A. // Springer Verlag, 1997. – 148 p.

ГЛАВА 3 КЛАССИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В основе всех процессов, которые протекают в ходе исследования нуклеиновых кислот, лежат естественные свойства ДНК/РНК, такие как способность к комплементарному взаимодействию, денатурация/ ренатурация. Во многих реакциях исследования нуклеиновых кислот участвуют ферменты, которые контролируют изменение нуклеиновых кислот. Основные ферменты, которые обеспечивают изменения нуклеиновых кислот: ДНК-полимеразы и рестриктазы.

3.1. ДНК-полимеразы

В бактериальных клетках, и в клетках эукариот содержатся различные формы ДНК-полимераз (в клетках эукариот репликацию осуществляет ДНК-полимераза α , а в клетках *E.coli* - ДНК-полимераза III). Все ДНК-полимеразы обладают синтезирующей активностью и способны удлинять цепи ДНК в направлении 5'-3', последовательно прибавляя по одному нуклеотиду к 3'-ОН-концу цепи. Точность синтеза определяется специфичностью спаривания оснований.

Для работы ДНК-полимераз необходимы:

- ❖ однонитевая матричная ДНК с двухнитевым участком на 3'-конце молекулы;
- ❖ в среде должны присутствовать четыре типа дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP: dATP, dCTP, dGTP и dTTP) - молекул, состоящих из основания - А, С, G или Т, сахара - дезоксирибозы (d) и трех (Т) фосфатных остатков (Р).
- ❖ ДНК-полимеразы обладают различными видами активности, в том числе и экзонуклеазной в направлении 3'-5', что позволяет им исправлять - репарировать - дефекты, допущенные при подборе комплементарных оснований. ДНК-полимераза I *E.coli* способна инициировать репликацию в месте разрыва ДНК и замещать гомологичный участок в двойной цепи ДНК. Это свойство используется для введения в ДНК меченых нуклеотидов (метод никтрансляции).

3.2 Рестриктазы

Открытие бактериальных ферментов, обладающих эндонуклеазной активностью, - рестрикционных эндонуклеаз, или рестриктаз, значительно продвинуло исследование структуры ДНК и расширило возможности генно-инженерного манипулирования с молекулами ДНК. *In vivo* эти ферменты участвуют в системе распознавания и защиты «своих» и уничтожения чужеродных ДНК. В зависимости от частоты встречаемости сайтов рестрикции в молекуле ДНК различают три класса рестриктаз: частощепящие, среднещепящие и редкощепящие.

Рестриктазы, узнающие длинные специфические последовательности (8-12 п.о.) – редкощепящими (*Not*1); Рестриктазы узнающие короткие последовательности - (4-5 п.о.) - частощепящими (*Taq*1, *Eco*R1). Сайты рестрикции могут быть использованы в качестве генетических маркеров ДНК.

Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть упорядочены исходя из молекулярной массы полученных фрагментов, путем электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Определение молекулярной массы фрагментов позволяет установить физическое расстояние между сайтами рестрикции. Обычным методом выявления ДНК или РНК в геле является их специфическое окрашивание, чаще всего бромидом этидия, что обеспечивает специфическое окрашивание мест локализации ДНК при наблюдении в проходящем свете ультрафиолетовой области спектра.

3.3.Рестрикционное картирование.

При использовании для рестрикции нескольких эндонуклеаз с последующим электрофоретическим анализом перекрывающихся аддитивных по длине фрагментов ДНК, можно добиться полного упорядочивания сайтов узнавания для каждого из ферментов относительно друг друга и каких-то иных маркеров, присутствующих в исследуемой молекуле ДНК. Этот процесс называется физическим картированием и является обязательным элементом анализа плазмидных, вирусных, бактериальных ДНК и относительно небольших фрагментов ДНК эукариот. Простейший пример картирования в том случае, когда в исследуемой молекуле ДНК присутствуют два сайта рестрикции – по одному для каждой из двух эндонуклеаз (рисунок 3.1).

После обработки исходной ДНК отдельно каждой из рестриктаз образуются два фрагмента, соответствующих по длине расстоянию от концов молекулы ДНК до сайтов рестрикции.

При совместной обработке обеими эндонуклеазами на электрофореграмме появляется новый фрагмент, размер которого соответствует расстоянию между сайтами рестрикции.

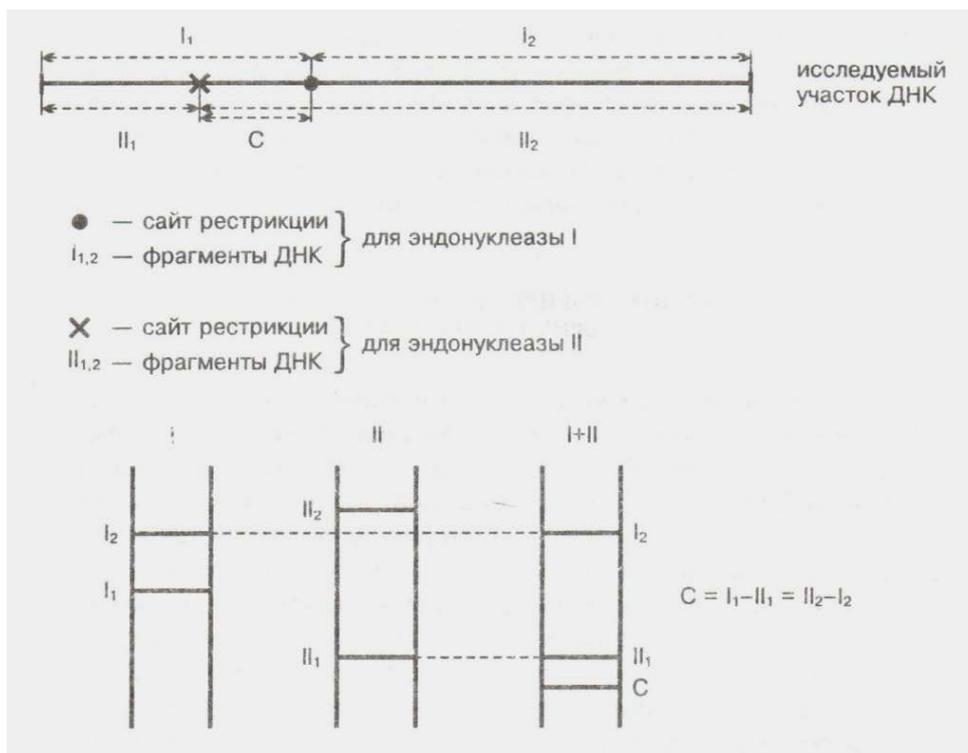


Рисунок 3.1 – Рестрикционное картирование

Достаточно знать расположение хотя бы одного маркера для того, чтобы произвести точное физическое картирование исходной молекулы ДНК независимо от количества локализованных в ней сайтов рестрикции.

При обработке тотальной геномной эукариотической ДНК, (например ДНК человека) часто- или среднещепящими эндонуклеазами образуется так много фрагментов различной длины, что не удается визуально идентифицировать отдельные фрагменты ДНК на электрофореграмме.

После электрофореза рестрицированной геномной ДНК получается равномерное окрашивание по всей длине геля – так называемый *шмер*.

Идентификация нужных фрагментов ДНК в таком геле возможна только путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами.

3.4. Методы гибридизационного анализа

Основы генетической инженерии получили свое развитие в 70-е годы вследствие интенсивного развития молекулярной биологии и создания совершенной методической базы генетических исследований. В области диагностики возникло и бурно развивалось направление по определению специфических нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК, так называемое генное зондирование (гибридизационный анализ).

В основе всех методов лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации – образованию двухцепочечных структур за счет взаимодействия комплементарных нуклеотидов.

Различают два типа гибридизационного анализа:

1. методы гибридизационного анализа, проводимые в растворе (гомологичные);
2. методы гибридизационного анализа, проводимые на твердом носителе (гетерогенные).

Метод гибридизации в растворе

При гибридизации в растворе искомая нуклеиновая кислота и зонд свободно взаимодействуют в водной реакционной смеси, что повышает скорость процесса гибридизации. Детекцию результатов гибридизации в растворе осуществляют путем нуклеазного гидролиза одноцепочечных ДНК и выделения оставшихся двухцепочечных гибридов, содержащих меченый зонд.

Для успешного проведения реакции гибридизации в растворе необходимо применять одноцепочечные зонды, неспособные к самогибридизации. Метод хорош еще и тем, что требует минимальных объемов и количеств биологического и клинического образцов, поэтому может быть использован в диагностических целях. В то же время этот метод имеет один существенный недостаток – на его основе можно создать диагностические тест-системы для выявления специфических фрагментов небольших участков ДНК при условии достаточно высокой концентрации искомым фрагментов или участков в исследуемом образце. Это снижает порог чувствительности до уровня иммуноферментного анализа и даже ниже.

Метод гибридизации на твердом носителе

Принцип метода основан на гибридизации зонда на твердой поверхности. В качестве твердой поверхности чаще всего используют полимерный мембранный фильтр, например, нейлоновую мембрану.

В большинстве случаев процедуру проведения анализа можно разделить на следующие стадии:

1. Подготовка образца (в том числе экстракция и выделение ДНК).
2. Фиксация пробы на носителе.
3. Предгибридизация.
4. Собственно гибридизация.
5. Отмывание несвязавшихся продуктов.
6. Детекция.

Для подготовки пробы может быть необходимо предварительное «подрачивание» исследуемого материала для идентификации отдельных колоний бактерий или увеличение концентрации вирусов в клеточной культуре.

Проводится и непосредственный анализ образцов клеток, мочи, уретральных соскобов, форменных элементов крови или цельной крови на присутствие инфекционных агентов. Для освобождения нуклеиновых кислот из состава клеточных структур проводят лизис клеток, а в некоторых случаях очищают препарат ДНК с помощью фенола. Денатурация ДНК, т.е. переход в одноцепочечную форму, происходит при обработке щелочью. Затем образец нуклеиновой кислоты фиксируют на носителе – нитроцеллюлозной или нейлоновой мембране, обычно путем инкубации от 10 мин до 4 ч при 80°С в вакууме. Далее в процессе предгибридации достигается инактивация свободных мест связывания для уменьшения неспецифического взаимодействия зонда с мембраной. После чего искомые фрагменты ДНК (РНК) комплементарно связываются со специфическим зондом, и тогда данный метод называют ДНК-зондовой диагностикой. Далее осуществляют детекцию одним из возможных методов (авторадиографическим, ферментативно-гибридизационным и т.д.).

Метод «сэндвич»-гибридации

Метод является одной из разновидностей зондовой технологии (DNA-probe). При его использовании применяются два зонда, гомологичные различным участкам искомой нуклеиновой кислоты. Один зонд фиксируют на мембране для того, чтобы связать искомую нуклеиновую кислоту, присутствующую в исследуемом образце. После осуществления гибридизации мембрану отмывают от исследуемого материала и добавляют раствор, содержащий второй зонд, который имеет определенную метку. Процесс гибридизации проводят повторно, и при этом зонд с меткой взаимодействует с искомым участком ДНК (РНК). Дальнейший процесс детекции проводится стандартным методом (ферментно-гибридизационным, радиографическим, авторадиографическим, флюоресцентным, хемилюминесцентным).

Метод блот-гибридации по Э. Саузеру

Метод предложен в 1975 г. Суть его заключается в том, что геномная ДНК подвергается расщеплению и образующиеся фрагменты разделяют по относительной молекулярной массе в агарозном или акриламидном геле. После электрофореза ДНК денатурируют и переносят с геля на плотный носитель. Перенос осуществляют за счет действия капиллярных сил, электрического поля или вакуума. После авторадиографии определяют положение искомого фрагмента ДНК на электрофореграмме (рисунок 3.2).

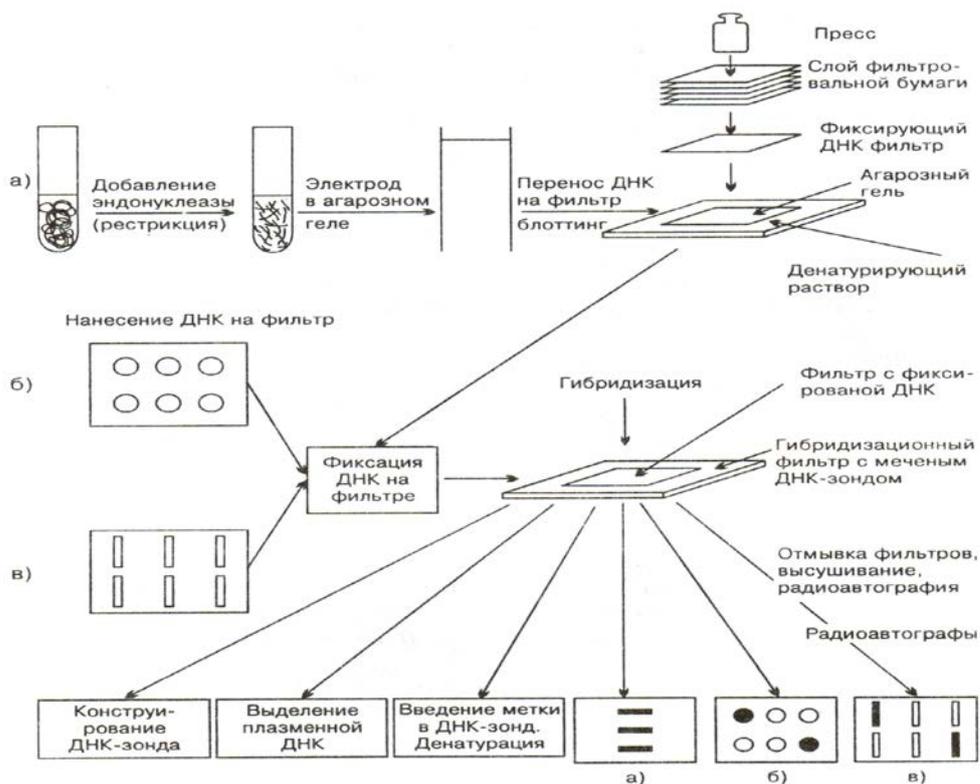


Рисунок 3.2 – Методы гибридизации

При длительной экспозиции (в течение нескольких дней) и при высокой удельной радиоактивности ДНК-зонда (более 10^9 расп./ (мин-мкг)) этот метод позволяет выявлять $< 0,1$ пг ДНК.

При использовании зонда размерами в несколько сотен оснований уникальная последовательность в 1000 п.о. может быть выявлена в 10 мкг геномной рестрицированной ДНК в виде отдельной полосы на радиоавтографе после его экспозиции в течение 12 ч.

Метод блот гибридизации позволяет работать с очень короткими олигонуклеотидными зондами (20 п.о.), однако требует особенно хорошего мечения и длительной экспозиции фильтра.

Блот-гибридизация – высокочувствительный, но дорогостоящий и трудоемкий метод выявления специфических последовательностей ДНК, причем метод предполагает использование радиоактивных меток.

Гибридизация с меченым ДНК-зондом препаратов ДНК или РНК, нанесенных капельно на твердый матрикс без предварительной рестрикции и электрофореза, в зависимости от конфигурации пятна ДНК на фильтре может носить название:

- ✓ дот-гибридизация (округлая форма пятна);
- ✓ слот-гибридизация (продолговатая форма пятна).

Метод гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК носит название нозерн-блот-гибридизация;

Метод нозерн-блот-гибридации – Northern-blot

Метод используется для определения уровня экспрессии гена путем количественной оценки иРНК. Метод сложен и длителен по выполнению (5–7 суток). Трудности связаны с необходимостью блокировать при выделении РНК так называемые РНКазы, которые чрезвычайно стабильны и устойчивы по отношению к многим химическим процедурам, применяемым при экстракции РНК. Процедуры блот-гибридации по Э. Саузерну и нозерн-блот-гибридации не нашли рутинного применения в клинической микробиологии, поскольку они трудоемки. Точками приложения данных методов явились задачи, связанные с проведением научных исследований и задач по изучению геномной структуры ДНК (РНК), а также для выявления точечных мутаций.

Вестерн-блоттинг (иммунный блоттинг) – это связывание электрофоретически разделенных белков, фиксированных на фильтрах, с мечеными антителами.

Метод гибридизации in situ (ISH – in situ hybridization)

Метод основан на проведении процессов гибридизации непосредственно на срезе или в мазке с использованием любых зондов. Частная методика гибридизации in situ – **FISH (fluorescent in situ hybridization)**, позволяет установить наличие патогена в препаратах, фиксированных в формалине, и залитых парафином срезах и пунктатах ткани, что особенно важно при патоморфологическом анализе. Метод гибридизации in situ базируется на основных принципах гибридизации твердофазной и гибридизации в растворе. Чувствительность метода гибридизации in situ ограничена возможностью проникновения зондов внутрь клеток для связывания с искомой мишенью. Процесс гибридизации проходит в тканях, при этом зонд снабжен флюоресцентной меткой. После промывки материала и удаления несвязавшихся молекул осуществляется детекция, для чего мазок или срез просматривают в флюоресцентном микроскопе. Метод ISH сложен для осуществления и по сравнению с другими молекулярными методами малочувствителен. Метод наиболее удобен для определения мишеней, например, вирусов в инфицированных клетках, которые представлены большим числом копий.

Гибридизация in situ является одним из наиболее эффективных методов картирования комплементарных ДНК-зонду последовательностей ДНК на хромосомах.

Эта методика особенно эффективна при:

- исследовании распределения по геному повторяющихся последовательностей ДНК;
- исследовании клонированных последовательностей ДНК анонимного происхождения;

➤ определении не только хромосомной принадлежности, но и внутрихромосомной локализации уникальных генов в тех случаях, когда имеются соответствующие ДНК-зонды.

Разрешающая способность метода может достигать нескольких хромосомных бэндов.

Метод разветвленной ДНК (branch-DNA)

Искомая нуклеиновая кислота связывается с улавливающим зондом, один конец которой комплементарен мишени, а другой – определенному концу усиливающего зонда. При этом усиливающий зонд может быть комплементарен следующему зонду и т.д. Количество зондов может быть велико, и все они связаны с несколькими (от одного до нескольких десятков) люминофорами, которые по мере увеличения количества связанных зондов усиливают (хеми-, флюоро-) люминесценцию. Преимуществом данного метода является возможность использования в одной реакции нескольких улавливающих и связывающихся с мишенью зондов, что обеспечивает выявление агентов, характеризующихся значительной геномной гетерогенностью, например, вирус иммунодефицита человека.

В последнее время в практике нашел применение метод гибридизации в растворе с зондами, мечеными акридином. Результаты гибридизации регистрируют по испусканию меткой света определенной длины волны после обработки щелочью.

3.5. Библиотеки генов

Основным источником ДНК-зондов являются искусственным образом сконструированные библиотеки генов, в которых осуществляют поиск, или скрининг, нужных последовательностей ДНК разными методами в зависимости от специфических особенностей этих последовательностей.

Библиотека генов – это полный набор клонированных перекрывающихся фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции или механического разрезания тотальной ДНК, выделенной из какого-либо специфического источника.

В зависимости от происхождения ДНК различают геномные и библиотеки кДНК генов.

Для конструирования геномных библиотек используют ДНК, выделенную из тканей, культур клеток, из отдельных хромосом или из фрагментов.

Процедура создания фрагмента ДНК для хранения в библиотеке генов включает:

- ❖ выделение тотальной мРНК из тканей или культивируемых клеток, в которых заведомо экспрессируются интересующие исследователя гены;
- ❖ синтез кДНК методом обратной транскрипции (РНК-ДНК);
- ❖ разрезание и упаковка полученной кДНК в выбранный для клонирования вектор.

В геномных библиотеках присутствуют не только кодирующие последовательности генов, но также бессмысловые внутригенные последовательности – интроны, и межгенные участки ДНК, причем удельный вес некодирующих фрагментов ДНК значительно выше.

Библиотеки кДНК состоят только из кодирующих – экзонных – областей генов.

Информационная емкость каждой библиотеки, т. е. количество клонов с различными инсертированными фрагментами ДНК, определяется размерами исходного генома и необходимостью присутствия каждой его последовательности хотя бы в одном клоне.

Поэтому достаточно представительные геномные библиотеки млекопитающих обычно содержат не менее $8 \times 10^5 - 10^6$ различных клонов.

Чаще библиотеки конструируют на основе фаговых или космидных клонирующих векторов, так как в таком виде легче хранить большие количества химерных ДНК.

Для создания библиотек генов человека особенно удобны векторы, полученные на основе фага λ , такие как EMBL3 или EMBL4. Пакующая способность этих векторов от 9 до 23 тыс. п.о., они содержат много удобных клонирующих сайтов, так что для инсерции ДНК могут быть использованы разные рестриктазы.

Для создания библиотек клонов, содержащих большие районы ДНК, используется технология искусственных дрожжевых хромосом – YAC.

Скрининг библиотек проводят путем гибридизации на фильтрах с олигонуклеотидными, кДНК- или любыми иными ДНК-зондами, а также с помощью антител, если библиотека сконструирована на основе экспрессионного вектора.

В настоящее время ведутся интенсивные разработки по совершенствованию методов гибридизации в следующих направлениях:

- ✓ Упрощение процедуры генного зондирования до одной – двух стадий процесса.
- ✓ Отказ от сорбции на мембране.
- ✓ Повышение чувствительности гибридизационных методов за счет использования процедуры амплификации сигнала с зонда.

✓ Активные разработки по третьему направлению стали возможными лишь с момента появления и внедрения в практику методов амплификации нуклеиновых кислот.

3.6. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот

Открытие Карри Мюллисом в 1983 году (США) метода полимеразной цепной реакции послужило толчком к активному развитию разнообразных технологий амплификации нуклеиновых кислот.

Позаимствованная у биологических систем способность к изолированному умножению гена или его фрагмента в процессе активного размножения и (или) репликации микроорганизмов в целях выживания позволила использовать в искусственных условиях (*in vitro*) данное свойство живых организмов в качестве основного механизма всех методов амплификации.

М. А. Чернески предложил подразделить все методы амплификации, применяемые в клинической практике, в зависимости от технологии на три основные категории.

Амплификация мишени, в частности метод ПЦР, самоподдерживающаяся реакция репликации последовательностей, амплификация с вытеснением цепи (АВЦ).

Амплификация с использованием QВ-репликазы, лигазная цепная реакция (ЛЦР).

Амплификация сигнала, при которой усиление сигнала каждой молекулы зонда происходит за счет использования сложных зондов или технологии разветвленной ДНК.

Все методы амплификации могут быть разделены в зависимости от изменения температурных режимов на:

методы амплификации с циклической сменой температурных параметров: (методы ПЦР, ЛЦР и их модификации);

изотермальные методы амплификации нуклеиновых кислот (метод изотермальной транскрипционной амплификации (TAS), самоподдерживающаяся репликация последовательностей (3SR, NASBA), амплификация с вытеснением цепи (АВЦ), амплификация с использованием QВ-репликазы.

Все методы амплификации состоят из трех основных этапов.

1. Подготовка исследуемого образца в целях выделения ДНК (РНК) из клеток.

2. Непосредственная амплификация выделенных участков (копий) ДНК (РНК).

3. Детекция продуктов ПЦР, полученных на втором этапе.

3.7. Полимеразная цепная реакция – ПЦР (PCR – polymerase chain reaction)

Принципы метода

ПЦР – метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаруживать единственную специфическую ДНК в присутствии миллиона других молекул. Открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последнее десятилетие. Суть метода заключается в многократном копировании в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. Изолированное умножение гена или его фрагмента называют амплификацией, которая является одним из способов выживания микроорганизмов и клеток животных, например, в условиях действия противоопухолевых и противобактериальных препаратов. Амплификация – основа ПЦР метода. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК в миллиарды раз, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Таким образом, ПЦР позволяет осуществлять амплификацию в пробирке при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы из 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), являющихся структурными элементами всякой ДНК, и коротких олигонуклеотидных 20-30-членных затравок (праймеров), комплементарных 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК (рисунок 3.3).

Каждый цикл синтеза (амплификации) состоит из 3 этапов, протекающих в различных температурных режимах.

1-й этап. Денатурация ДНК - расплетение двойной спирали при температуре 93-95⁰ С в течение 30-40 сек.

Одна из цепей (+) используется в качестве основной матрицы. Ее 5' конец фиксируется ферментом ДНК-полимеразой, что обеспечивает построение из отдельных нуклеотидов второй цепи ДНК, комплементарной первой. То же самое, только в обратном направлении, происходит и на второй нити ДНК, однако, так как расплетение молекулы ДНК идет в обратном направлении, то новая цепь строится небольшими фрагментами, которые затем сшиваются. Для того чтобы фермент ДНК-полимераза начал свою работу, требуется наличие затравки или праймера – небольшого одноцепочечного фрагмента ДНК, который, соединяясь с комплементарным участком одной из цепей родительской ДНК, образуя стартовый блок для наращивания дочерней нити.

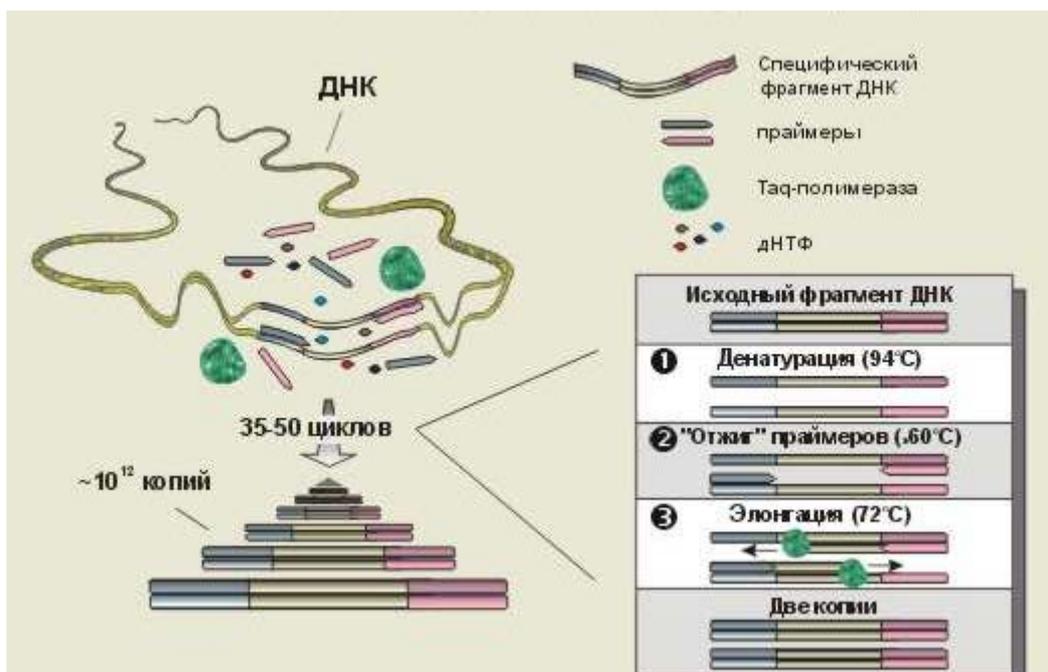


Рисунок 3.3 – Принцип ПЦР

2-й этап. Отжиг – присоединение праймеров при температуре 50-65⁰ С в течение 20-60 сек. Праймеры – это химически синтезированные олигонуклеотидной природы затравки для ПЦР, определяющие границы амплифицируемого участка ДНК матрицы и комплементарные противоположным ее цепям. Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующей последовательности нуклеотидов на противоположной цепи ДНК.

3-й этап . Элонгация – достраивание цепей ДНК при температуре 70-72⁰ С в течение 20-40 сек. Комплементарное достраивание цепей ДНК идет в направлении от 5 штрих конца к 3 штрих концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служит вносимый дНТФ. Этот процесс катализируется ферментом Таq-полимеразой. Образовавшиеся в первом цикле синтеза новые ДНК служат исходным материалом для второго цикла, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (амплификона) и т.д.

Кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20-25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40-45 циклов) в силу истощения дНТФ, праймеров и нарастающего температурного повреждения Таq-ДНК-полимеразы, конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Таq-ДНК-полимеразы. Количество циклов может быть 25-40, в среднем 30 циклов. Следовательно, если в начальном растворе находилась одна ДНК, то после 30 циклов их будет 10⁸. Это является критическим порогом чувствительности, достаточным

для достоверной идентификации. При содержании в ПЦР-пробирке около 10 молекул ДНК-матриц, как правило, достаточно 35 циклов.

Количество необходимых циклов определяется как эффективностью реакции, так и числом образцов ДНК в реакции, начиная с небольшого количества материнского генома в 100 нг, что соответствует 10^4 клеточным эквивалентам. После 30 циклов 10% реакции должны быть видимыми при окраске бромистым этидием в геле как единичные основные полосы (бэнды). Если брать большее количество образцов, то необходимо меньшее количество циклов. Если брать образцов меньше, то необходимо 45 циклов. (Теоретически одиночная последовательность из 100 пар оснований должна образовывать 1 нг продукта в 45 циклах). На протяжении проверки эффективности реакции в геле, образцы могут храниться при 4°C и затем проходить дополнительные циклы, если это необходимо. Многие исследователи увеличивают время для последнего этапа амплификации до 7 мин с целью убедиться, что все продукты ПЦР полностью готовы.

Пятью основными компонентами ПЦР являются следующие:

- фермент Таq-ДНК-полимераза;
- пара олигонуклеотидных праймеров;
- 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ);
- копируемая ДНК;
- ионы Mg^{+2} .

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

Фермент Таq-ДНК-полимераза при оптимальных условиях ПЦР содержится в 50-100 мкл реакционной смеси в количестве 0,5-2 единицы. Фермент и синтезирует цепь ДНК до 1000 пар оснований в минуту. Увеличивая время полимеризации и подбирая новые разновидности Таq - ДНК-полимеразы, обладающие и экзонуклеазной (редактирующей) активностью, вырезающей ошибочные (некомплементарные) нуклеотиды, W.M. Barnes (1994г.) удалось получить очень длинные амплифицированные ДНК до 42000 пар оснований (Лонг-ПЦР). Большой избыток Таq-ДНК-полимеразы увеличивает образование неспецифических продуктов ПЦР.

Праймеры – это короткие, длиной 20-30 оснований, одноцепочечные ДНК (дезоксиолигонуклеотиды), комплементарные 3'-концам цепей копируемой ДНК-матрицы. Праймеры ограничивают фрагмент ДНК, который будет миллионы раз скопирован ферментом Таq-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к 3'-концам праймеров и достраивающей их до заданной длины в несколько сот или тысяч пар оснований. Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (амплификоны), то они в реакционной смеси ПЦР присутствуют в избытке: концентра-

ция их составляет 0,5-1,0 мкМ. Специфичность получаемого продукта ПЦР в значительной степени определяется так называемой температурой отжига праймеров, при которой они взаимодействуют с комплементарными участками ДНК-матрицы, образуя двухцепочечные структуры. Температура отжига определяется длиной праймера и содержанием ГЦ-пар и рассчитывается по следующей формуле:

$$T = [(A+T) \times 2] + [(G+C) \times 4] - 5 \text{Ц (D.Dukt et al, 1990г.)}$$

При отклонениях в температуре денатурации внутри одной пары праймеров выбор температуры отжига будет менее строгим. Как правило, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создают на консервативные участки ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дГТР и дЦТР в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях от 200 до 500 мкМ, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Ионы магния необходим для функционирования фермента Таq-ДНК-полимеразы, но оптимальная концентрация его устанавливается путем титрования, поскольку концентрация свободных ионов Mg зависит не только от добавленного его количества, но и от концентраций нуклеиновых кислот, праймеров и дНТФ, которые связывают ионы магния. Средние величины концентрации Mg в ПЦР составляют около 2-3 мМ. Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен Трис-НСI-буфер, который удерживает рН во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и детергенты для стабилизации фермента, 50 мМ КСI.

Минеральное масло наслаивается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Накопление ампликонов происходит по формуле 2^n , где n-число циклов амплификации.

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

$$A = M \cdot (1+E)^n, \text{ где}$$

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

$$K = M * n, \text{ где}$$

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 компонентов реакции (дНТФ и фермента), количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы, конкуренция за компоненты реакции 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.

При многократном повторении циклов репликации происходит увеличение числа копий фрагмента ДНК. Все это позволяет из единичных клеток микроорганизмов, содержащихся в анализируемом биологическом материале, получить необходимое количество ДНК для их идентификации.

Технологические особенности постановки ПЦР

Подготовка пробы биологического материала.

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. Иногда бывает достаточно прокипятить образец в течение 5-10 мин., однако в большинстве случаев требуются более сложные методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, описанная Мармуром. Она включает в себя ферментативный протеолиз с последующей депротеинизацией и переосаждением 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. Очень часто есть необходимость очистки или концентрации раствора ДНК перед дальнейшими ферментативными методами или аналитическими исследованиями. Наиболее частый метод, используемый для депротеинизации растворов ДНК – это экстракция фенолом, который эффективно денатурирует протеины. Хлороформ также эффективно денатурирует с некоторыми отличительными чертами – он стабилизирует в дальнейшем нестабильный слой между водной фазой и фенольным слоем. Использование смеси также удерживает оставшуюся водную фазу в органической фазе с целью увеличения эффективности.

Изоамиловый спирт предотвращает формирование смеси после вортексирования и способствует разделению органической и водной фаз. Слой денатурированных протеинов формируется на границе между водной и органической фазами и, таким образом изолируется от ДНК, находящейся в водном слое. Эта процедура быстрая, недорогая и легко применяемая для большого числа образцов. Этанольная преципитация полезна для концентрации растворов ДНК и для удаления остатков фенола и хлороформа из депротеинизованного водного раствора. Это также件годно для сохранения раствора ДНК, которая относительно свободна от молекул раствора, когда параметры буфера необходимо изменить с целью перехода одной модификации реакции в другую. В присутствии относительно высоких (0,1-0,5 М) концентраций моновалентных катионов, этанол инициирует структурную перестройку нуклеиновых кислот, которая способствует их агрегации и преципитации из раствора. Однако, т.к. большинство солей и небольших органических молекул растворимы в 70% этаноле, этанольная преципитация и промывка осадка будет эффективна в удалении солей. Однако хлорид Na и аце-

тат аммония способствуют преципитации и более сложно удалить NaCl из-за его низкой растворимости в 70% этаноле.

Продукты окисления фенола могут повредить нуклеиновые кислоты и поэтому должен использоваться только редистиллированный фенол. В основном преципитация спиртом требует присутствия по меньшей мере 0,1 М моновалентного катиона в начальном водном растворе. Преципитация нуклеиновых кислот малых концентраций требует охлаждения до низких температур для получения хороших результатов, Преципитация нуклеиновых кислот в высокой концентрации (>0,25 мг/мл после добавления этанола) очень быстро протекает при комнатной температуре. Появление видимой преципитации после добавления спирта и тщательного перемешивания, не требующего охлаждения и дальнейшей инкубации. В протоколах органической экстракции потери нуклеиновой кислоты на границе и в органической фазе может быть снижен до минимума посредством повторной экстракции органической фазы.

Одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный *Boom* с соавт. 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 *Chilex*, 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.

При отсутствии в пробе ингибиторов Таq-ДНК-полимеразы, гемоглобина или других, и наличия десятка копий ДНК-матрицы в объеме, вносимом в пробирку со смесью всех реагентов ПЦР, подготовка пробы может быть полностью исключена. Например, вирус гепатита В в сыворотке крови и многие возбудители инфекционных менингитов в спинномозговой жидкости, можно детектировать методом ПЦР без всякой подготовки, без предварительного выделения из них ДНК.

В последние годы ряд фирм производит наборы для быстрой экстракции ДНК или РНК из различных материалов, подвергаемых анализу методом ПЦР. Основу экспресс метода составляет термокоагуляционное концентрирование молекулы ДНК микроорганизма. При этом использование экспресс метода выделения ДНК на этапе пробоподготовки приводит к значительным потерям ДНК (от 12 до 22%), в результате чего формируется определенный процент ложноотрицательных результатов. Полученные нами данные позволяют предположить, что выделения ДНК с помощью сорбентного метода является наиболее оптимизированной процедурой пробоподготовки и позволяет увеличить чувствительность ПЦР, что влечет за собой увеличение числа выявления возбудителей урогенитальных инфекций, присутствующих в биологических пробах в минимальных количествах.

Общее количество ДНК, вносимой в пробирку для ПЦР, не должно превышать 1мкг, ибо большой избыток неспецифической ДНК снижает специфичность и чувствительность ПЦР-амплификации ДНК-матрицы. Превышение количества ДНК требует провести ряд разведений образцов 0,01;0,001;0,0001.

Подготовка пробы материала (выделение ДНК или РНК) должна проводиться в условиях, исключающих перекрестное загрязнение исследуемых проб выделяемыми нуклеиновыми кислотами. Для исключения ложноположительного результата необходимо обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, проведение предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов.

Следует подчеркнуть, что ДНК-матрицы генов клеток, вирусов и бактерий при нейтральном и слабощелочном рН для ПЦР в условиях инактивации ДНК-азы (замораживание, высушивание, температурная или химическая денатурация белков, добавка ингибиторов ДНК-аз) пригодны для ПЦР в течение длительного времени (десятки, сотни и даже тысячи лет).

РНК-матрицы клеток вирусов и бактерий менее устойчивы: быстро гидролизуются очень активными эндогенными и экзогенными РНК-азами, при щелочных и кислых значениях рН, поэтому материал для анализа методом ОТ-ПЦР должен подвергаться немедленному исследованию или храниться при -70°C в присутствии ингибиторов РНК-аз.

Таким образом, к выбору метода пробоподготовки следует относиться с пониманием целей проведения предполагаемых анализов.

Аmplификация.

Во время следующей процедуры – амплификации – в образец, содержащий ДНК возбудителя, вносится в небольшую пробирку с компонентами, обеспечивающими протекание ПЦР: два вида праймеров, два энзима (Taq - ДНК -полимераза и N-урацилгликолаза) и четыре вида нуклеотида А, Г, Ц, У. Для проведения ПЦР используется специальное устройство (термоциклер или ДНК-амплификатор), позволяющее автоматически, по определенной программе изменять температурный режим реакционной смеси. В первом цикле осуществления ПЦР образец нагревается до температуры 94°C для разделения двух комплементарных нитей ДНК. Затем температура снижается до $40-60^{\circ}\text{C}$, при этом праймеры присоединяются к единичной цепи ДНК, после чего температура вновь поднимается до 72°C (при которой наиболее выражена активность полимеразы). Весь цикл с изменением температуры продолжается менее 3-х минут. Специфичность ПЦР и количество амплифицируемой ДНК, которое определяет чувствительность, могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-ДНК-полимеразы, праймеров, дНТФ и ионов Mg) и температурного режима ПЦР.

Типичный состав и концентрации компонентов смеси ПЦР в объеме 100 мкл:

1. ПЦР буфер x 10 (десятикратный) 10 мкл*.

*Примечание: ПЦР буфер x 10 содержит 50 мМ KCl, 100мМ Tris HCl, рН 8,3, 15мМ MgCl и 0,01% (г/объем) желатина, в объеме 1,4 мл, автоклавируется и хранится при -20°C .

2. Раствор 4 дНТФ*:

дАТФ (дезоксиаденозинтрифосфат) – 10 мМ - 8 мкл;

дГТФ (эзоксигуанозинтрифосфат)– 10 мМ - 8 мкл;

дЦТФ (дезоксцитидинтрифосфат) – 10 мМ - 8 мкл;

дНТФ (дезокситимидинтрифосфат) – 10 мМ -8 мкл.

*Примечание: компоненты смешиваются в деионизированной воде в эквимольной концентрации при помощи 0,05 М Трис рН раствора, устанавливают рН 7,0 и разбавляют деионизированной водой до концентрации 2,5 мМ, расфасовывают в полимерные пробирки по 100 мкл и хранят при –25°С.

3. Праймер 1 (5 наномолей в 200 мкл) - 1-5 мкл*;

4. Праймер 2 (5 наномолей в 200 мкл) -1-5 мкл*;

*Примечание: Раствор дезоксиолигонуклеотидных праймеров с концентрацией 5 пикомолей/мл расфасовывают в полимерные пробирки по 100 мкл, хранят при –20°С 6 месяцев. Праймеры заказывают применительно к конкретным ДНК-матрицам микробных или вирусных возбудителей.

5. Таq-ДНК-полимераза 5,0 Ед/1 мкл -0,5 мкл*;

* Примечание: Раствор фермента Таq-ДНК-полимеразы в 50% глицерине с активностью 5,0 ед/мл хранится при –20°С в течение 6 месяцев.

6. MgCl₂ (25 мМ) - 4-16 мкл;

7. Амплифицируемая ДНК-матрица (не более 1 мкг на пробирку (конечный объем 100 мкл)*;

* Примечание: Амплифицированная ДНК-матрица (положительный контроль) – это раствор ДНК возбудителей с концентрацией 100 нанограмм/мл в бидистиллированной воде; хранят при –20°С до 6 месяцев.

8. Дистиллированная вода (до конечного объема 100 мкл).

Рекомендуется следующий порядок работы:

В зависимости от числа исследуемых образцов смешивают рабочие растворы на 10, 20 или 40 пробирок для ПЦР.

На 1 пробирку при суммарном объеме реакционной смеси 50 мкл в указанной ниже последовательности вносятся:

1. Деионизированная вода -15 мкл;

2. ПЦР-буфер - 5 мкл;

3. Раствор дНТФ - 5 мкл;

4. Раствор пары праймеров -10 мкл.

5. Растворы исследуемой или контрольной ДНК 10 мкл, предварительно прогретые в течение 10-15 мин. при +95°С. Отрицательный контроль содержит 10 мкл воды вместо раствора ДНК.

В таблице 1 приведены диапазоны вариаций основных параметров ПЦР для получения максимальной специфичности и чувствительности ПЦР. Даже при оптимальных концентрациях фермента, MgCl₂, праймеров и дНТФ специфичность и чувствительность ПЦР сильно зависит от температуры отжига праймеров (2-я стадия цикла ПЦР): неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентраций праймеров и дНТФ выше опти-

мальных, а при повышении температуры отжига выше оптимальной снижается выход специфической амплифицированной ДНК вплоть до ее полного исчезновения, когда праймеры не в состоянии взаимодействовать с ДНК-матрицей.

Таблица 3.1 – Стратегия оптимизации ПЦР-амплификации

Варьируемые параметры	Диапазон вариаций	Градиент вариаций
Температура отжига	45-62 °С	2-3 °С
Количество единиц Taq-ДНК-полимеразы на пробирку	0,5-0,3 ед.	0,5 ед/100 мкл
Концентрация Mg ²⁺	1,25-3,00 мМ	0,25 мМ
Концентрация каждого праймера	0.2-2,0 мкМ	0,5 мкМ

В последние годы широко используется простой прием для получения максимальной специфичности и чувствительности ПЦР, как «горячий старт» ПЦР, который заключается в предварительном (до добавления Taq-ДНК-полимеразы или ионов Mg) прогревании пробирок с ПЦР-амплификационной смесью при температуре 95°С в течение 3-5 минут. Такой прием предупреждает амплификацию неспецифических ДНК-фрагментов вследствие низкотемпературного, неспецифического спаривания праймеров.

Для контроля реакции амплификации используются контроли. В качестве «положительного контроля» используют препарат ДНК искомого микроорганизма. Неспецифические ампликоны отличаются по размеру от ампликонов, образуемых в результате амплификации с контрольным препаратом ДНК. Размер неспецифических продуктов может быть как большего, так и меньшего размера по сравнению с положительным контролем. В худшем случае эти размеры могут совпадать и читаются в электрофорезе как положительные. Для контроля специфичности образуемого продукта амплификации можно использовать гибридизационные зонды (участки ДНК, расположенные внутри амплифицируемой последовательности), меченные ферментными метками или радиоактивными изотопами и взаимодействующими с ДНК в соответствии с теми же принципами, что и праймеры. Это значительно усложняет и удлиняет анализ, а его стоимость существенно увеличивается.

«Положительный контроль» позволяет удостовериться, что все компоненты, входящие в состав реакционной смеси, обеспечивают нормальное прохождение реакции. В то же время, препарат ДНК, подготовленный к ПЦР из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, за-

метно снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого возбудителя. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью. Для этой цели используют дополнительный, так называемый «внутренний контроль». Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Для инфекционных тест-систем иногда, например, используют β -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 хромосомальная 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. К сожалению, несмотря на всю привлекательность такого подхода, у него есть существенный изъян. Если в реакционной смеси находится нужная ДНК, то эффективность ее амплификации резко снижается из-за конкуренции с внутренним контролем за праймеры. Это особенно принципиально важно при низких концентрациях ДНК в испытуемом образце, что может приводить к ложноотрицательным результатам. Тем не менее, при условии решения проблемы конкуренции за праймеры, этот способ контроля эффективности амплификации безусловно будет весьма полезен.

Существует шесть основных способов, при помощи которых можно повысить количество амплифицированной ДНК (усилить ПЦР-сигнал) при низкой концентрации ДНК-матрицы (вируса, бактерии, мутантных генов):

❖ Усиление денатурации ДНК-матрицы: денатурировать ДНК при 94-99°C до начала ПЦР или удлинить начальную денатурацию до 3-5 минут;

❖ Увеличение специфичности праймеров: при длине 18-30 пар содержание Г+Ц должно составлять около 50%, а комплементарность по 3' и 5'-концам праймеров исключить;

❖ Подбор оптимальных концентраций реагентов и температуры отжига: подобрать оптимальные концентрации Taq-ДНК-полимеразы, праймеров и магния, повысить температуру отжига;

❖ Применение «горячего старта»: произойдет увеличение выхода специфического продукта ПЦР;

❖ Увеличение продолжительности ПЦР до 40 циклов и использование ПЦР с «вложенными» праймерами (nested-PCR): увеличение чувствительности и специфичности ПЦР;

❖ Применение более чувствительной гибридационно-ферментативной детекции амплифицированной ДНК.

Этой методологией владеть необходимо, так как концентрации инфекционных агентов варьируют в широких пределах, и по этой причине ПЦР-результаты могут быть отрицательными даже при оптимальных условиях ее проведения. Знание этих способов позволяет получить дополнительную уверенность в отсутствии или присутствии данного инфекционного возбудителя при очень низкой его концентрации.

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.

Возможно осуществление одновременного определения нескольких инфекций в одной реакции амплификации, если для определяемых инфекций совпадают программы проведения реакции – **метод мультиплексной (мультипраймерной) ПЦР**. Для этого в амплификационную смесь добавляется равный объем растворов праймеров для различных инфекций, при

этом объеме добавляемой деионизованной воды уменьшается на объем дополнительно добавленных растворов праймеров. Следует, однако, отметить, что в этом случае чувствительность реакции уменьшается пропорционально разбавлению. Поэтому, рекомендуется одновременно определять не более трех инфекций за одну реакцию.

Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода. Например, геномы многих вирусов (гепатит С, вирус инфлюэнцы, пикорнавирусы и т.д.) представлены именно РНК. При этом в их жизненных циклах отсутствует промежуточная фаза превращения в ДНК.

При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР предварительно на этой РНК-матрице посредством фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратная транскриптаза, ревертаза) синтезируют комплементарную ДНК (кДНК), которая затем используется в качестве матрицы в ПЦР. Для этого используют обратную транскриптазу, которую выделяют из двух различных вирусов: *avian myeloblastosis virus* и *Moloney murine leukemia virus*. Использование этих ферментов связано с некоторыми трудностями. Прежде всего, они термолабильны и поэтому могут быть использованы при температуре не выше 42°C. Так как при такой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, то эффективность реакции заметно снижается и по разным оценкам приблизительно равна 5%.

Несколько лет тому назад удалось получить термостабильную Taq-ДНК-полимеразу из бактерии *Thermus Thermophilis*, так называемую Tth-ДНК-полимеразу, которая наряду с ДНК-полимеразной активностью обладает и обратнo-транскриптазной активностью, что позволило эти две реакции совместить и проводить одновременно в одной и той же пробирке. Это единственный известный фермент, способный проявлять как полимеразную, так и транскриптазную активность.

Для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) в реакционной смеси также как и в ПЦР должны присутствовать праймеры в качестве затравки и смесь 4-х дНТФ, как строительный материал. После проведения ОТ реакции полученные молекулы кДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР. После проведения ОТ реакции полученные молекулы кДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР. ОТ-ПЦР широко применяется для детекции вирусов РНК, определения экспрессии вирусных, бактериальных и клеточных генов по их РНК.

Важным фактором воспроизводимости реакции амплификации является приборное обеспечение. Кроме надежности амплификатора и точности поддержания температур следует упомянуть о таком важном качестве прибора, как использование «активного регулирования», позволяющего добиваться

достижения нужной температуры реакционной смеси внутри пробирки в значительно более короткие сроки, чем при обычном регулировании. Тем самым, сокращается время реакции (в 1,5-2 раза), увеличивается время сохранения активности Taq-полимеразы, что позволяет увеличить количество циклов амплификации, снизить риск неспецифического отжига праймеров, а, следовательно, повысить чувствительность и специфичность реакции.

К приборам такого класса следует отнести аппараты фирмы Perkin-Elmer 2400 или 9600, NuBaid "TouchDown", MJ Research PTC200. Среди российских амплификаторов активное регулирование реализовано в термоциклере МС-2 ("Терцик"), производимом фирмой «ДНК-технология». При использовании приборов с активным регулированием следует учитывать тип ПЦР-пробирок и строго придерживаться рекомендаций фирм-изготовителей. Это объясняется тем, что при высоких скоростях изменения температуры, минимальные отличия в конфигурации гнезд амплификатора и формы конуса ПЦР-пробирки могут сводить на нет преимущества активного регулирования и приводить к снижению чувствительности реакции из-за температурных погрешностей, связанных с ухудшением теплового контакта.

Детекция продуктов амплификации.

Для визуализации результатов амплификации используют различные методы. **Метод электрофореза**, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Детекция продукта амплификации может иметь место и по флюоресцентному сигналу, как в **методе ПЦР в режиме реального времени (Реал-тайм ПЦР)**. Причем Реал-тайм ПЦР позволяет также проводить количественный анализ исследуемой нуклеиновой кислоты.

ПЦР с электрофоретической схемой детекции.

Для проведения электрофореза готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок 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. Отрицательно 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, состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК.

Хотя электрофорез в кислотном геле несложен и легко осуществим, несколько факторов необходимо учитывать перед проведением электрофоретической сепарации. Параметры, влияющие на подвижность ДНК (в т.ч. применяемое напряжение и концентрация агарозы) должны быть выбраны в соответствии с оптимальными рекомендациями для желаемых ДНК-фрагментов. Протокол должен быть таким, чтобы прогресс электрофоретической сепарации мог бы контролировать и результаты тщательно интерпретировать. Это включает такие параметры, как треки образцов и маркеры молекулярного веса. На рисунке 3.4 представлен пример электрофореграммы.



Рисунок 3.4 - Электрофореграмма продуктов амплификации по выявлению ДНК *Chlamydia trachomatis*

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 флюоресцировать 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. Анализ результатов проводится в два этапа. На первом этапе анализ результатов проводится по контрольным образцам и внутренним контролям (таблица 3.2).

Для оценки соблюдения методики ПЦР-анализа используется внутренний контроль. Полоса, соответствующая по подвижности внутреннему контролю, указывает на законченную реакцию амплификации в пробах. Наличие в исследуемом образце полосы положительного контроля указывает

на присутствие возбудителя, тогда как выявление лишь фрагмента внутреннего контроля свидетельствует об отсутствии возбудителя.

Таблица 3.2 - Интерпретация результатов по контрольным образцам ДНК возбудителей и внутреннему контролю

Полосы фрагментов ДНК	К+	К-	К+	К-	Проба 1	Проба 2
Положительный контроль	+	--	--	+	+	--
Внутренний контроль	+	+	--	+	+	+
Интерпретация	Амплификация прошла, методика анализа соблюдена		Амплификация не прошла, нарушена методика анализа		Контаминация компонентов набора	Присутствие возбудителя
					Отсутствие возбудителя	

На втором этапе интерпретации результатов анализ проводится по дополнительным лабораторно-диагностическим признакам: количеству синтезированных нуклеотидных пар (н.п.), молекулярной массе и интенсивности свечения фрагментов молекул ДНК с использованием программы «Gel Analysis».

Параметры, влияющие на миграцию ДНК в агарозном геле.

Концентрация агарозы: линейные молекулы, дуплексы ДНК (третичная структура) мигрируют в геле согласно их молекулярному весу. Молекулярный вес интересующих фрагментов может быть определен путем сравнения их подвижности с подвижностью ДНК-стандартов известного молекулярного веса. Это основная ценная черта электрофореза в агарозном геле, т.к. это обеспечивает точное значение характеристики ДНК-фрагментов согласно размеру. Концентрация агарозы играет важную роль в электрофорезной сепарации, т.к. ограничивает размеры ДНК-молекул, которые можно разделить. Для большинства методик концентрация агарозы 0,5-1% используется для разделения 0,5-30 кБ фрагментов. Однако низкая концентрация агарозы (0,3-0,5%) используется для разделения больших фрагментов ДНК (20-60 кБ), и высокая концентрация агарозы (1-1,5%) может использоваться для разделения малых фрагментов ДНК (0,2-0,5 кБ).

Применяемое напряжение: В основном фрагменты ДНК мигрируют в геле со скоростью, пропорциональной приложенному напряжению. С увеличением напряжения, однако, большие молекулы ДНК мигрируют с большей скоростью, чем малые молекулы. Следовательно, высокое напряжение менее эффективно в разделении больших фрагментов ДНК. Для разделения боль-

ших фрагментов ДНК лучшим является низкая концентрация агарозы и низкое напряжение (~ 1 V/см, 0,5% агароза).

