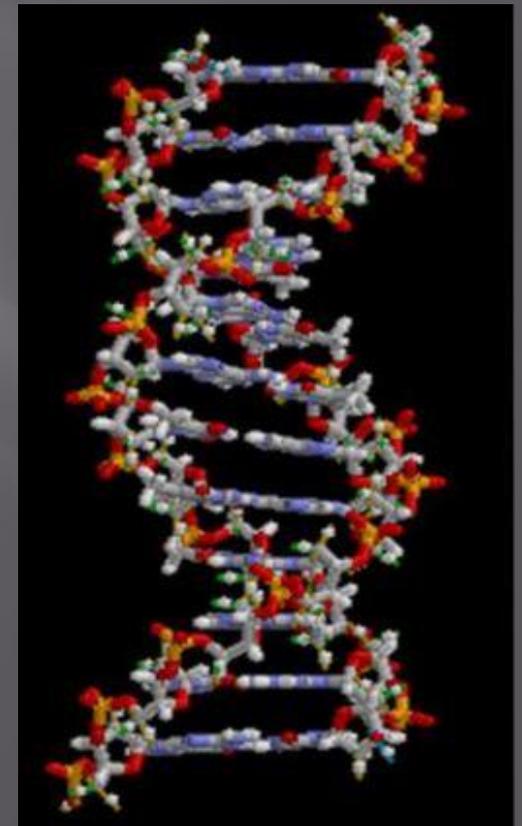


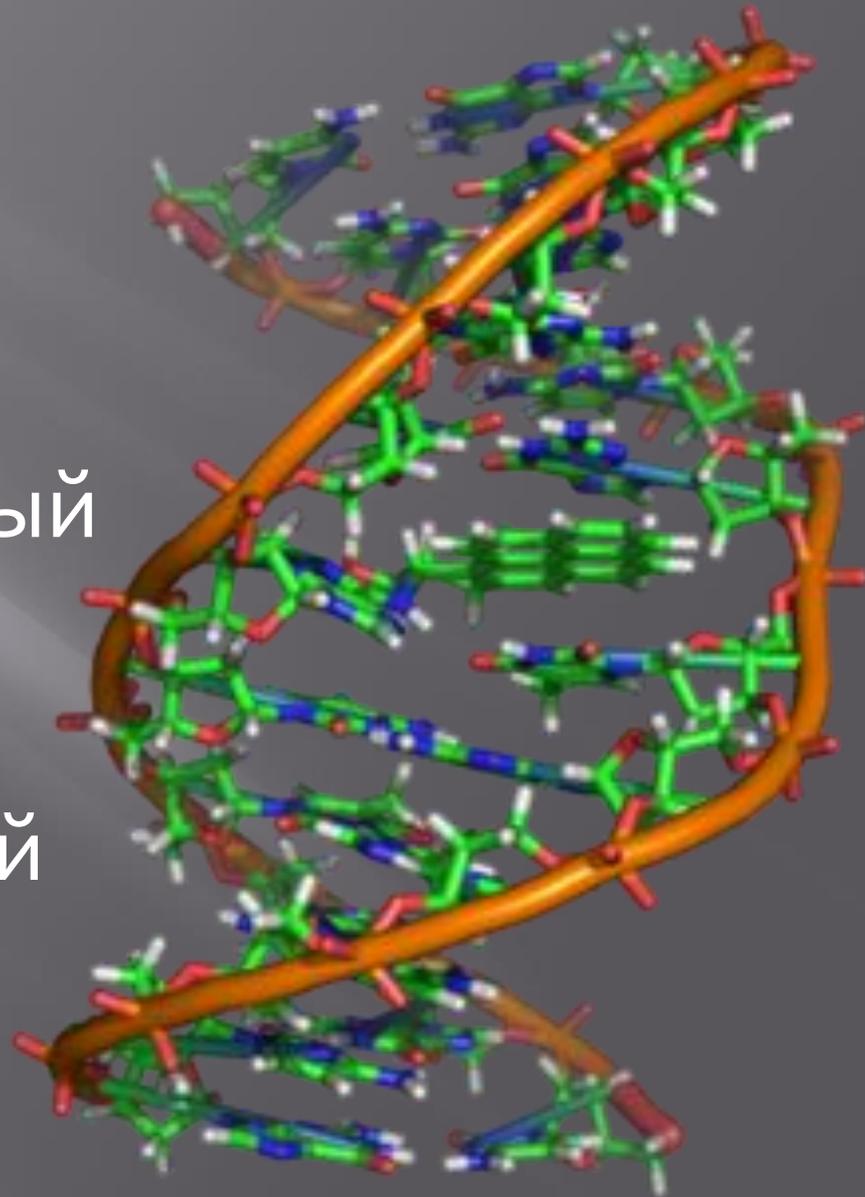
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ И МЕТОДЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Доцент кафедры молекулярной
биологии и генетики, к.м.н.
Замарина Т.В.



