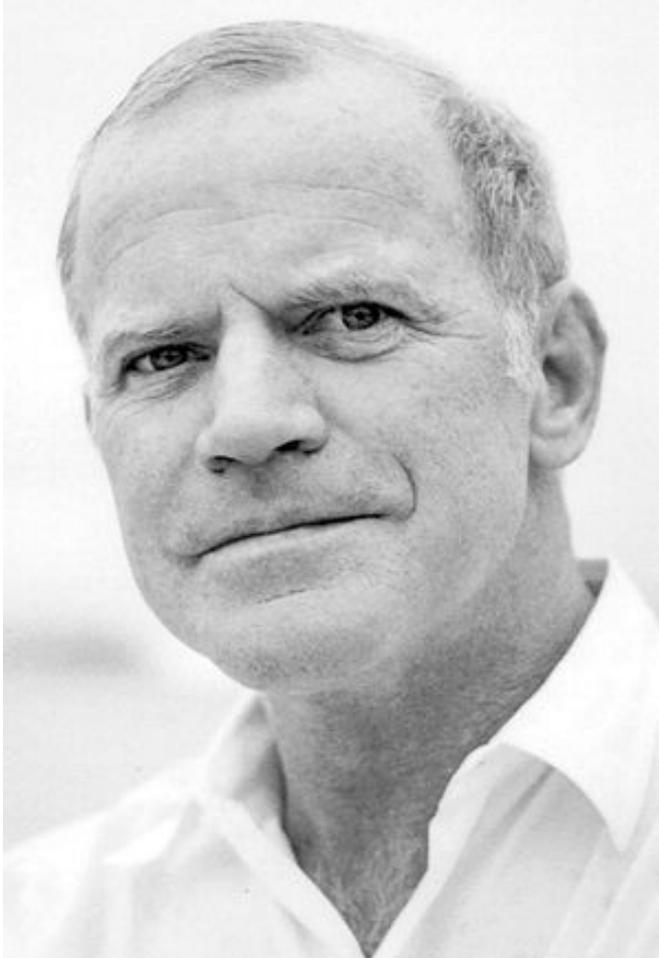


***Полимеразная цепная
реакция в реальном
времени***

Изобретение ПЦР



Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR) изобрел в 1983 году американский ученый Кэри Мюллис (Kary Mullis).

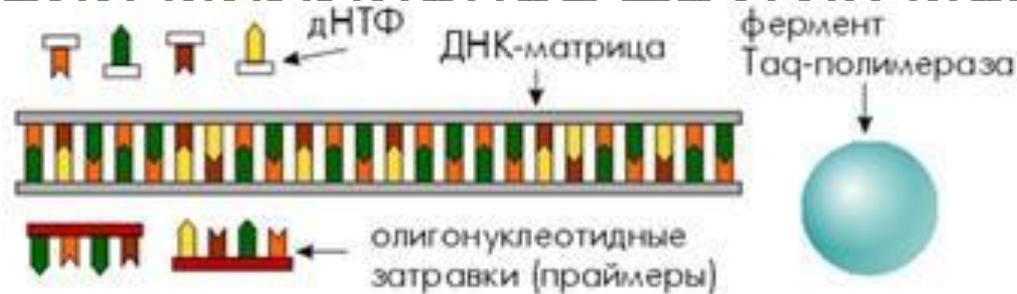
Kary Mullis, Лауреат Нобелевской премии 1993 г. по химии

Принципы технологии ПЦР

- Мишень – генетический материал.
- Метод прямого выявления возбудителя, основанный на универсальности способа хранения и передачи генетической информации.
- Высокая чувствительность, основанная на принципе экспоненциального накопления продукта.
- Высокая специфичность, основанная на выявлении уникальных последовательностей генома.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР - это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.



Исходные компоненты ПЦР

Компоненты реакции

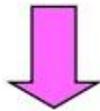
Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- 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.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора.



