

Коломыткин О. В.

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(ПЦР, РСР)**

Учебное пособие



Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

О. В. Коломыткин

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(ПЦР, PCR)**

Учебное пособие

Электронное издание
локального распространения

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2024

© Коломыткин О. В., 2024
ISBN 978-5-907804-48-7

УДК 577.2:61
ББК 28.070
К61

Автор:

О. В. Коломыткин – доктор физико-математических наук,
профессор Научно-образовательного центра Института теоретической и
экспериментальной биофизики Российской академии наук

Рецензенты:

Г. Д. Миронова – доктор биол. наук, Заслуженный деятель наук РФ, профессор, заведующая
лабораторией Митохондриального транспорта Института экспериментальной и теоретической
биофизики РАН;

А. А. Кособрюхов – доктор биол. наук, заведующий лабораторией Экологии и физиологии
фототропных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН

К61 Коломыткин О. В. Биофизические принципы метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) [Электронный ресурс]: учебное пособие. / О. В. Коломыткин. – Электрон, текстовые дан. (3,8 Мб). – СПб.: Научное издание, 2024. – 24 с. – 1 электрон., опт. диск (CD-ROM).

ISBN 978-5-907804-48-7

В учебном пособии представлены современные данные о полимеразной цепной реакции и её применении в научных исследованиях и медицинской диагностике.

Учебное пособие предназначено для аспирантов и студентов при подготовке для проведения практических лабораторных занятий по применению полимеразной цепной реакции.

Учебное пособие одобрено для публикации на заседании Учёного совета ИТЭБ РАН
21 марта 2024 г., протокол № 2.

Текстовое электронное издание

Минимальные системные требования:

- процессор: Intel x86, x64, AMD x86, x64 не менее 1 ГГц;
- оперативная память RAM ОЗУ: не менее 512 МБайт;
- свободное место на жестком диске (HDD): не менее 120 МБайт;
- операционная система: Windows XP и выше;
- Adobe Acrobat Reader;
- дисковод CD-ROM;
- мышь.

УДК 577.2:61
ББК 28.070

ISBN 978-5-907804-48-7

© Коломыткин О. В., 2024

Учебное издание

Коломыткин Олег Владимирович

Биофизические принципы метода полимеразной цепной реакции
(ПЦР, PCR)

Учебное пособие

Электронное издание
локального распространения

Знак информационной продукции (в соответствии с законом № 436-ФЗ)
12+

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
<https://publishing.intelgr.com>
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63

Подписано к использованию 03.05.2024 г.
Объем издания – 3,8 Мб.
Комплектация издания – 1 CD.
Тираж 100 CD.

ISBN 978-5-907804-48-7



9 785907 804487 >

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принцип метода ПЦР.....	5
Медицинская диагностика при помощи ПЦР	6
Теоретическое и экспериментальное обоснование метода ПЦР.....	8
Вещества, необходимые для проведения ПЦР	9
Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза	10
Праймеры	11
Амплификатор	11
Молекулярные процессы, происходящие при протекании полимеразной цепной реакции.....	12
1. Денатурация.....	12
2. Отжиг.....	13
3. Элонгация.....	14
4. Последующие циклы денатурации, отжига и элонгации.....	15
Регистрация продуктов ПЦР. Определение наличия искомого гена.....	16
Медицинская диагностика.....	20
Использование ПЦР для доказательства экспрессии генов.....	20
Контрольные вопросы.....	22
Список литературы.....	23

ПРИНЦИП МЕТОДА ПЦР

Методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) получили большое развитие и широкое применение в молекулярной биологии и медицине в последнее время. Данные методы при помощи ПЦР позволяют найти искомый ген в молекулах ДНК и изготовить миллионы копий данного гена. Таким образом происходит огромное усиление концентрации гена.

Начало и конец гена в ДНК находят при помощи двух праймеров. Праймер – синтетический олигонуклеотид длиной 18–30 оснований. Один из праймеров комплементарен началу, а другой концу гена во второй цепочке исходной ДНК.

Синтез копий гена производится специальным ферментом термофильной ДНК-полимеразой. ДНК-полимераза синтезирует копии гена из нуклеозидтрифосфатов. Для возможности регистрации полученные копии ДНК метят флуоресцентным зондом.

Процесс изготовления копий гена называют амплификацией. В процессе амплификации производят 25–35 циклов нагрева реакционного раствора до 94–96° С и его последующего охлаждения до 60–72° С.

После проведения реакции измеряют интенсивность флуоресценции. Наличие интенсивной флуоресценции свидетельствует о том, что праймеры обнаружили искомый ген в исходной ДНК и термофильная ДНК-полимераза произвела амплификацию данного гена. Отсутствие или чрезвычайно малый уровень флуоресценции свидетельствует о том, что праймеры не обнаружили искомый ген и его амплификация не произошла.

