

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»
проректор по учебной работе ТМА,
проф. Тешаев О.Р. _____

«___» _____ 2013 г.

ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(учебное пособие для магистров медицинских вузов)

Ташкент-2013

Составитель: ассистент кафедры биоорганической и биологической химии стоматологического факультета ТМА
кандидат медицинских наук Н.Х.Мухамедова

Рецензенты: Профессор кафедры биоорганической и биологической химии ТМА Ф. Х. Иноятова

Директор городского диагностического центра, доктор
медицинских наук **Арипов О.А.**

Рассмотрена и рекомендована на заседании ЦМК медико-биологических предметов Ташкентской медицинской академии
Протокол № _____ от « ____ » _____ 2013 г.

Председатель ЦМК _____ А.Ю.Юлдашев

ИЗОБРЕТЕНИЕ ПЦР

В последние годы все больше молекулярно-биологических методов находят практическое применение в различных областях медицины. Один из таких методов — полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая нарабатывать в пробирке определенный участок молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) практически в неограниченных количествах.

В медицине ПЦР применяют при диагностике инфекционных и наследственных заболеваний, при диагностике рака и иммунных патологий. ПЦР используют для идентификации личности и определения биологического родства индивидов. Санитарно-эпидемиологические службы используют ПЦР для контроля за микробиологическим загрязнением окружающей среды и продуктов питания, а также для выявления генетически модифицированных источников пищи (ГМИ). В научно-исследовательских лабораториях ПЦР используют для изучения нуклеиновых кислот и проведения манипуляций с ними. Например, благодаря ПЦР стало возможным быстрое получение исследуемых участков ДНК в чистом виде и в достаточном количестве.

Открытие полимеразной цепной реакции стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять данную область науки на качественно новый уровень. Внедрение полимеразной цепной реакции в медицину открыло новое диагностическое направление — ДНК-диагностику.

Основные принципы полимеразной реакции и состав реакционной смеси для получения копий ДНК впервые были описаны Клерре с соавт. в 1971 году. Однако исследователями не была продемонстрирована главная черта ПЦР — экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК.

В 1983 году сотрудник фирмы «Cetus» Kary Mullis предложил метод, ставший в дальнейшем известным как полимеразная цепная реакция. Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ферментом ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение числа определенных фрагментов ДНК.

Следует отметить, что широкому распространению ПЦР сопутствовало развитие некоторых технологий. В частности, появление приборов, позволяющих автоматически синтезировать одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды). В тот же период были обнаружены уникальные микроорганизмы, живущие в гейзерах. Их ферментативная система, в частности фермент ДНК-полимераза, выдерживает высокие температуры горячих источников и сохраняет свою биологическую активность после нагревания до 100 °С. Использование программируемых термоциклеров, изменяющих температуру реакционной смеси по заданной циклической

программе, и ферментов из термофильных микроорганизмов, существенно упростило проведение реакции, сделав ее рутинной процедурой.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 году Saiki с соавт. опубликовали статью, в которой была описана амплификация участка гена глобина. С этого момента количество публикаций, в которых авторы сообщали о применении ПЦР в своих работах, стало увеличиваться в геометрической прогрессии. На основе ПЦР были созданы современные технологии секвенирования (определения последовательности нуклеотидов в ДНК). В настоящее время существует множество модификаций ПЦР, одной из которых и посвящена данная работа.

ИЗОБРЕТЕНИЕ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

Поскольку в ходе полимеразной цепной реакции происходит наработка определенного участка ДНК, по окончании реакции можно зарегистрировать полученный фрагмент при помощи ряда методов, первым и наиболее часто используемым из которых является метод электрофореза молекул ДНК в геле с окрашиванием бромистым этидием. Однако регистрация результата реакции по ее завершении не дает информации об эффективности процесса (если не использовать специальную постановку эксперимента), снижая тем самым потенциальную информативность ПЦР. Применение метода было ограничено задачами, в которых было достаточно ответа «да»-«нет».

В начале 90-х годов прошлого столетия исследователи предложили регистрировать накопление ДНК непосредственно в ходе ПЦР. К этой идее их подтолкнуло желание использовать метод ПЦР для количественного определения исходного числа матриц, попавших в реакционную пробирку. Несмотря на то, что ПЦР и ранее использовали для количественного определения нуклеиновых кислот, изобретение ПЦР «в реальном времени» существенно упрощало технику измерения и делало подход более точным.

С этого момента началось бурное развитие как приборной, так и реагентной базы для выполнения ПЦР с регистрацией накопления продуктов амплификации непосредственно в ходе реакции (рис. 1.2). Уже в середине 90-х годов появились первые детектирующие амплификаторы (термоциклеры), а к настоящему моменту их разнообразие перевалило за 30 (на рынке присутствует более 10 компаний, промышленно выпускающих приборы данного типа).

