

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие Л. А. Остермана	6
Предисловие Е. Д. Свердлова	7
Список сокращений	8
Перечень компаний, упомянутых в тексте	9
Глава 1. Что такое ПЦР	10
1.1. Изобретение ПЦР	10
1.2. Изобретение ПЦР «в реальном времени»	12
1.3. Отличие анализа продуктов ПЦР «по конечной точке» и «в реальном времени»	14
1.4. Развитие ПЦР «в реальном времени» как диагностического инструмента	14
Глава 2. Основы полимеразной цепной реакции	19
2.1. Общие сведения о ПЦР	19
2.2. Организация ПЦР-лаборатории	20
2.3. Оборудование и материалы для ПЦР	22
2.4. Свойства олигонуклеотидов (праймеров и проб)	26
2.5. Влияние ионов Mg^{2+}	29
2.6. Свободные дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTPs)	29
2.7. Влияние pH	30
2.8. Минеральное масло	30
2.9. Другие компоненты, добавление которых влияет на ПЦР	30
2.10. Ферменты, используемые в ПЦР	31
2.11. Программы амплификации	32
2.12. «Горячий старт» (hot start)	36
Глава 3. Оборудование для ПЦР «в реальном времени»	39
3.1. Устройство детектирующих амплификаторов	39
3.2. Основные функциональные узлы	39
3.3. Обзор характерных разновидностей приборов	52
3.4. Тенденции развития оборудования для ПЦР «в реальном времени»	64
Глава 4. Визуализация накопления ДНК при проведении ПЦР «в реальном времени»	65
4.1. Флуоресценция	65
4.2. Флуорофоры	66
4.3. Гасители флуоресценции	69

4.4. Неспецифичные системы детекции	73
4.5. Специфичные системы детекции	76
Глава 5. Дизайн праймеров и проб, программы амплификации ...	85
5.1. Параметры, влияющие на взаимодействие олигонуклеотида и ДНК	85
5.2. Выбор последовательности проб	94
5.3. Программное обеспечение для дизайна праймеров и проб	95
5.4. Особенности систем праймеры–проба	96
5.5. Особенности программ амплификации для ПЦР «в реальном времени»	96
Глава 6. Особенности очистки нуклеиновых кислот для ПЦР «в реальном времени»	101
6.1. Общие принципы очистки нуклеиновых кислот для использования в ПЦР	101
6.2. Особенности взятия биоматериала для клинических ПЦР-исследований и риск контаминации	103
6.3. Особенности методов очистки НК для ПЦР «в реальном времени»	105
6.4. Типовые ошибки использования ПЦР «в реальном времени», связанные с количеством нуклеиновых кислот, забираемых в реакцию	106
Глава 7. Анализ данных ПЦР «в реальном времени»	109
7.1. Методы и средства анализа графиков накопления ДНК	109
7.2. Простая модель ПЦР	111
7.3. Связь флуоресцентного сигнала и накопления ДНК в ходе ПЦР	113
7.4. Пороговый метод сравнения графиков накопления ДНК (C_t)	114
7.5. Определение эффективности ПЦР	118
7.6. Недостатки порогового метода и пути их преодоления ...	122
7.7. Методы прямого сравнения графиков накопления ДНК (C_p)	129
7.8. Комбинация методов C_t и C_p	134
Глава 8. Определение уровня представленности транскриптов ...	141
8.1. Организация эксперимента	141
8.2. Абсолютное определение уровня представленности транскриптов	151
8.3. Относительное определение уровня представленности транскриптов	155
8.4. Нормировка данных	156
8.5. Внутренний контрольный образец	160

8.6. Отрицательный контрольный образец	161
Глава 9. Количественное определение вирусной нагрузки	165
9.1. Количественное определение вирусной нагрузки	165
9.2. Источники погрешностей и варианты учета потерь и эффективности реакции	182
Глава 10. Использование ПЦР «в реальном времени» для определения однонуклеотидного полиморфизма	188
10.1. Однонуклеотидный полиморфизм последовательностей ДНК	188
10.2. Идентификация ОНП с помощью аллель-специфичных праймеров	190
10.3. Дифференциация аллелей с помощью олигонуклеотидных проб	196
10.4. Генотипирование ОНП методом плавления ДНК-дуплексов.	199
Глава 11. Определение относительного содержания нуклеиновых кислот на примере генетически модифицированных источников.	202
11.1. Общие сведения о ГМИ	202
11.2. Классификация существующих методов определения ГМИ в продуктах питания	202
11.3. Организация чужеродной ДНК в геноме растений	205
11.4. Выбор последовательностей-мишеней для выявления чужеродной ДНК в геноме растения	205
11.5. Тест-системы для определения процентного содержания чужеродной ДНК относительно геномной ДНК растений.	207
11.6. Выбор чужеродной и нормировочной ДНК для количественного определения ГМИ.	210
11.7. Калибровочные образцы	211
11.8. Точность метода определения процентного содержания генетически модифицированных ингредиентов в пище с помощью метода ПЦР «в реальном времени»	212
Предметный указатель	216