ДНК-диагностика — это один из наиболее современных высокотехнологичных методов исследования. ДНК-анализы широко применяются в диагностике инфекционных заболеваний, позволяя обнаруживать даже единичные микроорганизмы в организме человека.

ДНК-диагностика
объединяет
несколько методов
исследования, самый
распространенный
из них — метод
ПЦР (полимеразной
цепной реакции).



ПЦР диагностика

- ПЦР — (Polymerase chain reaction, PCR diagnostics) - расшифровывается как полимеразная цепная реакция.
- ПЦР диагностика — это метод лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, в частности, этот метод широко применяется и для диагностики ЗППП — заболеваний, передающихся половым путем.

- Анализ методом ПЦР основан на обнаружении в материале исследования небольшого фрагмента ДНК возбудителя той инфекции, которую подозревает врач. «Небольшой фрагмент ДНК» — это несколько сотен пар оснований ДНК — кирпичиков, расположенных в строго определенной последовательности, и потому образующих неповторимый узор. Для ПЦР-диагностики инфекций достаточно небольшого фрагмента, поскольку любая ДНК включает в себя не менее нескольких тысяч оснований.

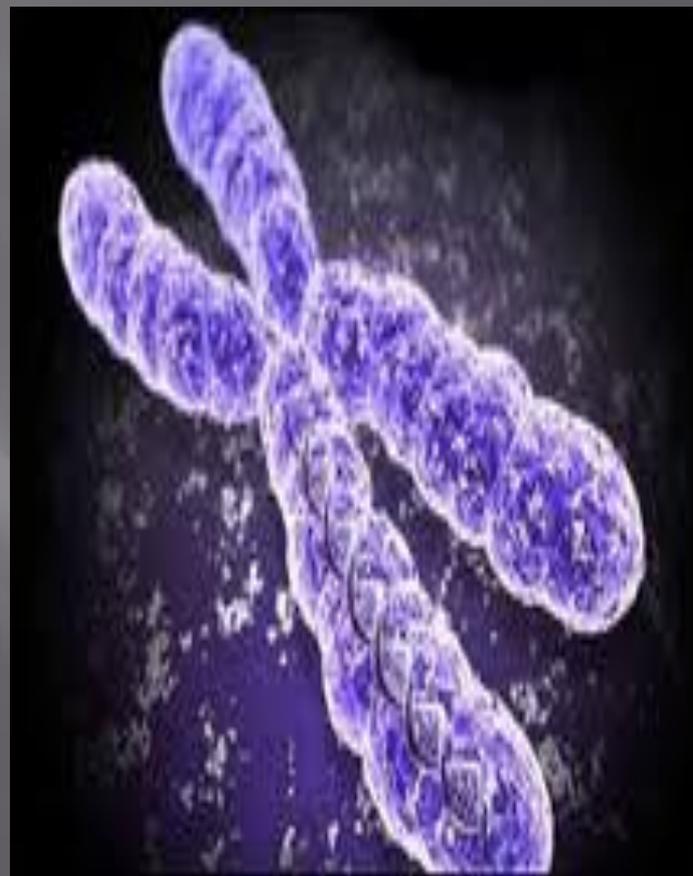
- ▣ При проведении ПЦР-анализа ведется поиск такого фрагмента ДНК инфекции, который специфичен только для данного микроорганизма. Это значит, что этот фрагмент ДНК «особенный» — он встречается только у этого микроба (или группы родственных микробов), но не встречается ни у одного другого микроба.
- ▣ Сама полимеразная цепная реакция (ПЦР-диагностика) используется для того, чтобы найденный фрагмент размножить, клонировать: чтобы однозначно «увидеть» эти фрагменты ДНК, к окончанию реакции их должно быть не менее 10^{12} штук.