Можно с уверенностью констатировать быстрое замещение обычной ПЦР методиками с флуоресцентной регистрацией накопления ДНК в области выявления и количественного определения нуклеиновых кислот. В первую очередь это связано с удобством процедуры за счет отсутствия отдельной стадии детекции результатов ПЦР. Кроме того, флуоресцентные методы позволяют избирательно регистрировать амплификацию лишь определенных фрагментов ДНК (за счет использования олигонуклеотидных проб), повышая тем самым достоверность исследования. Вместе с тем, обычная ПЦР

сохраняет свои позиции в методиках, требующих наработки фрагментов ДНК с целью их дальнейшего использования (клонирования, определения последовательности и т. п.). Здесь дополнительные компоненты реакции (интеркалирующие красители, пробы) могут помешать последующим процедурам и их лучше исключить из состава реакционной смеси

ФОРМАТЫ ПЦР

1. Метод электрофореза (классический ПЦР). Этот метод основан на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, чаще всего бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки в геле формируют специальные лунки, в которые вносят продукты амплификации. Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от отрицательно заряженного к положительно заряженному электроду. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254, 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм). Яркость полос продуктов амплификации может быть различной. Поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

2. Метод «FLASH». Технология «FLASH» подразумевает детекцию флуоресценции по окончании реакции, поэтому метод не является количественным. Основная особенность данной технологии - детекция результата ПЦР в закрытой пробирке, быстрота детекции и, как следствие, упрощение и ускорение получения результатов ПЦР при одновременном уменьшении трудозатрат лаборатории. Для работы с этой технологией в лаборатории должен быть один или несколько обычных амплификаторов и специализированный детектор флуоресценции для ПЦР-.

ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ПЦР КАК МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

1. Прямое определение наличия возбудителей: многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность: высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от иммунологических методов анализа, где нередки ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

3. Высокая чувствительность: метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-анализ обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов – 1000-100000 клеток).

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей: материалом для исследования методом ПЦР служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы.

При различных инфекциях для анализа используют следующий клинический материал: кровь, плазму крови, сыворотку крови, форменные элементы крови, мочу, слюну, соскобы и мазки со слизистых, ликвор, слезную жидкость, содержимое везикул, биоптаты органов и тканей. Следует отметить, что методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.).

5. Высокая скорость получения результата анализа: для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя, что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация

процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-5 часов.

6. 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, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

ОГРАНИЧЕНИЯ 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. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель.

2. Возможность перекрестной реакции. Подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа.

3. Изменчивость микроорганизмов. Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома, и, таким образом, становиться неуловимыми данной тест-системой. Последние два пункта важны для разработчиков ПЦР-диагностикумов. В настоящее время разработаны стандарты, регламентирующие объем испытаний (включая проверку на перекрестные реакции, а также тестирование известных штаммов определяемого возбудителя), которые должна выдержать тест-система, прежде чем она попадет на рынок.

ОСНОВНЫЕ И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЦР

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

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов ПЦР.

1. Праймеры - олигонуклеотиды размером от 15 до 30 нуклеотидов, соответствующие участкам ДНК мишени. Они ограничивают область в ДНК, которая будет многократно копироваться (амплифицироваться). Праймеры играют ключевую роль в образовании продуктов ПЦР (ампликонов), обеспечивая специфичность и чувствительность тест-системы.

2. Таq-полимераза - фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

3. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - это смесь которой состоит из дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ). Они являются «строительным материалом», для синтеза второй цепи ДНК.

4. Буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

5. Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для амплификации. При отсутствии ДНК-мишени специфические ампликоны не образуются.

Кроме основных при постановке ПЦР кроме основных в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

1. Внутренний контроль (ВК) - искусственная молекула ДНК, представляющая собой альтернативную матрицу для ПЦР и позволяющая контролировать эффективность амплификации в каждой конкретной пробирке.

2. ДНК-зонды - олигонуклеотиды небольшого размера (20-30 нуклеотидов), комплементарные ампликонам. Благодаря прикреплению к ним флуоресцентным меткам, ДНК-зонды могут использоваться для детекции результатов ПЦР. ДНК-зонды широко применяются в ПЦР реального времени и FLASH методе.

ПРОГРАММА ПЦР АНАЛИЗА

Программа ПЦР анализа состоит из 30-40 циклов. Каждый цикл состоит из 3 температурных режимов:

1. Денатурация: Реакционную смесь нагревают до 92-95⁰С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием одноцепочечных молекул.

2. Отжиг праймеров: На этом этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Присоединение происходит в соответствии с правилом комплементарности. Правило комплементарности: в молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, напротив гуанина - цитозин).

3. Элонгация (синтез). На этом этапе происходит синтез второй цепи ДНК Taq-полимеразой. В случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента возможно совместить отжиг и элонгацию.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз).

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ ПЦР ЛАБОРАТОРИИ

В связи с высокой чувствительностью метода существует опасность получения ложноположительных результатов в силу переноса через предметы и реагенты ДНК-матрицы и продуктов ПЦР-ампликонов, получаемых в больших количествах во многих пробирках в течение ежедневной работы. Вследствие этого при проведении работ с использованием метода ПЦР необходимо соблюдать следующие правила:

1. Территориально разделять различные стадии анализа, размещая их в различных помещениях (для ПЦР реального времени):

- помещение для выделения нуклеиновых кислот;
- помещение для подготовки реагентов;
- помещение для амплификации и детекции;

Допустимо объединение помещения для выделения нуклеиновых кислот и помещения для подготовки реагентов при наличии отдельных боксов для проведения работ.

2. Для каждой стадии анализа должен быть свой комплект лабораторной одежды, автоматических пипеток, вспомогательных материалов и оборудования.

3. Работу на всех этапах проводить только с использованием одноразовых расходных материалов: пробирок, наконечников для пипеток и пр. Желательно использовать наконечники и пробирки с маркировкой «DNase and RNase free», и чтобы наконечники для пипеток были с фильтрами (aerosol-resistant tips). Каждый из процессов (очистка ДНК, приготовление реактивов и т.д.) необходимо выполнять в новых одноразовых перчатках (без талька).