ПРЕДИСЛОВИЕ Л. А. ОСТЕРМАНА

Развитие большинства современных научных дисциплин напрямую связано с развитием применяемых исследователями методов. В последние десятилетия именно новые методические подходы определяли прорывы в области биохимии и молекулярной генетики. При этом понимание сути используемых методик всегда являлось необходимым условием эффективного экспериментального подхода. Одним из таких методов, позволивших генетикам и молекулярным биологам сделать сразу несколько огромных шагов вперед, безусловно стало изобретение метода полимеразной цепной реакции.

Несмотря на то, что принцип ПЦР понятен большинству школьников после краткого его изложения, этот метод обладает массой нюансов, о существовании которых подозревают далеко не все исследователи, использующие его в повседневной практике. Так, далеко не каждый экспериментатор учитывает влияние эффективности ПЦР на результат амплификации. А между тем данный параметр определяет возможность сравнения результатов для разных реакций. Другой пример типичного «заблуждения» — отождествление накопления ДНК и накопления флуоресцентного сигнала при проведении ПЦР «в реальном времени», хотя есть масса примеров из практики, когда эти процессы идут независимо.

Предлагаемая читателю книга направлена, в первую очередь, на объяснение тонкостей метода полимеразной цепной реакции с регистрацией результатов в режиме «реального времени». Авторы постарались рассмотреть все нюансы метода, позволяя читателю разобраться в сути процесса. Работа выстроена по принципу использования метода ПЦР «в реальном времени» для решения различных задач. При этом авторы постарались сделать так, чтобы исследователь мог обратиться к каждой отдельной главе, поняв особенности данного варианта применения метода даже без прочтения всей книги.

Л. А. Остерман

ПРЕДИСЛОВИЕ Е. Д. СВЕРДЛОВА

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) «в реальном времени» — методика, прочно вошедшая в повседневную практику исследовательских и клинических лабораторий по всему миру. Спектр задач, для решения которых применяется ПЦР «в реальном времени», увеличивается с каждым днем. Сюда можно отнести как сферу научных исследований (определение уровня экспрессии генов, анализ количественного соотношения альтернативно сплайсированных форм мРНК и т. д.), так и сферу прикладных применений (определение уровня бактериальной или вирусной нагрузки органа, поиск следов генно-инженерных конструкций в продуктах питания и т. д.).

Несмотря на то, что число обзоров и монографий (A–Z of Quantitative PCR; Real-Time PCR (BIOS Advanced Methods)), посвященных ПЦР «в реальном времени», постоянно растет, ощущается значительная нехватка подобных работ на русском языке. Поэтому книга Д. В. Ребрикова с соавторами, являющаяся первой работой такого уровня, посвященной различным аспектам ПЦР «в реальном времени», вне всякого сомнения, актуальна и с успехом заполнит существующий вакуум соответствующих русскоязычных учебных пособий.

Книга написана коллективом авторов, не просто использующих ПЦР «в реальном времени» в повседневной практике, но являющихся ведущими в нашей стране разработчиками оборудования и реагентов для ПЦР в «реальном времени». Разностороннее и творческое понимание физической и биологической составляющих научной основы метода помогло авторам в полной мере осветить особенности ПЦР «в реальном времени» и дать читателям точную, написанную доступным языком картину процессов, идущих в реакционной пробирке.

По своей структуре и глубине описания этих процессов книга нацелена, в первую очередь, на сотрудников научно-исследовательских лабораторий и студентов, стремящихся разобраться в фундаментальных принципах и нюансах метода. Вместе с тем, каждая глава содержит много конкретных практических рекомендаций, делая книгу ценной также для практикующих специалистов.