Электрофорезный буфер: В электрофорезе используются 2 наиболее широко распространенных буфера - трис/ацетат (ТАЕ) и трис/борат (ТБЕ). Однако эти буфера имеют несколько различные эффекты, влияющие на ДНК-подвижность. Доминирующим фактором, который необходимо учитывать при выборе буфера – это буферная емкость. Трис/ацетат – более часто используемый буфер вопреки тому, что он более легко истощается в процессе электрофореза. Трис/борат имеет существенно лучшую буферную емкость, но необходимо избегать его применения для очистки ДНК из гелей.

Конформация ДНК: Первичная, вторичная и третичная структура ДНК одинакового молекулярного веса мигрируют в агарозном геле с различной скоростью. В отсутствие бромистого этидия первичная структура ДНК мигрирует быстрее, чем третичная, Суперспираль (1-ая) позволяет молекулам мигрировать быстрее в геле за счет малого гидродинамического радиуса. «Нитка бус» (2-ая структура) ослабленная циркулярная молекула, она мигрирует медленнее, чем суперспираль или линейные молекулы. Окраска снижает подвижность линейных дуплексов и оказывает резко выраженный эффект на подвижность 1-ой структуры ДНК. Бромистый этидий изменяет плотность скрученной ДНК путем индуцирования положительных супервитков. С увеличением концентрации бромистого этидия негативные супервитки постепенно исчезают, что является причиной снижения подвижности ДНК. Это происходит до тех пор, пока не будет достигнут критический % окраски, где не останется больше супергелических витков (обычно между 0,1-0,5 мкг/мл). Если увеличивать окраску бром этидием, будут возникать положительные супервитки, которые, как и отрицательные, являются причиной увеличения электрофорезной подвижности ДНК.

Мониторинг и интерпретация сепарации ДНК в агарозном геле. Образец ДНК. При выборе объема ДНК, который вносится в лунку, необходимо учитывать ширину лунки, % геля, число и размер ДНК фрагментов. 5-200 нг единичных фрагментов ДНК могут быть внесены в лунку размером 0,5 см·0,2 см (глубина); 5 нг – минимальное количество ДНК-фрагмента, которое может быть детектировано с помощью окраски бром этидием, и 200 нг – это максимальное количество, которое может быть разделено. Для образцов ДНК, содержащих несколько фрагментов, 0,1-0,5 мкг ДНК вносится в лунки размером 0,5 см. До 10 мкг ДНК может быть адекватно разделено для образцов, содержащих несколько фрагментов различных размеров.

Треки окраски (образцов). Широко распространены 2 вида окраски: голубой бромфенол и ксилен цианол. Ксилен мигрирует с ДНК-фрагментами 5 кБ и бромфенол голубой обычно мигрирует с ДНК-молекулами 0,5 кБ.

Бромфенол голубой обеспечивает индекс подвижности фрагментов быстро мигрирующих. Ксилен цианол полезен для мониторинга мигрирования длинных последовательностей.

Бромистый этидий. Бром этидий часто используется для прямой визуализации ДНК в гелях. Окраска распределяется между основаниями нуклеиновых кислот и флюоресцирует красно-оранжевым (560нм) светом в УФ лучах (260-360нм). Это позволяет определять очень малые количества ДНК (<5нг).

Маркеры молекулярного веса. Среди образцов, загружаемых в гель, по меньшей мере, одна линия должна содержать серии ДНК-фрагментов известных размеров так, чтобы стандартная кривая могла позволить вычислить размеры неизвестных ДНК-фрагментов. Большинство используемых маркеров молекулярного веса являются фрагментами рестрикции ДНК фага λ или меньшими фрагментами плазмиды pBR 322.

Электрофорез продуктов проходит в агарозном или полиакриламидном геле. Дорожки ДНК, включая маркеры молекулярного веса, можно увидеть с помощью окраски бромистым этидием и посредством ауторадиографии.

Фрагменты ДНК, соответствующие продукту ПЦР от материнской ДНК, должны быть видимыми при окраске бромистым этидием и могут служить мерой эффективности каждой реакции амплификации. Не должно являться сюрпризом появление некоторого числа других бэндов, особенно высокого молекулярного веса, которые являются неспецифическими продуктами ПЦР. Однако если реакция оптимизирована, специфический ПЦР-продукт должен преобладать. Проверка специфичности с помощью рестрикции эндонуклеазами (если продукт содержит сайт) или посредством гибридизации с внутренними олигонуклеотидами.

Перенос геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые фильтры. Выбор фильтра и метод переноса является индивидуальным преимуществом, однако, электроблоттинг из акриламидного геля на нейлоновые фильтры с последующим УФ является количественным методом для переноса и сохранения небольших количеств ДНК-фрагментов на фильтрах в течение множественных циклов гибридизации, разбирания и репробирования.

Если реакция амплификации была проведена с одинаковой эффективностью (которая может быть оценена посредством окраски бромистым этидием в геле), серии разведений должны давать монотонный убывающий сигнал одного доминирующего бэнда с увеличением разведений. Это должно давать возможность детектировать сигнал разведений, содержащих только одну или несколько молекул. Не должно быть сигнала у отрицательного контроля. Оценка числа молекул интересующей последовательности в каждом

образце может быть проведена путем сравнения с сериями известных разведений, подразумевая, что каждая реакция амплификации имела одинаковую эффективность.

Для большинства количественных анализов характерна очистка с помощью фильтров предшествующих проб путем кипячения в воде в течение 15 мин (если есть необходимость) и гибридизация с пробой, специфичной для множества единичных копий последовательности.

Сигналы, полученные путем денситометрического сканирования с помощью компьютера от серий разведений, позволяют построить стандартную кривую, нормализующую большую последовательность сигналов. Определение числа молекул в экспериментальных образцах проводится путем интраполяции на стандартную кривую.

Стандартная кривая в идеале должна давать линию связи ауторадиографического сигнала и количества ДНК. Однако, необязательно, чтобы это была линейная зависимость. В конце (от 0,1 до 1 копии на клетку), это может быть плато. Если это является проблемой, то необходимо уменьшить число циклов амплификации или изменить другие параметры.

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.

Возможные ошибки при детекции методом электрофореза.

Плохое разделение фрагментов ДНК. Наиболее частая причина плохого разделения фрагментов ДНК – неподходящий выбор % агарозы. Низкий % агарозный гель должен использоваться для разделения ДНК высокого молекулярного веса и высокопроцентный агарозный гель для ДНК низкого молекулярного веса. Расплывчатые бэнды, особенно ДНК-фрагменты малых размеров, результат диффузии ДНК в геле. Это особенно характерно тогда, когда происходит диффузия в течение длительного времени при низком напряжении.

Размазывание бэндов. Образование следов и размазывание ДНК-бэндов часто случается с фрагментами ДНК высокого молекулярного веса. Причиной этого является перегрузка ДНК-образцов или высокое напряжение.

Расплавление геля. Расплавление геля при электрофоретической сепарации является признаком того, что электрофорезный буфер не был включен в гель при приготовлении или является результатом испарения буфера. Для электрофореза с высоким напряжением в течение длительного промежутка времени, ТБЕ предпочтительней использовать, чем ТАЕ, т.к. он имеет высокую буферную емкость. Итак, емкости для мини и миди-гелей, которые обычно имеют малые буферные резервы, ведут к испарению геля наиболее часто.

Преимуществами ПЦР с электрофоретической схемой детекции являются:

- ✓ высокая специфичность;
- ✓ высокая чувствительность;
- ✓ возможность идентификации возбудителя в течение 4,5-5 часов;
- ✓ универсальность процедуры выявления различных возбудителей.

Помимо метода электрофореза существует и ряд других методов детекции продуктов амплификации (например, гибридизация со специфическими зондами), что определяет наличие различных модификаций ПЦР.

Идентификация ПЦР-продуктов с помощью электрофореза, являющегося наиболее простым методом детекции результатов исследования, налагает высокие требования к организации лаборатории для уменьшения риска контаминации реакционных смесей и клинических образцов ампликонами, что требует безукоризненного выполнения целого списка требований. Это связано с тем, что специфические продукты реакции попадают в окружающую среду на этапе детекции при переносе ампликона из реакционной пробирки в гель или планшет гибридизационного анализа. Перенос даже следовых количеств такого контаминирующего агента в реакционную пробирку приводит к амплификации специфического участка ДНК и ложнопозитивному результату. В

условиях постоянного увеличения потока анализов вероятность контаминации из-за ошибок персонала непрерывно возрастает, тогда как определение источника требует много времени и средств. Кроме того, регистрация полученных результатов субъективна и зависит от квалификации сотрудников, проводящих электрофорез.

Детекция продуктов амплификации **гибридизационно-ферментативным методом** с измерением интенсивности окраски образовавшегося продукта колориметрическим, флюоресцентным или хемилюминесцентными методами

Другим способом качественной и количественной оценки ПЦР является ферментно-гибридизационный метод (метод дот-гибридизации). Этот способ детекции является схожим по выполнению с иммуноферментным анализом, когда в лунке иммунологического планшета иммобилизован ДНК-зонд, с которым в результате гибридизации взаимодействует продукт амплификации, в дальнейшем в результате аффинного взаимодействия происходит связывание биотина и авидина с образованием биотин-авидинового комплекса. При этом меченный пероксидазой авидин выявляется ферментной реакцией с субстратом и дальнейшей регистрацией оптической плотности. В случаях, если вместо пероксидазы в авидин встроено флюоресцентное вещество (FITC и др.), то детекция должна осуществляться с использованием флюоресцентной техники. Возможны варианты, когда в авидиновый комплекс встраиваются рутений или другие вещества, способные к хемилюминесценции, и тогда оценка результатов проводится с использованием метода хемилюминесценции.

Использование одного или нескольких внутренних стандартов с известным количеством копий позволяет рассчитать содержание возбудителя в исследуемой пробе. В то же время большой разброс данных снижает достоинства этого метода. Тем не менее большинство зарубежных производителей систем для ПЦР-диагностики в целях количественной детекции пошло по пути ферментно-гибридизационного метода, основным преимуществом которого, несомненно, является сходство с методом иммуноферментного анализа (ИФА) и возможность использования приборного обеспечения, предназначенного для ИФА.

Перспективной в настоящее время видится разработка для детекции продуктов амплификации методов лантаноидного иммунофлюоресцентного анализа. Данный метод основан на использовании в качестве метки положительно заряженных ионов редкоземельных элементов – европия, самария, тербия и прозеодима, флюоресценция которых характеризуется высокой продолжительностью жизни атома в возбужденном состоянии (в 100–1000 раз превосходящем обычные флюорохромы), что необходимо для задержки регистрации флюоресценции, при этом успевают «затухнуть» центры неспеци-

фической флюоресценции, обычно присутствующие в реальном клиническом образце (белки, компоненты буферных смесей и т.д.); аномально большим стоксовским сдвигом (например, для хелатов европия возбуждение флюоресценции происходит при длине волны – 340 нм, а ее регистрация при – 615 нм, т.о. сдвиг составляет 250–270 нм).

Именно эти свойства лантаноидных флюорохромов позволяют снизить ошибку флюоресцентного анализа, связанную с неспецифической флюоресценцией фона и вторичным поглощением флюоресценции.

Детекция продуктов амплификации методом конъюгации с моноклональными антителами с выявлением количества ампликонов.

Используется детекция продуктов амплификации с использованием флюоресцеирующих моноклональных антител к специфическим ампликонам (цепочкам ДНК), характеризующим тот или иной геном возбудителя или участок гена с определенными искомыми свойствами (HLA-типирование, генные мутации, наследственные и онкологические заболевания и т.д.). Используя проточную цитометрию, с высокой точностью можно определять количество ампликонов и так называемую нагрузку возбудителем.

Весьма перспективным методом количественного ПЦР анализа является метод ПЦР в режиме реального времени.

Метод гибридизационного анализа, также используемый для детекции ПЦР продуктов, является более объективным, так как интерпретация полученных результатов может проводиться в автоматическом режиме при наличии специального программного обеспечения. Однако применение этого метода, также как и электрофореза, невозможно без проведения всех организационно-методических мероприятий, направленных на предупреждение возможной контаминации биологических образцов.

ПЦР в режиме реального времени (Реал-тайм ПЦР)

В последние годы интенсивно развивается новый подход к проведению ПЦР и детекции продуктов амплификации, позволяющий повысить специфичность и чувствительность реакции, а также проводить не только качественную, но и количественную оценку реакции – Реал-тайм ПЦР. Сегодня метод количественного определения продуктов ПЦР непосредственно во время амплификации становится одним из наиболее популярных методов как в клинической генодиагностике, так и в научных исследованиях

Кроме снижения трудозатрат и увеличения достоверности результатов метод ПЦР в режиме реального времени обладает целым рядом других важнейших преимуществ, таких как возможность количественной оценки исходного наследственного материала, а так же параллельную детекцию до 4-х инфекций в одном образце.

Таким образом, Реал-тайм ПЦР – это метод количественной ПЦР со следующими чертами:

- Определение выхода продукта реакции после каждого цикла амплификации.
- Построение по этим данным кинетической кривой ПЦР.
- Определение относительной концентрации субстрата на основании анализа этой кривой.

Сущность метода заключается в детекции накопления флюоресценции реакционной смеси, при этом интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР. Важнейшей особенностью метода является синхронизация регистрации и амплификации, что дает возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого наследственного материала.

Для того чтобы полностью исключить ложноположительные сигналы, связанные с накоплением в процессе ПЦР побочных продуктов амплификации (праймеры-димеры, неспецифические полосы и шмеры), используется построение так называемых кривых плавления для определения температур денатурации получаемых в ходе реакции продуктов амплификации. Зная температуру плавления продуктов амплификации, синтезировавшихся в данном эксперименте, и температуру плавления специфических ампликонов, можно сделать точный вывод о присутствии исследуемой ДНК в анализируемой пробе.

Для детекции ПЦР-продукта используются флюоресцентные красители, обеспечивающие флюоресценцию, прямо пропорциональную количеству ПЦР-продукта - репортерную флюоресценцию.

Кинетическая кривая ПЦР в координатах «Уровень репортерной флюоресценции – цикл амплификации» имеет сигмоидную форму (рисунок 3.5).

Для детекции продуктов амплификации используется несколько подходов:

1. Детекция специфического продукта амплификации с использованием меченых флюоресцентными агентами олигонуклеотидных комплементарных участку ПЦР-продукта.

В реакционную смесь добавляют флюоресцентно меченные олигонуклеотидные пробы, способные присоединяться (гибридизироваться) к сегментам ДНК-мишени, в их состав входит ковалентно присоединенные флюоресцентная метка (флюорофор) и «тушитель» флюоресценции. Так как спектр и эмиссия «тушителя» перекрывает спектр и эмиссию флюорофора происходит блокировка флюоресцентного сигнала (FRET эффект). По мере накопления продукта ПЦР в ходе амплификации происходит освобождение флюоресцентной метки от пробы, тем самым флюорофор освобождается от свя-

зи с «тушителем», что приводит к усилению флюоресценции. При этом интенсивность флюоресценции пропорциональна количеству специфического продукта ПЦР реакции, т.е. чем больше ампликонов было наработано в образце на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение.

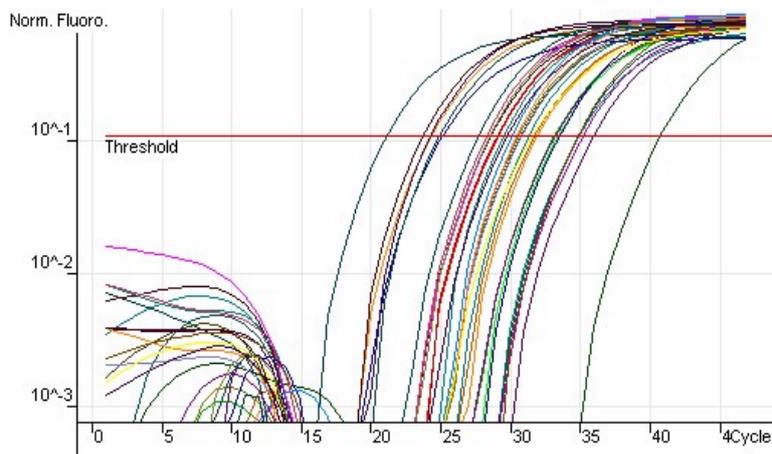
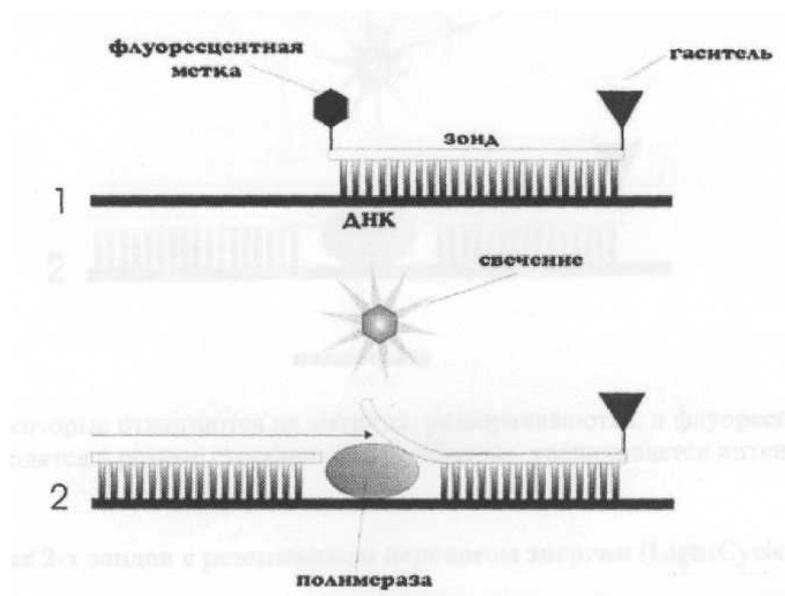


Рисунок 3.5 - Кинетические кривые накопления продуктов амплификации в ходе ПЦР в реальном времени при выявлении ДНК

Меченые олигонуклеотидные пробы используют в технологиях TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler.

1.1. TaqMan PCR – выщепление 5' концевой метки – основан на использовании 5'-эксонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-пробы, меченные на 5'-конце флюоресцентным красителем (FAM, TET, VIC, JOE), а на 3'-конце – фосфатной группой и гасителем флюоресценции (TAMRA). Пробы комплементарны участку амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флюоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа блокирует полимеразу.

При отжиге праймеров проба количественно связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибризованного с пробой, начинает расщеплять пробу за счет 5'-эксонуклеазной активности. В результате флюоресцентная метка отделяется от гасителя, и ее свечение может быть детектировано. Таким образом, увеличение флюоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного ПЦР-продукта (рисунок 3.6).



1 стадия – Проба имеет на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – фосфатной группой и «тушителем» флуоресценции, который блокирует испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа блокирует ДНК полимеразу.

2 стадия - ДНК-полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридизированного с пробой, начинает ее расщеплять за счет 5'-эксонуклеазной активности, в результате флуоресцентная метка отделяется от «тушителя», и ее свечение может быть детектировано.

1.2. Molecular Beacons – использование зондов с комплементарными концевыми последовательностями – отличается от TaqMan тем, что концы пробы, на которых находятся соответственно метка (FAM, TAMRA, ROX) и тушитель флуоресценции, комплементарны друг другу. В результате, при температуре отжига праймеров они схлопываются и образуют структуру типа "ручки сковородки" (stem-loop), где зона комплементарности пробы с матрицей находится в петле. При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается, флуоресцентная метка и тушитель расходятся в разные стороны, и флуоресценция от метки может быть детектирована (рисунок 3.7).

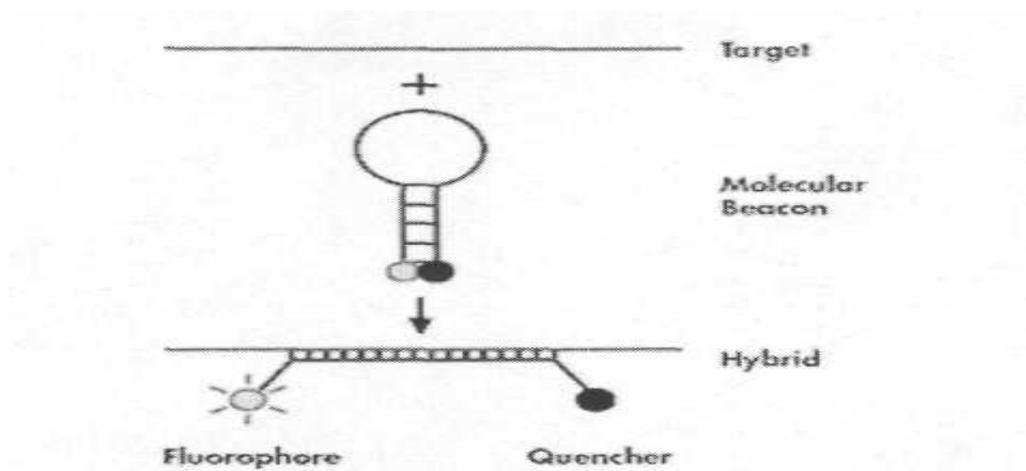


Рисунок 3.7 - Принцип Molecular Beacons

1.3. В методике Light Cycler – применение 2-х зондов с резонансным переносом энергии - используется две пробы, меченные флюоресцентной меткой. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флюорофора, находящегося на 3' конце первой пробы, ко второму флюорофору, находящемуся на 5' конце второй пробы, который происходит в том случае, когда расстояние между флюорофорами составляет 1 -3 нуклеотида (рисунок 3.8).

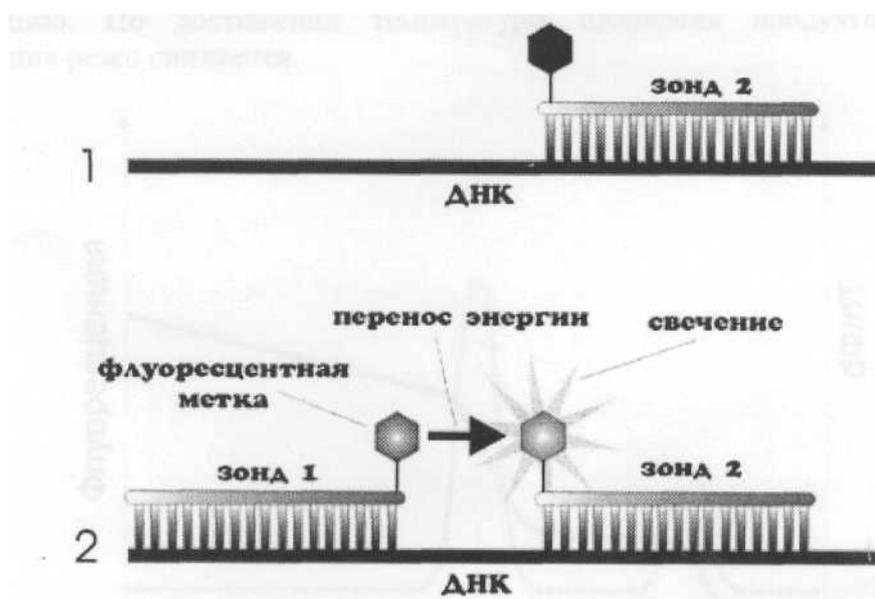


Рисунок 3.8 - Принцип LightCycler

1 стадия – В реакционной смеси внесены 2 пробы с флюоресцентными метками (флюорофорами), флюоресценции нет.

2 стадия – В процессе амплификации ДНК расстояние между флюоресцентными метками сокращается до 1-3 нуклеотидов, в результате чего происходит индуктивно- резонансный перенос энергии электронного возбуждения и регистрируется флюоресценция.

Данный способ детекции накопления продуктов амплификации отличается повышенной специфичностью, так как увеличение флюоресценции происходит только при комплементарном связывании с ампликонами сразу 2-х ДНК зондов.

Таким образом, неоспоримым достоинством использования ДНК-зондов является возможность непосредственной детекции специфических ампликонов, невзирая на присутствие неспецифических продуктов амплификации, что повышает специфичность анализа, кроме того этот диагностический подход позволяет выявлять ассоциации возбудителей в одной биологической пробе ходе амплификации (multiplexing reaction PCR). К недостаткам этого метода идентификации накопления продуктов амплификации следует отнести высокую стоимость зондов, меченных флюоресцентной меткой, что делает процесс подбора оптимального дизайна зондов, праймеров и условий амплификации весьма дорогостоящим.

2. Детекция всех продуктов амплификации – применение интеркалирующих флюоресцентных агентов.

В качестве интеркалирующего (встраивающегося) красителя наиболее часто используют бромистый этидий и SYBR Green. Этот способ основан на том факте, что флюоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в двойную цепь молекулы ДНК (рисунок 3.9). Важно отметить, что увеличение флюоресценции может быть связано как с накоплением специфического ПЦР-продукта, так и неспецифического - праймер-димеры, шмер.

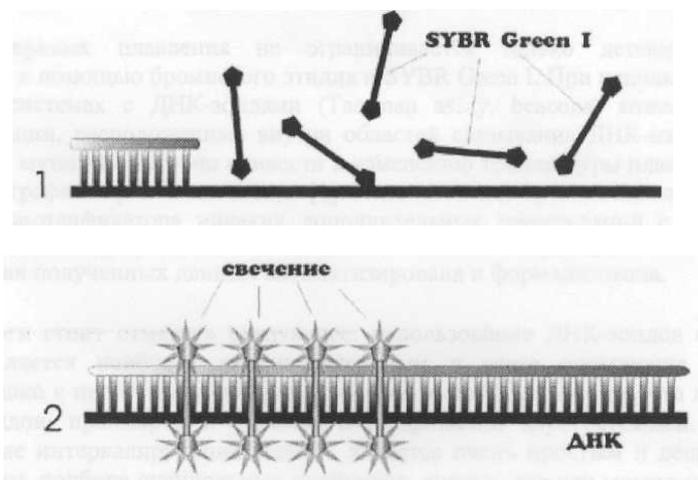


Рисунок 3.9 - Принцип действия интеркалирующих флюоресцентных агентов

1 стадия – Молекулы интеркалирующих красителей находятся в свободном состоянии, флюоресцентный сигнал низкий.

2 стадия – Интеркалирующий краситель встраивается в двухцепочечную молекулу ДНК, флюоресцентный сигнал значительно увеличивается.

Использование интеркалирующих агентов является простым и дешевым, так как при этом отпадает необходимость подбора специальных праймеров, зондов, так как можно пользоваться праймерами, эффективность работы которых уже проверена. Эти обстоятельства делают применение интеркалирующих агентов весьма привлекательным, в то же время эта методика подходит только для выявления одного возбудителя в одной биологической пробе (singleplex reaction PCR).

Для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение полученных ампликонов с помощью построения «кривых плавления» (melting curves). Температура плавления определена как температура, при которой половина дуплекс ДНК становится одноцепочечной. При этом после проведения ПЦР пробирки медленно нагревают от 55°C до 95°C, определяя при этом флюоресценцию через каждые 0,1-0,5°C. При достижении температуры плавления продукта ПЦР происходит его денатурация, сопровождаемая диссоциацией молекул ДНК и интеркалирующего красителя, что ведет к резкому уменьшению уровня измеряемой флюоресценции (рисунок 3.10).

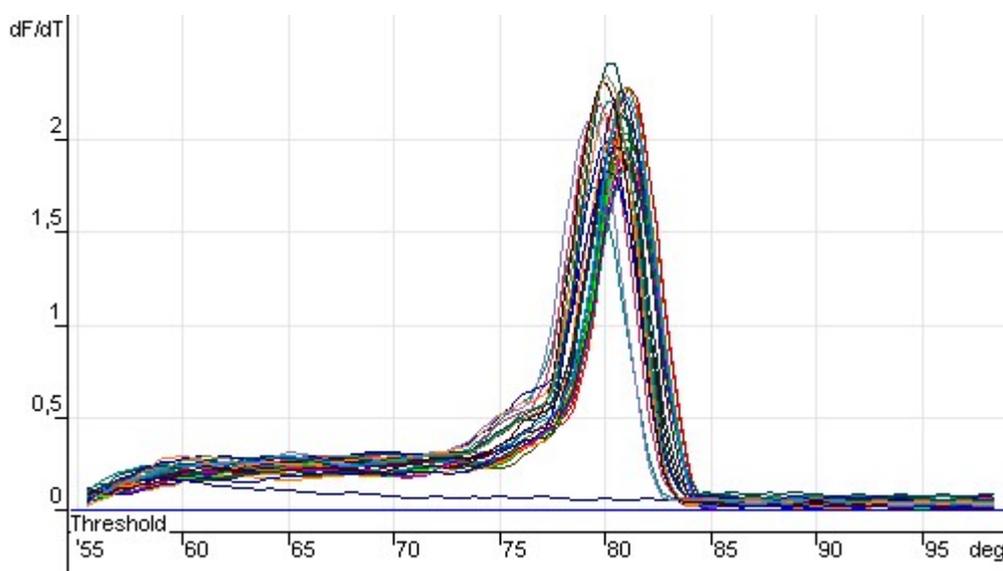


Рисунок 3.10 - Кривые плавления продуктов амплификации при проведении ПЦР в режиме реального времени при выявлении ДНК

Специфический продукт амплификации ДНК имеет температуру плавления, отличную от температуры плавления неспецифических продуктов ПЦР

и праймер-димеров. При отсутствии исследуемой ДНК будут отсутствовать пики плавления. Наличие неспецифических продуктов амплификации, праймеров-димеров и т.д. приведет к появлению пиков с другой температурой плавления, отличающейся от температуры плавления специфических ампликонов.

Для облегчения работы с полученной информацией проводят дифференциальный анализ кривой плавления, что не требует от оператора никаких дополнительных манипуляций с пробирками, а интерпретация полученных данных автоматизирована и формализована.

Применение кривых плавления не ограничивается только детекцией продуктов амплификации с помощью интеркалирующих красителей, но и в системах с ДНК-зондами (Molecular Beacons, TaqMan) возможно различать точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда. Наличие мутаций приводит к изменению температуры плавления зонда и изменениям в графике кривой плавления.

Анализ количественного уровня ДНК. Анализ кинетической кривой ПЦР позволяет определить относительную концентрацию субстрата, который основывается на сопоставлении кинетики реакции в исследуемых и стандартных образцах, при этом используются разведения контрольного образца (положительного контроля) с известной концентрацией геномной ДНК. Концентрация стандартных разведений следующая: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 копий/мкл. Таким образом, стандартная кривая представляет собой серию threshold cycles (C_t) стандартных разведений. Образцы с высоким уровнем ДНК имеют низкий (C_t), а низкое значение ДНК – высокий уровень C (рисунок 9). Каждый образец следует исследовать в дублях для получения корректных результатов. Калькуляция ДНК концентрации в образцах высчитывается по наклону стандартной кривой (таблица 3.3).

Для постановки Реал-тайм ПЦР необходим специальный прибор, который состоит из трех блоков: амплификатора (термического блока), флуоресцентного детектора и компьютера.

Термический блок, как правило, рассчитан на 36-96 образцов с использованием прозрачных ПЦР-пробирок или микропланшетов стандартного формата (исключение составляет прибор «Лайт Сайклер» компании Хофман-Рош, в котором ПЦР проводится в капиллярах). Регистрация флуоресцентного сигнала происходит одновременно во всех образцах. Данные отображаются на экране компьютера для каждой пробы. По окончании анализа автоматически строится калибровочная кривая, и рассчитывается содержание исследуемого материала в образцах.

Таблица 3.3 – Результат анализа концентрации ДНК *Ureaplasma urealyticum* в биологических пробах

№.	Цвет	Номер	Предполагаемая концентрация (число копий в мл)	Рассчитанная концентрация (число копий в мл)	% Вариации	Ct
1		1.1	16000,00	15797,45	8,02%	27,32
2		1.2	16000,00	16294,40	8,63%	27,04
3		2.1	8000,00	7051,16	11,86%	28,45
4		2.2	8000,00	8426,75	5,33%	28,15
5		3.1	4000,00	4010,16	0,25%	29,4
6		3.2	4000,00	3939,33	1,52%	29,43
7		4.1	2000,00	2187,78	9,39%	30,42
8		4.2	2000,00	1863,56	6,82%	30,69
9		5.1	1000,00	816,07	18,39%	32,08
10		5.2	1000,00	1312,58	31,26%	31,28

Оптический модуль содержит источник света и несколько пар эмиссионных-экстинционных фильтров, либо установленных стационарно, либо сменных, а также регистрирующее устройство. Прибор, позволяет одновременно использовать несколько флюорофоров, конъюгированных с разными специфическими ДНК-зондами. Таким образом, появляется возможность одновременного исследования нескольких типов ДНК-фрагментов, например, несколько до 4-х инфекций в одной пробе – мультиплексная Реал-тайм ПЦР.

Однако, такой тип исследований, как правило, ставит перед исследователем определенные технологические проблемы, например, подбор флюориметрических красителей с неперекрывающимся спектром излучения. Способы их решения тесно связано с возможностями, заключенным в конструкции анализатора: сменные фильтры позволяют значительно расширить список флюорофоров и выбрать оптимальную комбинацию.

Использование математических методов анализа позволяет проводить автоматическую интерпретацию полученных результатов и снимает проблему субъективной оценки электрофореграмм.

Таким образом, совмещение этапов амплификации и детекции в методе ПЦР в реальном времени позволяет существенно повысить достоверность ПЦР, исключив возможность контаминации, а также значительно сократить трудоемкость исследования, задействовав в аналитическом процессе минимум сотрудников.

Благодаря возможности количественной оценки и одновременного анализа нескольких параметров, метод ПЦР в режиме реального времени предоставляет исследователю принципиально новые возможности в молекулярной биологии.

Преимущества Реал-тайм ПЦР:

- ❖ возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации;
- ❖ отсутствие стадии электрофореза;
- ❖ автоматическая регистрация и интерпретация результатов;
- ❖ количественное определение нуклеиновых кислот в каждой пробе.

Преимущества Реал-тайм ПЦР по сравнению с культуральными методами исследования:

- ✓ определение концентрации возбудителя, выраженное в числе бактериальных клеток/мл, а не в условных единицах (ЦИЕ);
- ✓ не зависит от падения титра жизнеспособных возбудителей в процессе хранения и транспортировки материала;
- ✓ универсальность методики, может сочетаться с исследованиями на другие возбудители;
- ✓ отсутствие необходимости в повторном заборе материала.

Принцип метода заключается в естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей нуклеиновых кислот и комплементарный синтез новых нитей ДНК. Метод ПЦР обеспечивает многократное приумножение (амплификацию, amplification – усиление, увеличение) в условиях *in vitro* фрагментов генома и быстрое накопление практически в любых количествах определенной, интересующей исследователя последовательности ДНК, которая первоначально может быть представлена всего лишь одной молекулой.

В результате получают количество материала, достаточное для проведения анализа обычными методами детекции.

Сущность метода ПЦР составляет многократный циклический процесс, попеременно включающий полимеразную реакцию и денатурацию синтезированного фрагмента двунитевой ДНК и отжиг праймеров, что в конечном счете может привести к неограниченному увеличению исходного материала.

Необходимые компоненты для проведения ПЦР:

1. Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из 15–30 нуклеотидов, комплементарных сайтам (участкам) на идентифицируемой матричной ДНК.

2. Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитидинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – «строительный материал», используемый Таq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

3. Таq-ДНК-полимераза (термостабильный фермент). Она способна удлинять короткие олигонуклеотидные последовательности (праймеры), при-

соединяя к их 3'-концу дополнительный нуклеотид при условии, что праймер, как уже отмечалось, комплементарен сайту цепи ДНК (матрице). Нарращивание длины праймера с помощью полимеразы происходит до тех пор, пока не будет достигнут 5'-конец матрицы. Экспериментально доказано, что процесс амплификации проходит более эффективно при использовании Таq-ДНК-полимеразы.

4. Буферный раствор для обеспечения оптимальных условий работы.

5. Ионы магния (Mg^{2+}) – катализатор фермента Таq-ДНК-полимеразы.

6. Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, служащий мишенью для последующего многократного копирования (например, ДНК микроорганизмов). При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

7. Положительный контроль – образец ДНК выделяемой биологической системы.

8. Минеральное масло – наслаивается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения и разбрызгивания продуктов ПЦР в случаях, если не применяется амплификатор с горячей крышкой.

Приборы. Важным фактором воспроизводимости реакции амплификации является приборное обеспечение. Основным прибором для проведения ПЦР является амплификатор (термоциклер), представляющий собой аппарат, в гнезда которого устанавливаются специальные амплификационные пробирки, изготовленные из особого термопроводимого пластика, с реакционной смесью или предметные стекла с образцами тканей.

Кроме надежности амплификатора и точности поддержания температуры, следует упомянуть о таком важном свойстве приборов, как использование активного регулирования, позволяющего добиваться достижения нужной температуры реакционной смеси внутри пробирки в существенно более короткие сроки, чем при обычном регулировании.

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в ходе реакции амплификации с ней происходит ряд процессов, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Параметры температурного режима играют исключительно важную роль для успешного проведения реакции.

Каждый цикл амплификации состоит из 3-х этапов: денатурации ДНК, отжига и синтеза.

В результате нагревания (обычно до 92–95°C в течение 40–50 с) двойная цепь ДНК разделяется на 2 отдельные цепи, т.е. происходит денатурация ДНК. Длительная денатурация необязательна, более того, именно не-

продолжительное воздействие повышенных температур способствует сохранению высокой активности полимеразы в течение всего исследования.

Далее следует отжиг, или присоединение праймеров. На данном этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. При создании оптимальной температуры (обычно 40–65°C) происходит комплементарное связывание праймера с соответствующим участком ДНК: один праймер – на одной цепи, другой – на другой цепи ДНК. Отжиг протекает в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если данное условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

Температура отжига праймера в значительной степени влияет на специфичность получаемого продукта ПЦР. Она определяется длиной праймера и содержанием Г-Ц-пар.

Элонгация (синтез). На данном этапе происходит достраивание праймеров. Температуру реакционной смеси доводят до оптимальной для активности Таq-ДНК-полимеразы (=72°C), которая начинает достраивание второй цепи ДНК из дНТФ.

В завершение первого цикла ПЦР из одной образуются 2 новые молекулы ДНК, идентичные оригиналу, но не по всей длине ДНК, а только в тех участках, которые ограничены присоединением праймеров. То есть дочерние молекулы ДНК идентичны не всей материнской ДНК, а только ее части.

Следует отметить, что во время первого цикла удлинение новой цепочки от праймера заканчивается произвольно. Однако со второго цикла в смеси начинают накапливаться специфические продукты амплификации – ампликоны, которые ограничены по длине 2-мя праймерами. Именно ампликоны и являются непосредственным предметом детекции, которую проводят с помощью электрофореза либо других методов.

Во втором цикле ПЦР образованные из одной материнской ДНК два синтезированных участка ДНК также служат матрицей (шаблоном) для последующих циклов ПЦР. Начиная с третьего цикла, в процессе синтеза образуются отрезки ДНК (ампликоны) со строго определенным количеством нуклеотидных последовательностей и, соответственно, с определенной молекулярной массой, что позволяет в процессе классического метода детекции – гель-электрофореза, легко выявить такие ампликоны. I цикл ПЦР дает 2 копии ДНК, затем 4, 8, 16 и т.д., т.е. в результате каждого проведенного цикла количество синтезированных копий удваивается. Данный процесс повторяют 20–30 раз, что обеспечивает синтез как минимум 1 млн. Результатом цикли-

ческого синтеза является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК.

Экспоненциальный характер увеличения числа копий ДНК носит только при первых 20 – 25 циклах. В дальнейшем в результате истощения дНТФ, праймеров, снижения активности Taq-ДНК-полимеразы и др. причин увеличение количества образующихся копий прекращается.

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.

Описанный метод «классической» направленной полимеразной цепной реакции, который используется в тест-системах первого поколения, претерпевает значительные изменения, связанные с разработкой и внедрением различных тест-систем (в том числе и отечественных) для ПЦР-диагностики второго (применяемых для количественного анализа ДНК (РНК)), и третьего («сухих» тест-систем, находящихся в стадии разработки) поколений, а также различных модификаций ПЦР (лонг-ПЦР, гнездовая ПЦР, РТ-ПЦР, LIPA-ПЦР-технология, ПЦР *in situ*, мультиплексная ПЦР) и альтернативных методов амплификации нуклеиновых кислот.

Полимеразная цепная реакция гнездовая (nested-PCR – nested-polymerase chain reaction). Принцип метода заключается в поэтапном проведении полимеразной цепной реакции: в начале с парой внешних праймеров, затем с парой внутренних праймеров. Разработана в целях повышения чувствительности и специфичности и проводится в два этапа. На первом этапе осуществляется амплификация определенного гена искомой ДНК с «внешними» праймерами: проводится от 30 до 35 циклов. После этого часть амплификата (аликвоту) помещают во вторую пробирку с ПЦР-смесью и проводят 30–35 циклов амплификации с так называемыми «внутренними» праймерами (участки нуклеотидных последовательностей, отстоящие от внешних праймеров на их длину). Получаемый продукт отличается высокой специфичностью и в дальнейшем подвергается детекции.

Обратно-транскрипционная ПЦР – ОТ-ПЦР (RT-PCR – reverse transcription – polymerase chain reaction). Методика позволяет осуществлять ПЦР с РНК-содержащими возбудителями, считывая информацию с РНК и создавая подобную ей ДНК. Выполнение данного процесса возможно при использовании специальных ферментов, обладающих обратно-транскрипционными свойствами (RT), и дезоксирибонуклеотидфосфатов. При помощи фермента обратной транскриптазы или ревертазы (RT) и одного цикла амплификации по специальной программе – RTM: (+42°C – 30 мин; +99°C – 5 мин; охлаждение до 4°C) осуществляется обратная транскрипция РНК:

одна нить РНК превращается в двойную комплементарную ДНК, а дальше ДНК может быть амплифицирована «классической» или «гнездной» ПЦР.

Лонг-ПЦР (Long-PCR) – модификация ПЦР, разработанная для амплификации и последующего исследования протяженных участков ДНК. Принцип метода заключается в увеличении времени полимеризации и подбора новых разновидностей Taq-ДНК-полимеразы, обладающих эндонуклеазной (редактирующей) активностью, т.е. способных вырезать ошибочные (некомплементарные) нуклеотиды.

LiPA-ПЦР. Методика полимеразной цепной реакции с обратной дот-блот-гибридизационной детекцией на стрипах (полосках бумаги с иммобилизованными ДНК-зондами). Метод применяется для HLA-типирования и выявляет более 400 аллелей HLA-Class I и II – главного комплекса гистосовместимости. Данная методика является достаточно дорогой, но в тоже время благодаря своей надежности и точности получила самую широкую апробацию во всем мире. Методика позволяет также осуществлять ПЦР-HLA-генотипирование генного локуса HLA-DQa, что может использоваться в судебно-медицинской экспертизе, а также для установления отцовства или родства.

ПЦР in situ (PRINS — polymerase reaction in situ). Метод сравнительно недавно предложен для практики, аналогичен методу ISH (in situ hybridization) и позволяет проводить ПЦР на срезе или в мазке. Метод хорошо себя зарекомендовал и используется в онкологии, хотя спектр его применения не ограничивается онкологическими заболеваниями. В данном методе отсутствует пробоподготовка. При этом используется та же ПЦР-смесь, что и в «классическом» методе, однако сама реакция проходит на поверхности среза. Для проведения данной методики требуется специальный амплификатор, в котором изменяется температура воздушных потоков, создаваемых в микроколориметре, куда устанавливаются покровные стекла со срезами и реакционной смесью. Детекцию результатов проводят с использованием ферментативно-гибридизационного метода с визуальной оценкой полученных результатов в обычном световом микроскопе. Данный метод позволяет определить: 1) типы клеток, в которых произошли изменения; 2) распределение измененных клеток в ткани, т. е. оценить степень повреждения; 3) провести сравнение с результатами гистологических и цитохимических исследований в адекватных условиях.

Мультиплексная ПЦР (multi-PCR – multi-polymerase chain reaction). Методика позволяет проводить ПЦР с двумя–четырьмя и более не перекрывающимися праймерами нескольких возбудителей. Мультиплексная ПЦР позволяет определить в одной пробе нуклеиновые кислоты сразу нескольких возбудителей, что особенно актуально, т.к. часто при диагностике

обнаруживаются смешанные формы инфицирования. Такой подход уже используется в диагностической практике. Так Mahony et al. публиковали результаты испытаний ПЦР-диагностикумов, позволяющих одновременно определять *S. trachomatis* и *N. gonorrhoeae* с высокой чувствительностью (100% и 92,3% соответственно). Имеются диагностикумы на основе принципа множественной амплификации для выявления *T. pallidum*, *H. ducreyi* и вируса герпеса простого.

В последнее время для выявления ДНК-мишени используются альтернативные методы, при этом не уступающие по чувствительности и специфичности методикам, основанным на методе ПЦР, но существенно более быстрые по времени выполнения. Принципы этих методов несколько отличны от классического варианта ПЦР.

Лигазная цепная реакция – ЛЦР (LCR – Ligase chain reaction). Метод амплификации, включающий последовательные циклы лигирования (соединения) четырех олигонуклеотидных зондов, комплементарных цепям ДНК-матрицы. Метод впервые описан в 1989 году. В нем используется способность ДНК-лигазы соединять две пары комплементарных олигонуклеотидов после их гибридизации с последовательностями мишени *in vitro*. Основными компонентами ЛЦР являются: лигаза, два или четыре специфических праймера и буфер для цепной реакции. В ряде случаев набор может содержать и другие вспомогательные компоненты для осуществления лигазной цепной реакции.

Линейная амплификация специфических зондов происходит при лигировании одной пары олигонуклеотидов. При использовании двух пар олигонуклеотидов, одна из которых комплементарна верхней цепи ДНК-матрицы, а вторая – нижней, достигается экспоненциальная амплификация. На первом этапе происходит гибридизация двух пар олигонуклеотидных зондов с ДНК-матрицей при температуре +65°C. Затем происходит лигирование олигонуклеотидов в месте их соединения с образованием более длинного продукта, связанного с матрицей. Специфичность реакции обеспечивается тем, что любое нарушение гомологии в области стыка двух олигонуклеотидов сразу же предотвращает их лигирование. На втором этапе реакционную смесь нагревают до +94°C. При этом происходит денатурация и отделение лигированного продукта от матрицы. При последующем охлаждении до +65° С процессы гибридизации и лигирования повторяются. Вновь образованные продукты лигирования выступают в качестве матриц в последующих циклах реакции. В ходе ЛЦР происходит экспоненциальное увеличение количества исходных продуктов лигирования. Поскольку один из нуклеотидов, участвующих в ЛЦР, ковалентно связан с гаптенем или лигандом, таким, например, как биотин, а другой – с репортерной группой, такой,

например, как щелочная фосфатаза, выявление продуктов амплификации может происходить непосредственно после амплификации без использования электрофореза или секвенирования ДНК.

Лигазная цепная реакция с заполнением брешки. Модификация ЛЦР, в ходе которой две пары олигонуклеотидных праймеров гибридизуются с комплементарными цепями ДНК-матрицы, но на некотором расстоянии друг от друга. Образовавшаяся брешка заполняется нуклеотидами с помощью ДНК-полимеразы, а затем в реакцию вступает ДНК-лигаза, осуществляя лигирование в месте стыка.

Мультиплексная ЛЦР (multi-LCR – multi-ligase chain reaction). Для ЛЦР так же, как для ПЦР, была разработана методика одновременного определения в одном образце хламидий и гонококка, хотя обработка материала для выявления каждого из этих агентов проводится в лаборатории раздельно.

Метод транскрипционной амплификации – ТА (TAS – Transcription-based amplification system). Открытие данного метода послужило толчком к развитию и разработке альтернативных изотермических методов транскрипционной амплификации. В реакции участвуют T7 РНК-полимераза, обратная транскриптаза AMV, выделенная из Avian myeloblastosis virus, два специфических праймера, один из которых длиной около 45 нуклеотидов, примерно 20 из них на 3'-конце комплементарны 3'-концу матрицы, а 5'-конец праймера содержит промотор (т.е. отвечает за начало работы фермента и может распознаваться T7 РНК-полимеразой) и второй праймер, состоящий примерно из 20 нуклеотидов, комплементарный антипараллельной цепи матрицы. После завершения каждого цикла образуется от 100 до 1000 копий РНК с определенным количеством нуклеотидных последовательностей. Для повторения цикла необходимо провести денатурацию при +95°C с целью расщепления ДНК-РНК-гибрида на отдельные цепи, и в дальнейшем процесс повторяется. Однако трудности, связанные с периодическим нагреванием амплификационной смеси для повторения циклов, привели к разработке метода 3SR, в котором вместо нагревания используют РНКазу H.

Самопроизвольная репликация последовательностей (3SR – Self-sustained sequence replication). Метод обеспечивает изотермальную амплификацию РНК-матрицы за счет совместного действия трех ферментов – обратной транскриптазы AMV РНКазы H и T7 РНК-полимеразы. При этом за 1–2 ч количество исходного генетического материала возрастает в 10 миллионов раз.

С помощью метода 3SR можно эффективно амплифицировать одноцепочечную РНК, однако процедура становится более сложной при использо-

вании в качестве матрицы двухцепочечной ДНК. В этом случае в реакцию включают дополнительный этап – денатурацию нагреванием.

На базе метода 3SR разработан коммерческий метод амплификации РНК (ДНК) – **NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification)**, запатентованный фирмой «Cangene corporation» (Canada). Фирмой «Organon-Teknika» (Голландия) по этой технологии производится большое количество диагностических тест-систем. Метод применяется для качественного определения рибосомной РНК хламидий в эндоцервикальных, уретральных образцах, а также в пробах мочи.

Амплификация специфической рРНК-мишени происходит с образованием промежуточных ДНК-продуктов. Обнаружение амплифицированных последовательностей рРНК (ампликонов) осуществляется с использованием гибридизации нуклеиновых кислот. Применяется комплементарный ампликону одноцепочечный ДНК-зонд, несущий хемилюминесцентную метку. Меченый ДНК-зонд гибридизуется с ампликоном с образованием стабильного РНК-ДНК-гибрида. Отделение гибридов от зондов, не вступивших в реакцию гибридизации, проводится с помощью специального реагента на люминометре.

Среди преимуществ метода NASBA можно отметить следующие: выполняется при постоянной температуре, не требует специального лабораторного оборудования (кроме термостата), значительно короче по времени, так как достаточно провести 5 циклов (за один цикл синтезируется от 100 до 1000 копий РНК). Данный метод нашел свое применение не только в диагностике инфекционных заболеваний, но и в выявлении генетических дефектов, диагностике и контроле терапии рака, а также для контроля пищевых продуктов, в ветеринарии, в судебной медицине, в сельском хозяйстве.

Амплификация с вытеснением цепи – АВЦ (SDA – Strand Displacement Amplification). Метод основан на изотермальной амплификации ДНК. В реакции экспоненциальной амплификации участвуют специфические праймеры, ДНК-полимераза (полимераза экзо-Vca) и рестрикционная эндонуклеаза (VsoVI). Действие ферментов и повторяющиеся многократно циклы проходят без смены температуры. При этом вначале рестрикционная эндонуклеаза расщепляет ДНК на участки, разделяя двойные нити ДНК, затем происходит присоединение специфических праймеров к участкам ДНК и на заключительном этапе осуществляется достройка праймеров ДНК-полимеразой, после чего цикл повторяется. Имеются сообщения, что после 2 ч инкубации уровень амплификации достигал 10 млн. Нагревание образца до +95°C используют только на начальном этапе реакции для того, чтобы обеспечить денатурацию ДНК. Затем реакцию проводят без смены температурных режимов. Постановка АВЦ не требует использования специального

лабораторного оборудования, за исключением контролируемого термостата на +37°C. Метод позволяет амплифицировать как одноцепочечные, так и двухцепочечные ДНК. Недостатком метода можно считать большую, чем при проведении ПЦР, опасность контаминации ампликонами, что обусловлено трудностями инактивации коротких (50–100 пар нуклеотидов) продуктов амплификации.

Метод с использованием QВ-репликазы. Основан на гибридизации матрицы с молекулой РНК, в которую встроен специфический короткий одноцепочечный РНК-зонд. После гибридизации в реакцию вступает фермент QВ-репликазы, осуществляющий экспоненциальную амплификацию специфического зонда. Репликация происходит с очень большой скоростью. Теоретически за 13 мин при +37°C получают 1000 млрд. копий фрагментов РНК длиной 200 нуклеотидов. При этом фермент QВ-репликазы, выделенный из вирусов, способен с высокой скоростью осуществлять наработку специфического зонда. На первом этапе реакции происходит денатурация ДНК-матрицы при температуре +85°C. После охлаждения реакционной смеси в нее вносят матрицу для QВ-репликазы со встроенным олигонуклеотидным зондом, а также специфические улавливающие зонды. Реакционную смесь инкубируют при +37°C в течение 30 мин для осуществления гибридизации. Если имеются специфические фрагменты, то проходит гибридизация, если нет – то матрица для QВ-репликазы будет удалена в процессе отмывания. Затем добавляют QВ-репликазу, и в том случае, если гибридизация прошла, осуществляется и амплификация. Детекцию продуктов амплификации проводят одним из стандартных методов. Весь процесс, включая гибридизацию, амплификацию и выявление продуктов амплификации, может быть завершен за 2–3 ч. Проведение этой изотермальной реакции не требует применения специального лабораторного оборудования, за исключением термостата. Если удастся разрешить проблему неспецифического фонового сигнала, то простота постановки реакции и огромная скорость амплификации позволят превратить метод с использованием QВ-репликазы в один из наиболее перспективных.

