

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»
завідувач кафедри молекулярної
і медичної біофізики
доктор фіз.-мат. наук, доцент
_____ Володимир БЕРЕСТ
«___» _____ 2023 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

ВИКОРИСТАННЯ БІОФІЗИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В МЕДИЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

Науковий керівник

д-р фіз.-мат. наук, с.н.с., професор _____ Марина КОСЕВИЧ

Виконала студентка групи РБ-61,

спеціальність: 105 Прикладна

фізика та наноматеріали _____ Олександра КОПТЄВА

Харків - 2023

РЕФЕРАТ

Коптєва О.Д. Використання біофізичних характеристик полімеразної ланцюгової реакції в медичній діагностиці. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023. 57 с., 19 рис., 6 табл., 0 дод., 38 джерел.

ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ФЛУОРЕСЦЕНТНІ БАРВНИКИ, ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ, ПРАЙМЕР, АМПЛІФІКАЦІЯ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ В РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ, ПЛАВЛЕННЯ ДНК, МІЖМОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ

Об'єкт дослідження: біофізичні характеристики методу полімеразної ланцюгової реакції.

Предмет дослідження: особливості використання біофізичних характеристик біополімерів в клінічній діагностиці із застосуванням різних методик ПЛР.

Мета роботи: визначити оптимальні методики використання ПЛР та ПЛР в реальному часі для статистично значущого детектування збудників інфекційних захворювань.

Методи дослідження: флуоресцентна спектроскопія, гель електрофорез в ПААГ, центрифугування, полімеразна ланцюгова реакція.

Результати дослідження: показано, що різні методики ампліфікації ДНК та РНК при клінічному використанні методу полімеразної ланцюгової реакції забезпечують відмінне статистично значуще детектування та кількісне визначення збудників інфекційних захворювань, що передаються статевим шляхом. Доповнено базу даних клінічної лабораторії. Визначено шляхи спрощення стадії підготовки зразків та скорочення часу дослідження.

ABSTRACT

Kharchenko Y.O. Application of biophysical characteristics of a polymerase chain reaction in medical diagnostics. Thesis. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023. 57 pages, 19 figures, 6 tables, 0 appendices, 38 references.

POLYMERASE CHAIN REACTION, FLUORESCENT DYES, GEL ELECTROPHORESIS, PRIMER, AMPLIFICATION, POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME, DNA MELTING, INTERMOLECULAR INTERACTIONS

Research object: biophysical characteristics of the polymerase chain reaction method.

The subject of the study: peculiarities of using biophysical characteristics of biopolymers in clinical diagnostics using different PCR techniques.

The aim of the work: to determine the optimal methods of using PCR and real-time PCR for statistically significant detection of pathogens of infectious diseases.

Research methods: fluorescence spectroscopy, gel electrophoresis in PAAG, centrifugation, polymerase chain reaction.

Research results: it is shown that different methods of DNA and RNA amplification in clinical use of the polymerase chain reaction provide distinct statistically significant detection and quantification of pathogens of sexually transmitted infectious diseases. The database of the clinical laboratory has been supplemented. Ways of simplifying the sample preparation stage and reducing research time have been identified.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ	8
1.1. Перспективи практичного використання ПЛР-діагностики	8
1. 2. Механізм полімеразної ланцюгової реакції	9
1.2. 1. Компоненти реакційної суміші	9
1.2.2. Циклічний температурний режим	10
1.2.3. «Ефект плато».....	14
1.3. Стадії постановки ПЛР	14
1.3.1. Підготовка проби біологічного матеріалу.....	16
1.3.2.1. Проведення ПЛР у режимі «гарячого старту».....	18
1.3.3. Детекція.....	19
1.3.3.3. ПЛР у режимі реального часу.....	20
1.4. Спостереження за ходом реакції ампліфікації.....	25
1.4.1. Додатні контролю	25
1.4.2. Внутрішній контроль	26
1.5. Проблема контамінації зразків	27
1.6. Облаштування ПЛР-лабораторії та організація робочого процесу	29
Розділ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	31
2.1. Проведення ПЛР в режимі реального часу	31
2.2. Методика проведення ПЛР-ампліфікації ДНК у форматі Real-time	35
2.3. ПЛР-детектор «Джин».....	36
2.4. Методика ПЛР-ампліфікації ДНК у форматі "Flash")	37
2.5. Виявлення РНК у пробах за допомогою Gene Pak™ RNA PCR test.....	39
2.5.1. Пробопідготовка	40

2.5.2. Постановка реакції зворотної транскрипції	41
2.5.3. Проведення реакції PCR.....	41
2.6. Візуалізація результатів ПЛР.....	43
2.6.1. Проведення гель-електрофорезу	43
Розділ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54

ВСТУП

Полімеразна ланцюгова реакція – потужний інструмент сучасної біофізики, молекулярної біології, біотехнології та медичної діагностики, що імітує природну реплікацію ДНК і дозволяє виявити єдину специфічну молекулу ДНК у зразку за присутності мільйонів інших молекул.

Відкриття методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стало однією з найвидатніших подій у галузі молекулярної біології за минулого століття, дозволило підняти медичну діагностику на якісно новий рівень.

Основні принципи використання праймерів і склад інгредієнтів, що входять до реакційної суміші для отримання копій ДНК, вперше було описано 1971 року [1]. Однак тоді ще не була продемонстрована основна риса ПЛР - експоненційне збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК як результат реакції. 1983 року був запропонований метод, що став надалі відомим як полімеразна ланцюгова реакція [2]. Суть методу полягає в багаторазовому копіюванні (ампліфікації) у пробірці певних ділянок ДНК у послідовно повторюваних температурних циклах. На кожному циклі ампліфікації синтезовані раніше фрагменти знову копіюються ДНК-полімеразою. Завдяки цьому відбувається багаторазове збільшення кількості специфічних фрагментів ДНК.

Результатом відкриття ПЛР стало майже негайне практичне застосування методу. Метод полімеразної ланцюгової реакції набув особливого поширення в галузі молекулярної біології, а надто при виконанні міжнародної програми «Геном людини»: створені сучасні лазерні технології сіквенування дозволяли для розшифрування послідовності ДНК визначати до 5000 пар нуклеотидів (п.н.) в день, що у 20 разів перевершувало попередні потужності та призвело до значного зростання інформаційних баз даних, що містять послідовність ДНК різних біологічних об'єктів та зародженню геноміки, згодом протеоміки та інших -омік нинішнього тисячоліття [3]. Зараз на ринку наявні різні

модифікації ПЛР, створено тест-системи для виявлення мікроорганізмів, виявлення точкових мутацій, описано десятки різних застосувань методу [4].

Метою дипломної роботи було порівняння різних методик ПЛР-ампліфікації ДНК та вибір оптимального поєднання методів виявлення збудників патологічних процесів.

РОЗДІЛ 1. КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

1.1. Перспективи практичного використання ПЛР-діагностики

Полімеразна ланцюгова реакція є важливим методом у молекулярній діагностиці та науках про життя. ПЛР вимагає термічного циклу для нагрівання ДНК для відокремлення ланцюга та охолодження для реплікації. Процес використовує спеціалізоване обладнання та піддає біомолекули впливу температур вище 95 °С. Наразі найстрімкіше розвиваються п'ять основних напрямів медичної ПЛР-діагностики: діагностування інфекційних захворювань; діагностика онкологічних захворювань; діагностика генетичних захворювань; ідентифікація особи; діагностика патогенів у їжі [5]. ПЛР є також одним із найцінніших методів, які зараз використовуються не лише в діагностиці, а й в біонауках та криміналістиці. На даний момент існує два основних напрямки використання ПЛР у інноваційних сферах біомедицини: високопродуктивні ПЛР-системи та мікрофлюїдичні ПЛР-пристрої для застосування в точках догляду (point of care POC). Крім того, ПЛР зі зворотною транскрипцією в реальному часі є золотим стандартом для діагностики SARS-CoV-2. Його також можна використовувати для різних модифікацій додатків POC, які є ключовим компонентом системи від-зразка-до-діагноза [6].

Головним напрямком розвитку ринку ДНК-діагностики є діагностика інфекційних захворювань. На відміну від імуноферментного аналізу (ІФА), який широко використовується у цій галузі, ДНК-діагностика дозволяє визначати безпосередньо збудника захворювання. За допомогою вдосконалених схем постановки ПЛР можна виявляти патогенні мікроорганізми у дуже низькій концентрації.

ДНК-діагностика онкологічних захворювань обмежується невеликою, але активно зростаючою кількістю відомостей про гени, асоційовані з

пухлинними захворюваннями. У рамках проекту «Геном людини» вчені продовжують пошуки мутацій, асоційованих із певною патологією. Діагностика генетичних захворювань, як і онкологічних, може розвиватися лише за проведенням широких наукових досліджень геному людини. Медична спільнота вже усвідомила важливість вивчення генетичної основи захворювань, а також можливість діагностики та початку лікування хвороби до появи її симптомів [7].