Методы, использующие ПЦР, применяются для решения целого ряда важных научных и прикладных задач молекулярной биологии и медицины. Особо эффективную роль данный метод показал в медицинской диагностике.

МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ПОМОЩИ ПЦР

Метод ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний.

Для диагностики наследственных заболеваний выделяют ДНК из ткани пациента. Затем находят исследуемый ген при помощи специфических праймеров и производят амплификацию данного гена при помощи ПЦР. После этого ген секвенируют и сравнивают полученную последовательность оснований с данными геномных библиотек для выявления мутаций.

Для диагностики вирусных заболеваний используют специфический ген искомого вируса. По специфическому гену определяют наличие вируса в ткани пациента. Рассмотрим два случая, когда генетическая информация записана в вирусе при помощи молекулы ДНК, а также когда генетическая информация записана в вирусе при помощи молекулы РНК.

В первом случае прежде всего синтезируют праймеры к специфическому гену. Для известных вирусов первичную структуру праймеров можно найти в геномных библиотеках. Праймеры для ряда известных вирусов доступны в продаже. Затем из образцов, взятых у пациента, выделяют грубую фракцию ДНК и производят амплификацию указанного выше специфического гена искомого вируса при помощи ПЦР. Наличие интенсивной флуоресценции в образце после проведения ПЦР свидетельствует о наличии данного вируса в организме пациента. Слабая флуоресценция или её отсутствие указывают на отсутствие искомого вируса у пациента.

Во втором случае для РНК-вирусов на первом предварительном этапе выделяют вирусную РНК при помощи метода, описанного в литературе [1]. Затем синтезируют молекулу сДНК, используя вирусную РНК как матрицу, при помощи специального фермента – обратной транскриптазы. Метод обратной транскрипции описан в литературе [1, 2]. Компоненты реакции смешиваются с добавлением

ДНК-праймера. Обычно обратной транскриптазе требуется ≈ 1 час (37°C) для синтеза сДНК, комплементарной с исходной РНК.

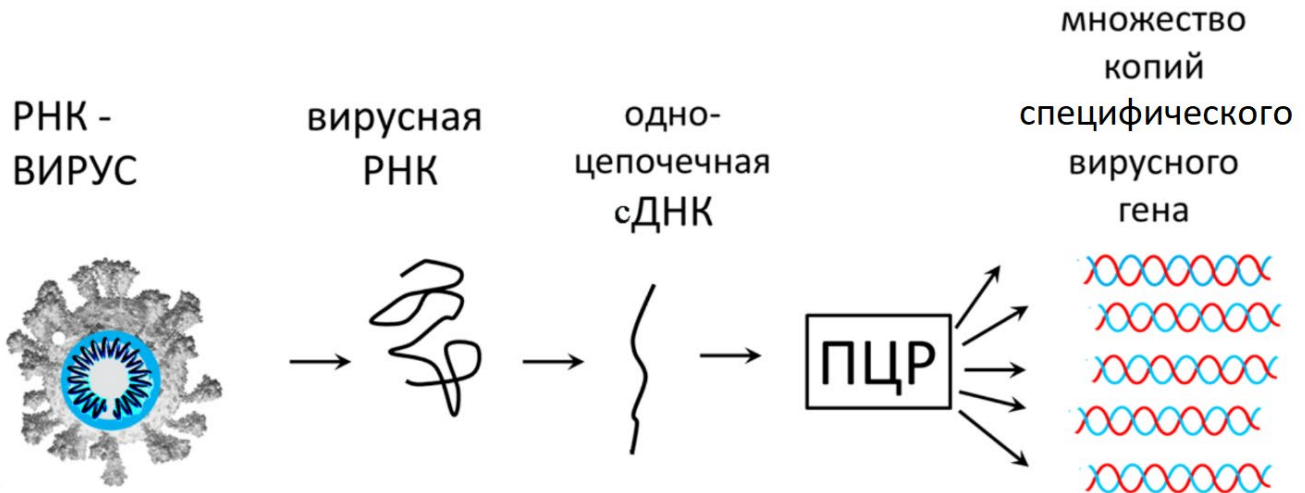


Рис. 1. Схема диагностики заражения РНК-вирусом при помощи метода ПЦР

Следует отметить, что выделение РНК и проведение реакции обратной транскрипции требуют аккуратности и высокой степени очистки препаратов. Трудность заключается в том, что ферменты, деградирующие РНК, экзо- и эндонуклеазы широко распространены (присутствуют даже на стенках недостаточно чистой посуды). Поэтому необходимо применять специальную посуду и методы для недопущения загрязнения РНК-нуклеазами. Учитывая указанную лёгкость деградации РНК, рекомендуем покупать специальные наборы реактивов и приспособлений для работы с РНК.