4. Необходимо включать в экспериментальную постановку контрольные реакции: отрицательный контрольный образец, в котором есть все компоненты реакции кроме матричной ДНК и положительный контрольный образец, в котором реакция должна пройти обязательно (отсутствие результата в положительном контрольном образце будет свидетельствовать об ошибках в приготовлении реакции или испорченных реактивах). Наличие продуктов амплификации в отрицательном контрольном

образце свидетельствует о загрязнении оборудования или реактивов продуктами ПЦР предыдущих исследований.

5. Очистку ДНК и приготовление реакций желательно проводить в ПЦР-боксах (или ламинарах с выключенным воздушным потоком, поскольку воздушный поток повышает вероятность кросс-контаминации образцов) с УФ-лампами которые необходимо включать до и после работы.

6. Работу должен выполнять специально обученный персонал, обладающий достаточной квалификацией в данной области.

7. Хранение образцов: до транспортировки в ПЦР-лабораторию отобранный биоматериал хранят при температуре 2–4°C не более 48 ч; для более длительного хранения (до 1 месяца) используют максимально низкую температуру: – 20°C. Необходимо минимизировать время от забора образца до постановки ПЦР-анализа.

8. Транспортировка образцов осуществляется в сумках-холодильниках, термоконтейнерах, термосах с термопакетами, льдом или сухим льдом.

9. Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в том числе халатами и сменной обувью, закрепленными за соответствующими помещениями.

10. Желательно предусмотреть отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

11. Все производственные комнаты должны быть снабжены коротковолновыми ультрафиолетовыми лампами.

12. Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только В направлении из «чистой» зоны в зоны пробоподготовки и детекции. Клинический материал, поступивший в лабораторию, должен быть как можно быстрее обработан (выделены ДНК и РНК) в зоне пробоподготовки. Подготовленные в чистой зоне амплификационные пробирки с внесенной в зону пробоподготовки ДНК образцов переносят в амплификаторную.

13. По окончании термоциклирования, не открывая крышек, переносят в зону детекции. При использовании метода гель-электрофореза для проведения детекции должен быть выделен отдельный сотрудник.

14. Для обработки клинических образцов должны быть установлены ПЦР-боксы, обеспечивающие безопасность персонала при работе с инфекционным материалом и предусматривающие длительную экспозицию внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

15. Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

16. **Запрещается внесение пробирок с положительными контролями или клиническими образцами как до, так и после обработки, в ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси («чистую» зону).**

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЗЯТИЮ БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения адекватного результата анализа большое значение имеет качество взятия материала для исследования, условия его хранения, транспортировки, предварительной обработки. Для ПЦР-исследования пригоден любой потенциально инфицированный материал; окончательный выбор материала для анализа должен определяться наиболее вероятным местом локализации возбудителя инфекции.

Общие рекомендации по взятию биоматериала для ПЦР-исследования.

1. Различные микроорганизмы имеют свои особенности локализации, пути распространения и выделения, что следует учитывать при выборе места взятия биоматериала.

2. Взятие биоматериала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За несколько дней до исследования необходимо прекратить прием химиопрепаратов. Контроль эффективности лечения должен проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

3. Объем отбираемого биоматериала не должен быть избыточным, т. к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке. При взятии мазков и соскобов достаточно получить материал в объеме «спичечной головки». Идеальный инструмент для взятия соскобов и мазков — специальный урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает его в транспортную среду.

4. Для взятия проб необходимо пользоваться только одноразовым инструментом и стерильными пластиковыми контейнерами (или пробирками с транспортной средой) с плотно закрывающейся крышкой.

Рекомендации по подготовке к сдаче мазка на ПЦР, РИФ, посева на флору, микоплазму, трихомонаду, грибковую инфекцию.

1. Нельзя проводить такие исследования в период приема любых антибактериальных препаратов.

2. Эти исследования не сдаются в период менструации и в течение 1-2 дней после её окончания.

3. За 2-3 дня до визита в клинику следует прекратить использование любых влагалищных таблеток, шариков, свеч и лечебных, и противозачаточных средств.

4. Накануне вечером и с утра в день взятия мазка не следует подмываться и спринцеваться.

5. **ВАЖНО!** Нельзя брать мазки на ПЦР после проведения кольпоскопических проб.

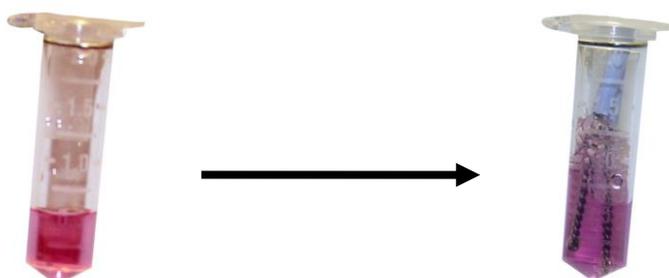
РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ОБРАЗЦОВ



Вакутейнер - вакуумный контейнер с различными антикоагулянтами или без них. Для взятия венозной крови для ПЦР в качестве антикоагулянта используются этилендиаминтетраацетат-ЭДТА. Использование гепарина в качестве антикоагулянта для ПЦР исследований запрещается так как гепарин является ингибитором ПЦР.