Полученное в процессе амплификации значительное количество нуклеиновых кислот в дальнейшем проходит третий этап – *детекцию*.

К настоящему времени разработано несколько направлений детекции продуктов амплификации.

Секвенирующая ПЦР

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК.

Принцип секвенирования достаточно прост и заключается в том, чтобы получить серию комплементарных молекул ДНК, различающихся по

длине на одно основание. На практике методика секвенирования представляет собой весьма трудоемкую задачу.

Основные методы секвенирования:

- химический – метод Максама-Гильберта, где используют химическое расщепление ДНК по одному основанию;
- дидезоксисеквенирование – метод Сэнджера, синтезируют нужную цепь ДНК, специфически останавливая синтез на заданном основании.

В соответствии с методом Сэнджера, проводят следующие этапы:

1. ДНК денатурируют, чтобы получить однонитевые молекулы.
2. Добавляют секвенирующий праймер – искусственно синтезируемую олигонуклеотидную последовательность, комплементарную определенному участку исходной молекулы ДНК.
3. Создают условия для гибридизации праймера, т.е. для образования двухцепочечного участка, и инициируют синтез ДНК, добавляя в реакционную смесь ДНК-полимеразу и дезоксинуклеотидтрифосфаты – dATP, dCTP, dGTP, dTTP, один из которых является радиоактивным.

Синтез ведут в четырех параллельных пробирках, в каждую из которых добавляют один из специфических дидезоксинуклеотидтрифосфатов, или терминаторов – ddATP, ddCTP, ddGTP и ddTTP (ddNTP). При встраивании ddNTP на место соответствующего нуклеотида синтез ДНК прекращается.

Таким образом, в каждой из пробирок получают набор различающихся по длине радиоактивно меченых фрагментов ДНК с одним и тем же специфическим для данной пробирки дидезокситерминатором на конце молекулы.

После одновременного электрофоретического разделения этих фрагментов на четырех соседних дорожках и радиоавтографии размер синтезированных фрагментов может быть определен, а значит, определена и локализация дидезоксинуклеотидов, и порядок соответствующих им нуклеотидов в исходной молекуле ДНК.

Разработана методика автоматического ДНК-секвенирования, основанная на применении меченных различными флюорохромами дидезоксинуклеотидов.

В этом варианте каждому из нуклеотидов соответствует свой цвет полосы в геле, что хорошо различается в автоматическом режиме. Данный метод генетического анализа основан на принципе капиллярного электрофореза с индуцированной лазером флуоресценцией. Для проведения анализа применяются 4 различных красителя для идентификации реакций наращивания цепи, начиная с нуклеотидов А, Т, G, С. Флуоресцентные метки можно вводить с

использованием праймеров, меченных красителем с 5'-конца, или терминирующих дидезоксинуклеотидов, меченных красителем с 3'-конца.

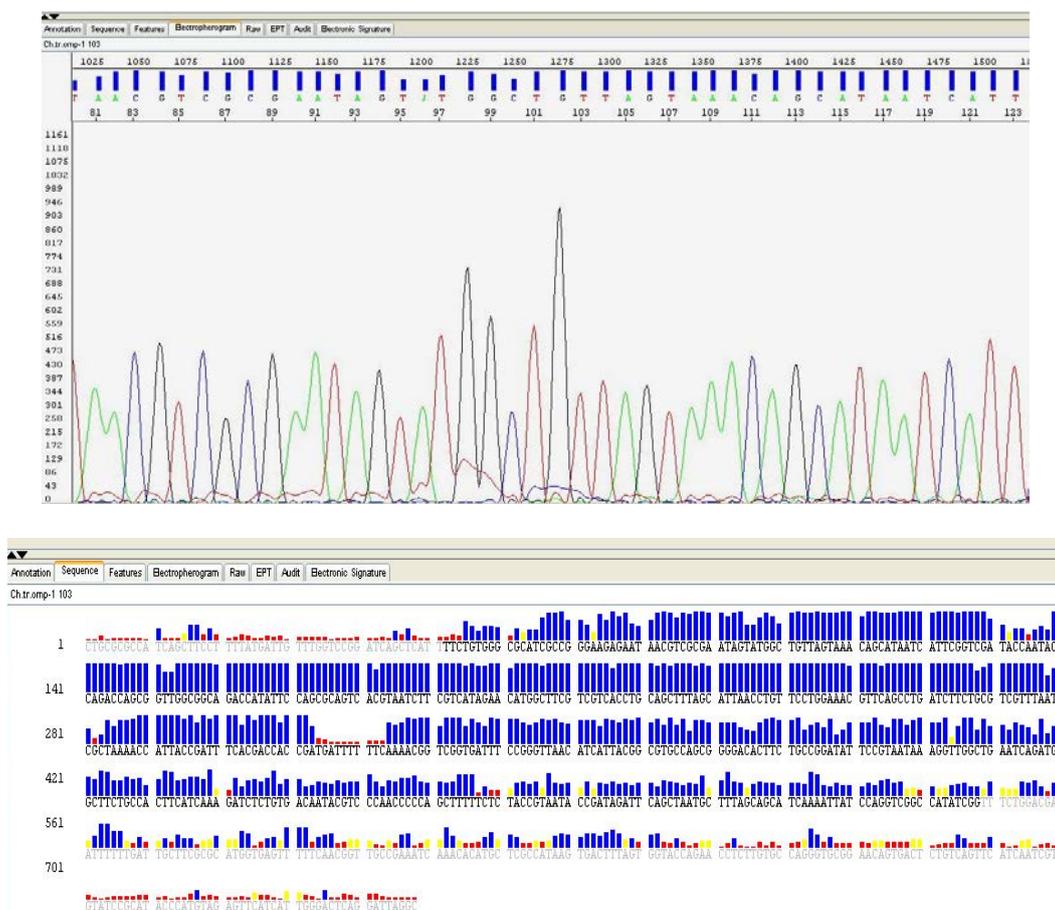


Рисунок 3.11 – Детектирование данных секвенирующей ПЦР с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 при определении участка нуклеотидной последовательности *omp-1* гена *S. trachomatis*

После введения метки в анализируемые фрагменты ДНК, в генетическом анализаторе происходит электрофоретическое разделение образцов и их детектирование, а полученные данные анализируются с помощью программ секвенирования (Sequencing) и сканирования генов (GeneScan).

При помощи специальных программ можно проводить идентификацию мутаций и скрининг нуклеотидной последовательности, путем парного или множественного сравнения последовательностей ДНК, фильтровать шумы и интерпретировать результаты на основе заданных критериев, проводить комплексную автоматическую обработку данных конечных экспериментальных результатов и др. Этот метод нашел особенно широкое применение в реализации программы «Геном человека».

Список литературных источников:

1. Аксенов М.Ю., Гинцбург А.Л. // Мол. генетика микробиол. и вирусол.- 1993.- № 4. - с.3.
2. Аксенов М.Ю., Мисуренко Е.Н., Шустрова Н.М. и др.// Журн. микробиол. - 1995. - № 2. - с. 80 - 83.
3. Гинцбург А.Л. // Микробиология, иммунология и вирусология. - 1999. - №5. - с. 22-26, 86-95.
4. Гинцбург А.Л., Брюханов А.Ф. и др. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. - 1987. - № 11.- с. 9-13.
5. Говорун В. М. // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы 2-й Всероссийской научно-практической конференции. 20-22 января 1998г., г.Москва. с. 12.
6. Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора РФ. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. М., 1995. Утверждены 22 июня 1995: 3-4.
7. Грижебовский Г.М., Четина Е.В., Брюханов А.Ф., Гинцбург А.Л. // Здоровье населения и среда обитания. - 1994. - № 4(13). - с. 13 - 14.
8. Гришина Т.Л., Шагинян И.А., Пузанов В.А. и др. // Мол. генетика. - 1995. - № 1. - с. 36 - 39.
9. Екимов А.Н., Шипулин Г.А., Бочкарев Е.Г. и др. // Вестник последипломного медицинского образования. 2002. №3. с.7-10.
10. Зигангирова Н.А., Соловьева С.В., Раковская И.В. и др. // Генетика. - 1995. - Т. 31, № 8. – с. 1059 - 1064.
11. Зигангирова Н.А., Раковская И.В., Неустроева В.В. и др. // Журн. микробиол. - 1996.- № 3. - с. 39 - 42.
12. Ключенович В.И. Новые стратегии и основные задачи по противодействию распространению ВИЧ-инфекции, парентеральных вирусных гепатитов и ИППП на современном этапе // Материалы Республиканской конференции «Медико-социальные проблемы ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов и инфекций, передаваемых половым путем». 10-11 декабря 2003г., г.Минск. – с.3-6.
13. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. - Санкт-Петербург: «Ольга».-2000. - 573 с.
14. Ллуелин М.Б. Определение нуклеотидной последовательности ДНК. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. - М.: Мир,1999 - с. 428-447.
15. Лопухов Л.В., Эйдельштейн Н.В. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2000. - Т.2 - №3. - с. 96-106.

16. Макреди Б.Дж., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. - М.: Мир, 1999. - с. 496-506.
17. Масленников А.Б., Бравве Ю.И. // Технологии генодиагностики в практическом здравоохранении. Сборник трудов научно-практического симпозиума. Москва, 20-21 июня 2002г. с.343-347.
18. Михайлов Н.В., Симещенко И.Е., Огарков П.И. // Генодиагностика инфекционных заболеваний. Сборник трудов 4-й Всероссийской научно-практической конференции. 22-24 октября 2002г., г.Москва. с.54-56.
19. Момыналиев К.Т., Говорун В.М.. // Клиническая лабораторная диагностика. 2000. №4. с.25-33.
20. Навроцкий А.Л. Медико-социальные особенности ИППП и современная эпидситуация в Республике Беларусь // Материалы Республиканской конференции «Медико-социальные проблемы ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов и инфекций, передаваемых половым путем». 10-11 декабря 2003г, г.Минск. - с.11-13.
21. Олецкий Э.И., Таганович А.Д. Современные методы молекулярной биологии и их прикладное значение. - М.: Мед.книга, 1999. - 56 с.
22. Организация лаборатории и правила работы в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции: Методические рекомендации МЗ РФ. Разработчик ЦНИИ Э и МЗ РФ, составители Т.А. Бектимиров, В.В.Блоха. Минск, 1995. - с.10.
23. Романова Ю.М., Гицбург А.Л. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. - 1993. - № 6. - с. 34- 37.
24. Саики Р., Гиленстен У., Эрлих Г. Полимеразная цепная реакция. Анализ генома. Методы. - М.: Мир,1990.-с.176-190.
25. Сидоренко С.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1999. - Т.44. - №12. - с. 19-22.
26. Скала Л.З. Современные аспекты клинической микробиологии. - 1999. - 323 с.
27. Скрипкин Ю.К., Кубанова А.А., Аковбян В.Н. и др. // Антибиотики и химиотерапия. - 1996. - Т. 41, № 2. - с. 5 - 8.
28. Соловьева С.В., Зигангирова Н.А., Гончарова СЛ. и др. // Журн. микробиол. - 1994. - Приложение. - с. 60 - 64.
29. Соловьева С.В., Гой Е.Г., Зигангирова Н.А, Гамова Н.А., Раковская И.В. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - №1. - с.43-46.
30. Хейз Дж., Волер С. Молекулярная генетика устойчивости к лекарственным препаратам. - М.: Медицина, 1997. - 412 с.
31. Херрингтон С., Макгли Дж. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. - М.: Мед. Книга, 1999. – 433 с.

32. Уимсон Дж., Хант Т. Молекулярная биология клетки. - М.: Медицина, 1994. - 322 с.
33. Четина Е.В., Гинцбург А.Л., Грижебовский Г.М. и др. // Журн. микробиол. - 1992. - № 3. - с. 21 - 24.
34. Четина Е.В., Грижебовский Г.М., Брюханов А.Ф. и др. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. - 1993. - № 6. - с. 18 - 22.
35. Шагинян И.А., Ананьина Ю.В., Токарская О.Н. и др. // Журн. микробиол. - 1991. - № 6. - с. 25 - 29.
36. Шагинян И.А., Нестеренко А.Н., Терехов А.А. и др. // Генетика. - 1994. - Т. 30. - № 5. - с. 627 - 634.
37. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. // Генетика. - 1995. - Т. 31, № 5. - с. 600 - 610.
38. Щербо С.Н., Макаров В.Б. // Клиническая лабораторная диагностика. - 1998. - №2. - с. 13-15.
39. Arthur M., Molinas C. // Antimicrob. Agents. Chemother. - 1990. - V. 34. - P. 2024 - 2026.
40. Waczyńska A., Helle F., Fedder J et al. // BMC Microbiol. 2004. Vol. 35. №4. P.1186 -1204.
41. Bernard P.S., Pritham G.H., Wittwer C.T. // Analytical Biochemistry. 1999. V 273. P. 221-228.
42. Boom R., Sole J.A. Salimans M.M. et al. // J.Clin.Microbiol. - 1990. - V. 28. - P. 495 - 503.
43. Burrows J., Nitsche A., Bayly B. et al. // BMC Microbiol. 2002. V.2. P.12.
44. Bustin S. A. // Molecular Endocrinology. 2000. V.25. P.169-193.
45. Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. // Bio. Technology. - 1991. - V.9. - P.553-557.
46. Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshoff P.M. // Clin.Microbiol. - 1992. - V.38. - №2. - P.70-76.
47. Cockerill E.R. // Antimicrob Agent Chemother. - 1999. - V.43. - №5. - P.199-212.
48. Colucci G., Benchmark I.I. - 1995. - V. 2. - № 2. - P. 3 - 9.
49. Jashek G., Gaydos C.A., Welsh L., Quinn T.C. // Clin. Microbiol. - 1993. - V.31. - №11. - P.1209-1212.
50. Fredricks D.N., Relmen D.A. // Clin .Infect.Dis. -1999. - V.29. - №10. - P.457-488.
51. Marmion B.R., Williamson J., Wors-wich D.A. et al. // Clin. Infect. Dis. - 1993. - V. 17. - № 1. - P. 90 - 99.
52. Miettinen A. // Benchmark. - 1995. - V. 2. - №. 2. - P. 5 - 13.
53. Mills K.B, Faloona F.A. // Biotechnol. - 1991. - V.155. - P.335-350.

54. Owen R.J. // *Med. Microbiol.* - 1991. - V.30. - №2. - P.89-99.
55. Griffi H.G., Griffin A.M. *PCR Technology. Current Innovations.* - CRC Press, 1994.
56. Pfaller M.A., Herwaldt L.A. // *Clin. Infect. Dis.* - 1997. - V.25 - №14. - P.858-870.
57. Roberts M.C. et al. // *Mol. Cell. Prob.* - 1993. - V. 7. - P. 387-393.
58. Roberts M.C. // *Trends in Microbiol.* - 1994. - V. 2. - P. 353-357.
59. Scarpellini P., Braglia S., Brambilla A.M. et al. // *Clin. Microbiol.* - 1997. - V.35. - №17. -P.2802-2806.
60. Stull T.L., LiPuma J.J., Edling T.D. // *Clin.Infect. Dis.*- 1998. - V.157. - №7. - P.280-286.
61. Tomas J.K., Forrest A., Bhavnani S.M. // *J. Antimicrob. Chemother.* - 1998. - V.42. - №5. - P.521-527.
62. Widjojoatmojo M.N., Fluit A.C., Verhoef J. // *Clin. Microbiol.* - 1994.-V.32. - №35. – P. 3002-3007

ГЛАВА 4 ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К КОМПЛЕКТАЦИИ ЛАБОРАТОРИЙ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ АНАЛИЗОМ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

4.1. Общие требования к организации лаборатории для постановки ПЦР в режиме реального времени

Для организации молекулярно-биологической лаборатории, работающей методом ПЦР в режиме реального времени необходимо территориально разделить различные стадии проведения анализа (рисунок 4.1):

- I. Зона пробоподготовки (обработка биологического материала и выделение нуклеиновых кислот);
- II. Зона подготовки реакционной смеси («чистая зона»);
- III. Зона амплификации.

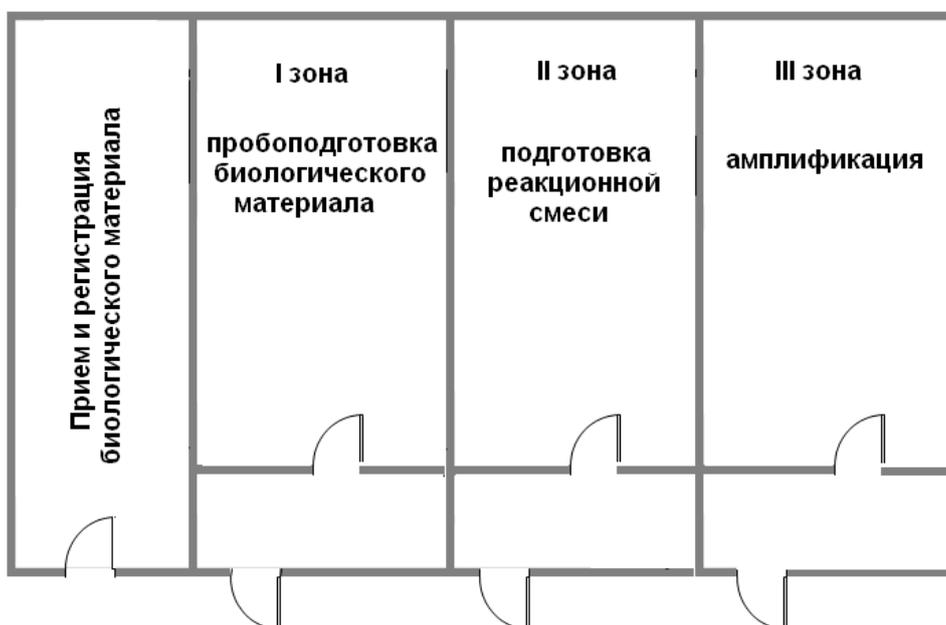


Рисунок 4.1 – Схема организации ПЦР-лаборатории

Все три зоны должны быть изолированными комнатами. Вторую и третью зоны, в случае необходимости допускается объединить (при наличии специальных боксов).

Все помещения лаборатории должны быть оснащены УФ-облучателями. Перенос автоматических дозаторов, штативов для пробирок, лабораторной одежды и мебели из одной зоны в другую строго запрещен. Перемещение пробирок с исследуемым материалом должно производиться только в одном направлении, при этом потоки не должны пересекаться.

В ходе проведения ПЦР исследований расходные материалы (пробирки и наконечники) должны иметь маркировку «DNase & RNase free», также,

для предупреждения контаминации биологического материала необходимо использовать наконечники с аэрозольным барьером.

Биологический материал, поступивший в лабораторию, проходит этап пробоподготовки в выделенной для этого зоне. Далее материал, содержащий выделенную ДНК, переносится в зону, где происходит подготовка реакционной смеси для амплификации и внесение в нее выделенной ДНК. После этого пробирки помещают в амплификатор. Процесс термоциклирования и анализа результатов при проведении ПЦР в режиме реального времени происходит при закрытой крышке пробирки, что практически полностью исключает риск возникновения контаминации.

Обязательным условием при организации ПЦР-лаборатории является выделение отдельных помещений для переодевания и хранения верхней одежды персонала, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Особенностью метода ПЦР в режиме реального времени является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных возбудителей в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории, а также автоматическая регистрация и анализ полученных результатов. Отсутствие стадии электрофореза позволяет снизить риск контаминации продуктами ПЦР. Регистрация результатов проводится непосредственно в процессе ПЦР, весь анализ можно проводить в одной-двух комнатах лаборатории и нет необходимости в отдельном помещении для детекции продуктов реакции.

4.2. Приборная комплектация лабораторий, использующих метод ПЦР в режиме реального времени

Оборудование для зоны пробоподготовки

1. ПЦР-бокс (ламинарного типа);
2. Термостат (диапазон до +100°C);
3. Центрифуга мощностью не менее 12 000 об/мин.;
4. Центрифуга-вортекс;
5. Насос с колбой-ловушкой;
6. Автоматические дозаторы переменного объема 0,1 – 1 000 мкл.;
7. Штатив для дозаторов;
8. Штативы для пробирок;
9. Пробирки пластиковые типа Эппендорф объемом 1,5 мл.;
10. Наконечники одноразовые для дозаторов с фильтрами (объем 200 мкл, 1 000 мкл)

11. Набор реагентов для выделения ДНК/РНК

ПЦР-боксы и ламинарные шкафы

ПЦР-боксы применяются для оснащения отдельных рабочих мест, что обеспечивает защиту персонала от возможного неблагоприятного воздействия химических и биологических факторов при проведении ПЦР-исследований. На этапе пробоподготовки, использование ПЦР-боксов необходимо, т.к. существует вероятность контакта персонала с инфекционным агентом, находящимся в биологическом материале, а также с агрессивными химическими веществами (этиловый спирт, фенол, хлороформ, изопропиловый спирт, гуанидин изотиоционат), которые входят в состав наборов реагентов для выделения ДНК/РНК.

Еще одним фактором, обуславливающим применение ПЦР-боксов, является защита расходных материалов, используемых при проведении ПЦР, от возможной контаминации из внешней среды, а также защита окружающей среды всей лаборатории от возможной контаминации продуктами ПЦР.



Рисунок 4.2. – УФ-боксы для проведения ПЦР UVC/T-M-AR и UVT-S (BioSan)

Боксы для проведения работ в молекулярно-биологической лаборатории, изготавливаются из стекла с УФ-защитным покрытием, рама и рабочая поверхность должны быть сделаны из нержавеющей стали. В боксе обязательно наличие ламп дневного света и УФ-лампы. Современные модели производители, как правило, оснащают цифровым таймером контроля длительности ультрафиолетового облучения. УФ лампы дезинфицируют рабочий объем бокса (в течении 1 часа до и после работ в боксе). Лампа дневного света обеспечивает освещение рабочего места. Современные боксы оснаены бактерицидным проточным рециркулятором, обеспечивающим постоянное обеззараживание внутри бокса во время работы. Данный режим работы рекомендуется использовать при работе с вирусными ДНК ампликонами и

прионами. Рециркулятор увеличивает максимум плотности УФ-лучей, что является достаточно эффективным для ДНК/РНК инактивации при этом через него прокачивается 100 объемов бокса за 1 час, что дополнительно увеличивает эффективность рециркулятора и создает асептические условия работы внутри бокса [10].



Рисунок 4.3 – ПЦР-бокс PCR-BOX-DNA (ДНК-Технология).

ПЦР-бокс PCR-BOX-DNA выполнен из нержавеющей стали, со стеклянными боковыми стенками и подвижной передней стеклянной панелью. Внутренний блок розеток (3 шт), на напряжение 220В с заземляющим контактом предназначен для подключения приборов и оборудования, необходимых при проведении ПЦР - анализа. В боксе установлена люминесцентная лампа дневного света и ультрафиолетовая лампа. Встроенный таймер ограничивает время включения ультрафиолетовой лампы и производит ее отключение при открывании переднего стекла.

Передняя стеклянная панель поднимается и фиксируется на любой высоте.

Установлена блокировка УФ-излучения при открывании передней панели бокса и при включении лампы дневного света.

Технические характеристики:

Ширина рабочей поверхности	1200 мм
Внешние размеры, ШхГхВ	1220x672x670 мм
Таймер УФ- облучения	15 мин - 3 ч 45 мин /и до 24 часов
Мощность лампы дневного света	30 Вт
Мощность УФ-лампы	30 Вт [2].



Рисунок 4.4 – БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» (Ламинарные системы, РФ).

БАВ-ПЦР-«Ламинар-С» применяется для чистой работы с ДНК-пробами. Обеспечивает защиту агента от контаминации. Механизм подъема стекла позволяет фиксировать стекло в двух положениях и легко обрабатывать рабочую камеру и стекло с обеих сторон дезрастворами. Корпус выполнен без стыковых соединений.

Отсутствие в рабочей камере крепежных элементов и выступов обеспечивает легкость дезобработки и отсутствие труднодоступных мест. Окраска бокса - порошковая эмаль светлых тонов, стойкая к обработке дезинфекционными растворами.

Рабочая столешница выполнена из нержавеющей стали. Фронтальное наклонное (поднимающееся) стекло - каленое. Блок освещения вынесен за пределы рабочей камеры.

Все системы электроуправления расположены за пределами основного корпуса бокса, что обеспечивает легкий доступ при ремонте. Встроенный таймер, позволяющий устанавливать время работы и автономное отключение лампы УФО. Таймер также отображает ресурс работы лампы УФО. Блок УФ-облучения на время работы в боксе по направляющим задвигается под рабочую столешницу.

Технические характеристики:

габаритные размеры рабочей камеры	101.5 x 53 x 53.5 см
освещение не менее	1000 Лк
мощность лампы УФО	30 Вт [2].



Рисунок 4.5 – Ламинарный шкаф СЛШ-М3 (АМС МЗМО, РФ)



Рисунок 4.6 – Шкаф ламинарный, ТУ ВУ 101148500.021-2008 («Научное приборостроение НАНБ», РБ)

Принцип работы ламинарных шкафов состоит в циркуляции комнатного воздуха через входной фильтр к рабочей зоне. В зависимости от класса патогенности возбудителя, можно использовать ламинарные шкафы I, II или III класса биологической защиты, которые отличаются степенью очистки воздуха проходящего через фильтр.

При организации ПЦР-лаборатории допустимо использовать как ПЦР-боксы, так и ламинарные шкафы. Однако необходимо учитывать, что при использовании ламинарных шкафов, в ходе проведения ПЦР воздушный поток должен быть выключен, т.к. это увеличивает риск кросс-контаминации биологических образцов.



Рисунок 4.7 – Ламинарный шкаф JOUAN MSC 12 (Франция)

Термостаты

Предназначены для термостатирования сухим способом микропробирок объемом 0,5-1,5 мл в диапазоне температур от комнатной до 120°C. Современные термостаты представляют собой компактные, удобные в управлении сухие приборы, которые можно использовать для длительных инкубаций при различных температурах. Блоки для пробирок выполняются из алюминия, и имеют гнезда для 3-х наиболее распространенных типов пробирок типа эппендорф. Приборы оснащаются дисплеем, который отображает установленные и текущие значения температуры и времени.



Рисунок 4.8 – Термостат типа «Драй-блок» Bio TDB-100 (BioSan, Латвия).

Технические характеристики Термостат типа «Драй-блок» Bio TDB-100:

Диапазон регулирования температуры	+25° ... +100°C
Дискретность	0.1°C
Точность измерения	±0.5°C
Независимый таймер с звуковым сигналом	1 мин - 96 ч
Дисплей	ЖК
Время набора температуры до 100°C	15 мин. [10].



Рисунок 4.9 – Термостат с функцией охлаждения и нагрева СН-100 (BioSan, Латвия).

Некоторые термостаты (например, термостат с функцией охлаждения и нагрева СН-100) могут сочетать в себе функции

1. Нагревающего драй-блока;
2. Охлаждающего термостата.

Комбинированная конструкция алюминиевого блока для пробирок и модуля элементов Пельтье, охлаждаемого радиатором с принудительной вентиляцией, позволяет добиться быстрой смены режимов охлаждения и нагрева.

Такие термостаты являются эффективным инструментом пробоподготовки для постановки ферментативных реакций, для реакций гибридизации, ДНК пробоподготовки.

Технические характеристики:

Диапазон регулирования температуры	-10°C ... + 100°C
Время нагрева до +100°C	примерно 15 мин
Номинальная точность регуляции	0.1°C
Таймер с звуковым сигналом	1 мин - 96 ч. [10].



Рисунок 4.10 – Термостаты типа «Драй-блок» TDB-120(BioSan, Латвия)

Технические характеристики термостатов типа «Драй-блок» TDB-120:	
Диапазон регулирования температуры	+25° ... +120°С
Стабильность температуры	0.1°С
Установка и контроль текущей температуры	Цифровая
Цифровая установка и контроль времени реакции	1 мин - 96 ч. [10].



Рисунок 4.11 – Твердотельный термостат «Термо 48» (Биоком, РФ).

Технические характеристики термостат «Термо 48»:	
Диапазон регулирования температуры	10°С до +120 °С
Стабильность температуры	0.1°С
Дополнительные функции	память на 3 программы.



Рисунок 4.12 – Твердотельный термостат «Термо 24-15» (Биоком, РФ)

Технические характеристики термостат «Термо 24-15»:	
Диапазон регулирования температуры	25°С до +120 °С
Стабильность температуры	0.1°С
Дополнительные функции	память на 3 программы.



Рисунок 4.22 – Твердотельный термостат «Термит» (НПФ «ДНК-технология»)



Рисунок 4.23 – Твердотельный термостат «Гном» (НПФ «ДНК-технология»)

Твердотельные термостаты «Термит» и «Гном» Предназначены для термостатирования биопроб в пробирках типа Эппендорф объемом 1.5 (0.5)мл.

Технические характеристики:

Число пробирок с образцами 1,5 мл x 40 шт;

0,5мл x 28 шт.

Диапазон температуркомн 99°C

Точность поддержания температуры +0.5°C

Дискретность задания температуры 1,0°C [5].

Центрифуги

Предназначены для разделения исследуемого материала на фракции.

По функциональным характеристикам центрифуги можно разделить на:

1. По скорости:

- ✓ низкоскоростные;
- ✓ высокоскоростные;
- ✓ ультрацентрифуги;

2. По объему образца:
 - ✓ для микрообъемов;
 - ✓ для малых объемов;
3. По температурному режиму:
 - ✓ с охлаждением;
 - ✓ без охлаждения.

На этапе пробоподготовки в процессе выполнения ПЦР используют низкоскоростные центрифуги – для предобработки клинического материала (если это необходимо), микроцентрифуги – для отделения осадка от раствора в процессе выделения нуклеиновых кислот.



Рисунок 4.13 – Низкоскоростная центрифуга ОПНЗ (РФ).

Низкоскоростная центрифуга ОПНЗ используется для первичной обработки клинических образцов, если это необходимо.

Технические характеристики центрифуги ОПНЗ:

Скорость центрифугирования	1000, 1500, 2800 об/мин;
Емкость ротора	10 x 15 мл.



Рисунок 4.14 – Низкоскоростная центрифуга ЦЛМН-Р10-01 ЭЛЕКОН (РФ).

Технические характеристики центрифуги ЭЛЕКОН:
Скорость центрифугирования 500-2700 об/мин.
Емкость ротора 10 x 15 мл.



Рисунок 4.15 – Центрифуга BioSan LMC-3000 (Латвия)

Технические характеристики центрифуги LMC-3000:
Скорость центрифугирования 0 - 3000 об/мин.
Емкость ротора 6 x 50 мл.
12 x 15 мл.
12 x 10 мл.
2 иммунопланшета.



Рисунок 4.16 – Центрифуга ELMi CM-6 (Латвия)

Технические характеристики центрифуги ELMi CM-6:
Скорость центрифугирования 1000, 1500, 2800 об/мин.
Емкость ротора 12 x 15 мл.



Рисунок 4.17 – Микроцентрифуга «MiniSpin» (Eppendorf).

Технические характеристики центрифуги «MiniSpin»:

Максимальная скорость центрифугирования	13400 об/мин
Ускорение	12100 g
Емкость ротора	12x 1.5/2.0 мл. [2, 5]



Рисунок 4.18 – Микроцентрифуга «Minispin plus» (Eppendorf).

Микроцентрифуга «Minispin plus» – современная, компактная, с низким уровнем шума, легко управляемая, разработанная для широкого круга лабораторных исследований.

Диаметр центрифуги 23 сантиметра. Автоматическое открывание крышки. Встроенный таймер до 99 минут. Время разгона и торможения - менее 13 секунд. Цифровой дисплей. Встроенный блок питания.

Угловой ротор "Black Line" из анодированного черного алюминия. Крышка ротора из высококачественной стали. Автоклавируемый ротор (121°C, 20 мин.) Отдельная кнопка кратковременного центрифугирования.

Минимальный нагрев образцов (не более 12°C после 20 минут центрифугирования на максимальной скорости).

Технические характеристики:

Максимальная скорость центрифугирования	14500 об/мин
Ускорение	14000 g
Емкость ротора	12x 1.5/2.0 см. [2]



Рисунок 4.19 – Высокоскоростная микроцентрифуга Eppendorf 5415 R

Eppendorf 5415 R – многоцелевая универсальная микроцентрифуга, идеальна для всех клинических, исследовательских и промышленных лабораторий. Плавная регулировка ускорения до 16 100 g, причем можно выставить как скорость вращения в об/мин, так и ускорение в единицах g. Уникальная задвижка защитной крышки автоматически закрывает центрифугу.

Малое время разгона и торможения обеспечивает быструю и безопасную работу. Крайне низкий уровень шума (<60 dB) и вибрации.

При помощи адаптеров в стандартном роторе можно также центрифугировать пробирки на 0.2, 0.4, 0.5 и 0.6 мл. Новый элемент безопасности — аэрозольулавливающая крышка для стандартного ротора — дает возможность центрифугирования микробиологических объектов, например, вирусов или бактерий.

Автоматический зажим крышки. Компактность и бесшумность. Удобная система управления. Отдельная кнопка кратковременного центрифугирования. Встроенный таймер до 99 мин.

Время разгона до максимальной скорости менее 13 сек. Автоклавируемый ротор (121°C, 20 мин.). Цифровая индикация времени и скорости.

Технические характеристики:

Максимальная скорость центрифугирования	13200 об/мин
Ускорение	16100 g
Емкость ротора	24 или 36 [2].



Рисунок 4.20 – Центрифуга Eppendorf 5418.

Eppendorf 5418 – многоцелевая универсальная микроцентрифуга. Плавная регулировка ускорения до 16800g, причем можно выставить как скорость вращения в об/мин, так и ускорение в единицах g. Уникальная задвижка защитной крышки автоматически закрывает центрифугу. Малое время разгона и торможения обеспечивает быструю и безопасную работу.

Поставляется со стандартным ротором для 18 микропробирок на 1.5/2.0 мл. Новый элемент безопасности аэрозольулавливающая крышка для стандартного ротора — дает возможность центрифугирования микробиологических объектов, например, вирусов или бактерий.

Технические характеристики:

Максимальная скорость центрифугирования	14000 об/мин;
Ускорение	16800 g
Емкость ротора	18 x 1.5/2.0 мл. [2].



Рисунок 4.21 – Микроцентрифуга MPW-55 (Med.Instruments, Польша)

MPW-55 лабораторная микроцентрифуга. Её конструкция обеспечивает легкость в обслуживании и безопасную работу. Центрифуга применяется в медицинских, биохимических, промышленных и других лабораториях, в которых существует необходимость разделения небольших объемов на составные части разной плотности.

Оснащена выносимым, не обслуживаемым индукционным двигателем. Микропроцессорный контроль частоты вращения и времени обеспечивает точность результатов исследования. Выбор 9 программ центрифугирования. Возможность выбора из 3 характеристик разгона и торможения. Цифровые показатели всех характеристик на ЖК дисплее. Центрифугирование в режиме «short». Блокировка крышки в период работы. Блокировка включения центрифуги при открытой крышке.

Технические характеристики:

частота вращения	300-14000 мин ⁻¹
максимальное ускорение	14243 x g
время центрифугирования	1 – 99 мин. [16].



Рисунок 4.22 – Микроцентрифуга Hettich MIKRO 120

Технические характеристики микроцентрифуги Hettich MIKRO 120:

Максимальная скорость центрифугирования	14000 об/мин;
Ускорение	15558g
Емкость ротора	12 пр. x 1.5/2.0 мл 24 пр. x 1.5/2.0 мл (адаптеры - 0.2, 0.4 , 0.5 и 0.8 мл).



Рисунок 4.23 – Микроцентрифуга Hettich MIKRO 200

Технические характеристики микроцентрифуги Hettich MIKRO 200:

Максимальная скорость центрифугирования 14000 об/мин;
Ускорение 18862g
Емкость ротора 24/30 пр. x 1.5/2.0 мл.
24 пр. x 1.8 мл. (крио)
4 стрипа x 0,2 мл.
(адаптеры - 0.2, 0.4 , 0.5 и 0.8 мл).

Центрифуга-вортекс

Предназначены для встряхивания и перемешивания смесей, а также быстрого осаждения образца на дно пробирки при скорости до 2000 об/мин.



Рисунок 4.24 – Мини центрифуга/вортекс Комбиспин FVL-2400N (BioSan, Латвия).

Центрифуга/вортекс Комбиспин FVL-2400N - прибор разработан специально для молекулярно-биологических исследований (ПЦР-диагностика).

Обеспечивает возможность одновременного перемешивания и разделения образцов, используя модули центрифугирования и перемешивания, расположенные на общем спин-блоке.

Центрифуга имеет защитный механизм, останавливающий вращение ротора при открытой крышке.

Может использоваться в молекулярно–генетических, микробиологических, биохимических, клинических и научных лабораториях, а также промышленных биотехнологических лабораториях.

Технические характеристики:

Постоянная скорость вращения 2400 об./мин

Автостоп при незакрытой крышке

Относительная центробежная сила (RCF):

от центра пробирки до 300g

от дна пробирки до 700g

Два режима работы: непрерывный и импульсный [10].



Рисунок 4.25 – Мини центрифуга/вортекс Микроспин FV-2400 (Bio-San, Латвия).

Центрифуга-вортекс Микроспин FV-2400 разработана специально для генно-инженерных исследований (для ПЦР-диагностики). Является центрифугой “открытого типа” (без крышки), что повышает скорость проведения операций центрифугирования и ресуспензирования

Технические характеристики:

Постоянная скорость вращения 2400 об./мин

Автостоп при незакрытой крышке

Относительная центробежная сила (RCF):

от центра пробирки до 300g

от дна пробирки до 700g

Два режима работы: непрерывный и импульсный [10].



Рисунок 4.25 – Центрифуга/вортекс Мультиспин MSC-3000, (BioSan, Латвия).

Технические характеристики Мультиспин MSC-3000:

Постоянная скорость вращения	3500 об./мин
Роторы	R-1.5 – 12x1.5мл R-0.5/0.2 – 12x0.5 и 12x0.2 мл

Регулятор скорости вращения

Два режима работы: непрерывный и импульсный [10].



Рисунок 4.26 – Мини центрифуга/вортекс ТЕТА-2 (БИОКОМ, РФ).

Технические характеристики ТЕТА-2:

Постоянная скорость вращения	2000 об./мин
Роторы	12x1.5мл 12x0.5 12x0.2 мл

Регулятор скорости вращения

Два режима работы: непрерывный и импульсный [10].



Рисунок 4.27 – Центрифуга/вортекс CM-70M (ELMI)

Центрифуга CM-70M оснащена угловым ротором, установленном на шаговом двигателе. Такая система позволяет совместить центрифугирование и встряхивание с широкими возможностями в одном роторе.

Технические характеристики:

Угловой ротор	до 36 пробирок: 12x 0.2 мл.; 12x 0.5 мл.; 12x 1.5/2.0 мл.
---------------	--

Диапазон регулирования скорости	1000-7000 об/мин,
---------------------------------	-------------------

Таймер	от 0,1 до 30 мин,
--------	-------------------

Режимы перемешивания	6,
----------------------	----

Система безопасности, блокирующая центрифугирование при открытой крышке [2].

Аспираторы

Предназначены для удаления надосадочной жидкости при выполнении ПЦР.



Рисунок 4.28 – Насос с колбой-ловушкой (НПФ «Литех», РФ).

Устройство предназначено для отсоса микроколичеств надосадочных растворов и может использоваться в научных и клинико-диагностических ла-

бораториях (в том числе при обработке клинических проб для диагностики инфекционных заболеваний)

Состоит из:

стеклянной колбы объемом 1 л;

стеклянной насадки с отводными трубками и гибкими шлангами;

электрического мембранного микро-насоса;

Технические характеристики:

производительность насоса - 50-60 мл/мин. [3, 5].



Рисунок 4.29 – Аспиратор с колбой-ловушкой FTA-1 (Biosan, Латвия).

Технические характеристики FTA-1:

Объем колбы-ловушки

1 литр

Потребляемый ток / мощность

12 В, 300 мА / 3,6 Вт

Внешний блок питания

вход. АС 100–240 В,

50/60 Гц; выход. DC 12 В



Рисунок 4.30 – Аспиратор ОМ-1 (Утес, РФ)

Технические характеристики ОМ-1:

Максимальная производительность по л/мин.

6/20

Объем емкости

2x3000 мл.

Максимальная степень разрежения, кПа

16,4



Рисунок 4.31 – Аспиратор АС-750 (Blue Cross, Япония)

Технические характеристики АС-750:

Максимальная производительность по л/мин.	8/10
Объем емкости	750 мл.
Максимальная степень разрежения, кПа	80.



Рисунок 4.32 – Аспиратор MEVACS M46-L50 (MEDIST, Словакия)

Технические характеристики MEVACS M46-L50:

Максимальная производительность по л/мин.	50
Объем емкости	2000 мл.
Максимальная степень разрежения, кПа	98,5



Рисунок 4.33 – Аспиратор ATMOS S 351 (Atmos, Германия)

Технические характеристики ATMOS S 351:

Максимальная производительность по л/мин.	36
Объем емкости	3000 мл.
Максимальная степень разрежения, кПа	90.

Автоматические дозаторы



Рис. 4.34. – Линейки дозаторов переменного объема

В ходе проведения пробоподготовки для ПЦР целесообразным является использование автоматических дозаторов переменного объема. Автоматические дозаторы оснащены механизмами дозирования жидкости (два упора), и сброса наконечника. Высокие точность и воспроизводимость результатов обеспечиваются конструкцией, качеством изготовления и материалов применяемых для изготовления дозаторов.

Дозаторы с плавно регулируемым объемом широкого применения для забора и распределения точных объемов жидкости. Выбранный объем показывается на цифровом индикаторе на рукоятке пипетки. В основе действия - перемещение объема воздуха между поршнем и жидкостью. Используются сменные наконечники из полипропилена.

4.3. Расходные материалы для зоны пробоподготовки

Штативы для пробирок

Штативы для пробирок могут быть изготовлены из пластика или металла, которые должны обладать устойчивостью к большинству агрессивных веществ. Ячейки штатива должны быть пронумерованы для легкой идентификации образцов. Оснащение штатива прозрачной крышкой с матовой поверхностью дает возможность делать надписи. Большинство штативов подходит для криогенного хранения образцов.

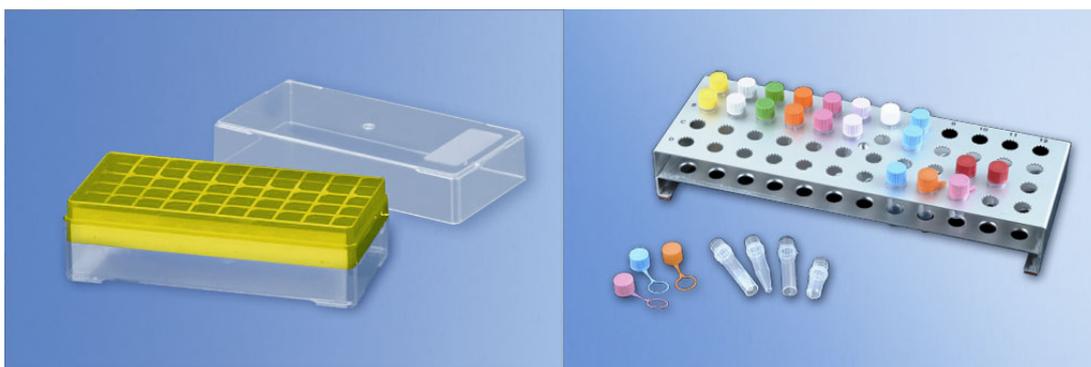


Рисунок 4.35 – Штативы для пробирок 0,5-2,0 мл. (Ахуген).

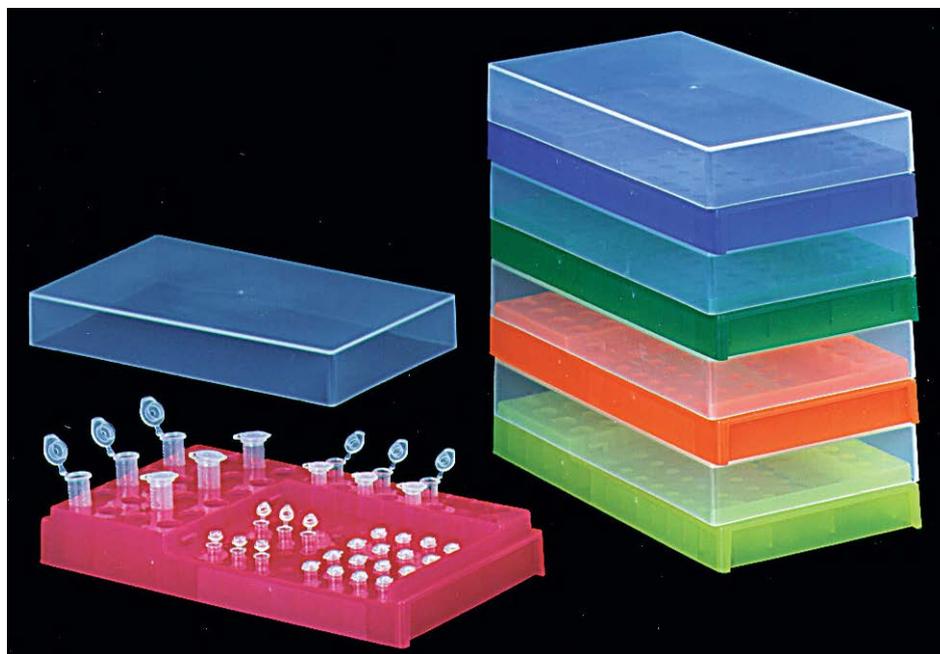


Рисунок 4.36 – Штативы с крышкой для пробирок 0,2; 0,5 и 1,5-2,0 мл. (SSI).

Пробирки пластиковые типа Эппендорф

Одноразовые пластиковые пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, используемые в ходе пробоподготовки для ПЦР исследования, должны быть оснащены крышками, могут иметь градуировку. Производитель должен гарантировать отсутствие в данных пробирках таких веществ как РНК-азы, ДНК-азы, ингибиторы ПЦР, ДНК человека.



Рисунок 4.37 – Пробирки одноразовые пластиковые типа эппендорф объемом 0,5-1,5-2,0 мл.

Для проведения реакции амплификации, как правило, используют пробирки входящие в состав ПЦР-набора. На сегодняшний день для проведения ПЦР в режиме реального времени производители ПЦР-наборов предлагают использовать 3 стандартных формата пробирок: 0,2 мл., 0,025 м., 0,01мл. Пробирки объемом 0,2 мл. могут быть как отдельными, так и в стрипах по 8 или 12 штук, либо в виде 96-луночных планшетов. Пробирки более мелкого объема производятся только в виде стрипов.

Наконечники для автоматических дозаторов

Для проведения большинства этапов ПЦР исследования используются одноразовые наконечники с фильтрами для автоматических дозаторов. Гидрофобный фильтр из полиэтилена идеален для амплификации ДНК. Предотвращает контаминацию при распространении аэрозоля в пипетки и их загрязнении. Для автоматических дозаторов различного объема используются разные виды наконечников, которые отличаются по размеру канюли и цвету (для облегчения идентификации). Для проведения этапа пробоподготовки необходимы наконечники объемом от 10 мкл до 1 000 мкл. Для удобного использования, производители могут помещать наконечники в специальные штативы по 96 шт, герметичная упаковка, однако это не является обязательным. Большие упаковки наконечников (500-1000 шт./уп.) являются более экономичным вариантом [1].



Рисунок 4.38 – Одноразовые наконечники с фильтрами и без для автоматических дозаторов

Автоматические системы для выделения нуклеиновых кислот



Рисунок 4.39 – Система автоматическая для выделения нуклеиновых кислот CAS-1820 X-Tractor Gene™ (Corbett Research, Австралия)

X-tractor Gene™ — это открытая, гибкая, компактная система, адаптированная для использования формата 96-луночных микропланшетов и 8-луночных стрипов, а так же реактивов для экстракции нуклеиновых кислот различных производителей, в том числе и отечественных. В основу прибора положена комбинация вакуумной станции и автоматической системы дози-

рования. Основной принцип экстракции — сорбция нуклеиновых кислот на фильтрах с последующей отмывкой и элюцией.

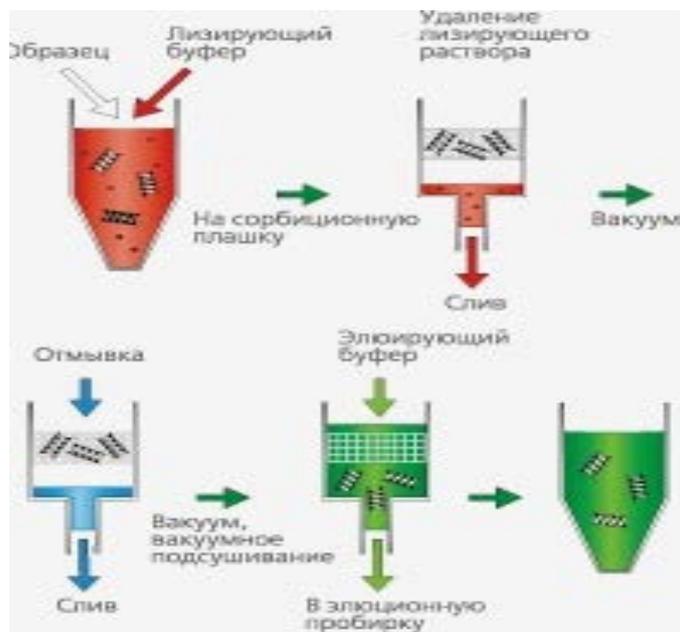


Рисунок 4.40 – Принцип работы X-tractor Gene™

Особенности прибора X-Tractor gene™

- X-tractor Gene™ оснащен 8-канальной насадкой для пипетирования.
- Рабочая зона разделена на 6 секторов, используемых для размещения:
 - модуля для элюции;
 - сорбционного и отмывочного модуля;
 - четырех SBS креплений для 96-луночных планшетов;
 - емкостей для реактивов;
 - штативов для наконечников.

Рабочая зона, включающая сектор для размещения емкостей для реактивов, надежно закрывается поликарбонатной крышкой.

Система укомплектована помпой, позволяющей регулировать уровень вакуума (рисунок 4.41).



Рисунок 4.41 – Насосная станция X-Tractor gene™.

Возможна установка робота в ламинарный шкаф.

Возможность дополнительного оснащения HEPA-фильтром, для обеспечения избыточного давления чистого воздуха в рабочей зоне под крышкой, ультрафиолетовой лампой и сканером штрих-кодов.

Технические характеристики:

Объемы пипетирования

От 1 мкл до 200 мкл

Точность:

Коэффициент вариации <4%

Погрешность <1%

Пипетирующая головка

8 каналов, 60-450 мкл/сек

Расходные материалы X-tractor Gene™:



Рисунок 4.42 – 96-луночный планшет для образцов объемом 1,5-2 мл

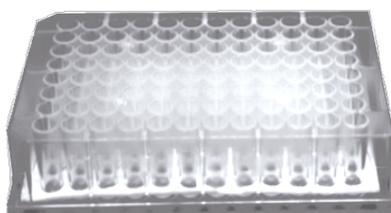


Рисунок 4.43 – Сорбционная плашка (Corbett, Whatmann, Promega, Macherey-Nagel, Ахуген, Invitek и другие)



Рисунок 4.44 – Пробирки для элюции в 96-луночном штативе

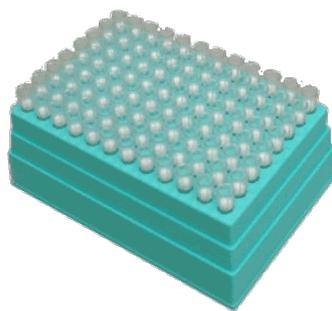


Рисунок 4.45 – Наконечники — 200 мкл с барьером, в контаминационно защищенных штативах по 96 штук



Рисунок 4.46 – Емкости для реагентов

Расход наконечников - 44 наконечника на 96 образцов

Скорость экстракции - 6 образцов за 1,5 часа

Объем элюции - 100 – 500 мкл [1].



Рисунок 4.47 – Экстрактор нуклеиновых кислот NucliSENS® easyMAG™
(Biomerieux, Франция)

Платформа **NucliSENS® easyMAG™** — система второго поколения компании bioMérieux для автоматического выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов, основанная на технологии экстракции с использованием магнитных частиц (технологии BOOM®, разработанной научно-исследовательской командой компании bioMérieux). Внедрение магнитных частиц и оптимизация других реактивов позволили существенно усовершенствовать технологию BOOM® в системах второго поколения. Высокое качество экстракции уже подтверждено в ручной модификации такой системы NucliSENS® miniMAG™.

Система NucliSENS easyMAG предлагает широкие возможности: различные образцы (ДНК и РНК) различных типов, различные элюирующие объемы могут обрабатываться одновременно. Высокопроизводительная автоматическая экстракция с минимумом ручных операций и очень коротким временем производственного цикла (24 экстракции за 40 минут) теперь доступна каждой лаборатории. Для большинства задач используется общий стандартный протокол, что также существенно экономит время.