*Е. Д. Свердлов
Академик РАН и РАСХН, советник РАН*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AMV — вирус миелобластога птиц
dNTPs — дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
DTT — дитиотрейтол
EBV — вирус Эпштейна–Барр
FACS — флуоресцентный клеточный сортировщик
FLASH — флуоресцентная детекция результатов после ПЦР
FRET — флуоресцентно-резонансный перенос энергии
GFP — зеленый флуоресцирующий белок
HBV — вирус гепатита В
HCV — вирус гепатита С
HIV — вирус иммунодефицита человека
HSV — вирус простого герпеса
LCR — лигазная цепная реакция
LNA — линейная нуклеиновая кислота
MGB — связыватель малой бороздки
MMLV — вирус лейкемии мышей Молони
NASBA — основанная на последовательности нуклеиновых кислот амплификация
pH — водородный показатель
T_m — температура «плавления»
TMA — опосредованная температурой амплификация
BSA — бычий сывороточный альбумин
ВКО — внутренний контрольный образец
ГиФА — гибридизационно-ферментный анализ
ГМ — генетически модифицированный
ГМИ — генетически модифицированный источник
ГМО — генетически модифицированный организм
ДМСО (DMSO) — диметилсульфоксид
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖХВД (HPLC) — жидкостная хроматография высокого давления
ИКП — инвертированный концевой повтор
кДа — килодальтон
кДНК — комплементарная ДНК
КПД — коэффициент полезного действия
мкМ — микромоль
мМ — миллимоль
мРНК — матричная РНК
НК — нуклеиновая кислота
ОЕ — оптическая единица
ОНП — однонуклеотидный полиморфизм
ОТ — обратная транскрипция
ОТ-ПЦР — обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция
п. н. — пара нуклеотидов
ПААГ (PAGE) — электрофорез в полиакриламидном геле
ПЗС — прибор с зарядовой связью
ПЦР — полимеразная цепная реакция
рекДНК — рекомбинантная ДНК
РНК — рибонуклеиновая кислота
рРНК — рибосомальная РНК
т. п. н. — тысяча пар нуклеотидов
ТЭ — термоэлектронный
УФ — ультрафиолет
ФЭУ — фотоэлектронный умножитель
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

ПЕРЕЧЕНЬ КОМПАНИЙ, УПОМЯНУТЫХ В ТЕКСТЕ

Agilent Technologies

Ambion

Applied Biosystems

Bayer Diagnostics

Bio-Rad

Cepheid

Corbett Research

Digene Diagnostics

DNASTAR

Gen-Probe Inc.

Hasting Software

Idaho

Molecular Biology Insights

Organon Teknika

QIAGEN

Roche

Stratagene

НПФ ДНК-Технология

ЧТО ТАКОЕ ПЦР

1.1. ИЗОБРЕТЕНИЕ ПЦР

В последние годы все больше молекулярно-биологических методов находят практическое применение в различных областях медицины, промышленности и сельского хозяйства. 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 [Kleppe *et al*, 1971]. Однако исследователями не была продемонстрирована главная черта ПЦР — экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК.

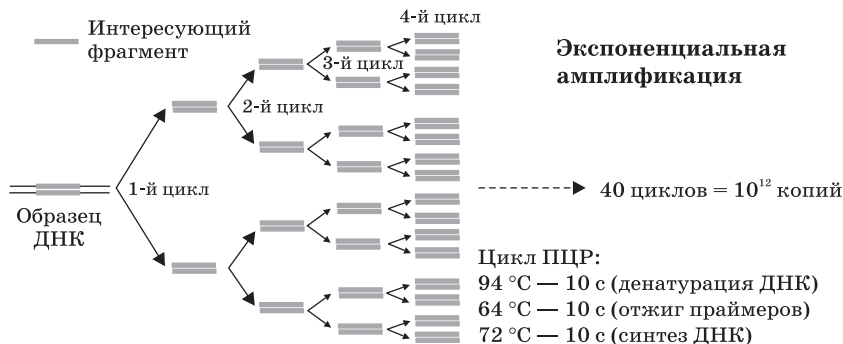


Рис. 1.1. Принцип экспоненциальной амплификации ДНК в ходе ПЦР

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 (рис. 1.1).

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 °C. 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 β -глобина [Saiki et al, 1985]. С этого момента количество публикаций, в которых авторы сообщали о применении ПЦР в своих работах, стало увеличиваться в геометрической про-

грессии. Метод приобрел такую популярность, что сегодня уже трудно представить работу в области молекулярной биологии без его использования. 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.

1.2. 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 [Higuchi *et al*, 1992]. 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 упростило технику измерения и сделало подход более точным [Higuchi *et al*, 1993].

