

Полимеразная цепная реакция – базовая технология генодиагностики инфекционных болезней. Разновидности ПЦР и технологические особенности. Методы детекции результатов. ПЦР реального времени. Количественная ПЦР-РВ. Разновидности количественной ПЦР-РВ (Taqman, molecular beacon).

Корсакова И.И.



Метод ПЦР был разработан в 1984 г. американским биохимиком Кэрри Мюллисом, который впервые показал возможность амплификации (многократного увеличения числа копий) участков ДНК в процессе биохимической реакции.

Синтез копий молекул ДНК *in vivo* (полимеразная реакция) происходит во всех организмах во время клеточного деления. Копирование ДНК осуществляют ферменты (ДНК-полимеразы).

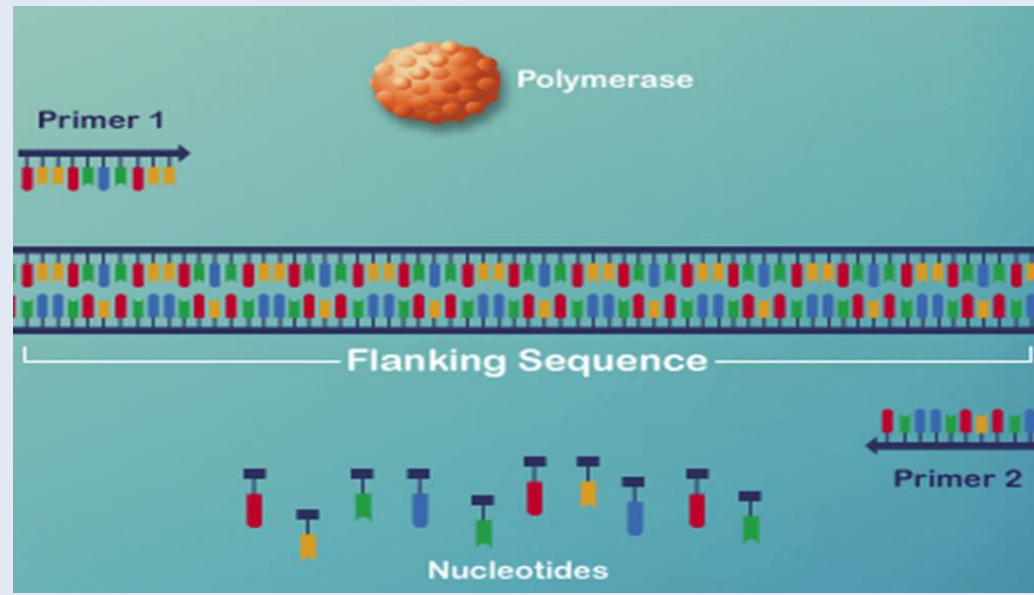
Принцип метода ПЦР - это получение множества копий специфического фрагмента ДНК, ограниченного праймерами, *in vitro*. За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).

С помощью этого метода в течение нескольких часов за 30 - 40 циклов амплификации можно выделить и размножить определенный участок ДНК (размером от 80 до 3000 пар нуклеотидов) в миллиарды раз.

В настоящее время ПЦР широко используется в различных областях, как в научных исследованиях, так и в клинической медицинской практике.



В основе метода ПЦР лежит уникальное свойство НК (как ДНК, так и РНК) — способность к саморепродукции, которая воспроизводится искусственно *in vitro*. При этом синтезируются только строго специфические фрагменты НК. В связи с этим, прежде чем проводить ПЦР, необходимо узнать нуклеотидную последовательность искомой НК. После этого синтезируются два коротких ДНК-зонда или праймера, которые комплементарны соответствующим участкам НК-мишени на границах определяемого специфического фрагмента. Синтез цепи происходит только между ними. Праймер — самый главный элемент в ПЦР, обеспечивающий запуск и специфичность реакции.



ПЦР - термины

Амплификация (лат. *amplificatio* — усиление, увеличение) - в молекулярной биологии — увеличение числа копий ДНК. В клетке амплификация происходит в результате репликации ДНК, в искусственных условиях увеличения числа копий ДНК добиваются с помощью полимеразной цепной реакции.

Праймер — короткая олиго- или полинуклеотидная последовательность со свободной 3'ОН-группой, комплементарно связанная с однонитевой ДНК или РНК; с его 3'-конца ДНК-полимераза начинает наращивать полидезоксирибонуклеотидную цепь.



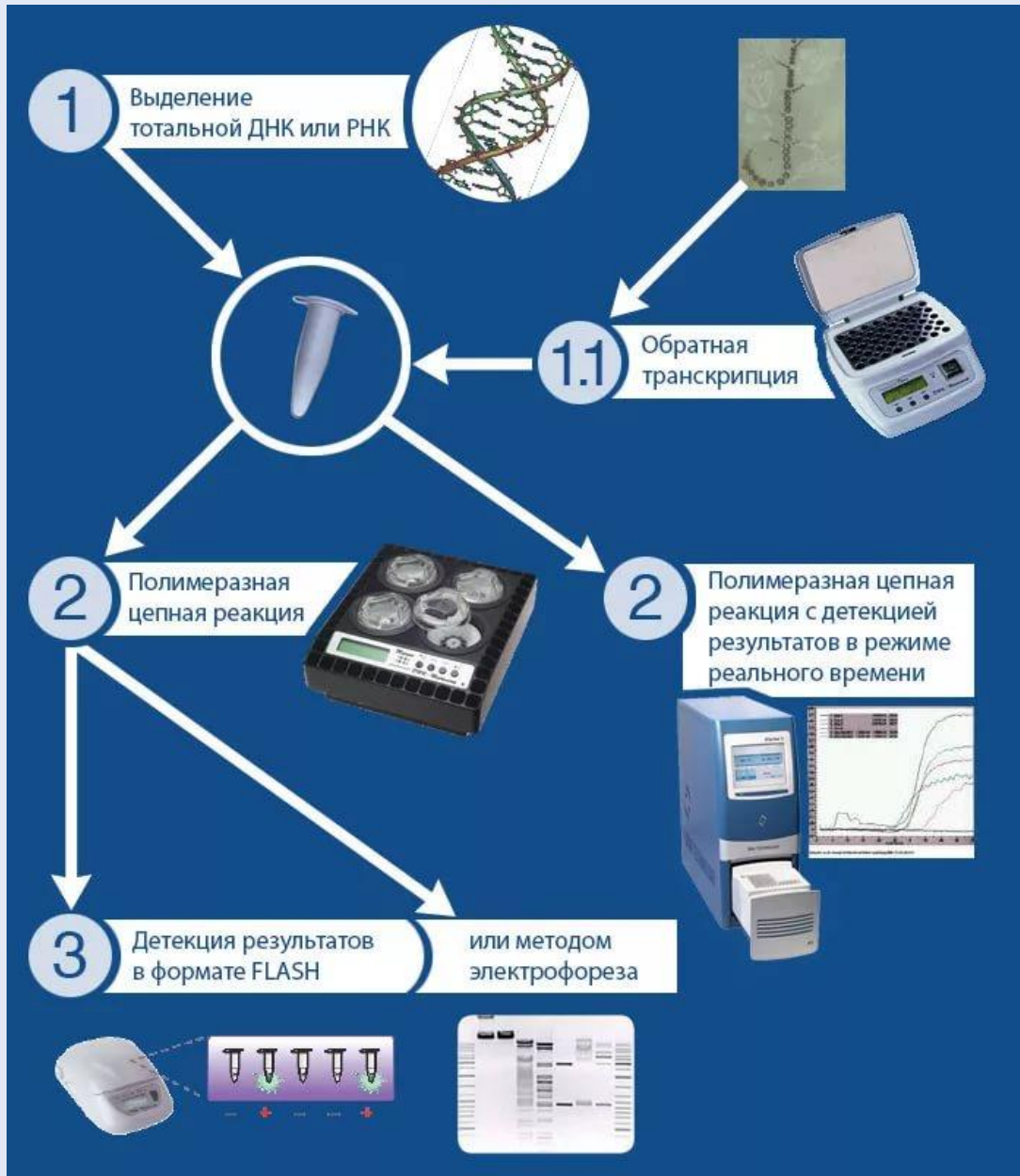
Этапы ПЦР-исследования

1. Выделение нуклеиновых кислот. На первом этапе выделяется вся ДНК (для ДНК-содержащих микроорганизмов) или РНК (для метода NASBA или РНК - содержащих вирусов) из исследуемого материала.

2. Собственно ПЦР или амплификация.

3. Учет результатов. Накопленные продукты амплификации (большое число копий ДНК между местами посадки праймеров) можно выявить путем электрофореза в геле. Помимо этого, при использовании флуоресцентно меченых зондов, возможен учет результатов по изменению флуоресценции относительно отрицательного контроля.

Этапы ПЦР-исследования



Амплификация

Для постановки ПЦР необходимы:

- ДНК-матрица (ДНК или ее часть, содержащая искомый специфический фрагмент)
- Праймеры
- Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов
- Фермент Таq-полимераза (термостабильная)
- Буферный раствор



Амплификация

В раствор, содержащий смесь нуклеотидов, ПЦР-буфер, полимеразу и праймеры добавляется ДНК, выделенная на первом этапе. ПЦР проводят следующим образом: сначала реакционную смесь нагревают до температуры 90-94 °С, вызывая этим денатурацию ДНК, затем температуру снижают до 50-70 °С в зависимости от нуклеотидной последовательности праймеров, чтобы отжиг происходил в строго комплементарных участках, и наконец, в смеси устанавливают температуру, оптимальную для работы ДНК-полимеразы. При повторении этих циклов количество копий участка ДНК, находящегося между местами посадки праймеров, возрастает в геометрической прогрессии.



Амплификация

Стадии Полимеразной Цепной Реакции

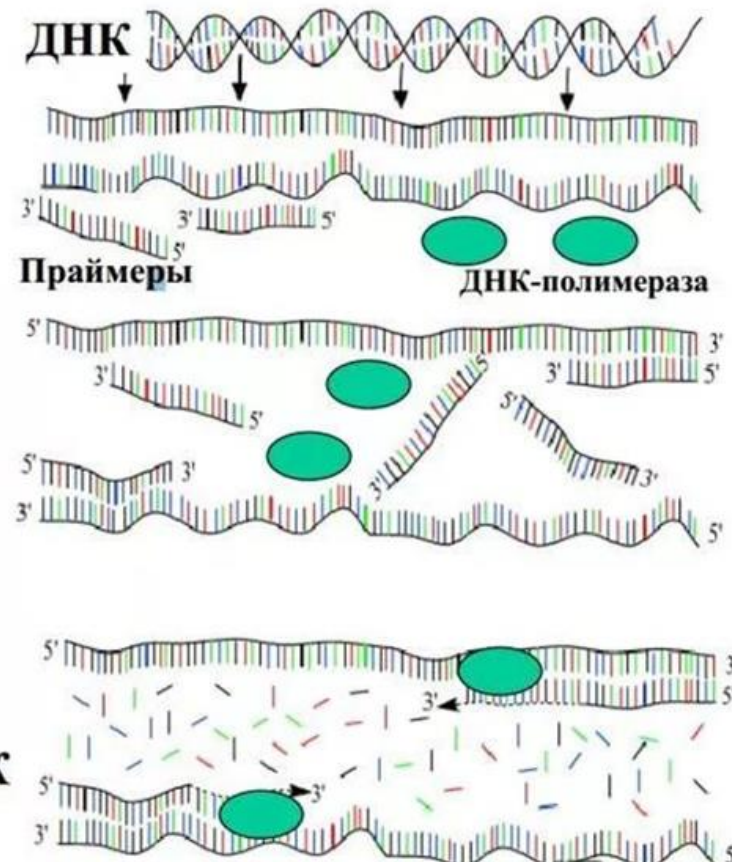
Денатурация ДНК
(95°C)



Отжиг праймеров
(55-65°C)