После получения сДНК-реплик процесс становится гораздо более стабильным поскольку полимер сДНК является гораздо более стабильной молекулой по сравнению с полимером РНК. После получения сДНК-реплик появляется возможность применить такую же процедуру поиска специфического гена, которая описана выше для ДНК-вирусов.

Возможность амплифицировать вирусный ген до миллионов копий даёт чрезвычайно высокую чувствительность метода ПЦР для диагностики вирусных заболеваний. Вирусные инфекции можно обнаруживать при помощи ПЦР через короткое время после заражения, за недели или месяцы (в зависимости от длительности инкубационного периода) до того, как проявятся симптомы заболевания. Помимо высокой чувствительности метод ПЦР существенно облегчает и убыстряет вышеуказанные диагностики.

Помимо медицинской диагностики метод ПЦР используется для решения многих других научных и прикладных задач молекулярной биологии и медицины.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕТОДА ПЦР

Метод ПЦР основан на проведении многократного копирования заданного участка ДНК в искусственных условиях. Копирование производят при помощи специального фермента термофильной ДНК-полимеразы (Taq-полимераза).

При этом Taq-полимераза копирует только тот участок, который удовлетворяет заданным условиям, то есть расположен между двумя концевыми праймерами. Это может произойти только в том случае, если искомый участок ДНК присутствует в исследуемом образце. Таким образом метод ПЦР амплифицирует относительно короткие участки ДНК в отличие от репликации ДНК в живых организмах при их размножении. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. При использовании специальных условий (подбор смеси различных полимераз, применение добавок и подбор физико-химических условий) длина продукта ПЦР может достигать ≈ 30 тысяч пар нуклеотидов. Однако, даже такая длина намного меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки (например, длина самой короткой ядерной хромосомы (№ 21) у человека равна $\approx 46\,710\,000$ пар оснований).

ВЕЩЕСТВА, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

Следующие основные компоненты требуются для осуществления ПЦР:

(1) ДНК-матрица, в которой содержится тот участок ДНК, который необходимо амплифицировать.

(2) Два праймера, комплементарные противоположным концам искомого фрагмента ДНК. Праймеры должны быть комплементарны участкам, расположенным на противоположных цепях α -спирали ДНК-матрицы. Праймеры должны быть ориентированы друг к другу 3'-концами.

(3) Фермент термостабильная ДНК-полимераза, которая катализирует реакцию полимеризации ДНК. Для применения в методе ПЦР ДНК-полимераза должна сохранять активность при высокой температуре длительное время. Поэтому используют ферменты, выделенные из термофильных бактерий – *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза), *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза) и другие.

(4) Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

(5) Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.

(6) Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции. Содержит соли, буфер, бычий сывороточный альбумин.

(7) Пирофосфатаза может увеличить выход ПЦР. Данный фермент катализирует гидролиз пирофосфата (побочного продукта присоединения нуклеозидтрифосфатов к растущей цепи ДНК) до ортофосфата. Таким образом из раствора убирается пирофосфат, который может ингибировать ПЦР.

(8) Если используют амплификатор без подогреваемой крышки, то для того, чтобы предотвратить испарение реакционной смеси, раствор в пробирке покрывают слоем вазелина или другого высококипящего масла.

ТЕРМОСТАБИЛЬНАЯ ДНК-ЗАВИСИМАЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА

Термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза) является основным инструментом метода ПЦР. Рассмотрим более подробно её свойства. Taq-полимераза является гомологом ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*. В отличие от *E. coli*, *Th. aquaticus* является термофильным микроорганизмом (для его жизнедеятельности оптимальна температура окружающей среды 55° С и выше), поэтому и его ферменты термостабильны (температурный оптимум находится в интервале 70–80° С). Taq-полимераза обладает хорошей ДНК-полимеразной активностью и применяется для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Период полураспада данного фермента при температуре 92,5° С равен ≈2 часа.

Скорость синтеза, осуществляемого ферментом Taq-полимеразой, зависит от температуры и равна ≈60 нуклеотидов в секунду при 72° С. Это быстрее, чем скорость работы фрагмента Клёнова при оптимальной для него температуре. Фрагмент Клёнова является фрагментом ДНК-полимеразы I из *Escherichia coli*, который обладает ДНК-полимеразной активностью. Более высокая скорость термофильного фермента Taq-полимеразы в значительной степени объясняется тем, что Taq-полимераза не имеет корректирующей 3', 5'-экзонуклеазной активности. Последняя активность способствует исправлению ошибок при синтезе ДНК, однако цена за такое полезное действие является замедление работы всего фермента.