За оцінками експертів, ідентифікація особистості, що включає судову медицину, криміналістику, трансплантацію органів і тканин, є однією з найбільших та швидкозростаючих напрямків на ринку ДНК-діагностики.

Ринок ДНК-діагностики патогенів та їжі є найскромнішим. В даний час на ДНК-діагностику мікробного забруднення вироблених продуктів харчування припадає менше 5% від загальної кількості методів, які застосовуються для тестування забрудненості продуктів (усе ще переважають переважають культуральні методи та методи з використанням моноклональних антитіл). Однак методи ДНК-діагностики є більш швидкими, точними та інформативними, що найближчим часом має привести до різкого зростання їх частки на ринку ДНК-діагностики в цій галузі.

1. 2. Механізм полімеразної ланцюгової реакції

1.2. 1. Компоненти реакційної суміші

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції необхідна наявність у реакційній суміші ряду компонентів: праймерів - штучно синтезованих олігонуклеотидів, що мають, як правило, розмір від 15 до 30 п.н., та є ідентичними відповідним ділянкам ДНК-мішені. Вони відіграють ключову роль утворення продуктів реакції ампліфікації. Правильно підібрані праймери забезпечують специфічність та чутливість тест-системи.

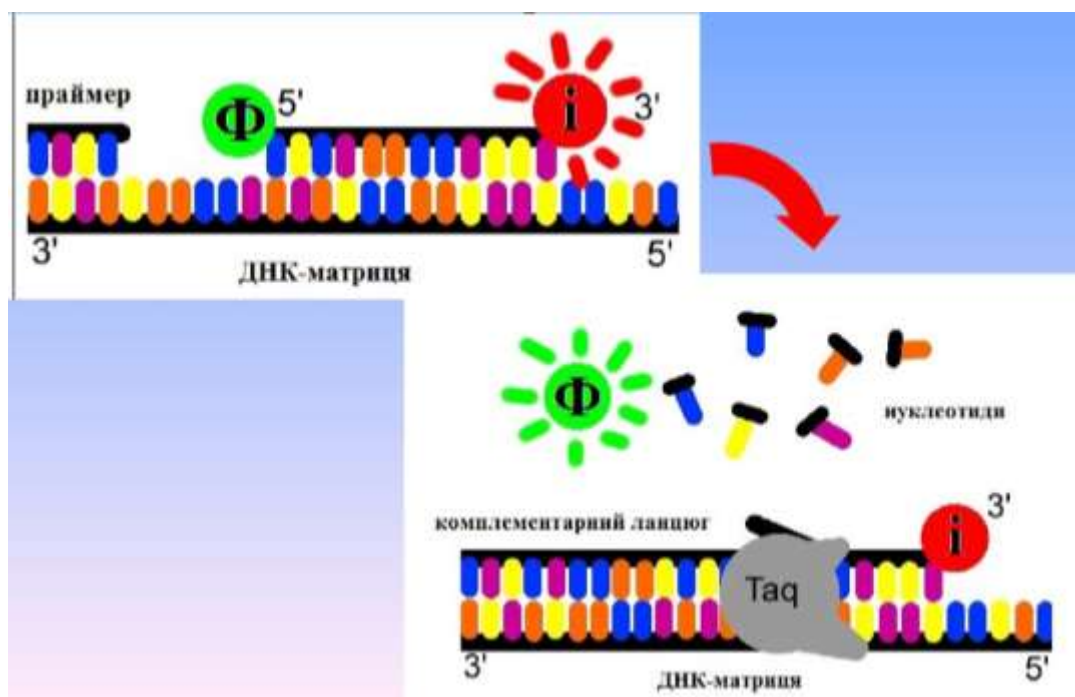


Рисунок 1.1. Компоненти полімеразної ланцюгової реакції

Тaq-полімераза (термостабільна ДНК-полімераза виділена із *Thermus aquaticus*) - фермент, що забезпечує добудовування 3-кінця другого ланцюга ДНК згідно з принципом комплементарності (рис. 1.1). Суміш дезоксинуклеотидотрифосфатів (дНТФ) – дезоксіденозинтрифосфату (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфату (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфату (дЦТФ), та дезокситимідинтрифосфату (дТТФ) - «будівельний матеріал», використовуваний Таq-полімеразою для синтезу другого ланцюга ДНК [11]. Буфер - суміш катіонів і аніонів у певній концентрації, що забезпечують оптимальні умови реакції, а також стабільне значення рН. Аналізований зразок - підготовлений до внесення до реакційної суміші препарат, який може містити потрібну ДНК, наприклад, ДНК мікроорганізмів, що служить мішенню для подальшого багаторазового копіювання. За відсутності ДНК-мішені специфічний продукт ампліфікації не утворюється.

1.2.2. Циклічний температурний режим

Якщо в аналізованому зразку присутня необхідна ДНК, то у процесі реакції ампліфікації з нею відбувається ряд подій, що забезпечуються

відповідними температурними циклами. Кожен цикл ампліфікації складається з трьох етапів (рис. 1.2).

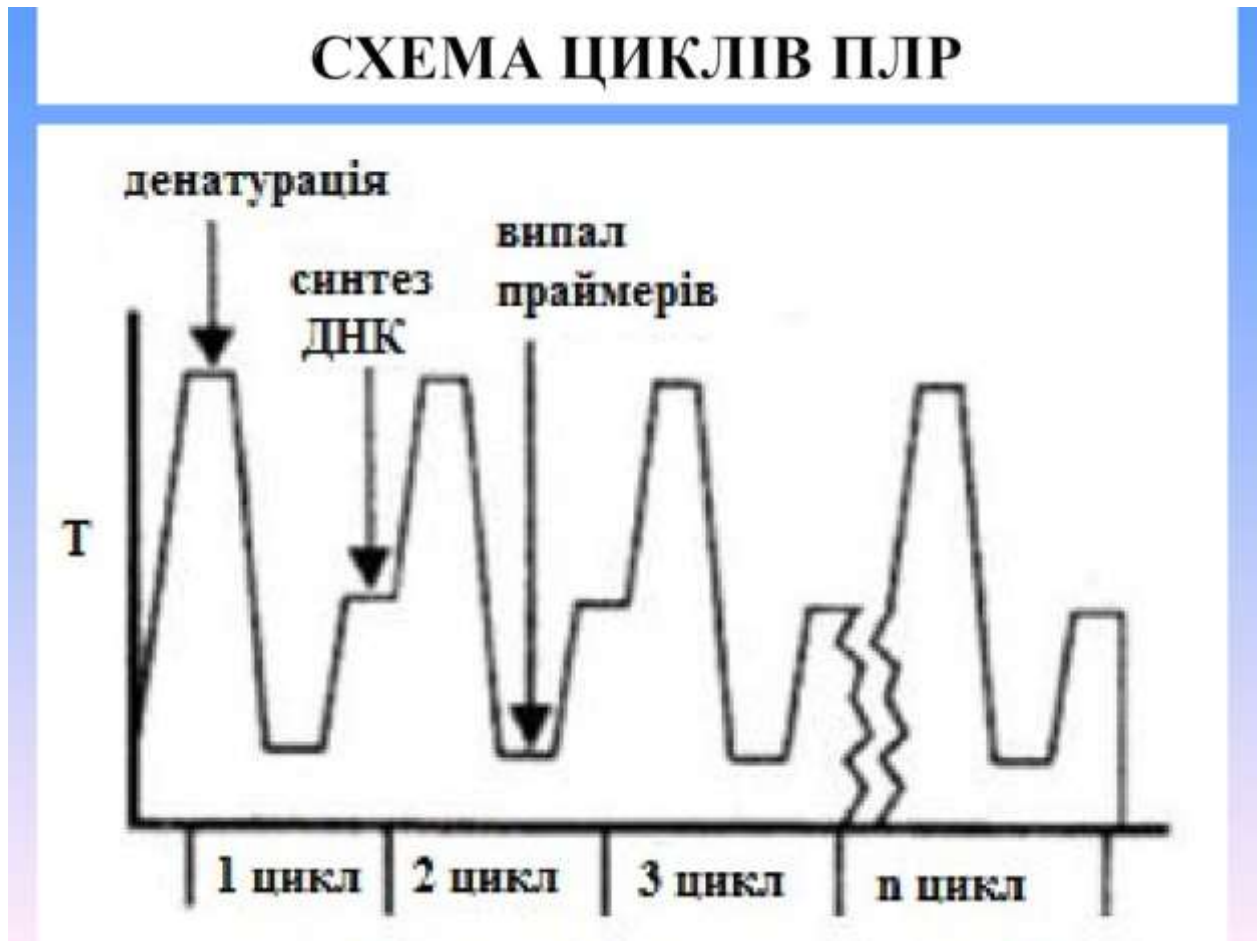


Рисунок 1.2. Послідовність циклів реакції ПЛР

1. Денатурація. На першому етапі необхідно розплести подвійний ланцюг ДНК, що знаходиться в зразку. Для цього реакційну суміш нагрівають до 92-95°C, в результаті чого дволанцюжкові молекули ДНК розплітаються з утворенням двох одноланцюгових молекул.