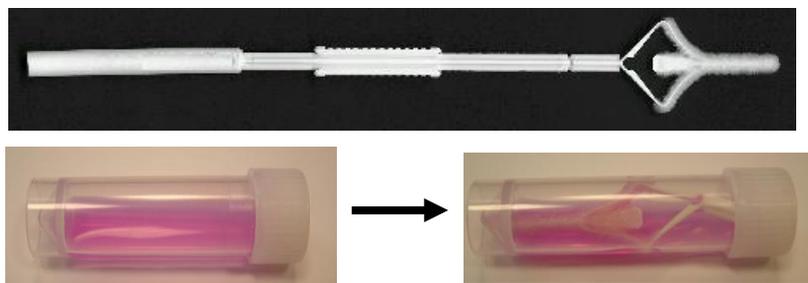


Специальный зонд - хорошо забирает клеточный материал, насечка способствует удобному обламыванию. Предназначен для получения материала из различных мест в том числе и с уретры. Сверху пробирка с транспортной средой.

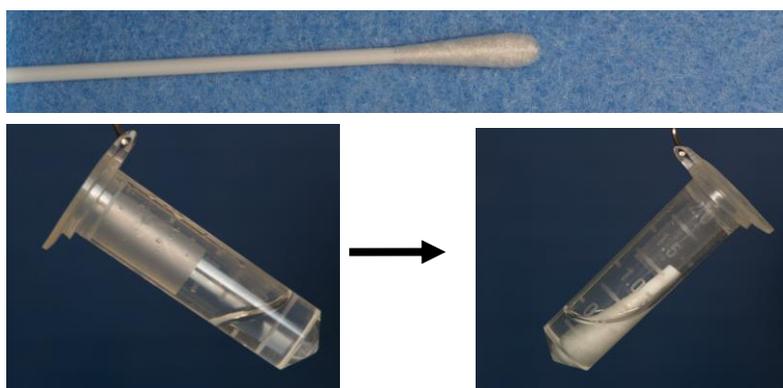


Цитощетка - Хорошо забирает клеточный материал, •насечка способствует удобному обламыванию. Предназначен для получения материала из цервикального канала. Внизу пробирка с транспортной средой

до и после взятия материала. При правильном заборе материала транспортная среда меняет окраску так как выделения из половых органов меняют рН среды транспортной среды и это является контролем правильности взятия биоматериала.



Цервикальная цитощетка - предназначен для получения материала из шейки матки, насечка способствует удобному обламыванию. Внизу пробирка с транспортной средой до и после взятия материала. При правильном заборе материала транспортная среда меняет окраску так как выделения из половых органов меняют рН среды транспортной среды и это является контролем правильности взятия биоматериала.



Специальное приспособление предназначен для получения мазков. Внизу пробирка с транспортной средой до и после взятия материала.



Флакон со одноразовой лопаточкой прикрепленной к крышке флакона, в который забирают материал. Предназначен для взятия образцов кала.



Стерильной флакон - предназначен для взятия образцов мочи.



Пробирка с крышкой объемом 50 мл – предназначен для взятия бронхо-альвеолярного лаважа или промывных вод бронхов.

ЭТАПЫ ПОСТАНОВКИ ПЦР

ПЦР-анализ состоит из трех этапов:

1. Подготовка пробы биологического материала. Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации.

При большом потоке исследований очень эффективно использовать простые методы пробоподготовки, так как они позволяют большую часть образцов (95% и более) обработать за очень короткое время с минимальными трудозатратами. Если такой метод не дает возможности провести ПЦР-анализ, то такие единичные образцы можно обработать другим методом,

позволяющим получить более чистые препараты ДНК, но сопряженным с большими трудозатратам.

2. Подготовка реакционной смеси. Это этап проводится в чистой зоне и готовые пробирки со «рабочей смесью» проводится в комнату для выделения ДНК для внесения в нее анализируемый образец ДНК.

3. Детекция. Для учета результатов амплификации используют различные методы. Наиболее современной является технология гибридизации флуоресцентных зондов с матрицей в процессе амплификации. Зонды добавляются в реакционную смесь наряду с праймерами и остальными компонентами реакции.

В структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, и перед началом реакции флуоресценция отсутствует. Во время реакции при повышении температуры происходит денатурация матрицы и зонды могут с ней гибридизоваться. На стадии элонгации во время синтеза комплементарной цепи Taq-полимераза разрушает зонд благодаря 5'-экзонуклеазной активности и флуорофор оказывается свободным от гасителя. Таким образом, количество разрушенных зондов и, соответственно, уровень флуоресценции оказывается пропорционален количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР. Детекция флуоресценции флуорофоров может проводится либо в процессе амплификации (технология «Real-time»), либо после окончания амплификации (технология «FLASH»).

Самой важной составляющей таких методов является то, что результаты детектируют по наличию флуоресценции в закрытых пробирках, что решает основную проблему ПЦР - проблему контаминации ампликонами.

ОСОБЕННОСТИ ПЦР ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РНК СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

Особенностью ПЦР при исследовании РНК содержащих вирусов является то что, выделенную из биологических образцов РНК необходимо перевести в форму ДНК. Для этого используют фермент (обратную транскриптазу), способный синтезировать комплементарную ДНК (кДНК) на матрице РНК. Такие ферменты выделяют из ретровирусов AMV (Avian myeloblastosis virus) и Mo-MuLV (Moloney murine leukemia virus). Эти ферменты могут быть использованы при температуре не выше 42⁰С, так как при более высокой температуре молекулы РНК легко образуют вторичные структуры, что снижает эффективность реакции обратной транскрипции. Полученные молекулы кДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР. Возможность использования РНК в качестве мишени для ПЦР существенно расширяет спектр применения этого метода. Например, геномы многих вирусов (гепатит С, ВИЧ и т.д.) представлены именно РНК.