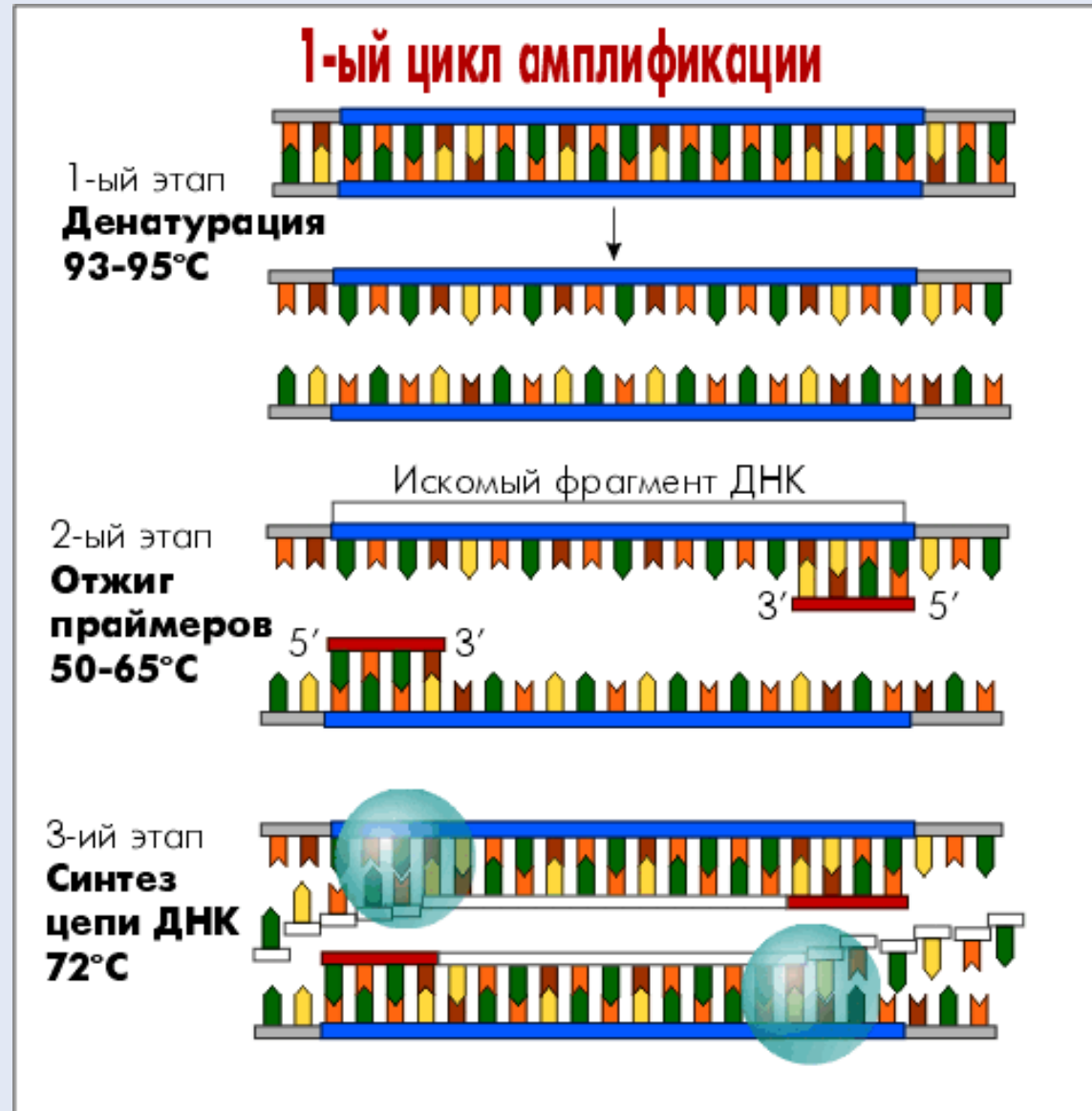


Полимеризация цепей ДНК
(72°C)



Амплификация

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающие в разных температурных режимах:

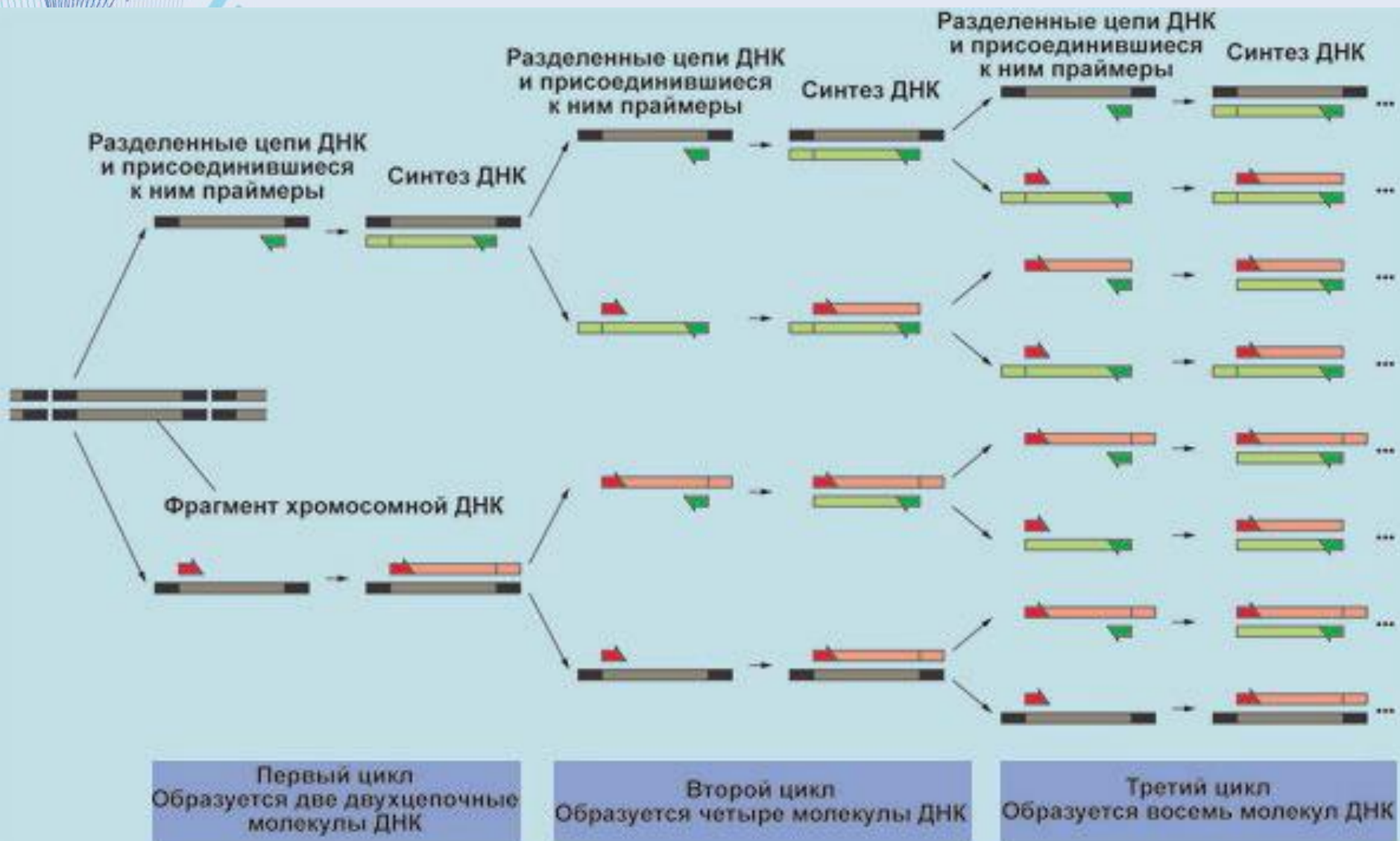


Амплификация

В последующих циклах вновь синтезируемые молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий.

Поскольку синтез каждой из двух антипараллельных цепей ДНК начинается от места гибридизации праймера, эти места и становятся границами синтезируемого участка. Число указанных циклов в ПЦР составляет обычно от 25 до 40, причем в каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка ДНК, приводящее к увеличению в геометрической прогрессии общего содержания продуктов реакции.

Амплификация

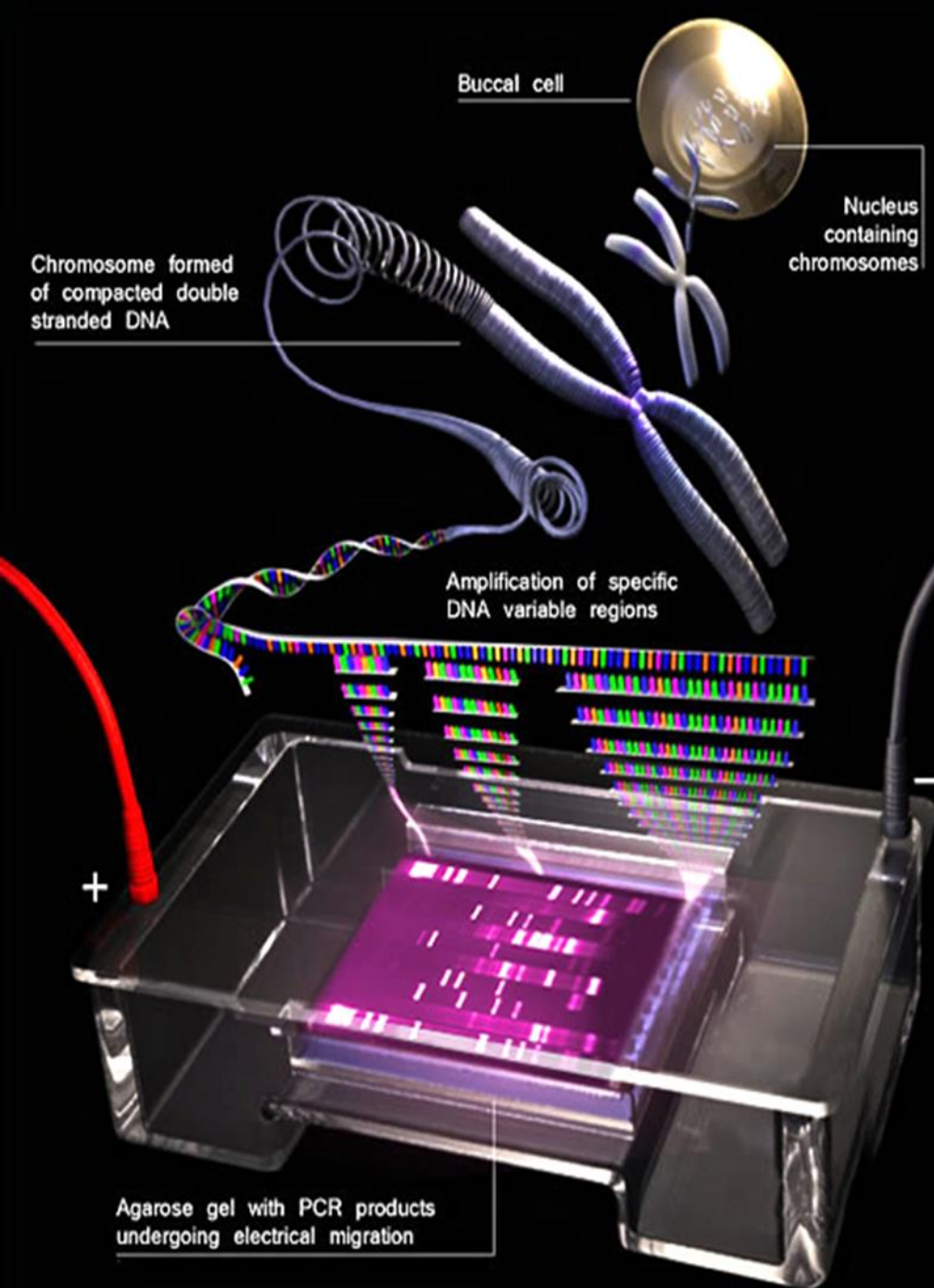


Амплификация

Таким образом, тест-система для ПЦР состоит из смеси НК испытуемого образца, праймеров, дезоксирибонуклеотидов (набора нуклеотидтрифосфатов) и термостабильной ДНК полимеразы (энзима термофильных бактерий *Termus aquaticus*).

Указанную выше реакционную смесь подвергают повторным циклам нагревания/охлаждения для денатурации (при нагревании) НК и гибридизации или отжига (при охлаждении) праймеров с целью синтеза (с помощью ДНК-полимеразы) новых нуклеиновых кислот.

Учет результатов ПЦР



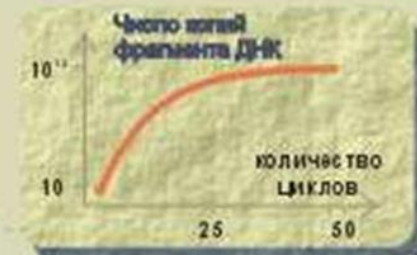
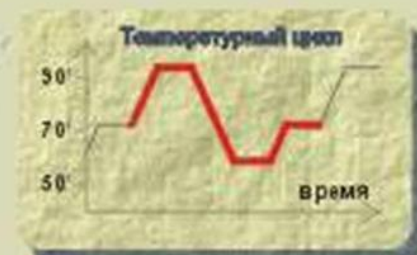
Этапы ПЦР с электрофоретической детекцией

Стадии метода ПЦР

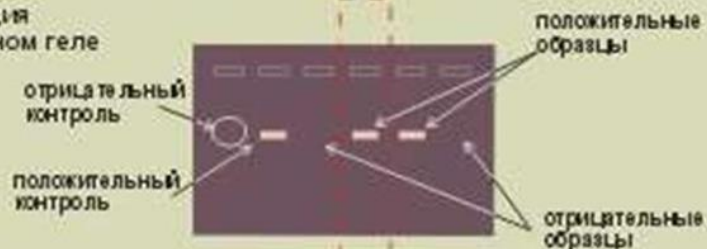
1. Выделение ДНК



2. Амплификация



3. Детекция в агарозном геле



Этапы ПЦР с использованием метода «FLASH» -

(FLuorescent Amplification-based Specific Hybridization — специфическая флуоресцентная гибридизация в процессе амплификации)

Схема ПЦР-исследования с использованием метода «FLASH» включает 3 стадии.