Taq-полимераза стабильно синтезирует фрагменты ДНК длиной до 4000 нуклеотидных остатков. При оптимизации условий можно достичь синтеза фрагментов длиной до ≈9000 оснований. При больших длинах ошибки синтеза становятся неприемлемыми.

Несмотря на относительно большую скорость реакции, недостатком Taq-полимеразы является довольно высокая вероятность внесения ошибочного нуклеотида потому, что у этого фермента отсутствует механизм исправления ошибок (3'→5'-экзонуклеазная активность).

В настоящее время применяют смеси Taq- и Pfu-полимераз, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

ПРАЙМЕРЫ

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами, которые являются короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18–30 оснований. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка. При этом праймеры комплементарны разным цепям ДНК-матрицы.

Во время стадии отжига происходит гибридизации матрицы с праймером. После этого праймер служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе цепи, комплементарной матрице.

АМПЛИФИКАТОР

ПЦР проводят в специальном высокоавтоматизированном приборе – амплификаторе. Данный прибор обеспечивает периодическое охлаждение и нагревание минипробирок. Точность поддержания температуры прибором довольно высокая не менее $0,1^{\circ}\text{C}$. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», и последующего хранения амплифицированных молекул при 4°C . Для ПЦР в реальном времени выпускают амплификаторы, содержащие встроенный флуоресцентный детектор. Существуют также амплификаторы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет. Такая модификация позволяет встраивать амплификаторы в автоматизированные системы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ ПРОТЕКАНИИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Рассмотрим подробнее процессы, происходящие при применении метода ПЦР. Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–35 циклов, каждый из которых состоит из трёх стадий: (1) Денатурация, (2) Отжиг, (3) Элонгация.

1. ДЕНАТУРАЦИЯ

Двухцепочечную исходную ДНК-матрицу нагревают до 94–96°C на 0,5–2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (денатурацией), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Как правило перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2–5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

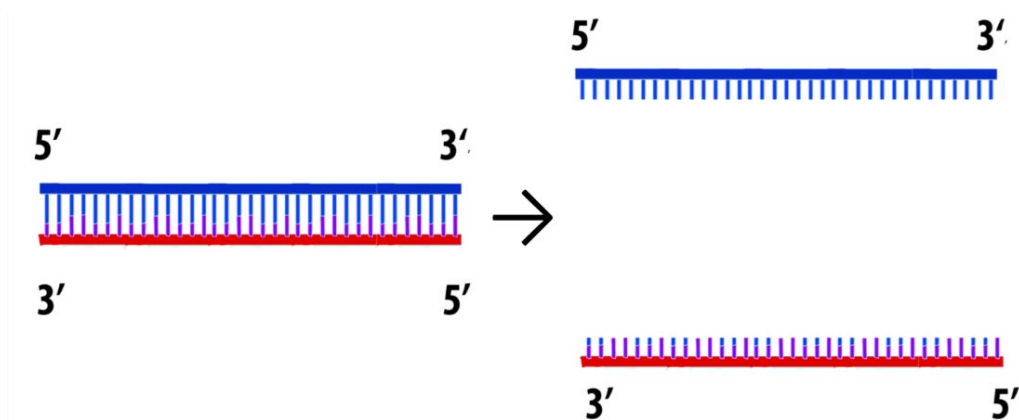


Рис. 2. Схематическое изображение процесса денатурации (плавления) двойной спирали ДНК. Слева схематически показана исходная двойная спираль ДНК. Показаны 3' и 5' концы обеих нитей ДНК, составляющих двойную спираль. Показаны водородные связи между нуклеотидами двух цепей ДНК, но не показана закрученность цепей в винтовую спираль. Справа показаны продукты после нагревания двойной спирали. Показано, что после нагревания до 94–96° С произошла денатурация двойной спирали, то есть комплементарные связи разорвались и две нити ДНК плавают в растворе отдельно друг от друга.

Не показан хаотический клубок, в который свёрнуты нити ДНК.

Для наглядности нити ДНК изображены прямыми линиями

2. ОТЖИГ

После того, когда цепи ДНК разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей-ДНК. Эта стадия называется отжигом. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 5°C меньше, чем температура плавления праймеров.

Отжиг является важным этапом метода ПЦР. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при повышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре). Время стадии отжига обычно берётся равным 0,5 минут. Одновременно, за это время полимеразы уже успевают синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60° С и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при температуре 60–72° С.