ВЛИЯНИЕ КОНТАМИНАЦИИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение ПЦР-диагностики инфекций связано с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, - возможностью контаминации. Попадание в реакционную пробирку следовых количеств положительной ДНК (специфических продуктов амплификации ДНК-ампликонов; ДНК-стандарта, используемого в качестве положительного контроля; положительной ДНК клинического образца) приводит к амплификации в процессе ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, к появлению ложноположительных результатов.

Значит, причинами получения ложноположительных результатов являются три вида контаминаций:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов;

2. Контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности детектируемого гена, часто использующимися в качестве положительного контроля;

3. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, т.к. в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации. Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхности лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложноположительных результатов. Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств.

Накопленный к настоящему времени опыт работы лабораторий, использующих метод ПЦР для диагностики позволяет сформулировать основные требования к организации таких лабораторий и проведению самих анализов. Соблюдение данных требований позволяет исключить возможность контаминации и получения ложноположительных результатов.

ДЕЙСТВИЯ ПРИ КОНТАМИНАЦИИ 17

1. Сотрудников, проводящих мероприятия по деконтаминации, обеспечивают одноразовыми халатами, шапочками, бахилами и перчатками, одноразовой ветошью, емкостями для приготовления необходимых количеств моющих и дезинфицирующих растворов.

2. Каждую зону лаборатории обрабатывают работающие в ней сотрудники.

3. Для обработки каждой зоны используют новый набор уборочного инвентаря.

4. Каждую зону лаборатории разбивают на участки уборки, например:

- участок 1-бокс биологической безопасности и оборудование внутри него;
- участок 2- внешние поверхности бокса биологической безопасности;
- участок 3 - шкафы для расходного материала;
- участок 4 - холодильники для хранения реактивов, образцов проб;
- участок 5 - оборудование, которое используют в работе, но стоит вне бокса биологической безопасности;
- участок 6 - поверхности помещения (стены, окна, батареи, потолок, двери и т.д.);
- участок 7 - пол.

5.Обработку проводят от участка к участку последовательно. Каждый участок обрабатывают отдельной ветошью. Перед обработкой персонал надевает одноразовую одежду, бахилы, шапочки, перчатки; готовит моющие и дезинфицирующие растворы.

6.Поверхности каждого участка вначале обрабатывают моющим раствором для удаления жировых загрязнений, после чего остатки моющего средства удаляют ветошью, смоченной водой.

7.Затем на поверхность наносят на 30 минут дезинфицирующий раствор (например, 0,2%-ный раствор ДП-2Т или аналогичные ему, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке). Остатки дезинфицирующего средства тщательно удаляют ветошью, смоченной водой.

8. После завершения указанной обработки проводят обеззараживание ультрафиолетовым излучением влажных поверхностей в течение 1 ч.

9. Мероприятия, описанные в п. п. 7 и 8, повторяют еще раз.

10. Каждый последующий этап обработки проводят в новой одноразовой одежде (халат, шапочка, бахилы, перчатки) с использованием новой ветоши. Для удаления остатков нанесенных на поверхность дезинфицирующих средств ветошь тщательно прополаскивают в чистой воде, обрабатываемую поверхность протирают несколько раз. После каждого этапа обработки ветошь утилизируют.

11. По завершении деконтаминации берут повторные смывы, которые исследуют на наличие НК возбудителей инфекционных заболеваний, диагностику которых наиболее часто осуществляют в данной лаборатории, а также на выявление НК возбудителей, имеющих короткие - менее 300 п.н. - специфические продукты амплификации (длина специфического фрагмента указана в инструкциях к тест-системе).

12. Для проведения смывов стерильный зонд с ватным тампоном смачивают в физиологическом растворе или ТЕ-буфере (10 mM Tris, 1 Мм ЭДТА), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности оборудования, мебели, дверных ручек и косяков, телефонов и т.п. Особое внимание уделяют помещениям совместного посещения работников зоны детекции продуктов амплификации и других сотрудников лаборатории (столовая, санузел и т.п.). После взятия смыва зонд помещают в микропробирки типа «эппендорф» с 300 - 400 мкл ТЕ-буфера, вращают в

течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют.

13. В случае получения в образце смывов положительных результатов ПЦР-анализа обработку повторяют.

14. Загрязненный расходный материал (пробирки, наконечники и т.п.) утилизируют.

ПОМЕЩЕНИИ ЛАБОРАТОРИИ ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ПЦР АНАЛИЗА

ПЦР-лаборатория должна быть разделена на три зоны - по числу технологических операций:

1. Зона подготовки реакционной смеси («чистая» зона);
2. Зона пробоподготовки («грязная зона»);
3. Зона детекции.

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксиками. Полезно иметь устройство фильтрации воздуха. При наличии специальных боксов первую и вторую зоны допускается объединить, а для проведения реакции амплификации необходимо выделить отдельное помещение. Расположение зоны детекции зависит от того, какой из методов детекции применяется. Если используется метод, при котором необходимо открывать пробирку с продуктами амплификации (электрофорез, гибридационный анализ) то зона детекции должна размещаться как можно дальше от двух других зон (другой этаж, другое здание) и иметь не связанную с другими зонами систему вентиляции. Это является принципиальным требованием при организации ПЦР-лаборатории. А при ПЦР реального времени и при FLASH методе это не имеет принципиального значения и зона детекции может быть оборудована в соседней комнате. ПЦР-лаборатория должна быть разделена на три зоны - по числу технологических операций: Значит, для проведения ПЦР анализа необходимы 3 основные комнаты: комната для выделения ДНК, комната для приготовления «рабочей смеси» (master mix) и комната для амплификации.