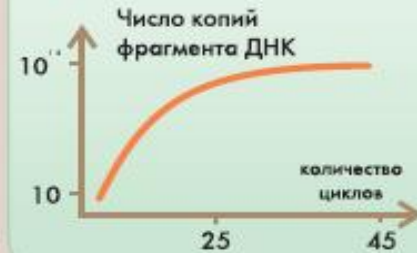
Первые 2 (пробоподготовка и амплификация) не отличаются от традиционной постановки ПЦР.

Третья стадия (детекция продуктов ПЦР) принципиально другая. В случае метода «FLASH» пробирки из амплификатора переставляют в ПЦР-детектор и, не открывая их, проводят регистрацию флуоресценции.

1. Пробоподготовка



2. Амплификация FLASH



3. Детекция (регистрация флуоресценции)

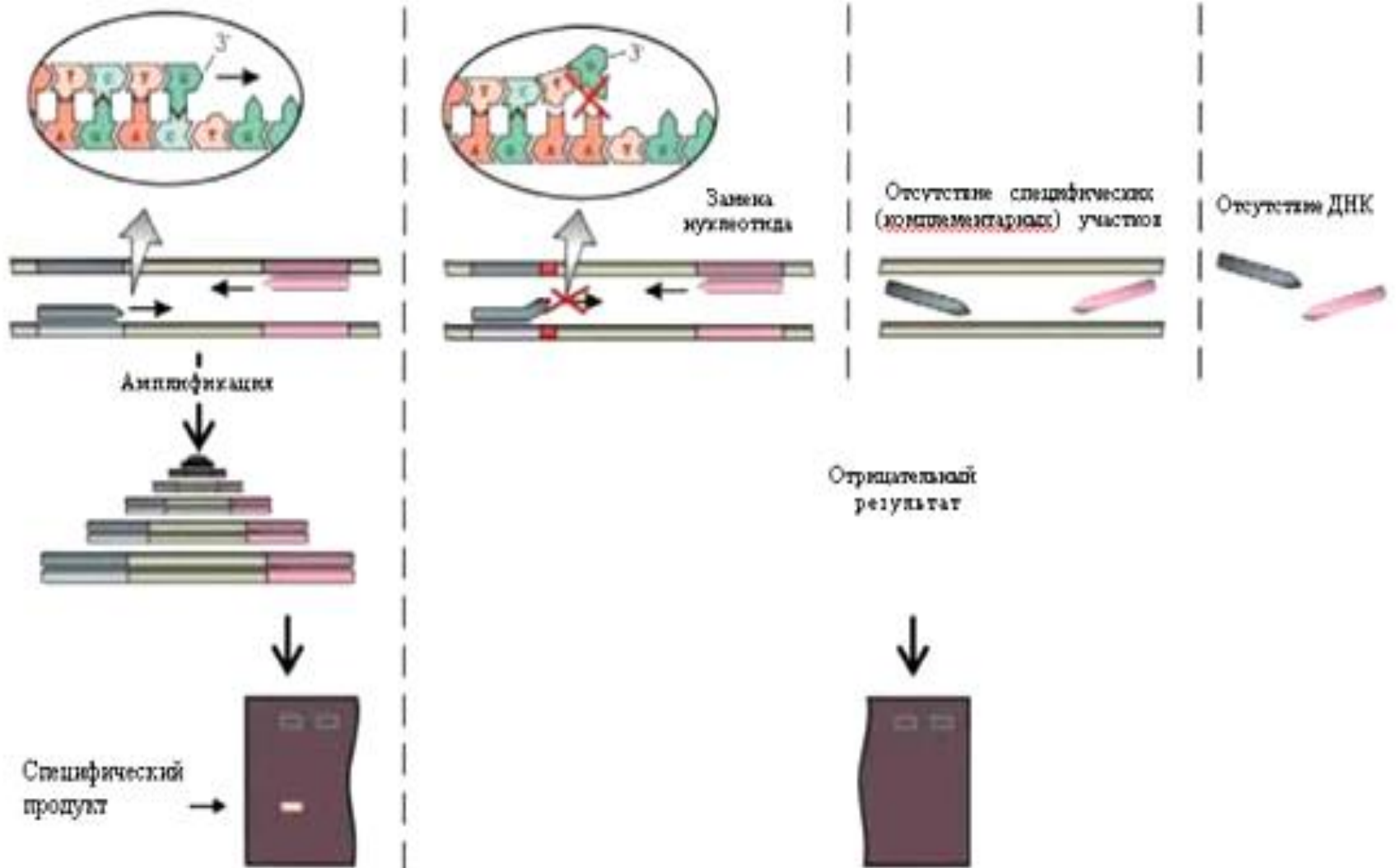


- + - - +

Преимущества метода ПЦР

- 1. Универсальность.** При помощи ПЦР можно определять ДНК в любых биологических образцах. Причем это в равной степени относится как к ДНК микроорганизмов, так и к ДНК человека.
- 2. Высокая специфичность.** Специфичность определяется тем, что в ПЦР определяется уникальный участок гена, характерный только для данного возбудителя. Для повышения специфичности возможно определять несколько разных генов одного микроба. Так, например, для определения *Ureaplasma urealyticum* можно выявлять как ген 16S РНК, так и ген уреазы. А для идентификации *Chlamydia trachomatis*, помимо определения хромосомальной ДНК и ДНК криптической плазмиды, стало возможным выявлять рибосомальную РНК (NASBA). Это значительно повышает достоверность исследования.
- 3. Высокая чувствительность.** Полимеразная цепная реакция способна выявлять единичные копии ДНК. В среднем порог чувствительности большинства современных тест-систем составляет от 10 до 100 копий ДНК. Это значительно превышает чувствительность культуральных методов исследования.
- 4. Малый объем биологического материала.** Проведение анализа возможно в минимальном объеме пробы (до нескольких микролитров), что крайне важно в педиатрии, неонатологии, неврологии, судебной медицине.
- 5. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций.** Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях.

Специфичность ПЦР



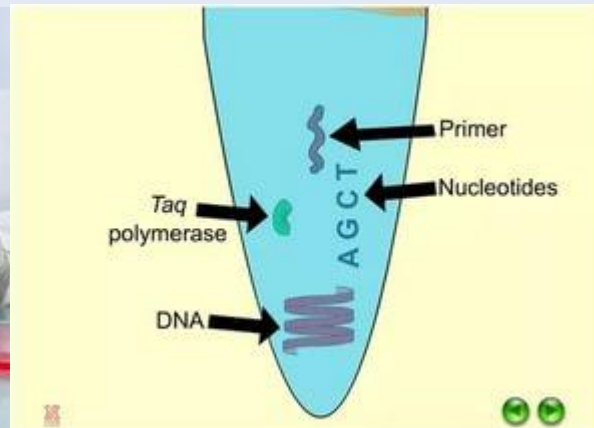
Недостатки метода ПЦР

- 1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма. Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Разработанный метод NASBA выявляет РНК только живых микроорганизмов и позволяет избежать этих ограничений.**
- 2. Высокая чувствительность. Ряд микроорганизмов (условно - патогенная флора) в норме может существовать у человека в малом количестве. При помощи метода ПЦР определяются даже самые малые количества микроорганизмов при отсутствии патологии. Эта проблема решена с появлением метода количественного определения ДНК (Real-time PCR).**
- 3. Различия при использовании разных тест систем. Как говорилось выше, для амплификации можно использовать различные участки генома возбудителя. Однако в случае различных мутаций микроорганизмов возможно изменение или утрата генов. Это приводит к разным результатам при использовании тест систем разных производителей.**

Области применения ПЦР

Качественную ПЦР можно использовать в следующих случаях:

- диагностика инфекционных заболеваний, вызванных безусловными патогенами;
- выявление инфекционных агентов перед проведением количественной ПЦР;
- диагностика онкологических заболеваний;
- диагностика генетических заболеваний;
- идентификация личности;
- скрининг генетически модифицированных источников пищи.



Модификации метода ПЦР

Существует большое число модификаций метода ПЦР. Представляем некоторые из них:

- **Метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR)**
- **ПЦР в реальном времени**
- **Метод количественной ПЦР-РВ**
- **NASBA-ПЦР (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification)**
- **ПЦР in situ**
- **«Вложенная», «гнездовая» ПЦР (Nested PCR)**
- **«Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR)**
- **Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR)**
- **ПЦР длинных фрагментов (Long-range PCR)**
- **Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР**

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

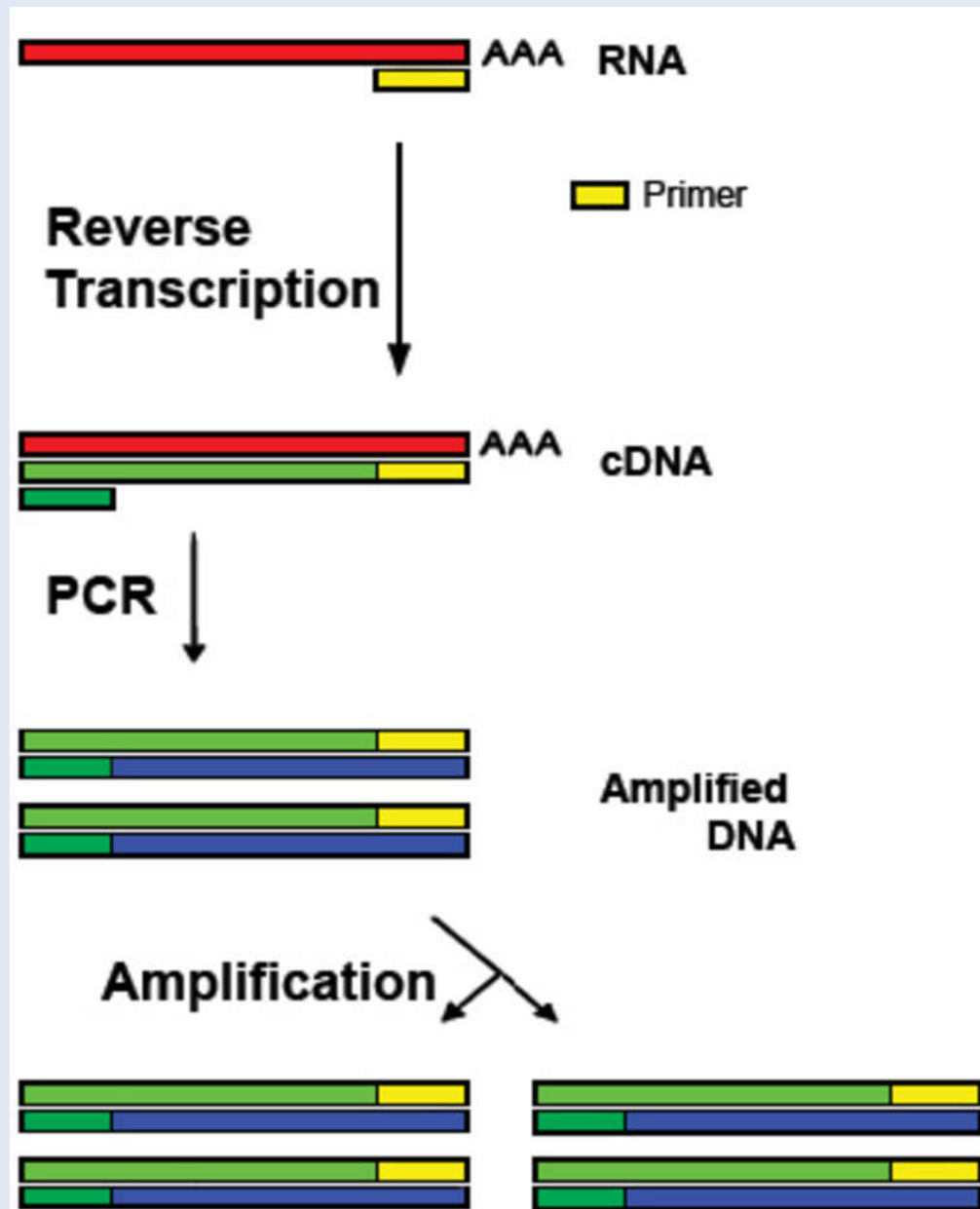
ОТ-ПЦР используют для выявления молекул РНК.