2. Отжиг/відпал. На цьому етапі праймери приєднуються до одноланцюгової ДНК-мішені. Цей процес називається «відпал» (від англ. «annealing»). Праймери підбирають таким чином, щоб вони обмежували (фланкували) фрагменти комплементарні протилежним ланцюгам ДНК. Відпал відбувається відповідно до правила Чаргафа (рис. 1.5), якщо цієї умови не дотримано, то відпал праймерів не відбувається. Після відпалу праймерів

Тaq-полімераза починає добудовування другого ланцюга ДНК із 3'-кінця праймера.

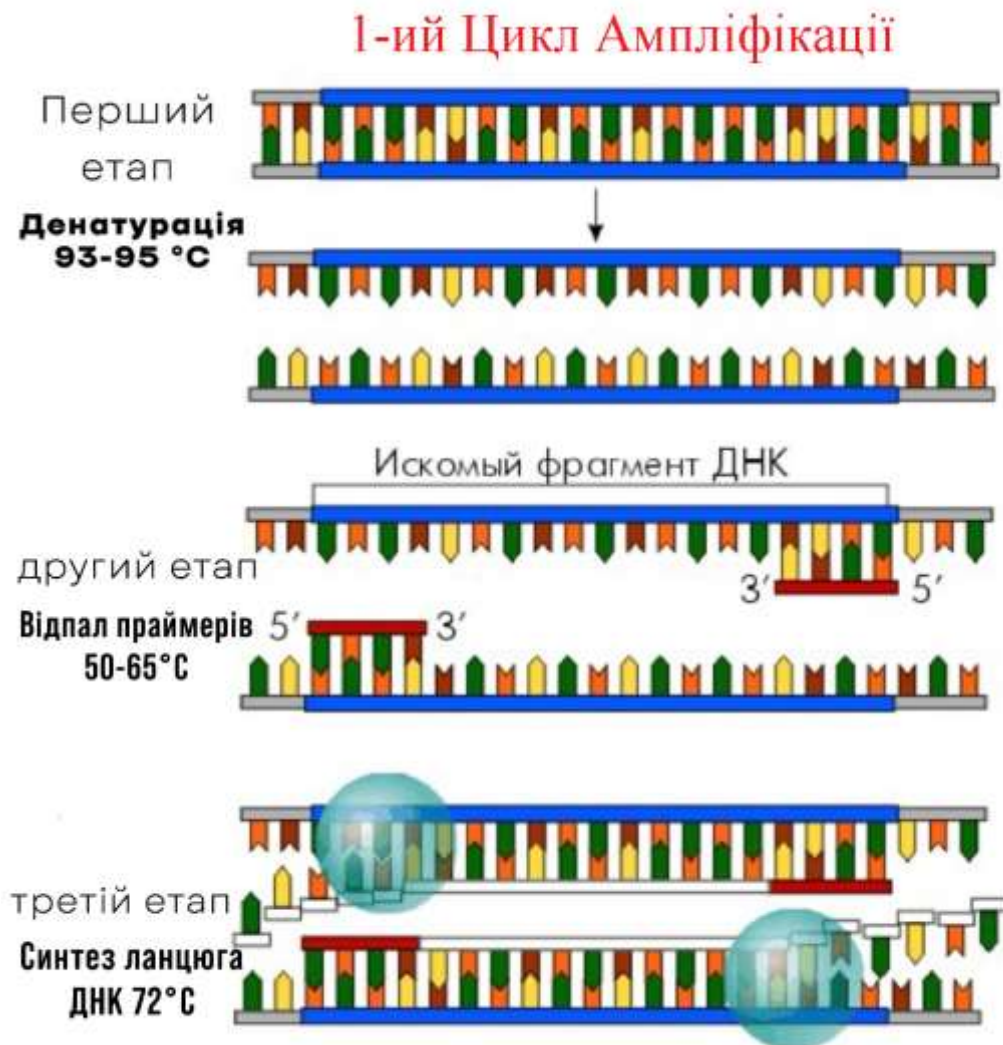


Рисунок 1.3. Початковий цикл ампліфікації

3. Елонгація (синтез). На третьому етапі температуру в реакційній суміші доводять до оптимуму роботи Таq-полімерази й синтез другого ланцюга триває з максимальною швидкістю. Іноді, у разі близького значення температури відпалу праймерів та температури оптимуму роботи ферменту, стає можливим використовувати двоетапний ПЛР, поєднавши відпал та елонгацію.

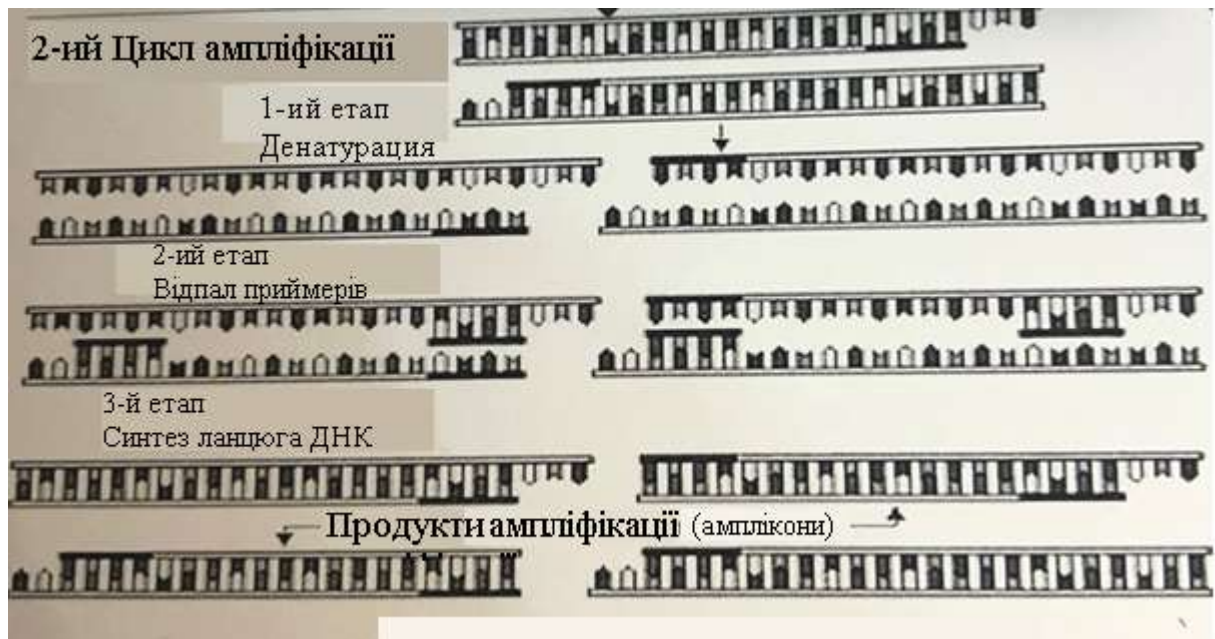


Рисунок 1.4. Приклад етапу формування ампліконів

Нові ланцюги ДНК, що утворилися в першому циклі ампліфікації, служать матрицями другого циклу ампліфікації, в якому відбувається утворення шуканого специфічного фрагмента ДНК (амплікону). (Рис. 1.4). У наступних циклах ампліфікації амплікони є матрицею для синтезу нових ланцюгів.

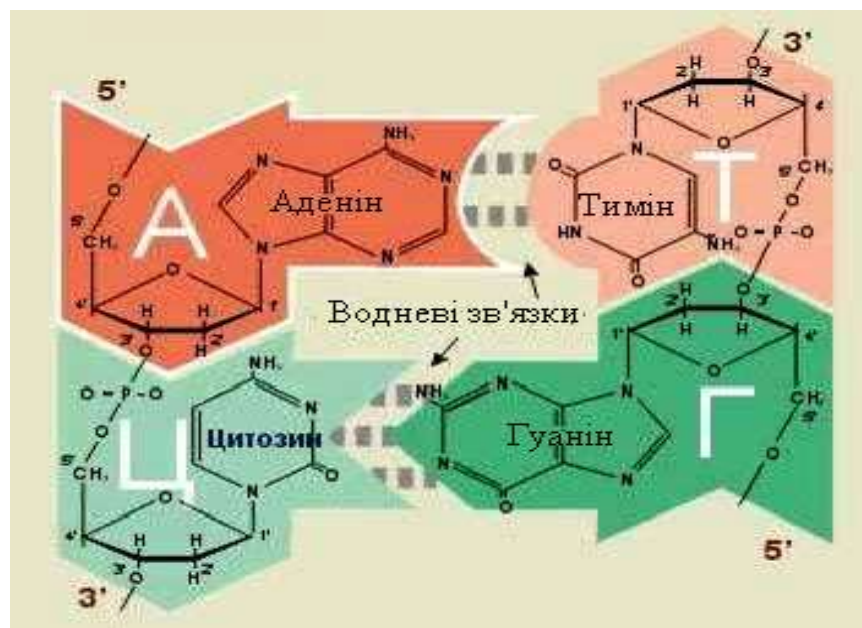


Рисунок 1.5 Дуплекс нуклеїнової кислоти: принцип комплементарності та антипаралельності ланцюгів ДНК

Відбувається подвоєння кількості ампліконів у суміші за кожний цикл ампліфікації [7]. Навіть якщо у вихідному розчині спочатку знаходилася тільки одна дволанцюжкова молекула ДНК, то за 30-40 циклів у розчині накопичується близько 10^8 молекул амплікону для достовірної візуалізації цього фрагмента методом електрофорезу в агарозному гелі [8].