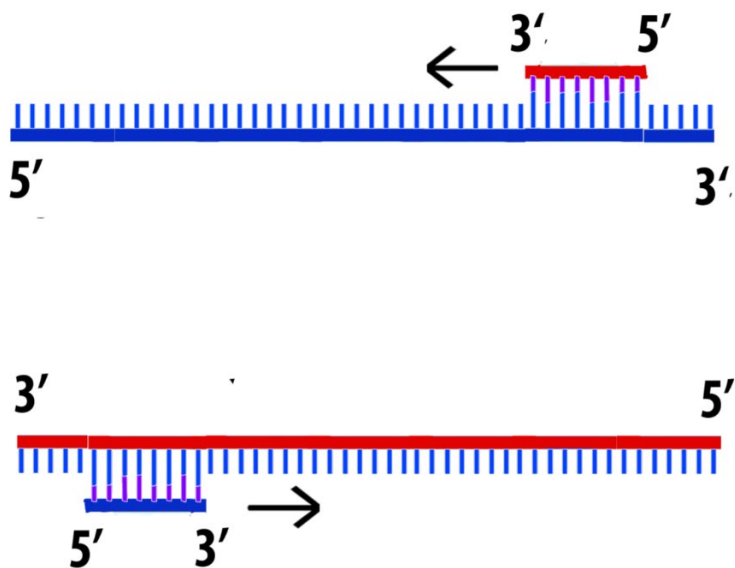


Рис. 3. Показано, что после отжига при температуре 60–72° С два праймера присоединились к комплементарным участкам на разных нитях ДНК при помощи водородных связей. После этого два молекулярных комплекса ДНК-полимеразы начинают наращивать праймеры с 3'-концов, синтезируя две новые молекулы ДНК, комплементарные ДНК-матрице

3. ЭЛОНГАЦИЯ

На стадии элонгации ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез новой цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей. Полимераза движется вдоль матрицы в направлении от её 5'- к 3'-концу, синтезируя новую цепь ДНК. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72° С. В принципе синтез будет продолжаться до тех пор, пока не будет достигнут конец ДНК-матрицы. Однако, на практике в первом цикле синтез прекращают, когда будет синтезирован весь исследуемый ген плюс некоторый запас. Конец синтеза осуществляют при помощи повышения температуры до 94–96° С, осуществляя при этом денатурацию ДНК в следующем цикле.

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.

Важно, что каждая синтезированная цепь ДНК начинается с праймера. Цепь, которая синтезировалась справа-налево, начинается с праймера № 1, а цепь, которая синтезировалась слева-направо, начинается с праймера № 2 (рис. 3, 4).

Из рисунков 1 и 3 следует, что если мы используем в первом цикле в качестве матрицы не двухцепочечную, а одноцепочечную сДНК, полученную при помощи обратной транскрипции из одноцепочечной вирусной РНК, то важно, чтобы один из праймеров был комплементарен тому концу гена, который расположен ближе к 5'-концу матрицы – сДНК (праймер № 1 на рис. 3). Тогда в первом цикле ДНК-синтетаза будет синтезировать весь требуемый ген целиком от начала до конца. Второй праймер (праймер № 2 на рис. 3) должен быть комплементарен противоположному концу гена, однако не в исходной сДНК, а в её первой копии, полученной в первом цикле.

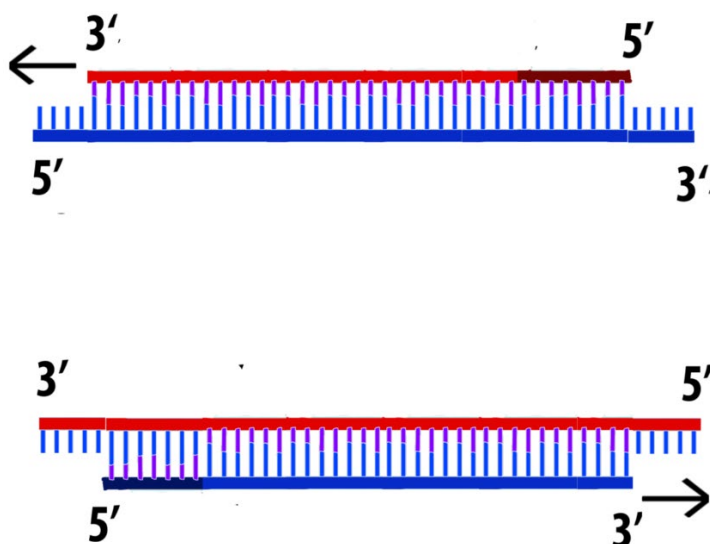


Рис. 4. Показано, что во время элонгации два молекулярных комплекса ДНК-полимеразы наращивают праймеры с 3'-концов, как показано стрелками. Таким образом происходит синтез двух новых молекул ДНК, комплементарных ДНК-матрице. В принципе синтез будет продолжаться до тех пор, пока не будет достигнут конец ДНК-матрицы. Однако на практике в первом цикле синтез прекращают, когда будет синтезирован весь ген плюс некоторый запас. Конец синтеза осуществляют при помощи повышения температуры до 94–96° С, осуществляя при этом денатурацию ДНК в следующем цикле