Материал для сдачи ПЦР-анализа

Материалом для проведения ПЦР-диагностики может служить:

- соскоб эпителиальных клеток (соскоб из уретры у мужчин и у женщин, соскоб из цервикального канала)
- кровь, плазма, сыворотка крови

- биологические жидкости (сок простаты, плевральная, спинномозговая, околоплодная, суставная жидкости, слюна)
- моча (используется первая порция утренней мочи)
- мокрота
- биоптат желудка и двенадцатиперстной кишки
- слизь и другие биологические выделения



Как правильно подготовиться к ПЦР-анализу (ДНК-диагностике)

- ◎ Достоверность результатов лабораторной диагностики ПЦР зависит не только от опыта и профессионализма врача, возможностей данной лаборатории, но и от того, соблюдал ли пациент рекомендации врача, насколько правильной была его подготовка к проведению анализа. На самом деле ничего сложного в правильной подготовке нет.

При сдаче анализа методом ПЦР врачи рекомендуют соблюдать следующие правила:

- ◎ За сутки до проведения анализа не жить половой жизнью
- ◎ Сдача ПЦР анализа крови проводится натощак, т. е. необходимо ничего не есть, не пить и не жевать жвачку
- ◎ Для ПЦР-анализа мочи используется первая утренняя порция, собранная в чистый, стерильный контейнер

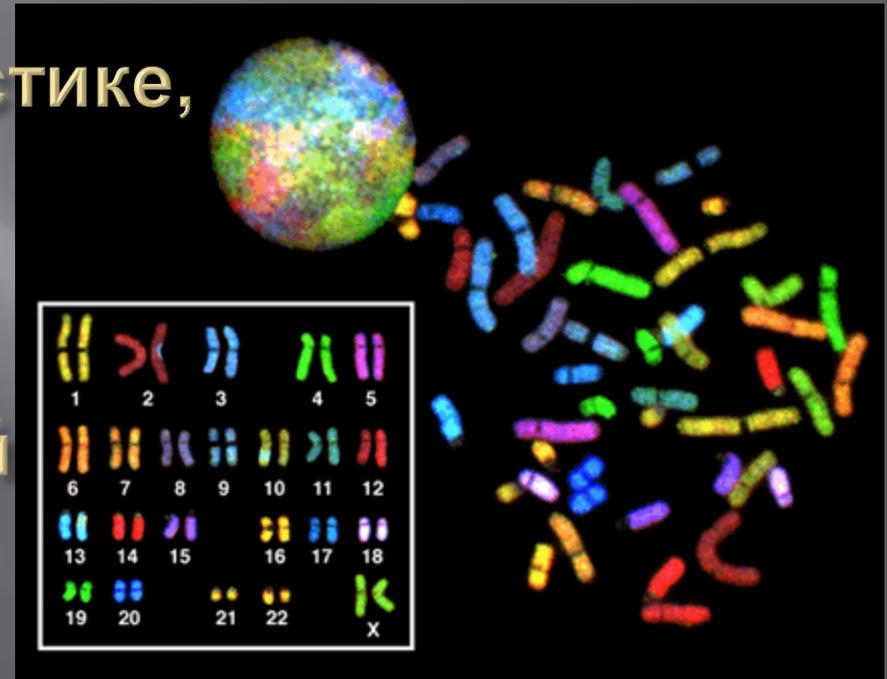
Срок изготовления



Результат ПЦР-диагностики обычно можно получить через 1,5—2 суток после сдачи анализа. Возможно получение результатов ПЦР-теста в течение одного дня.

Флюоресцентная гибридизация *in situ*, или метод FISH (англ. *Fluorescence in situ hybridization* - *FISH*) — цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*. Кроме того, FISH используют для выявления специфических мРНК в образце ткани. В последнем случае метод FISH позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в клетках и тканях.