Процес ампліфікації проводиться в спеціальному програмованому термостаті ампліфікаторі, який за заданою програмою автоматично здійснює зміну температур відповідно до числа циклів ампліфікації [8].

1.2.3. «Ефект плато»

Варто враховувати, що накопичення специфічних продуктів ампліфікації у геометричній прогресії відбувається лише протягом обмеженого часу, а потім його ефективність критично падає. Це є так званим «ефектом плато» [3].

Термін «ефект плато» використовують для опису процесу накопичення продуктів ПЛР на останніх циклах ампліфікації, коли кількість ампліконів досягає 0.3-1 молів.

Залежно від умов та кількості циклів ПЛР кілька факторів визначають час досягнення «ефекту плато», як от: виснаження пулу субстратів (дНТФ та праймерів); стабільність реагентів (три фосфо нуклеотидів та полімерази); кількість інгібіторів, наприклад, пірофосфатів та дуплексів ДНК; неспецифічні продукти чи праймер-димери, які конкурують за праймери. дНТФ та полімеразу; концентрація специфічного продукту та неповна денатурація за високої концентрації продуктів ампліфікації [9]. Чим менша початкова концентрація ДНК-мішені, тим вищий ризик виходу реакції на плато. Цей момент може настати до того, як кількість специфічних продуктів ампліфікації буде достатньою, щоб їх можна було проаналізувати. Уникнути цього дозволяють лише добре оптимізовані тест-системи [10].

1.3. Стадії постановки ПЛР

ПЛР-аналіз складається із трьох стадій ампліфікації коротких сегментів довшої молекули ДНК. Типова реакція ампліфікації включає цільову ДНК, термостабільну ДНК-полімеразу, два олігонуклеотидні праймери, дезоксинуклеотидтрифосфати (dNTP), реакційний буфер і магній. Після збирання реакцію поміщають у термоциклер, прилад, який піддає реакцію серії різних температур протягом встановленого періоду часу. Цю серію коригувань температури та часу називають одним циклом посилення. Кожен цикл ПЛР теоретично подвоює кількість цільової послідовності (амплікону) в реакції. Десять циклів теоретично помножують амплікон приблизно на тисячу; 20 циклів, більше ніж у мільйон за лічені години.

Кожен цикл ПЛР включає етапи денатурації матриці, відпалу праймера та розширення праймера. На початковому етапі відбувається денатурація цільової ДНК шляхом нагрівання її до 94°C або вище протягом 15 секунд-2 хвилин. У процесі денатурації дві переплетені нитки ДНК відокремлюються одна від одної, утворюючи необхідну одноланцюгову матрицю ДНК для реплікації термостабільною ДНК-полімеразою. На наступному етапі циклу температуру знижують приблизно до 40–60°C. При цій температурі олігонуклеотидні праймери можуть утворювати стійкі асоціації (відпалювати) з денатурованою цільовою ДНК і служити праймерами для ДНК-полімерази. Цей крок триває приблизно 15–60 секунд. Нарешті, коли температура реакції підвищується до оптимальної для ДНК-полімерази, починається синтез нової ДНК. Для більшості термостабільних ДНК-полімераз ця температура знаходиться в діапазоні 70–74°C. Етап подовження триває приблизно 1–2 хвилини. Наступний цикл починається з повернення до 94°C для денатурації.

Кожен крок циклу має бути оптимізовано для кожної комбінації шаблону та пари праймерів. Якщо температура під час етапів відпалу та подовження однакова, ці два етапи можна об'єднати в один етап, на якому відбуваються як відпал ґрунтовки, так і подовження. Після 20–40 циклів ампліфікований продукт може бути проаналізований на розмір, кількість, послідовність тощо або використаний у подальших експериментальних процедурах.

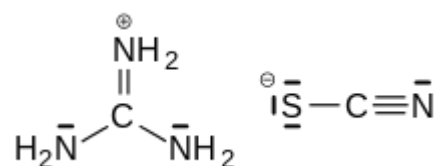
1.3.1. Підготовка проби біологічного матеріалу

Для підготовки проби до постановки ПЛР використовують різні методики, залежно від поставлених завдань. Їх суть полягає в екстракції ДНК з біопрепарату та видаленні або нейтралізації сторонніх домішок для отримання препарату ДНК з чистотою, придатною для постановки реакції ампліфікації. Типова методика отримання чистого препарату ДНК включає кип'ятіння або радше ферментативний протеоліз клітин з подальшим звільненням від білків і переосадженням ДНК спиртом [12]. Однак це метод досить трудомісткий і передбачає роботу з такими агресивними речовинами як фенол і хлороформ.

Використовують метод виділення ДНК, заснований на вжитку для лізису клітин сильного хаотропного агента - гуанідину тіоціанату (GTC) та подальшої сорбції ДНК на носії типу скляні намистини [13].

Тіоціанат гуанідинію (GTC) або ізотіоціанат гуанідинію (GITC) є хімічною сполукою, яка використовується як загальний денатурант білка, будучи хаотропним агентом, хоча найчастіше використовується як протектор нуклеїнової кислоти при екстракції ДНК і РНК з клітин.

GITC також можна розпізнати як тіоціанат гуанідину. Це пояснюється тим, що гуанідиній є сполученою кислотою гуанідину і називається катіоном гуанідинію $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$.



Тіоціанат гуанідинію можна використовувати для дезактивації вірусу, наприклад вірусу грипу, який спричинив «іспанку» 1918 року, щоб його можна було безпечно вивчати. Гуанідиній тіоціанат також використовується для лізису клітин і вірусних частинок при екстракціях РНК і ДНК, де його функція, окрім лізуючої дії, полягає в запобіганні активності ферментів РНКаз та ферментів ДНКаз шляхом їх денатурації. Інакше ці ферменти пошкодили б екстракт.

Зазвичай використовуваним методом є екстракція гуанідинію тіоціанатом, фенолом і хлороформом. Не обов'язково використовувати фенол або хлороформ, якщо екстрагують РНК для Нозерн-блоттингу або ДНК для Саузерн-блот-аналізу, оскільки електрофорез у гелі з подальшим перенесенням на мембрану відокремить РНК/ДНК від білків. Крім того, оскільки ці методи використовують зонди для зв'язування з їхніми кон'югатами, пептиди, які проходять через процес, як правило, не мають значення, якщо пептид не є РНКазою або ДНКазою, і тільки якщо ферменту вдається ренатуруватись, чого не повинно відбуватися за належних протоколів сліdkують. Можливим винятком може бути робота з температурними екстремофілами, оскільки деякі ферменти цих організмів можуть залишатися стабільними за надзвичайних обставин.

Після відмивання в пробі залишається ДНК, сорбована на носії, з якого вона легко «відмивається» за допомогою елюції. Метод зручний, технологічний та придатний для підготовки зразка до ампліфікації. Втрати частини ДНК відбуваються внаслідок незворотної сорбції на носії, та під час повторюваних відмивок, що є критичним при роботі з невеликими кількостями ДНК у зразку, а навіть слідові кількості GuSCN можуть інгібувати ПЛР. Тому при використанні цього методу дуже важливий правильний вибір сорбенту та ретельне дотримання технології. Слід зазначити, що через велику кількість стадій додавання та видалення розчинів під час роботи зі зразком можлива перехресна контамінація між пробами аерозоллю ДНК, що утворюється [15].

Можлива підготовка зразків, так звана Chelex-based technique з використанням іонообмінників, які сорбують з розчину не ДНК, а низькомолекулярні речовини та домішки. Клітинні мембрани руйнують кип'ятінням, нуклеїнові кислоти виділяють з розчину сорбуючи домішки на іонообміннику. Метод використовують в клінічній діагностиці через його методичну протокольну простоту [14].

При масовому скринінгу, коли важливо отримати статистичні дані, допускається використання простих методів із застосуванням детергентів або обробки біологічного матеріалу лугами з подальшою їх нейтралізацією. У той же час, використання подібних методів пробопідготовки для клінічної діагностики може призводити до хибнонегативних результатів, внаслідок використання в реакційній суміші неякісного препарату ДНК. Отже, вибір методу підготовки зразка має визначатися цілями клінічного аналізу.