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 де-

Изобретение «классической» ПЦР

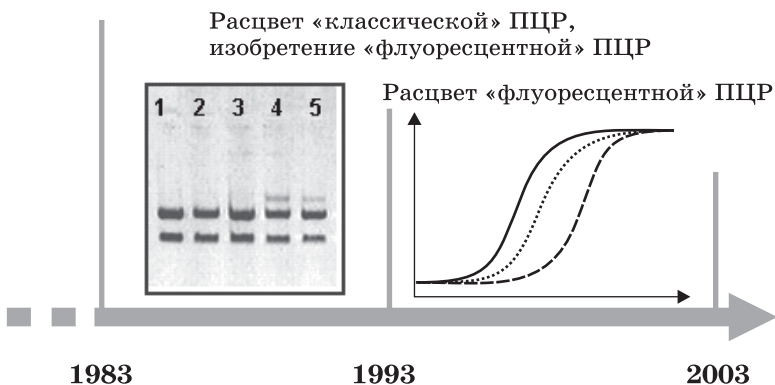


Рис. 1.2. Этапы развития метода ПЦР

текции 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 мешать последующим процедурам и их лучше исключить из состава реакционной смеси (рис. 1.3).

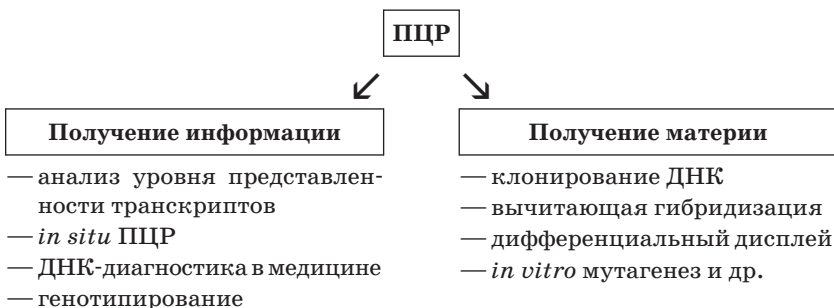


Рис. 1.3. Разделение ПЦР по принципу решаемой задачи. ПЦР «в реальном времени» наилучшим образом подходит для «информационной» ПЦР

1.3. ОТЛИЧИЕ АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ ПЦР «ПО КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» И «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ»

Регистрировать результат ПЦР можно либо по завершении амплификации («по конечной точке»), либо на протяжении всей реакции («в реальном времени»). «Классическая» ПЦР предполагает анализ результатов реакции «по конечной точке». Для этого используют методы электрофореза в геле, гибридационно-ферментный анализ (ГиФА), флуоресцентную детекцию после ПЦР (FLASH) и др. Все эти подходы показывают количество продукта реакции в определенный момент течения процесса (обычно — по завершении процесса), давая исследователю лишь статичную картинку динамичного процесса. Электрофореграмму агарозного геля по информативности для исследователя можно сравнить фотографией фигуриста, по которой судьи должны выставить оценки за технику и артистичность всего выступления.

При регистрации накопления продуктов амплификации на протяжении всего процесса, исследователь получает гораздо больше информации об особенностях реакции. Продолжая аналогию, можно сказать, что ПЦР «в реальном времени» — это киносъемка выступления фигуриста. Зная кинетику процесса, можно уже оценивать начальные параметры реакции и сравнивать реакции между собой.

Приведем такой пример: среди исследователей, использующих ПЦР для оценки уровня представленности транскриптов, часто можно встретить суждение, что чем больше продукта реакции видно на электрофореграмме, тем больше матриц было добавлено в реакцию на старте. На рисунке 1.4 приведен результат эксперимента, в котором в параллельные реакции было добавлено одинаковое количество стартовых молекул ДНК. Анализ электрофореграммы показывает, что в реакциях получено разное количество продукта ПЦР. Однако кривые накопления продукта амплификации ярко демонстрируют схожую начальную концентрацию матриц.

1.4. РАЗВИТИЕ ПЦР «В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ» КАК ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА

Переход любого метода из научно-исследовательской лаборатории в лабораторию диагностическую сопряжен с рядом возникающих на этом пути проблем: уровень специальной подготовки сотрудников диагностической лаборатории принци-

