

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

И.В. Полторацкая
(представил д.т.н., проф. В.А. Краснобаев)

Рассматривается метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Представлен один из вариантов технической реализации данного метода.

В настоящее время весьма актуальной и важной является задача количественного определения продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) непосредственно во время амплификации (Real Time PCR), т.е. в реальном времени. Такой метод ПЦР становится одним из наиболее популярных методов как в клинической генодиагностике, так и в научных исследованиях [1, 2].

Рассматриваемый метод основывается на использовании одновременно операций детектации с амплификацией, и основывается на принципе естественной репликации ДНК, включающей расплетение двойной спирали ДНК, расхождения нитей нуклеиновых кислот и комплементарный синтез новых нитей ДНК. Данный метод позволяет увеличивать в геометрической прогрессии количество копий фрагментов генома.

Принципиальной особенностью данного метода в отличие от классического ПЦР является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации процесса ПЦР-лаборатории и автоматическая регистрация и представление (интерпретация) полученных результатов. Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Данный метод в течение последних лет успешно применяется в крупнейших диагностических и научно-исследовательских центрах развитых стран мира и в ближайшее время станет широко распространенным в Украине. Это обусловлено в первую очередь тем, что благодаря использованию этого метода уменьшается количество обслуживающего персонала и востребованности количественного определения ДНК/РНК, а также осуществляется экономия производственных площадей, необходимых для осуществления процесса полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для реализации метода ПЦР существует ряд приборов. Рассмотрим принцип действия одного из них – генного амплификатора GeneAmp System 2400, предназначенного для автоматического проведения метода PCR-Polymerase Chain Reaction (полимеразной цепной

реакции) для амплификации ДНК [3]. Прибор реализует три функции:

- денатурацию матричной двухцепочной ДНК при нагревании от 94 до 95 °С;
- отжиг двух отдельных цепей ДНК со специфическими праймерами при охлаждении реакционной смеси до (37 ÷ 65) °С;
- элонгацию цепи праймеров в присутствии полимеразы AmpliTaq ДНА проводят при нагревании смеси до промежуточной температуры 72 °С.

Описываемый генный амплификатор предназначен для автоматического осуществления амплификации нуклеиновых кислот с использованием PCR. Прибор оборудован панелью управления, на которой имеется цифровая клавиатура, функциональные клавиши и экран. На экран в процессе каждого цикла выводится информация о времени и градиенте температуры в каждый данный момент времени работы прибора. В приборе имеется возможность реализовать четыре предварительно запрограммированных программы для проведения процесса PCR, а также проводить автоматическое изменение временных и температурных параметров в процессе выполнения цикла. К прибору 2400 можно подключить любой принтер с серийной (RS-232C) интерфейсной панелью и следующими характеристиками:

- величина скорости передачи информации – 9600 (бод);
- количество информационных битов – 8 (бит);
- количество стоповых битов – 1 (бит).

Прибор 2400 содержит до 100 вариантов реализации метода ПЦР. Это число изменяется в зависимости от объема и сложности метода. Каждый сохраняемый вариант характеризуется размером, измеряемым в сегментах. Память прибора заполняется до тех пор, пока общий размер всех хранимых вариантов метода не будет равен 529 сегментам или число сохраняемых вариантов не достигнет 100.

Использование данного прибора и ему подобных (см. ниже описание приборов “ABI Prism 7000” и “iQ iCycler”) позволяет одновременно проводить операцию детекции до четырех агентов и быстро получать результаты с минимальными затратами. В течение порядка 2 часов можно провести обследование 96 проб, что превышает производительность обычных приборов почти на порядок.

Бурное развитие науки и техники за несколько последних десятилетий и результаты современных исследований, как в нашей стране, так и за рубежом, в области молекулярной биологии, генетики, генной инженерии, биохимии и биофизики привели к созданию и внедрению в практику диагностических лабораторий молекулярно-биологических методов исследований генома человека, животных, растений, бактерий и вирусов. Эти методы чаще всего называют ДНК-исследованиями. Данные ДНК-исследования позволяют осуществлять раннюю и полную диагностику различных заболеваний, своевременно проводить дифференциальную диагностику и осуществлять контроль эффективности терапии.

В качестве приборов для реализации рассмотренного метода целе-

сообразно использовать, например, следующие. Так “ABI Prism 7000” (производства компании “Applied”, USA) является оптимальным прибором по соотношению качество/цена для проведения ПЦР в реальном времени. Полученные с помощью этого прибора результаты информационных исследований опытов отличаются высокой точностью и воспроизводимостью. Прибор имеет удобное автоматизированное управление и использует персональный компьютер и пакет прикладного программного обеспечения, позволяющие получить выходные информационные данные в электронном формате.

Прибор “iQ iCycler” является наиболее оптимальным прибором по соотношению качество/цена для реализации метода (проведения) ПЦР в реальном времени. Применение этого прибора позволяет проводить одновременную детекцию до четырех информационных объектов (агентов) в одной емкости («мультиплексная ПЦР»), что позволяет оперативно получить результат информационного обследования с минимальными временными и экономическими затратами. Проводить информационное обследование возможно одновременно для 96 биопроб. Полученные с помощью этого прибора результаты отличаются высокой точностью и воспроизводимостью. Прибор имеет удобное управление, не требующее глубоких специальных знаний физических процессов и высокой компьютерной подготовки. В комплекте с прибором поставляется пакет прикладного программного обеспечения, позволяющий получать результаты исследований в электронном формате (необходим персональный компьютер класса Pentium быстродействием не ниже 400 МГц).

Таким образом, совмещение операций амплификации и детекции в одном методе ПЦР в реальном времени позволяет существенно повысить степень достоверности PCR-анализа, исключив возможность контаминации, а также значительно сократить трудоемкость и трудозатраты исследований. Благодаря возможности количественной оценки и одновременного анализа нескольких параметров, метод ПЦР представляет ученым и практикам новые широкие возможности в генодиагностике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснобаев В.А. Искусственный интеллект и система остаточных классов // Проблемы бионики. – 1987. – Вып. 39. – С. 53 – 58.
2. Колупаев В.Е. Преимущество метода ПЦР в реальном времени // Сборник тезисов 4-й Всероссийской научно-практической конференции. – М.: РАМН. – 22 – 24 октября 2002 г. – С. 182 – 185.
3. Генный амплификатор GenAmp PCR System 2400. Техническое описание. Руководство по эксплуатации. – М., 1995. – 260 с.

Поступила 20.08.02

ПОЛТОРАЦКАЯ Инна Викторовна, лаборант КДЛ. В 1989 году окончила Харьковский государственный университет. Область научных интересов – бионика, генодиагностика.

инженерия и клиническая генодиагностика.