В состав NucliSENS® easyMAG™ входят:

1. Модуль для реагентов
2. Модуль фильтрации
3. Сканер штрих-кода
4. Загрузочная зона
5. Рабочая зона с крышкой
6. Модуль управления
7. Выключатель
8. Электронный модуль
9. Жидкостной модуль

Принцип работы NucliSENS® easyMAG™:

1. В ходе инкубации лизированных образцов происходит адсорбция нуклеиновых кислот на магнитных частицах

2. Магнитное устройство NucliSENS easyMAG удерживает магнитные частицы с адсорбированными нуклеиновыми кислотами, таким образом, обеспечивая очистку нуклеиновых кислот в ходе нескольких отмывок

3. При нагревании происходит разделение нуклеиновых кислот и магнитных частиц

4. На завершающем этапе элюат освобождается от магнитных частиц при помощи магнитного устройства

Виды клинического материала:

- ✓ Плазма
- ✓ Сыворотка
- ✓ Цельная кровь
- ✓ Спино-мозговая жидкость
- ✓ Мокрота
- ✓ Фекалии
- ✓ Бронхоальвеолярный смыв
- ✓ Мазки
- ✓ Сухие пятна крови.

Внутренний контроль – максимум 100 мкл.

Объем образца – от 10 до 1000 мл.

Прослеживаемость штрих-кодов.

Одинаковые реактивы для всех процедур.

Параметры выхода

Объем полученного экстракта от 25 до 110 микролитров

Длительность ручных операций < 15 минут для 24 образцов

Производительность

Лизис в режиме работы «в приборе» до 168 экстракций за смену

Лизис в режиме работы «в пробирке» до 240 экстракций за смену

Полное время одного производственного цикла от 40 до 60 минут для 24 экстракций (в зависимости от режима работы) [1].

Оборудования для зоны приготовления реакционной смеси

1. ПЦР-бокс (ламинарный шкаф)
2. Термостат (диапазон до +100°C)
3. Центрифуга-вортекс
4. Автоматические дозаторы переменного объема 1 –50 мкл.
5. Штатив для дозаторов
6. Штативы для пробирок.
7. Пробирки пластиковые типа эппендорф объемом 0,2 - 0,5 мл.
8. Наконечники одноразовые с фильтрами (объем 200 мкл)
9. Набор реагентов для постановки ПЦР в режиме реального времени

ни

Возможность автоматизации зоны подготовки реакционной смеси



Рисунок 4.48 – Система автоматического раскапывания ПЦР смесей CAS-1200/4200/4800 (Corbett Robotics, Австралия)

Данная система является открытой, дает возможность работы с планшетами 96 и 384 луночного формата. Автоматизация процесса позволяет исключить возможные ошибки персонала, обеспечивает высокую точность пипетирования (диапазон рабочих объемов от 1 до 200 мкл), минимизирует риск контаминации биопроб, т.к. система оснащена воздушными фильтрами и ультрафиолетовыми лампами.

Оборудования для зоны амплификации

Детектирующий амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени

Для постановки ПЦР в режиме реального времени необходимо наличие прибора, оснащенного тремя блоками: амплификатор (термический блок), детектор флюоресценции и компьютерная рабочая станция.

Качество результатов ПЦР анализа во многом зависит от технических характеристик используемого оборудования. Собственно реакция проводится в управляемом термостате – амплификаторе (термоциклере), обеспечивающем необходимое для процесса циклическое изменение температуры по заданной программе. Важными техническими характеристиками амплификатора являются скорость нагрева-охлаждения, равномерность и стабильность поддержания температуры.

Приборы для проведения ПЦР в режиме реального времени производятся многими компаниями, наиболее распространенными и хорошо зарекомендовавшими себя в ходе их применения являются: Bio-Rad, BioSan, ДНК-Технология, Corbett Research, Applied Biosystems, Hofman la Roche и др.



Рисунок 4.49 – Амплификатор на 96 образцов MyCycler (Bio-Rad)

Амплификатор на 96 образцов MyCycler имеет функцию температурного градиента, позволяющую оптимизировать условия проведения ПЦР, снабжен большим дисплеем для наглядного отображения схемы температурного протокола [9].



Рисунок 4.50 – Амплификатор ICycler IQ 5 (Bio-Rad)

Амплификатор ICycler IQ 5 может с успехом применяться для научных экспериментов, для создания новых тест-систем, для клинической диагностики, включая большие объемы скрининговых исследований. ICycler IQ 5 - открытая система, которая легко адаптируется к выполнению тестов большинства производителей.

Прибор позволяет проводить мультиплексный и количественный анализ. Оснащен современной 5-ти канальной оптической схемой, что позволяет осуществлять одновременный анализ 5 различных ДНК-мишеней, а также количественный анализ исходного содержания ДНК в исследуемом материале. Применение новых технологий обеспечивает возможность количественного анализа, начиная с единичных молекул (ДНК/РНК) в образце. Благодаря использованию для регистрации флюоресценции 12-битной цифровой видеокамеры, динамический диапазон прибора составляет до 9 порядков [9].



Рисунок 4.51 – Амплификатор Real Time PCR - Roche Light Cycler 24 (Hoffman la Roche)

Амплификатор Real Time PCR - Roche Light Cycler 24 – система ПЦР в реальном времени, позволяющая быстро (менее чем за 30 мин.) получать достоверные результаты и одновременно получать количественный результат по изменению уровня флуоресцентного сигнала. Уникальная опция по анализу кривых плавления позволяет быстро определить основные характеристики полученных продуктов амплификации. Стеклообразный капилляр диаметром 1,5 мм. Находится в пластиковой крышке. Объем реакционной смеси от 10 до 20 мкл. Каналы детекции: 530 нм, 640 нм, и 710 нм. Среднее время реакции: 20 мин для проведения 30 циклов. Возможная скорость изменения температуры: 0.1 - 20° C/c

Точность температурного показателя: +/- 0.4°С [15].



Рисунок 4.52 – Амплификатор Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Applied Biosystems 7500 – многоцелевая система ПЦР в реальном времени, позволяющая получать высококачественные результаты. Может быть доукомплектована до работы в режиме скоростного термоциклирования.

Имеет 5 фильтров для работы в широком диапазоне популярных флуорофоров, включая: FAM/SYBR Green I, VIC/JOE, NED/TAMRA/Cy3, ROX/Texas Red, Cy5.

Повышена чувствительность для красителей в красной области спектра. Пятикрасочная детекция позволяет использовать систему для решения разнообразных задач: количественной оценки патогенов, определения генной экспрессии, анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), качественных исследований с применением внутреннего положительного контроля.

В качестве источника света использована новая вольфрамово-галогенная лампа с увеличенным до 2000 часов сроком работы. Прибор снабжен автоматической системой контроля работы лампы. Пользователю сообщается о необходимости скорой замены лампы.

На передней панели имеется световая индикация рабочего состояния прибора.

Модель использует и пробирки, и планшеты: 0.2 мл пробирки с плоскими крышками, как отдельно, так и в стрипах по 8 штук, а также 96-луночные планшеты с пленками. Максимальный объем реакции 100 мкл, минимальный объем – 25 мкл.

Технические характеристики:

Система термоциклирования	основанная на элементах Пельтье;
Блок для образцов	96-луночный блок;
Расходные материалы	планшет на 96 лунок и
пробирки по 0,2 мл;	
Объем реакционной смеси	25-100 мкл;
Максимальная скорость	
нагрева/охлаждения блока	2,0°C/сек;
Диапазон температур	4°C-100°C;

Точность поддержания температуры: $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ от установленной/выведенной на дисплей температуры, измеренной спустя 3 минуты после старта. Равномерность поддержания температуры: $\pm 0.50^{\circ}\text{C}$ спустя 30 секунд после старта. Оптическая система - Вольфрамо-галогеновая лампа. 5 фильтров возбуждения сигнала, 5 фильтров эмиссии и CCD камера.

Получение результатов - Данные снимаются со всех 5 фильтров для каждой лунки в соответствии с установленной схемой планшета. Схема планшета может изменяться после окончания работы.

Время проведения количественной ПЦР: <2 часов [8].



Рисунок 4.53 – Амплификатор ДТ-96 (ДНК-Технология)

Особенности ДТ-96:

Мультиплексная детекция с использованием до 5-ти каналов флуоресценции и различных комбинаций флуорофоров;

Высокая чувствительность, соотношение сигнал/шум и низкий уровень помех между каналами обеспечиваются с помощью оригинального оптического тракта, включающего в себя отдельный источник света на каждый канал и ПЗС-матрицу (CCD камеру);

Работа с различным типом флуорофоров, благодаря комплектации оптическими системами с различными спектральными характеристиками;

Термоблок позволяет задавать градиент температуры отжига, открывая дополнительные возможности для оптимизации программ амплификации;

Прибор является открытой системой и не привязан к конкретным реагентам и пластику. В то же время, «ДНК-технология» производит реагенты для большинства существующих на сегодняшний день приложений ПЦР в реальном времени.

Технические характеристики:

Формат термоблока	96 пробирок на 0,2 мл (12 × 8)
Тип пробирок (отдельные, в стрипах по 8 шт. или планшет 12 × 8)	пробирки для ПЦР 0,2 мл
Диапазон температур термоблока	от 4 до 99°C
Дискретность установки температур	0.1°C
Точность поддержания температуры	не хуже 0.3°C
Средняя скорость нагрева термоблока	2.5°C/с
Средняя скорость охлажд. термоблока	1.5°C/с
Исполнительное устройство термоблока	элементы Пельтье
Источник возбуждения	светодиод
Детектор	ПЗС-матрица
Число каналов флуоресценции	4 (5-й канал опционально)
Длины волн возбуждения/детекции	470/520, 530/570, 590/630, 630/670 [4].

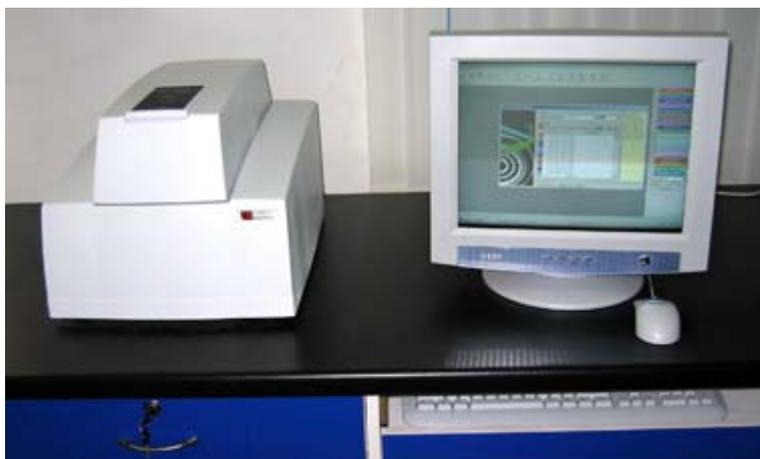


Рисунок 4.54 – Амплификатор RotorGene3000 (Corbett Research)

Технические характеристики:

Источник возбуждения	470 нм, 530 нм, 585 нм, 625 нм, LED диоды высокого напряжения
Фильтры для детекции	510 нм, 555 нм, 610 нм, 660 нм, 580 нм и 610 нм высокого прохождение
Флюорофоры	Sybr-Green I
Детекция	Fam, Tct, Joc, Vic, Vax, Rox, Tam-ra, Cy3, Cy5, Tex Red
Температурный диапазон	25-99°C
Возможности блока	36x0,2 мл стандартные пробирки, 72x0,1 мл стрипы
Скорость нагрева/охлаждения	нагрева- 2,0°C/сек (по пробиркам); 5,0°C/сек (температура воздуха)
Температурная однородность (от образца к образцу)	± 0,01°C.
Температурная точность	± 0,5°C
Температурная прецизионность	± 0,1°C

[1].



Рисунок 4.54 – Амплификатор RotorGene 6000 (Corbett Research)

Прибор позволяет проводить: количественный ПЦР-анализ
 Определение вирусной нагрузки при инфекциях, вызванных ВИЧ, ВГВ, ВГС, ЦМВ и др.

Определение концентрации генетически-модифицированных ингредиентов

Оценка уровня экспрессии генов

Качественный ПЦР-анализ:

Выявление возбудителей широкого спектра инфекционных болезней

Одновременное определение нескольких возбудителей в клиническом материале

Генотипирование микроорганизмов

Определение точечных мутаций и генетического полиморфизма

Технические характеристики:

Температурные ха- Диапазон t° 25-99 $^{\circ}$ C; температурная однород-
 рактеристики: ность от пробирки к пробирке t° $\pm 0,01^{\circ}$ C

Точность температуры по воздуху t° $\pm 0,2^{\circ}$ C

Скорость нагрева- 10,0 $^{\circ}$ C/сек.
 ния:

Скорость охлаждения- 10,0 $^{\circ}$ C/сек.
 ния:

Возбуждение 365, 470, 530, 585, 625, 670

Детекция 470, 510, 555, 610, 660, 710

Флуоресцентные красители Biosearch Blue, Marina Blue, Bothell Blue, Alexa Fluor 350, FAM, SYBR Green 1, Fluorescein, EvaGreen, Alexa Fluor 488, JOE, VIC, HEX, TET, Yakima Yellow, Alexa Fluor 532, ROX, Cy 3.5,

CalOrange, RedMond Red, Alexa Fluor 568, Cy5, Cy5.5, Quasar 670, LCRed 640, Texas Red, CAL Fluor Red, Quasar 705, LCRed 705, Alexa Fluor 680

[1].

Основные технические принципы работы амплификаторов для проведения ПЦР в режиме реального времени

В блоке амплификатора (термический блок) происходит непосредственно ПЦР. Данный блок может быть рассчитан на 36 - 96 образцов. Для загрузки образцов в прибор могут быть использованы прозрачные микропробирки объемом 0,1 – 0,2 мкл, микропланшеты или стрипы стандартного формата. Однако некоторые компании производители предлагают иные варианты проведения реакции амплификации, например, прибор Light Cycler 24 (Hoffman la Roche) оснащен капиллярами, в которых и проводится ПЦР. Объем анализируемого образца может составлять от 5 до 50 мкл. [1, 10].

Диапазон температур термоблока может составлять от 4°C до 100°C. Дискретность установки температуры термоблока 0,1°C. Скорости нагрева и охлаждения термоблока могут варьировать в пределах 1,5 - 10°C/с.

Функционирование термоблока обеспечивается наличием элемента Пельтье — это термоэлектрический преобразователь, принцип действия которого базируется на эффекте Пельтье — возникновении разности температур при протекании электрического тока. Достоинством элемента Пельтье является небольшие размеры, отсутствие каких-либо движущихся частей, а также газов и жидкостей. Недостатком элемента Пельтье является очень низкий коэффициент полезного действия, что ведёт к большой потребляемой мощности для достижения заметной разности температур [4].

Регистрация флуоресцентного сигнала происходит одновременно во всех образцах. Оптический модуль содержит источник света и несколько пар эмиссионных-экстинционных фильтров, либо установленных стационарно, либо сменных, а также регистрирующее устройство.

Современные приборы для проведения ПЦР в режиме реального времени позволяют одновременно использовать несколько флуорофоров, конъюгированных с разными специфическими ДНК-зондами. Диапазон возбуждения флуоресценции может проходить по 6 каналам 440 – 684 нМ, а диапазон детекции флуоресценции по 6 каналам 500-730 нМ. Таким образом, появляется возможность одновременного исследования нескольких типов ДНК-фрагментов в одной пробе [1, 3, 4]. Наиболее популярными являются такие

флуоресцентные красители как FAM, SYBER Green 1, JOE, VIC, NED, TAMRA, HEX, TET, ROX, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5, Texas Red.

Однако, такой тип исследований, как правило, ставит перед исследователем определенные технологические проблемы, например, подбор флюориметрических красителей с неперекрывающимся спектром излучения [4, 7]. Способы их решения тесно связано с возможностями, заключенным в конструкции анализатора: сменные фильтры позволяют значительно расширить список флюорофоров и выбрать оптимальную комбинацию.

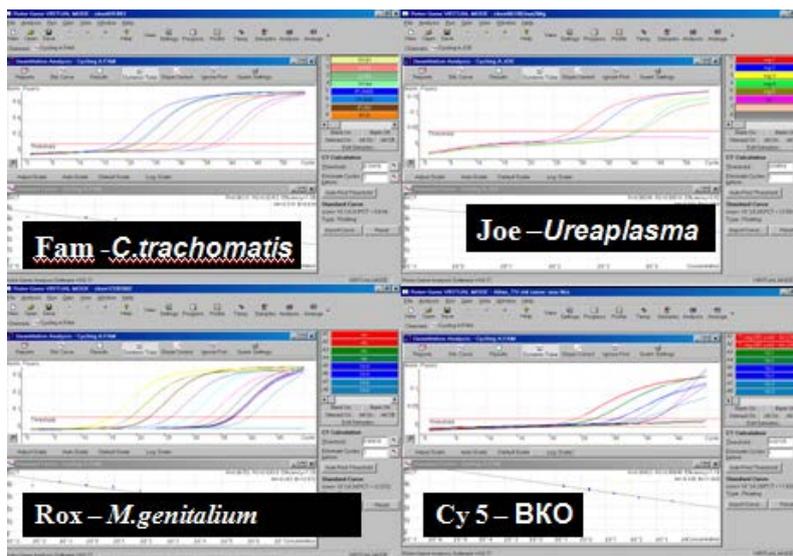


Рисунок 4. 55 – Детекция флуоресценции по различным каналам в ходе ПЦР в режиме реального времени.

Данные полученные прибором при считывании флуоресцентного сигнала, проходят обработку и отображаются на экране компьютер отдельно для каждой пробы. Использование метода компьютерной регистрации уровня флуоресценции при проведении ПЦР в режиме реального времени позволяет проводить автоматическую интерпретацию полученных результатов и снимает проблему субъективной оценки электрофореграмм [7, 8, 10].

Таким образом, методика ПЦР в режиме реального времени позволяет совместить этапы амплификации и детекции, что существенно повышает достоверность результатов ПЦР-анализа, дает возможность исключить контаминацию и появление ложноположительных результатов, а также значительно сократить трудовые затраты на проведение исследования.

Создание автоматизированного компактного оборудования позволило активно внедрять новый метод в практику медицинских и научных учреждений. Успех ПЦР в режиме реального времени, как одного из самых популярных молекулярно-генетических методов исследования, сопровождался появлением большого числа разнообразных подходов и созданием широкого

спектра тест-систем в том числе и российских производителей. Одним из важнейших критериев при выборе прибора, кроме соотношения цена - качество, стала его универсальность, то есть возможность легко адаптировать прибор для выполнения любого теста в формате ПЦР в реальном времени.

Благодаря возможности количественной оценки и одновременного анализа нескольких параметров, метод ПЦР в режиме реального времени предоставляет исследователю принципиально новые возможности в молекулярной биологии.

В настоящее время метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) находит широкое применение в диагностических исследованиях, таких как определение инфекционных, онкологических и наследственных заболеваний, типирование генов тканевой совместимости и др. ПЦР является одним из самых чувствительных молекулярно-биологических методов и его значение в клинической лаборатории постоянно возрастает.

ПЦР в режиме реального времени является наиболее технологичным подходом в количественном ПЦР-анализе. Применение этого современного специфичного и высокочувствительного метода позволяет максимально точно проводить диагностику ряда инфекционных агентов с оптимальными условиями работы для специалистов клинической лабораторной диагностики.

Возможность использования количественного формата детекции позволяет быстро получить результат и предоставляет данные об инфекционной нагрузке биологического образца, что способствует назначению адекватного этиотропного лечения в максимально быстрые сроки, позволяет вести мониторинг течения заболевания и контроль излеченности.

Список литературных источников:

1. ИнтерЛабСервис (ИЛС) [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.interlabservice.ru>
2. Компания Хеликон [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.helicon.ru>
3. Литех [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.lytech.ru>
4. «НПФ ДНК-Технология» [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.dna-technology.ru>
5. Реамед-ЮГ Лабораторное оборудование и реагенты [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.reamedyug.ru>
6. Федоров Н.А., Ёлов А. А., Суханов Ю. С, Онищенко Г. Г. Методическое пособие по генотестированию минипулов донорской крови и ее компонентов на вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов В и С методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). – М., 1998. – 20 с.
7. Щербо С. Н. ДНК и РНК-технологии в современной лабораторной диагностике. // Лабораторная медицина. – 1998. – № 1. – С. 81–83.
8. ALT Ltd. [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.alt.ua>
9. Bio-Rad Laboratories [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.bio-rad.com>
10. BioSan ltd. [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.biosan.lv>
11. Boeco [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.boeco.com>
12. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M. M. M., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol.28, №3, – P. 495–503.
13. Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanat-phenol-chloroform extraction // Analit. Bio-chem. – 1987. – Vol.11, №2. – P. 156–159.
14. Ishizawa M., Kobayashi Y., Miyandira T., Matsuura S. Single procedure of DNA isolation human serum// Nucleic Acids Res. –1991. – Vol. 19, №20. – P. 5792.
15. LabCentraal [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.labcentraal.com>
16. MPW Med.Instruments [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.mpw.pl>
17. Nanogen Advanced Diagnostics s.r.l. [Electronic resource] / Mode of access: <http://www.nanogenad.com>

ГЛАВА 5 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Приоритетным направлением развития современной лабораторной медицины является разработка и внедрение передовых диагностических технологий, позволяющих обеспечить высокую эффективность лабораторного процесса, получить новые данные о состоянии организма человека, сократить время и стоимость лечения.

К клинико-диагностическим лабораториям предъявляются все более высокие требования: контроль качества проводимых исследований, их воспроизводимость, чувствительность, необходимость расширения спектра выполняемых исследований использование новейших технологий и современного оборудования.

Отмечаются колебания результатов клинико-лабораторных исследований под влиянием многих факторов: возможно изменение исследуемой величины, так как количественные или качественные характеристики клеточных элементов, концентрация и наличие химических компонентов в биологическом материалах являются непостоянными величинами. Все исследуемые показатели, отражающие физиологические процессы жизнедеятельности макроорганизма подвергаются непрерывным динамическим изменениям, при этом характер этих изменений неодинаков в отношении различных видов аналитических образцов. В то же время на точность лабораторных исследований, определяющих собственно аналитическую вариабельность, влияют такие факторы как нестабильность применяемых реактивов, колебания тока в сети, питающей измерительный прибор, невнимательность лаборанта и др. (вызывающие случайные погрешности), а также свойства метода исследования, калибратор, технические свойства измерительного прибора и т.д. (приводящие к систематической погрешности). При этом факторы, вызывающие аналитическую погрешность, могут иметь постоянный характер или проявляться время от времени [1].

На колебания результатов анализов влияют также и факторы собственно аналитического процесса: его условия (ручное или автоматическое выполнение, температура); характеристики метода (принцип определения, специфичность, чувствительность); ингредиенты (реагенты, калибраторы); способ регистрации и измерения результатов (визуальная или автоматическая детекция и регистрация результатов исследования, точностные характеристики измерительного оборудования). Главной задачей клинической лабораторной аналитики является достижение и обеспечение такого соотношения

разброса аналитической вариации с пределами биологической вариации, при котором оказывается возможным надежно установить и отличить изменения результатов исследований, вызванные патологическим состоянием или процессом, от колебаний чисто биологического характера [2].

При оценке аналитической точности принимают во внимание как правильность результата, т.е. степень близости значения результата исследования должному или наиболее вероятному значению аналитического образца, так и степень близости друг к другу результатов повторных исследований одного и того же материала, произведенных в определенных условиях (если в одной серии, – это сходимость результатов; если в разное время и в разных местах, – воспроизводимость). Интегральной мерой неточности результатов может служить общая ошибка или погрешность.

Контроль качества лабораторных методов исследования – это система мероприятий, включающая как статистические методы анализа, так и оценку пригодности метода для данной лаборатории; квалификацию сотрудников, уровень и контроль работы оборудования, контроль проведения пре- и постаналитического этапов [5].

Использование методов контроля дает возможность оценить качество проводимых лабораторных исследований, выявить возникающие при исследовании всевозможные ошибки, их характер и причины, выработать способы устранения ошибок.

По мнению специалистов лабораторной диагностики требования к качеству лабораторных исследований должны соответствовать медицинским потребностям, которые оказываются неодинаковыми как применительно к отдельным видам патологии и соответствующим наиболее информативным для них аналитическим образцам, так и по отношению к цели исследования: собственно лабораторной диагностике, отбору пациентов для специфических лечебных мероприятий, динамическому наблюдению (мониторингу) состояния пациента в процессе проводимого лечения.

Основным условием для использования новых разработанных методик в повседневной работе лабораторий является их оценка и анализ с позиций доказательной медицины.

Для осуществления данного этапа используются такие мероприятия, как проведение контроля качества выполняемых клинических лабораторных исследований, которое предполагает стандартизацию методов и средств проведения исследований.

Система контроля качества проводимых исследований должна охватывать все факторы, влияющие на получение конечного результата проводимого лабораторного исследования, в том числе особые требования должны предъявляться к:

- эталонным образцам и калибраторам;
- используемому оборудованию;
- наборам реагентов;
- методам исследования;
- преаналитическому этапу;
- контрольным материалам.

Согласно данной концепции в отношении каждого из вышеизложенных пунктов подразумевается, во-первых, разработка необходимого пакета документации, регламентирующей деятельность клинико-диагностической лаборатории; следующим пунктом идет разработка требований к материалам исследования, методикам и получаемым результатам, а также мероприятия по организации и техническому оснащению данных процессов.

При организации работы по контролю качества проводимых исследований следует основываться на принципах доказательной медицины, главным из которых является проверяемость, т.е. возможность проверки объективными методами полученных результатов с использованием приведенных выше требований.

5.1. Критерии аналитической и диагностической значимости молекулярно - биологических исследований

Для выявления и оценки систематических и случайных погрешностей результатов измерений, производимых в молекулярно-биологических лаборатории в процессе выполнения внутрилабораторного контроля качества исследований следует использовать ряд критериев качества:

1. точность измерений, т.е. близость их результатов к истинному значению измеряемой величины; высокая точность измерений соответствует малым погрешностям как систематических, так и случайных измерений;
2. сходимость результатов измерений, т.е. отсутствие существенных различий между ними при измерениях, выполняемых в одинаковых условиях;
3. воспроизводимость результатов измерений — отсутствие существенных различий между ними при измерениях, выполняемых в разных условиях (в различное время, в разных местах);
4. правильность измерений, т.е. отсутствие систематических погрешностей в результатах [6].

Для практического использования в клинической лабораторной диагностике оптимальным является соотношение высокой чувствительности теста с высокой специфичностью. Внедрение современных молекулярно-

генетических методов позволяет решить данную проблему, но требует тщательных подходов к оптимизации методик и актуализирует формирование в молекулярно-генетических лабораториях системы контроля качества, которая отвечала бы международным стандартам [10].

Обязательным требованием к молекулярно-биологическим лабораторным исследованиям является достоверность получаемых результатов. Метод не может быть рекомендован для практического использования, если не проведена оценка его надежности и аналитической пригодности. Надежность метода и его аналитическая пригодность характеризуется его специфичностью, чувствительностью, интервалом, который определяется по нескольким параметрам (точность, правильность, линейность), а также воспроизводимостью, сходимостью, пределом обнаружения и надежностью (стабильностью) результатов исследования.

Специфичность метода – его способность выявлять именно тот компонент, для определения которого данный способ исследования предназначается, т.е. свойство метода качественно и количественно обнаруживать одно и тот же субстрат, поэтому при оценке специфичности указываются характер и степень влияния других факторов на результаты исследования [10].

Специфичность метода ПЦР заключается в возможности с его помощью установить наличие определенных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) избранного объекта (микроорганизмы, генетически модифицированные соединения) в исследуемом субстрате. В коммерческих наборах для ПЦР исследований специфичность определена и, как правило, представлен перечень интерферирующих веществ. Для работы в лаборатории следует использовать наборы с высокой специфичностью [4].

Чувствительность метода ПЦР характеризуется возможностью выявлять определенный фрагмент ДНК избранного объекта изучаемое свойство субстрата при минимальных количествах последнего. При исследовании концентрации ДНК чувствительность ПЦР метода определяют по наименьшему различию между двумя концентрациями ДНК исследуемого объекта, которые могут быть установлены данным методом. При использовании метода ПЦР чувствительность анализа характеризуется наименьшей концентрацией клеток или вирусных частиц в пробе, дающей положительный результат анализа, и определяется эффективностью методики выделения ДНК возбудителя, чувствительностью собственно ПЦР и чувствительностью выбранного метода индикации.

Интервал определяется в ходе проведения испытаний по каждому из параметров: точность, правильность, линейность. Интервал выражается в тех же единицах, что и результаты самого аналитического метода.

Точность определения – качество измерений, отражающее близость полученных результатов содержания анализируемого вещества к его истинному значению. Критерий точности характеризуется воспроизводимостью результатов при повторном анализе отдельных проб. Пределы для точности - 3 % RSD, для примесей – в пределах 10 %.

Оценка точности лабораторного теста основана на сравнении его результата с результатом некоторого точного способа определения болезни, т.е. с заслуживающим доверия показателем, так называемым «золотым стандартом» (референтным, или эталонным методом). В действительности «золотой стандарт» тоже нельзя считать абсолютным. Эталоном точности может быть относительно простой и недорогой тест, однако гораздо чаще для ответа на вопрос о наличии или отсутствии заболевания нужны исследования достаточно трудоемкие, дорогие или сопряженные с риском для пациента. Поскольку точные способы установления диагноза почти всегда сопряжены с достаточно высоким риском и значительными затратами средств, врачи и пациенты предпочитают использовать более простые тесты вместо «золотого стандарта», по крайней мере на первых этапах диагностики. Простые тесты можно использовать для диагностики вместо более сложных, но более точных, но при этом необходимо учитывать риск постановки ошибочного диагноза, это оправдано только в тех случаях, когда риск ошибки известен и допустимо низок. Для этого необходимо иметь достоверные данные о соотношении точности простых тестов и «золотого стандарта». «Золотым стандартом» в клинической микробиологии является культуральный метод обнаружения микроорганизмов [7].

Правильность – понятие, характеризующее качество измерений. Правильность лабораторного теста оценивается соответствием определяемого результата истинному его значению. Чем оно больше, тем ближе к нулю систематические погрешности в результате анализа. Критерий правильности используется для того, чтобы показать, насколько полученные данным методом результаты отличаются от истинных [4].

Правильность результатов исследования проверяется соответствием среднего значения результатов измерений истинной величине измеряемого параметра. Для определения относительной концентрации ДНК в биологическом материале методом ПЦР правильность измерений можно определять, используя следующие способы:

1. Способ добавки – внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и определение его с помощью исследуемого метода (Рекомендуется исследовать три уровня концентрации, с интервалом концентраций от 50 до 150 %, трехкратно).

2. Способ смешения проб – биологическая жидкость с низкой и высокой концентрацией исследуемого вещества смешиваются в разных соотношениях.

3. Сравнение с методом, правильность которого установлена (референтный метод). Данный способ недоступен при отсутствии референтного метода.

4. Исследование контрольного материала (контрольной сыворотки или калибровочных образцов) с известным содержанием компонентов – наиболее простой способ оценки правильности [4, 8, 11].

Критериями оценки правильности результатов являются:

1. Отношение разности величин (заданной и истинной) к заданной величине. Если процентное отклонение от заданной величины меньше $3S$ (S – среднеквадратичное отклонение), правильность результатов находится в допустимых пределах;

2. По допустимому отклику в зависимости от концентрации активного компонента, для биоаналитических методов – не более 15 %, за исключением предела количественного определения – не более 20 %;

3. Тест Лорда. Сравнивают результаты 10 параллельных исследований контрольной сыворотки со значением, приведенным в аннотации к контрольной сыворотке по формуле 5.1:

$$L = \frac{\bar{x} - m}{x_n - x_1} \quad (5.1),$$

где L – критерий Лорда,

m – величина с аннотации,

\bar{x} – среднее значение 10 определений,

$(x_n - x_1)$ – разница между максимальной и минимальной величинами.

При уровне значимости 5 % правильность результата достоверна, если $L < 0,23$.

4. Тесты, устанавливающие степень достоверности различий между двумя методами (методом-кандидатом и методом сравнения): t – критерий Стьюдента, f – критерий Фишера, критерии знаков, тест Вилкоксона и др [6].

Линейность для ПЦР исследования определяется путем анализа 4 или более образцов, от трех до шести повторений. Производится расчет линии регрессии методом наименьших квадратов для результатов с различными концентрациями аналита, от 50 до 150% от планируемых (от 80 до 120% по FDA). Наклон регрессионной линии и его вариация дает математическую степень линейности. Для оценки степени линейности должны быть рассчитаны коэффициент корреляции, пересечение с осью Y , наклон регрессионной

линии и остаточная сумма отклонений. Поскольку отклонения от линейности трудно обнаружить, могут использоваться две дополнительные графические процедуры.

Первый график должен изобразить взаимосвязь отклонений от линии регрессии и концентрации или логарифмов концентрации, если концентрационный интервал перекрывает несколько десятичных знаков. Для линейных интервалов отклонения должны быть равномерно распределены между положительными и отрицательными значениями.

Второй – зависимость относительных откликов (отношение сигнала или оптической плотности к соответствующим концентрациям) от концентрации. Полученная линия (постоянного ответа) должна быть горизонтальна (нулевой наклон) по полному линейному диапазону, т. е. до точек пересечения с параллельными линиями, соответствующими 95 и 105% значимости [3].

Уравнение линейной регрессии, примененное к результатам, должно иметь отрезок, отсекаемый на координатной оси, близкий к нулю, либо точка пересечения не должна статистически значимо отличаться от нуля [2]. О тесной корреляции можно говорить, когда коэффициент корреляции не ниже 0,9, о слабой связи – при значениях ниже 0,7 [7].

Другие авторы устанавливают следующие значения допустимых критериев для различных методов [2]: – для количественного определения коэффициент корреляции – не менее 0,99, пересечение с осью Y – не более 2,0% отклика номинальной концентрации, относительный отклик во всем диапазоне не отличается от данного показателя при номинальной концентрации более чем на 2,5%; – для определения примесей соответствующие числовые критерии – коэффициент корреляции 0,98, пересечение с осью Y – не более 10% отклика концентрации примеси 2,5%, разброс относительного отклика – не более 5%.

Воспроизводимость – характеризует близость друг другу результатов, полученных при выполнении лабораторно-аналитических исследований пробы в различных условиях (обычно во времени). Это критерий, отражающий степень разброса данных и используется для выявления случайных ошибок. Воспроизводимость результатов ПЦР исследований характеризуется степенью их совпадения при многократном анализе одной и той же пробы биологического материала. Воспроизводимость выражается величиной, обратной коэффициенту вариации результатов, при этом, чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость.

Сходимость (или воспроизводимость в серии) – дает представление о близости друг другу результатов исследований, выполняемых в одинаковых условиях (в серии). В целом воспроизводимость оценивается как степень

разброса результатов, получаемых анализируемым методом. Статистическими показателями разброса результатов являются среднеквадратичное отклонение S и относительный показатель разброса результатов – коэффициент вариации CV [4].

Среднее квадратичное отклонение (S) и коэффициент вариации (CV) служат характеристикой случайных погрешностей и используются для оценки сходимости и воспроизводимости измерений. Коэффициент вариации (формула 5.4) является отношением среднеквадратичного отклонения (формула 5.2) к среднеарифметическому значению результатов (формула 5.3) n измерений:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n-1} \quad (5.2);$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n} \quad (5.3);$$

$$V = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (5.4),$$

где x – результат отдельного определения;

\bar{x} – среднее арифметическое всех определений,

n – число определений,

S – среднеквадратичное отклонение,

V – коэффициент вариации [7].

Критерий инструментальной воспроизводимости – 1%, внутрилабораторной воспроизводимости – 2% для количественного определения основного компонента, для примесей на пределе определения – 5 и 10%, соответственно [7].

Контроль воспроизводимости (для выявления случайных ошибок) и контроль правильности (для установления систематических ошибок) проводятся для проверки точности ПЦР исследования.

Сходимость для метода ПЦР определяется путем постановки анализа, который выполняется в одной лаборатории одним оператором на одном оборудовании за относительно короткий промежуток времени. По крайней мере:

1. проводится 5-6 определений,
2. используются три различных матрикса,
3. при трех различных концентрациях, и рассчитывается относительное среднеквадратичное отклонение [6].

Критерий оценки зависит от типа анализа. Стандартное отклонение (SR) может изменяться между 2 и 20%. Термин «стандартное отклонение» означает корень квадратный из дисперсии, определяемый в отечественных нормативных документах как «среднеквадратичное отклонение S» [1]. Для анализа лекарственных соединений при контроле качества стандартное отклонение – менее 1%. Для биологических образцов допускается до 15% [3]. Для биоаналитических методов – не более 15% для каждого концентрационного уровня. За исключением нижнего предела количественного определения – не более 20% [9].

Предел обнаружения для инструментальных методов определяют как отношение сигнал/шум или путем измерения величины фонового сигнала. Для неинструментальных методов предел обнаружения определяется анализом образцов с известными концентрациями аналита и установлением минимального уровня аналита, при котором он может быть достоверно обнаружен. Согласно фармакопейной документации [1, 2, 3], установленный предел обнаружения и определения должен быть подтвержден анализом модельных смесей, содержащих аналит на пределе и близко к нему. Пользуются подходом, описанным в [5]: ряд образцов (обычно 6) с уменьшающимся количеством аналита анализируют и строят график зависимости относительного стандартного отклонения сходимости от количества аналита. По графику количество аналита, которое соответствует предварительно определенной требуемой сходимости, равно пределу определения. Другой подход – установление предела определения по внутрилабораторной воспроизводимости (рекомендуется SR = 20 %) [2].

Предел обнаружения и предел определения могут быть вычислены расчетным методом (формулы 5.5, 5.6) [7]:

$$DL = \frac{3,3SD}{b} \quad (5.5),$$

где DL (limit of detection) – предел обнаружения,
SD – стандартное отклонение,
b – наклон калибровочной кривой.

$$QL = \frac{10SD}{b} \quad (5.6),$$

где QL (limit of quantitation) – предел количественного определения,
SD – стандартное отклонение,
b – наклон калибровочной кривой.
SD определяется несколькими путями:

1. По стандартному отклонению холостой пробы, вычисляется (SD от фонового ответа);

2. По калибровочной кривой по остаточному отклонению регрессионной линии, используя образцы аналита в предполагаемом диапазоне предела количественного определения или обнаружения.

3. По стандартному отклонению регрессионной линии в точке пересечения с осью Y.

Предел количественного определения для биоаналитических методов должен быть проанализирован в 5 повторностях и иметь 20% точность и 80-100% правильность.

Надежность (стабильность) определяется проведением теста правильности при небольших реальных отклонениях параметров методики или свойств анализируемого объекта. Процедура изучения стабильности должна показать стабильность аналитов в течение получения, обработки образца, длительного (замороженного при предписанной температуре хранения), кратковременного хранения (при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ от 4 до 24 ч), после циклов замораживания/оттаивания (три цикла) и самого аналитического процесса.

Источниками погрешностей могут быть внутренние и внешние факторы: несоблюдение условий методики (температура, объем, время), правил приготовления и хранения реактивов, принципов аналитического метода, низкое качество реактивов и др.

Для оценки диагностической значимости результатов молекулярно-биологических исследований необходимо рассчитывать диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), диагностическая эффективность (ДЭ), прогностическую значимость положительного (ПЦ+) и отрицательного (ПЦ-) результатов по следующим формулам 5.7 – 5.11:

$$\text{ДЧ} = [\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})] \times 100\% \quad (5.7);$$

$$\text{ДС} = [\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})] \times 100\% \quad (5.8);$$

$$\text{ДЭ} = [(\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ЛП} + \text{ИО} + \text{ЛО})] \times 100\% \quad (5.9);$$

$$\text{ПЦ+} = [\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП})] \times 100\% \quad (5.10);$$

$$\text{ПЦ-} = [\text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛО})] \times 100\% \quad (5.11),$$

где ИП – истинноположительные результаты теста;

ЛО – ложноотрицательные результаты теста;

ИО – истинноотрицательные результаты теста;

ЛП – ложноположительные результаты теста.

Диагностическая чувствительность – вероятность того, что у пациента будет получен положительный результат теста.

Диагностическая специфичность – вероятность того, что у здорового человека будет получен отрицательный результат теста.

Предсказательная ценность положительного результата теста - вероятность того, что у обследованного с положительным результатом теста есть болезнь.

Предсказательная ценность отрицательного результата теста - вероятность того, что у обследованного с отрицательным результатом теста нет заболевания.

5.2. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на пре-аналитическом этапе

Пре-аналитический этап ПЦР включает в себя долабораторный и лабораторный этапы, требующие стандартизации. В каждом лечебно-профилактическом учреждении необходимо разработать стандартные операционные процедуры (СОП), регламентирующие пре-аналитический долабораторный этап, включающий следующие позиции:

1. Правильное и адекватное взятие клинического материала [5]

➤ взятие материала производится из предполагаемого места обитания микроорганизма. Различные микроорганизмы имеют свои особенности локализации, пути распространения и выделения, что следует учитывать при выборе наиболее адекватного места взятия биопробы;

➤ взятие биологического материала, по-возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры;

➤ клинический материал из урогенитального тракта для исследования у женщин следует брать перед менструацией или через 1-2 дня после ее окончания. Женщины накануне обследования не должны проводить туалет наружных половых органов и спринцевание. Взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии;

➤ количество биологического материала, забираемого для исследования не должно быть избыточным, т.к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или могут способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке. При взятии

мазков и соскобов достаточное количество материала - размером “со спичечную головку”;

➤ для взятия биопроб необходимо пользоваться только одноразовым инструментом и одноразовыми пластиковыми контейнерами (или пробирками с транспортной средой) с плотно закрывающейся или завинчивающейся крышкой;

➤ при заборе материала из урогенитального тракта недопустимо попадание крови и большого количества слизи.

2. Доставку материала в лабораторию при оптимальных условиях

❖ моча, слюна, смывы и др. исходный материал, содержащий взвеси клеток доставляются в лабораторию в свежем виде и до получения осадка исходный материал не охлаждается и не замораживается;

❖ неохлажденная кровь с антикоагулянтом доставляется в лабораторию в течение 2-х часов, при необходимости допускается хранение при +4...+8°C - не более 1 суток;

❖ при необходимости соскобы эпителиальных клеток, помещенные в пробирки с транспортной средой можно заморозить при – 20°C. В замороженном виде биологический материал может храниться не более 2-х недель.

3. Специальную маркировку биологического материала с указанием в направлении и медицинской карте пациента его фамилии и типа материала и анатомической области, откуда он получен.

4. Транспортировку клинического материала при адекватном температурном режиме и условия хранения проб до исследования.

➤ транспортировка охлажденных или замороженных образцов должна проводиться при температуре не выше +4°C в течение 6 часов в термоконтейнере с охлаждающими элементами или термосе со льдом.

В клинко-диагностической лаборатории также необходимо разработать СОП пре-аналитического лабораторного этапа, включающие следующие позиции:

1. Регистрация поступившего биологического материала.

2. Соблюдение условий хранения биологических проб до исследования.

❖ неохлажденные пробы должны быть использованы в течение 2-х часов для выделения нуклеиновых кислот;

❖ хранить биологический материал необходимо при +4...+8°C - не более 1 суток; при заморозке при -18...-20°C - не более 2-х недель; при -70°C - несколько месяцев.

❖ допускается только однократное замораживание-оттаивание биологического материала.

5.3. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на аналитическом этапе

Контроль качества клинических лабораторных исследований состоит в разработке и осуществлении системы контрольных мер для обнаружения и отслеживания погрешностей, которые могут проявиться в процессе выполнения исследований и исказить клинико-лабораторную информацию о состоянии внутренней среды обследуемых пациентов.

Контроль качества призван минимизировать любую вариабельность в результатах исследований, обусловленную различиями в:

- ✓ квалификации исследователей;
- ✓ технологии получения клинического материала;
- ✓ качестве реагентов;
- ✓ используемой аппаратуры;
- ✓ методологии исследования.

Система обеспечения качества лабораторных исследований включает в себя с одной стороны - соблюдение общих требований к работе лаборатории, таких как:

- максимальное исключение «человеческого фактора» — автоматизация на всех этапах работы;
- соблюдение требований по хранению реагентов от компаний-производителей;
- входной и текущий технический и метрологический контроль оборудования и расходных материалов;
- соблюдение санитарно-эпидемиологического режима;
- периодический аудит и аттестация лаборатории;
- наличие действующих сертификатов и повышение квалификации всего медицинского персонала по специальности;
- соблюдение техники безопасности и т.д.

С другой стороны - обязательные специализированные мероприятия - поведение внутрилабораторного и участие в межлабораторном контроле качества [6].

Целью внутрилабораторного контроля качества является оценка соответствия результатов исследований установленным критериям их приемлемости при максимальной вероятности обнаружения недопустимой погрешности и минимальной вероятности ложного отбрасывания результатов выполненных лабораторией аналитических серий. Межлабораторный контроль - это сравнительный контроль качества результатов исследований, полученных в ряде лабораторий при использовании единого контрольного материала,

проводимый не реже чем один раз в квартал под методическим руководством контрольных центров республиканского, краевого или областного уровней.

Регулярно проводимая внешняя оценка качества и повседневно проводимый внутрилабораторный контроль качества дополняют, но не заменяют друг друга: внешняя оценка качества направлена, прежде всего на выявление систематических ошибок лабораторных методов и обеспечение единства измерений на всей территории страны, а внутрилабораторный контроль качества предназначен для поддержания стабильности аналитической системы, выявления и устранения недопустимых случайных и систематических погрешностей [7, 8].

Внутрилабораторный контроль качества исследований методом ПЦР состоит в постоянном (повседневном, в каждой аналитической серии) проведении контрольных мероприятий:

1. Использование тест-систем, содержащих внутренние контрольные образцы, позволяющие оценить эффективность выделения ДНК и возможное ингибирование в процессе амплификации.

2. Постановка отрицательных контролей при выделении нуклеиновых кислот (нк).

3. Постановка положительного и отрицательного контролей при проведении амплификации.

Также с периодичностью, зависящей от объема выполняемой работы (периодичность определяется руководителем лаборатории), но не реже 1 раза в квартал проводят внутрилабораторный контроль ПЦР-исследований с оценкой сходимости, воспроизводимости и правильности измерений.

Контроль качества лабораторных исследований проводят путем сопоставления результатов измерений, производимых в лаборатории, с контрольным образцом и последующим определением величины отклонения. Контроль может осуществляться с использованием специальных контрольных материалов или средств и ряда способов, не требующих контрольных материалов.

Для контрольных измерений в молекулярно-биологической лаборатории следует использовать контрольные материалы: водные стерильные растворы - отрицательный контроль; специфические контрольные средства (микробиологические культуры, плазмидные стандарты и т.п.) – положительный контроль.

Контрольный материал включают в серию однотипных исследований и производят анализ с использованием той же аппаратуры, методов, реактивов, пипеток, дозаторов, с участием того же персонала, и т.д.

Применение контрольных материалов с известным содержанием ДНК матрицы определяет правильность выдаваемых количественных результатов.

Для чего используют ДНК матрицы со средними, низкими и высокими значениями концентрации ДНК.

Контроль сходимости и воспроизводимости результатов исследований осуществляется с помощью как контрольного материала с неисследованным содержанием, так и методами, не требующими контрольных материалов (н.р. исследование параллельных, случайных, повторных и смешанных проб).

Контроль может осуществляться путем исследования шифрованных «положительных» и «отрицательных» проб. В качестве «положительных» могут быть использованы образцы, искусственно контаминированные нуклеиновыми кислотами, или уже ранее использованные пробы, хранившиеся не более 1 недели при температуре минус 20°C. В этих пробах определяют нуклеиновые кислоты тех же возбудителей, что и при первичном исследовании. В качестве «отрицательных» применяют образцы, не содержащие нуклеиновые кислоты возбудителей инфекционных заболеваний, например, транспортная среда, ДНК-буфер.

Для контроля правильности используется только материал с исследованным содержанием компонентов. Контроль правильности результатов измерений проводят при условии их хорошей сходимости. Методами контроля правильности могут быть сравнение результатов собственных определений с номинальным значением контрольных материалов; сравнение результатов с результатами референтного метода.

Допускается проведение внутрилабораторного контроля качества путем исследования шифрованных аттестованных контрольных панелей, содержащих «положительные» и «отрицательные» пробы.

Количество проб должно быть достаточным (не менее 10) для оценки работы сотрудников и выявления контаминированных участков лаборатории.

Документирование результатов ВКК по показателям, оцениваемым качественными категориями, должно проводиться ответственным за контроль качества в Журналах регистрации результатов ВКК в рукописном виде, а результаты ВКК по измеряемым показателям в цифровом формате должно производиться в электронном виде.

Проведение внутрилабораторного контроля качества является обязательным требованием при проведении лабораторных исследований как доказательство того, что в каждом конкретном случае соблюдены и контролируются все параметры исследования, обеспечивающие правильность результата.

5.4. Критерии внутрилабораторного контроля качества ПЦР-исследований

Для выявления и оценки систематических и случайных погрешностей результатов измерений, производимых в ПЦР-лаборатории в процессе выполнения внутрилабораторного контроля качества исследований следует использовать следующие критерии качества [7,8]:

1. **Сходимость** (воспроизводимость в серии) – дает представление о близости друг другу результатов исследований (т.е. отсутствие существенных различий между ними при измерениях), выполняемых в одинаковых условиях (в серии).

2. **Воспроизводимость** – характеризует близость друг другу результатов, полученных при выполнении лабораторно-аналитических исследований пробы в различных условиях (в различное время, в разных местах).

Эти критерии, отражающие степень разброса данных и используются для выявления случайных ошибок. Сходимость и воспроизводимость результатов количественной ПЦР характеризуется степенью их совпадения при многократном анализе одной и той же пробы биологического материала. По крайней мере:

1. проводится 3-6 определений,
2. в трех различных диапазонах концентраций (низком, среднем и высоком), и рассчитывается относительное среднеквадратичное отклонение.

В целом воспроизводимость **количественной ПЦР** оценивается как степень разброса результатов, получаемых анализируемым методом. Среднее квадратичное отклонение (S) и коэффициент вариации (V) служат характеристикой случайных погрешностей и используются для оценки сходимости и воспроизводимости измерений.

Статистическими показателями разброса результатов являются среднеквадратичное отклонение S (формула 5.12) и относительный показатель разброса результатов – коэффициент вариации V (формула 5.14), при этом, чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость [9].

При расчете среднеквадратичного отклонения пределом воспроизводимости является значение, которое с доверительной вероятностью 95 % не превышает абсолютной величиной разности между результатами двух измерений (или испытаний), полученными в условиях воспроизводимости.

Коэффициент вариации является отношением среднеквадратичного отклонения к среднеарифметическому значению результатов n измерений:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n-1} \quad (5.12);$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n} \quad (5.13);$$

$$V = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (5.14),$$

где x – результат отдельного определения;
 \bar{x} – среднее арифметическое всех определений,
 n – число определений,
 S – среднеквадратичное отклонение,
 V – коэффициент вариации.

Критерий приемлемости при оценке сходимости и воспроизводимости не должен превышать 20 %.

Также сходимость и воспроизводимость результатов количественной ПЦР можно оценить при помощи тестов, устанавливающих степень достоверности различий между двумя методами (методом-кандидатом и методом сравнения): t – критерий Стьюдента, f – критерий Фишера, критерии знаков, тест Вилкоксона и др [10,11].

Сходимость и воспроизводимость результатов **качественной ПЦР** характеризуется степенью их совпадения при многократном анализе одной и той же пробы биологического материала.

Статистическая обработка данных оценки воспроизводимости качественной ПЦР осуществляется методом альтернативной вариации, где относительная доля положительно сработавших образцов p рассчитывается по формуле 4:

$$p = \frac{p_1}{n} \times 100\% \quad (5.15),$$

где p_1 – количество положительно сработавших образцов,
 n – общее количество исследованных образцов

со средней статистической ошибкой sp , которая рассчитывается по формуле 5:

$$S_p = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n}} \quad (5.16)$$

где p - относительная доля положительно сработавших образцов,
 n – общее количество исследованных образцов.

Результаты статистической обработки данных представляются в виде $p \pm Sp$.

Критерием приемлемости воспроизводимости качественной ПЦР является значение p равное 98-100%.

Оценка сходимости и воспроизводимости для качественной ПЦР с детекцией в реальном времени проводится по результатам сравнения разности значений СТ (Δ СТ) при амплификации проб (СТ- значение цикла при котором пороговая линия и кривая амплификации пересекается (cycle threshold)).

Критерий приемлемости воспроизводимости качественной ПЦР в реальном времени по Δ СТ не должен превышать 0,5.

3. Правильность – понятие, характеризующее качество измерений, т.е. отсутствие систематических погрешностей в результатах. Правильность лабораторного теста оценивается соответствием определяемого результата истинному его значению. Чем оно больше, тем ближе к нулю систематические погрешности в результате анализа. Критерий правильности используется для того, чтобы показать, насколько полученные данным методом результаты отличаются от истинных [8].

Правильность результатов **количественной ПЦР** проверяется соответствием среднего значения результатов измерений истинной величине измеряемого параметра. Исследование контрольного материала (контрольной сыворотки или калибровочных образцов) с известным содержанием компонентов – наиболее простой способ оценки правильности.

Коэффициент вариации рассчитывался по формуле 5.17:

$$CV = \left| 1 - \frac{\text{рассчитанная концентрация ДНК}}{\text{известная концентрация ДНК}} \right| \times 100 \% \quad , (5.17)$$

Критерием приемлемости для правильности является коэффициент вариации, значения которого не должно превышать 20 %.

Правильность **качественной и количественной ПЦР** можно оценить при сравнении с методом, правильность которого установлена (референтный метод). Данный способ недоступен при отсутствии референтного метода.