Метод FISH используют
в преимплантационной,
пренатальной и
постнатальной
генетической диагностике,
в диагностике
онкологических
заболеваний, в
ретроспективной
биологической
дозиметрии.



Процедура гибридизации

На первом этапе происходит конструирование зондов. Размер зонда должен быть достаточно большим для того, чтобы гибридизация происходила по специфическому сайту, но и не слишком большой (не более 1 тыс п.о), чтобы не препятствовать процессу гибридизации. При выявлении специфических локусов или при окраске целых хромосом надо заблокировать гибридизацию ДНК-проб с неуникальными повторяющимися ДНК-последовательностями путём добавления в гибридизационную смесь немеченой ДНК повторов (например, Cot-1 DNA). Если ДНК-зонд представляет собой двуцепочечную ДНК, то перед гибридизацией её необходимо денатурировать

На следующем этапе приготавливают препараты интерфазных ядер или метафазных хромосом. Клетки фиксируют на субстрате, как правило, на предметном стекле, затем проводят денатурацию ДНК. Для сохранения морфологии хромосом или ядер денатурацию проводят в присутствии формамида, что позволяет снизить температуру денатурации до 70°.

- ▣ Далее к препарату добавляют зонды и осуществляют гибридизацию около 12 часов. Затем проводят несколько стадий отмывок для удаления всех негибридизовавшихся зондов. Визуализацию связавшихся ДНК-зондов проводят при помощи флуоресцентного микроскопа. Интенсивность флуоресцентного сигнала зависит от многих факторов — эффективности мечения зондом, типа зонда и типа флуоресцентного красителя.

Таким образом, общий вид протокола для постановки FISH можно представить в следующем виде:

1. **Подготовка гистологического или цитологического препарата.**

Подготовка гистологического препарата осуществляется по стандартной схеме: вырезка, маркировка, проводка, заливка, микротомия, помещение среза на предметное стекло и депарафинизация. При подготовке цитологического препарата используются специальные осаждающие растворы и центрифугирование, что позволяет получить концентрированную суспензию клеток.

▣ 2. Предварительная обработка (если необходимо).

Препарат обрабатывается протеазами, чтобы исключить присутствие белков, которые затрудняют гибридизацию.

3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация.

Для того, чтобы денатурировать зонд и ДНК образца, их обрабатывают формамидом и нагревают до температуры около 85-90°C.

3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация.

Для того, чтобы денатурировать зонд и ДНК образца, их обрабатывают формамидом и нагревают до температуры около 85-90°C.

4. Гибридизация.

После денатурации препарат охлаждают до определенной температуры (37°C в случае клинических исследований) и инкубируют во влажной камере в течение нескольких часов (продолжительность инкубации указана в каждом конкретном протоколе). В настоящее время для денатурации и гибридизации используют автоматические гибридайзеры.

5. Промывка.

После того, как гибридизация завершена, необходимо отмыть несвязавшиеся зонды, которые, в противном случае, создадут фон, затрудняющий оценку результатов FISH-анализа. Для промывки обычно используют раствор, содержащий цитрат и хлорид натрия (SSC).

6. **Контр-окрашивание.**

При помощи флуоресцентных красителей (DAPI - 4,6-диамидин-2-фенилиндол; йодид пропидия) проводится окраска всей ядерной ДНК.

7. **Анализ результатов при помощи**

флуоресцентного микроскопа. Выполнение рутинных операций (депарафинизация, предварительная обработка, промывка) может быть автоматизировано.

Цитогенетика – область науки, изучающая морфофункциональные особенности хромосом.

Цитогенетические методы можно подразделить на три группы: способы получения препаратов хромосом, их окрашивание и анализ.

Получение препаратов хромосом

Методы получения клеточных популяций с высокой митотической активностью подразделяют на прямые и непрямые.

При прямом методе для исследования берут клетки, активно делящиеся в организме. В онкогематологии используют клетки костного мозга и периферической крови в том случае, если в циркулирующей крови

содержание лейкоцитов составляет 30×10^9 и содержится 30% бластов .