4. ПОСЛЕДУЮЩИЕ ЦИКЛЫ ДЕНАТУРАЦИИ, ОТЖИГА И ЭЛОНГАЦИИ

Во втором цикле те цепи ДНК, которые были синтезированы в первом цикле, станут матрицами. Очевидно, что они произведут цепи ДНК, которые будут начинаться и заканчиваться последовательностями оснований, определёнными праймерами № 1 и № 2, соответственно. Другими словами после второго цикла будут синтезированы последовательности ДНК, являющиеся искомым геном.

В последующих циклах концентрация данного гена будет удваиваться в каждом новом цикле. При 30 циклах концентрация гена теоретически увеличится в $2^{30} \approx 10^9$ раз. Колоссальное увеличение.

Кроме этого, в каждом новом цикле будет увеличиваться концентрация цепочек ДНК, начало которых определяется праймерами, а конец точно не определён. Концентрация таких цепочек будет увеличиваться линейно с каждым новым циклом потому, что количество исходной ДНК остаётся постоянным. Таким образом при 30 циклах концентрация таких «бракованных» ДНК теоретически увеличится всего лишь в 30 раз. Следовательно, после 30 циклов концентрация «бракованных» ДНК будет пренебрежимо мала по сравнению с искомым амплифицированным геном.

После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7–10 минут.

На практике при большом числе циклов экспоненциальный рост продукта реакции начинает переходить в плато вследствие исчерпания компонентов реакции праймеров, дезоксинуклеозидтрифосфатов и других причин (рис. 5).

РЕГИСТРАЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ИСКОМОГО ГЕНА

Для количественного определения амплифицированного гена довольно широко применяют интеркалирующие красители SYBR Green и другие. Краситель SYBR Green I встраивается в малую бороздку амплифицированной двойной спирали ДНК. При этом он испускает гораздо более сильный флуоресцентный сигнал при облучении синим лазером по сравнению с несвязанным SYBR Green I. Максимум поглощения для SYBR Green I находится при длине волны 494 нм. Кроме главного, имеются два небольших дополнительных максимума поглощения при 290 нм и 380 нм. Максимум испускания для SYBR Green I находится в зелёной области при длине волны 521 нм.

Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству амплифицированной ДНК.

Многие современные амплификаторы имеют возможность измерять флуоресценцию SYBR Green I в режиме реального времени в процессе амплификации. Обычно регистрацию флуоресценции производят в промежутке между циклами.

Для регистрации амплифицированного гена применяют также так называемые репортёрные флуоресцентные зонды. Репортёрный зонд содержит флуоресцентно активные группы на концах короткой цепочки ДНК. Данные зонды обнаруживают только такую амплифицированную ДНК, которая содержит последовательность, комплементарную зонду. Это значительно повышает специфичность и позволяет повысить точность измерения в присутствии других ДНК.

На рис. 5 показаны графики амплификации двух разных образцов представляющие собой зависимость логарифма интенсивности флуоресценции от количества циклов ПЦР. Каждая кривая получена усреднением по пяти экспериментам. Использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Пока количество циклов мало уровень флуоресценции мал и недостаточен для надёжного измерения. Поэтому эта область не используется для построения графиков и их анализа. При увеличении числа циклов интенсивность флуоресценции начинает экспоненциально возрастать (удваиваться с каждым циклом при оптимальных условиях). Эта область представлена на двух графиках рисунка 5 прямыми наклонными линиями и ограничена по оси нормированной флуоресценции величинами от 0,001 до примерно 0,03. На графике рис. 5 эта область расположена между осью абсцисс и верхней пунктирной линией. Именно эта область используется для количественного анализа экспериментальных результатов. Из графиков видно, что при большом числе циклов все графики выходят на примерно один максимальный уровень флуоресценции. Этот максимальный уровень флуоресценции принят на графике за единицу.