1.3.2.1. Проведення ПЛР у режимі «гарячого старту»

Щоб зменшити ризик утворення неспецифічних продуктів реакції ампліфікації, використовують підхід, який отримав назву гарячий старт. Суть його полягає у запобіганні можливості початку реакції до моменту досягнення у пробірці умов, що забезпечують специфічний відпал праймерів. У залежності від ГЦ-складу та розміру праймери мають певну температуру плавлення ($T_{пл}$), коли він утворення водневих зв'язків нестабільно. Якщо температура системи перевищує $T_{пл}$ праймер не в змозі утримуватися на ланцюзі ДНК та денатурує. За дотримання оптимальних умов, тобто. температури відпалу, близької до температури плавлення, праймер утворює дволанцюжкову молекулу тільки за умови його повної комплементарності і, таким чином, забезпечує специфічність реакції.

Термостабільна ДНК-полімераза Таq зазвичай використовується в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) для виявлення інфекційних агентів у зразках пацієнтів, генетичного аналізу, діагностики пухлин, дослідження та криміналістики. Однак Таq ДНК-полімераза є дорогою, і, отже, необхідно розробити простий метод, за допомогою якого окрема лабораторія може легко та регулярно отримувати великі кількості Таq ДНК-полімерази.

Більшість термостабільних ДНК-полімераз, включаючи ДНК-полімеразу Таq, експресуються як рекомбінантні білки в *Escherichia coli* (E. coli), що містять вектори експресії. Очищення полімерази зазвичай необхідне під час

ПЛР. Однак ПЛР без очищення полімеразою є швидким і простим підходом, що передбачає пряме використання *E. coli*, що містить термостабільну ДНК-полімеразу як ПЛР-фермент, що усуває стомлюючі етапи очищення білка. Таким чином, розробка простого та економічно ефективного протоколу ПЛР з використанням живої кишкової палички, що експресує ДНК-полімеразу Taq (*EcoliTaq*) без очищення полімеразою, має практичне значення та комерційний інтерес.

ПЛР-аналіз клінічних зразків, таких як цільна кров, для ідентифікації мікробних інфекцій або іншої генетичної інформації зазвичай передбачає очищення зразків і процеси екстракції ДНК. Це тому, що неочищена цільна кров містить інгібітори, такі як антикоагулянти або гемоглобін, які можуть знизити ефективність ПЛР [16]. Крім того, виділення ДНК є трудомістким і тривалим процесом, що є суттєвим недоліком. Тому існує потреба в методі прямої ПЛР, який передбачає ефективне придушення інгібіторів і пряме використання зразків.

Були докладені різні зусилля для вдосконалення технології ПЛР з точки зору виходу, специфічності та довжини ампліфікованої ДНК. Основна проблема ПЛР полягає в тому, що іноді під час налаштування ПЛР може відбуватися небажаний синтез ДНК через неправильне праймування та утворення димеру праймера. ПЛР з гарячим стартом була розроблена для запобігання небажаному синтезу ДНК під час ПЛР [17, 30]. ПЛР з гарячим стартом заснована на блокуванні синтезу ДНК за температури навколишнього середовища, що досягнуто за допомогою хімічної модифікації полімерази, антитіл, аптамерів, воску, реакційних буферів, спеціальних праймерів і чутливих до холоду мутантів полімерази [18-29].

1.3.3. Детекція

Для коректної оцінки результатів ПЛР важливо зрозуміти, що цей метод не можна вважати абсолютно кількісним. Теоретично можливо виявлення продуктів ампліфікації окремих молекул ДНК-мішені після 30-35 циклів за

допомогою електрофорезу. Однак на практиці це досягається нечасто через те, що для успішної ампліфікації потрібні майже ідеальні умови реакції, які рідко зустрічаються в реальному житті. Особливо важливим є ступінь чистоти ДНК-препарату, оскільки наявність різних інгібіторів у реакційній суміші може значно ускладнити процес. Іноді через їхню присутність не вдається успішно ампліфікувати навіть десятки тисяч молекул ДНК-мішені. Отже, прямого зв'язку між початковою кількістю ДНК-мішені та кінцевою кількістю продуктів ампліфікації часто не існує.

1.3.3.3. ПЛР у режимі реального часу

Спочатку технологія ПЛР була обмежена якісним і напівкількісним аналізом через обмеження кількісного визначення нуклеїнових кислот. У той час продукт ДНК розділяли за розміром за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, щоб перевірити, чи успішно ампліфікували цільовий ген. Бромід етидію, молекула, яка флуоресціює при зв'язуванні з ДНК, використовувалася для оцінки кількості ДНК шляхом порівняння інтенсивності розділених смуг, але була недостатньо чутливою для ретельного кількісного аналізу.

Удосконалення у розробці флуорофорів та інструментарії призвели до створення термоциклерів, які більше не вимагали вимірювання лише ДНК кінцевого продукту. Цей процес, відомий як ПЛР у реальному часі або кількісна ПЛР (кПЛР), дозволив виявити двониткову ДНК під час ампліфікації. Термоциклери кПЛР можуть збуджувати флуорофори на певних довжинах хвиль, виявляти їх випромінювання за допомогою фотодетектора та записувати значення. Чутливий збір числових значень під час ампліфікації має значно підвищену кількісну аналітичну потужність.

Чутливість флуорофорів була важливим аспектом розробки кПЛР. У кПЛР використовуються два основних типи флуорофорів: ті, які специфічно зв'язуються з заданою цільовою послідовністю, і ті, які зв'язуються

неспецифічно. Один із найефективніших і широко використовуваних неспецифічних маркерів, SYBR Green, після зв'язування з малою борозенкою двониткової ДНК демонструє 1000-кратне збільшення флуоресценції порівняно з вільним вмістом у розчині. Однак, якщо потрібна ще більша специфічність, можна додати специфічний для послідовності олігонуклеотид або зонд гібридизації, який зв'язується з геном-мішенню в певний момент після праймера (після 3'-кінця). Ці гібридизаційні зонди містять репортерну молекулу на 5'-кінці та молекулу-гасник на 3'-кінці. Молекула-гасник ефективно перешкоджає флуоресценції репортера, поки зонд неушкоджений. Однак при контакті з ДНК-полімеразою І гібридизаційний зонд розщеплюється, уможливлуючи флуоресценцію барвника.

ПЛР у реальному часі дозволяє точно визначити кількість цих нуклеїнових кислот ДНК і РНК із більшою відтворюваністю. Ця методика забезпечує чутливий метод точної кількісної оцінки окремих видів, що може бути дуже актуальним для діагностики патогенів і генетичних захворювань. Переваги ПЛР у реальному часі включають легкість кількісного визначення, більшу чутливість, відтворюваність і точність, швидкий аналіз, кращий контроль якості в процесі та менший ризик контамінації [31].

Для ПЛР у реальному часі потрібен термоциклер з оптичною системою для фіксації флуоресценції та комп'ютер із програмним забезпеченням, здатним фіксувати дані та виконувати остаточний аналіз реакції. Програми, доступні від різних виробників, демонструють відмінності щодо ємності зразка, методу збудження та загальної чутливості. Існують також відмінності щодо обробки даних. Випромінювання флуоресценції генерує сигнал, який зростає прямо пропорційно кількості продуктів ПЛР. Значення флуоресценції реєструються під час кожного циклу і представляють кількість ампліфікованого продукту. Використані флуоресцентні композити SYBR® Green і TaqMan® [32].

Форми детектування в технологіях ПЛР у реальному часі: сигнали флуоресценції пропорційні кількості продукту ПЛР, утвореного

флуоресцентними барвниками, які є специфічними для дволанцюгової ДНК (dsDNA), або олігонуклеотидними зондами, специфічними для послідовності.

SYBR Green I є найбільш використовуваним барвником, специфічним для зв'язування дцДНК, у ПЛР у реальному часі. Його флуоресценцію неможливо виявити, якщо він не зв'язаний з дцДНК. Його спорідненість зв'язування з ДНК у 100 разів більша, ніж у броміду етидію, який є найбільш часто використовуваним сполучником дцДНК у звичайній ПЛР. Недоліком SYBR Green I є те, що він зв'язується з будь-якою дцДНК, наприклад з продуктами неспецифічної ампліфікації та димерами праймерів. Ампліфіковані неспецифічні продукти впливають на ефективність ампліфікації специфічних продуктів. Таким чином, аналіз повинен бути оптимізований таким чином, щоб не відбувалося неспецифічної ампліфікації. Аналіз кривої плавлення після реакції ПЛР є хорошою практикою для контролю утворення димерних праймерів. Флуоресценцію вимірюють як функцію температури, яка поступово зменшується зі збільшенням температури посиленого продукту. Однак після досягнення температури, при якій дволанцюгова ДНК відокремлюється, пляма відривається і флуоресценція різко спадає [33]. Після оптимізації виявлення за допомогою SYBR Green I є дуже чутливим до ідентифікації однієї молекулярної мішені в реакційній суміші. Найбільшою перевагою є те, що його можна використовувати з різними парами різних праймерів, що робить його дешевшим, ніж зонд.