В пренатальной диагностике наиболее часто используется хромосомный анализ клеток хориона и плаценты

Непрямые методы связаны с предварительным культивированием выделенных из организма клеток в питательной среде *in vitro*. Наиболее широкое распространение в клинической практике получил метод анализа хромосом из лимфоцитов периферической крови.

Циркулирующие в кровяном русле клетки в норме не пролиферируют. В культуральных условиях используют митогены, стимулирующие митотическое деление лимфоцитов.

- ▣ Существуют макро-, полумикро- и микрометоды культивирования лимфоцитов. Морфология хромосом сильно варьирует во время клеточного цикла и наилучшим образом визуализируется на стадии прометафазы и метафазы митоза, когда хромосомы максимально конденсированы и располагаются в одной плоскости в центре клетки отдельно одна от другой. При воздействии на размножающиеся клетки колхицином останавливается митотическое деление на стадии метафазы, обеспечивая накопление метафазных пластинок.

Для разобшиения хромосомного набора и разброса хромосом на предметном стекле, на клетки воздействуют гипотоническим раствором. Для этого используют разные по составу и концентрации солевые растворы. Чаще используют 0,55% (0,07M) раствор хлорида калия. Следующим этапом обработки является фиксация. В состав фиксаторов входит ледяная уксусная кислота в смеси с метиловым или этиловым 96 % спиртом в соотношении 1:3. Взвесь зафиксированных клеток наносят на предметное стекло и высушивают на воздухе.

Окрашивание хромосом

В 70е годы прошлого века получили развитие различные методики дифференциальной окраски хромосом, что позволило увидеть продольную исчерченность структуры хромосом. Хорошо выраженный образец этих «полосок» (banding) позволил идентифицировать каждую хромосому. Некоторые красители окрашивают различные участки хромосом с переменной интенсивностью в зависимости от структуры хроматина в данном участке, его нуклеотидного и белкового состава.

- ▣ В результате такого окрашивания получают уникальный паттерн чередования темных и светлых полос, специфичный для каждой хромосомы. Этот метод был применен для исследования клетки в определенной фазе деления, когда хромосомы конденсированы, и тогда стало возможным узнавать делеции и перестройки в структуре этих хромосом.

- ▣ В настоящее время существует несколько видов дифференциального окрашивания хромосом: **Q, G, R, C-окраски**. Каждый из них существует в нескольких модификациях по техническому выполнению. Для обозначения вида окраски используется система трехбуквенного обозначения, включающая основной метод окраски, вариант предварительной обработки препарата хромосом и название красителя (GTG, RHG, QFQ и т.д.). Структуры, выявляющиеся по длине хромосом в соответствии с типом окраски, называют Q, G, R, C-сегментами (bands).
- ▣ Методики, с помощью которых получают G-окраску хромосом, разнообразны

- ▣ Общим для них является наличие предварительной обработки препаратов и использование тиазиновых красителей.
- ▣ По характеру постфиксационной обработки методы подразделяются на следующие группы:
 - ▣ 1) инкубация препаратов в буферных растворах, не содержащих ионы кальция и магния при температуре не выше $+37^{\circ}\text{C}$;
 - ▣ 2) инкубация в буферных растворах, но при высоких температурах ($+60^{\circ}\text{C}$ и выше);

- ▣ 3) инкубация в растворах протеолитических ферментов (трипсина, проназы, др. протеаз);
- ▣ 4) инкубация препаратов с депротеинизирующими веществами (мочевина, 2-меркаптоэтанол и др.);
- ▣ 5) комбинированное воздействие на препараты щелочью и высокой температурой при инкубации в SSC.

- ▣ Наиболее широкое распространение получила методика предварительной обработки трипсином . При использовании красителя по Романовскому-Гимзе (G-бендинг), хромосомы приобретают вид серии темных и светлых полос или бэндов (bands). Рисунок при R-окраске противоположен рисунку при G-окраске. Интенсивность окраски хромосом обычно более слабая

- ▣ Ключевым моментом методики является нагревание препаратов
- ▣ при высокой температуре (78-90°C). Окрашивание препаратов может производиться красителем Романовского-Гимзы. Анализ при этих типах окрашивания выполняется с помощью светового микроскопа.