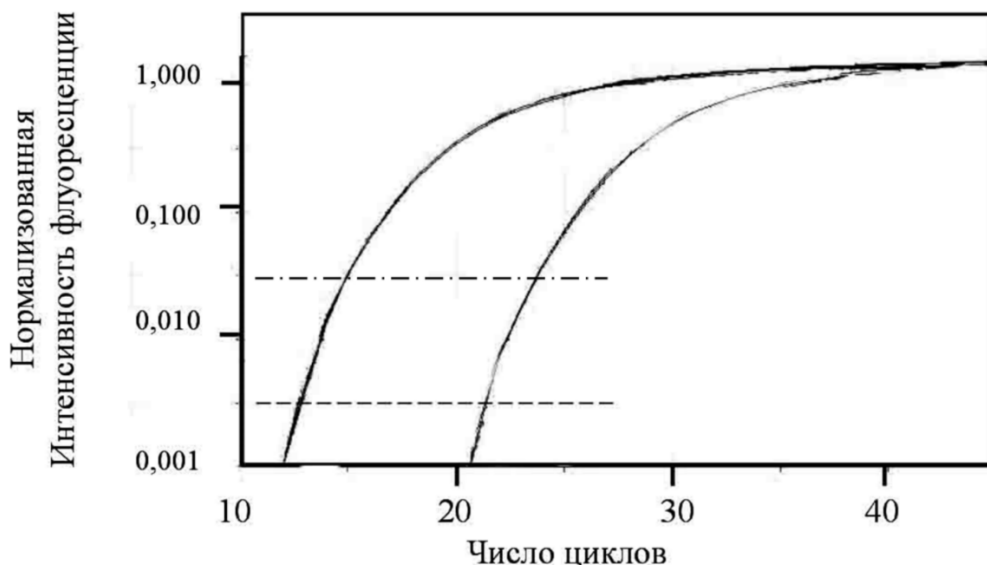


Рис. 5. Графики амплификации двух разных образцов – зависимость нормированной интенсивности флуоресценции от количества циклов ПЦР.

Каждая кривая получена усреднением по пяти экспериментам.

Использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Относительные значения интенсивности флуоресценции отложены на оси ординат в логарифмическом масштабе. Максимальный уровень флуоресценции принят на графике за единицу.

График слева – калибровочный, справа – эксперимент

Для целей диагностики вирусных заболеваний и оценки экспрессии генов нам необходимо количественно оценить количество искомого гена в исходном растворе до начала реакции ПЦР. Очевидно, что для этой цели необходима калибровочная кривая для гена, начальная концентрация которого известна. На рисунке 5 слева приведена калибровочная кривая.

Рассмотрим более подробно способ количественной оценки концентрации гена в исходном образце. Концентрация амплифицируемого гена во время проведения ПЦР (согласно механизму реакции) равна:

$$[N] = [N_0] \cdot 2^c,$$

где $[N_0]$ – концентрация искомого гена в исходном растворе, $[N]$ – концентрация амплифицированного гена, C – количество циклов.

Поскольку интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации амплифицированной ДНК, то

$$I = k \cdot [N_0] \cdot 2^c,$$

где I – интенсивность флуоресценции, k – коэффициент.

Следовательно, для одинаковой интенсивности флуоресценции, отношение концентраций искомого гена $[N_0]$ и известной калибровочного гена $[N_0]_1$ равно:

$$\frac{[N_0]}{[N_0]_1} = (1 + E)^{(C_1 - C)},$$

где E – эффективность ПЦР, E – немного меньше 1, C_1 и C – значения абсцисс (ось количества циклов) при одинаковой интенсивности флуоресценции калибровочной и экспериментальной кривых, соответственно. Для этой цели на графике 5 проведена горизонтальная пунктирная прямая (нижняя), пересекающая кривые в области экспоненциального роста. Находим точки пересечения этой прямой с калибровочной и экспериментальной кривыми. Абсциссы этих точек следует взять в качестве значений C_1 и C . Такую процедуру следует повторить для нескольких горизонтальных прямых, чтобы убедиться в однозначности результата.

Таким образом из последней формулы мы можем количественно рассчитать концентрацию искомого гена в исходном растворе. Такой способ хорошо работает при обнаружении хорошо изученных генов вирусной ДНК в организме.

В случае определения экспрессии гена построить калибровочную кривую часто бывает невозможно. В этом случае также можно использовать последнюю формулу. Однако, вместо калибровочной кривой используют кривые, полученные для тех генов, которые клетки экспрессируют постоянно и в практически постоянной концентрации. Их называют «генами домашнего хозяйства». Хотя точную концентрацию этих генов определить трудно, зато их удобно использовать для количественного расчёта относительной величины концентрации исследуемого экспрессируемого гена в исходном растворе.

МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА

В случае диагностики наследственных заболеваний амплифицированный ген секвенируют и анализируют его дефекты, используя геномные библиотеки. При этом исследуемый ген можно получить двумя способами: из транскрибированной зрелой мРНК при помощи обратной транскриптазы, или непосредственно из хромосомной ДНК. Во втором методе следует учитывать наличие интронов, чтобы исключить их из анализа.

