**Тема: Методы детекции продуктов ПЦР.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Метод гель-электрофореза для визуализации ампликонов.
2. Флуоресцентная детекция результатов ПЦР.
3. Основные характеристики флуоресцентных красителей и гасителей флуоресценции.

**Краткое содержание занятия:**

Для правильной оценки результатов ПЦР важно понимать, что данный метод не является количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется лишь в случаях, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в жизни встречается не часто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает степень чистоты препарата ДНК, т.е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться в некоторых случаях бывает крайне сложно. Иногда, из-за их присутствия не удается амплифицировать даже десятки тысяч молекул ДНК-мишени. Таким образом, прямая связь между исходным количеством ДНК-мишени и конечным количеством продуктов амплификации часто отсутствует.

МЕТОД ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Для визуализации результатов амплификации используют различные методы. Наиболее распространенным на сегодняшний день является метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого 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 гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254 - 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной. Однако это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце.

МЕТОД ВЕРТИКАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

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 обычной работе используют метод горизонтального электрофореза.

**Методы флуоресцентной детекции**

Методы флуоресентной детекции могут быть разделены на два главных направления: неспецифичные и специфичные. В таблице перечислены основные особенности, преимущества и недостатки наиболее используемых методов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Неспецифичные методы** | **Принцип действия** | **Особенности** |
| Интеркалирующие красители (SYBR Green I и др.) | Сигнал флуоресценции увеличивается из-за связывания интеркалирующего красителя с двухцепочечной ДНК. | Высокий уровень сигнала, общие подходы к дизайну различных экспериментов, возможны ложноположительные результаты из-за димеров праймеров или неспецифичных ампликонов, в силу этого эти методы непригодны для диагностических целей. |
| Амплифлуры (Amplifluor) | Аллель-специфичная ПЦР раскрывает шпилечную структуру флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов. |
| Люкс-праймеры (Lux) | Сигнал флуоресценции меняется при включении флуоресцентно-меченного праймера в ПЦР продукт. |
| DzyNA-PCR | При связывании зонда с амплификатом образуется участок узнавания рестриктазы. |
| **Cпецифичные методы** |   |   |
| ТакМаны (TaqMan) | Краситель и гаситель разделяются из-за 5`-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы. | Высокий уровень сигнала, легкость дизайна и синтеза, плохое соотношение сигнал/шум, проблемы с дискриминацией некоторых последовательностей. |
| Molecular Beacons | Краситель и гаситель разделяются после связывания зонда с ампликоном и раскрытия шпильки. | Низкий уровень сигнала из-за кинетики реакции, хорошое соотношение сигнал/шум. |
| Eclipse | Аналогичны ТакМанам, но устойчивы к экзонуклеазной активности полимеразы, сигнал генерируется после связывания зонда с ампликоном. | Высокий уровень сигнала, легкость дизайна и синтеза, плохое соотношение сигнал/шум, проблемы с дискриминацией некоторых последовательностей. |
| Hyb probes | Два красителя сближаются после связывания зондов с ампликоном, сигнал генерируется с помощью механизма FRET. | Плохое соотношение сигнал/шум, не подходит для всех приборов, реакция требует тримолекулярного взаимодействия. |
| Scorpions | Зонд-праймер включается в ПЦР продукт, сигнал генерируется после раскрытия шпильки и связывания свободного конца зонда с ампликоном. | Отличное соотношение сигнал/шум, мономолекулярная реакция, сравнительно дорогой синтез. |

ЗАНЯТИЕ № 25 (Лабораторное).

**Флуоресцентная детекция результатов ПЦР.**

**ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)** — В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Получать и интерпретировать результаты ПЦР становится проще, быстрее и надежнее.

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

**1.** В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами реакции добавлены специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3’-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5’-конце расположена молекула-“гаситель” флуоресценции. За счет близости флуорофора и “гасителя” вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на “гаситель” по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.

**2.** В ходе ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.

**3.** В процессе синтеза новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от “гасителя”, расстояние между ними увеличивается, процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается.

**ПЦР “в реальном времени”** имеет ряд значительных преимуществ:

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

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

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

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