- ▣ Q-окрашенные хромосомы анализируются с помощью люминесцентной микроскопии.
- ▣ Наиболее часто используются производные акридина: акрихин и акрихин-иприт. Реже используют производное бибензимидазола, известное под названием Hoechst 33258.

- ▣ Q-окрашивание выявляет хромосомы с образованием **Q-исчерченности (Q-бендинг)** поперечными флуоресцентными полосами, что позволяет идентифицировать хромосомы. При такой окраске анализ проводят с использованием флуоресцентного микроскопа. В отличие от других методов дифференциальной окраски при C-окраске в каждой хромосоме человека краситель воспринимают только центромерные и околоцентромерный участки во всех хромосомах, а также длинное плечо Y-хромосомы.

Цитогенетическая номенклатура

- ▣ На Парижской конференции по номенклатуре обозначений в цитогенетике человека была разработана и в настоящее время вошла в практику цитогенетического анализа система нумерации сегментов и районов при дифференциальной окраске хромосом и обозначения хромосомных изменений (Paris Conference, 1971). Этот документ содержит рекомендации по описанию линейной дифференцировки структуры хромосом по единой форме. Каждая хромосома рассматривается как непрерывная совокупность сегментов, независимо от интенсивности их окраски.

Хромосомные плечи обозначаются латинскими буквами p (короткое плечо) и q (длинное плечо), подразделяются на районы и сегменты. Районы и сегменты нумеруются арабскими цифрами, от центромеры к теломере, отдельно для каждого плеча. Рисунок каждой пары хромосом является специфичным для нее. Размеры сегментов неодинаковые. В мелких хромосомах рисунок образуется меньшим числом сегментов, в крупных хромосомах их много. Общее количество окрашенных и неокрашенных сегментов в нормальном хромосомном наборе человека средней степени конденсации метафазных хромосом, в соответствии с Парижской номенклатурой, примерно 350. В прометафазных и профазных хромосомах их число увеличивается до 1000 и более.

Цитогенетический анализ – это анализ хромосом с помощью микроскопа. Цели хромосомного анализа могут быть различными. В медицинской цитогенетике главная задача анализа – определить, нормален ли кариотип пациента, или нет, и в чем состоят отклонения.

- ▣ Совокупность морфологических особенностей полного хромосомного набора, свойственного клеткам данного вида, обозначается термином «кариотип». Специфичность кариотипа каждого вида определяется общим числом хромосом, их размером и формой. Кариотипированием называют исследование количества и строения хромосом. В процессе анализа первоначально определяют, соответствует ли число хромосом в клетках нормальному. Затем хромосомы идентифицируются согласно существующей последней номенклатуре, и их структура характеризуется как нормальная, или аберрантная.

G-окраска препаратов с использованием трипсина (Seabright M., 1971)

Перед окрашиванием стекла с препаратами помещают в термостат на ночь при t 600С.

Использованные реагенты:

- раствор трипсина: 10 мг кристаллического трипсина растворяют в 100 мл фосфатного буфера.
- раствор красителя: на 40 мл фосфатного буфера берется 7,5 мл красителя по Романовскому – Гимзе и 1,2 мл метанола.
- метанол.

- ▣ **Окрашивание:** раствор трипсина подогревают до 37°C (температура должна быть постоянной). В стаканчик с трипсином опускается стекло на 10-12 сек. Затем ополаскивается в стаканчике с метанолом и переносится в раствор красителем. Время окрашивания подбирается эмпирически, начиная с 6 сек. По истечении этого времени проводят контроль окрашивания под микроскопом при увеличении 40х, не смывая краситель со стекла.

- ▣ Если хромосомы бледно окрашены, увеличивают время окраски под контролем микроскопа. Если в хромосомах отсутствуют бенды, это значит, что время воздействия трипсина недостаточно, его следует увеличить при проведении процедуры со следующим стеклом. После достижения хорошего окрашивания препарат моют под проточной водой

- ▣ **G-окраска препаратов с использованием стандартного солевого раствора, или SSC (Sumner A et al., 1971)**
- ▣ Стекла помещают в емкость с 0,2 N HCL на 1 час при комнатной температуре. Каждое стекло промывают в трех порциях дистиллированной воды. Подсушивают стекла, ставя на ребро на фильтровальной бумаге.