Правильность можно оценить при помощи статистических тестов, устанавливающих степень достоверности различий между двумя методами (методом-кандидатом и методом сравнения): t – критерий Стьюдента, f – критерий Фишера, критерии знаков, тест Вилкоксона и др [10,11].

5.5. Принципы организации контроля качества ПЦР-исследований на пост-аналитическом этапе

Для обеспечения качества ПЦР исследований немаловажным условием является предупреждение отрицательного влияния факторов на пост-аналитическом (оценка правдоподобия и достоверности полученных результатов исследований, их предварительная интерпретация) этапе. Пост-аналитический этап – этап от получения результата ПЦР-анализа до доставки его лечащему врачу или пациенту, а так же адекватная трактовка результата врачом.

Для повышения качества исследований на пост-аналитическом этапе необходимо все результаты, выходящие за пределы референсных значений, просматривать врачом-лаборантом. При получении результатов, вызывающих подозрение или не укладывающихся в клиническую картину, решение о перепостановке ПЦР-анализа принимать совместно с заведующим. При возникновении вопросов у клиницистов, трактовку результатов ПЦР-анализа и планирование дальнейших действий необходимо проводить совместно с заведующим лаборатории.

При разработке СОП, регламентирующих пост-аналитический этап в клинико-диагностической лаборатории, необходимо отразить следующие позиции:

- ❖ формулирование заключения по результатам лабораторного исследования (оценка их аналитической достоверности по данным исследования контрольных материалов, сравнение полученных результатов с референтными величинами, оценка возможной ингибиции ДНК и др.);
- ❖ доставка результатов анализа до клинициста;
- ❖ интерпретация лабораторных данных с учетом клинического состояния пациента.

5.6. Принципы организации внешнего контроля качества ПЦР-исследований

Целью внешней оценки качества ПЦР-исследований является оценка степени сопоставимости результатов исследований, выполняемых в различных учреждениях здравоохранения, и соответствия их установленным нормам аналитической точности [7].

Одним из факторов, препятствующих становлению системы контроля качества ПЦР-диагностики, является недостаточное количество в Республике Беларусь зарегистрированных, сертифицированных контрольных материалов.

Основными требованиями к контрольным материалам являются идентичность их физико-химических свойств анализируемым образцам; стабильность при длительном хранении; минимальная вариабельность состава и свойств внутри серии; пригодность для выявления систематических и случайных погрешностей.

ПКО предназначена для проведения внешнего и внутреннего контроля качества работы лабораторий, использующих метод ПЦР.

ПКО предназначена для проведения контроля качества ПЦР-тест-систем, амплифицирующих ДНК возбудителей, с оценкой их чувствительности и специфичности

При проведении внешнего контроля качества ПЦР-исследований готовят отчет, содержащий следующую информацию:

- ✓ Дата постановки эксперимента;
- ✓ ФИО, должность исполнителя;
- ✓ Серия панели;
- ✓ Названия и серии реагентов;
- ✓ Тип амплификатора;
- ✓ Полученные результаты.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкций по применению ПКО и диагностических ПЦР-тест-систем, а также квалифицированное проведение анализа.

5.7. Контаминация в ПЦР-лабораториях и меры предупреждения

Контаминация - попадание из внешней среды в реакционную смесь молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные результаты. Такими мишенями могут быть продукты реакции, попадающие во внешнюю среду на этапе электрофореза из пробирок, в которых успешно прошла амплификация, либо специфическая ДНК из биологических образцов на этапе пробоподготовки.

Причинами ложноположительных результатов являются следующие 3 вида контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе, которая возникает в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси) и приводит к появлению спорадических ложноположительных результатов;

2. Контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности детектируемого гена, которая возможна в условиях научно-производственных лабораторий;

3. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами) является наиболее частой причиной ложноположительных результатов, в связи с тем, что в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы.

Факторы, способствующие контаминации ПЦР-лаборатории:

- ✓ использование методов детекции ПЦР-продуктов, включающих открывание амплификационной пробирки;
- ✓ неправильная организация ПЦР-лаборатории;
- ✓ неправильное поведение лабораторного персонала.

Определить источник контаминации очень трудно, это требует значительных затрат времени и средств, поэтому необходимо постоянно использовать собственные лабораторные контроли и периодически применять зашифрованные отрицательные и положительные контрольные образцы, а также смывы с приборов, ручек и т.д.

Существует несколько способов борьбы с контаминацией. Одним из них является использование фермента N-урацил-гликозилазы (УГ). В основе этого метода лежит способность УГ расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на дУТФ, и после проведения ПЦР все образующиеся в пробирке ампликоны содержат урацил. При этом до амплификации в реакционную смесь добавляют УГ, поэтому попавшие в реакционную

смесь ампликоны будут разрушаются, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации.

Другим способом инактивации ампликонов служит фотохимическое воздействие на молекулы ДНК. Для этого используют псорален или изопсорален, которые активируются кратковременным облучением УФ-светом. Модифицированные этими соединениями молекулы ДНК не могут участвовать в реакции амплификации.

Однако, как известно, ни одна биологическая или химическая реакция не идет со 100% эффективностью и, соответственно, после инактивации продуктов амплификации из миллиардов копий амплифицированного фрагмента хотя бы несколько останутся целыми, что существенно снижает ценность такого подхода. Кроме того, всегда остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе пробоподготовки.

Таким образом, оба эти метода лишь в некоторой степени позволяют устранить источник контаминации и не гарантируют от ложноположительных результатов.

Третий способ борьбы с результатами контаминации— значительное уменьшение количества циклов реакции (до 25—30 циклов). Но даже при таком подходе риск получения ложноположительных результатов велик, так как и в этом случае при отсутствии ингибиторов легко получить продукт амплификации из-за контаминации.

Случайное загрязнение исследуемых проб нуклеиновыми кислотами или их амплификационными фрагментами (контаминация исходной ДНК или продуктами ПЦР) может происходить в результате воздействия пыли и аэрозолей. Вследствие этого, организация рабочей зоны в лаборатории основывается на системной локализации по месту этапов метода, вовлеченных в получение результатов, и на принципе «поточности».

Для предупреждения контаминации работа в ПЦР-лаборатории должна быть организована строго в соответствии с нормативно-правовыми документами:

1. Санитарные правила 17-129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 27 июля 2000 г. № 40.

2. Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Инструкция по применению утв. М-вом. рег. № 090-1008. – Минск, 2008. – 8 с.

Для выявления возможной контаминацией лаборатории нуклеиновыми кислотами контроль проводят путем взятия смывов с поверхностей объектов внешней среды. Смывы следует проводить 1 раз в неделю с рабочих

поверхностей во всех ПЦР-зонах. Перед взятием смывов тампоны (зонды) смачивают стерильным физиологически раствором или ТЕ-буфером (10 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности. После взятия смыва зонд помещают в микропробирки типа «эппендорф» с 300-400 мкл ТЕ-буфера, вращают в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют. Полученные суспензии центрифугируют при 8000g (12 тыс об./мин) в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения нуклеиновых кислот используют 0,1-0,2 мл надосадочной фракции.

Для уверенности в отсутствии контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать отрицательными контролями. В качестве отрицательных контролей рекомендуется использовать воду из комнаты пробоподготовки. Все реактивы рекомендуется хранить разлитыми на отдельные порции (аликвоты).

При возникновении контаминации лаборатории следует провести следующие мероприятия:

- утилизацию всех находящихся в "контаминированной" зоне реактивов;
- утилизацию исследуемых материалов на всех промежуточных стадиях обработки (кроме исходной);
- генеральную уборку, химическую и ультрафиолетовую дезинфекцию всех поверхностей лабораторных помещений;
- дезинфекцию мебели, рабочих поверхностей, а также поверхностей корпусов приборов и оборудования химическим методом и ультрафиолетовым излучением;
- замену всей спецодежды "контаминированной" зоны.

Случаи контаминации регистрируют в специальном журнале с указанием мероприятий по ее устранению и результатов внутрилабораторного контроля.

Проведение ПЦР-исследований до завершения деконтаминационных мероприятий не допускается.

Алгоритм действия при контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами [12]:

1. Сотрудников, проводящих мероприятия по деконтаминации, обеспечивают одноразовыми халатами, шапочками, бахилами и перчатками, одноразовой ветошью, емкостями для приготовления необходимых количеств моющих и дезинфицирующих растворов.

2. Каждую зону лаборатории обрабатывают сотрудники, работающие в ней.

3. Для обработки каждой зоны используют новый набор уборочного инвентаря.

4. Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки, например:

5. Участок 1 – бокс биологической безопасности и оборудование внутри него;

6. Участок 2 – внешние поверхности бокса биологической безопасности;

7. Участок 3 – шкафы для расходного материала;

8. Участок 4 – холодильники для хранения реактивов, образцов проб;

9. Участок 5 – оборудование, которое используют в работе, но стоит вне бокса биологической безопасности;

10. 10 Участок 6 – поверхности помещения (стены, окна, батареи, потолок, двери и т.д.);

11. Участок 7 – пол.

12. Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой персонал надевает одноразовую одежду, бахилы, шапочки, перчатки; готовит моющие и дезинфицирующие растворы.

13. Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляются ветошью, смоченной водой.

14. Затем на поверхность наносят хлорсодержащий дезинфектант (н-р, на 30 мин. 0,2% раствор ДП-2Т). Остатки дезинфицирующего средства удаляются ветошью, смоченной водой.

15. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание влажных поверхностей ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч.

16. Мероприятия, описанные в п.п. 7-8, повторяют еще раз.

17. Каждый последующий этап обработки проводят в новой одноразовой одежде (халат, шапочка, бахилы, перчатки) с использованием новой ветоши. Для удаления остатков нанесенных на поверхность дезинфицирующих средств ветошь тщательно прополаскивают в чистой воде, обрабатываемую поверхность протирают несколько раз. После каждого этапа обработки ветошь утилизируют.

18. По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний, диагностика которых наиболее часто осуществляется в данной лаборатории, а также на выявление нуклеиновых кислот возбудителей, име-

ющих короткие – менее 300 п.н. – специфические продукты амплификации (длина специфического фрагмента указана в инструкциях к тест-системе).

19. Для проведения смывов стерильный зонд с ватным тампоном смачивают в

20. В случае получения в образцах смывов положительных результатов ПЦР-анализа обработку повторяют.

21. Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники и т.п.) утилизируют.

22. Если все же, несмотря на принятые меры, обнаружены следы контаминации, то необходимо все поверхности помещения, оборудования, пипеток и прочее обработать 0,1 М НС1, а все используемые порции реактивов следует заменить на новые.

23. Проведение ПЦР-исследований до завершения деконтаминационных мероприятий не допускается.

Результаты смывов должны документироваться ответственным за контроль качества в ПЦР-лаборатории в Журнале регистрации результатов ВКК в рукописном виде.

Таким образом, в качестве критериев оценки качества исследований методом полимеразной цепной реакции в лаборатории учитывают результаты внутреннего и внешнего лабораторного контроля, а также отсутствие случаев лабораторной контаминации нуклеиновыми кислотами.

Требования к проведению ПЦР-анализа:

Забор биологического материала должен производить специально обученный персонал только в одноразовые стерильные пластиковые пробирки.

Работа должна проводиться в одноразовых перчатках и специальной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и, так как анализируемые биологические пробы являются потенциально опасным инфицированным материалом.

Обработка одежды из разных помещений должна производиться отдельно. Необходимо, чтобы на разных этапах проведения ПЦР-анализа работали различные сотрудники.

Хранение биологического материала: до транспортировки в ПЦР-лабораторию отобранный биоматериал хранят при температуре 2-4°C не более 48 ч; для более длительного хранения (до 1 месяца) используют максимально низкую температуру. Необходимо минимизировать время от забора образца до постановки ПЦР-анализа.

Транспортировка образцов осуществляется в сумках-холодильниках, термоконтейнерах, термосах с термопакетами, льдом или сухим льдом.

Неправильный забор образцов, некачественное хранение и доставка может привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам, несмотря на безусловно проведенную процедуру анализа.

Следует подготовить отдельные наборы полуавтоматических пипеток и одноразовых наконечников (12 штук на одно исследование одной биологической пробы), предназначенные для различных стадий анализа и не переносимые из одного помещения в другое.

Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы необходимо хранить и использовать в небольших порциях.

Все этапы работы необходимо проводить только с использованием одноразовых расходуемых материалов: наконечников для микропипеток, пробирок, перчаток и т.д. Обязательно менять наконечники при переходе от пробы к пробе, которые должны быть 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 (1 н соляная кислота, 10% гипохлорит натрия или 10% хлорная известь).

Биологические пробы следует хранить отдельно от реагентов.

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

5.8. Валидация методик, основанных на ПЦР

Система обеспечения качества лаборатории должна базироваться на стандартах ISO 9000 и отвечать требованиям технической компетентности лабораторий (ISO 17025). Требованием данного стандарта является при введении новых аналитических технологий и разработок в клинико-лабораторную практику их обязательное валидирование [13].

Валидация аналитического метода – процесс демонстрации соответствия методики предполагаемому применению путем лабораторных исследований специфических характеристик. Валидация аналитического метода проводится при внедрении новой методики или изменении условий проведения анализа.

Цель валидации методики – показать пригодность ее применения в конкретной лаборатории.

Валидация методики ПЦР должна проходить специфично (с использованием оборудования, помещения и персонала данной лаборатории), на со-

ответствующем и правильно работающем оборудовании. Также, оператор, который проводит валидацию, должен быть компетентен для проведения исследования методики.

При валидации аналитических методик методологическая часть начинается с определения следующих основных параметров [14, 15, 16, 17, 18]:

1. Определение аналитической специфичности метода;
2. Определение аналитической чувствительности метода;
3. Исследование линейности;
4. Установление правильности метода;
5. Изучение прецизионности.

Критерии приемлемости валидации для метода ПЦР по каждому параметру указаны в таблице 1 [19].

Аналитическая специфичность метода ПЦР – его способность выявлять именно тот компонент, для определения которого данный способ исследования предназначается, т.е. свойство метода качественно и количественно обнаруживать один и тот же субстрат, поэтому при оценке специфичности указываются характер и степень влияния других факторов на результаты исследования.

Специфичность оценивают по наличию специфической реакции с основным ДНК-стандартом и отсутствием перекрестной реакции при использовании стандартов ДНК других возбудителей, принадлежащих к общему роду, семейству. При проведении эксперимента перекрестных реакций не должно быть обнаружено, при этом специфичность составит 100%.

Специфичность метода ПЦР заключается в возможности с его помощью установить наличие определенных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) избранного объекта (микроорганизмы, генетически модифицированные соединения) в исследуемом субстрате.

Аналитическая чувствительность метода ПЦР характеризуется возможностью выявлять определенный фрагмент ДНК избранного объекта при минимальных количествах последнего. При исследовании концентрации ДНК чувствительность ПЦР метода определяют по наименьшему различию между двумя концентрациями ДНК исследуемого объекта, которые могут быть установлены данным методом. При использовании метода ПЦР чувствительность анализа характеризуется наименьшей концентрацией клеток или вирусных частиц в пробе, дающей положительный результат анализа, и определяется эффективностью методики выделения ДНК возбудителя, чувствительностью собственно ПЦР и чувствительностью выбранного метода индикации.

Линейность – способность показать, что результаты теста сразу или после определенной математической обработки пропорциональны концен-

трации ДНК в образце в пределах данного интервала, установленного для данного метода.

Для оценки линейности ПЦР анализируют калибровочные образцы с известными концентрациями ДНК (не менее пяти концентраций) от трех до шести повторений. Производится расчет линии регрессии (R) методом наименьших квадратов для результатов с различными концентрациями ДНК (амплификаторы для ПЦР в реальном времени расчет регрессии проводят автоматически). Наклон регрессионной линии и его вариация дает математическую степень линейности. Коэффициент корреляции линейной регрессии должен быть близок к 1 (более 0,99 обычно считается приемлемым для установления линейности метода).

Правильность – близость получаемых результатов к истинному значению, оценивается по погрешности определения. Правильность качественной и количественной ПЦР оценивается при расчете коэффициента вариации (формула 6) при сравнении результатов ПЦР с референтным методом.

Прецизионность методики определяется двумя параметрами – сходимостью и воспроизводимостью [20]. Для оценки сходимости и воспроизводимости рассчитывают среднее квадратичное отклонение (S) (формула 1) и коэффициент вариации (V) (формула 3).

Таблица 5.1 – критерии приемлемости валидации

Показатели валидации	Критерии приемлемости
Аналитическая специфичность, %	100,0
Аналитическая чувствительность (минимальный предел определения), копий/мл	не более 10^3
Линейность, R	$>0,99$
Правильность, CV %	не более 20,0
Сходимость, Δ СТ	не более 0,5
Воспроизводимость, Δ СТ	не более 0,5

При получении результатов испытаний неудовлетворяющих критериям приемлемости необходимо проведение повторных исследований для исключения возможного нарушения процедуры испытаний. В случае повторно неудовлетворительного результата необходимо исследовать причину и выяснить факторы, повлиявшие на результат испытаний.

Отчет о валидации методики должен содержать информацию по следующим позициям:

- цель и контекст метода (область применения, процедура);
- тип анализируемых веществ и матрицы;
- детальную информацию о реактивах, эталонах и приготовлении контрольных (стандартных) образцов;

- процедуры для проверок качества стандартов и используемых реактивов;
- соображения безопасности;
- параметры метода;
- перечень оборудования и его функциональных и эксплуатационных характеристик;
- детальные условия проведения экспериментов, включая подготовку пробы;
- процедуры вычислений и статистической обработки результатов;
- процедуры для контроля качества в процессе эксплуатации методики;
- графическую информацию, например калибровочные кривые;
- критерии для ревалидации;
- квалификацию специалистов, которые валидировали метод;
- резюме и заключения.

Список литературных источников:

1. Dequeker, E. Genetic testing and quality control in diagnostic laboratories / E. Dequeker, JJ Cassiman // *Nat Genet.* – 2000. - Vol. 25. – P. 259-260.
2. Quality control in molecular genetic testing / E. Dequeker [et al.] // *Nat Rev Genet.* – 2001. - Vol. 2. P. 717-723.
3. External Quality Assessment Program for Qualitative and Quantitative Detection of Hepatitis C Virus RNA in Diagnostic / Jurjen Schirm [et al.] // *Virology Journal of Clinical Microbiology.* – 2002. Vol. 40. - P. 2973-2980.
4. Меньшиков, В.В. О клинической ценности лабораторных исследований / В.В. Меньшиков // *Клиническая лабораторная диагностика.* - 1996. - № 5. - С. 4-12.
5. Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики // *Методическое пособие ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии»* – Москва, 2009. – 28 с.
6. Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 154 от 24.06.1997 г. О дальнейшем совершенствовании системы контроля качества клинических лабораторных исследований.
7. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. Т 1. / В.С. Камышников. – Мн.: Беларусь, 2000. – 495 с.
8. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М., 1987.
9. Меньшиков, В.В. Биологическая вариация как объективная мера аналитической точности и клинической информативности лабораторных исследований (лекция) / В.В. Меньшиков, Т.И. Лукичева, Л.И. Пименова // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2004. – № 5. – С. 21–32.
10. Балаховский, И.С. Статистический контроль качества клинических лабораторных анализов (лекция) / И.С. Балаховский // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2009. – № 10. – С. 30–37.
11. Балаховский, И.С. Статистический контроль качества клинических лабораторных анализов (лекция) / И.С. Балаховский // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2009. – № 11. – С. 33–42.
12. Методические указания 1.3.1888-04 «Эпидемиология. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04 марта 2004 г.
13. Общие требования к компетентности испытательных лабораторий: СТБ ИСО/МЭК 17025-2007. – Введ. 23.02.07. – Минск: Межгос. Совет

по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. Ин-т стандартизации и сертификации, 2007. – 28 с.

14. Validation of Analytical Procedures // The Japanese Pharmacopoeia. – 2001. – Vol. 40. – Pt. 1.

15. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория и практика. Часть 1. / Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Н. Корнеева // Ремедиум. – 2003. – №10. – С. 69–71.

16. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория и практика. Часть 2. / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева // Ремедиум. – 2003. – №12. – С. 65–67.

17. Шалепо, К.В. Валидация методов лабораторной диагностики инфекций, вызываемых Chlamydia Trachomatis : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Шалепо Кира Валентиновна. – СПб., 2003. – 30 с.

18. Давлетбаева, Л.Р. Сравнительный анализ международных требований к параметрам валидации аналитических методик /Л.Р. Давлетбаева, С.И. Положенцев, А.Г. Исрафилов // Новые лабораторные технологии в диагностике и лечении заболеваний человека :Сб.тр.конф. – Челябин., 2006г.

19. Костюк, С.А. Клиническая лабораторная диагностика ассоциированных инфекций, передаваемых половым путем: автореф. дис...д-ра. мед. наук: 14.00.46 / С.А. Костюк; Бел. мед. акад. последипл. образ. – Минск, 2010. – 44 с.

20. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения: СТБ ИСО 5725-2-2002. – Введ. 21.02.02. – Минск: Межгос. Совет по стандартизации, метрологии и сертификации: Белорус. гос. Ин - т стандартизации и сертификации, 2002.– 29 с.

ГЛАВА 6 АЛГОРИТМЫ ПЦР И ЕЕ МОДИФИКАЦИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Полимеразная цепная реакция. ПЦР является ферментной реакцией, позволяющей в относительно короткое время (часы) синтезировать миллионы копий выбранных участков ДНК. ПЦР составляют три повторяющихся последовательных этапа, проводимых в одной пробирке.

Основные стадии ПЦР-анализа:

1. Денатурация – расхождение цепей двойной спирали ДНК, которое достигается при нагревании до 91–95 °С.
2. Отжиг – при снижении температуры до 50-70°С находящиеся в реакционной смеси праймеры связываются с комплементарным участком одноцепочных ДНК. (Праймеры, короткие олигонуклеотидные затравки длиной 18-30 нуклеотидов, определяют специфичность ПЦР.)
3. Элонгация – при температуре 72°С фермент Таq-полимераза начинает удлинять праймер, присоединяя к нему нуклеотиды в последовательности, задаваемой ДНК-матрицей. После первого цикла, как исходная ДНК, так и ДНК, образованная в ходе ферментативной реакции, служат матрицами на втором и последующих циклах.

Последовательное изменение температурных режимов в специальных термоциклерах (амплификаторах) при достаточном количестве праймеров и нуклеотидов обеспечивают увеличение концентрации исследуемых участков ДНК в несколько миллионов раз за 30–35 циклов.

Анализ изменений в нуклеотидной последовательности ДНК

Изменения в последовательности ДНК могут являться следствием полиморфизма или мутаций. Данные особенности генома могут служить ДНК-маркерами того или иного патологического состояния и могут быть проанализированы с использованием нескольких молекулярно-генетических методов:

1. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов – RFLP;
2. Аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR), аллель специфичная олигонуклеотидная гибридизация – ASO-H;
3. Анализ вариаций в количестве tandemных повторов в ДНК – VNTR (микросателлитный анализ).

В основе методов групп 2 и 3 лежит ПЦР.

Техника **RFLP** включает экстракцию ДНК, расщепление соответствующими рестриктазами, электрофорез, приготовление, экстракцию, изоляцию, очистку и мечение радиоактивной меткой ДНК пробы, Саузерн-блоттинг, гибридизацию и наконец, ауторадиографию для визуализации ДНК

полос. Саузерн-блоттинг используется для определения размера ДНК фрагментов после их расщепления рестриктазами и гель-электрофореза. ДНК фрагменты переносятся на нейлоновую мембрану для реакции с меченой пробой, что позволяет визуализировать полосы ДНК и определить молекулярный вес фрагментов.

RFLP сегодня вытеснена методиками, в основе которых лежит ПЦР, поскольку RFLP требует длительного времени на проведение и использования радиоактивных меток для визуализации полос ДНК.

Аллель-специфичная ПЦР (AS-PCR) основана на том, что только олигонуклеотиды, последовательность которых абсолютно соответствует исследуемой последовательности, способны связываться с матрицей. Данная методика адаптирована для выявления точечных мутаций в онкогенах (например, точечных мутаций *ras* онкогена). В данной технологии праймеры конструируются таким образом, что они комплементарны или дикому или мутантному типу гена, в реакции участвует также общий праймер. Поскольку у ДНК полимеразы отсутствует 3'-экзонуклеазная активность, она неспособна исправить однонуклеотидное несоответствие между праймером и матрицей на 3'-конце ДНК праймеров. Таким образом, если олигонуклеотидные праймеры сконструированы так, что содержат несоответствия с одной из матриц (дикой или мутантной) вблизи или на 3'-конце, то не будет происходить элонгации. Поэтому амплифицироваться будет только та матрица, которой соответствует последовательность праймера.

Долгосрочная (long-range) ПЦР была разработана в связи с тем, что размер фрагмента ДНК, амплифицируемого термостабильной полимеразой ограничен, а именно, для геномной ДНК максимальная длина амплифицированного фрагмента 3-4 kb. В основе данного ограничения лежит частота ошибок Taq-ДНК-полимеразы, которая составляет 2×10^{-4} - 2×10^{-5} мутаций на нуклеотид в одном цикле. Включение ошибочного нуклеотида приводит к задержке элонгации, что приводит к тому, что Taq-ДНК-полимераза покидает цепь. Чем длиннее фрагмент, тем больше вероятность включения ошибочного нуклеотида. Было показано, что включение в реакцию фермента, который способен исправлять ошибки Taq-ДНК-полимеразы, способствует тому, что нуклеотидные несоответствия устраняются и Taq-ДНК-полимераза способна дольше удерживаться на матрице, следовательно, можно получить продукт амплификации большей длины. Использование комбинации ферментов позволяет добиться амплификации матрицы геномной ДНК до 22 kb.

Метод нашел применение в мониторинге структурных изменений в митохондриальной ДНК (мхДНК), быстрой амплификации и картировании областей хромосомных транслокаций, амплификации протяженных зон три-нуклеотидных повторов.

При проведении долгосрочной ПЦР с обратной транскрипцией (long-range ОТ-ПЦР) используют исправляющий фермент на этапе элонгации ДНК. Метод применяется в выявлении делеций в экзонах, используется для предварительного обогащения ДНК матриц перед другими тестами выявления мутаций.

Анализ вариации в нуклеотидной последовательности **методом твердофазного минисеквенирования (ТМС)** разработан для анализа ДНК фрагментов, которые отличаются друг от друга нуклеотидами в одной или нескольких позициях. В данном методе не используется гель-электрофорез. ТМС включает этап амплификации с использованием одного биотинилированного и одного небитинилированного праймера. Продукты амплификации наносятся на подложку, на которой иммобилизованы авидин или стрептовидин ловушки.

Цепи ДНК, которые несут биотиновую метку праймера, взаимодействуют с ловушками и оказываются связанными с подложкой. Нуклеотид в переменном сайте детектируется на иммобилизованном ДНК фрагменте в реакции элонгации праймера: праймер этапа детекции взаимодействует с матрицей ДНК прямо около переменного сайта, который анализируется, ДНК-полимераза включает меченый нуклеотид. Если имеет место различие в нуклеотиде в исследуемой позиции полинуклеотидной цепи образцов, то количество включенных разных меченых нуклеотидов будет отличаться. Количество включенной метки учитывается и служит специфическим индикатором присутствия того или иного нуклеотида в переменном сайте (рисунок 6.1).

ТМС используют для оценки множественных мутаций, которые могут быть причиной генетической патологии, для анализа аллельных вариаций при исследовании генетического сцепления, для идентификации личности. Метод хорошо подходит для анализа большого количества образцов, поскольку он предполагает простые манипуляции и результат получается как объективная числовая величина, которую легко интерпретировать. Более того, ТМС позволяет проводить количественную детекцию последовательности с тем или иным вариантом нуклеотида в переменной позиции, которая присутствует в количестве менее чем 1% в образце.

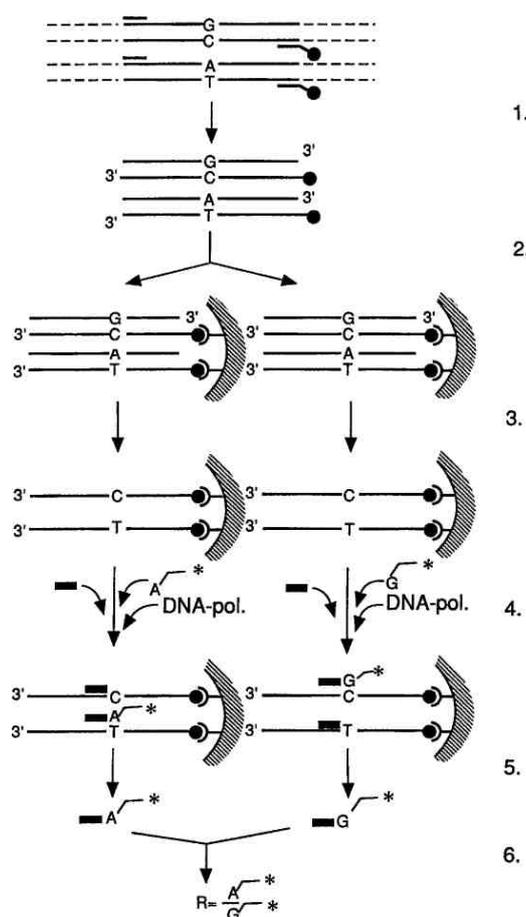


Рисунок 6.1 – Принцип метода твердофазного минисеквенирования.

Метод ТМС применяют для количественного анализа точечных мутаций в опухолевых клетках, присутствующих в минорных количествах в клеточной популяции и для анализа гетероплазматических мутаций митохондриальной ДНК. Несмотря на высокую чувствительность метода, основное его ограничение – способность детектировать только переменные нуклеотиды в позициях, прилегающих к праймерам детекции. Для исследования мутаций широко используется метод секвенирования, который универсален.

Тест усечения длины белка (protein truncation test – РТТ) представляет собой метод синтеза белка *in vitro*. Используется для скрининга мутаций в кодирующем регионе гена, которые вызывают терминирование мРНК трансляции. На начальном этапе выделяют ДНК или РНК. Затем используются ПЦР для амплификации ДНК матрицы, обычно размером 1-3 kb, которая затем анализируется в тесте *in vitro* транскрипции и трансляции. Усеченные протеины идентифицируются натрий-додecil-сульфат-полиакриламидным гелем электрофорезом (SDS-PAGE) и ауторадиографией или флюорографией.

Единичный обширный экзон гена может быть амплифицирован прямо с геномной ДНК, причем амплификация гена происходит, начиная с разных фрагментов гена, которые перекрываются между собой. Полная кодирующая последовательность большого гена, включающая множество малых экзонов, может быть амплифицирована, начиная с нескольких перекрывающихся фрагментов, методом ОТ-ПЦР, с РНК матрицы.

Амплификация гена, начиная с нескольких фрагментов, которые перекрываются на 300-500 п.о., увеличивает чувствительность метода. В таком случае получается, что мутация, расположенная вблизи 3' конца одного фрагмента, оказывается расположенной вблизи 5' конца другого перекрывающегося фрагмента, что увеличивает вероятность идентификации усеченного протеина.

Для проведения РТТ требуется специально модифицированный forward-праймер. В дополнение к основной ген-специфичной последовательности праймеры содержат на 5' конце T7 промотор для РНК транскрипции T7-РНК-полимеразой, а также эукариотическую консенсусную последовательность для инициации трансляции белка, и АТG фрагмент для начала трансляции белка. Выход и специфичность ПЦР амплификации оценивается электрофорезом в агарозном геле.

Аликвоты ПЦР продукта используются в качестве матриц для *in vitro* транскрипции и трансляции, с использованием РНК-полимеразы. В транслируемый протеин включаются меченые аминокислоты (радиоактивная или флуоресцентная метки), что позволяет детектировать результаты исследования автоматически.

Детекция белка, размер которого короче, чем полноразмерный протеин, свидетельствует о присутствии терминирующей трансляцию мутации. Размер укороченного белка говорит о позиции терминирующего стоп-кодона. Подтверждается наличие мутации в ДНК методом секвенирования.

Идентифицированные мутации – это преимущественно мутации сдвига рамки считывания и нонсенс-мутации, но также могут детектироваться мутации, которые нарушают нормальный сплайсинг экзонов.

Существует 2 основных преимущества РТТ в сравнении с другими методами выявления мутаций:

1. Фрагменты гена в несколько килобаз могут быть быстро исследованы в одной реакции;
2. РТТ определяет только те мутации, которые оказывают ясный патологический эффект на функцию протеина (те, что приводят к укорочению длины белка и в большинстве случаев к потере функции белком). Миссенс мутации и нейтральные полиморфизмы не выявляются.

Если целью исследования является определение миссенс мутаций, то применяется SSCP (метод конформационного полиморфизма одонитевых молекул ДНК).

Метод РТТ применяется для анализа терминирующих трансляцию мутаций генов BRCA1, BRCA2 при синдроме рака груди и яичников. BRCA1 и BRCA2 – подобны по структуре, оба являются протяженными генами с множеством экзонов, в обоих случаях множество мутаций могут приводить к терминации трансляции. Примерно 86% мутаций, выявленных в BRCA1 гене приводят к укорочению белка и порядка 50% из них расположены в экзоне 11. BRCA2 несет 26 кодирующих экзонов. Практически все мутации в BRCA2 приводят к укорочению белка-продукта данного гена.

Таким образом, РТТ может рассматриваться как простой, быстрый и экономичный метод скрининга протяженных генов с большим количеством мутаций, результатом которых является преждевременная остановка трансляции.

Гель-электрофорез, чувствительный к конформации фрагментов (Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis – CSGE). Впервые метод описан Ganguly et al. в 1993 г. Данная технология стала результатом поиска быстрого, нерадиоактивного метода гетеродуплексного анализа для скрининга мутаций. Метод основан на разнице в миграционной способности ДНК-гетеродуплексов по сравнению с ДНК-гомодуплексами в ходе электрофореза в полиакриламидном геле при умеренных денатурирующих условиях. Окраска бромистым этидием и визуализация в ультрафиолете позволяет выявить образцы с измененной структурой. Данные образцы подвергаются ДНК секвенированию для определения природы нуклеотидных изменений.

ДНК-гомодуплекс отличается от ДНК-гетеродуплекса полнотой формирования пар А-Т и G-C согласно модели Уотсона-Крика. ДНК-гомодуплекс представляет собой молекулу ДНК, полностью сформированную согласно принципу комплементарности. Напротив, ДНК-гетеродуплекс сформирован при неполном соответствии модели Уотсона-Крика. Образование пар нуклеотидов не в соответствии с принципом комплементарности может быть вызвано нуклеотидной заменой и приводит к формированию ДНК-гетеродуплекса, что детектируется CSGE.

Обязательным условием проведения CSGE является использование умеренно денатурирующих растворителей в ходе электрофореза в полиакриламидном геле для усиления конформационных изменений, которые вызваны однонуклеотидными изменениями матрицы. При неденатурирующих условиях незначительные конформационные различия, которые обусловлены однонуклеотидными несоответствиями ДНК-фрагментов, будут практически незаметны, и электрофоретическая подвижность ДНК-фрагментов с данными

изменениями будет соответствовать электрофоретической подвижности ДНК дикого типа.

При умеренно денатурирующих условиях одно из несоответствующих оснований выворачивается во вне из двухцепочечной структуры ДНК и формирует структуру наподобие петли. Миграционная способность такой молекулы ДНК отличается от миграционной способности ДНК дикого типа при электрофорезе в полиакриламидном геле при умеренно денатурирующих условиях.

Если денатурирующая способность компонентов геля превышает оптимум для CSGE, то оба нуклеотида, формирующие пару вне соответствия с принципом комплементарности, выворачиваются во вне из ДНК-спирали, и при этом петля не формируется. В результате гомодуплексная ДНК и гетеродуплексная будут иметь одинаковую электрофоретическую подвижность. Было показано, что фрагменты с инсерциями/делециями, а также с множественными сайтами нуклеотидного несоответствия движутся в геле медленнее, чем дикого типа при умеренно денатурирующих условиях.

Метод используется для анализа изменений в последовательности ДНК многих генов, включая изучение приобретенных мутаций в генах *c-kit* и *BRCA1*, *BRCA2*.

Если исследуется дикая и мутантная ДНК, то проводится амплификация обеих матриц с использованием праймеров, которые полностью ограничивают исследуемый фрагмент. После проведения амплификации следует этап формирования гомо- и гетеродуплексов. ДНК-гетеродуплексы формируются при взаимодействии цепей дикой и мутантной ДНК, которые содержат несопряженные нуклеотиды. Метод формирования гетеродуплексов представляет собой простой процесс, включающий 2 стадии: фазу денатурации, на которой формируются одноцепочечные фрагменты ДНК. Во вторую фазу происходит аннигиляция, когда ДНК вновь возвращается к двухцепочечному состоянию, когда каждая из смысловых последовательностей формирует пары с различными антисмысловыми последовательностями. В результате формируются как гомодуплексы – полное следование принципу комплементарности (A-T, G-C), и гетеродуплексы, когда нуклеотиды образуют пару не в соответствии с принципом комплементарности (рисунок 6.2). До формирования гетеродуплексов как в дикой ДНК, так и в мутантной нуклеотиды формируют пары в соответствии с моделью Уотсона-Крика. В сайте мутации дикой ДНК содержится пара нуклеотидов G-C, в мутантной - A-T. В ходе реакции формирования гетеродуплексов формируется как гомо-, так и гетеродуплексная ДНК. В гомодуплексах восстанавливаются структуры дикой (G-C) и мутантной ДНК (A-T).

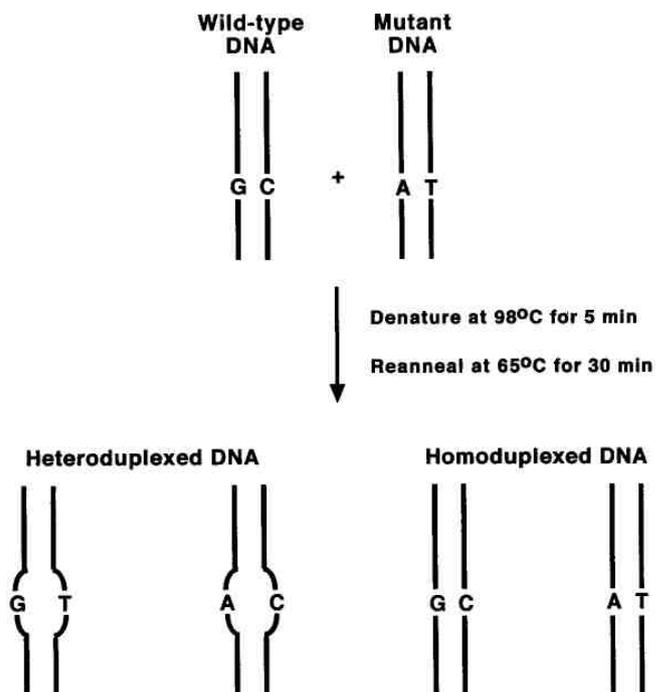


Рисунок 6.2 - Формирование гетеродуплекса при смешивании дикой и мутантной ДНК

Гетеродуплексная ДНК формируется при объединении цепей дикой и мутантной ДНК, которые отличаются одним или несколькими нуклеотидами. В данном примере формируется 2 типа гетеродуплексов, в которых нуклеотиды сайта мутации формируют пары не в соответствии с моделью Уотсона-Крика, а именно G-T и A-C. Поскольку подвижность гетеродуплексов может быть изменена относительно подвижности гомодуплексов при умеренно денатурирующих условиях, то гетеродуплексы могут быть выявлены методом CSGE.

SSCP (метод конформационного полиморфизма однонитевых молекул ДНК). Техника SSCP была впервые описана в 1989 г. Она включает высокотемпературную денатурацию амплифицированных ДНК фрагментов с последующим электрофорезом при неденатурирующих условиях. Фрагменты могут быть визуализированы мечением радиоактивной меткой, серебром, флуоресцентными красителями, бромистым этидием (рисунок 6.3).

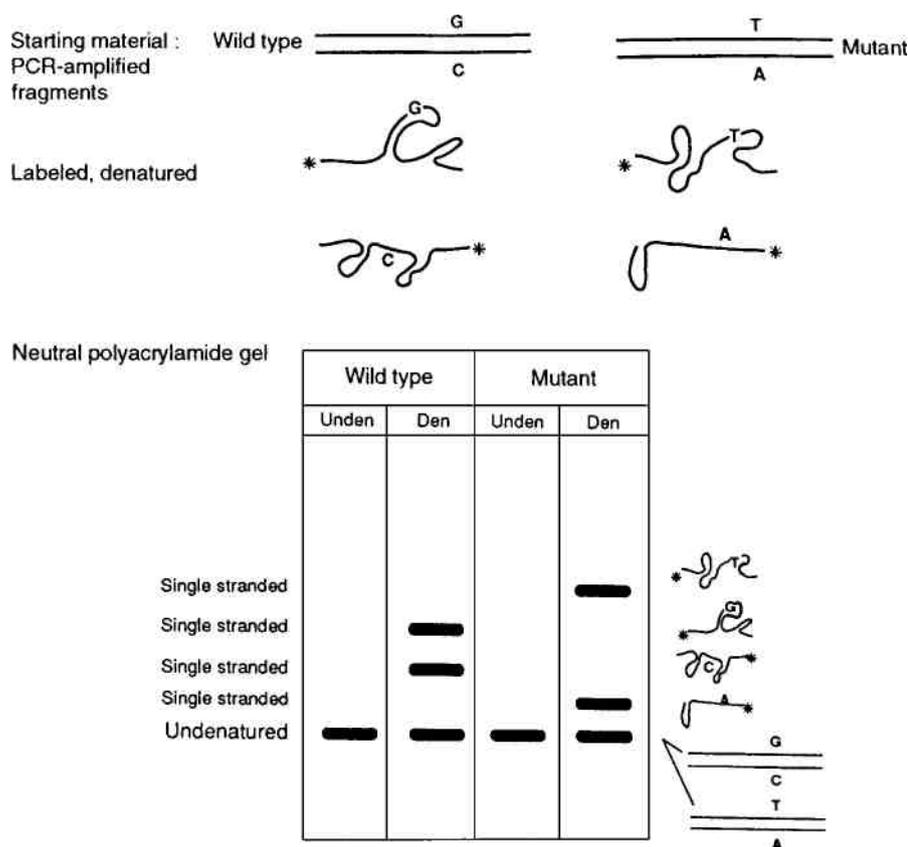


Рисунок 6.3 – Принцип метода SSCP [7].

SSCP основан на склонности одноцепочечной ДНК (ssДНК) при неденатурирующих условиях формировать особую вторичную и третичную структуры, которые зависят от нуклеотидного состава ДНК. Поскольку электрофоретическая подвижность ДНК при неденатурирующих условиях зависит от формы молекулы, такие факторы как мутации, могут изменять подвижность ДНК. Эффективность детекции ДНК варьирует, наиболее важный параметр – размер фрагмента. Оптимальна чувствительность методики для фрагментов порядка 150 п.н.

ПЦР-SSCP – быстрый, простой и недорогой метод мониторинга наличия мутаций. Он удобен для начального скрининга амплифицированных фрагментов ДНК на точечные мутации, малые делеции. SSCP может выступать ориентировочным методом для поиска генов-кандидатов опухолевой чувствительности, может применяться, когда абсолютный анализ на мутации не требуется. Для более точного исследования генетических маркеров канцерогенного риска метод может использоваться в комбинации с другими методами.

Фрагментный анализ (Cleavase Fragment Length Polymorphism – CFLP). ДНК секвенирование считается золотым стандартом ДНК-диагностики и единственным методом, который позволяет непосредственно идентифицировать мутации. Однако он является дорогостоящим и зачастую

его невыгодно использовать в клинике, особенно когда большие ДНК фрагменты необходимо исследовать на наличие уже известных или еще неисследованных мутаций. Также разработано много методов для детекции нескольких определенных клинически значимых мутаций, когда не требуется секвенировать каждый нуклеотид. Первоначально данные методы давали ответ только «да» или «нет» в отношении отличий тестируемой последовательности от референсной. Только несколько методов были способны точно идентифицировать определенные изменения в нуклеотидной цепи, особенно множественного характера.

В третьем поколении методов детекции мутаций и скрининга полиморфизмов был предложен подход, позволяющий точно определять варианты первичной структуры нуклеиновых кислот. Данный метод основан на расщеплении односторонней структуры ДНК специальным ферментом. При денатурации и ренатурации одноцепочечная ДНК и РНК приобретают трехмерную конформацию, которая является точным выражением нуклеотидного состава. Данный принцип является основой SSCP анализа и дидезокси дактолоскопического (*dideoxy fingerprinting*) анализа.

В свою очередь метод фрагментного анализа (CFLP) является одной из технологий третьего поколения, который использует эндонуклеазу, являющуюся структурно специфичной, и представляющую собой нуклеазный домен Taq-ДНК-полимеразы, названную *Cleavase I*. Данный фермент сконструирован таким образом, чтобы разрезать фрагмент ДНК в месте, где присутствует специфичная трехмерная структура (рисунок 6.4, 6.5).

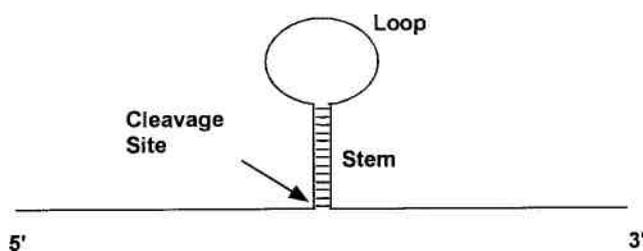


Рисунок 6.4 - Структуры, распознаваемые *Cleavase I* ферментом.

Фермент быстро и специфично разрезает данные структуры, многие из которых образуются на ДНК-фрагменте, иногда временно, в равновесии с альтернативными, характерными для ДНК структурами. Таким образом, каждая специфическая последовательность ДНК приводит к формированию коллекции структур, которые являются опознавательным знаком наличия тех или иных мутаций, и могут быть детектированы. Более того, метод позволяет анализировать протяженные фрагменты ДНК, превосходящие длину в 2,7 kb, что невозможно сделать другими методами.

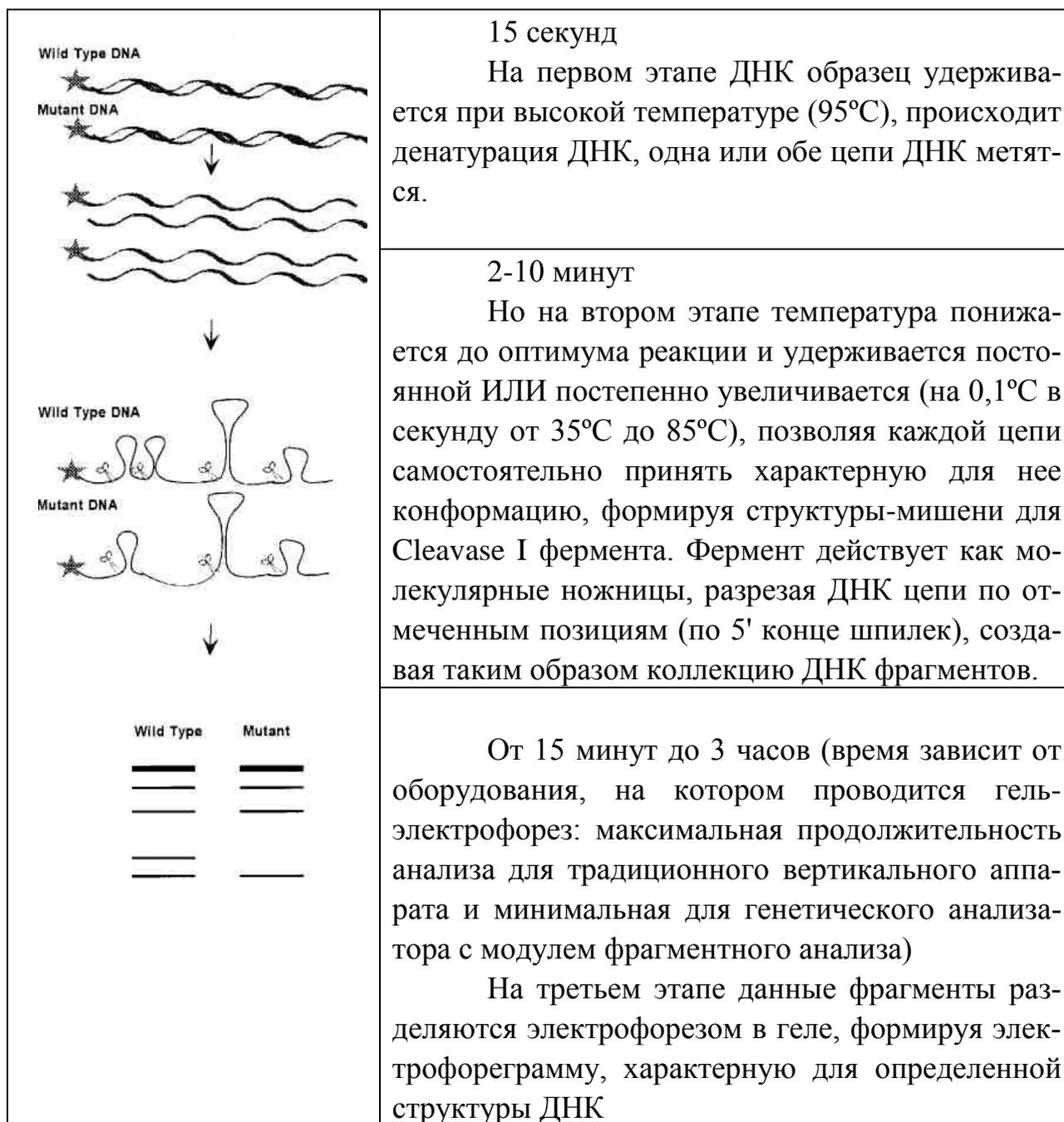


Рисунок 6.5 – Принцип фрагментного анализа (CFLP).

CFLP метод достаточно чувствительный к присутствию малых изменений структуры и может детектировать изменения, вызванные одной или несколькими нуклеотидными заменами, включая миссенс мутации, с чувствительностью >95% и специфичностью 100% .

Микроанализ (ДНК-чипы) – компактная система, которая содержит большое количество иммобилизованных молекул-ловушек (например, синтетические олигонуклеотиды, ПЦР-продукты, протеины, антитела) для связывания строго определенных частиц-молекул (формат адресации). Метод поз-

воляет взять образец неизвестного состава, поместить на платформу для микроанализа и определить, где какая молекула была захвачена. Затем можно получить информацию о характере и количестве захваченных молекул.

Применение микроанализа:

- ✓ одновременное определение экспрессии многих генов;
- ✓ выявление одноцепочечных полиморфизмов (SNP);
- ✓ последовательные гибридизации/генотипирование /выявление мутаций;
- ✓ изучение экспрессии белков;
- ✓ белок-белковые взаимодействия

Метод обеспечивает одновременное получение большого количества информации.

Преимущества микроанализа:

- необходим малый объем пробы для детекции (nL);
- минимум реагентов;
- оценка множества биомолекул одновременно;
- может быть автоматизирован;
- количественный учет.

Анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). SNP – биаллельные однонуклеотидные вариации, которые могут иметь место в геноме с частотой порядка 1 SNP/1000 п.н. Анализ SNP проводится для изучения предрасположенностей к заболеваниям, выявления особенностей течения патологий.

Анализ SNP проводится и в формате микроанализа с использованием ДНК чипов. В основе микроанализа лежит принцип гибридизации. Следует помнить, что гибридизация не несет 100%-ой специфичности.

Автоматическое генотипирование с использованием технологии ДНК масс-спектрометрии (MassArray™). Обширные проекты, подобные проекту «Геном Человека», продемонстрировали еще одно направление генетического анализа – крупномасштабная идентификация и детекция изменений в геноме популяций и индивидов. Подобная информация способна внести ясность в этиологию ряда заболеваний. Данные исследования проводились и проводятся с использованием ряда методов, включая метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), микросателлитный анализ (STR – short tandem repeats), анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Общий принцип масс-спектрометрии (МС) – создание, разделение и детекция ионов, находящихся в газовой фазе. Традиционно методы испарения используются для перевода молекул в газовую фазу. Многие биомолекулы, подвергаясь условиям, необходимым для перехода в газовую фазу, теря-

ют свою структуру. Поэтому биомолекулы помещаются в кристаллические структуры, именуемые матриксом. Данные системы облучаются наносекундным лучом лазера. Энергия лазера приводит к декомпозиции облученного кристалла, образуется облако частиц, из которого ионы экстрагируются электрическим полем. После ускорения ионы движутся в зоне отсутствия поля и достигают детектора. Массы ионов рассчитываются на основании время полета (time-of-flight-TOF), которое длиннее для больших молекул, чем для маленьких (при условии равенства их начальных энергий) (рисунок 6.6).