КОМНАТА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Комнаты выделения ДНК- «грязная зона» это комната где проводится выделение ДНК методом поэтапного вымывание или сорбции на сорбенте.

Для выделения ДНК необходимы следующие оборудование:

1. Ламинарный шкаф 2-го класса защиты
2. Центрифуга 12000-14000 об/мин
3. Вортекс
4. Твердотельный термостат
5. Отсасыватель медицинский-аспиратор
6. Комплект дозаторов - одноканальные дозаторы объемом 0,5-10мкл, 10-100мкл, 100-1000 мкл



Аспиратор - предназначен для отсасывание жидкостей. Максимальная производительность по воде/воздуху - 6/20 л/мин, 2 емкости по 3 л, управление педалью, бактериальные фильтры, регулировка мощности



Комплект дозаторов с подставкой для дозаторов. Дозаторы - дозирующие устройства предназначенные для точного взятия жидкостей.

КОМНАТА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАБОЧЕЙ СМЕСИ

Комната приготовления рабочей смеси (master-mix)- «чистая зона».

Это комната где проводится смешивание компонентов ПЦР исследование (кроме ДНК мишени):

- Праймеров,
- Нуклеотидов,
- Таq-полимеразы и др.

Для приготовления рабочей смеси необходимы следующие оборудование:

1. ПЦР-бокс
2. Центрифуга 12000-14000 об/мин
3. Вортекс
4. Комплект дозаторов - одноканальные дозаторы объемом 0,5-10мкл, 10-100мкл, 100-1000 мкл
5. Подставка для дозаторов
6. Штатив типа «рабочее место» для пробирок 1,5 мл



Настольная модель бокса для стерильных работ, изготовлена из плексигласа с рабочим столом из стали, поверхность которого покрыта порошковой эмалью, и цифровым таймером контроля длительности ультрафиолетового облучения. Две 15 Вт УФ безозонные лампы дезинфицируют рабочий объём бокса в течении 15-30 мин. Одна 15 Вт лампа дневного света обеспечивает освещение рабочего места.



Центрифуга-вортекс обеспечивает возможность одновременного перемешивания и разделения образцов, используя модули центрифугирования и перемешивания, выполненные единым блоком.



Комплект дозаторов с подставкой для дозаторов. Дозаторы - дозирующие устройства предназначенные для точного взятия жидкостей.

КОМНАТА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ

В комнате для амплификации должна оборудоваться амплификатором. Все современные амплификаторы можно разделить на модели с

возможностью детекции накопления ДНК во время реакции детектирующие амплификаторы, и не детектирующие - обычные амплификаторы. Детектирующие амплификаторы применяемые для проведения ПЦР реального времени, в сравнении с обычными амплификаторами, оснащены дополнительной оптической насадкой, позволяющей регистрировать флуоресценцию в закрытой реакционной пробирке (через прозрачную крышку или стенки пробирки) непосредственно во время реакции.



SLAN

двух канальный детектирующий амплификатор блочного типа на 48 пробирок (Китай)



iQ5

пятиканальный детектирующий амплификатор блочного типа на 96 пробирок (США)