- ▣ Каждое стекло проводят через подогретый до 600С 5%раствор Ва (ОН)2 в течение 10 сек. Стекла промывают в 0,1 N HCL и 3-х порциях дистиллированной воды, подсушивают. Помещают стекла в буферный раствор 2SSC и ставят их в термостат или водяную баню при t650С на 2 часа. Вынимают стекла из буферного раствора и подсушивают (на ребре) на фильтровальной бумаге. Окрашивают раствором красителя по Романовскому –Гимзе, приготовленном на фосфатном буфере из расчета 40 мл буфера и 3-7 мл красителя.

- ▣ Окрашивание производят несколько минут под контролем микроскопа. Время окрашивания подбирают, начиная с 1 мин. После окрашивания центромерные области должны быть интенсивно окрашены. После получения такой картины, препараты промывают водопроводной водой.
- ▣ **G-окраска без предварительной обработки препаратов (Селезнев Ю.В. 1972)**
- ▣ Препараты окрашивают раствором азур-эозина по Романовскому – Гимзе на фосфатном буфере с рН 6,8. Концентрация раствора и время окраски подбирается эмпирически.

- ▣ **G-окраска препаратов с использованием стандартного солевого раствора, или SSC (Sumner A et al., 1971)**
- ▣ Стекла помещают в емкость с 0,2 N HCL на 1 час при комнатной температуре. Каждое стекло промывают в трех порциях дистиллированной воды. Подсушивают стекла, ставя на ребро на фильтровальной бумаге.

- ▣ Каждое стекло проводят через подогретый до 600С 5%раствор Ва (ОН)2 в течение 10 сек. Стекла промывают в 0,1 N HCL и 3-х порциях дистиллированной воды, подсушивают. Помещают стекла в буферный раствор 2SSC и ставят их в термостат или водяную баню при t650С на 2 часа. Вынимают стекла из буферного раствора и подсушивают (на ребре) на фильтровальной бумаге. Окрашивают раствором красителя по Романовскому –Гимзе, приготовленном на фосфатном буфере из расчета 40 мл буфера и 3-7 мл красителя.

Q-метод

- ▣ **Окраска препаратов акрихин-ипритом (QFQ)**
- ▣ Промыть стекло в дистиллированной воде, затем в буфере Мак-Ильвейна. Опустить стекло в стаканчик с красителем акрихин-ипритом на 10-20 минут. Промыть стекло в буфере Мак-Ильвейна. Заключить стекло в смесь лицерин-вода (1:1). После окрашивания хромосомы имеют дифференцированность по длине, аналогичной G-бендированию, Y-хромосома, спутники акроцентрических хромосом, центромерные районы 3 и 4 хромосом имеют сверх яркое (бриллиантовое)

- ▣ **Окраска препаратов флюорохромом Hoechst 33258 (Hilwig I., Gropp A., 1972)**
- ▣ Краситель готовят на сбалансированном растворе Хенкса с концентрацией флюорохрома 0,05 мкг/мл. Время окрашивания – 10 мин. Препарат промывают в воде и заключают в уксуснокислый буфер с рН 5,5. Для получения более четкой дифференцированности окрашенные препараты следует выдерживать в темноте в течение 3-7 дней.

Р-окраска с использованием термической обработки и красителя Романовского-Гимзы (Dutrillaux B., 1973; Dutrillaux B., Covic M., 1974)

Препараты инкубируют при температуре + 87° в растворе Эрла (рН 6,5). Время инкубации варьирует от 1,2-2 ч для односуточных препаратов до 10 мин для препаратов месячной давности. Окраску производят раствором Романовского-Гимзы на фосфатном буфере с рН 6,7. Время и концентрация раствора подбирается эмпирически.

- ▣ **Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**
— экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

- ▣ Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

История возникновения

- В начале 1970-х годов норвежский учёный Хьелль Клеппе из лаборатории нобелевского лауреата Хара Гобинды Хораны предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК — синтетических праймеров. Однако в то время эта идея осталась нереализованной. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была изобретена в 1983 году американским биохимиком Кэри Муллисом. Его целью было создание метода, который бы позволил амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. Первая публикация по методу ПЦР появилась в ноябре 1985 года в журнале Science. Через 8 лет после этого за изобретение метода ПЦР К. Муллис получил Нобелевскую премию.