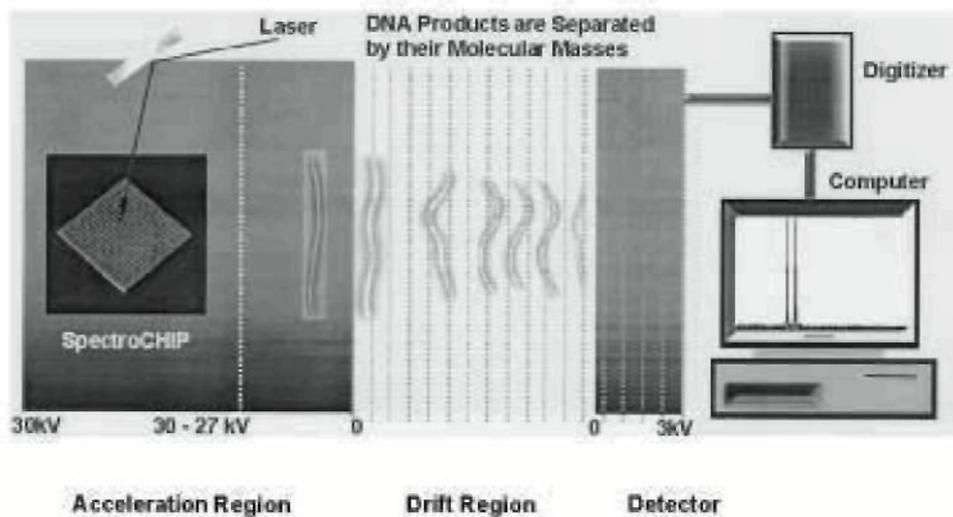


Рисунок 6.6 – Схема системы для ДНК MassArray метода

Характер спектра зависит от подготовки образца и состава матрикса. Поэтому первые приборы позволяли анализировать только пептиды и протеины. Создание новых матриксов для нуклеиновых кислот позволило детектировать продукты ПЦР.

Реакция олигонуклеотидного удлинения праймеров (primer oligo base extension reaction – PROBE) разработана специально для оценки генетических полиморфизмов методом МС. PROBE-формат может быть использован для анализа делеций, инсерций, точечных мутаций, STR, SNP, для анализа гетерозигот. PROBE-анализ проводится после ПЦР и включает процесс удлинения праймеров при фиксированной на твердой фазе матрице в присутствии одного или более дидезоксинуклеотидов (ddNTPs), при этом образуются аллель специфичные фрагменты (рисунок 6.7).

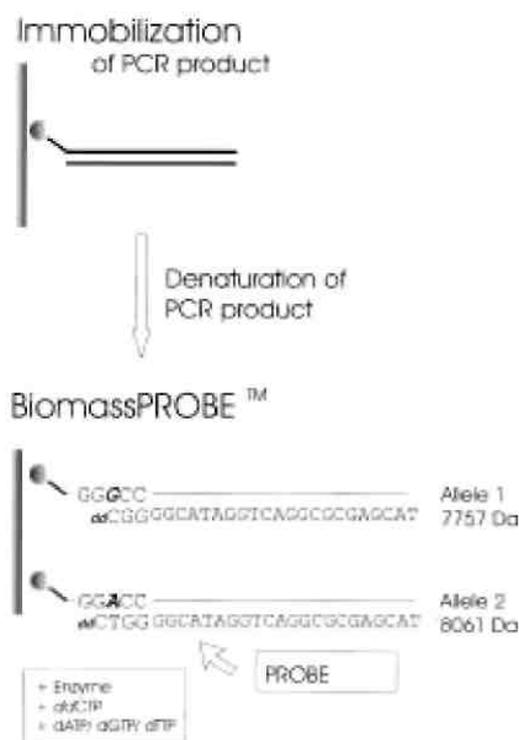


Рисунок 6.7 - Схема PROBE-реакции (продукты элонгации различаются по массе на один нуклеотид)

В случае SNP анализа праймеры для PROBE-анализа располагаются на матрице в сайте непосредственно возле полиморфной позиции. В зависимости от нуклеотидного статуса SNP получается более короткий или более длинный фрагмент. В случае анализа гетерозиготности, образуются 2 продукта. После окончания реакции оба продукта денатурируют от твердой фазы и анализируются методом МС.

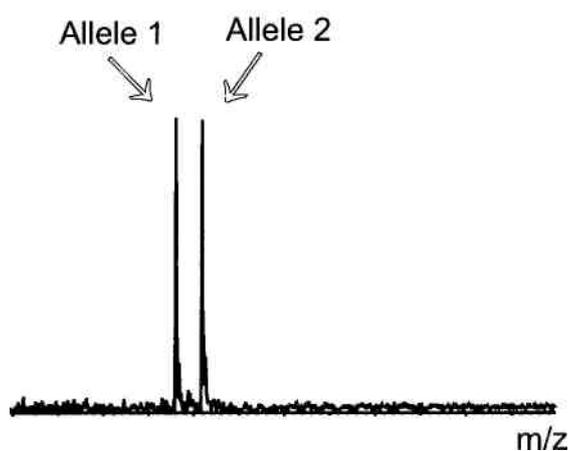


Рисунок 6.8 - Результат SNP анализа (гетерозиготный образец) с использованием PROBE-реакции (два SNP аллеля дают два четко различимых масс-сигнала)

В случае STR анализа ddNTP выбираются таким образом, чтобы терминировать ПЦР на первом нуклеотиде, не присутствующем в повторе. Для определения длины СА повтора, используется смесь ddG или ddT. Даже неполные повторы, включающие инсерции или делеции, могут быть анализированы данным методом.

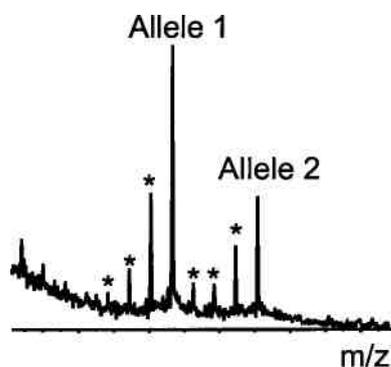


Рисунок 6.9 - Данные микросателлитного анализа (гетерозиготный образец) с использованием PROBE-реакции

На рисунке 1.9 представлен анализ STR гетерозиготного образца человеческой ДНК. Оба аллеля отличаются четырьмя СА повторами. В ходе ПЦР образуется набор фрагментов (отмечены на рисунке звездочкой). В случае гетерозигот, которые отличаются только одним повтором, более короткий аллель дает более интенсивный сигнал, чем более длинный аллель, так как аллельный и фрагментный сигналы сливаются.

Анализ позволяет добиться высокой точности и эффективности, может комбинироваться с технологией микрочипов для анализа большого количества образцов.

Микросателлитный анализ. В настоящее время хорошо известно, что в некодирующих областях генома присутствуют так называемые тандемные повторы. Эти повторы представляют собой последовательности, состоящие из различного количества мономеров. Мономеры в свою очередь могут содержать от одного до нескольких десятков нуклеотидов. Эффективность использования мини- и микросателлитных последовательностей (маркеров) в ДНК-диагностике обусловлена относительно равномерным распределением их на хромосомах и большим разнообразием. Микросателлиты – простые повторяющиеся последовательности длиной 2-6 п.н.

Микросателлиты классифицируются по повторяющимся фрагментам:

- ❖ АААААААААААА – моно - (A)11;
- ❖ GTGTGTGTGTGT – ди - (GT)6;
- ❖ CTGCTGCTGCTG – три - (CTG)4;
- ❖ АСТСАСТСАСТСАСТС – тетра - (АСТС)4.

Высокий уровень полиморфизма, обусловленный разницей в количестве повторов мономера микросателлита, стабильность, которую демонстрируют микросателлиты, сделали их хорошим маркером для создания генетических карт с целью идентифицировать локус, изменения в котором могут быть связаны с формированием заболевания. Для проведения микросателлитного анализа не требуется большое количество биологического материала. В последние годы для обнаружения различных мини- и микросателлитных последовательностей стали использовать различные модификации полимеразной цепной реакции (мультиплексная ПЦР, ПЦР с использованием меченых нуклеотидов). Идентификация результата при анализе гомо- и гетерозигот представлена в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Исследование гомо- и гетерозиготности в микросателлитном анализе.

GCCGCCGCCGCC		GCCGCCGCCGCCGCCGCC
	—	—
—	—	
AA	Aa	aa
Гомозигота	Гетерозигота	Гомозигота

Для проведения микросателлитного анализа для детекции хромосомных делеций (потери гетерозиготности) важно, чтобы была в доступности, как опухолевая ткань, так и здоровая в качестве биологического материала. Например, при проведении исследования лимфопролиферативных заболеваний используются В-лимфоциты периферической крови как опухолевая ткань. В качестве контроля можно использовать популяции гранулоцитов или Т-лимфоцитов. Оцениваются образцы как:

- гетерозигота, отсутствие делеции (два разных аллеля присутствуют как в нормальной, так и в опухолевой тканях);
- гетерозигота, наличие делеции (два аллеля присутствуют в нормальной ткани, но только один присутствует в опухолевой ткани);
- гомозигота, не информативно (два аллеля одного и того же размера присутствуют как в нормальной, так и в опухолевой ткани).

Когда определен интересующий фрагмент генома, должны быть выбраны подходящие микросателлиты для исследования, или из перечня уже установленных микросателлитов в базе данных, или из новых микросателлитов. Следует отметить, что прямое секвенирование ДНК часто выявляет микросателлиты, последовательности которых затем используются для дизайна фланкирующих микросателлиты праймеров.

Оценка статуса метилирования. Эпигенетическая модификация ДНК – наследственная генетическая модификация, которая не затрагивает первичную структуру молекулы. Метилирование ДНК является наиболее распространённой эпигенетической модификацией. Было показано, что с помощью избирательного метилирования специфических участков молекулы ДНК осуществляется регуляция множества клеточных процессов:

- ✓ Эмбриональное развитие;
- ✓ Хромосомная стабильность;
- ✓ Структурная организация хроматина;
- ✓ Транскрипция;
- ✓ Инактивация X-хромосомы.

Аномальное метилирование может являться причиной различных заболеваний, в частности, раковых. Метилирование ДНК оказывает влияние на экспрессию генов:

- CpG островки узнаются специфическими ферментами – метилтрансферазами;
- CpG островки часто располагаются в промоторных областях генов;
- Метилирование промоторной зоны ингибирует экспрессию соответствующего гена.

Методы исследования метилированных состояний, основанные на капиллярном электрофорезе:

- ❖ Бисульфитное секвенирование – информация для каждого CpG островка;
- ❖ Удлинение на одно основание SNaPShot® Multiplex Kit – количественный результат для индивидуального CpG островка;
- ❖ Фрагментный анализ с помощью метил-специфичной ПЦР – суммарная оценка метилированных состояний;
- ❖ Фрагментный анализ, основанный на различии в подвижности метилированной и неметилированной ДНК.

Известно, что первичный дефект при раке возникает в геномной ДНК, и одной из форм изменений ДНК при раке является aberrантное метилирование гена. Анализ статуса метилирования CpG островков промоторных районов в специфических генах может помочь раннему выявлению рака, определению прогноза и предсказанию терапевтического ответа. Эпигенетические модификации затрагивают клетки опухоли и практически не выявляются в нормальных клетках того же органа, а разница в уровне метилирования может достигнуть нескольких десятков раз. Метилирование может быть обнаружено за несколько лет до клинического диагноза и в настоящее время является наиболее перспективным методом ранней диагностики опухолей.

Примеры генов-супрессоров опухолевого роста, инактивирующихся путём гиперметилирования CpG островков промоторных зон представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Гены-супрессоры опухолевого роста, инактивирующиеся путём гиперметилирования CpG островков

Ген	Функция	Тип опухоли
Гены-супрессоры опухолевого роста, которые мутируют при канцерогенезе <i>VHL</i>	Обеспечивает ангиогенез	Паренхиматозные опухоли почки
<i>p16^{INK4a}</i>	Циклин-зависимый ингибитор киназы	В большинстве солидные опухоли, лимфома
<i>E-cadherin</i>	Межклеточная адгезия	Опухоли протоков молочной железы, щитовидной железы, желудка, другие
<i>hMLH1</i>	Репарация ДНК	Опухоли толстого кишечника, желудка, эндометрия
<i>BRCA1</i>	Репарация ДНК	Опухоли молочной железы, яичников
<i>LKB1</i>	Серин, треонин киназа	Опухоли толстого кишечника, папиллярный рак груди
Другие важные гены <i>p15^{INK4A}</i>	Циклин-зависимый ингибитор киназы	Острый миелоидный, лимфоидный лейкоз
<i>ER</i>	Рецептор для индуцируемой эстрогенами транскрипционной активности	Опухоли молочной железы, толстого кишечника, лейкозы, другие
<i>O⁶-MGMT</i>	Восстановление уровня метилирования гуанозина ДНК	Опухоли мозга, толстого кишечника, легких, лимфома
<i>GSTP1</i>	Предотвращение повреждения ДНК активными формами кислорода	Опухоли молочной железы, простаты, почек
<i>TIMP3</i>	Ингибитор тканевых металлопротеаз	Опухоли толстого кишечника, почек, головного мозга
<i>TIMP3</i>	Медиатор интерферонзависимого апоптоза	Опухоли толстого кишечника, почек, головного мозга
<i>DAPK1</i>	p53 подобный ген	В-клеточные лимфомы, опухоли легких
<i>p73</i>		Лимфомы

Целесообразность использования секвенирования для анализа метилированных последовательностей заключается в

1. возможности получить информацию для каждого CpG участка, составляющего CpG островок;
2. количественной оценке степени метилирования продуктов;
3. точности метода благодаря прямой детекции метилированной последовательности ДНК

Начальным этапом является выделение ДНК. Степень очистки ДНК критична для успешного выполнения бисульфитной конверсии и в дальнейшем ПЦР. Рекомендуется использовать протеиназу К для того, чтобы убрать белки перед следующим этапом анализа. Далее необходимо проводить бисульфитную конверсию (рисунок 6.10).

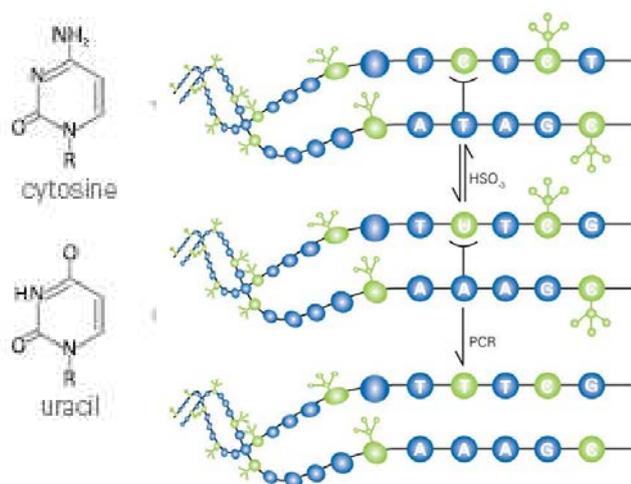


Рисунок 6.10 - Бисульфитная конверсия

Причины проведения бисульфитной конверсии:

- ✓ Метилирование нельзя детектировать в процессе обычной ПЦР;
- ✓ При обработке бисульфитом не метилированный цитозин превращается в урацил, а метилированный цитозин не меняет свою структуру;
- ✓ Если затем провести ПЦР, то на месте урацила появится тимин, а на месте 5-метилцитозина – цитозин;
- ✓ Обработка бисульфитом превращает эпигенетическую модификацию в генетическое изменение на уровне первичной структуры ДНК, которое можно затем анализировать при помощи ПЦР.

В процессе реакции могут возникать сложности: частичная апуринизация под воздействием слабой кислоты; неполная конверсия, что приводит к получению ложных результатов; перед последующими этапами анализа необходимо тщательно очистить образец от солей и других возможных ингибиторов.

Следующим этапом является дизайн праймеров, а затем амплификация. Существует две основные стратегии дизайна праймеров (6.3).

Таблица 6.3 – Стратегии дизайна праймеров

Метил-специфичная ПЦР (MSP)	Бисульфитный сиквенс (BSP)
СрG мотивы включены в последовательность праймеров	СрG мотивы исключены из последовательности праймеров
Продукты реакции после амплификации анализируются электрофоретически на геле или при помощи фрагментного анализа в капиллярах - определяется статус метилирования	Продукты реакции после амплификации подвергаются секвенированию. Более accurатная оценка метилированного статуса по сравнению с MSP.
<p>Methylated</p> <p>FW5' ATCGGGTTTTTTGGTAGGTTTAGCCGTTGGTTCGTTCCGG New RV 3' TAGCCCAAAAAACCATCCAATCCGCAACCACCAAGCC</p> <p>Unmethylated</p> <p>FW5' ATTGGGTTTTTTGGTAGGTTTAGGTTGTTGGTTCGTTCCGG New RV 3' TAGCCCAAAAAACCATCCAATCCGCAACCACCAAGCC</p>	<p>Methylated ?</p> <p>FW5' ATYGGGTTTTTTGGTAGGTTTAGGYGTTGGTTCGTTCCGG New RV 3' TAGCCCAAAAAACCATCCAATCCGCAACCACCAAGCC</p>

После этапа амплификации проводится анализ результатов. Одним из методов анализа является секвенирование, по результатам которого можно судить о степени метилирования образцов ДНК (рисунок 6.11).

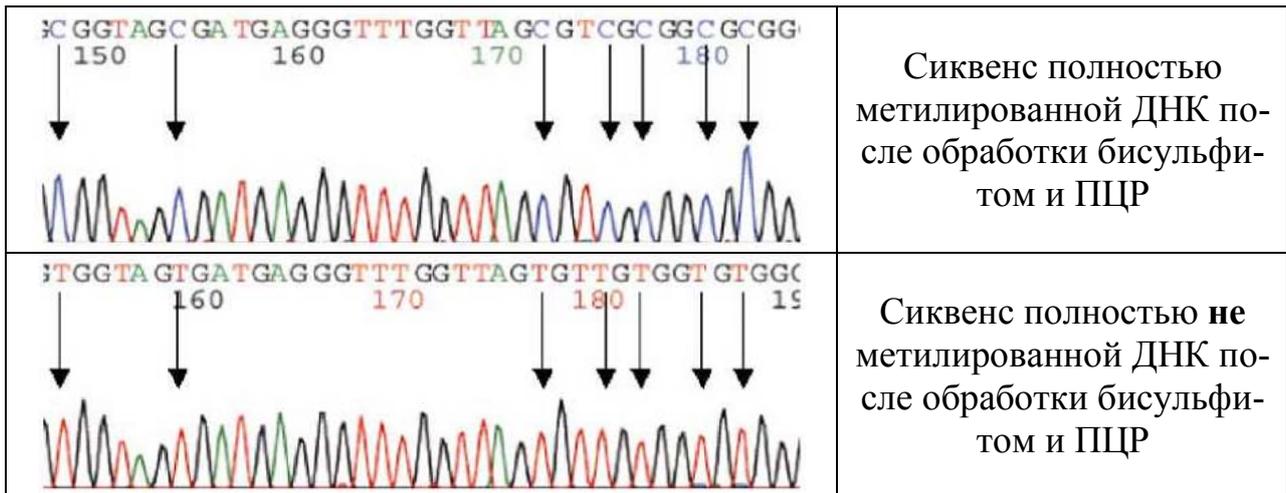


Рисунок 6.11 – Результат секвенирования метилированной и неметилированной матриц

Еще одним вариантом анализа полученных результатов является фрагментный анализ, также позволяющий быстро оценить степень метилированности данного ампликона (рисунок 6.12). При этом дизайн праймеров не отличается от такового для бисульфитного секвенирования, прямой праймер должен содержать на конце флуоресцентную метку. Разделение Основано на различии электрофоретической подвижности между С и Т, фрагменты с высоким содержанием С (метилированные) движутся быстрее в геле, чем фрагменты с высоким содержанием Т (неметилированные).

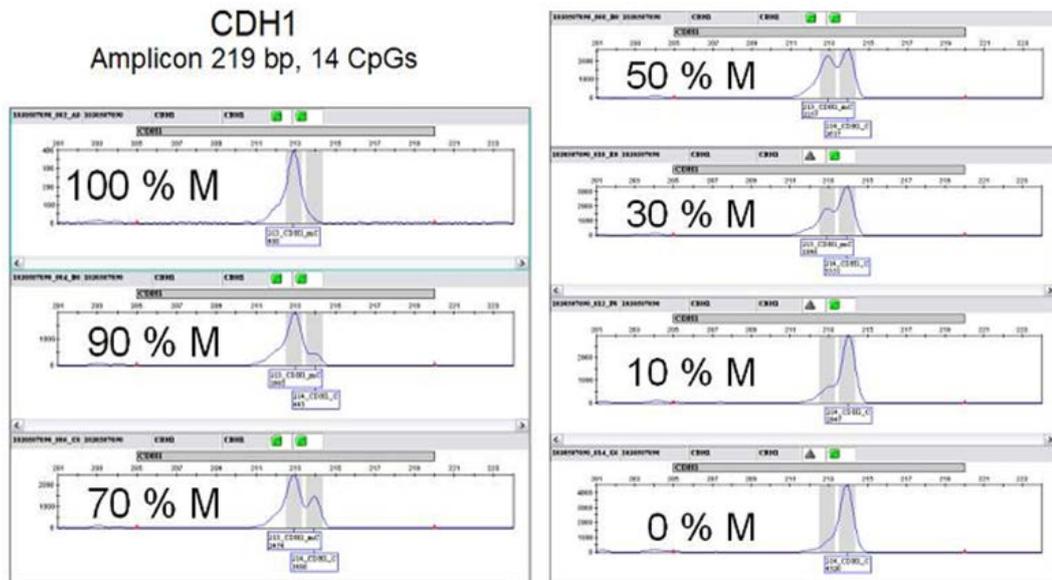


Рисунок 6.12 – Определение степени метилирования методом фрагментного анализа

Метод удлинения на одно основание основан на том, что полимеразы удлиняют праймер на один меченый флуоресцентным красителем ddNTP с 3'-конца (в смеси отсутствуют обычные dNTP) (рис. 1.13), после этого проба анализируется с помощью капиллярного электрофореза (GeneMapper® Software). При дизайне праймеров необходимо учитывать, что последний нуклеотид праймера должен располагаться перед CpG локусом.

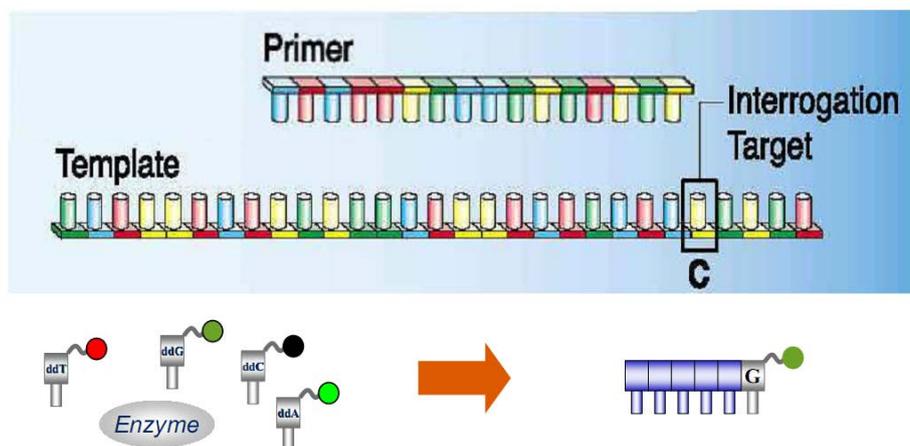


Рисунок 1.13 - Удлинение на одно основание с использованием набора SNaPshot® (Applied Biosystems)

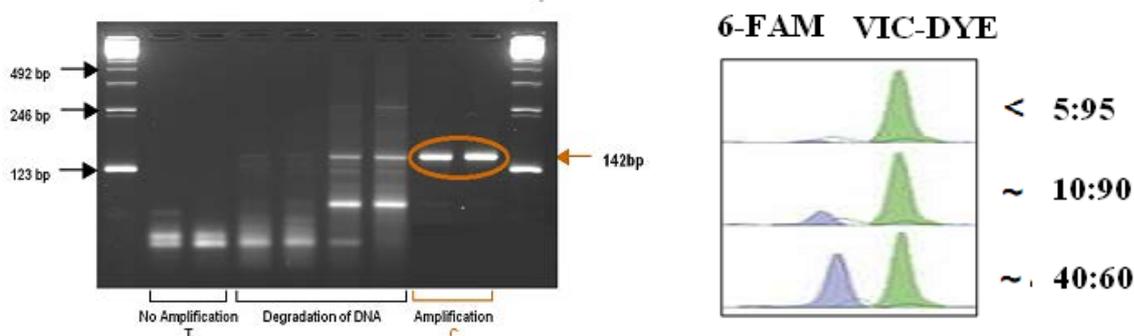
Метил-специфичная ПЦР (MSP) характеризуется тем, что CpG мотивы включены в праймеры, проводится дискриминация по парам праймеров, амплификация зависит от статуса метилирования. Рекомендуемые размеры ампликонов от 80 до 175 п.о., оба ампликона должны охватывать одну и ту же последовательность, на 3'-конце праймера должны быть C из CpG

или связка CG. Амплификация должна проводиться в разных пробирках, но затем при нанесении на гель или в капилляр их нужно смешивать.

Детекция может проводиться классически – метод геле-электрофореза, или по флуоресцентным меткам (рис. 1.14). Для флуоресцентной детекции используют:

- 6-FAM™ dye – метил-специфичный праймер;
- VIC® dye – праймер для неметилованного состояния;

Разделение ампликонов проводят методом капиллярного электрофореза и анализируют с помощью GeneMapper® Software.



Классическая детекция

Сравнение интенсивности пиков

Рисунок 6.13 – Классическая и флуоресцентная детекция результатов MSP

Модификации ПЦР для неинвазивной детекции минорных фракций ДНК

Корректирующая ПЦР (proof-reading PCR – PR-PCR). Метод разработан для выявления известных мутаций в геномной ДНК. Он отличается от стандартной ПЦР структурой одного из праймеров и использованием ДНК-полимеразы с корректирующей активностью. Один из праймеров обладает 3'-концом, расположенным возле сайта предполагаемой мутации, 3'-ОН группа данного праймера заменена блокирующей группой. Выявление мутантного и дикого генов зависит от того, устраняется или нет блокирующая группа праймера корректирующей активностью полимеразы в случае несоответствия с матрицей. Удаление блокирующей группы делает возможным прохождение селективной амплификации и создает основы для дифференциации нормального и мутантного генов (рисунок 6.15).

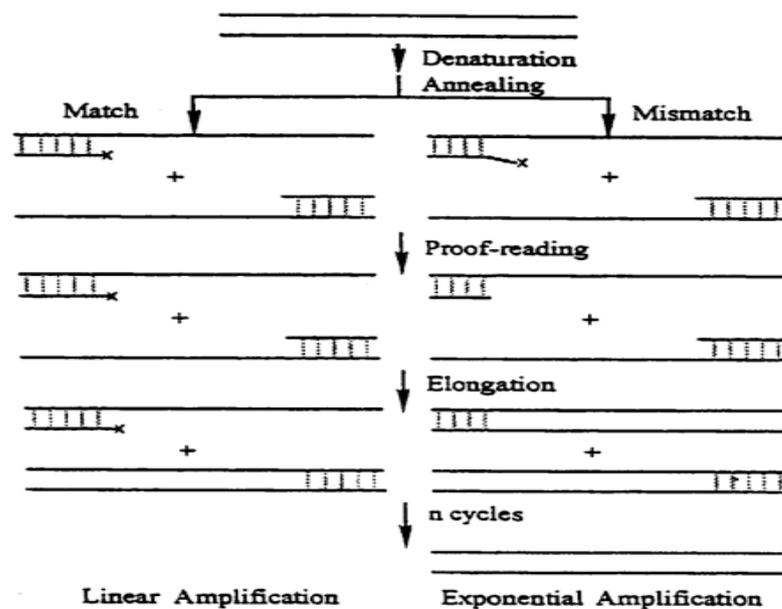


Рисунок 6.14 – Схематичная диаграмма принципа метода PR-PCR

Как и в стандартной ПЦР, в данной модификации используют 2 праймера для амплификации, но в PR-PCR 3'-ОН группа одного из праймеров заменена блокирующей группой (x), которая не допускает экспоненциальной амплификации в случае присутствия блокирующего терминального нуклеотида на матрице. Для эффективного удаления блокирующего нуклеотида нужна ДНК полимеразы с корректирующей активностью (proof-reading activity). Если блокирующий 3'-нуклеотид не комплементарен матрице, то он будет удален корректирующей активностью полимеразы, допуская, таким образом, прохождение элонгации, т.е. матрица будет амплифицироваться. Если блокирующий нуклеотид связывается с матрицей, то его удаление полимеразой не эффективно и элонгация, а значит и амплификация матрицы блокируется.

Использование данного метода сделало возможным селективную амплификацию специфического ДНК фрагмента при наличии очень малого количества ДНК. Дополнительное преимущество – возможность амплифицировать мутантную последовательность из смешанной популяции мутантных и диких ДНК. Подобное свойство присуще и методу аллель-специфичной ПЦР (AS-PCR), но у аллель-специфичной ПЦР есть и свои ограничения. А именно, при выполнении AS-PCR может происходить ошибочная элонгация праймеров, которые не образуют полностью комплементарной пары с матрицей, что приведет к ошибочному выходу продуктов реакции. Напротив, PR-PCR создает другие альтернативные условия амплификации.

Для обеспечения значимой разницы амплификаций в PR-PCR блокирующий 3'-нуклеотид должен эффективно вырезаться. Избирательное вырезание блокирующего 3' нуклеотида при условии не соответствия матрице

осуществляется в каждом цикле амплификации, поэтому кумулятивный эффект после множества циклов очень высок. Дополнительное различие в том, что в PR-PCR непосредственная элонгация праймера начинается с потенциального сайта мутации в отличие от начала элонгации с соседнего нуклеотида в случае AS-PCR. Более того, корректирующая способность ДНК полимеразы (используется Pfu-ДНК-полимераза) снижает риск нежелательных мутаций, который всегда присутствует при амплификации, данный риск меньше, чем в случае использования Taq или других термостабильных полимераз, у которых нет корректирующей способности. PR-PCR является высокоселективной методике при простоте манипуляций [2, 7, 13, 31].

ПЦР с блокированием дикого типа (wild-type blocking PCR WTB-PCR) – одна из наиболее эффективных технологий обнаружения редких аллелей, содержащих точечные мутации (единичные однонуклеотидные замены или небольшие делеции/инсерции).

Сутью технологии является введение в ПЦР-смесь дополнительных модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных последовательности исследуемого региона ДНК «дикого типа» и имеющих достаточно высокую температуру плавления (Seyama et al., 1992; Orou et al., 1995; Dominguez et al., 2005). В ходе ПЦР эти дополнительные олигонуклеотиды (блокаторы) не отделяются от своей мишени на этапах отжига и элонгации и таким образом препятствуют полимеразному синтезу новых копий ДНК.

Однако при наличии в исследуемом регионе хотя бы одной точечной мутации температура плавления данных олигонуклеотидов значительно снижается и полимеразный синтез начинает идти беспрепятственно (рисунок 6.16).

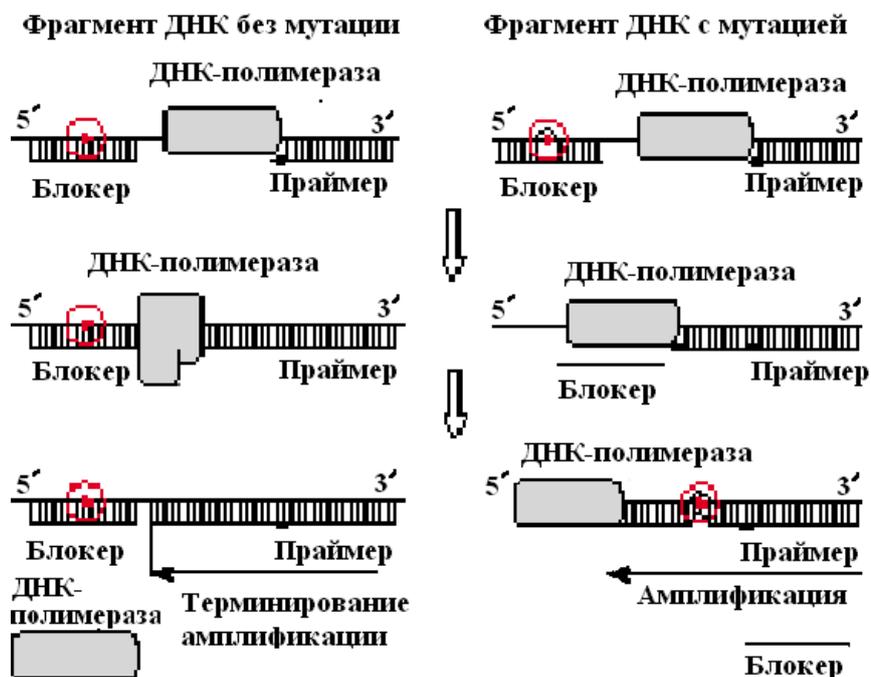


Рисунок 6.15 – Схема принципа метода ПЦР с блокированием дикого типа

Применение WTB-PCR позволяет добиться избирательности не менее 1 : 2000 при чувствительности менее 5 копий исследуемой ДНК.

Лиганд-опосредованная ПЦР (ligand-mediated PCR – LM-PCR) – это метод амплификации ДНК-фрагмента или серии фрагментов с одного сайта отжига праймера. Фрагмент денатурирует и гибридизуется с праймером. Полимераза при элонгации оставляет отрезок полинуклеотидной цепи для соединения с линкерным праймером, который представляет собой двойной олигодезоксинуклеотид, и становится сайтом связывания второго праймера для последующих циклов амплификации.

ПЦР с ко-амплификацией при низкой температуре денатурации (COamplification at Lower Denaturation temperature PCR – COLD-PCR). COLD-PCR – технология, которая позволяет детектировать мутации в ДНК, присутствующей в малом количестве. Метод использует критическую температуру (T_c), при которой ДНК с мутациями преимущественно плавится в сравнении с ДНК дикого типа. COLD-PCR обогащает мутантной ДНК смесь дикой и мутантной ДНК. T_c ниже, чем стандартная температура денатурации, при T_c преимущественно денатурируют гетеродуплексные молекулы (те, что сформированы из цепей дикой ДНК и мутантной).

COLD-PCR может быть выполнена в 2-ух форматах: полная (full) COLD-PCR или быстрая (fast) COLD-PCR (рисунок 6.17). Полная COLD-PCR может увеличивать количество копий всех возможных мутаций вдоль после-

довательности, хотя и в меньшей степени, чем для быстрой COLD-PCR. Полная COLD-PCR использует промежуточную температуру во время ПЦР циклирования для кросс-гибридизации мутантных и диких аллелей. Гетеродуплексы, которые плавятся при более низкой температуре, чем гомодуплексы, затем селективно денатурируют при T_c и амплифицируются при прохождении циклов ПЦР.

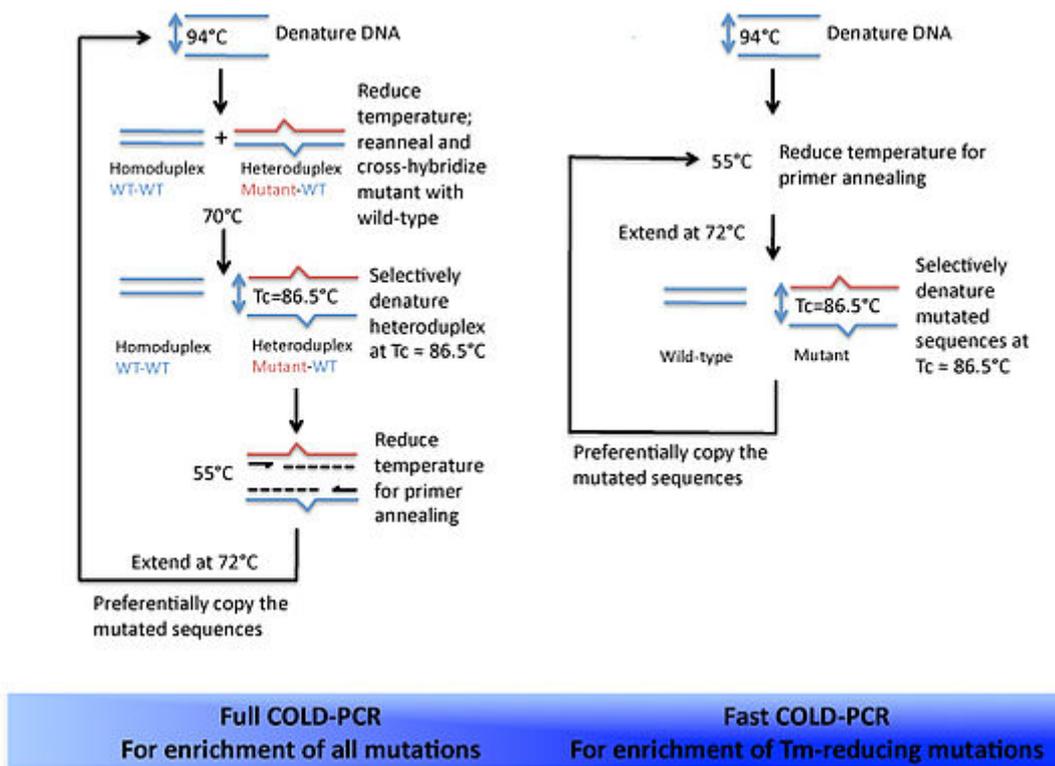


Рисунок 6.16 – Схема принципа метода ПЦР с ко-амплификацией при низкой температуре денатурации

При проведении полной COLD-PCR формирование гетеродуплексов не требуется, множатся мутации в любой позиции ДНК не все, а те, которые делают T_m мутантного ампликона ниже в сравнении с дикой ДНК (в соответствии с соотношением T_m для пар нуклеотидов: G:C>A:T или G:C>T:A).

Применение COLD-PCR позволяет увеличить количество матрицы с мутациями, таким образом, улучшая детекцию и селективность. Чем больше $\Delta(T_m - T_c)$, тем выше выход мутантной ДНК.

COLD-PCR позволяет детектировать менее чем 1 мутантную копию на 1 000 диких копий ДНК. Технология имеет различные сферы применения:

- ✓ детекция мутаций в малигнизированных клетках крови;
- ✓ генотипирование образцов опухоли с низким содержанием малигнизированных клеток;
- ✓ детекция мутаций в циркулирующих опухолевых клетках;

- ✓ идентификация резистентных клонов в первичных опухолях;
- ✓ мониторинг мутаций, вызывающих вирусную резистентность.

COLD-PCR может служить высоко точным и чувствительным методом, необходимым для скрининга онкологических пациентов на ранних стадиях заболевания.

Цифровая ПЦР (digital PCR – dPCR) (Vogelstein and Kinzler, 1998) является оптимизированным вариантом традиционных ПЦР методов. Технология может быть использована для клональной амплификации и количественного учета нуклеиновых кислот (включая ДНК, кДНК, метилированную ДНК или РНК). Ключевое различие между dPCR и традиционной ПЦР заключается в методе количественного учета нуклеиновых кислот. ПЦР предполагает выполнение одной реакции в одном образце. dPCR также предполагает проведение одной реакции в одном образце, но образец разделен на множество порций и реакция проводится в каждой порции индивидуально. Данное разделение образца на порции позволяет получить более надежную информацию о структуре и составе образца. Метод продемонстрировал свою состоятельность для изучения вариаций в генетических последовательностях – количество копий, точечные мутации.

dPCR позволяет преодолеть трудности традиционной ПЦР. При выполнении dPCR каждый образец разделяется на порции так, что каждая молекула оказывается в собственном домене, в котором и протекает амплификация. Расчеты производятся по методу Пуассона. В результате каждому домену приписывается цифра "0" или "1", в зависимости от того, содержит он молекулу или нет, что соответствует положительной или отрицательной реакции. После прохождения ПЦР амплификации возможно производить количественный учет нуклеиновых кислот путем учета регионов, которые содержат конечные ПЦР продукты, положительные реакции (рисунок 6.18).

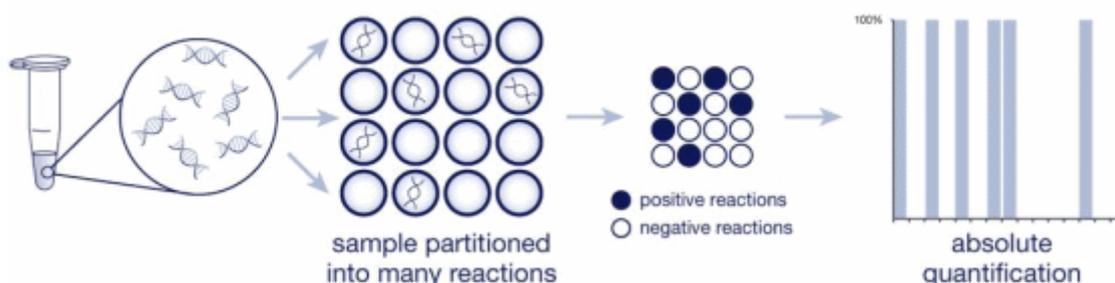


Рисунок 6.17 – Схема принципа метода Digital PCR

В традиционной ПЦР количество нуклеиновой кислоты пропорционально количеству циклов амплификации. dPCR независима от количества

циклов амплификации для определения начальной концентрации нуклеиновой кислоты в образце, что является преимуществом метода, так как экспоненциальные данные для количественной оценки нуклеиновых кислот несут некоторую неточность.

dPCR имеет много областей приложения, включая детекцию и количественный учет патогенов, присутствующих в малых концентрациях, выявление редких генетических последовательностей, определение вариаций в количестве копий генетических последовательностей, определение относительной генной экспрессии в единичной клетке, обогащение и разделение смесей молекул.

Преимущества Digital PCR:

- ❖ нет необходимости полагаться на референсные образцы и стандарты;
- ❖ желаемая точность может быть достигнута путем увеличения количества ПЦР доменов (повторов);
- ❖ высоко устойчива к ингибиторам;
- ❖ возможность анализировать сложные смеси молекул;
- ❖ в отличие от традиционной ПЦР dPCR предоставляет линейный отклик на количество копий нуклеиновой кислоты в образце, что позволяет детектировать даже незначительные изменения состава образца.

Список литературных источников:

1. Глик, Б. Молекулярная биотехнология : принципы и применение : пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак ; Под ред. Н.К. Янковского. – М. : Мир, 2002. – 590 с.
2. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение. Монография / С.П. Осинский, Д.Ф. Глузман, Й. Клифф, Н.А. Гизе, Г. Фрисс. – К.: «DIA». – 248 с.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Пер. с англ. Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М. : Мир, 1999. – 558 с.
4. Beale S.C. Capillary electrophoresis / S.C. Beale // *Anal. Chem.* – 1998. – Vol. 9, № 13. – P. 79–83.
5. Bi W., Stambrook P. J. Detection of known mutation by proof-reading PCR / Bi W., Stambrook P. J. // *Nucl. Acids Res.* – 1998. – vol. 26. – issue 12. – P. 3073-3075.
6. Crockett, A.O. Fluorescein-labelled oligonucleotides for Real-time PCR : using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides / A.O. Crockett, C.T. Wittwer // *Anal. Biochem.* – 2001. – Vol. 290, № 1. – P. 89–97.
7. Koonin E.V. Sequence. Evolution. Function : Computational approaches in comparative genomics / E.V. Koonin, M.Y. Galperin // *Science.* – 2003. – Vol. 4. – P.461.
8. Milbury C. A., Li J., Makrigiorgos G.M. COLD-PCR – Enhanced High-Resolution Melting Enables Rapid and Selective Identification of Low-Level Unknown Mutations // *Clinical Chemistry* – 2009. – vol. 55. – no. 12. – P. 2130-2143.
9. PCR mutation detection protocols / edited by Bimal d. Theophilus and Ralph Rapley // *Methods in molecular biology.* – Totowa, N.J. – 2002. – V. 187.
10. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer / Maher CA. [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 458. – pp. 97-101.
11. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer / DeRisi J [et al.] // *Nat. Genet.* – 1996. – Vol. 14. – pp. 457-460.
12. www.info.appliedbiosystems.com/methylation
13. Zhou X.P. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites / Zhou X.P. [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* – 1998. – Vol. 21 – pp. 101-107.

ГЛАВА 7 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ

Внедрение с 1980-х гг. методов клонирования, гибридизации и метода ПЦР (полимеразная цепная реакция), появление ДНК-чипов определили бурное развитие генетики по таким направлениям, как исследование структурно-функциональной организации генов и повторяющихся последовательностей ДНК, разработка ДНК-маркеров и применение их для составления насыщенных хромосомных карт, оценки генетического разнообразия и решения филогенетических задач [15,16].

7.1 Методы анализа полиморфизма ДНК: основные типы молекулярных маркеров и область их применения

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие, как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодоминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании.

В настоящее время существует огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК и множество комбинаций данных методов, что затрудняет создание единой более или менее подробной классификации ДНК-маркеров. Используются следующие подходы: RFLP, CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR, DArT и SNP (таблица 7.1) [16].

По основному методу, на котором строится тот или иной подход к анализу полиморфизма ДНК, молекулярные маркеры можно разделить на

маркеры, основанные на блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипах. При этом в каждой из трех групп маркеры разделяются на монолокусные и мультилокусные. Все мультилокусные маркеры объединяют еще и под общим названием «методы геномного фингерпринтинга». Монолокусные маркеры наследуются, как правило, по ко-доминантному типу, мультилокусные – по доминантному.

Для адекватного подбора маркеров с целью решения той или иной генетической задачи необходимо учитывать такие критерии, как цель использования, возможность сопоставления полученных результатов с данными других исследователей, материальные и временные затраты, необходимые для проведения исследования с выбранной группой маркеров, уровень полиморфизма и возможность автоматизации процесса [15].

Таблица 7.1 – Классификация монолокусных и мультилокусных маркеров

Клас- сификация	Монолокусные марке- ры	Мультилокусные марке- ры
Классификация		
Мето- ды, основанные на блот- гибридизации	RFLP (restriction frag- ment length polymorphism) – по- лиморфизм длины рестрикцион- ных фрагментов	Минисателлиты
Мето- ды, основанные на ПЦР	SSR (simple sequences repeats) – простые повторяющие- ся последовательности (микроса- теллиты) STS (sequences tagged site) – последовательности, ха- рактеризующие локус SCAR (sequence charac- terized amplified region) – после- довательность, характеризующая амплификационную область SSCP (single strand conformation polymorphism) – полиморфизм конформации одноцепочечной	RAPD (random amplified polymorphic DNA) – случайно ам- плифицированная полиморфная ДНК ISSR (inter simple sequence repeats) – межмикросателлитные последовательности IRAP (inter- retrotransposon amplified polymor- phism) – полиморфизм амплифици- рованных последовательностей между ретротранспозонами AFLP (amplified fragment length polymorphism) – полимор-

	<p>ДНК</p> <p>CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) – рещепленные амплифицированные полиморфные последовательности</p>	<p>физм длины амплифицированных фрагментов</p> <p>SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей</p>
<p>Методы, основанные на применении ДНК-чипов</p>	<p>SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм</p>	<p>DArT (diversity array technology) – ДНК чип технология для изучения разнообразия</p>

7.2 Подходы к выделению нуклеотидных последовательностей генов и анализ их транскрипционной активности

Существует достаточно широкий спектр подходов для направленного выделения нуклеотидной последовательности целевого гена. Выбор подхода зависит от исходных данных о гене и от того, насколько полная информация о последовательности гена необходима для решения дальнейших задач. В таблице 7.2 приведены критерии выбора адекватного подхода к выделению нуклеотидной последовательности целевого гена, названия соответствующих подходов [11].

Большинство из перечисленных в таблице 7.2 подходов приводит к выделению частичной нуклеотидной последовательности целевого гена, секвенирование которой достаточно для дальнейшего картирования и изучения экспрессии целевого гена. Для получения полной последовательности кДНК были разработаны методы амплификации концов кДНК *in vitro*, известные под общим названием «быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК» (rapid amplification of cDNA ends, RACE). Эти подходы разделяются на 5'RACE и 3'RACE; принцип данных подходов основан на селективной супрессии полимеразной цепной реакции. Дальнейшее конструирование праймеров к различным участкам выделенной полной последовательности кДНК (или к EST) и использование их для амплификации геномной ДНК позволяют выделить последовательности интронов.

Для понимания функциональной организации и эволюции целевого гена требуется выделение его полноразмерной геномной последовательности, включая промоторную область, а иногда и более протяженные прилегающие районы. Для того чтобы выделить полноразмерную последовательность целевого гена из неотсеквенированного генома, необходимо с помощью гомологичных последовательностей (путем гибридизации) или подобранных к ним праймеров (методом ПЦР) проводить скрининг геномных библиотек изучаемого вида. Дальнейший анализ отобранных позитивных клонов позволяет определить полноразмерную геномную последовательность целевого гена, включая прилегающие районы. Выделение промоторных участков генов может проводиться и с помощью подхода, основанного так же, как и RACE-метод, на селективной супрессии полимеразной цепной реакции и известного под названиями «прогулка по хромосоме» (chromosome walking) или «прогулка по геному» (genome walking) [13,15,16].

Таблица 7.2 – Критерии выбора адекватного подхода к выделению нуклеотидной последовательности целевого гена

Исходные данные 1	Исходные данные 2	Подход к выделению нуклеотидной последовательности гена
Продукт целевого гена неизвестен, с какими генами взаимодействует – не известно	Имеются мутантные или изогенные линии по целевому признаку	Метод транспозонного мечения
		Метод Т-ДНК мечения
	Локус картирован	Дифференциальный дисплей Позиционное клонирование
Продукт целевого гена неизвестен, но известно, с какими генами он взаимодействует	-	Саузерн-Вестерн скрининг экспрессирующей библиотеки
		Метод двугибридного скрининга
Известен продукт целевого гена	Известна аминокислотная последовательность белкового продукта	ПЦР-скрининг кДНК библиотеки с помощью вырожденных праймеров, подобранных на основании знания аминокислотной последовательности
		Метод выделения индуцированных кДНК, соответствующих аминокислотной последовательности очищенного фрагмента
		Вычитающая гибридизация + секвенирование
	Выделен белковый продукт	Скрининг экспрессирующихся <i>in vitro</i> библиотек кДНК Дифференциальный скрининг библиотек кДНК
Известна нуклеотидная последовательность гена с такой же функцией у других видов	Отсутствуют гомологичные EST в базе данных изучаемого вида	Саузерн- или ПЦР-скрининг геномной ДНК или кДНК библиотеки
		ПЦР на геномной ДНК или кДНК с консервативными праймерами
	Имеются гомологичные EST в базе данных изучаемого вида	ПЦР на геномной ДНК или кДНК со специфическими праймерами

Реализация масштабных программ по секвенированию геномов различных организмов привела к накоплению огромного числа нуклеотидных последовательностей и поставила перед исследователями задачу определения функционального значения полученной генетической информации. Основным инструментом, определяющим функцию генов, является дифференциальное исследование генной экспрессии. Путем определения того, какие гены экспрессируются, а какие неактивны в данной ткани (органе) в данных условиях у данного организма (генотипа), можно выяснить их функциональное значение.

Методы анализа транскрипционной активности генов можно разделить на три основные группы: 1) методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот; 2) методы, основанные на ПЦР (при использовании в качестве матрицы кДНК); 3) методы, основанные на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК.

Кроме того, в зависимости от поставленных задач все подходы по анализу экспрессии генов разделяются на подходы, направленные на изучение экспрессии индивидуальных генов и на выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы (таблица 7.3) [15].

Таблица 7.3 – Классификация методов анализа транскрипционной активности генов

Классификация	Выделение наиболее полного спектра генов, по экспрессии которых отличаются сравниваемые образцы	Изучение экспрессии индивидуальных генов
Методы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот	Вычитающая гибридизация Обратный нозерн-блоттинг Гибридизации НК на микрочипах	Нозерн-блоттинг

Методы, основанные на ПЦР	РНК-фингерпринтинг с помощью ПЦР	ОТ-ПЦР со специфическими праймерами ОТ-ПЦР в реальном времени
Методы, основанные на секвенировании экспрессирующихся последовательностей ДНК	Анализ EST SAGE Секвенирование транскрипта методами высокопроизводительного секвенирования	Анализ EST, гомологичных целевому гену

К числу методов анализа транскрипционной активности генов на основе гибридизации нуклеиновых кислот относится метод вычитающей гибридизации, позволяющий идентифицировать дифференциально экспрессирующиеся гены, метод Нозерн-блот гибридизации (Нозерн-блоттинг), обратный Нозерн-блоттинг, ставший прототипом современного подхода, известного как «gene expression profiling» (составление профилей экспрессии генов), основанного на различных высокопроизводительных методиках, в частности на использовании ДНК-чипов, позволяющих одновременно анализировать экспрессию тысяч генов.

Применение ДНК-чипов пришло в транскриптомику из геномики, где использование ДНК-чипов сначала было предложено в качестве альтернативного метода для секвенирования ДНК, а затем и для высокопроизводительного генотипирования. Однако наиболее успешным направлением исследований с использованием ДНК-чипов стал именно анализ экспрессии генов. В основе создания ДНК-чипов для мониторинга экспрессии генов лежит возможность идентифицировать целевую последовательность на основании последовательности гибридизующейся с ней пробы. При этом пробы иммобилизованы на плоскости, и каждой из них соответствует определенная локализация.

Первый чип для анализа экспрессии (cDNA microarray) содержал всего 45 различных последовательностей длиной около 1000 п.н., полученных с помощью ПЦР, каждая из которых соответствовала определенному гену. Для

размещения проб на чипе использовалось специально сконструированное автоматическое устройство. Однако первые чипы для анализа экспрессии генов отличались рядом недостатков (дорогостоящий и трудоемкий процесс создания чипов, низкая воспроизводимость результатов, ограниченное число проб на одном чипе). Преодолеть эти недостатки удалось с применением фотолитографического метода синтеза чипов, несущих пробы в виде коротких (20–25 п.н.) олигонуклеотидов (по 10–20 олигонуклеотидов, соответствующих каждому гену). Такой подход существенно повышает точность и воспроизводимость количественного анализа экспрессии генов, делает возможной высокую плотность размещения проб, это позволяет анализировать с помощью одного чипа тысячи генов и полностью охватывать геном изучаемого организма.