Стадии Полимеразной Цепной Реакции

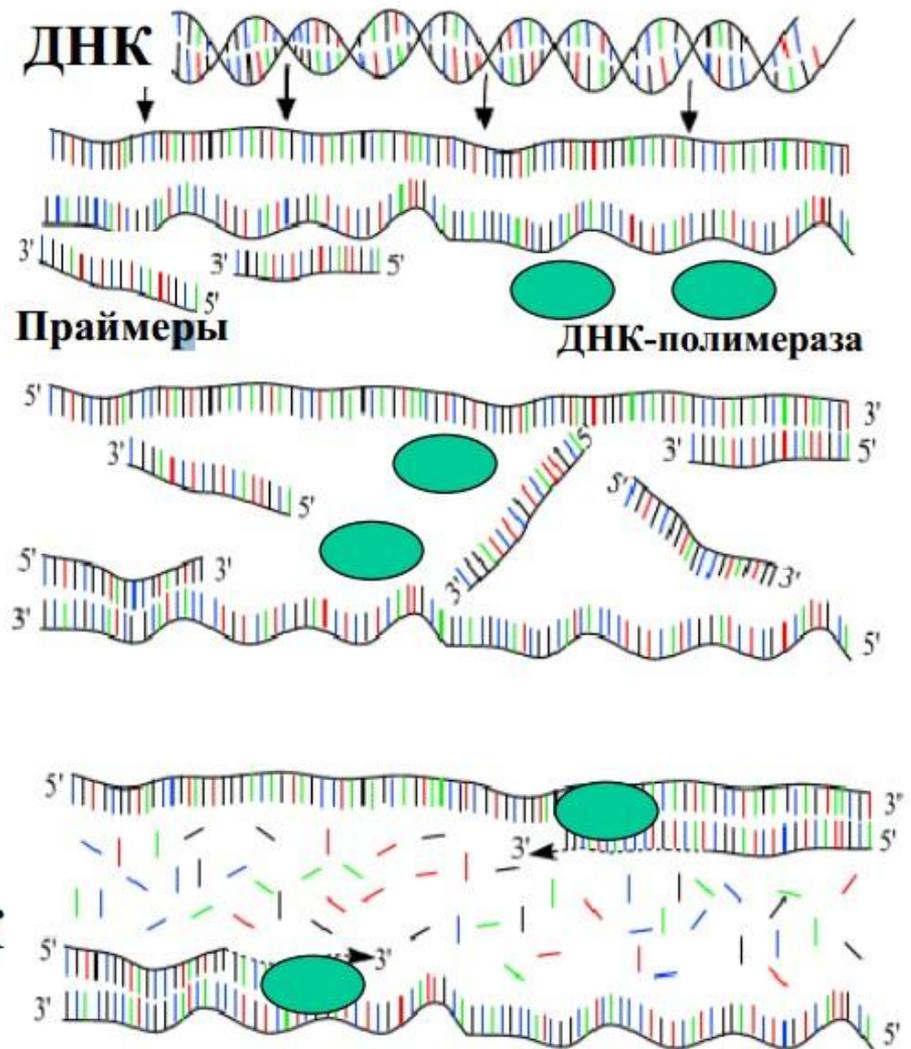
Денатурация ДНК
(95°C)



Отжиг праймеров
(55-65°C)



Полимеризация цепей ДНК
(72°C)



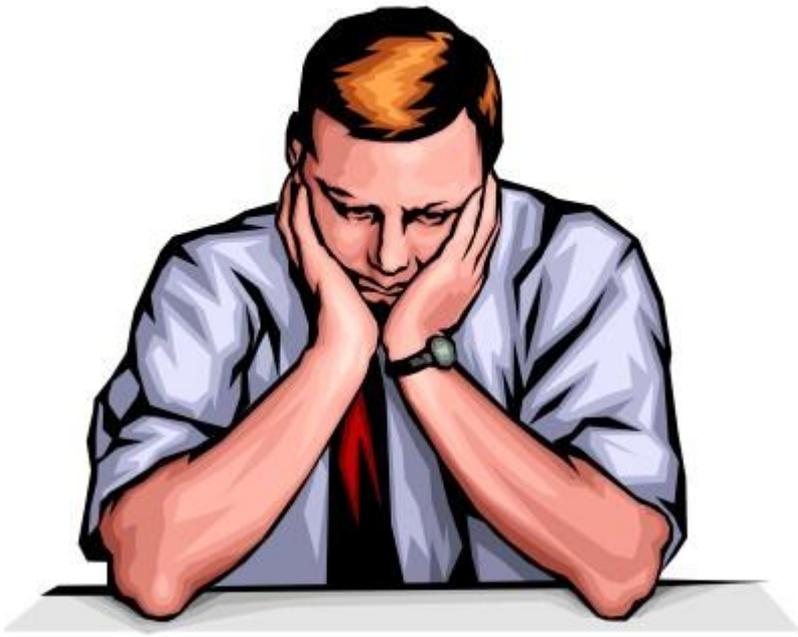
Принцип метода заключается в удвоении (амплификации) участка ДНК, ограниченного праймерами, при помощи фермента ДНК-полимеразы.