Полимеразная цепная реакция может идти исключительно на матрице ДНК. Поэтому сначала РНК нужно «переписать» в ДНК. Для этого применяют реакцию обратной транскрипции, в которой фермент обратная транскриптаза по матрице РНК с помощью одного праймера, комплементарного исследуемой РНК, строит комплементарную ДНК (кДНК). А потом с этой ДНК проводят обычную ПЦР, как описано выше.

ОТ-ПЦР незаменима при работе с вирусами, геном которых представлен молекулой РНК, в диагностике некоторых видов рака по специфическим транскриптам опухолевых клеток, а также в генной инженерии, если нужно экспрессировать эукариотический ген в бактериальных клетках.

РНК 

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

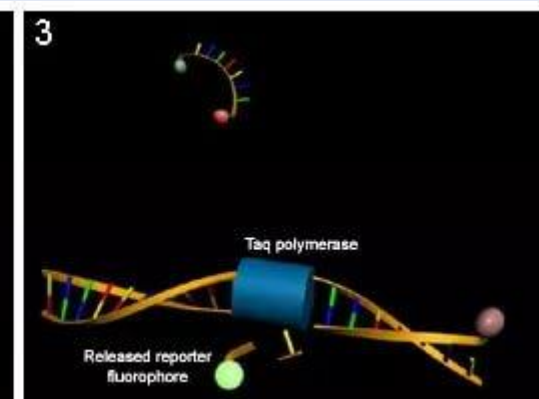
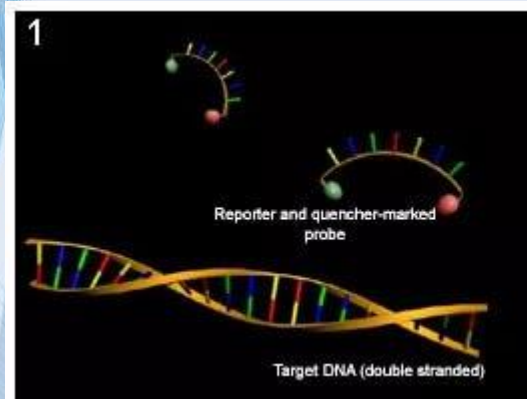


ПЦР в реальном времени

В основе метода лежит принцип детекции продуктов непосредственно в ходе процесса амплификации.

Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле.

Важнейшей чертой этого метода является синхронизация процессов регистрации и амплификации, что позволяет наиболее точно оценить кинетику протекающего процесса, зависящую от начального количества исследуемого материала. Чем больше в исходной пробе было специфической ДНК, тем раньше и больше увеличится число специфических фрагментов.



ПЦР в реальном времени

Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амплификатор, совмещающий функции термоциклера и флуоресцентного детектора. Отличительной особенностью прибора является возможность возбуждать и детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов, на каждом цикле амплификации.

На сегодня существует несколько моделей приборов для ПЦР в реальном времени: "iQ iCycler" ("Bio-Rad"), "ABI Prism" ("Applied Biosystems"), "LightCycler" ("Roche"), "SmartCycler" ("Cepheid") и другие.



"ABI Prism 7000"



"RotorGene"



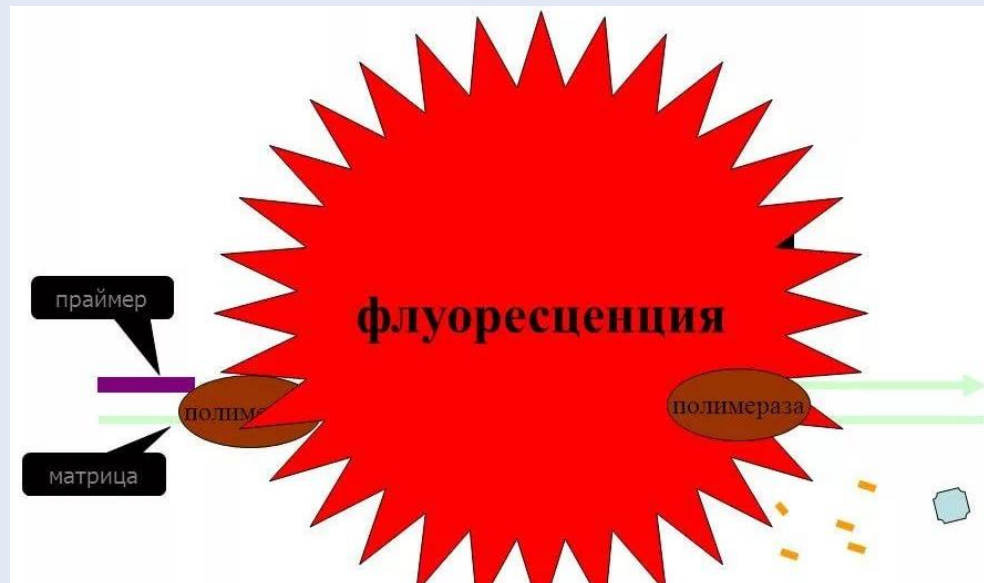
"iCycler iQ"

Детекция продуктов амплификации

Метод **real-time PCR** не требует визуализации продуктов реакции с помощью гель-электрофореза — их накопление фиксируют в реальном времени оптические датчики, вмонтированные в амплификатор и настроенные на определенную длину волны, испускаемую флуоресцирующими метками.

При этом используют два типа меток:

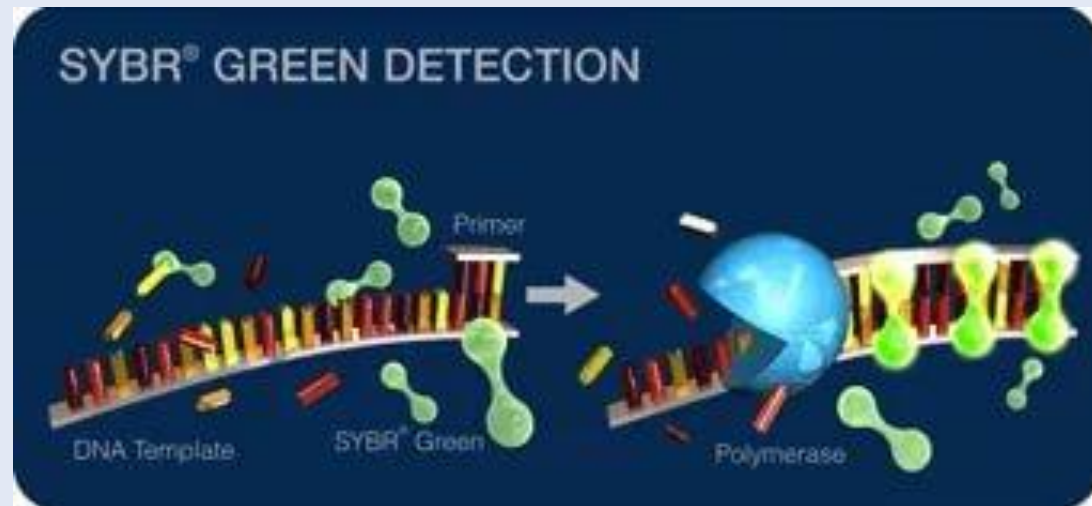
- интеркалирующие агенты (химические агенты, неспецифически связывающиеся с ДНК);
- зонды с флуорофорами.



Детекция продуктов амплификации

Самый популярный **интеркалирующий агент** — SYBR Green, флуорофор, резко увеличивающий флуоресценцию (в 1000 раз) после связывания с двухцепочечной ДНК. С односпиральными молекулами ДНК он не связывается. Таким образом, увеличение флуоресценции будет пропорционально увеличению количества ДНК в каждом цикле ПЦР.

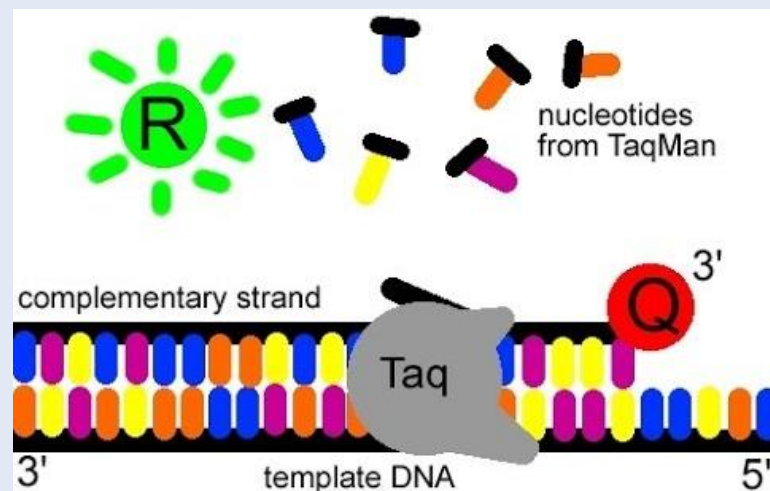
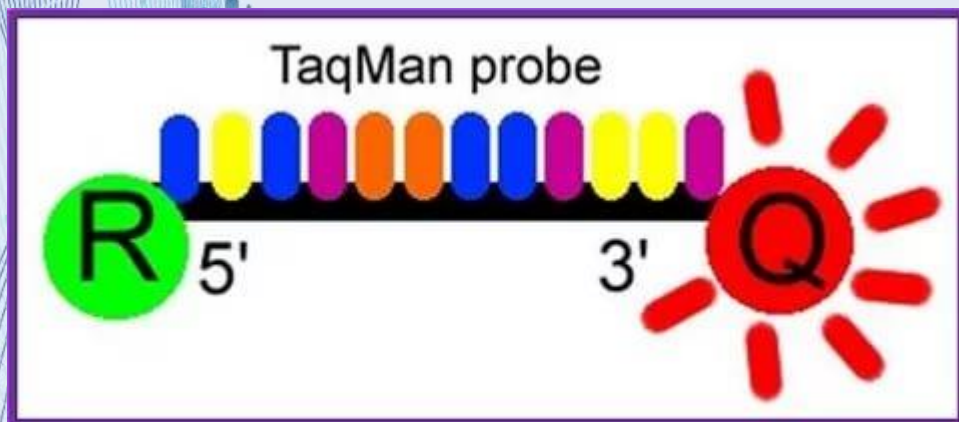
К сожалению, интеркалирующие агенты обладают низкой специфичностью: они могут связываться и с «побочными» продуктами реакции, и с димерами праймеров. Однако тщательный подбор праймеров и условий ПЦР минимизируют этот недостаток.



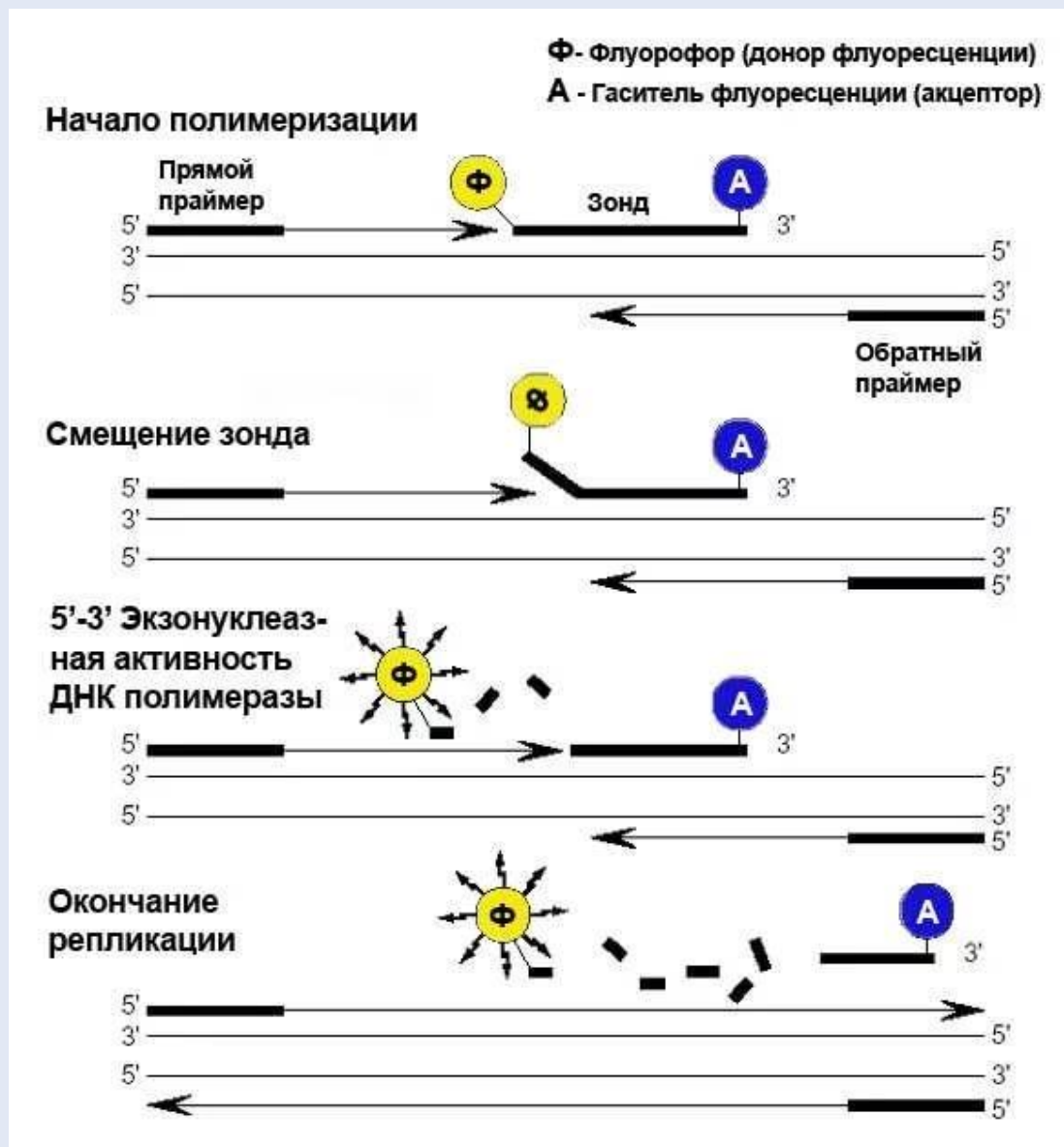
Детекция продуктов амплификации

Систем **зондов с флуорофорами** достаточно много. Подробно разберем лишь три самых распространенных.