Несколько опережая развитие методов дифференциального анализа экспрессии генов с помощью ДНК-чипов, появились и получили широкое применение методы РНК-фингерпринтинга на основе ПЦР: RAP-PCR, дифференциальный дисплей (DD-PCR), cDNA-AFLP, ACP-PCR. Несмотря на то что в настоящее время данные подходы уступают по своей воспроизводимости, возможности автоматизации анализа, производительности и возможности количественного анализа методам, основанным на использовании ДНК-чипов, доступность и низкая стоимость методов РНК-фингерпринтинга на основе ПЦР способствуют их широкому применению. Данные подходы основаны на ОТ-ПЦР (ПЦР на кДНК) с применением различных методов фингерпринтинга. Например, сочетание ОТ-ПЦР и AFLP дало метод cDNA-AFLP, сочетание ОТ-ПЦР и RAPD дало RAP-PCR. Метод дифференциального дисплея основан на использовании праймеров в виде случайными основаниями 3'-конце. Метод выявления дифференциально генов помощью высокоспецифичной (ACP-PCR GeneFishing) основан на использовании структуры их трех составляющих, а именно из полидI (дезоксиинозин) линкера, соединяющего целевую (с 3'-конца линкера) и универсальную нецелевую (с 5'-конца линкера) последовательности. Такая конструкция позволяет значи-

тельно повысить специфичность ПЦР, а сочетание использования данной структуры и случайных праймеров дает эффективный метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов.

Тогда как РНК-фингерпринтинг используется для выявления дифференциально экспрессирующихся генов, методы, основанные на ОТ-ПЦР со специфичными праймерами, призваны помочь исследователям выявить различия в экспрессии определенного гена у разных образцов. При этом с помощью ОТ-ПЦР могут быть продемонстрированы как качественные отличия (активен ген или неактивен), так и количественные изменения. Количественная ПЦР (или ПЦР в реальном времени) основана на флюоресцентной регистрации накопления ДНК непосредственно в процессе ПЦР, что дает возможность определять количество исходного числа матриц. В случае ОТ-ПЦР количественный анализ позволяет установить число молекул мРНК (или относительный уровень экспрессии) определенного гена в том или ином образце.

В начале 1990-х гг. развитие высокопроизводительных методов секвенирования ДНК положило начало созданию баз данных EST (expressed sequences tags) на основе секвенирования библиотек кДНК. EST получают в результате случайного отбора клонов из библиотек кДНК и секвенирования коротких участков (длиной 300–500 п.н.) из расчета один участок на клон. Количественные различия в экспрессии какого-либо гена могут быть установлены в результате подсчета частоты, с которой последовательность данного гена встречается в библиотеках, полученных на различных образцах. Результаты такого сравнения являются достаточно точными (при условии использования ненормированных библиотек, т. е. библиотек, при получении которых не происходило выравнивания численности клонов, содержащих транскрипты разных генов), а эффективность такого подхода возрастает с накоплением информации в базах данных EST.

Существует ускоренная версия секвенирования EST – последовательный анализ экспрессии генов (serial analysis of gene expression, SAGE). SAGE-

последовательности получают на основе мРНК, выделяя короткую последовательность из определенного участка (как правило, SAGE-последовательности представляют собой 9 пар оснований сразу после последнего сайта узнавания эндонуклеазой в данном транскрипте). Множество SAGE-последовательностей лигируют между собой так, чтобы получались удобные для секвенирования последовательности длиной 300–500 п.н., встраивают в вектор для клонирования, секвенируют и анализируют полученные последовательности.

7.3 Метод вычитающей гибридизации и его использование

Различные экспериментальные подходы, основанные на гибридизации нуклеиновых кислот, такие как гибридизация микрочипов, конкурентная геномная и Саузерн/Нозерн блот гибридизация, стали весьма популярны среди научного сообщества и используются в настоящее время повсеместно. Однако же, представляется недооценённым потенциал ряда родственных экспериментальных методов, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот в растворе. К таким методам относятся вычитающая гибридизация, которая позволяет эффективно находить различия в образцах геномной ДНК или кДНК; метод клонирования общих последовательностей (англ. coincidence cloning), который, напротив, позволяет идентифицировать последовательности, присутствующие во всех сравниваемых образцах; нормализация кДНК, которая используется для выравнивания концентраций часто- и редко представленных транскриптов в библиотеках кДНК; метод, названный TILLING, широко применимый для исследований в области обратной генетики. Наконец, некоторые методы направлены на крупномасштабный поиск полиморфных участков ДНК, включая выявление однонуклеотидных полиморфизмов [1].

Уотсон-Криковская гибридизация комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот – это один из самых важных фундаментальных процессов, необходимый как для узнавания на молекулярном уровне *in vivo*,

так и для выделения и анализа нуклеиновых кислот *in vitro*. Использование экспериментальных подходов, основывающихся на гибридизации ДНК в растворе, имеет ряд преимуществ для многих приложений, начиная от конструирования репрезентативных библиотек кДНК для секвенирования пулов EST, и заканчивая идентификацией эволюционно консервативных последовательностей, дифференциально экспрессирующихся генов и геномных делеций.

Уникальные характеристики многих таких методов делают их сильными конкурентами таких широко известных и вошедших в моду подходов, как микрочиповая и конкурентная геномная гибридизации. В качестве примера можно привести следующие методы: вычитающая гибридизация позволяет находить различия в образцах кДНК или геномной ДНК; метод клонирования совпадающих последовательностей (*coincidence cloning*), напротив, эффективен для поиска общих последовательностей в сравниваемых образцах; нормализация кДНК успешно используется для выравнивания содержания часто- и редко встречающихся последовательностей в библиотеках кДНК, что особенно важно для создания репрезентативных библиотек EST (англ. *expressed sequence tag*). Более того, некоторые методы используются для крупномасштабного поиска полиморфных локусов, включая идентификацию однонуклеотидных полиморфизмов.

Гибридизация нуклеиновых кислот в растворе имеет ряд преимуществ общего характера перед гибридизацией с нуклеиновыми кислотами, иммобилизованными на твёрдом носителе: более быструю кинетику гибридизации, лучшую дискриминацию совершенных дуплексов и возможность использовать полученные дуплексы для дальнейшей ПЦР амплификации и клонирования. Среди методов гибридизации в растворе, вычитающая гибридизация, безусловно, на настоящий момент является наиболее популярной техникой. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов в постгеномную эру требует масштабного скрининга и включает в себя как анализ транскриптома и протеома, так и расширенный поиск функциональных полиморфизмов среди популяций. Основными подходами, используемыми для достижения этих

целей, являются секвенирование по Сэнгеру и ДНК-чипы, применяемые как для качественных, так и для количественных измерений. Вместе с тем, нельзя не признать ряд существенных недостатков, которыми обладают многие популярные подходы, основанные на технологии микрочипов:

1. Анализ ограничен количеством кДНК или синтетических олигонуклеотидов, нанесённых на чип. Это количество, как правило, существенно ниже, чем общее количество генов у исследуемых организмов. Таким образом, многие гены избегают анализа в подобных системах.
2. Даже «полнотранскриптомные» ДНК-чипы в их нынешнем виде слабо дискриминируют различные сплайс-формы мРНК.
3. Экспрессия генов, транскрибируемых на низком уровне, не может быть детектирована с использованием стандартных микрочиповых систем.
4. Чипы, созданные на основе нанесённых на твёрдый носитель кДНК, не позволяют дискриминировать различных индивидуальных представителей многих генных семейств, а также многие транскрипты, содержащие в своём составе геномные повторы.
5. Наконец, микрочипы не содержат большинства регуляторных антисмысловых РНК и не могут быть использованы для масштабных исследований регуляции экспрессии генов по пути РНК интерференции.

Однако же, многие из вышеперечисленных недостатков могут быть исправлены при подборе или же разработке специфических вариантов технологии микрочипов.

Наиболее важный минус закрытых систем, таких как микрочипы, сохраняется: все они требуют предварительной информации по геномной и транскриптомной последовательностям для обнаружения, например, дифференциально экспрессирующихся транскриптов [1, 6, 9, 15].

Открытые системы обладают большей «подвижностью» в детекции новых последовательностей с неизвестной структурой и/или функциональным статусом. Различия в экспрессии генов между двумя образцами могут быть найдены как результат прямого сравнения двух образцов, без предвари-

тельного упрощения транскриптомов в угоду той или иной теории, которой придерживается исследователь или же основываясь на которой был разработан микрочип. К таким методам прямого сравнения относятся методы дифференциального дисплея, дифференциального клонирования, а также комбинация этих методов. Эти подходы успешно применялись для поиска генов, дифференциально экспрессирующихся в двух сравниваемых образцах.

К недостаткам упомянутых методов можно отнести то, что они эффективно применимы лишь для анализа генов, экспрессирующихся на высоком уровне и/или показывающих значительные различия в уровнях экспрессии в сравниваемых образцах. При этом эффективность обнаружения дифференциальных слабо экспрессируемых транскриптов крайне низка. Эта проблема становится неразрешимой, когда разница в экспрессии таких «редких» транскриптов между образцами также мала [1, 8, 10, 13].

Необходимо заметить, что многие гены, экспрессируемые на низком уровне, играют важнейшие роли в установлении и поддержании различных фенотипических признаков, и их всесторонний анализ необходим для понимания целостной картины механистических изменений, происходящих в клетке. Основным преимуществом вычитающей гибридизации является возможность поиска дифференциально экспрессирующихся генов вне зависимости от уровня их транскрипции, и при отсутствии предварительных данных об их первичной структуре. Помимо получения дифференциальных библиотек кДНК, вычитающая гибридизация также чрезвычайно полезна для поиска различий в геномных ДНК.

Появление метода. Вычитающая гибридизация (ВГ) была впервые использована Баутцем и Рейлли в 1966 г. для очистки мРНК фага Т4. Позднее, в нескольких исследовательских группах использовались варианты этой техники, как для клонирования кДНК, полученных из мРНК сравниваемых образцов (вычитание кДНК), так и для выявления крупных делеций в геномной ДНК (геномное вычитание).

Техника ВГ получила «второе дыхание» в 1984 г., когда Палмер и Ламар применили ВГ для создания рекомбинантных библиотек геномной ДНК мыши, обогащённых последовательностями, относящимися к У хромосоме. Начиная с этого момента, техника вычитающей гибридизации начала быстро развиваться и на настоящий момент значительно эволюционировала, став одним из наиболее важных и эффективных подходов молекулярной биологии. Этот универсальный метод используется для решения весьма различных экспериментальных задач, таких как клонирование и характеристика новых генов, поиск болезнь-, организм- и ткане-специфических транскриптов, идентификация генов, дифференциально экспрессирующихся на различных стадиях эмбрионального развития, прогрессии рака, регенерации, для поиска генов, регулируемых в ответ на внешнюю или внутреннюю стимуляцию, и так далее.

Техника ВГ эффективна для полногеномного сравнения бактериальной ДНК, для выделения видо-специфических геномных локусов и полиморфных маркёров как в эукариотических, так и в прокариотических геномах. Кроме того, ВГ использовалась для субклонирования ДНК из дрожжевых искусственных хромосом (YAC) в более мелкие векторы, для картирования геномных перестроек, ассоциированных с раком или хромосомными аномалиями, а также для заполнения протяжённых брешей геномной последовательности в крупномасштабных проектах по секвенированию геномов.

Однако же, важность ВГ остаётся на настоящий момент недооценённой. Как было упомянуто, ВГ стала популярна начиная с 1984 г., когда Палмер и Ламар предложили простую идею разделения гибридных молекул ДНК. Двухцепочечные гомогбриды так называемой «тестерной», или «тестерной» ДНК (образец, содержащий дифференциальные последовательности, которые надо найти) отделялись от гетерогбридов тестер-драйвер и гомогбридов драйвер-драйвер («драйвер» - это контрольный образец, с которым сравнивают тестер). Задачей ВГ является выделение фракции тестер-специфичной ДНК, отсутствующей в драйвере [1].

Предложенная идея заключалась в том, что тестер и драйвер должны иметь различающиеся последовательности на концах. Авторы хотели создать рекомбинантную библиотеку ДНК мыши, обогащённую последовательностями, относящимися к У хромосоме (рисунок 7.1). ДНК самки мыши (драйвер) была фрагментирована ультразвуком, тогда как ДНК самца (тестер) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *MboI*. ДНК тестера смешали со 100-кратным весовым избытком драйвера, денатурировали и ренатурировали. При этом только реассоциировавшие гомодуплексы тестер-тестер имели липкие концы с обеих сторон и могли быть лигированы в плазмидный вектор pBR322, расщеплённый эндонуклеазой рестрикции *BamHI*.

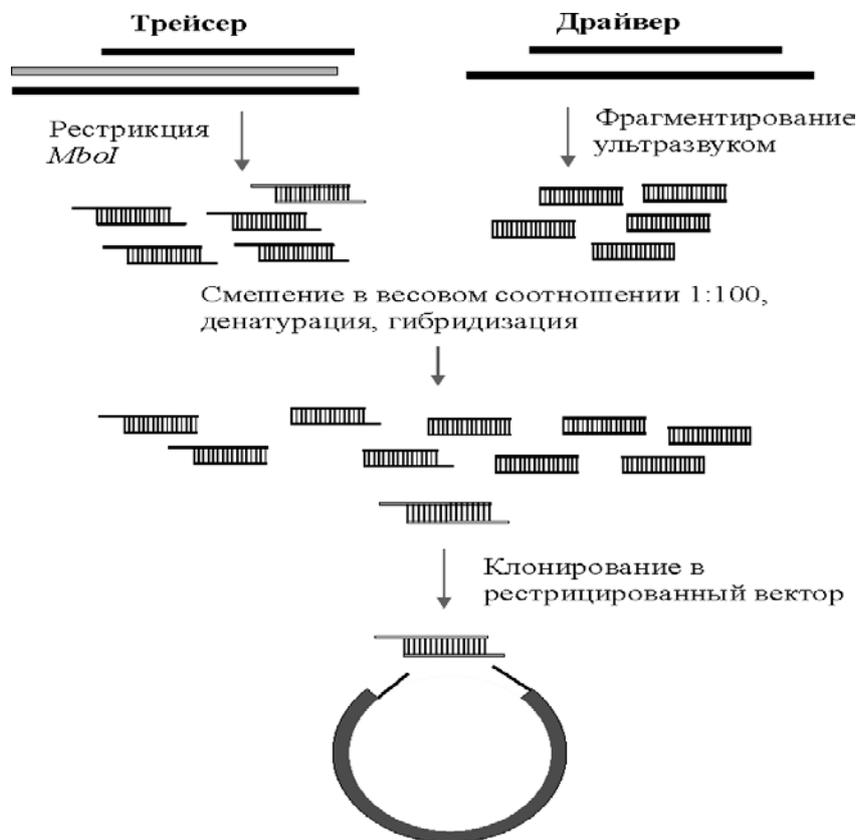


Рисунок 7.1 – Схема вычитающей гибридизации геномной ДНК, предложенная Палмером и Ламаром, основана на клонировании гибридов тестер-тестер при помощи уникальных рестриктных сайтов.

Вскоре этот принцип был успешно применён для клонирования фрагментов ДНК человека, делетированных у пациентов с миотонической дистрофией Дюшенна. Одновременно, другая исследовательская группа исполь-

зовала похожий подход для поиска матричных РНК, различающих анализируемые образцы, специфичных для определённого типа клеток, тканей или же организма (рисунок 7.2).

На матрице поли(А)+ фракции РНК тестера, синтезировали первые цепи кДНК, затем исходную РНК расщепляли в щелочных условиях, так что в растворе оставались только первые цепи кДНК, комплементарные исходной мРНК тестера. Тестер смешивали с драйвером, взятым в 100-кратном или большем весовом избытке. Драйвер являлся фракцией поли (А)+ РНК из другого образца. В получившейся смеси, фрагменты тестера либо гибридизовались с избытком комплементарных цепей драйвера, либо же оставались в форме одноцепочечной ДНК. Эта последняя одноцепочечная фракция, обогащённая тестер-специфичными последовательностями, очищалась от драйвера и гибридов тестер-драйвер на гидроксипатитовой колонке (специфично связывает двуцепочечные нуклеиновые кислоты). На матрице очищенного одноцепочечного тестера синтезировали вторую цепь кДНК и лигировали двуцепочечную кДНК либо в экспрессионный вектор (если требовались дополнительные раунды вычитания), либо в вектор для клонирования. Для повышения скорости гибридизации, к гибридизационной смеси могли быть добавлены химические акселераторы, например фенол [1, 11, 15, 18].

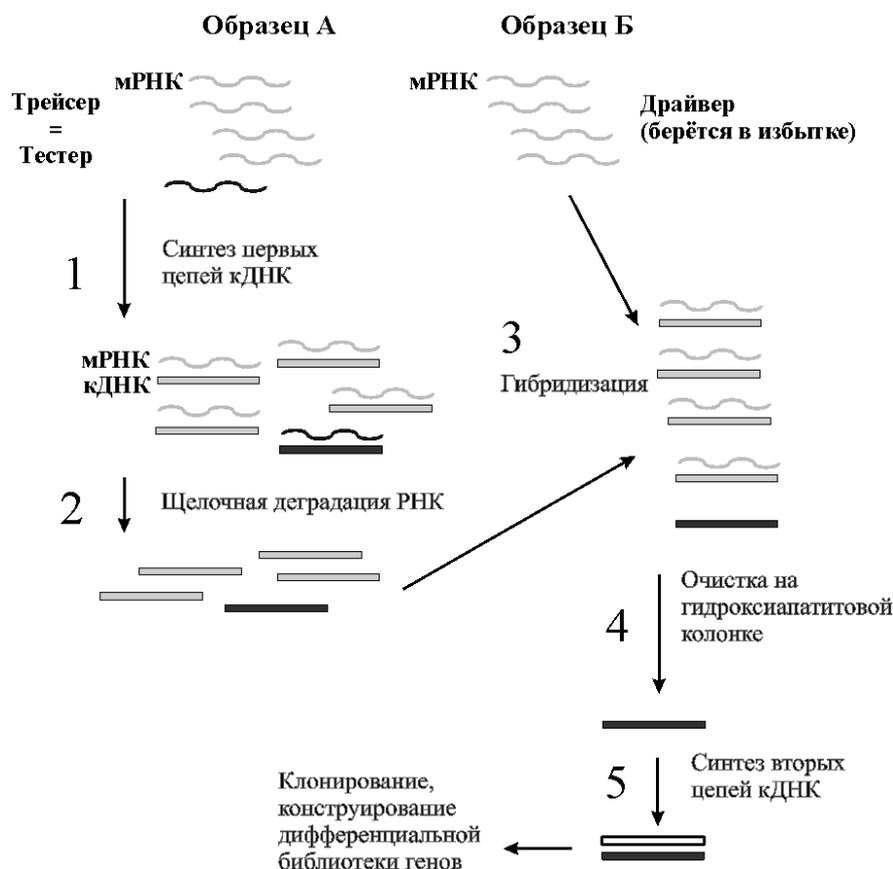


Рисунок 7.2 – Схема вычитания кДНК/мРНК, использующая щелочную деградацию РНК на стадии 2.

Однако же, этот подход не завоевал популярности, в первую очередь из-за трёх серьёзных ограничений:

1. требовались большие количества очищенной мРНК,
2. технические манипуляции были чрезвычайно трудоёмки,
3. деградация РНК создавала проблемы на всех стадиях работы.

Позднее, первая из этих проблем была решена при клонировании кДНК тестера и драйвера в специальные одно- или двуцепочечные экспрессионные векторы. РНК нарабатывалась в *E. coli*, что давало возможность получения больших количеств для гибридизации. Третий барьер был частично снят, когда мРНК драйвера была заменена на двуцепочечную кДНК (использование первых цепей одноцепочечной кДНК было чрезмерно дорого, а двуцепочечная кДНК могла быть наработана в *E. coli*). Впрочем, при этом возникла новая проблема: как разделять дуплексы тестер-тестер от дуплексов драйвер-драйвер?

В 1986г. Велхер с соавторами применили для вычитания биотин-стрептавидиновую систему: биотинилированные праймеры использовались для синтеза кДНК драйвера, и продукты вычитания инкубировались конъюгированные со стрептавидином медные гранулы. В результате, в растворе оставались дуплексы тестер-тестер, тогда как гранулы связывали остальные продукты гибридизации, кроме одноцепочечного тестера. Этот метод разделения продуктов вычитания стал достаточно популярным (при этом модифицировались отдельные детали). В 1993г. магнитные гранулы заменили медные гранулы в качестве твердофазного носителя для конъюгированного стрептавидина при очистке гибридов тестер-тестер.

Подводя итог, можно сказать, что ранние методы вычитания кДНК обычно использовали один или два раунда гибридизации и использовали (-) мРНК как драйвер и (+) кДНК как тестер. При этом наработка (-) мРНК в больших количествах была во многих случаях затруднительна. Степень обогащения тестер-специфичными последовательностями ограничена соотношением драйвер:тестер, и за один раунд вычитания произойдет адекватное обогащение только тех молекул, которые редки в (-) популяции и часто представлены в (+) популяции. Последовательности, которые представлены на среднем и низком уровнях, либо же те, содержание которых различается в тестере и драйвере не очень сильно (в единицы раз), оказываются недопредставлены в получающихся вычитенных библиотеках кДНК. Более того, количество кДНК, остающееся после гибридизации, может быть очень мало, что часто создает проблемы при клонировании продуктов ВГ.

Введение в протокол ВГ методики ПЦР сделало ее простой, недорогой и широко используемой техникой. Теперь исследователь мог получать большие количества ДНК тестера и драйвера простым и недорогим способом из ничтожно малого количества исходного материала. Более того, использование ПЦР решило проблему клонирования продуктов вычитания. Поэтому, начиная с 1990г. ПЦР была включена практически во все протоколы вычита-

ния, что сказалось на повышении интереса научного сообщества к данному методу.

ПЦР также предоставила возможность решить ещё одну важную проблему: представлялось невозможным проводить эффективное вычитание редких транскриптов, так как их концентрации были слишком малы и скорость реассоциации в ходе ВГ была для них пренебрежимо малой; поэтому такие транскрипты избегали анализа. Применение ПЦР позволило получать неограниченно большие количества ДНК для гибридизации, что дало возможность детектировать в том числе и редкие транскрипты. Помимо анализа экспрессии генов, начиная с 1991г. ВГ стала использоваться для поиска дифференциальных последовательностей в бактериальных геномах, что является одним из наиболее важных приложений ВГ и поныне: идентификация различий в геномной ДНК между вирулентными и невирулентными штаммами, болезнетворными видами бактерий и безвредными родственными видами, является крайне важной как для создания новых диагностических маркеров, так и для поиска бактериальных генов – мишеней разработки новых лекарств [1].

Однако же, эффективность вычитания геномной ДНК в значительной мере зависит от сложности сравниваемых ДНК, что было показано как экспериментально, так и предсказано исходя из математических моделей вычитающей гибридизации. При размере генома свыше 5×10^8 п.н. (сложность, сравнимая с геномами арабидопсиса и дрозофилы), кинетика гибридизации начинает играть решающую роль, значительно ограничивая обогащение по целевым последовательностям. Геномы млекопитающих слишком сложны, чтобы можно было достичь достаточно высоких скоростей реассоциации, и только значительные различия (такие, как наличие/отсутствие Y хромосомы или протяжённые делеции) могут быть эффективно обнаружены в ходе ВГ. Кинетические параметры гибридизации могут быть улучшены при использовании более длительных сроков гибридизации, более высоких концентраций тестера и драйвера, при повышении соотношения драйвер:тестер, при нали-

чий более длинных фрагментов ДНК в гибридизационных смесях, а также при использовании методов повышения скорости реассоциации - например, эффективными могут быть техника реассоциации в фенольной эмульсии (англ. phenol emulsion reassociation technique - PERT) или техника исключения растворителя (solvent exclusion).

Помимо низкой скорости реассоциации, при сравнении сложных эукариотических ДНК встаёт также проблема геномных повторяющихся элементов (формирующих, например, более 40% ДНК млекопитающих). Повторяющиеся элементы реассоциируют значительно быстрее, чем уникальные геномные последовательности, так что получающиеся дифференциальные библиотеки в значительной мере обогащены по содержанию повторов. Это создаёт серьёзное препятствие для попыток непосредственного сравнения эукариотических геномных ДНК с помощью ВГ. Однако же, как предсказано в некоторых работах, адекватная скорость реассоциации теоретически может быть достигнута и для сложных геномных смесей, при условии использования одноцепочечных тестера и драйвера. К сожалению, после 1996 года, когда эта идея была опубликована, она никогда не осуществлялась на практике для полногеномных сравнений ДНК высших эукариот. Таким образом, проблема слабой применимости ВГ для сложных геномных смесей пока остаётся неразрешённой. Следует отметить, что все вышеуказанные соображения относительно кинетики реассоциации в ходе ВГ являются справедливыми и актуальными также и для всех остальных методов, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот в растворе [1, 6, 12, 15, 16, 18].

7.4. Репрезентативный дифференциальный анализ

В 1994г. Николай Лисицын и коллеги опубликовали новый метод, основанный на ВГ, названный ими «репрезентативный дифференциальный анализ» (RDA), что сделало вычитающую гибридизацию значительно более популярным подходом. Метод RDA широко используется до сих пор. RDA впервые применили для сравнения двух геномов млекопитающих и для клонирования дифференциальных последовательностей. Кинетические ограни-

чения здесь обходятся благодаря случайному упрощению сравниваемых геномных смесей, что достигается либо благодаря использованию НЕ частотных эндонуклеаз рестрикции, либо благодаря эффекту ПЦР селекции (рисунок 7.3) [1, 4, 14, 15,16].

Однако же, техника RDA обладает серьёзным недостатком: в расчет берётся лишь небольшая часть транскриптома/генома, тогда как основная часть (90-98%) не анализируется. RDA не может быть использован для полногеномных сравнений ДНК, так как полученные с использованием этого метода результаты весьма фрагментарны (рисунок 7.3). Другим минусом метода является большое количество фальш-положительных сигналов при сравнении библиотек кДНК. Когда различия в спектре транскриптов малы, будет образовываться лишь небольшое количество дуплексов тестер-тестер, и линейная амплификация гибридов тестер-драйвер может создать серьёзные проблемы при конструировании вычтенных библиотек. RDA применим для поиска последовательностей дифференциальных маркёров для сравниваемых ДНК.

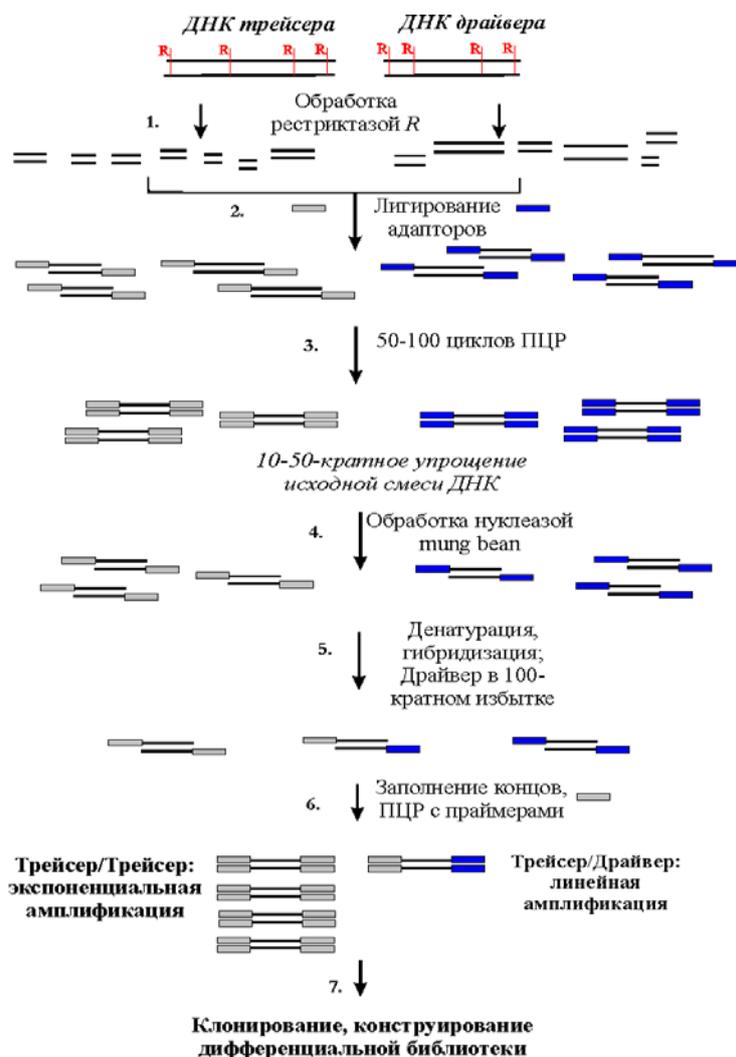


Рисунок 7.3 – Применение метода репрезентативного дифференциального анализа (RDA) для идентификации дифференциальных последовательностей геномной ДНК. Упрощение исходной смеси геномной ДНК происходит за счёт 50-100 циклов ПЦР амплификации на стадии 3.

Одним интересным применением ВГ стала техника поиска полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), названная «RFLP subtraction». Сравнимые образцы геномной ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции и по отдельности разделяли на агарозном геле. Затем для тестера и драйвера вырезались определённые зоны (например, содержащие фрагменты длиной от 100 до 500 п.н.), ДНК элюировали из агарозы и использовали для ВГ. В результате получали ампликоны, обогащённые фрагментами, присутствующими в такой зоне в тестере, но отсутствующие в

аналогичной зоне в драйвере. Техника была эффективна для обнаружения новых ПДРФ, генетических маркёров универсальной применимости.

Этот подход был затем значительно улучшен, когда авторы применили ВГ непосредственно в геле. Оба фрагментированных сравниваемых образца, один (драйвер) – в 100-кратном весовом избытке относительно другого (тестер), наносили на одну и ту же дорожку на геле и разделяли электрофоретически. Гель обрабатывали щелочью для химической денатурации ДНК, а затем нейтрализовали, что позволяло проводить гибридизацию непосредственно в геле. Наконец, гибридизованную ДНК элюировали из геля и амплифицировали с помощью ПЦР для селекции дуплексов тестер-трейчер. Авторам удалось добиться чрезвычайно высоких значений обогащения по дифференциальным последовательностям, близких к теоретически достижимым. Такой успех может быть объяснён высокими локальными концентрациями фрагментов каждого типа в геле, которые были значительно выше, чем при гибридизации в растворе. К сожалению, этот подход, который мог бы стать превосходной альтернативой наиболее востребованным техникам ВГ, а именно RDA и SSH, является чрезвычайно трудоёмким [1, 7, 15, 16].

7.4. Супрессионная вычитающая гибридизация (SSH)

Разработка нового метода, названного «супрессионной вычитающей гибридизацией», англ. «suppression subtractive hybridization, SSH», а также появление на рынке соответствующего кита производства фирмы Clontech в 1996 вызвала революцию в использовании ВГ. Техника стала более производительной, воспроизводимой и простой в исполнении [1].

Основное преимущество SSH над остальными вариантами ВГ – это значительно уменьшенный фон фальш-позитивных клонов. В других методах этот фон вызывается линейной амплификацией гибридов тестер-драйвер, что сводится к минимуму при применении SSH. Другим преимуществом SSH стала возможность одновременной нормализации библиотек кДНК, которая применяется для выравнивания концентраций различных транскриптов, при-

сутствующих в сравниваемых пулах кДНК. Выравнивание, например, необходимо для того, чтобы избежать дискриминации редко представленных транскриптов при вычитании.

Оба преимущества техники SSH базируются на так называемом эффекте «ПЦР супрессии». Приблизительно 40-нуклетидные ГЦ-богатые линкеры (называемые супрессионными адапторами) лигируют к фрагментированной двуцепочечной ДНК. Затем ДНК полимераза достраивает вторую цепь адапторов, так что в результате исходные фрагменты ДНК фланкируются инвертированными ГЦ-богатыми повторами длиной около 40 п.н. Принцип метода заключается в том, что праймеры, комплементарные последовательности супрессионных адапторов, не могут эффективно отжигаться на матрице и инициировать ПЦР сами по себе (рисунок 7.4) благодаря значительно более сильным внутримолекулярным комплементарным взаимодействиям между инвертированными повторами, которые элиминируют сайты, доступные для посадки праймеров в ходе ПЦР. Использование эффекта ПЦР супрессии предотвращает фоновую амплификацию с адаптор-специфических праймеров [1, 15, 16].

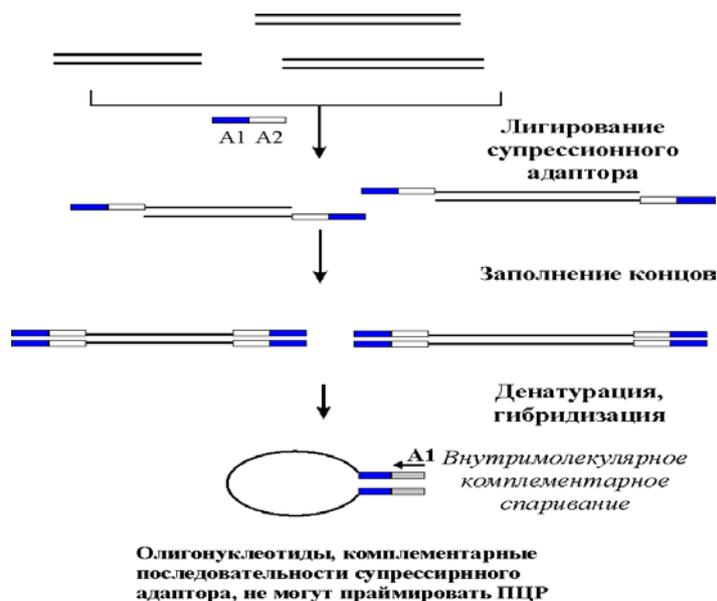


Рисунок 7.4 – Принцип эффекта ПЦР супрессии. GC-богатые инвертированные повторы (супрессионные адапторы) спариваются внутримолекулярно, тем самым мешая отжигу более коротких праймеров, специфичных последовательности адаптора. При этом значительно понижается фоновая амплификация при использовании адаптор-специфических праймеров.

Обычно SSH используется для сравнения транскриптомов, что позволяет создать высококачественные дифференциальные библиотеки кДНК. Частично удалось решить одну из самых основных и общих проблем всех методов анализа кДНК, а именно – проблему потери редко представленных транскриптов в получаемых библиотеках. Метод, разработанный под руководством С.А.Лукьянова для нормализации библиотек кДНК в растворе (рисунок 7.5) позволяет осуществлять простое и эффективное выравнивание концентраций редко- и часто представленных кДНК.

К двум порциям фрагментированной двуцепочечной кДНК лигируются два различных супрессионных адаптора, обе порции отдельно денатурируют и оставляют ренатурировать на короткое время. На этой стадии, друг с другом гибридизуются в основном часто представленные последовательности. Затем обе фракции смешивают и оставляют гибридизоваться, уже на длительное время. Те кДНК, которые не сформировали дуплексы во время первой гибридизации, могут прогибридизоваться теперь. Затем концы гибридизованных кДНК достраиваются ДНК полимеразой и проводится их ПЦР амплификация с праймерами, комплементарными использованным супрессионным адапторам (рисунок 7.5) [1].

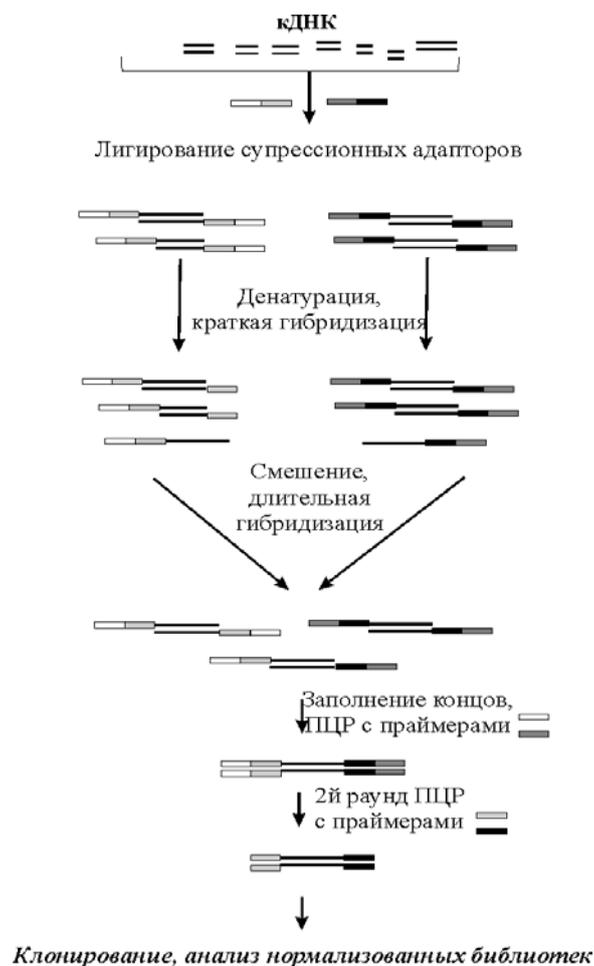


Рисунок 7.5 – Схема нормализации библиотек кДНК с использованием эффекта ПЦР супрессии. Нормализация приводит к выравниванию концентраций часто- и редко-представленных транскриптов, что необходимо для более высокой представительности библиотек кДНК и для некоторых других приложений как секвенирование библиотек EST

В результате, экспоненциально амплифицируются только те дуплексы, которые были сформированы во время второй, а не первой, гибридизации. Ампликон, таким образом, оказывается обогащён репликами редко представленных транскриптов. Такая стратегия является отличной альтернативой гораздо более сложному подходу, основанному на специальном вычитании последовательностей высоко представленных транскриптов из исходных пулов кДНК для обогащения по «редким» кДНК.

Хотя количество фоновых фальш-положительных клонов при использовании SSH, как правило, невелико, было предложено дальнейшее усовершенствование этого метода. При помощи метода, названного «Mirror orientation selection (MOS)» (рисунок 7.6), количество недифференциальных клонов

уменьшается основываясь на наблюдении, что фон, создающийся реассоциацией не-тестер-специфичных молекул, появляясь случайным образом, и каждый из типов таких фоновых дуплексов представлен малым числом молекул относительно «правильных» тестер-специфичных последовательностей.

Поскольку продукты SSH несут адапторные последовательности (рисунок 7.6), фланкирующие ДНК тестера в обеих ориентациях (продукты А и А' на рисунке), то удаление адаптора, денатурация и последующие гибридизация и заполнение концов приведут к появлению фрагментов тестера, фланкированных последовательностью второго адаптора с обоих концов. При помощи ПЦР, такие фрагменты тестера могут быть экспоненциально амплифицированы с использованием одного праймера. При этом фоновые фрагменты теряются, поскольку они появляются в SSH-ампликонах случайно и каждый их вид представлен крайне низкими концентрациями (тогда как количество таких видов фоновых последовательностей может быть огромно), и возможность того, что они сформируют гибриды, несущие адапторную последовательность с обеих сторон, в большинстве случаев пренебрежимо мала (рисунок 6, правая сторона) [1, 18, 20].

MOS применяют для уменьшения фона, создаваемого псевдоселективной амплификацией случайных побочных последовательностей. MOS был признан эффективным как для сравнения кДНК, так и сложных геномных ДНК.

Кроме того, SSH может быть использована в комбинации с дифференциальным дисплеем и микрочиповой гибридизацией. Последний подход представляется весьма перспективным, так как позволяет получать интегральную картину пространственно-временной дифференциальной экспрессии генов. При этом важно заметить, что непосредственное использование гибридизации с микрочипами как правило дискриминирует редкопредставленные транскрипты, тогда как предварительная процедура SSH, особенно со стадией нормализации кДНК, может значительно повысить как чувствительность метода, так и воспроизводимость результатов [15].

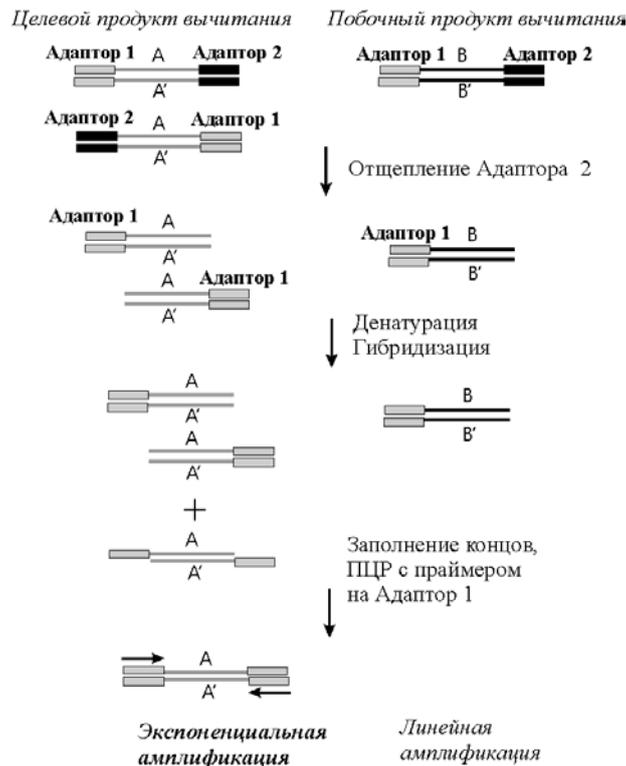


Рисунок 7.6 – Принцип метода mirror oriented selection (MOS).

В ревматологии субстратная гибридизация в модификации SSH используется как скрининговый метод для анализа дифференциально экспрессирующихся генов, например генов синовиальных фибробластов. При этом на первом этапе выделяется poly-A⁺-РНК и подвергается обратной транскрипции с образованием кДНК. При модификации метода может быть использована общая РНК. В качестве тестерной кДНК может быть использована кДНК синовиальных фибробластов, стимулированных TNF α , в качестве референсной кДНК (драйвер) может быть использована кДНК синовиальных фибробластов в отсутствии стимуляции. Общий принцип SSH – гибридизация последовательностей, которые присутствуют в обеих кДНК популяциях. Для вычитающей гибридизации 2 адаптора лигируются с тестерной кДНК. Тестерная кДНК затем смешивается дважды с кДНК референсного образца. Последовательности, которые присутствуют в равных количествах в смесях тестерных и референсных кДНК гибридизуются друг с другом и затем удаляются из смеси.

Дифференциально экспрессируемые гены обогащаются и затем амплифицируются ПЦР. Поскольку вычитающая гибридизация представляет

собой сложный мультистадийный процесс, результаты должны контролироваться на каждой ступени и рекомендуется использование положительных контролей. Поскольку все скрининговые методы несут риск значительного количества ложно положительных результатов, дифференциальная экспрессия должна подтверждаться другими методами [1, 7, 12, 13, 15,16, 20].

7.5 Лазерная микродиссекция и ее применение для анализа экспрессии генов воспаленной синовиальной ткани

При традиционной подготовке проб для молекулярно-генетического анализа в лизирующий раствор помещают кусочки ткани, которые, как правило, включают клетки различных типов. В результате лизат содержит компоненты этих клеток, что затрудняет интерпретацию результатов последующего молекулярного анализа. Эту проблему позволяет преодолеть метод лазерной микродиссекции, который сравнительно недавно стал активно использоваться в молекулярных исследованиях. С его помощью можно выделять и накапливать определенные фрагменты ткани, отдельные клетки и даже субклеточные структуры (органеллы, хромосомы и т.д.). Из таких фрагментов могут быть выделены и в дальнейшем проанализированы с помощью различных методов молекулярной биологии ДНК, РНК. Благодаря своим возможностям метод лазерной микродиссекции находит все более и более широкое применение в таких областях, как онкология (фундаментальные исследования и диагностика), клеточная и молекулярная биология [2].

Хорошо известно, что любая ткань многоклеточного организма гетерогенна, т.е. состоит из различных типов клеток, организованных в определенные компартменты. Эта гетерогенность сильно затрудняет интерпретацию результатов молекулярно-генетического анализа, поскольку при обычной подготовке проб часто неизвестно, какие именно клетки дают те или иные компоненты лизата. Более того, неизвестно, и каков вклад различных типов клеток в общее количество того или иного компонента. Метод лазерной микродиссекции позволяет преодолеть эти трудности.

С помощью лазерной микродиссекции можно выделять с высокой точностью определенные фрагменты ткани, отдельные клетки и даже субклеточные структуры (органеллы, хромосомы и т.д., что обеспечивает чистоту стартового материала для последующего молекулярного анализа. Кроме того, этот метод позволяет осуществлять контролируемое накопление клеточного материала, что дает возможность проводить более точный количественный молекулярный анализ.

Лазерная микродиссекция появилась более тридцати лет назад, но бурное развитие метода началось в середине 90-х годов XX столетия. К настоящему времени лазерная микродиссекция зарекомендовала себя как простой и весьма эффективный метод пробоподготовки молекулярно-генетического и биохимического анализа. Из фрагментов тканей, «вырезанных» с ее помощью, могут быть выделены: геномная ДНК, митохондриальная ДНК, мРНК, белки и даже низкомолекулярные продукты метаболизма. Выделенный материал затем может быть проанализирован с применением различных молекулярно-генетических и биохимических методов, таких как качественная и количественная полимеразная цепная реакция геномной ДНК и кДНК, синтезированной по мРНК; микроаррей-анализ РНК; вестерн-блот анализ белков; протеомный анализ с помощью двумерного гель-электрофореза белков, масс-спектрометрии SELDI-TOF и MALDI-TOF; анализ низкомолекулярных продуктов метаболизма клеток с использованием хромато-масс-спектрометрии.

Таким образом, метод лазерной микродиссекции позволяет установить связь между результатом молекулярно-генетического или биохимического анализа и структурой биологического образца, что делает его весьма востребованным в различных областях биологии, медицины, биотехнологии и биоинженерии. Кроме того, лазерная микродиссекция позволяет вывести молекулярно-генетический и биохимический анализ биологических образцов на уровень отдельных клеток или даже их частей.

В 1996 г. был предложен метод лазерной микродиссекции с автоматизированным захватом фрагментов, который получил название «Laser Capture Microdissection», или «LCM». Именно с этого времени началось бурное развитие и активное использование лазерной микродиссекции. Принцип лазерной микродиссекции с захватом состоит в следующем. Препарат (высушенные срезы ткани или органа, прикрепленные к предметному стеклу) помещают на предметный столик инвертированного микроскопа таким образом, чтобы срезы были обращены к конденсору (рисунок 7.7, а). Под микроскопом на препарате выбирают поле, из которого предполагается вырезать и захватить материал для дальнейшего анализа. В выбранном поле над препаратом с помощью автоматики устанавливают прозрачную тонкую термопластичную мембрану. Затем в выбранные для микродиссекции области со стороны конденсора подают импульсы инфракрасного лазера. Под воздействием инфракрасных импульсов расположенная над препаратом мембрана, расплавляясь, прикрепляется к выбранным для микродиссекции областям. Далее устройство с мембраной убирают от препарата (рисунок 7.7, б). В результате области интереса оказываются захваченными на мембране. Затем выделенный материал подвергают молекулярно-генетическому или биохимическому анализу [2].

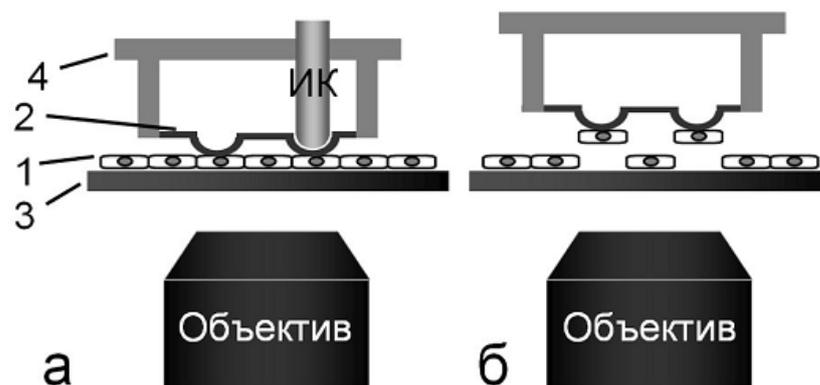


Рисунок 7.7 – Принцип лазерной микродиссекции с захватом при использовании инфракрасного лазера. 1 – срез ткани, 2 – термопластичная мембрана, 3 – предметное стекло, 4 – крышечка центрифужной пробирки. Обозначения: ИК – инфракрасный лазер.

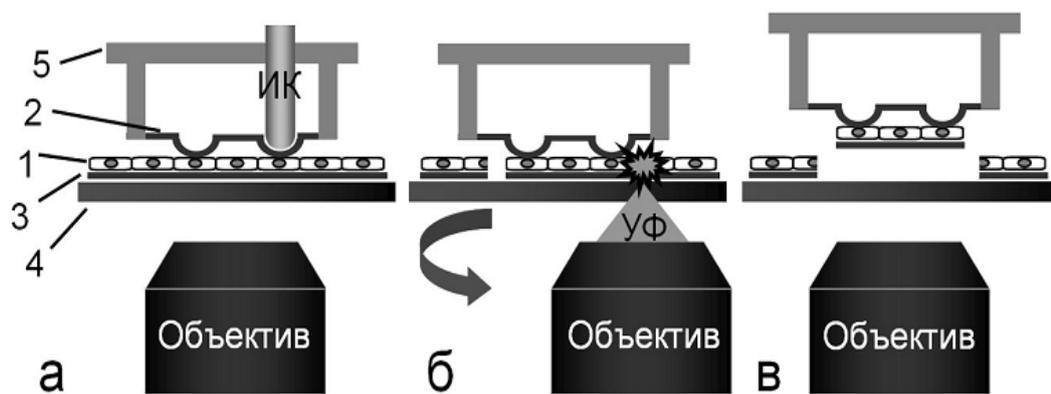


Рисунок 7.8 – Принцип лазерной микродиссекции с захватом при использовании ультрафиолетового и инфракрасного лазера. 1 – срез ткани, 2 – термопластичная мембрана, 3 – мембрана на основе полиэтилена, 4 – предметное стекло, 5 – крышечка centrifужной пробирки.

Технология была усовершенствована введением в систему импульсного ультрафиолетового лазера (рисунок 7.8). Это позволило работать со срезами, прикрепленными к мембранам на основе полиэтилена. В результате больше нет необходимости инфракрасным лазером плавить термопластичную мембрану по всей площади выбранной для захвата области. Достаточно сделать только несколько точек прикрепления (рисунок 7.8, а), а затем отрезать выбранную область помощью ультрафиолетового лазера (рисунок 8, б), фокусируемого на препарате через объектив, и изъять вырезанный фрагмент (рисунок 7.8, в). Это позволило увеличить производительность системы, т.е. скорость накопления фрагментов ткани [2, 15, 16].

Наиболее часто лазерная микродиссекция применяется для выделения и накопления определенных фрагментов из окрашенных или неокрашенных срезов органа или ткани как животных, так и растений, которые невозможно выделить никакими иными методами препарирования. Так, например, с использованием лазерной микродиссекции проводили анализ различий в уровне экспрессии генов в нейронах в различных полях гиппокампа в норме и при гипоксии, оценивали долю делетированной митохондриальной ДНК в различных структурах слуховой улитки у пожилых людей с прогрессирующей старческой глухотой.

С помощью лазерной микродиссекции отделяют опухолевую ткань от нормальной или же вырезают различные компоненты опухолей из биопсийного материала. Из вырезанных фрагментов затем выделяют ДНК, РНК и белки. Такой подход является очень удобным в изучении опухолевых тканей с целью определения потери гетерозиготности, анализа изменений в экспрессии генов, связанных с развитием опухоли, а также поиска белковых маркеров опухолевого роста.

Лазерная микродиссекция применяется для вырезания отдельных клеток из срезов тканей. Это позволяет проводить анализ ДНК и РНК, выделенных из одиночных клеток. Так, например, было продемонстрировано, что в отдельных кератиноцитах кожи человека происходят спонтанные мутации в гене, кодирующем белок р53, даже несмотря на полное исключение попадания солнечного излучения. Метод лазерной микродиссекции позволяет делать накопление определенного количества биоматериала и даже определенного количества отдельных клеток из ткани. Это дает возможность проводить количественные и сравнительные молекулярные исследования.

7.6 Генотипирование синовиальных фибробластов, кДНК-анализ в комбинации с RAP-ПЦР

Синовиальные фибробласты (СФ) играют ключевую роль в воспалении и деструкции хряща при ревматоидном артрите (РА). Поэтому их генотипирование представляет собой важную задачу в целях совершенствования терапии РА. Данный анализ может включать сравнение СФ от пациентов с РА, которые еще не проходили лечения по поводу РА, и пациентов, которые проходят лечение по поводу РА. Изучение экспрессии генов СФ может помочь в оценке, какие гены и внутриклеточные процессы могут модулироваться через генетическое модифицирование, перенос генов и использование различных лекарственных препаратов.

Для изучения экспрессии генов фибробластов одна из методик, которая применялась исследователями, - ПЦР с произвольно выбранными прай-

мерами (RAP-PCR). РНК выделялась из культивированных СФ, анализировалась RAP-PCR с разными произвольными праймерами для формирования первой и второй цепей, а также меченой пробы, которая может быть использована в анализе кДНК гибридизации. Методика пригодна и обладает высокой чувствительностью и специфичностью для исследования малых количеств мРНК. При этом возможно проводить скрининг многих генов в одном эксперименте [15].