Зонди для зв'язування ДНК з малою борозенкою (MGB) складаються з олігонуклеотидів довжиною від 14 до 15 pb, які містять флуоресцентний барвник на терміналі 5', а також нефлуоресцентний гасник і MBG на терміналі 3', який спеціально гібридується з цільовою послідовністю. MGB вивільняється із зонда, який зв'язується з малою борозенкою dsDNA (що складається з частини зонда MGB і комплементарної цільової послідовності, за допомогою якої він гібридується), пов'язаної з нуклеотидною послідовністю. MGB підвищує стабільність зв'язування із зондом ампліфікації [34].

Гібридизаційні зонди - олігонуклеотидні зонди, позначені флуорофорами, використовуються для виявлення специфічних послідовностей. Рівень флуоресценції може бути пов'язаний з кількістю продукту ПЛР через залежне від продукту зменшення флуорофора-гасника та репортера або через збільшення передачі енергії флуоресцентного резонансу (FRET) від донорного флуорофора до рецептора. Донорні зонди помічені на 3'-термінальній частині репортерним флуорофором (часто 6-карбоксифлуоресцеїн, FAM), а акцепторні зонди позначені на 5'-кінцевій частині акцепторним флуорофором (блакитні барвники Cy3, Cy5; 6-карбокси- 4,7,2',7'-тетрахлорфлуоресцеїн, TET; 6-карбокси-N, N, N', N''-тетраметилродамін, TAMRA; 6-карбоксиродамін X, ROX). Тільки донорний флуорофор збуджується таким чином, що у вільно плаваючих зондах не виявляється флуоресцентний акцептор. Під час фази відпалу праймера зонди гібридизуються поруч з одноланцюговою ДНК (ssDNA), і енергія збудження передається від донора до акцептора. У цьому форматі використовуються чотири олігонуклеотиди: два праймери та два зонди. Рівень флуоресценції пропорційний кількості цільової ДНК, що утворюється під час процесу ПЛР [35].

Першим флуоресцентним зондом, розробленим для ПЛР у реальному часі, була 5'нуклеаза, яку зазвичай називають TaqMan. Зонд TaqMan — це короткий олігонуклеотид (ДНК), який містить 5'-кінцевий репортерний флуорофор, схожий на флуоресцеїн, і 3'-кінцевий гасник. Інтактні зонди не випромінюють флуоресценцію, оскільки вони зв'язані (погашені). Для генерації флуоресцентного сигналу повинні відбутися дві події. По-перше, зонд повинен зв'язатися з комплементарним ланцюгом ДНК при 60°C. По-друге, при цій температурі полімераза Taq, той самий фермент, що використовується для ПЛР, має розщепити 5'-кінцевий зонд TaqMan (активність 5'нуклеази), відокремлюючи флуоресцентний барвник від барвника, що гасить. Гасник вивільняється з флуорофора, який тепер флуоресцує після збудження [36].

Молекулярні маяки поєднують олігонуклеотид, здатний утворювати структуру стебла-петлі, з парою гасник-репортер. Зокрема, олігонуклеотидний зонд із доменом зв'язування з антисмисловою мішенню, оточений двома короткими плечима комплементарних послідовностей, позначений на одному терміналі репортерним барвником, а на протилежному терміналі – барвником-гасником. За відсутності мішені короткі плечі відпалюються, утворюючи шпилькову структуру (петлю стебла), примушуючи флуорофор до гасника. У цій конформації молекулярний маяк є «темним». Через гібридизацію з цільовою послідовністю відкривається шпилькова структура, розділяючи флуорофор і гасник, що призводить до відновлення флуоресценції («сяючий» стан). Перехід між темним і сяючим станом молекулярного маяка дозволяє розрізнити зв'язані та незв'язані зонди [37].

Зонди Sunrise™ (Oncor, Inc.) функціонують подібно до зондів TaqMan. Вони також подвійно позначені флуорохромом у 5' термінальній частині. Область 3' зонда є специфічною мішенню, а область 5' є додатковою мішенню, так що, коли вона не розширена (не включена в амплікон), вона утворює шпилькову структуру, яка утримує разом гасник і репортерний маркер. Коли зонд подовжується та інтегрується в молекулу дцДНК, гасник і репортер утримуються окремо завдяки нещодавно скопійованому комплементарному ланцюгу. Як і звичайний TaqMan, праймери Sunrsire вимагають нового зонда для кожної ампліфікації. На першому етапі праймер Sunrise доповнюється попереднім праймером. Цей розширений продукт служить шаблоном для зворотного праймера на другій фазі. Зрештою, полімераза розкриває структуру шпильки і утворюється дволанцюговий продукт ПЛР, у якому репортер і гаситель розділені.

Праймери Scorpion структурно і функціонально пов'язані з молекулярними маяками, але служать праймерами в ПЛР. Можливі два різні формати: «стеблова петля» та «дуплекс». В обох випадках механізм маркування є внутрішньомолекулярним. Основними елементами скорпіонів є: (i) праймер ПЛР; (ii) пробка для ПЛР для запобігання перехресній реакції

зонда; (iii) зонд, специфічний для послідовності; та (iv) система виявлення флуоресценції, що містить мінімум один флуорохром та один гасник. Після ПЛР-ампліфікації праймера скорпіона отриманий амплікон містить послідовність, яка є комплементарною зонду, який відновлюється одним ланцюгом під час стадії денатурації кожного циклу ПЛР. З охолодженням зонд може вільно зв'язуватися з цією комплементарною послідовністю, створюючи посилену флуоресценцію. Таким чином, гасник не концентрується поблизу флуорофора.

Метод ПЛР у реальному часі (a.k.a. real-time PCR) дозволяє проводити детекцію продуктів ампліфікації у процесі реакції та вести моніторинг кінетики накопичення ампліконів. Детекція продуктів ампліфікації проводиться в реакційному розчині за рахунок специфічної гібридизації продукту з олігонуклеотидним зондом, що несе флуоресцентну мітку. У процесі реакції відбувається вивільнення флуоресцентної мітки в розчин, що дозволяє її визначення на флуоресцентному детекторі. Цей спосіб детекції є альтернативою електрофоретичного методу і має ряд істотних переваг.

1.4. Спостереження за ходом реакції ампліфікації

1.4.1. Додатні контролю

Позитивний контроль служить для пересвідчення у тому, що всі складові реакційної суміші дозволяють реакції пройти нормально. Для цього використовують ДНК-препарат, який включає сайти для початку ампліфікації праймерами: наприклад, ДНК шуканого мікроорганізму або клоновані специфічні фрагменти його геному. Неспецифічні амплікони відрізняються за розміром від ампліконів, утворених за допомогою контрольного ДНК-препарату. Їх розміри можуть бути як більшими, так і меншими порівняно з позитивним контролем [12]. У найгіршому випадку їх розміри можуть збігатися, і вони відрізняються під час електрофорезу, аналогічно позитивним контрольним зразкам.

Для перевірки специфічності отриманого продукту ампліфікації можна використовувати гібридизаційні зони, які позначені флюоресцентними мітками або радіоактивними ізотопами та взаємодіють з ДНК так само, як і праймери, за тими ж принципами.

1.4.2. Внутрішній контроль

Підготовлений ДНК-препарат, отриманий з біологічного матеріалу для ПЛР, може включати домішки інгібіторів, які значно знижують ефективність реакції та, у деяких випадках, призводять до відсутності специфічних ампліконів, навіть якщо збудник, якого шукають, присутній. Це вимагає обов'язкового контролю ходу ампліфікації в кожній пробірці з реакційною сумішшю. Для цього до кожної пробірки додають додатковий, так званий внутрішній контроль.

Внутрішній контроль - це будь-який ДНК-препарат, який не співпадає з ДНК шуканого мікроорганізму. Для інфекційних тест-систем іноді використовують, наприклад, ген глобіну, до кінця якого за допомогою генної інженерії пришиті фрагменти ДНК, гомологічні праймерам, що використовуються в тесті.

Якщо внутрішній контроль відсутній, і також відсутня специфічна смуга ДНК, результат слід вважати недостовірним. У цьому випадку рекомендується повторно виділити ДНК з зразка. Якщо внутрішній контроль додати до реакційної суміші, він також стане мішенню для праймерів, як і ДНК шуканого мікроорганізму. Розмір амплікону внутрішнього контролю підбирають таким чином, щоб він відрізнявся від специфічних ампліконів у 2 або більше разів. Це означає, що навіть якщо ДНК внутрішнього контролю додають до реакційної суміші разом з випробуваним зразком, незалежно від наявності мікроорганізму в біологічному зразку, внутрішній контроль спричинить утворення ампліконів, розмір яких буде відрізнятися від специфічних ампліконів, що утворюються після проведення ПЛР з наявністю специфічної ДНК мікроорганізму. Наявність ампліконів внутрішнього контролю та

реакційної суміші свідчить про нормальний хід ампліфікації та відсутність інгібіторів.

Якщо амплікони потрібного розміру не утворюються, і також не утворюються амплікони внутрішнього контролю, це може свідчити про проблеми при ПЛР внаслідок наявності небажаних домішок у зразку, які потрібно видалити, або через технологічні порушення. У будь-якому випадку результат реакції слід вважати недостовірним [17].