В случае диагностики вирусных заболеваний для синтеза ДНК можно использовать флуоресцентно меченые дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. После амплификации искомого вирусного гена и промывки измеряют флуоресценцию раствора. Наличие интенсивной флуоресценции в образце после проведения ПЦР свидетельствует о наличии вирусного гена у пациента. Следовательно, это свидетельствует о заражённости пациента данным вирусом. Слабая флуоресценция или её отсутствие указывают на отсутствие искомого вирусного гена у пациента. Следовательно, это указывает на незараженность пациента данным вирусом.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Для доказательства экспрессии какого-либо гена исследуемыми клетками необходимо и достаточно показать наличие молекул мРНК данного гена в цитоплазме исследуемых клеток. Метод ПЦР даёт уникальную возможность сделать это достаточно простым и быстрым способом.

Для этого необходимо выделить общую мРНК из цитоплазмы исследуемых клеток. Затем при помощи фермента – обратной транскриптазы синтезировать молекулы сДНК, используя общую мРНК как матрицы. Метод обратной транскрипции описан [1, 2]. Таким образом мы получим маленькую концентрацию сДНК для всех генов, которые экспрессируются данными клетками. Полученные сДНК-реплики

позволяют применить метод ПЦР для поиска и амплификации сДНК искомого гена. сДНК других экспрессируемых генов амплифицироваться не будут. Следовательно, их количество останется пренебрежимо малым по сравнению с искомым амплифицированным геном.

Таким образом наличие амплификации будет доказательством экспрессии искомого гена. Отсутствию амплификации будет доказательством отсутствия экспрессии искомого гена.

Метод ПЦР стал стандартным в молекулярной биологии клеток и протеомике.

В настоящее время считается, что для надёжного доказательства участия какого-либо белка в исследуемой клеточной функции необходимо сделать это с использованием как минимум следующих четырёх методов:

1. Доказать наличие экспрессии гена данного белка при помощи ПЦР.
2. Доказать наличие в клетках специфической для данного белка последовательности аминокислот при помощи метода Western Blot.
3. Показать наличие и локализацию в клетке нативной формы данного белка при помощи метода иммуно-флуоресценции.
4. Показать при помощи специфических блокаторов участие данного белка в исследуемом клеточном процессе.

Совокупность вышеперечисленных методов стало стандартом в протеомике при выяснении функциональной роли белков, записанных в геноме человека и других организмов.

Метод ПЦР активно развивается. В последние годы появился ряд новых модификаций метода и его применений. В настоящем пособии мы рассмотрели базовый вариант метода ПЦР, который является основой для всех остальных модификаций. Преимуществом базового варианта метода является его высокая надёжность и стабильность получаемых результатов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чём заключается метод ПЦР и какую информацию получают при помощи этого метода?
2. Какие основные молекулярные явления и процессы используются в методе ПЦР?
3. Из каких этапов состоит метод ПЦР?
4. Какие задачи можно решить при помощи метода ПЦР в молекулярной биологии и медицине?
5. Каковы преимущества и недостатки метода ПЦР?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. – Москва: Мир, 2002. – 589 с. – ISBN 5030033289.
2. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика. – 1. – Новосибирск: Издательство Новосибирского университета, 2002. – 459 с. – 2000 экз. – ISBN 5761505096.
Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. Science 1985 Dec 20; 230 (4732): 1350-4; Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
3. R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase Архивная копия от 19 декабря 2008 на Wayback Machine. in: Science. 239.1988, 487–491. ISSN 0036-8075 PMID 2448875.
4. Каледин А. С., Слюсаренко А. Г., Городецкий С. И. // Биохимия. – 1980. – Т. 45. – С. 644–651.
5. Mullis, Kary B. et al. «Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences» U.S. Patent 4 683 195.
6. Alice Chien, David B. Edgar и John M. Trela. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Extreme Thermophilic *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology, Sept. 1976, pp. 1550–1557.
7. Nicolas von Ahsen, Carl T. Wittwer, Ekkehard Schütz. Oligonucleotide melting temperatures under pcr conditions: nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas (англ.) // Clinical Chemistry: journal. – 2001. – Vol. 47, no. 11. – P. 1956–1961.
8. Календарь Р. Н., Сиволап Ю. М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // Биополимеры и клетка: журнал. – 1995. – Т. 11, № 3–4. – С. 55–65. – ISSN 0233-7657.

9. Pierce KE and Wangh L. J. Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells (англ.) // Methods Mol Med.: journal. – 2007. – Vol. 132. – P. 65–85. – ISBN 978-1-58829-578-1. – doi:10.1007/978-1-59745-298-4_7. – PMID 17876077.