7.7 Комбинация реал-тайм ПЦР с реакцией обратной транскрипции для оценки экспрессии генов

Оценка экспрессии генов металлопротеиназ суставного хряща может предоставить ряд информации о патогенезе ревматологических болезней. Хрящ – плотная малоклеточная ткань, включающая хондроциты, вставленные в массу хряща. Данные клетки ответственны за поддержание структуры экстрацеллюлярного матрикса и могут участвовать в процессе деградации матрикса при артритах. Изменение продукции и секреции металлопротеиназ матрикса (MMPs) является наиболее важным механизмом, посредством которого хондроциты участвуют в деградации матрикса. Две «желатиназы», желатиназа А MMP-2 и желатиназа В MMP-9, идентифицированы в ткани хряща. Изначально было показано, что они участвуют в цикле утилизации денатурированного коллагена, но ряд исследований подтвердил, что как и другие MMPs, они вовлечены в мобилизацию ростовых факторов и в модуляцию активности хемокинов.

Оценка количества желатиназ, ассоциированных с хрящевой тканью, зависит от того факта, что они секретируются хондроцитами во внеклеточный матрикс. В ткани они могут быть как в изолированном состоянии во внеклеточном матриксе, так и поглощены клетками путем эндоцитоза в активном или нет состоянии. Так как они секретируются в форме проферментов, степень их активации определяет их участие в развитии поражений су-

ставного хряща. Они также выступают субстратом тканевых ингибиторов металлопротеиназ, TIMPs, которые секретируются теми же клетками [16].

TIMPs представляют собой белки с молекулярной массой 22-30 kDa, которые ингибируют MMPs, формируя комплекс 1:1 с MMP. У позвоночных присутствуют 4 структурных гомолога TIMPs. Для TIMP-1 изначально была показана функция ингибитора коллагеназ, но затем было показано, что TIMP-1 ингибирует практически все MMPs, за исключением некоторых мембрано-ассоциированных MMPs. Аналогично и в отношении других гомологов TIMPs.

мРНК выделялась из нормального и пораженного остеоартритом хряща. Исследование проводилось с использованием ОТ и Реал-тайм ПЦР для определения экспрессии генов металлопротеиназ и их ингибиторов. Было показано, что MMP-2 и MMP-9 активируются в пораженной ткани в сравнении с нормой. Экспрессия генов TIMPs была различной.

С помощью метода реал-тайм ПЦР были изучены клеточные и молекулярные механизмы разрушения суставного хряща при остеоартрозе. В качестве объекта исследования была использована суммарная РНК хряща. Суммарную РНК выделяли из эксплантатов хрящей больных ОА после их культивирования в течение 6-48 часов, используя раствор D по стандартной методике. Дальнейшую очистку РНК проводили, используя набор RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя. В реакции обратной транскрипции использовали Super-Script ТМШН ОТ и суммарную РНК хряща. Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя (Invitrogen). В работе использовали олигонуклеотидные последовательности праймеров для амплификации 27 генов. ПЦР проводили, используя AmpliTaq ДНК-полимеразу в соответствии с рекомендациями производителя (Perkin Elmer).

Количественный анализ экспрессии генов проводили посредством ПЦР в режиме реального времени. Праймеры и зонды для TaqMan анализа образцов хряща изготавливали на заказ (Applied Biosystems). Количествен-

ный анализ уровня экспрессии мРНК проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени 7500 в соответствии с рекомендациями изготовителя (Applied Biosystems).

Относительную экспрессию мРНК рассчитывали с использованием метода вторичной производной (ddCT) в соответствии с рекомендациями производителя (Applied Biosystems) [3].

Были получены следующие результаты:

1. При воздействии неблагоприятных факторов хондроциты суставного хряща способны возобновить процесс дифференцировки, сходный с таковым у фетальных хондроцитов ростковой пластинки, одним из аспектов которой является резорбция хрящевого матрикса. При этом именно эти процессы постэмбриональной дифференцировки суставных хондроцитов лежат в основе начальных процессов разрушения суставного хряща при остеоартрозе.

2. В ходе дифференцировки хондроцитов в ростковой пластинке наблюдается экспрессия разных групп генов: в верхней пролиферативной зоне усиливается экспрессия маркера пролиферации циклина B2, ростовых факторов, таких как трансформирующего ростового фактора бета 2 (TGF β 2), белка, родственного паратироидному гормону (PTHrP), ростового фактора фибробластов 2 (FGF-2), а также протеиназ внеклеточного матрикса MMP-13, -3, MT1-MMP, катепсина K и их тканевых ингибиторов TIMP-1, -2, -3; структурных компонентов матрикса коллагенов 2 и 6 типов, аггрекана, гиалуронана (о последнем судили по уровню экспрессии гиалуронан синтазы 2 (HAS-2), декорина, фибромодулина, каспазы 3 и специфического транскрипционного фактора коллагена 2 типа (Sox 9).

3. В нижней пролиферативной зоне возрастает уровень экспрессии специфического транскрипционного фактора остеобластов Cbfa1, а также Sox 9, желатиназы MMP-9, тканевых ингибиторов металлопротеиназ - TIMP-1 и -2, структурных компонентов матрикса коллагена 2 и 6 типов и фибромодулина.

4. В гипертрофной зоне экспрессируются маркер гипертрофии - коллаген 10 типа (COL10A1), каспаза 3 и ростовые факторы TGF β 1 и Ihh, которые не экспрессировались в пролиферативной зоне, а также происходит повышение экспрессии большинства ранее перечисленных генов протеиназ, их тканевых ингибиторов и структурных компонентов матрикса, за исключением PTHrP, FGF-2, коллагена 6 типа и декорина, наивысший уровень экспрессии которых наблюдался в верхней пролиферативной зоне ростковой пластинки.

5. Предикторами развития ОА-подобных изменений являются экспрессия факторов роста, связанных с зоной пролиферации хондроцитов ростковой пластинки, а именно PTHrP, FGF-2, TGF β 1/2, а также макромолекул матрикса COL2A1 и аггрекана как на соседних с повреждениями участках, так и на значительном расстоянии от центра повреждения.

6. При ОА-подобных повреждениях хряща, происходит повышение активности расщепления коллагена 2 типа, сопровождающееся повышением экспрессии коллагеназ MMP-1, -14 (MT1-MMP), аггреканазы ADAMTS-5; цитокинов интерлейкинов-1(IL-1) α / β и фактора некроза опухолей (TNF) α ; а также увеличением экспрессии генов, связанных с гипертрофией хондроцитов COL10A1, MMP-13, MMP-9, Ihh и каспазы 3 непосредственной близости от повреждений. Каспаза 3 и ADAMTS-5 экспрессируются исключительно в центре повреждения хрящевой ткани.

7. Усиление расщепления коллагена в локусах образования ранних повреждений хряща сопровождается не только усилением экспрессии генов, ответственных за разрушение матрикса, но и генов, связанных с конечной дифференцировкой хондроцитов в ростковой пластинке. Поэтому дифференцировка хондроцитов является ранним событием, связанным с повреждением хряща, которое происходит при ОА.

8. На неповрежденных участках хряща не наблюдается ни усиленного расщепления коллагена, ни избыточной экспрессии генов, связанных с различными фазами дифференцировки хондроцитов ростковой пластинки.

9. Совместным воздействием ростовых факторов, а именно TGFβ2, FGF-2 и инсулином, активность разрушения коллагена значительно ингибируется в эксплантатах суставного хряща больных ОА. TGFβ2 наиболее эффективно предотвращает разрушение хряща. В суставных хондроцитах хрящей больных ОА подавление избыточного расщепления коллагена этими ростовыми факторами как в комбинации, так и исключительно TGFβ2 сопровождается уменьшением экспрессии генов, связанных с гипертрофией хондроцитов, а также увеличением экспрессии простагландин Е синтазы (PGES-1) и освобождением в среду простагландина E2 (PGE2).

10. PGE2 при низкой концентрации также способен значительно подавлять расщепление коллагена, уменьшая при этом экспрессию MMP-13, MMP-1, цитокинов и маркера гипертрофии хондроцитов COL10A1. Тот факт, что напроксен, неспецифический ингибитор циклооксигеназы (COX) -1 и -2, способен противодействовать влиянию TGFβ2 в подавлении расщепления коллагена, свидетельствует о том, что PGE2 опосредует действие этого ростового фактора. PGE2 в концентрации значительно меньшей, чем при воспалительном процессе, обладает хондропротективными свойствами, селективно подавляя расщепление коллагена и функционально связанную с ним гипертрофию суставных хондроцитов в хряще больных ОА.

11. Дифференцировка хондроцитов предшествует разрушению коллагена в нормальном хряще при воздействии агентов, способных стимулировать коллагеназную активность. Одним из таких агентов является обнаруженный нами пептид коллагена 2 типа - CB12-2. Пептид CB12-2 присутствует в значительных концентрациях в хряще больных ОА и обладает способностью увеличивать активность расщепления коллагена 2 типа коллагеназой.

12. В здоровом суставном хряще расщеплению коллагена в присутствии CB12-2 предшествует увеличение пролиферативной активности хондроцитов, с последующей экспрессией генов терминальной дифференцировки хондроцитов и увеличением числа апоптозных клеток. Подавление экспрессии гипертрофного фенотипа суставных хондроцитов ростовыми факто-

рами в сочетании с СВ12-2 предотвращает избыточное расщепление коллагена и ингибирует экспрессию протеиназ, цитокинов и белков, сопряженных с гипертрофией хондроцитов [3].

7.8 Профиль генной экспрессии в ревматологии

Ревматические заболевания представляют собой разнородную группу болезней, при которых поражается опорно-двигательная система. Как правило, причина этих расстройств неизвестна и их патогенез мало понятен. Хотя эти заболевания затрагивают суставы, они также имеют много системных проявлений. Например, ревматоидный артрит (РА) является хроническим воспалительным заболеванием, которое - в дополнение к его системным проявлениям - в первую очередь влияет на суставы. С другой стороны, системная красная волчанка (SLE) является типичным системным заболеванием с вторичным поражением множественных органов [19].

Этиология ревматических заболеваний в значительной степени неизвестна. Клинические и лабораторные наблюдения показывают наличие иммунной атаки, направленной против аутоантигенов при ряде данных заболеваний. Это подтверждается связью между многими ревматическими болезнями и наличием определенного гаплотипа по HLA, и экспрессией аутоантител, таких как антитела против ядерных компонентов при СКВ, синдроме Шегрена (SS) и системной склеродермии (SSc), ревматоидного фактора (RF) и антител к анти-цитруллинированному белку (ACPAs) при РА. То, что патогенез этих заболеваний имеет иммунную природу, подтверждается эффектом улучшения состояния больного после проведения иммуносупрессивной терапии [5, 13, 19].

Большинство ревматических заболеваний являются гетерогенными заболеваниями с клиническим спектром, который колеблется от легких до тяжелых форм, и вариабельностью вторичного вовлечения систем органов (например, сердечная недостаточность). Гетерогенность природы ревматических заболеваний находит свое отражение в изменчивости ответа практиче-

ски на все методы лечения. Гетерогенность, вероятно, берет свое начало в мультифакторном характере заболеваний, когда вполне вероятно, что определенные комбинации факторов окружающей среды и различный полигенный фон влияют не только на восприимчивость к заболеванию, но и на тяжесть и исход заболевания. Понимание молекулярно-генетической комплексности и сложности этих нарушений является неполным, и критериев формирования подгрупп пациентов (например, для того, чтобы выбрать тех пациентов, для которых тот или иной вид лечения эффективен) в настоящее время не хватает [13, 19].

Воспалительные ревматические заболевания включают в себе ряд диагностических сложностей для современной медицины. Особенно на ранних стадиях обычно отсутствуют патогномоничные маркеры, такие как различные клинические особенности, специфические морфологические изменения или типичные серологические маркеры. Как и в онкологии, ранняя диагностика необходима во избежание деструктивных процессов, которые могут привести к значительному ухудшению качества жизни, ранней инвалидности и преждевременной смерти. В связи с ограничениями в клинической ревматологии, высоки ожидания в отношении генных исследований. Изучение экспрессии генов открыло новые возможности. Вместо одного или несколько генов-кандидатов, десятки тысяч различных генов могут быть исследованы в небольшой промежуток времени. Эта технология в настоящее время наиболее передовая и всеобъемлющая для скрининга активности генов, изучения молекулярных сетей и уже широко используется в клинических исследованиях при ревматических заболеваниях. Кроме того, изучение мутаций в генах, предрасполагающих к ревматическим заболеваниям, может помочь в диагностике и прогнозе заболевания. Клинические вопросы и ожидания сосредоточены на исследовании молекулярных маркеров и профиля экспрессии генов для первоначального диагноза. Ранняя диагностика, как уже упоминалось, является критическим вопросом для ревматологии, профили экспрессии ге-

нов в этой начальной стадии заболевания могут обеспечить важную информацию о пусковых механизмах патологического процесса [17, 19].

Обзор геномных исследований при ревматических заболеваниях представлен в таблице 7.4.

Таблица 7.4 - Генные исследования при ревматических заболеваниях

Заболевание	Ткань	Количество образцов	Кол-во генов в исследовании	Сравнение	Результаты
РА	Синовиальная оболочка	13 РА	16,164	Различные образцы от одного пациента и образцы из одинаковых зон поражения у различных пациентов	Различие в генной экспрессии у разных пациентов более значительно, чем различия в генной экспрессии в биопсийных образцах, взятых из различных зон сустава одного пациента
РА	Синовиальная оболочка	5 РА и 10 ОА	5,760	РА и ОА	Разная экспрессия генов при РА и ОА
РА	Синовиальная оболочка	21 РА и 9 ОА	11,500 и 18,000	Изучение гетерогенности РА, РА и ОА	Подтверждение существования разных путей тканевой деструкции и восстановления
РА	Синовиальная оболочка	12 ранних форм РА и 4 поздние формы РА	23,040	Ранний и прогрессирующий РА	Ранний РА разделен на 2 группы на основании разницы в генной экспрессии, критичной для пролиферативного воспаления
РА	Синовиальная оболочка	10 РА	30,000 cDNA образцов	До терапии инфликсимабом и через 9 недель после окон-	Изменения в экспрессии генов у пациентов с хорошим ответом на терапию инфликсимабом

				чания те- рапии	
RA	Синови- альная оболочка	18 RA	18,000	Пациенты, отвечаю- щие на те- рапию ин- фликсима- бом и па- циенты, у которых нет ответа на терапию инфликси- мабом	Пациенты с высокой экспрес- сией генов, вовлеченных в воспалительную реакцию, более склонны к положитель- ному эффекту от терапии ин- фликсимабом
RA	Синови- альная оболочка	12 RA	11,500 и 18,000	Гетероген- ность RA	Идентификация ИЛ-7 сиг- нального пути в тканях, ха- рактеризующихся лимфоид- ным неогенезом
RA	Сино- виоциты подоб- ные фиб- фиб- робла- стам	19 RA	18,000	Гетероген- ность RA	Гетерогенность синовиальной ткани
RA	Сино- виоциты подоб- ные фиб- фиб- робла- стам	2 RA	12,600	Интактные и TNF- α или IL-1 β 4- стимулиро- ванные в течение часа клетки	Идентификация генов- регуляторов TNF- α и IL-1 β в синовиоцитах, подобных фибробластам, при RA
RA	Сино- виоциты подоб- ные фиб- фиб-	5 RA и 5 кон- троли	588	RA и кон- троли	Повышение экспрессии ге- нов, ответственных за опухо- леподобный рост синовиоцитов, подобных фибробластам, при RA

	робла- стам				
RA	Цельная кровь	35 RA и 15 контроли	18,000	Гетероген- ность RA, RA и контроли	Определение назначения ИФ тип I сигнального пути в субгруппе пациентов
RA	PBMC	19	4,300	Ранний и прогресси- рующий RA	Генный профиль экспрессии при ранних стадиях заболева- ния перекрывается с ответом на вирус
RA	PBMC	29 RA и 21 контроли	12,626	RA и кон- троли	Моноцит ассоциированная генная экспрессия усиливает- ся при RA
RA	PBMC	33	10,000	До терапии инфликси- мабом и через 3 ме- сяца после окончания терапии	Генная экспрессия коррели- рует с ответственностью на ле- карство
RA	PBMC	8 RF ⁺ , 6 RF ⁻ и 7 контроли	10,000	RF ⁺ и RF ⁻ и контроли	Нет разницы в генной экс- прессии при RF ⁺ и RF ⁻ RA. Повышенная экспрессия генов, продукты которых участвуют в иммун- ном воспалении, особенно ре- гулирующих фагоцитоз, при RA.
RA	PBMC	19	18,500	До терапии этанерцеп- том и через 72 часа по- сле окон- чания те- рапии	Выявлены генные пары и триплеты, которые определя- ют ответ на лечение в ранние периоды терапии
RA	В- клетки	8 RA и 8 кон- троли	21,329	RA и кон- троли	Многогранность дисрегуля- ции В-клеточной биологии при RA.
SSc	Биоп- сийный	24 SSc и 6 контроли	33,000	Гетероген- ность SSc,	Ассоциация 177 генов с тяже- стью поражения кожи при

	материал кожи			SSc и контроли	диффузной SSc
SSc	Фибробласты кожи	15 SSc близнецов и 5 контроли	16,659	SSc с повреждением кожи и без, исследование близнецов, сравнение с контролем	На молекулярном уровне конкордантность фенотипа SSc фибробластов высока в группе монозиготных близнецов и гораздо выше, чем в группе дизиготных близнецов.
SSc	Неповрежденные фибробласты кожи	21 SSc и 18 контроли	16,659	SSc с повреждением кожи и без, сравнение с контролем	Фибробласты неповрежденных участков при SSc обнаруживают аномалии в различных клеточных процессах, включая формирование экстрацеллюлярного матрикса, фибрилlogenезе, ангиогенезе и активации комплемента
SSc	PBMC	18 SSc и 18 контроли	16,659	SSc и контроли	Дифференциальная регуляция экспрессии генов, вовлеченных в ФНО цикл и поражение сосудов
SSc	PBMC	9 ранняя диффузная SSc и 4 контроли	38,500	SSc и контроли	Экспрессия тип I ИФ индуцируемого Siglec-1 повышена на циркулирующих SSc CD14 ⁺ моноцитах
SS	Малые слюнные железы	10 SS и 10 контроли	6,803	SS и контроли	Повышенная экспрессия генов, вовлеченных в хроническое воспаление и тип I ИФ путь
SS	Малые слюнные железы	7 SS и 7 контроли	7,261	SS и контроли	Активация ИФ пути при SS
SS	Слюна	10 SS и 8 контроли	38,500	SS и контроли	Активация ИФ пути при SS
SLE	Сино-	6 SLE, 7 RA	38,500	SLE и RA и	Повышение активность ИФ-

	виаль- ная оболоч- ка	и 6 ОА		ОА	индуцируемых генов и сни- жение активности генов, во- влеченных в обеспечение го- меостаза экстрацеллюлярного матрикса при SLE
SLE	Почеч- ные клубоч- ки	12 SLE и 4 контроли	3,602 и 4,030	SLE и кон- троли, ге- тероге- ность SLE	Характеристика молекуляр- ных основ гетерогенности па- тогенеза люпус нефрита
Pediatric SLE	PBMC	30 SLE, 12 JCA и 9 контроли	12,626	SLE и JCA, сравнение с контролем	Повышение образования гра- нулоцит специфичных тран- скриптов
SLE	PBMC	48 SLE и 42 контроли	10,260	Гетероген- ность SLE, SLE и кон- троли	Половина пациентов обнару- живали дисрегуляцию экс- прессии генов ИФ пути, ассо- циированную с более тяже- лым течением заболевания
SLE	Цельная кровь	269 пациен- тов	256	Гетероген- ность SLE	Деление SLE пациентов на 2 группы на основании высокой или низкой экспрессии ИФ. Активность заболевания кор- релирует с высокой экспрес- сией ИФ
Pediatric SoJIA	PBMC	44 SoJIA, 94 инфицирован- ные пациен- ты, 38 SLE, 6 PAPA и 39 контроли	17,454	SoJIA и контроли	SoJIA специфичный генный профиль включает 88 генов. Транскрипционный профиль клеток крови в системную фазу SoJIA схож с таковым пациентов с инфекциями, чем пациентов с поздней фазой заболевания
Pediatric SoJIA	PBMC	8 непроле- ченных, 5 пролеченных инфликсима- бом SoJIA	17,454	Пролечен- ные и непроле- ченные пациенты	Повышенная экспрессия тип I ИФ регулируемых генов у anti- ФНО пролеченных SoJIA пациентов, что позволяет предположить наличие кросс- регуляции между ФНО и тип I ИФ
Аутоимм	PBMC	20 RA, 24	4,329	Различные	Изменение генной экспрессии

унные заболева ния		SLE, 5 паци- ентов с диа- бетом I-го типа, 4 MS и 9 контроли		аутоим- мунные за- болевания	при RA, SLE, диабете I-го ти- па и MS, что отличается от нормы
RA, SLE	Цельная кровь	6 контроли , 4 RA, 4 SLE и 5 род- ственники	4,000	RA и SLE и контроли, исследова- ние семей	Возможное изменение генной экспрессии у родственников, отсутствие поражений у род- ственников первого поколе- ния

Примечания: OA, остеоартрит (osteoarthritis); JCA, ювенильный хронический артрит (juvenile chronic arthritis); MS, множественный склероз (multiple sclerosis); PAPA syndrome, семейное аутоиммунное заболевание, (a familial autoinflammatory disease that causes pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne); PBMC, мононуклеары периферической крови (peripheral blood mononuclear cell); RA, ревматоидный артрит (rheumatoid arthritis); RF, ревматоидный фактор (rheumatoid factor); SLE, системная красная волчанка (systemic lupus erythematosus); SoJIA, системный ювенильный идеопатический артрит (systemic onset juvenile idiopathic arthritis); SS, синдром Шегрена (Sjögren's syndrome); SSc, склеродермия (scleroderma)

В последние годы анализ генной экспрессии перешел от исследования единичных генов к одновременному исследованию экспрессии множества генов различных клеток и тканей. Разработка современных технологий, таких как микроанализ, позволила решать задачу оценки экспрессии генов для различных образцов тканей. Анализируя экспрессию генов при различных состояниях индивидов, мы, таким образом, создаем профиль генной экспрессии, который характеризует динамическое функционирование генома при тех или иных патофизиологических условиях. Этот метод также позволяет разделить группу пациентов, которые страдают сложным гетерогенным заболеванием, на более гомогенные субгруппы. Подобные исследования позволяют идентифицировать биологические процессы, которые включают новые гены с неизвестной функцией или гены, которые ранее не были известны как вовлеченные в тот или иной биологический процесс. Подход составления профиля генной экспрессии методом микроанализа был применен исследователями для изучения гетерогенности группы пациентов с RA на уровне генной экспрессии [19].

Экспрессия генов в специфически пораженных тканях

Одни из первых исследований экспрессии генов при ревматических болезнях осуществлялись при использовании в качестве биологического материала биопсийный материал больных RA, применялась комбинация субстратной гибридизации и кДНК анализа. Исследование идентифицировало в синовиальной оболочке при RA в сравнении с синовиальной оболочкой в норме повышенную экспрессию генов, вовлеченных в хроническое воспаление, таких как гены иммуноглобулинов, HLA-DR. Но объемы основной и контрольной выборок были невелики, что пока не позволяло установить гетерогенность RA [19, 20].

Сравнительный анализ синовиальной биопсийной ткани пациентов с RA, OA и SLE частично подтвердил предварительные наблюдения того, что отдельные нозологические формы характеризуются отдельным профилем генной экспрессии. Тогда как при RA гены, вовлеченные в T- и B-клеточную регуляцию демонстрировали повышенную экспрессию, при SLE ИФ-индуцируемые гены экспрессировались в еще большей степени, а экспрессия генов, продукты которых участвуют в поддержании гомеостаза внеклеточного матрикса, была снижена. Гистологический анализ подтвердил, что при RA синовиальная оболочка характеризовалась повышенной инфильтрацией T- и B-клетками в сравнении с OA и SLE [19, 20].

Молекулярные маркеры гетерогенности ревматических заболеваний

Lindberg и коллеги изучали вариабельность в уровнях генной экспрессии у одного пациентов и у различных пациентов. Исследование продемонстрировало, что различие в генной экспрессии в одном определенном фрагменте биопсийного материала у разных пациентов более значительно, чем различия в генной экспрессии в биопсийных образцах, взятых из различных зон сустава одного пациента

Определение генной экспрессии большого спектра генов синовиальной ткани у больных эрозивным RA выявило значительную гетерогенность между различными пациентами.

При этом было выделено как минимум 2 молекулярно явные формы RA ткани. Одна субгруппа тканей характеризовалась повышенной экспрессией генов, которые обеспечивают активное иммунное воспаление с высокой продукцией иммуноглобулинов. Данная субгруппа была характерна для RA с активным воспалением. Повышенная экспрессия генов иммуноглобулинов явилась основным дифференцировочным фактором между тканями с высоким и низким уровнями воспалительной реакции. Дальнейший анализ генов, вовлеченных в обеспечение интенсивного воспаления, показал значимую роль генов ИФ- и STAT сигнальных путей. Сравнимая экспрессия наблюдалась для генов *TIMP2*, *PDGFRA*, *GBP1*, *Fos*, *CTSL*, *TUBB* и *BHLHB2*. Известно, что 2 из данных генов (*GBP1* и *CTSL*) регулируются ИФ I-го типа [13].

Профиль экспрессии генов RA тканей второй субгруппы напоминал таковой для тканей пациентов с ОА. Данный профиль характеризовался низкой экспрессией генов, продукты которых участвуют в иммунном воспалении, и повышенной экспрессией генов, вовлеченных в ремоделирование ткани, которое ассоциировано с дифференцировкой фибробластов. В отличие от тканей с интенсивным воспалением в данных тканях повышен уровень экспрессии генов металлопротеиназ MMP11 и MMP13, снижен уровень экспрессии генов MMP1 и MMP3 [13, 19].

Гистологический анализ выявил, что разница в генной экспрессии между различными группами пациентов связана с разницей в распределении клеток. Ткани, содержащие зародышевые центр-подобные структуры, селективно обнаруживались среди тканей с высоким уровнем воспаления. Повышенная экспрессия генов иммуноглобулинов соответствовала присутствию В-клеток и/или плазматических клеток, что может характеризовать локальную продукцию антител. Повышенное количество транскриптов иммуноглобулинов обнаруживалось и в тканях пациентов с такими ревматическими болезнями, как SLE, SS и SSc .

Зародышевые центр-содержащие ткани при RA также демонстрировали повышенную экспрессию лиганда-12 С-Х-С хемокинов и лиганда-19 С-С

хемокинов, а также С-Х-С хемокинового рецептора-4 и С-Х-С хемокинового рецептора-5, которые участвуют в привлечении Т-, В- и дендритных клеток. Анализ сигнальных путей выявил повышенную экспрессию генов, вовлеченных в Janus kinase/STAT путь передачи сигнала, а также в Т- и В-клеточные сигнальные пути, Fc рецептор тип I сигнальный путь в тучных клетках, и ИЛ-7 трансдукцию сигнала в тканях с эктопическими лимфоидными фолликулами, в дополнение к этим данным была повышена экспрессия α и γ цепей ИЛ-7 рецептора и самого ИЛ-7. Результаты исследований показывают, что активация ИЛ-7 пути может играть важную роль в лимфоидном неогенезе, аналогично его роли в развитии нормальной лимфоидной ткани. Ткани с диффузным типом инфильтрата характеризовались профилем экспрессии, отражающим репрессию ангиогенеза и повышенное образование компонентов экстрацеллюлярного матрикса [13, 19, 20].

Tsubaki и коллеги показали, что тканевая гетерогенность при РА может уже наблюдаться при ранней фазе РА. Исследовалась генная экспрессия в синовиальной ткани пациентов с ранним РА (продолжительность < 1 года после постановки диагноза) и продолжительным РА (продолжительность > 3 после постановки диагноза). Как и в предыдущем эксперименте, когда исследовались биоптаты от пациентов с продолжительным РА, пациенты с ранним РА также могут быть разделены на 2 различные группы на основании профиля генной экспрессии.

Исследование, в котором материалом послужила ткань малых слюнных желез 10 пациентов с первичным SS и 10 здоровых индивидов, идентифицировало 200 генов, которые экспрессировались по-разному. Была идентифицирована повышенная экспрессия ИФ-индуцируемых генов (*ISGF3G*, *IFIT3*, *GIP2* и *IRF1*), повышенная экспрессия генов, связанных с созреванием лимфоцитов и их активацией, процессингом антигенов и передачей сигнала. Повышенная экспрессия ИФ-регулируемых генов имела место в образцах кожи SSc пациентов. Также Milano и коллеги описали различные профили

генной экспрессии в образцах кожи, в соответствии с которыми пациенты были разделены на группы с диффузным SSc и локализованным SSc.

Две основные субгруппы люпус нефрит биоптатов были идентифицированы на основании кластерного анализа генов. Одна из субгрупп пациентов характеризовалась повышенной экспрессией генов, связанных с фиброзом и отсутствием изменений в экспрессии генов ИФ-сигнального пути. Другая субгруппа характеризовалась повышенной экспрессией генов ИФ-сигнального пути, но низкой экспрессией генов фиброзного кластера. Клинически группы отличались незначительно, хотя для субгруппы с повышенной экспрессией генов фиброза были характерны более высокие значения индекса воспаление (острое, обратимое повреждение)/хронизация (необратимое повреждение), тогда как группа с повышенной экспрессией генов ИФ-сигнального пути характеризовалась более низкими значениями индекса воспаление/хронизация. Полученные данные могут обеспечить молекулярное и биологическое обоснование тяжести поражения почек.

Исследование гетерогенности молекулярного профиля ревматических заболеваний позволило улучшить понимания патогенеза тех или иных нозологических форм. В частности, изменение профиля экспрессии генов ИФ-сигнального пути имело место при RA, SLE, SS и SSc, что значимо при анализе тяжести заболевания и выборе тактики терапии, для категоризации пациентов с ревматическими заболеваниями [13, 19].

Экспрессия генов в мезенхимальных клетках, полученных из поврежденных тканей

Фибробласты являются повсеместно распространенными мезенхимальными клетками, которые играют важную роль в развитии органа, воспалении, заживлении ран, фиброзе и патологии. При хроническом воспалении, фибробласты считаются дозорными клетками, которые способствуют миграции лейкоцитов и развитию местного иммунного ответа посредством продукции различных иммуномодуляторов. Эти наблюдения позволяют предпо-

ложить, что фибробласты могут приобретать способность модулировать иммунный ответ [10, 19].

Синовиоциты, подобные фибробластам (FLSs), основные участники повреждения сустава при РА. Одно из первых исследований по определению профиля экспрессии генов FLSs выявило повышенную экспрессию генов, ответственных за опухолеподобный рост ревматоидной синовиальной ткани. В данном исследовании применялся кДНК анализ с использованием панели из 588 кДНК фрагментов известных генов, ассоциированных с канцерогенезом, для сравнения с экспрессией FLSs генов образцов 5 пациентов с РА, образцы от 5 пациентов с травмой служили контролем. Повышенный уровень экспрессии был обнаружен для *PDGFR α* , *PAI-1* и *SDF1A* из образцов синовиальной ткани больных РА в сравнении с нормальными FLSs.

Одно из недавних исследований использовало метод микроанализа для определения профиля экспрессии FLSs, забранных от 19 пациентов с РА, панель кДНК включала 24 000 образцов. Было показано, что гетерогенность на уровне синовиальной ткани ассоциирована со специфическими фенотипическими характеристиками культивированных FLSs. Ткани с интенсивным воспалением были ассоциированы с FLS субтипом, который проявляет сходство с так называемыми миофибробластами. Миофибробласт - специализированный фибробласт, который приобрел способность экспрессировать α -актин гладких мышц, изоформа актина, которая типична клеткам гладкой мускулатуры сосудистой ткани. Сейчас принято считать, что миофибробласты – ключевые клетки для ремоделирования соединительной ткани и оказывают влияние на клеточную инфильтрацию. Данные клетки характеризуются заметно повышенной экспрессией генов, которые представляют transforming growth factor (TGF)- β ответную программу. Среди данных генов ответа *SMA*, *SERPINE1*, *COL4A1* (тип IV коллаген- α цепь), *IER3* (немедленный ранний ответ 3), *TAGLN* (трансгелин) и ген, кодирующий активин А, который является потенциальным агонистом индукции TGF- β ответной программы. Исследования в области онкологии показали, что миофибробласты, присутствующие

в опухолях, играют важную роль в ангиогенезе посредством продукции протеинов экстрацеллюлярного матрикса, хемокинов и ростовых факторов. Таким образом, выдвинута гипотеза, что синовиоциты, подобные фибробластам, в RA синовиальной ткани участвуют в ангиогенезе [13, 19].

Эти данные подтверждают мнение о том, что клеточные различия между тканями-мишенями патологического процесса находят свое отражение в стромальных клетках, и доказывают связь между повышенным миофибробласт подобным фенотипом и высоким уровнем воспаления в тканях-мишенях [21].

Гены, характерно экспрессируемые в фибробластах, дифференциально экспрессируются в образцах биоптатов пациентов с SSc и в нормальной ткани. Определяемое изменение экспрессии генов, вовлеченных в формирование экстрацеллюлярного матрикса, фибрилlogenез, активацию компонента и ангиогенез имело место в дермальных фибробластах неповрежденной кожи SSc пациентов. Не было обнаружено значимой разницы в генной экспрессии между поврежденными неповрежденными фибробластами. Данные о том, что фибробласты дискордантных монозиготных пар близнецов с SSc не отличались в значительной степени, свидетельствуют о значительных генетических предпосылках развития SSc фенотипа [19].

Экспрессия генов в клетках периферической крови

Исследование периферической крови может не обладать непосредственным приложением для понимания патогенеза ревматоидного заболевания, но анализ экспрессии генов в клетках периферической крови может служить биомаркером для более точной постановки диагноза и назначения индивидуальной терапии [19].

Изучение генной экспрессии в клетках периферической крови пациентов с SLE выявило изменение в работе ИФ генов приблизительно у половины пациентов. Данные гены включали ИФ регулируемые гены и некоторые гены ответа на ИФ. У пациентов с измененной экспрессией генов ИФ наблюдались более тяжелые формы манифестации заболевания (вовлечение в патологиче-

ский процесс почек, центральной нервной системы и гематологические изменения) в сравнении с пациентами, у которых экспрессия генов ИФ не была изменена.

RA имеет ряд системных манифестаций, поэтому многие исследования включали определение профиля генной экспрессии в клетках периферической крови для определения корреляции с характеристиками заболевания. В одном из исследований были изучены 25 генов у пациентов с RA и в контроле. Изменение в экспрессии данных генов отражало изменение в иммунном воспалении у RA пациентов. Среди данных генов были гены, кодирующие кальций связывающие протеины S100A8 и S100A12 [4, 7, 8, 14].

Olsen и коллеги изучали генную экспрессию PBMCs у пациентов с ранним RA (длительность заболевания < 2 лет) и продолжительным RA (средняя продолжительность заболевания порядка 10 лет). Экспрессия 9 генов в 3 раза была выше при раннем RA, включая гены, кодирующие рецептор к колониестимулирующему фактору 3, cleavage stimulation factor, TGF- β рецептор II, которые влияют на функции В-лимфоцитов. Экспрессия 44 генов была в 3 раза ниже. Эти гены участвуют в регуляции иммунного ответа и клеточного цикла. Поскольку четверть ранних генов, ассоциированных с артритом, перекрываются с генами, индуцируемыми вирусами гриппа, авторы предположили, что профиль экспрессии данных генов отражает ответ на неизвестный инфекционный агент.

Таким образом, повышение экспрессии генов ответа на ИФ наблюдалось в клетках периферической крови и/или в тканях, специфически поражаемых при ревматоидной патологии, у пациентов с такими аутоиммунными болезнями как RA, SLE, SSc, SS, множественный склероз, сахарный диабет I-го типа.

ИФ I-го типа, которые являются ранними медиаторами видового иммунного ответа, и которые влияют на развитие адаптивного иммунитета посредством прямых и непрямых взаимодействий с дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами и натуральными киллерами, могут влиять на инициацию

или усиление аутоиммунных процессов, хода разрушения ткани через многообразия своих функций в отношении практически каждого типа клеток и обеспечения Th-1 ответа [20].

Предполагается, что программа ответа на ИФ может быть связана с активацией незрелых дендритных клеток, которые регулируют активацию аутореактивных лимфоцитов. Потеря толерантности приводит к образованию аутоантител. В случае SLE комплексы антиген-антитело могут стимулировать рецепторы распознавания патогенов (например, Toll-like рецепторы), которые индуцируют ИФ- α продукцию, формируется порочный круг.

Была выявлена группа генов, изменение экспрессии которых подобно для нескольких ревматоидных заболеваний. Так идентифицировано 95 генов с повышенной экспрессией и 117 генов со сниженной экспрессией в PBMCs пациентов с RA, SLE, диабет I-го типа, множественный склероз. Данные гены были вовлечены в воспаление, передачу сигнала, апоптоз, клеточный цикл [13, 19].

Список литературы

1. Буздин А.А. Полногеномные подходы к функциональному анализу повторяющихся элементов: дис.... докт. биол. наук: 03.00.03 / А.А. Буздин // Институт Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, – М., 2008. – 226 с.
2. Подгорный О.В., Лазарев В.Н., Говорун В.М. Лазерная микродиссекция в биологии и медицине // Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства; Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва. – 34 с.
3. Четина Е. В. Клеточные и молекулярные механизмы разрушения суставного хряща при остеоартрозе: автореф. дис.... докт. биол. наук: 03.03.04 / Е.В. Четина // Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН, – М., 2011. – 51 с.
4. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer / Vijver M.J. [et al.] // N Engl J Med. – 2002. – Vol. 347. – P. 1999-2009.
5. Adib N., Silman A., Thomson W. Outcome following onset of juvenile idiopathic inflammatory arthritis: I. frequency of different outcomes / Adib N., Silman A., Thomson W. // Rheumatology (Oxford) – 2005. – Vol. 44(8) – P. 995–1001.
6. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis / Stanczyk J. [et al.] // Arthritis Rheum. – 2008. – Vol. 58(4). – P. 1001–1009.
7. Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays / Zanders E. D. [et al.] // J Immunol Methods. – 2000 – Vol. 233. – P. 131-140.
8. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor / Bovin L. F. [et al.] // Immunol Lett. – 2004. – Vol. 93. – P. 217-226.

9. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens / Tsubaki T. [et al.] // *Arthritis Res Ther.* – 2005. – Vol. 7. – P. 825-836.
10. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts / Chang H. Y. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – Vol. 99. – P. 12877-12882.
11. DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets / Devauchelle V. [et al.] // *Genes Immun.* – 2004 – Vol. 5. – P. 597-608.
12. From transcriptome to proteome: differentially expressed proteins identified in synovial tissue of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an initial screen with a panel of 791 antibodies / Lorenz P. [et al.] // *Proteomics.* – 2003. – Vol. 3. – P. 991-1002.
13. Glass D.N., Giannini E.H. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait / Glass D.N., Giannini E.H. // *Arthritis Rheum.* – 1999. – Vol. 42(11). – P. 2261–2268.
14. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus / Nzeusseu T. A. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1579-1588.
15. *Methods in Molecular Medicine: Arthritis Research: Volume 1* / Edited by: Andrew P. Cope // Humana Press Inc., Totowa, NJ.
16. *Methods in Molecular Medicine: Arthritis Research: Volume 2* / Edited by: Andrew P. Cope // Humana Press Inc., Totowa, NJ.
17. Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues / Pouw Kraan T. C. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – Vol. 48. – P. 2132-2145.
18. Specific gene expression profiles in systemic juvenile idiopathic arthritis / Ogilvie E.M. [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2007. – Vol. 56(6). – P. 1954–1965.

19. Transcription profiling of rheumatic diseases / Baarsen L. [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – V. 11. – Issue 1. – 2009.

20. Wilson C.B., Rowell E., Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation / Wilson C.B., Rowell E., Sekimata M. // *Nat Rev Immunol*. – 2009 – Vol. 9(2) – P. 91–105.

21. Woo P., Colbert R. A. An overview of genetics of paediatric rheumatic diseases / Woo P., Colbert R. A. // *Best Pract Res Clin Rheumatol*. – 2009. – 23(5). – P. 589-597.

Правила взятия и хранения биологического материала для молекулярно-биологического анализа

Методы молекулярно-биологического анализа находят применение во многих областях медицины. Генетические маркеры и изменения структуры нуклеиновых кислот используют в урологии и нефрологии, акушерстве и гинекологии, неонатологии и педиатрии, онкологии, ревматологии, стоматологии, хирургии, пульманологии, офтальмологии, оториноларингологии, гематологии, иммунологии, диагностике инфекционных и генетических заболеваний, а также для анализа продуктов питания, объектов окружающей среды, растений, насекомых и животных.

Исследуемым материалом для ПЦР, как наиболее широко используемого среди молекулярно-биологических методов анализа, могут служить кровь, плазма, сыворотка, плевральная, синовиальная или спинномозговая жидкости, биоптаты тканей, соскобы клеток, моча, слюна, мокрота, слизь, сперма и другие биологические жидкости.

Взятие материала производится в условиях процедурного кабинета соответствующего профиля. После взятия образцов биологического материала пробы как можно скорее должны быть доставлены в лабораторию для подготовки материала к исследованию.

Для взятия образцов биологического материала необходимо использовать стерильный, желательно одноразовый, инструментарий. Материал помещают в одноразовые стерильные пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные в сушильном шкафу при температуре 150°C в течение 1 часа. Наиболее рациональным для взятия образцов биологического материала является использование пластиковых пробирок типа эппендорф.

Качество лабораторного исследования во многом зависит от качества взятия клинического материала. Взятие биологического материала проводят из предполагаемого места локализации патологического агента. Микроорганизмы могут иметь особенности локализации, путей распространения и выведения, что следует учитывать при выборе наиболее адекватного места взятия биопробы.

Важно помнить, что:

- ✓ Пациент не должен получать специфической терапии в течение 48-72 часов до взятия материала;

- ✓ Для получения проб мочи и отделяемого уретры необходимо, чтобы пациент не мочился в течение как минимум трех часов до взятия материала.

Соскобы эпителиальных клеток со слизистых оболочек

Данный вид биологического материала часто используют для диагностики инфекций, передающихся половым путем, таких как гонорея, хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз, трихомониаз, гарднереллез, герпетическая, папилломовирусная, цитомегаловирусная, а также для выявления других возбудителей, поражающих слизистые оболочки.

При выявлении возбудителей инфекций урогенитального тракта взятие материала у женщин проводят перед менструацией или через 1-2 дня после ее окончания. Женщины накануне обследования не должны проводить туалет наружных половых органов и спринцевание. Взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

Количество биологического материала, забираемого для исследования не должно быть избыточным, т.к. вместе с возбудителем в пробу попадают биологически активные вещества, которые могут ингибировать ПЦР или способствовать деградации ДНК при хранении и/или транспортировке проб.

Наиболее адекватным инструментом для взятия соскобов эпителиальных клеток и мазков для ПЦР-анализа является специальный урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает собранный материал в жидкую транспортную среду.

Для сбора биопроб лучше использовать одноразовые урогенитальные зонды и одноразовые пробирки с транспортной средой с плотно закрывающейся или завинчивающейся крышкой. Обязательным является плотное закрытие пробирки при хранении и транспортировке, а также маркировка.

Транспортировать охлажденные или замороженные образцы необходимо при температуре не выше +4°C в течение 6 часов в термоконтейнере с охлаждающими элементами или термосе со льдом. При необходимости пробирки с биологическим материалом можно замораживать и хранить при –20°C сроком до 1 месяца.

При взятии биологического материала недопустимо попадание в пробу крови и большого количества слизи!

При правильном выполнении процедуры взятия биологического материала образец имеет вид мутноватой жидкости белого, светло-желтого или светло-розового цвета с хлопьевидным осадком при рассмотрении пробирки в условиях естественного или искусственного освещения.

Процедура взятия соскоба эпителиальных клеток из цервикального канала для ПЦР исследований

1. Взятие соскоба эпителиальных клеток из цервикального канала проводят в амбулаторных или стационарных условиях.
2. Перед взятием соскоба необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором
3. Ввести зонд в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см, собрать материал осторожными вращательными движениями.
4. При наличии эрозий цервикального канала обработать их стерильным физиологическим раствором, и брать материал на границе здоровой и измененной ткани.
5. Извлечь зонд, избегая касания со стенками влагалища, и поместить его в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки. Оставлять наконечник зонда в пробирке с биопробой не рекомендуется.
6. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия соскоба эпителиальных клеток из уретры женщин для ПЦР исследований

1. Взятие соскоба эпителиальных клеток из уретры проводят в амбулаторных или стационарных условиях.
2. Непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором.
3. Провести массаж уретры о лобковое сочленение.
4. Ввести зонд на глубину 1,0-1,5 см, собрать материал осторожными вращательными движениями.
5. Извлечь зонд и погрузить его в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки. Оставлять наконечник зонда в пробирке с биопробой не рекомендуется.
6. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия отделяемого влагалища для ПЦР исследований

1. Взятие отделяемого влагалища проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Взятие отделяемого влагалища проводят до проведения мануального исследования.

3. В случае избытка слизи или обильных выделений удалить их стерильным ватным тампоном.

4. Влагалищное отделяемое собирают вращательными движениями стерильным одноразовым зондом по поверхности слизистой влагалища в области заднего нижнего свода или патологически измененных участков слизистой.

5. Извлечь зонд и поместить его в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки. Оставлять наконечник зонда в пробирке с биопробой не рекомендуется.

6. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия соскоба эпителиальных клеток из уретры мужчин для ПЦР исследований

1. Взятие соскоба эпителиальных клеток из уретры проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов.

3. Непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором.

4. При наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 мин после мочеиспускания.

5. При отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала.

6. Ввести зонд на глубину 3-4 см, собрать материал осторожными вращательными движениями.

7. Извлечь зонд и погрузить его в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки. Оставлять наконечник зонда в пробирке с биопробой не рекомендуется.

7. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия мочи для ПЦР исследований

1. Собирают первую порцию утренней мочи в количестве 20-30 мл в сухой стерильный флакон с плотно закручивающейся крышкой.

2. Возможно исследование первой порции мочи, полученной через 2 и более часов после предыдущего мочеиспускания.

Моча для исследования должна быть свежей (не охлаждать и не замораживать!)

3. Весь объем мочи тщательно взбалтывают и переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в одноразовую пластиковую пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл.

4. Центрифугируют 5 мин при 10 тыс. об/мин. При наличии большого количества солей ресуспандируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрируют центрифугированием.

5. С использованием вакуумного аспиратора полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок.

6. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 200 мкл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

7. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия эякулята для ПЦР исследований

1. Взятие эякулята проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Получение эякулята осуществляют в специальный сухой стерильный контейнер объемом 60 мл.

3. 50 мкл эякулята смешивают со 150 мкл транспортного раствора, тщательно перемешивают на вортексе и используют для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислот.

4. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия секрета предстательной железы для ПЦР исследований

1. Взятие секрета предстательной железы проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном.

3. Секрет простаты собирают после предварительного массажа простаты через прямую кишку. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5-1 мл собирают в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

4. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия крови для ПЦР исследований

1. Процедура взятия крови для ПЦР исследований осуществляется в специально оборудованном помещении (процедурный кабинет) на кушетке квалифицированным специалистом, прошедшим аттестацию в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологического режима.

2. Для получения плазмы отбор крови производят натошак из локтевой вены с использованием одноразовых шприцов объемом 5 мл или специальной вакуумной системы (с 6% ЭДТА)

3. При использовании шприца кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (6 % раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8 % раствор цитрата натрия в соотношении 1:9).

Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

4. Пробирку закрывают и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания крови с антикоагулянтом).

5. Для получения плазмы пробирки с цельной кровью центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре.

6. Полученную плазму (верхняя фаза) отбирают индивидуальным наконечником с фильтром (аэрозольным барьером) в количестве не менее 1 мл в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

7. Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови) для выявления лейкотропных вирусов и внутриклеточных паразитов отбирают после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром (аэрозольным барьером) собирают лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и переносят в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

8. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия спинномозговой жидкости для ПЦР исследований

1. Спинномозговую жидкость получают в амбулаторных или стационарных условиях путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами.

2. Взятие спинномозговой жидкости в количестве не менее 0,5-1 мл проводят в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

3. Центрифугируют пробирку с 1 мл спинномозговой жидкостью 5 минут при 10 000 об/мин.

4. Для выполнения ПЦР-исследования используют осадок и 0,1 мл надосадочной жидкости. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия соскоба слизистой полости носа для ПЦР исследований

1. Взятие соскоба слизистой полости носа проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Взятие биологического материала, по-возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры.

3. Соскоб слизистой полости носа берут сухими стерильными ватными тампонами.

4. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

5. Извлеченный тампон помещают в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки.

6. Пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия соскоба слизистой ротовой полости для ПЦР исследований

1. Взятие соскоба слизистой ротовой полости проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Взятие соскоба из ротовой полости проводят натощак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды.

3. Корень языка придавить шпателем, материал берут сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек или задней стенки глотки.

4. Извлечь зонд, не касаясь языка, слизистой щек и зубов, и поместить его в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл, несколько раз поворачивать и, отжав остатки раствора о стенки, удалить из пробирки.

5. Пластиковую пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

Процедура взятия выпотной жидкости (суставной) для ПЦР исследований

6. Выпотную жидкость (суставную) получают в амбулаторных или стационарных условиях.

7. Пункцию коленного сустава проводят в положении пациента «лежа» с соблюдением всех необходимых требований асептики и антисептики.

8. Обрабатывают кожу в месте предполагаемой пункции вначале спиртом, а затем двукратно 5% настойкой йода и изолируют стерильным материалом.

9. С помощью тонкой иглы 0,5% раствором новокаина проводят поверхностную анестезию мягких тканей в месте прокола.

10. Иглу на шприце заменяют на более толстую, которой и производят пункцию суставной полости.

11. Прокол коленного сустава производят у верхнего или нижнего полюсов коленной чашечки, отступя вбок наружи или кнутри на 1-2 см.

12. В процессе прокола в шприце создают отрицательное давление путем потягивания за поршень, что позволяет достаточно точно определить момент попадания в полость по поступлению содержимого в просвет шприца.

13. Пунктат в количестве не менее 0,5-1 мл переносят в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

14. После извлечения иглы место пункции смазывают настойкой 5% йода и накладывают стерильную повязку.

15. Центрифугируют пробирку с 1 мл выпотной жидкости 5 минут при 10-11 тыс. об/мин.

16. Для исследования используют полученный осадок и 0,1 мл надосадочной жидкости.

17. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура взятия соскоба содержимого периодонтального кармана для ПЦР исследований

1. Соскоб содержимого периодонтального кармана для ПЦР исследований получают в амбулаторных или стационарных условиях.

2. Взятие соскоба содержимого периодонтального кармана осуществляется с помощью трех стерильных бумажных штифтов.

3. Каждый штифт погружается зубодесневую борозду зуба в проекции зенита с вестибулярной стороны на 5 секунд.

4. Забранный материал помещают в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую транспортную среду в объеме 0,3 мл.

5. Пластиковую пробирку плотно закрывают и маркируют.

Процедура получения пунктиционно-аспирационного биопсийного образца тканей щитовидной железы для ПЦР-исследований

1. Получение пунктиционно-аспирационного биопсийного образца для ПЦР-исследований проводят в амбулаторных или стационарных условиях.

2. У пациента берут информированное согласие на проведение инвазивной процедуры и предоставление биологического материала в рамках лечебно-диагностических и научно-исследовательских мероприятий.

3. С целью расслабления шейной мускулатуры пациента укладывают в лежачее положение с подушкой под головой.

4. Пальпируют узловое образование, после чего пациенту предлагается несколько раз проглотить слюну, чтобы этого не произошло во время пункции.

5. Для биопсии необходимо использовать иглы 23G размера (0,6 мм) и шприц на 20 мл.

6. Игла вводится в узел, после чего осуществляется медленная аспирация, которая прекращается сразу после появления в шприце аспирата и до смещения иглы в сторону, что позволяет избежать попадания в аспират содержимого канала, сделанного иглой.

7. Пунктиционно-аспирационная биопсию сложных узлов проводят под контролем УЗИ, которое позволяет прицельно пунктировать солидные участки узлов и, таким образом, получить более адекватный по клеточности материал.

8. После нанесения биопсийного материала на предметные стекла для дальнейшего цитологического исследования остатки адгезированных в аспирационной игле и шприце клеток помещают в одноразовую пластиковую пробирку типа «Эппендорф», содержащую 0,5 мл стабилизирующего нуклеиновые кислоты раствора.

9. Пластиковую пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

Научное издание

Костюк Светлана Андреевна
Коломиец Наталья Дмитриевна
Руденкова Татьяна Владимировна
Полуян Ольга Сергеевна

Теоретические и прикладные вопросы применения
методов анализа нуклеиновых кислот

монография

Ответственная за выпуск С.А. Костюк

Подписано в печать 23. 12. 2014. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 15,81. Уч.- изд. л. 13,6. Тираж 100 экз. Заказ 68

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.