TaqMan. Этот небольшой олигонуклеотид, комплементарный внутреннему участку амплифицируемого фрагмента ДНК, содержит два флуорофора: репортер и гаситель. Когда они находятся на одном зонде, то есть близко друг к другу, гаситель поглощает сигнал от репортера. Во время амплификации движущаяся по ДНК полимераза разрушает зонд, репортер и гаситель отдаляются друг от друга, и флуоресценция репортера становится заметной. Детекция свечения происходит на стадии элонгации.



Детекция продуктов амплификации



**Схема работы ПЦР "в реальном времени":
Taq Man Assay**

Детекция продуктов амплификации

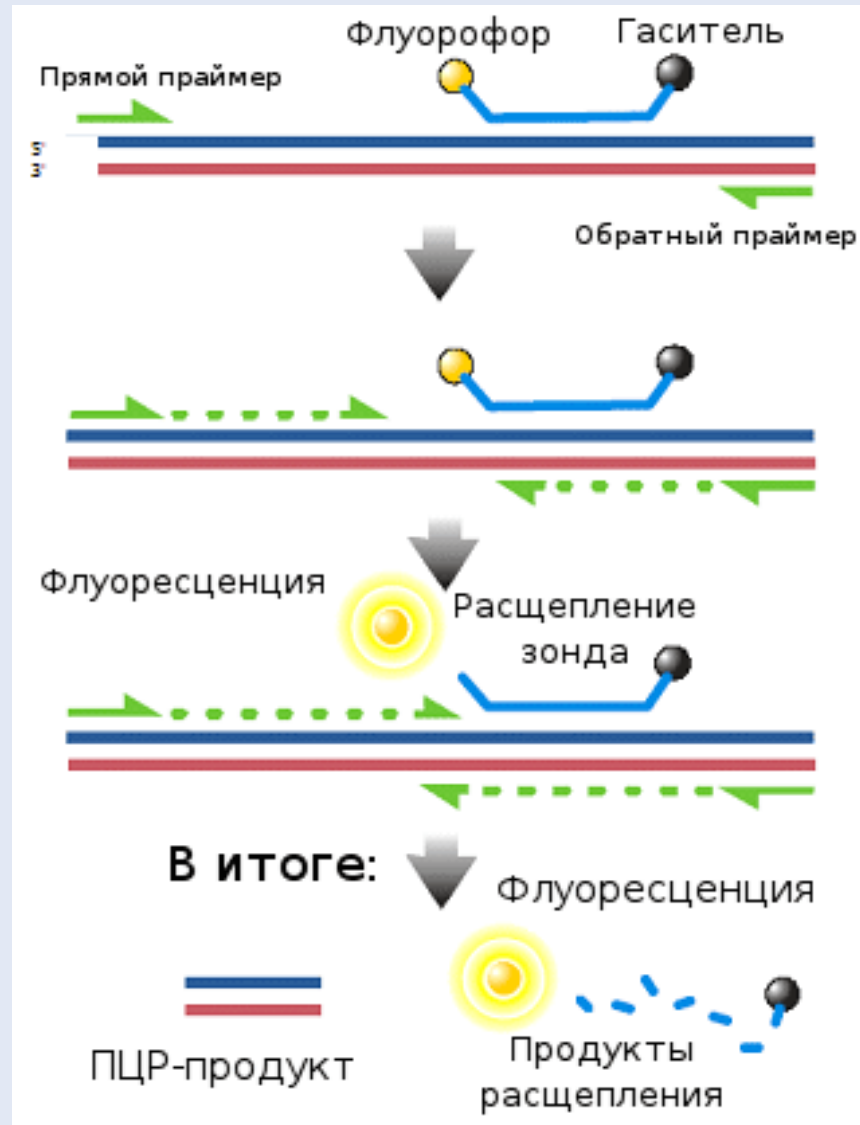
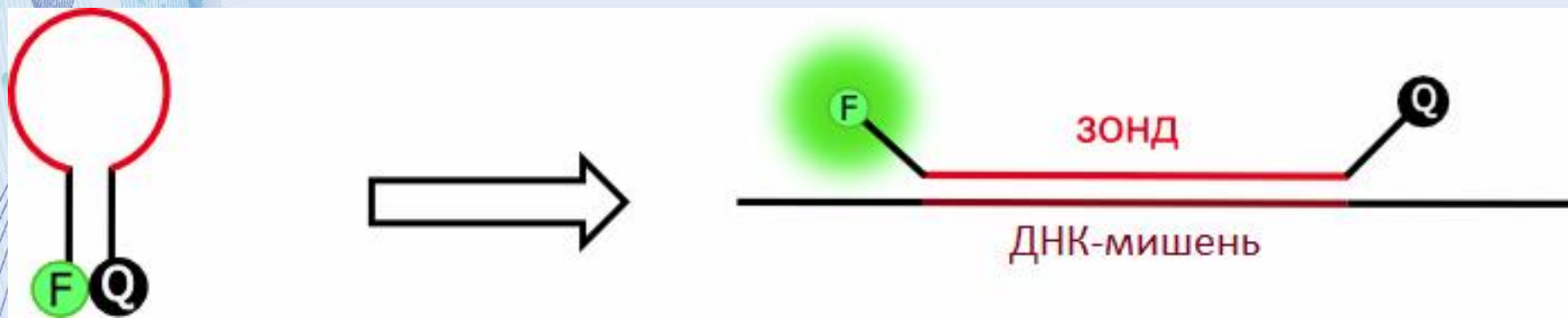


Схема работы ПЦР "в реальном времени": Taq Man Assay

Детекция продуктов амплификации

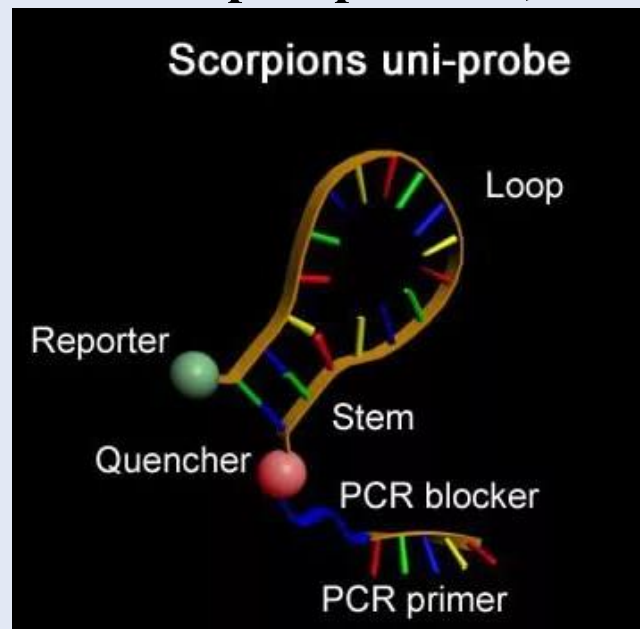
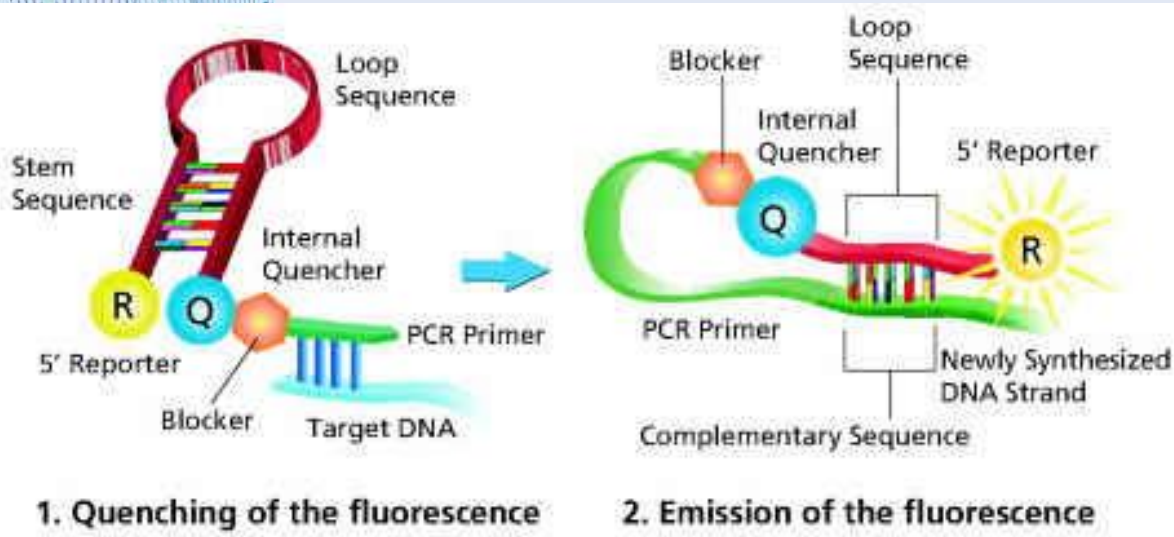
Молекулярные маяки (molecular beacons). Если в вышеописанном случае детекция свечения происходит на стадии элонгации, то здесь свечение фиксируют на этапе отжига праймеров.

Молекулярные маяки — это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, образующие петлю со шпилькой, на концах которой «пришиты» репортер и гаситель. Пока шпилька существует, гаситель находится рядом с репортером, подавляя его свечение. Как только зонд соединяется петлей с комплементарным участком ДНК, репортер и гаситель оказываются достаточно далеко друг от друга, чтобы началась флуоресценция. В процессе реакции флуоресцентный сигнал возрастает и коррелирует с количеством ПЦР-ампликона. Появляется дополнительная возможность разработки множественной ПЦР. Однако возрастание флуоресцентного сигнала не прямо пропорционально количеству ампликонов.



Детекция продуктов амплификации

Скорпионы (molecular scorpions). Это структуры, подобные молекулярным маякам, только на 3'-конце после гасителя к ним пришит праймер, с которого и начинается амплификация ДНК. Сигнал от репортера фиксируют в следующем цикле реакции: двухцепочечная ДНК денатурирует, на этапе отжига праймеров раскрывается шпилька зонда, и он, изгибаясь как хвост скорпиона, комплементарно соединяется с цепочкой ДНК, синтезированной как продолжение его праймера. Таким образом репортер с гасителем разносятся в пространстве, и появляется свечение.