За каждый следующий цикл амплификации происходит удвоение как исходного участка ДНК, так и вновь синтезированных фрагментов (амплификатов).

В результате этого число фрагментов растет в геометрической прогрессии (цепная реакция). После 30 - 40 циклов их число превышает несколько миллиардов, что делает возможным их обнаружение различными методами.

Проблемы при использовании ПЦР в лабораторной диагностике



- Высокий риск контаминации продуктами ПЦР
- Субъективизм в интерпретации данных электрофореза и сложность автоматизации процесса
- Отсутствие связи между начальной концентрацией ДНК и конечной концентрацией продукта

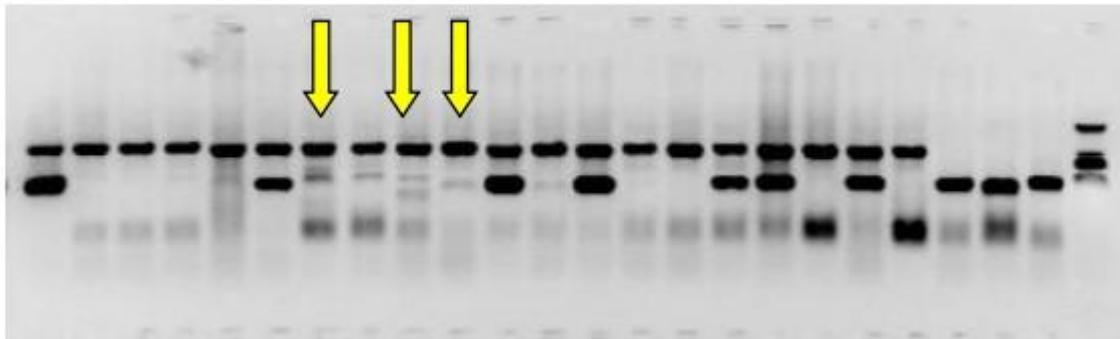
- **Необходимость в отдельных помещениях (зонах) для выделения НК, постановки ПЦР и проведения электрофореза.**



Отсутствие стандартизации электрофоретического этапа ПЦР-анализа

- Субъективное восприятие лаборантом «спорных» результатов.
- Отсутствие стандартных параметров при регистрации изображения с помощью трансиллюминаторов, видеосистем и др.

**Субъективизм в
интерпретации
полученных данных,
основанных на визуальном
анализе
электрофореграмм.**



**Расширение возможностей
полимеразной цепной
реакции – использование
метода Real-time PCR (ПЦР с
детекцией накопления
продуктов амплификации в
режиме реального времени)**

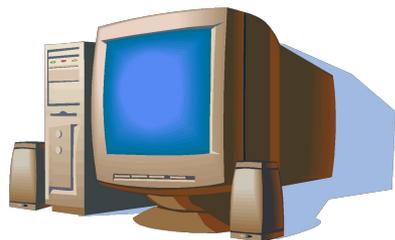
ПЦР в реальном времени

- Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации.

Преимущества ПЦР в реальном времени



- все операции проводятся в одной пробирке;
- исключается риск контаминации ПЦР-смеси и продуктов;