Для забезпечення ефективності ампліфікації потрібно, щоб у реакційній суміші була потрібна ДНК. Проте ефективність може помітно знизитися через конкуренцію за праймери з ДНК внутрішнього контролю, особливо при низьких концентраціях ДНК у зразку, що досліджується. Це може призводити до помилково-негативних результатів. Тому концентрацію внутрішнього контролю слід встановлювати так, щоб вона не створювала конкуренцію для ампліфікації навіть окремих розшукуваних молекул ДНК [16].

1.5. Проблема контамінації зразків

Контамінація – це процес потрапляння специфічних та неспецифічних молекул ДНК з зовнішнього середовища до реакційної суміші, які можуть призводити до отримання хибнопозитивних або хибнонегативних результатів в ході ампліфікації.

Молекули, які можуть використовуватися як мішені для ампліфікації, можуть бути продуктами реакції, що потрапили у зовнішнє середовище на етапі детекції з пробірок, в яких відбулася успішна ампліфікація, або специфічна ДНК зразків на етапі підготовки проб.

Існують різні методи боротьби з такою контамінацією. Один із них – використання ферменту N-урацил-глікозилази (УГ), який розщеплює молекули ДНК з вбудованим урацилом. Ампліфікацію проводять з використанням суміші дНТФ, в якій дТТФ замінено на дУТФ (урацил). Після термоциклювання всі амплікони, що утворюються в пробірці, міститимуть

урачил. Додавши УГ до реакційної суміші, амплікони, які потрапили в неї, будуть руйнуватися, тоді як нативна ДНК залишиться цілою і служитиме мішенню для ампліфікації.

Іншим способом інактивації ампліконів є фотохімічний вплив на молекули ДНК. Для цього використовують псорален або ізопсорален, які активуються короткочасним опроміненням ультрафіолетовим світлом. Модифіковані цими сполуками молекули ДНК вже неспроможні брати участь у реакції ампліфікації.

Однак навіть після застосування таких методів залишається можливість, що певна кількість молекул ДНК залишиться непошкодженою, що суттєво знижує ефективність цих заходів. Також існує ризик крос-контамінації внаслідок зовнішніх впливів на пробопідготовку.

Тому для впевненості у відсутності контамінації рекомендується проводити кожну серію експериментів з негативними контролями. Рекомендовано використовувати воду з кімнати пробопідготовки як негативний контроль. Крім цього, реактиви слід зберігати роздільно.

У випадку виявлення слідів контамінації, рекомендується замінити всі використані реактиви на нові та обробити всі поверхні та обладнання хлоровмісними розчинами для мінімізації можливості крос-контамінації.

Таким чином, не дивлячись на користь застосування преампліфікаційних методів для інактивації молекул ДНК, які можуть викликати хибнопозитивні та хибнонегативні результати, ефективність цих методів є обмеженою. Найбільш радикальним заходом є ретельна організація лабораторії ПЛР.

1.6. Облаштування ПЛР-лабораторії та організація робочого процесу

Облаштування ПЛР-лабораторії і організація робочого процесу включає кілька ключових етапів, щоб забезпечити правильну і безпечну роботу з матеріалами та уникнути забруднення зразків.

1. Зони лабораторії:

- **Зона підготовки реакційної суміші ("чиста" зона):** це місце, де готується реакційна суміш для ПЛР.
- **Зона пробопідготовки:** тут обробляються клінічні матеріали.
- **Зона детекції:** це місце для визначення результатів ПЛР.

2. Ізоляція зон:

- Усі три зони мають бути відокремленими кімнатами з передбоксниками для запобігання забрудненню.
- Рекомендується мати систему фільтрації повітря.

3. Розміщення зон:

- Зона детекції повинна бути максимально віддаленою від інших зон, можливо, навіть на іншому поверсі або в іншій будівлі.
- Кожна зона має свою систему вентиляції.

4. Інші приміщення:

- Рекомендується виділити приміщення для зміни одягу та зберігання верхнього одягу, окремий приміщення для прийому їжі та для зберігання лабораторних матеріалів.
- Всі виробничі кімнати мають бути обладнані короткохвильовими ультрафіолетовими опромінювачами.

5. Правила переміщення матеріалів:

- Пробірки та штативи слід переміщувати тільки з "чистої" зони до зони пробопідготовки та детекції.
- Клінічний матеріал має бути оброблений якнайшвидше у кімнаті пробопідготовки.

6. Організація робочих процесів:

- Різні люди повинні виконувати різні операції (пробопідготовку, підготовку реакційної суміші, електрофорез).
- Важливо використовувати ламінарні шафи для обробки клінічних зразків.

7. Особливі вимоги:

- Для обробки біологічного матеріалу слід використовувати ламінарні шафи з вертикальним потоком повітря.
- Передбачено можливість роботи без ламінарного потоку та тривалу експозицію опромінення внутрішніх поверхонь ультрафіолетовим світлом.

8. Безпека та обмеження доступу:

- Важливо дотримуватися вимог заборони внесення позитивних контролів або клінічних зразків до "чистої" зони.

Організація ПЛР-лабораторії включає не лише розподіл зон та устаткування, але й строгі процедури, які забезпечують безпеку матеріалів та надійність результатів досліджень.

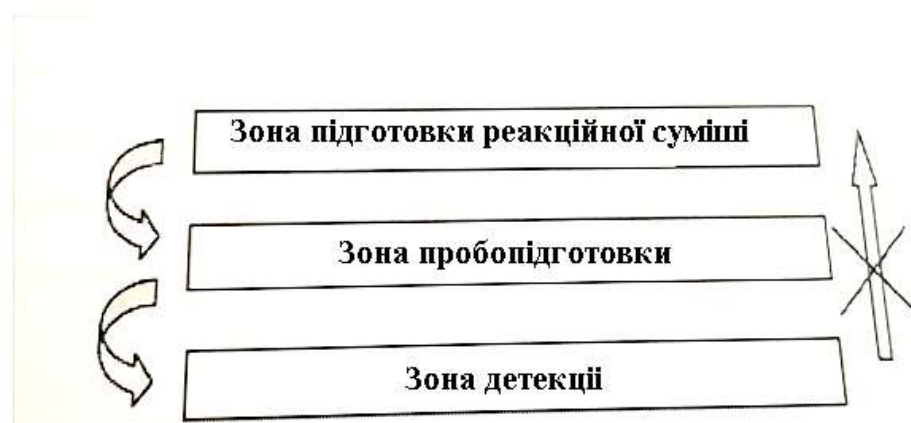


Рисунок 1.6. Схема переміщення зразків у ПЛР лабораторії

Розділ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Проведення ПЛР в режимі реального часу

Метод ПЛР у реальному часі є удосконаленою версією традиційної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), відомої за свою ефективність у визначенні ДНК/РНК в досліджуваному матеріалі. Основна перевага цього методу полягає у здатності проводити аналіз в реальному часі, без необхідності використання електрофорезу та зменшення ризику контамінації, що часто спричиняє хибнопозитивні результати. Тут наведено кілька ключових переваг методу ПЛР у реальному часі:

1. Кількісне визначення ДНК/РНК:
 - Метод дозволяє точно визначати кількість інфекційних агентів у досліджуваному матеріалі.
2. Відсутність електрофорезу та менш суворі вимоги до організації лабораторії:
 - Відсутність етапу електрофорезу дозволяє знизити ризик контамінації, а також зменшує вимоги до виробничих приміщень лабораторії.
3. Автоматична реєстрація та інтерпретація результатів:
 - Метод забезпечує автоматичний аналіз отриманих результатів, що усуває суб'єктивність оцінки та забезпечує надійність даних.
4. Детекція продуктів ампліфікації в реальному часі:
 - Використання спеціальних зондів з флуоресцентними мітками дозволяє проводити детекцію продуктів ампліфікації у реальному часі без потреби у електрофорезі.
5. Можливість кількісного оцінювання:
 - Метод дозволяє кількісно оцінити вихідну ДНК матрицю, а також аналізувати точкові мутації та проводити аналіз експресії генів.

6. Застосування для виявлення інфекційних агентів:

- Метод може бути використаний для кількісної оцінки агентів інфекційних захворювань у клінічних зразках.

Для кількісної оцінки збудників інфекційних захворювань, можна використовувати цей метод із клінічними зразками, які містять нормовані вміст збудника (наприклад, сироватку крові). Метод ПЛР у реальному часі надає зручний та ефективний спосіб виявлення та кількісної оцінки ДНК/РНК в досліджуваних матеріалах.

Описаний олігонуклеотидний зонд, який додається до реакційної суміші полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), є спеціально розробленим проблемно-орієнтованим інструментом для детекції конкретного фрагмента ДНК під час ампліфікації. Цей зонд є олігонуклеотидом, що має послідовність, яка відповідає специфічній частині ампліфікованої ДНК. Однак, відмінність полягає в його модифікації: на 5'-кінці (початковому кінці) використовується флуорофор FAM, а на 3'-кінці (закінченні) - флуорофор TAMRA.