Детекция продуктов амплификации

Taq-Man

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАЯК

СКОРПИОН

ИНТЕРКАЛИРУЮЩИЙ
КРАСИТЕЛЬ

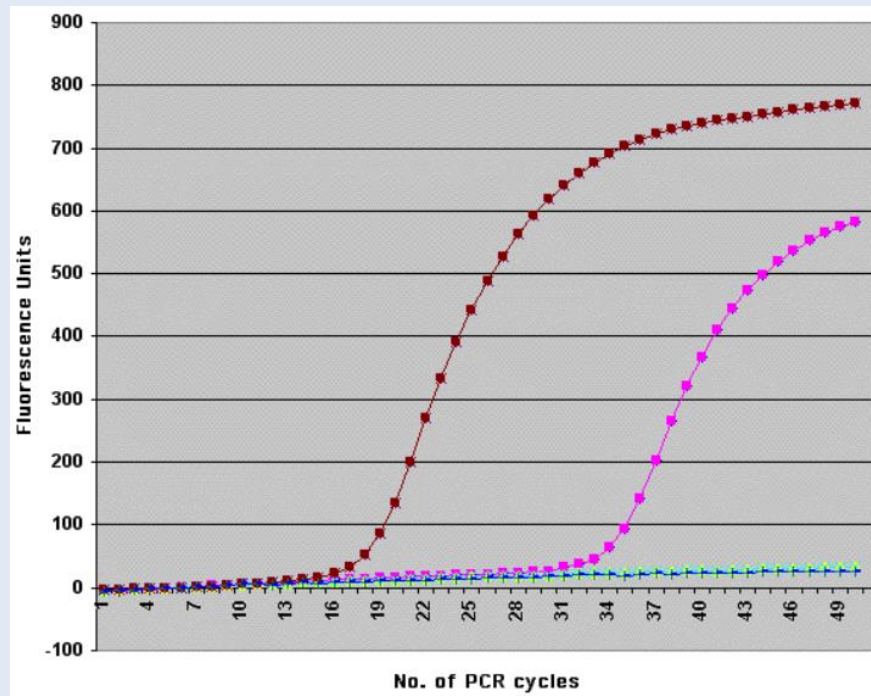
LUX-ПРАЙМЕР

SUNRISE-ПРАЙМЕР

Количественная ПЦР в реальном времени

Кинетическая кривая ПЦР в координатах "Уровень репортерной флуоресценции — цикл амплификации" имеет сигмоидную форму. В ней можно выделить три стадии:

1. Стадию инициации (когда ПЦР-продукты еще не детектируется флуоресцентной меткой).
2. Экспоненциальную стадию (в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР).
3. Плато (стадию насыщения).



Количественная ПЦР в реальном времени

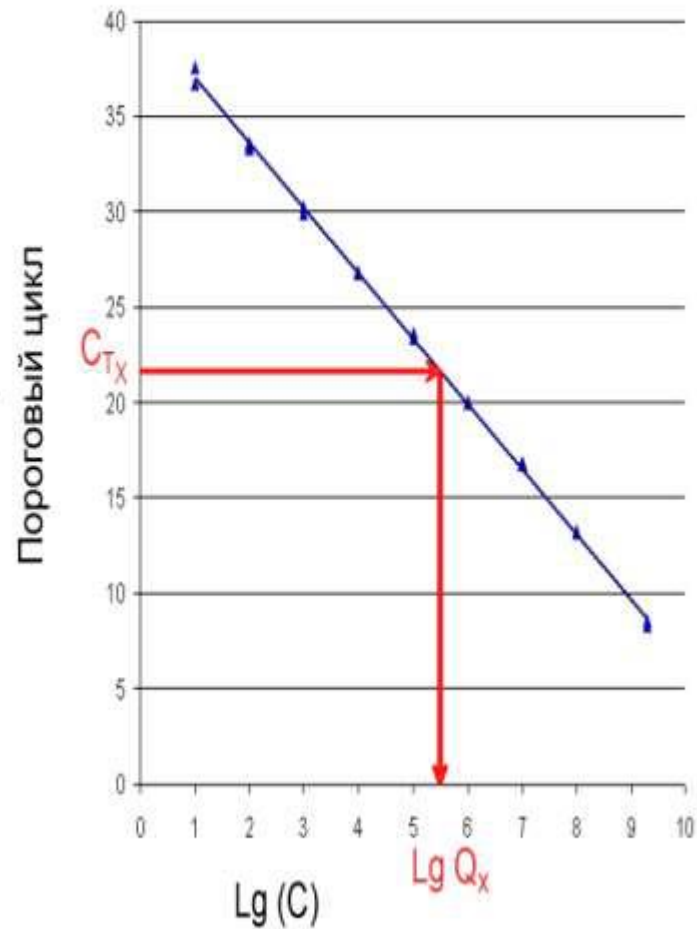
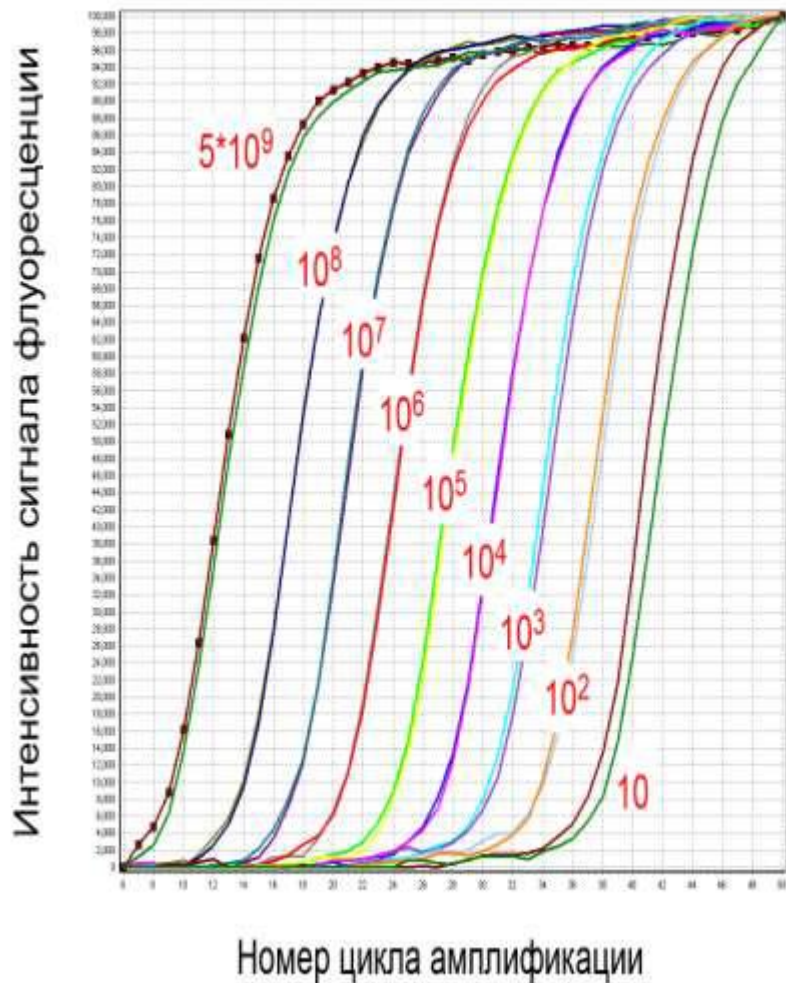
Кривая амплификации показывает увеличение концентрации ампликонов в образце, в процессе амплификации увеличивается и величина R_N - нормированный сигнал репортерного красителя (частное деления сигнала флюоресценции и флюоресцентного сигнала пассивного контроля).

Важным является определение порогового цикла C_t - номер первого цикла, в котором происходит увеличение флюоресцентного сигнала репортерной группы по сравнению с уровнем фонового сигнала. Его величина зависит от исходного количества копий матрицы и от эффективности амплификации ДНК. Базовую линию можно определить по умолчанию как точку на кривой амплификации, в которой величина dR_n равна значению порогового цикла, составляющего 0,2. Базовую линию можно также выставить вручную.

Для количественного анализа необходим стандарт (произвольный фрагмент ДНК или РНК, ограниченный теми же праймерами, что и в специфической ПЦР-системе). К каждому стандарту конструируется соответствующий зонд. Делают 10-кратные разведения стандарта и проводят ПЦР в реальном времени с использованием данных разведений. После проведения ПЦР и построения калибровочной зависимости величины C_t от исходного количества копий стандартов (IgN) для каждого из стандартов можно вычислить неизвестное исходное количество копий в анализируемых образцах с помощью интерполяции.

Количественная ПЦР в реальном времени

Пример абсолютного количественного анализа методом ПЦР-РВ

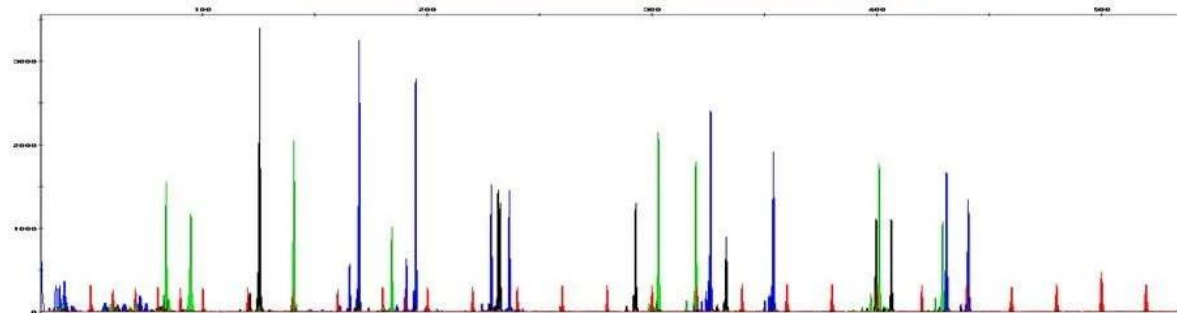
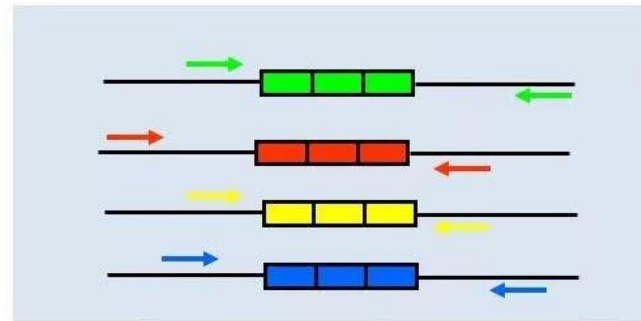


Преимущества ПЦР в реальном времени

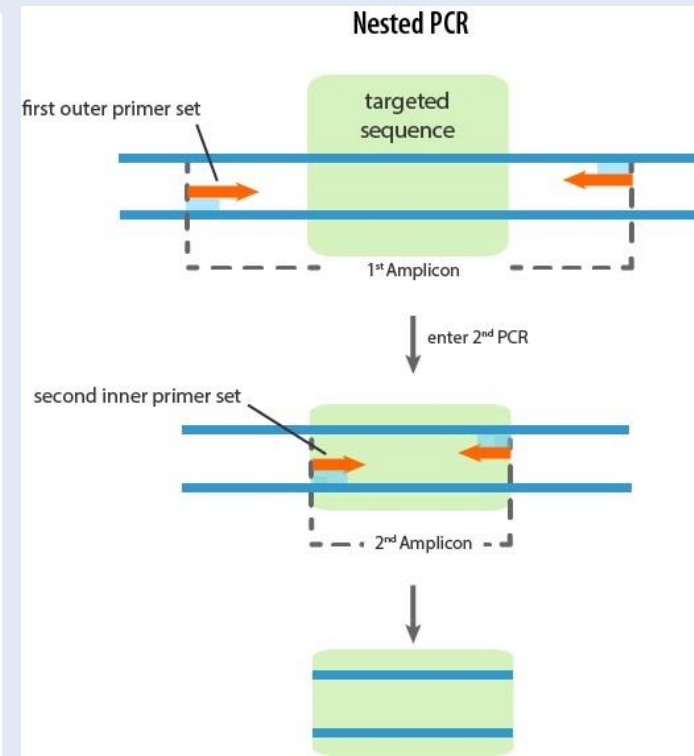
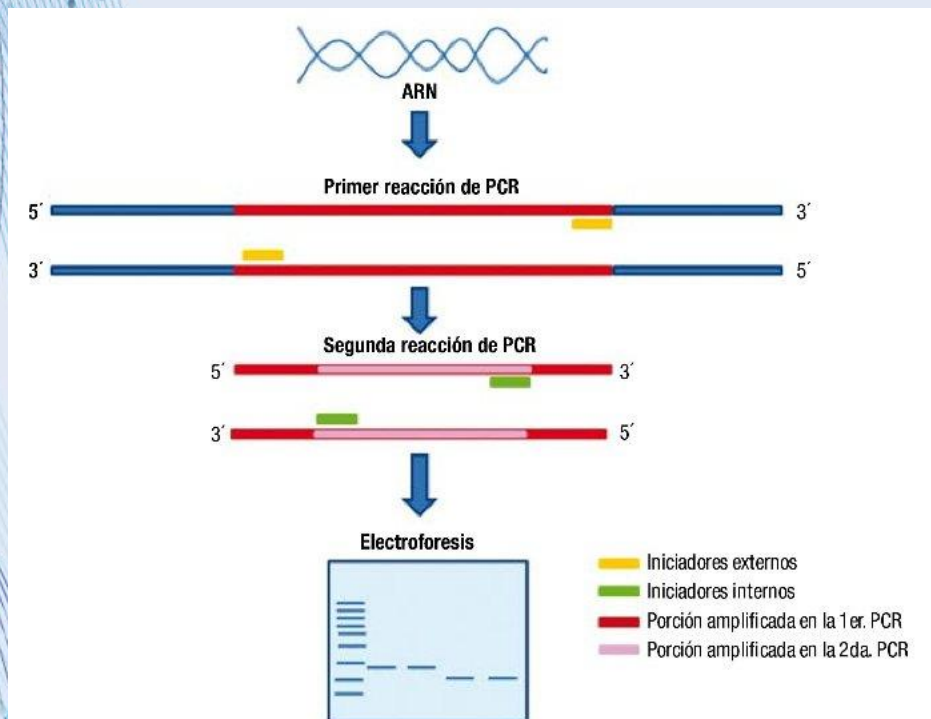
- Информацию о составе пробы и о ходе реакции можно получить, не открывая пробирку. Это ускоряет получение результата, снижает опасность контаминации. Наличие специфического зонда, комплементарного внутреннему участку фрагмента, дополнительно проверяет специфичность полученного фрагмента, снижает риск получения ложноположительных результатов.
- Регистрация интенсивности флюоресценции позволяет судить о количестве в пробе исходного инфекционного агента.
- Возможность проводить так называемую множественную ПЦР, т.е. регистрировать в одной реакции несколько инфекционных агентов, используя различные флюоресцентные красители.