Проведение ПЦР

- ▣ Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК.

- ▣ В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований (3 kbp). С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20 – 40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований.

Компоненты реакции

- ▣ Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:
- ▣ ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- ▣ Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

- ▣ Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- ▣ Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

- ▣ Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- ▣ Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — рН, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.
- ▣ Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

- ▣ Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, до ортофосфата. Пирофосфат может ингибировать ПЦР-реакцию.

Праймеры

- ▣ Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18 – 30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

- ▣ После гибридизации матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы (см. ниже).
- ▣ Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица.

- ▣ T_m — температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером. Усредненная формула подсчета T_m для короткого олигонуклеотида (и для длинных ДНК фрагментов), с учетом концентрации ионов K^+ и DMSO:
- ▣ где L — количество нуклеотидов в праймере, K^+ — молярная концентрация ионов калия, $G+C$ — сумма всех гуанинов и цитозинонов.

- ▣ В случае неверного выбора длины и нуклеотидного состава праймера или температуры отжига возможно образование частично комплементарных комплексов с другими участками матричной ДНК, что может привести к появлению неспецифических продуктов. Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °С.

- ▣ При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:
- ▣ GC-состав ~ 40 – 60 %;
- ▣ близкие T_m праймеров (отличия не более, чем на 5 °C);
- ▣ отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилек и димеров;
- ▣ желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

▣ **Амплификатор**

ПЦР проводят в амплификаторе – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Ход реакции

- ▣ Обычно при проведении ПЦР выполняется 20 – 35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий (рис. 2).

Денатурация

- ▣ Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94 – 96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5 – 2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется денатурацией, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно, перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2 – 5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров.

Отжиг

- ▣ Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается равной температуре плавления праймеров. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

- ▣ Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °C и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60-72 °C.

Элонгация

- ▣ ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5' к 3' концу. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С.

- ▣ Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7 – 10 мин.

Разновидности ПЦР

- ▣ **Вложенная ПЦР (Nested PCR (англ.))**
— применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

- ▣ **Инвертированная ПЦР (Inverse PCR (англ.))**
— используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно.

- ▣ ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR (англ.)) – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную кДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР. Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены.

- ▣ **Асимметричная ПЦР (англ. Asymmetric PCR)** – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке. концентрацией. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддержать эффективности реакции на протяжении всех циклов.

- ▣ **Количественная ПЦР (Quantitative PCR, Q-PCR (англ.))** или ПЦР в реальном времени — используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры или ДНК-зонды для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления;

- ▣ **Ступенчатая ПЦР (Touchdown PCR (англ.))** — с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной.. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72-75°C, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60-65°C.

- ▣ Метод молекулярных колоний (ПЦР в геле, англ. Colony - PCR Colony) – акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний.

- ▣ ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (англ. *Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR*).
- ▣ ПЦР длинных фрагментов (англ. *Long-range PCR*) – модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз, одна из которых – Taq-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК полимеразы с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это Pfu полимеразы. Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой, так как Taq-полимераза останавливает синтез ДНК если был добавлен не комплементарный нуклеотид.

- ▣ RAPD (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA), ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК — используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов.

- ▣ **Групп-специфическая ПЦР (англ. group-specific PCR)** – ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов. Противоположный этому методу является – уникальная ПЦР (англ. unique PCR), в котором задача состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

- ▣ **ПЦР с использованием горячего старта** (англ. Hot-start PCR) — модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами или имитирующие антитела небольшими молекулами типа Affibody, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95 °С в течение 10 минут.

- ▣ **Виртуальная ПЦР (англ. *in silico* PCR, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, e-ПЦР)**
— математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы, кольцевой ДНК или любого другого участка ДНК.

Применение ПЦР

- ▣ **Криминалистика**
- ▣ ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически — одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью электрофореза ДНК. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (англ. genetic fingerprint).

- ▣ Установление отцовства
- ▣ Медицинская диагностика
- ▣ ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

- Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого — отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее. Для того, чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием



**Спасибо за
внимание 😊**