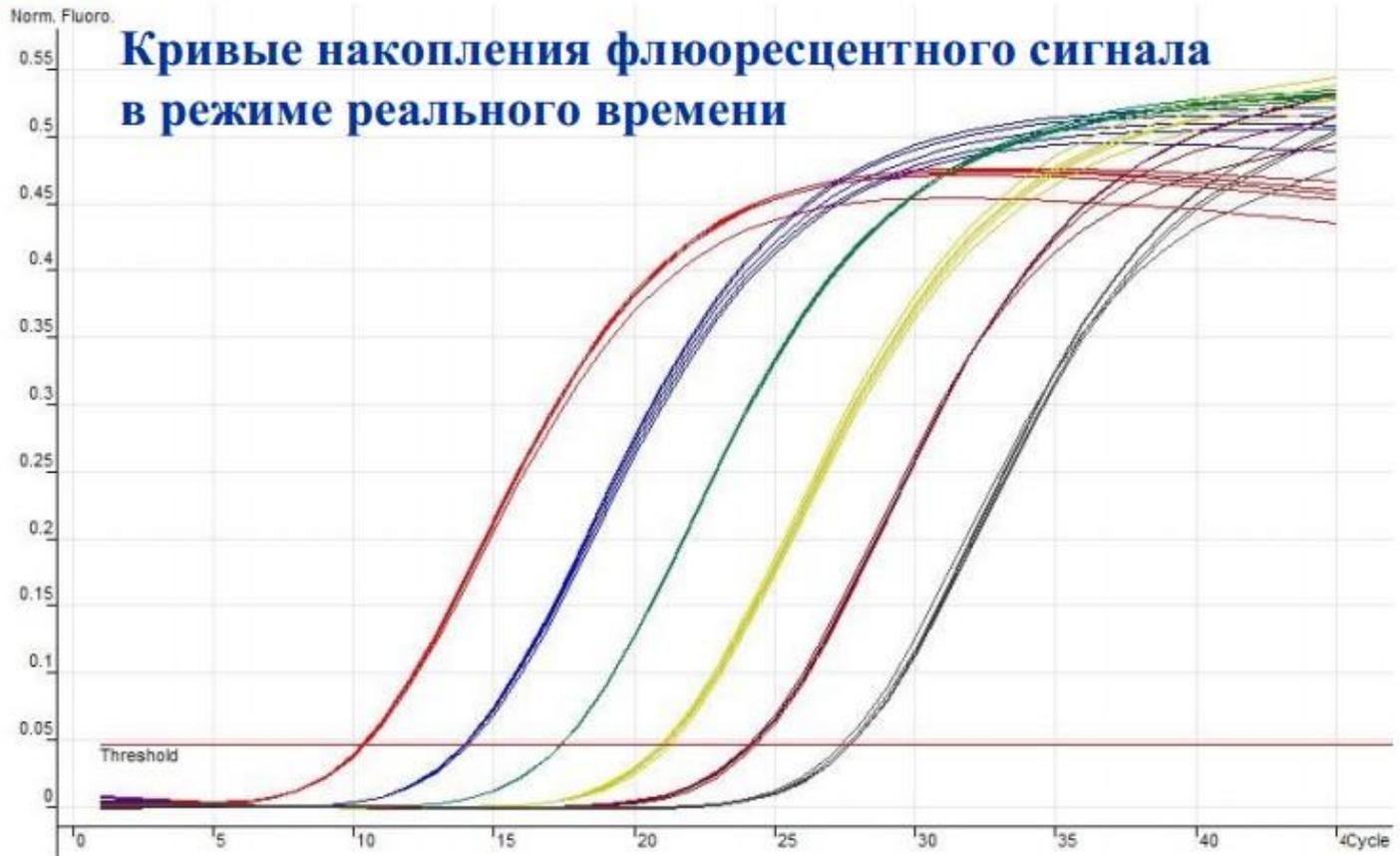
- быстрота анализа;
- возможность автоматизации;



- экономия затрат времени и труда.



Накопление флюоресцентного сигнала



Детекция накопления продуктов реакции (ампликонов) может измеряться двумя способами:

- неспецифически, с помощью интеркалирующих флуоресцентных красителей (напр. SYBRGreen, SYBR Gold)
- с помощью олигонуклеотидов с флуоресцентными метками (повышает специфичность реакции); этот способ используется чаще.

Для проведения анализа необходим специальный прибор - амплификатор для ПЦР в реальном времени, который совмещает в себе функции термоциклера и флуоресцентного детектора.