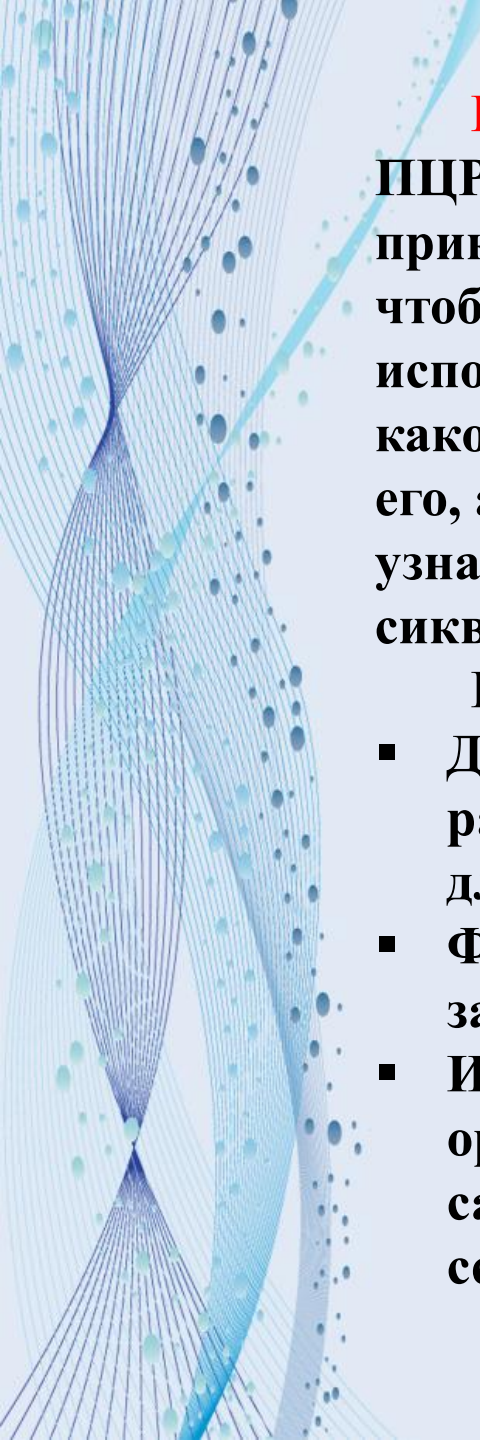
Мультиплексная ПЦР (multiplex PCR, ПЦР со множеством праймеров) позволяет выявить в одной пробе сразу несколько последовательностей, не проводить много реакций, экономит время и реактивы. Например, при инфекции несколькими патогенами, при диагностике комплекса заболеваний или при выявлении мутаций.

Суть ее в том, что в одну пробирку с ДНК-матрицей добавляют целый набор праймеров для одновременной амплификации нескольких интересующих фрагментов.



«Вложенная», «гнездовая» ПЦР (Nested PCR) - есть вторая пара праймеров, которая амплифицирует кусочек полученного кусочка. Полезна для уменьшения вероятности амплификации неспецифических фрагментов. Если, например, какие-то из праймеров «сядут» на незапланированные участки, после электрофореза в геле можно получить несколько полос — целевого фрагмента и побочных. Чтобы повысить специфичность реакции, используют два набора праймеров: первый — для амплификации более длинного фрагмента, второй — для амплификации внутреннего участка этого фрагмента. Несколько раундов ПЦР проводят с первым набором, а затем добавляют второй. Чтобы избежать продолжения амплификации с первыми праймерами, оба набора разрабатывают для отжига при разных температурах.



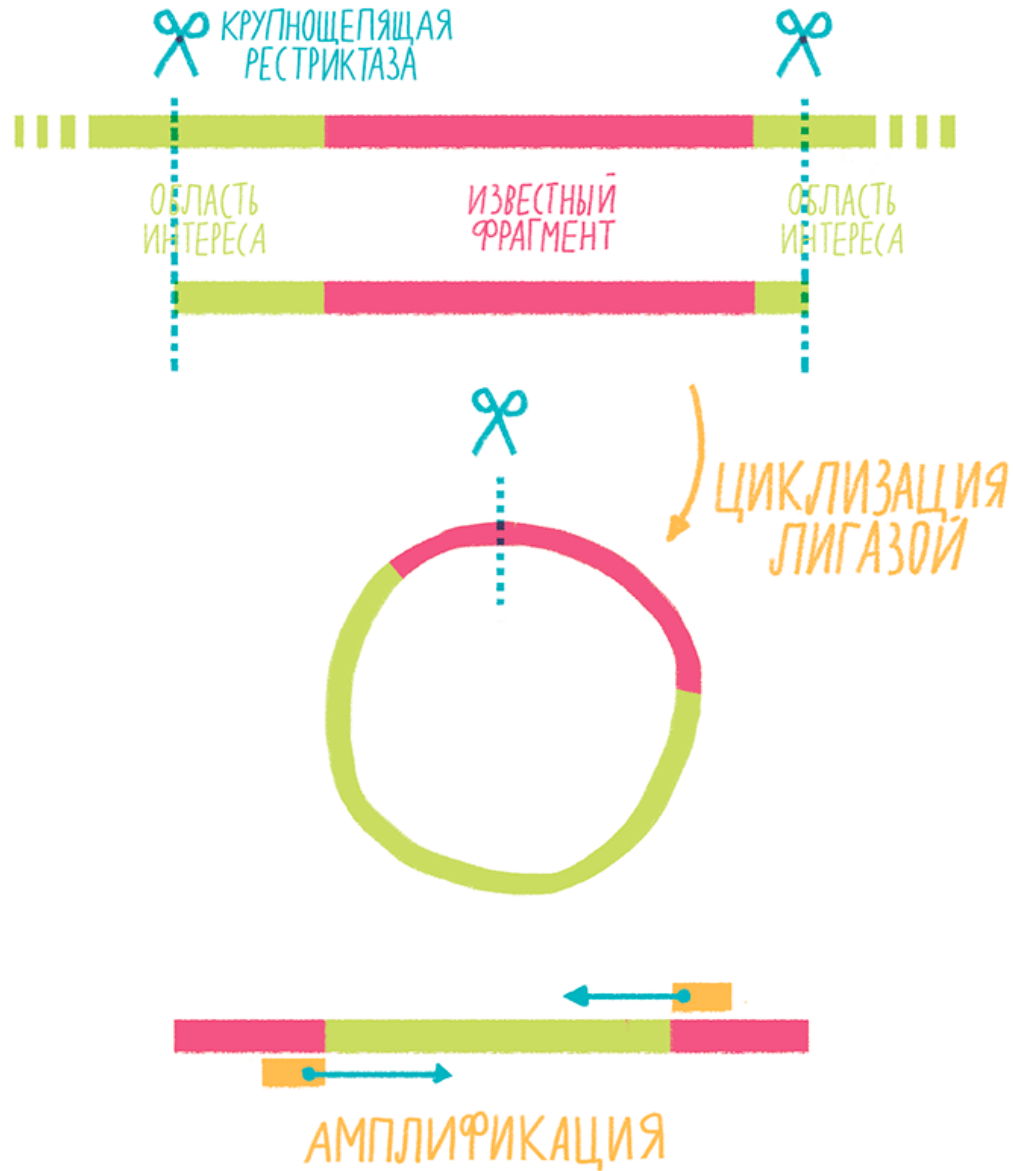


Инвертированная ПЦР (Inverse PCR) - перед проведением ПЦР с помощью серии ферментативных реакций как бы приклеивают известные фрагменты на концы неизвестного, чтобы можно было его амплифицировать. Этот вариант используют, когда известна последовательность (сиквенс) какого-то участка ДНК, но нужно амплифицировать вовсе не его, а то неизвестное, что его окружает (например, необходимо узнать, в какое место генома встроился вирус с известным сиквенсом).

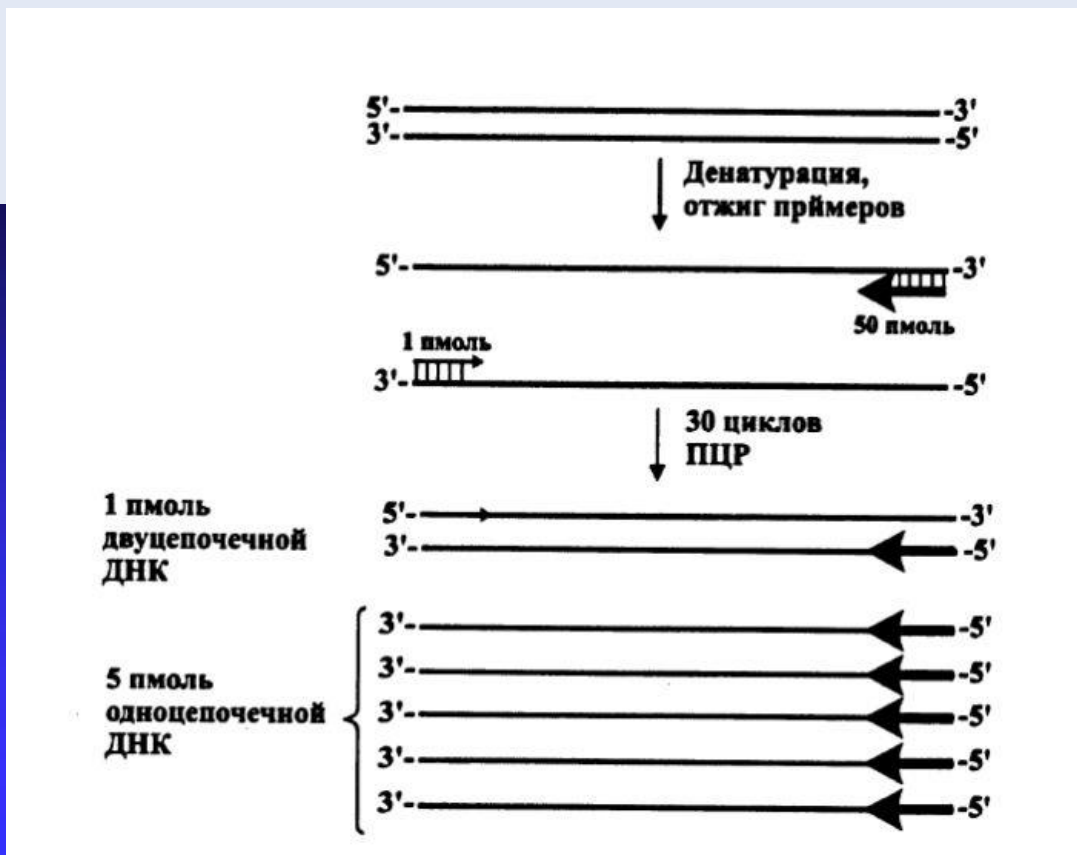
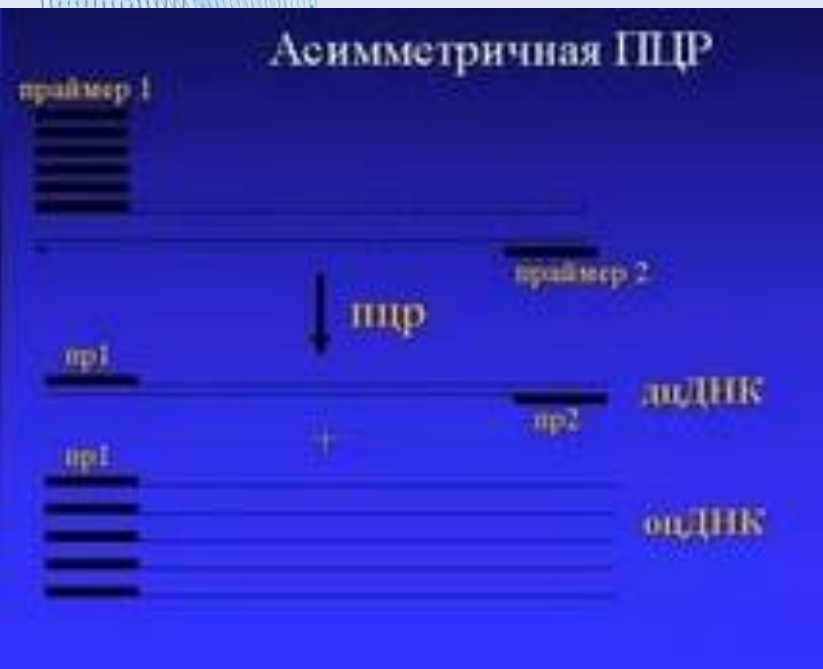
Инвертированная ПЦР состоит из нескольких этапов:

- ДНК, где есть участок с известной последовательностью, разрезают крупнощепящей рестриктазой на фрагменты длиной несколько т.п.н.
- Ферментом лигазой полученные фрагменты закольцовывают.
- Используя праймеры к известной последовательности, но ориентированные кнаружи от нее, амплифицируют ту самую, неизвестную, которую потом можно, например, секвенировать.