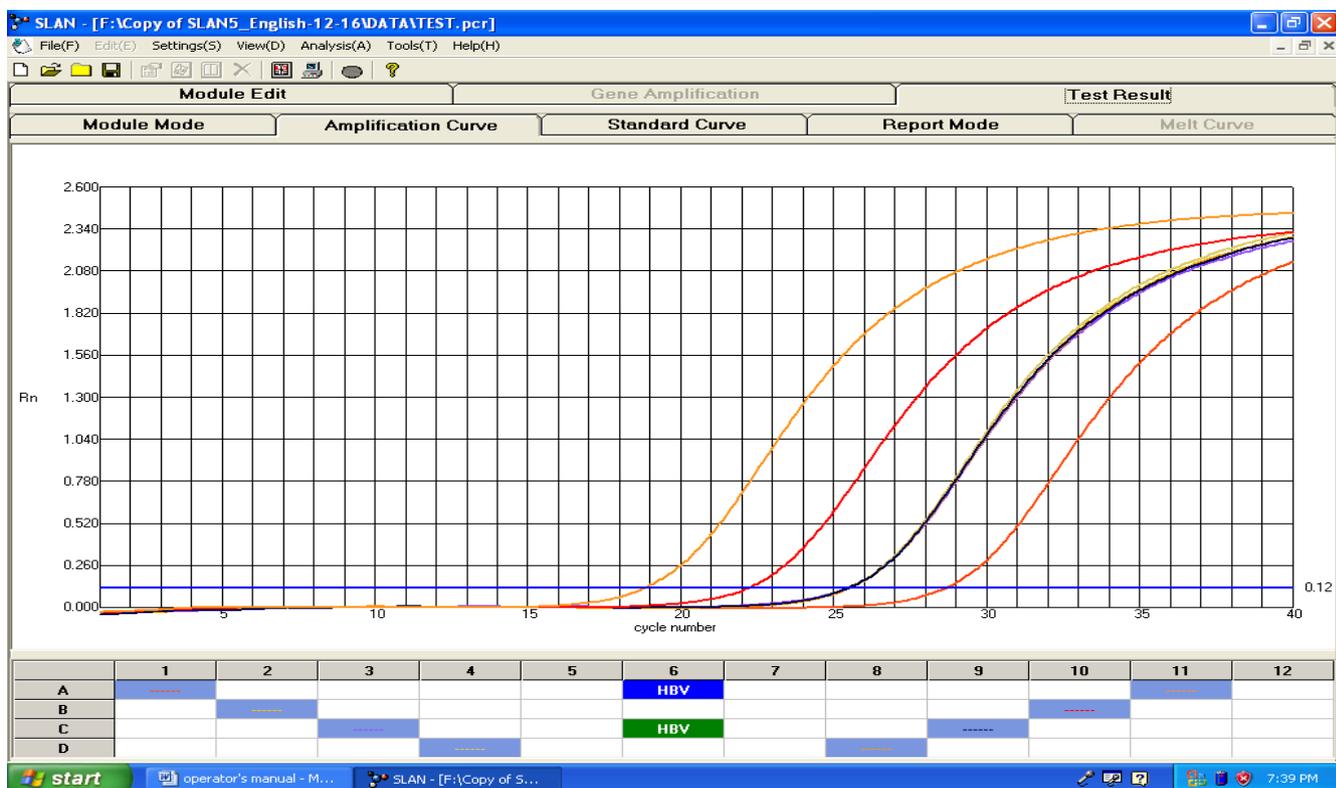


Rotor Gene 6000

многоканальный детектирующий амплификатор роторного типа со сменными роторами (Австралия)

КРАТКОЕ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР-РВ

№	КОНТРОЛЬ	ПРОБЛЕМА	ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	УСТРАНЕНИЕ
1	К+	Нет специфической полосы	Перепутывание mix1 и/или контролей Проблемы с реактивами	перестановка ПЦР
2	К-	Полосы ПК, ВК	контаминация	перестановка ПЦР, меры по предотвращению
3	ПКО	Отсутствуют или слабые полосы специфического сигнала/ВКО при наличии полосы К+	потери при выделении Испортились реактивы ПКО/ВКО	Перевыделение Развести ПКО и ВКО в 20 раз в ТЕ, поставить в ПЦР
4	ОКО	нет полосы ВКО	аналогично как для ПКО	аналогично как для ПКО
		наличие полосы ПК	контаминация	перевыделение, меры по предотвращению



Пример кривой амплификации – ПЦР-РВ полученный в амплификаторе SLAN

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Амплификация: процесс многократного копирования специфического участка ДНК (кДНК), ограниченного (фланкированного) праймерами.

Амплификатор: прибор предназначенный для проведения ПЦР.

Ампликоны: продукты ПЦР, синтезируемые в процессе амплификации копии ДНК-мишени.

Внутренний контроль ПЦР-анализа – это: препарат ДНК/РНК, добавленный к каждому исследуемому образцу на этапе обработки биологического материала, который проходит через все стадии ПЦР-анализа – экстракция НК, ОТ, ПЦР, на этапе детекции результат амплификации ВК позволяет судить о качестве проведения ПЦР-анализа в целом, а не отдельных его этапов. Отрицательный результат образца при отсутствии сигнала по внутреннему контролю говорит о недостоверности отрицательного результата образца.

ДНК-дезоксирибонуклеиновая кислота. Состоит из азотистых оснований аденина, гуанина, цитозина, тимина, дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты.

Контаминация НК - механический занос положительно реагирующих НК, прежде всего ампликонов, в исследуемые образцы, приводящий к ложноположительным результатам.

НК- нуклеиновые кислоты т.е. ДНК и РНК.

Отрицательный контроль ПЦР-анализа - контрольный образец который не содержит ДНК мишень. Положительный результат в отрицательном контрольном образце свидетельствует о загрязнении оборудования или реактивов продуктами ПЦР предыдущих исследований.

Полимеразная цепная реакция ПЦР-анализа – это имитация естественного процесса синтеза ДНК в лабораторных условиях с последующим (классический ПЦР, FLASH) или параллельным определением (Real-time ПЦР) продуктов амплификации.

Положительный контроль - контрольный образец который содержит ДНК мишень. Положительный контрольный образец, в котором реакция должна пройти обязательно, отсутствие результата в положительном контрольном образце будет свидетельствовать об ошибках в приготовлении реакции или испорченных реактивах.

РНК - Рибонуклеиновая кислота. Состоит из азотистых оснований аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и остатка фосфорной кислоты.

Тақ – **полимераза:** термостабильный фермент, используемый при амплификации.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое ПЦР?

*А. Это имитация естественного процесса синтеза ДНК в лабораторных условиях.

В. Это метод основанный на определении комплекса антигена с антителом с помощью ферментов.

С. Это метод определения антигенов с помощью антител сорбированных на поверхности латексных частиц.

Д. Это процесс синтеза ДНК на основе РНК.

Е. Это метод определения веществ основанный на принципе «молекулярных весов».

2. Какие виды ПЦР вы знаете?

А. ПЦР реального времени, ПЦР классика

В. FLASH, Реальный ПЦР, хроматография

С. Классический ПЦР, электрофорез

*D. Классический ПЦР, FLASH, ПЦР реального времени

Е. Электрофорез, ВЭЖХ

3. К основным компонентам ПЦР относятся?

*А. Праймеры, Таq-полимераза, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, ПЦР буфер, ДНК мишень

В. Минеральное масло

С. Плашка, конъюгат, субстрат, хромоген

Д. Антитела к гормонам или другим анализам нанесенных на чипе созданной на основе нанотехнологии

Е. Все ответы верны

4. Как называется прибор предназначенный для проведения ПЦР?