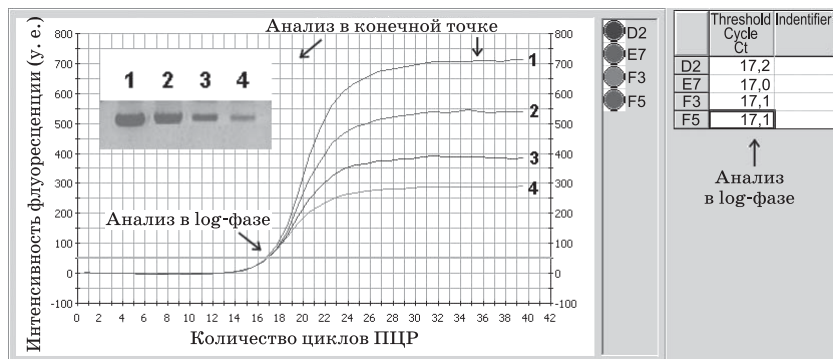


Рис. 1.4. Пример графиков накопления продуктов амплификации для четырех реакций с одинаковым начальным количеством матричной ДНК. На врезке показана электрофореграмма тех же реакций. Видно, что, несмотря на различие в конечной концентрации продуктов реакции, появление регистрируемого прибором сигнала для всех пробирок произошло одновременно, что свидетельствует о схожести начального количества ДНК

пиально отличается от подготовки сотрудников научно-исследовательского института. В медицинской диагностике гораздо выше требования к воспроизводимости получаемых результатов, трактовка результатов исследования должна быть стандартизована и автоматизирована и т. д.

В этой связи можно сформулировать основные направления развития ПЦР в ближайшем будущем.

1. Повышение общей надежности метода.
2. Дальнейшее упрощение процедуры анализа.
3. Сокращение времени исследования.
4. Широкое внедрение количественной ПЦР.

Эти тенденции будут реализованы за счет использования флуоресцентных методов детекции продуктов амплификации, автоматизации и применения компьютерных методов регистрации и трактовки результатов исследования.

Уже сейчас техника выполнения процедур при проведении ПЦР-диагностики довольно проста. В клинической лабораторной диагностике исследование принято подразделять на три этапа: пробоподготовка (очистка ДНК или РНК исследуемого объекта от примесей), амплификация определенного фрагмента ДНК и регистрация результатов амплификации. Развитие

методик пробоподготовки можно прогнозировать в направлении повышения эффективности лизиса и удаления ингибиторов и автоматизации процесса. Некоторые образцы биоматериала содержат агенты, существенно снижающие эффективность реакции. При проведении количественного ПЦР-анализа отличие в эффективности амплификации может внести существенную ошибку, поэтому с распространением количественного анализа требования к чистоте получаемой ДНК повышаются. Для этапа амплификации стоит отметить тенденцию к переходу от использования отдельных реакционных пробирок к стандартным форматам скрепленных пробирок (8- или 12-луночные стрипы и 96- или 384-луночные планшеты). При этом возможность использования многоканальных пипеток и дозаторов ускоряет процедуру приготовления реакционной смеси. Крупные диагностические центры, при использовании планшетных форматов, могут применять роботизированные дозирующие станции, снижающие вероятность ошибки лаборанта.

Достоверность исследования в значительной мере связана со способом детекции и интерпретации результатов ПЦР (см. табл. 1.1). В настоящее время можно выделить четыре системы детекции результатов ПЦР, наиболее часто применяемых в диагностических лабораториях: гель-электрофорез, гибридизационно-ферментный анализ (ГиФА), флуоресцентная детекция результатов после ПЦР (FLASH) и флуоресцентная детекция во время ПЦР (ПЦР «в реальном времени»). Последние два метода отличаются тем, что продукт амплификации для определения не извлекается из пробирки, а регистрация результатов (измерение флуоресценции) идет в закрытой пробирке. Тем самым решается одна из ключевых проблем внедрения ПЦР в медицинскую лабораторную практику — проблема контаминации (см. гл. 2).

Применение системы детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени», наряду с ответом на вопрос о наличии или отсутствии в исследуемом образце мишени, позволяет оценить его количество, что в ряде случаев позволяет уточнить диагноз и выбрать более адекватный метод лечения.

Современные компьютерные программы в комбинации с применением флуоресцентно-меченных гибридизационных олигонуклеотидных проб для визуализации результатов ПЦР (методы FLASH или ПЦР «в реальном времени») позволяют практически полностью исключить неверную трактовку результатов. Автоматизированная система фиксирования данных

Коллектив авторов — сотрудники научного подразделения ЗАО «НПФ ДНК-Технология», ведущего в нашей стране разработчика оборудования и реагентов для ПЦР «в реальном времени».

В книге в полной мере освещаются особенности метода и дается точная, написанная доступным языком картина процессов, идущих в реакционной пробирке. В первую очередь, книга предназначена сотрудникам научно-исследовательских лабораторий и студентам, стремящимся разобраться в фундаментальных принципах и особенностях ПЦР «в реальном времени». Вместе с тем, каждая глава содержит много конкретных практических рекомендаций, что делает рукопись настольным руководством сотрудника медицинской диагностической лаборатории.