«Инвертированная» ПЦР (Inverse PCR)



Асимметричная ПЦР (Asymmetric PCR) – используют, если нужны продукты амплификации преимущественно одной из двух цепей ДНК (например, для последующей гибридизации). В таком случае в реакционной смеси концентрация одного праймера должна быть намного выше, чем другого, и тогда на выходе будут превалировать фрагменты нужной цепи.






Цифровая ПЦР (digital PCR) — более точный и воспроизводимый метод количественного определения ДНК, чем ПЦР в реальном времени. Стандартная ПЦР проходит во всём объеме образца, а при цифровой пробу делят на большое количество маленьких субъединиц (компарментов) и проводят ПЦР в каждой из них отдельно.

Методы разделения на компарменты в различных технологиях цифровой ПЦР отличаются друг от друга (используют масляную эмульсию, капилляры и т.д.), а реакцию проводят в планшетах с микролунками. Результаты визуализируют чаще всего с помощью системы TaqMan, но иногда применяют и интеркалирующие агенты (зеленую флуоресцирующую краску EvaGreen).

Метод дПЦР разработали австралийцы Алек Морли и Памела Сайкс в 1992 году.





Капельная цифровая ПЦР (кцПЦР, droplet digital PCR, ddPCR). Эту методику разработала компания QuantaLife, а в 2011 году Bio-Rad приобрела права на технологию.

В ddPCR из 20 мкл образца, в котором требуется определить количество исследуемой ДНК, создают водно-масляную эмульсию. Реакционную смесь разделяют на приблизительно 20 000 капель-реакций объемом около 1 нл каждая с помощью автоматического генератора капель. При этом генетический материал распределяется по каплям случайным образом: в них попадают как ДНК-мишени, так и фоновая ДНК. Процесс распределения целевой ДНК по каплям чисто случайный и подчиняется закону распределения малых чисел Пуассона. Перед разделением образца на капли не обязательно разводить его до концентрации, чтобы в каждой капле было либо 0, либо 1 копия ДНК-мишени: при анализе результатов учитываются ситуации, когда в одной капле находится более одной копии мишени.

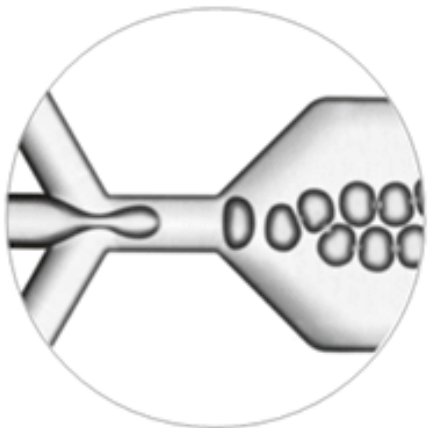
Капельная цифровая ПЦР

Капли вносят в 96-луночный планшет для ПЦР и помещают в циклер. Реакция проходит независимо в каждой капле. В тех каплях, куда попала ДНК-мишень, образуется ПЦР-продукт, что приводит к увеличению уровня флуоресцентного сигнала от флуоресцентной метки: либо TaqMan-зондов, либо интеркалирующего красителя.

После ПЦР в специальном устройстве (ридере) капли независимо друг от друга проверяют на наличие или отсутствие в них флуоресцентного сигнала. Количество капель с положительным и отрицательным сигналами подсчитывают для каждого образца, а программное обеспечение выдает концентрацию ДНК-мишени в виде числа копий в микролитре. Анализ продукта проходит в конечной точке после проведения ПЦР.

Схема цифровой ПЦР с использованием системы QX200™ от Bio-Rad

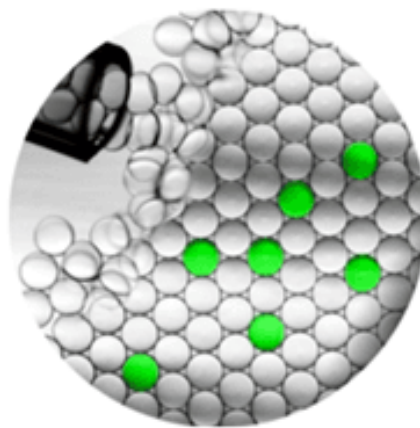
1. Создание
нанокапель



Генератор капель



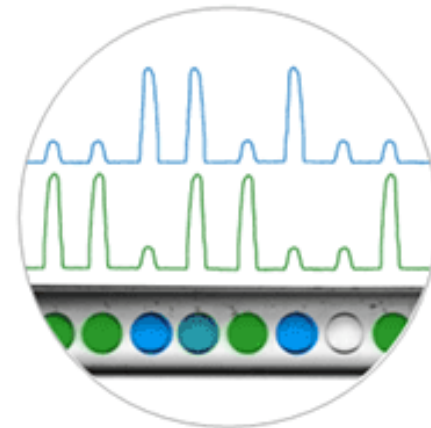
2. Амплификация



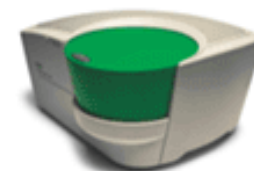
ПЦР
Термоциклер



3. Прочтение
флуоресценции
нанокапель

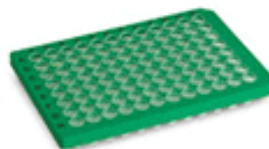


Ридер капель



96-луночный формат

BIO-RAD



Капельная цифровая ПЦР



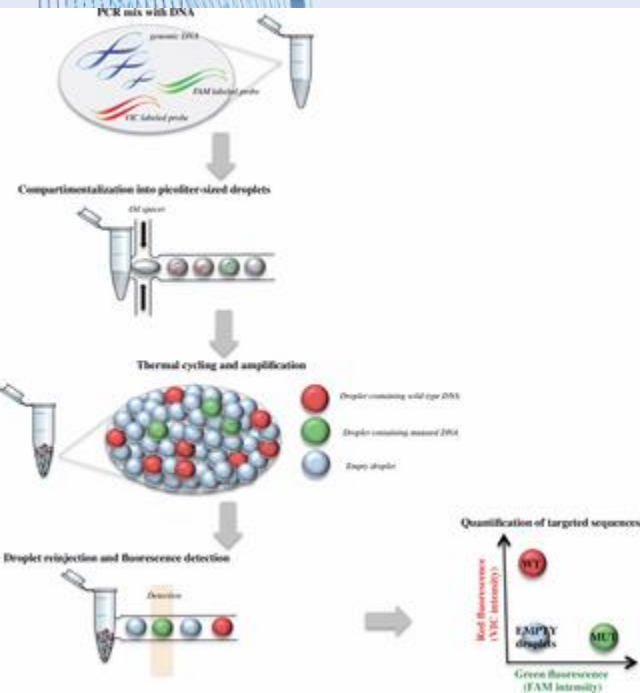
**Автоматическая шприц-пипетка
ридера каплеlь извлекает капли из
каждой лунки планшета для ПЦР**

Капельная цифровая ПЦР

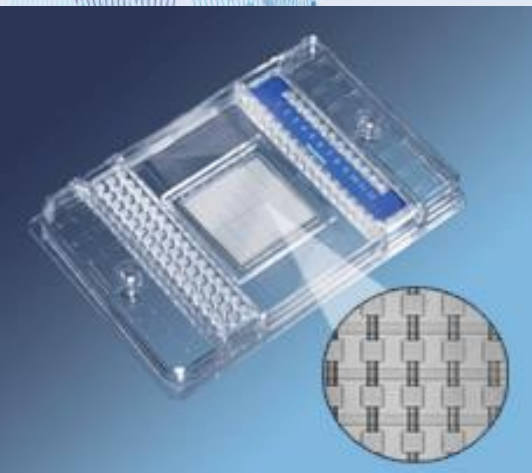
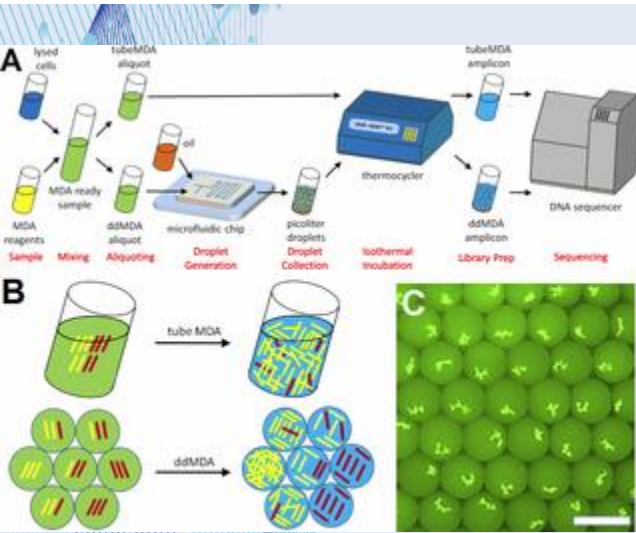
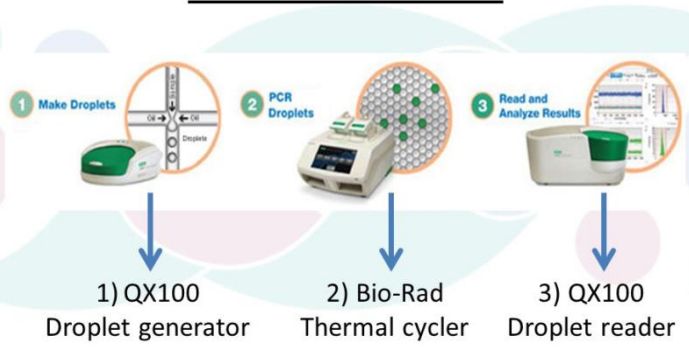
В кцПЦР определение количества ДНК-мишени проводят не относительно, используя калибровочную кривую, как в случае с ПЦР в реальном времени, а прямым подсчетом капель с наличием или отсутствием в них ДНК-мишени. Это существенно увеличивает стабильность системы и ее устойчивость к ингибиторам ПЦР.

При наличии только двух флуоресцентных каналов система позволяет запускать 4-5-плексные реакции за счет использования смеси зондов с одной нуклеотидной последовательностью, но меченных красителями FAM и HEX/VIC в различных пропорциях.

Возможно также проводить 2-3-плексные реакции с интеркалирующим красителем EvaGreen, используя различную «емкость» разноразмерных ПЦР-продуктов для интеркалятора, что позволяет независимо подсчитать количество этих продуктов по разнице уровня их флуоресценции.



ddPCR work flow



Применение капельной ПЦР

С помощью капельной цифровой ПЦР можно определять:

- количество интересующих молекул ДНК в образце;
- до 0,01% минорного (мутантного) генома в присутствии генома нормальной ткани;
- вариации числа копий гена (copy number variation, CNV);
- уровень экспрессии генов и микроРНК, включая детекцию небольших (до 10 %) изменений уровня экспрессии;
- различия в геномном контенте и экспрессии между единичными клетками.

КцПЦР используют:

- при проведении онкоисследований;
- для детекции нужных вариантов в экспериментах по геномному редактированию;
- для изучения геномики единичных клеток (single cell).

Несмотря на сходство применения цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени, скорее всего, в будущем ddPCR будет постепенно вытеснять real-time PCR как основной ПЦР-метод количественного определения ДНК.

Благодарю за внимание!