*А. Амплификатор, термоциклер, циклотермостат, ПЦР анализатор

В. Термоциклер, планшетный спектрофотометр

С. Циклотермостат, вертикальный спектрофотометр

Д. ПЦР анализатор, ПЦР катализатор, стриповый ИФА-ридер

Е. Все ответы верны

5. Что из себя представляет прибор предназначенного для ПЦР реального времени?

*А. Это циклотермостат совмещенный с флюориметром

В. Это вертикальный спектрофотометр совмещенный с миксером

С. Это масс-спектрометр совмещенный с ВЭЖХ

Д. Это горизонтальный спектрофотометр с термостатом и проточной кюветой

Е. Все ответы верны

6. Что означает слова контаминация?

*А. Загрязнение

- В. Умножение
- С. Удвоение
- Д. Удлинение
- Е. Все ответы верны

7. Укажите основные правила взятия материала для ПЦР исследований?

*А. Правильный выбор места и времени взятия образца в зависимости от локализации и патогенеза возбудителя

В. Правильный выбор времени взятия биоматериала в зависимости от патогенеза возбудителя

С. Взять большое количество образца

Д. Правильный выбор места взятия образца в зависимости от локализации возбудителя

Е. Все ответы верны

8. Почему клетки разных органов человеческого организма синтезируют разные белки, хотя каждая клетка организма содержит одинаковую генетическую информацию (ДНК)?

А. Потому что некоторые клетки не содержат ДНК например эритроциты

*В. Потому что в клетках «не работают» части ДНК которые связаны с гистонами.

С. Это неизвестно

Д. Каждая клетка имеет свою специфическую ДНК

Е. Все ответы верны

9. Соответствуют ли правила классической генетики «один ген = один белок» к понятиям современной геномики и протеомики?

А. Это до сих пор не изучено

*В. Молекулярно-биологические и протеомные исследования доказали не достоверность этой правила, это доказывает и тот факт что виды белков в организме в сотни раз больше чем количества генов

С. Это так потому что количества генов в организме в сотни раз больше чем виды белков

Д. Это понятие как было так и остаётся «золотым законам» генетики

Е. Все ответы верны

10. Какие виды ПЦР применяются при вирусных гепатитах?

А. Качественный ПЦР в том числе определения вирусов в мононуклеарах – для подтверждения диагноза

В. Определения YMDD, YVDD мутации вирусов-для оценки лекарственной устойчивости вирусов (при ВГВ)

С. Генотипирование-для установления срока лечения болезни (при ВГС)

Д. Количественный ПЦР-для оценки эффективности лечения

*Е. Все ответы верны

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диагностика внутриутробных инфекций у новорожденных детей методом полимеразной цепной реакции. Мет. рекомен. / Под редакцией Помогаевой А.П., Томск -2000. -40 с.
2. Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Мет. пособие/ Болдырева М. Н., Донников А Е, Тумбинская Л В. Москва- 2009.-42 с
3. Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) в клинической практике. Мет. Рекомен./ А.А.Бонецкий, М.М.Таирова, Т.С.Кутукеев и др. Бишкек – 2000.-12 с.
4. ПЦР «в реальном времени» / под ред. Д.В. Ребрикова 2-е изд., испр. и доп.-М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009.-223 с. : ил.
5. ПЦР-диагностика: выбор, взятие, транспортировка и хранение биологического материала. Мет. рекоменен. /под ред. Ариповой Т.У. Ташкент. 2010. -29 с.
6. Урогенитальный хламидиоз. Мет. рекомен / под. Ред Говоруна В.М. Москва-2009. -60 с.
7. Dang C, Jayasena S. D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR //J Mol Biol., 1996, 264:268-278.
8. Findlay J. B., Atwood S. M., Bergmeyer L., Chemelli J., Christy K., Cummins T., Donish W., Ekeze T., Falvo J., Patterson D., et al. Automated closed-vessel system for in vitro diagnostics based on polymerase chain reaction // Clin. Chem., 1993, 39:1927-1933.
9. Horton R. M., Hoppe B. L., Conti-Tronconi B. M. AmpliGrease: «hot start» PCR using petroleum jelly//Biotechniques, 1994,16:42-43.
10. Kellogg D. E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P. D., Chenchik A. TaqStart Antibody: « hot start» PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase // Biotechniques, 1994, 16:1134-1137.
11. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // Nucleic Acids Res., 1999,27:1558-1560.

СОДЕРЖАНИЕ

Изобретение ПЦР.....	3
Изобретение ПЦР «в реальном времени».....	4
Форматы ПЦР.....	5
Стадии ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией (Taq Man).....	6
Преимущества метода ПЦР как метода диагностики инфекционных заболеваний.....	7
Ограничения метода ПЦР.....	8
Основные и дополнительные компоненты ПЦР.....	9
Программа ПЦР анализа.....	9
Организация работ ПЦР лаборатории.....	10
Общие рекомендации по взятию биоматериала для ПЦР-исследования.....	12
Расходные материалы для взятия образцов.....	13
Этапы постановки ПЦР.....	15
Особенности ПЦР при исследовании РНК содержащих вирусов..	16
Влияние контаминации на результаты ПЦР исследований.....	17
Действия при контаминации.....	17
Помещения лаборатории предназначенного для ПЦР анализа.....	19
Комната выделения ДНК.....	19
Комната приготовления рабочей смеси.....	21
Комната для амплификации и детекции.....	22
Краткое интерпретация результатов ПЦР-РВ.....	23
Термины, определения и сокращения.....	25
Контрольные вопросы.....	26
Список литературы.....	28