Амплификаторы для Real-Time PCR



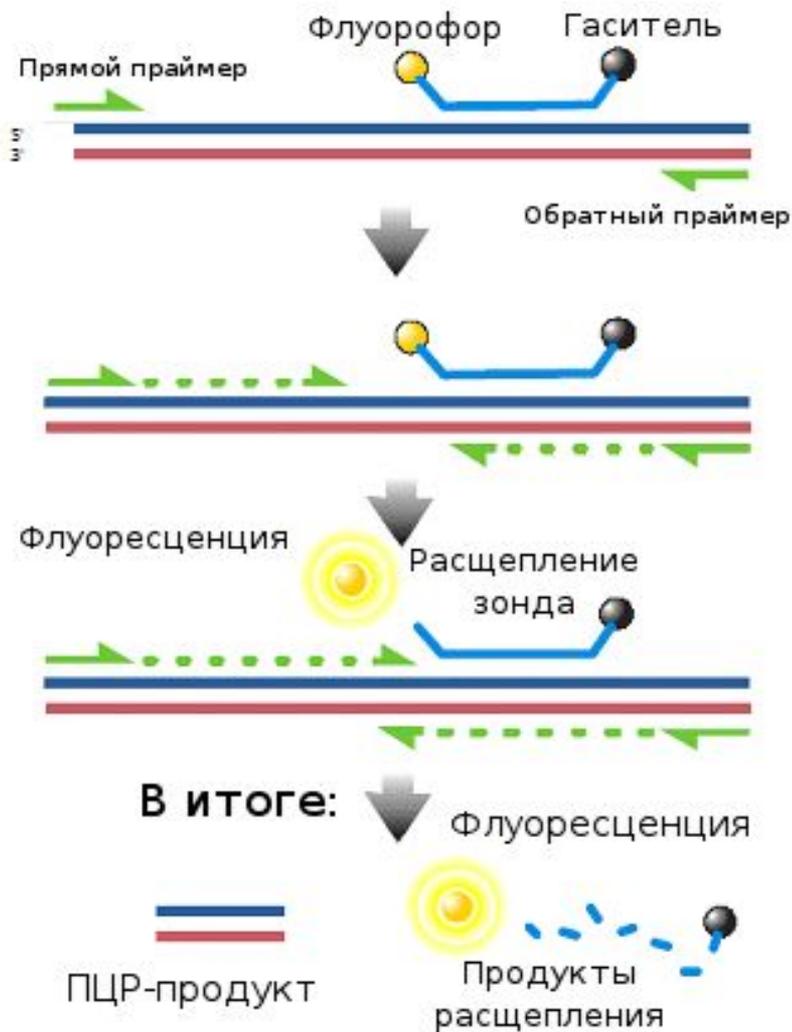
“ABI Prism 7000”



“RotorGene”



“iCycler iQ”



Метод выщепления флуорофора за счет разрушения зонда.

В этом случае в реакционной смеси должен присутствовать еще один компонент — специальный одноцепочечный ДНК-зонд: молекула ДНК, комплементарная последовательности амплифицируемого фрагмента, расположенной между праймерами. При этом к одному его концу должен быть химически приделан флуорофор (флуоресцирующая молекула), а к другому — гаситель (молекула, поглощающая энергию флуорофора и «гасящая» флуоресценцию). Когда такой зонд находится в растворе или комплементарно связан с целевой последовательностью, флуорофор и гаситель находятся относительно недалеко друг от друга, и флуоресценции не наблюдается. Однако за счет 3'-экзонуклеазной активности, которой обладает ДНК-полимераза (то есть она расщепляет ДНК, на которую «натывается» в ходе синтеза, и на ее месте синтезирует новую), зонд при синтезе второй цепи разрушается, флуорофор и гаситель за счет диффузии удаляются друг от друга, и появляется флуоресценция.

Заключение

- В настоящее время создана научная и материально-техническая база для широкого внедрения в клиническую лабораторную диагностику новой генодиагностической технологии - количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов – ПЦР в реальном времени.
- В ближайшие годы данная технология будет применяться в гепатологии (вирусные гепатиты В и С), в клинике ВИЧ и ВИЧ-ассоциированных инфекций (в первую очередь герпетическая и цитомегаловирусная инфекции), в дерматовенерологии, фтизиатрии, гастроэнтерологии, пульмонологии.
- С помощью ПЦР в реальном времени будет оцениваться эффективность проводимой терапии и клинический прогноз заболевания.