Флуорофор FAM (6-карбоксифлуоресцеїн) є хімічним компонентом, який приєднується до 5'-кінця олігонуклеотиду. Він володіє властивістю емітувати світло під час підходящих умов, таких як присутність правильної послідовності ДНК під час ампліфікації.

Флуорофор TAMRA (6-карбокситетраметил-родамін) прикріплюється до 3'-кінця олігонуклеотиду і функціонує як квенчер. Квенчери використовуються для гасіння світла, яке емітує флуорофор FAM. Це стає можливим під час приєднання зонду до специфічної послідовності ДНК під час реакції ПЛР. Якщо зонд не приєднаний до ДНК, то TAMRA гасить світло від FAM, але якщо він приєднаний до ампліфікованої послідовності ДНК, це призводить до відсутності гасіння і виявлення світла від FAM.

Отже, у процесі ампліфікації, коли зонд приєднується до цільової послідовності ДНК, світло, що емітується флуорофором FAM, може бути спостереженим. А наявність квенчера TAMRA призводить до гасіння цього

світла у відсутності цільової послідовності, що є важливим для точного виявлення та кількісної оцінки ампліфікованої ДНК під час ПЛР (рис. 2.1).



Рисунок 2.1. Лінкування олігонуклеотиду флуоресцентними зондами

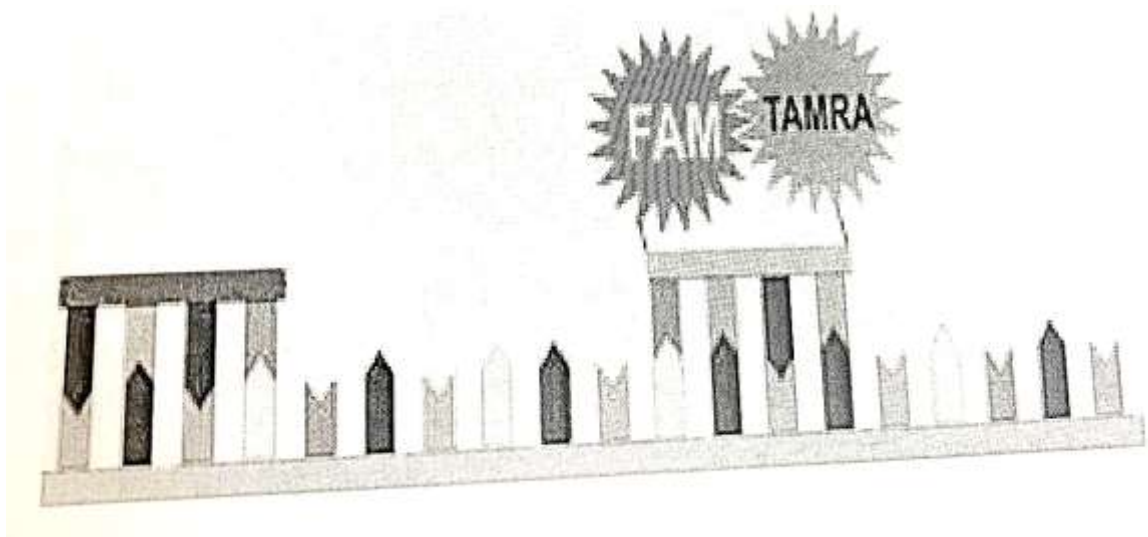


Рисунок 2.2 Гібридизація зонда на комплементарні ділянки амплікону, гібридизація праймера на межі обумовленого фрагмента ДНК.

Діапазон емісії FAM близький до діапазону поглинання TAMRA, що забезпечує повноцінне гасіння флуоресценції за рахунок флуоресцентно-резонансного перенесення енергії при стеричній близькості двох флуорофорів у структурі вихідного зонда.

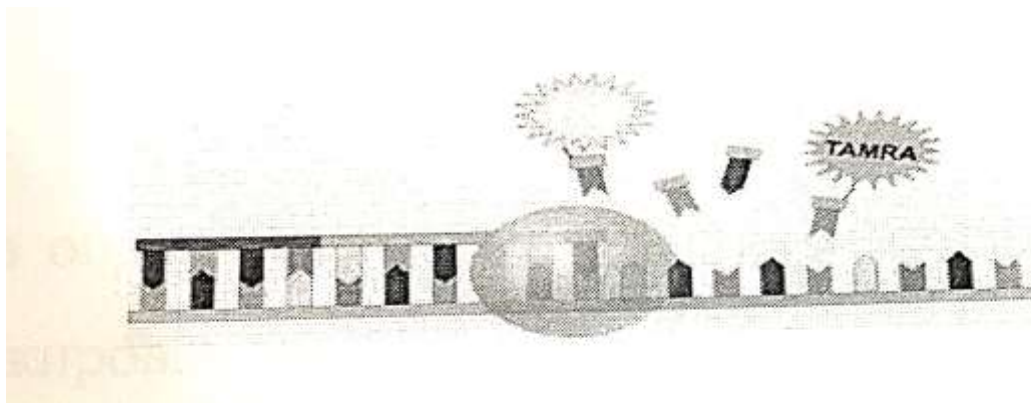


Рисунок 2.3. Вивільнення флуоресцентних зондів при синтезі нової ДНК

В нашій роботі було використано систему ABI PRISM 7000 Sequencing Detection System від компанії "Applied Biosystems" для ПЛР у реальному часі. Ця система має декілька ключових компонентів, які дозволяють проводити ампліфікацію та одночасно реєструвати флуоресцентний сигнал, що генерується під час реакції ПЛР. Основні складові цієї системи включають:

1. **Термоциклер:** Це пристрій, який забезпечує регулювання температури у пробірках під час ампліфікації. Використовуючи елементи Пельтьє, термоциклер здатний швидко нагрівати і охолоджувати пробірки, необхідне для реалізації температурних циклів у ПЛР.

2. **Флуоресцентний детектор:** Цей пристрій реєструє флуоресцентний сигнал, який виділяється під час ампліфікації, особливо від флуорофору FAM, що прикріплений до зонду в реакційній суміші.

3. **Програмне забезпечення для аналізу:** ПО, що постачається з ампліфікатором, дозволяє збирати та аналізувати дані флуоресцентного сигналу, отримані під час реакції ПЛР. Воно може використовуватися для обчислення концентрації ДНК у вихідній матриці на основі інтенсивності сигналу, яка зростає пропорційно до кількості ампліконів у реакційній суміші.

Ця система дозволяє проводити ПЛР у реальному часі, забезпечуючи точний та кількісний аналіз концентрації ДНК за допомогою флуоресцентного

сигналу, і дозволяє автоматично реєструвати та аналізувати результати ампліфікації.

2.2. Методика проведення ПЛР-ампліфікації ДНК у форматі Real-time

1. Промаркувати пробірки із запечатаною парафіном сумішшю для ампліфікації (з урахуванням пробірок для негативного контрольного зразка «К-» та позитивного контрольного зразка – «К+»).

2. Додати у кожную пробірку, не ушкоджуючи шар парафіну, по 10 мкл ретельно переметанного розчину Taq-полімерази.

3. Додати в кожную пробірку по 1 краплі мінеральної олії.

4. Перенести пробірки до зони пробопідготовки.

5. Додати в кожную пробірку, не пошкоджуючи шар парафіну, по 5,0 мкл виділеного із зразка препарату ДНК (крім пробірок "К-". "К+"). До пробірки, маркованої «К-» , додайте 5,0 мкл негативного контрольного зразка, що пройшов пробопідготовку, до пробірки, маркованої «К+», додайте 5,0 мкл позитивного контрольного зразка.

6. Центрифугувати пробірки при 1000 об/хв протягом 3-5 с.

7. Встановити всі пробірки в детектуючий ампліфікатор і провести ПЛР в режимі, наведеному в таблиці 2.1 та 2.2, з урахуванням об'єму реакційної суміші 35 мкл.

Таблиця 2.1 Режим ампліфікації

Температура	Час	Кількість циклів	
		для всіх комплектів, крім <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
80 °C 94 °C	1хв 1хв 30с	1	1
94 °C	30с	5	5
94 °C 64°C	10 с 15 с	45	35
10 °C	Зберігання		

2.3. ПЛР-детектор «Джин»

Ми використовували спеціалізований флюориметр для детекції результатів ПЛР (рис. 2.4.), призначений для реєстрації результатів ПЛР при використанні тест-систем, що ґрунтуються на принципах флуоресцентної детекції. Орієнтований на використання зондів та/або праймерів, мічених флуоресцентною міткою та гасителем флуоресценції. Дозволяє реєструвати результати ПЛР після проведення реакції, не відкриваючи пробірки, завдяки чому вирішується проблема контамінації продуктами ПЛР та спрощуються вимоги до організації ПЛР-лабораторії. Значно знижує трудомісткість та час проведення стадії детекції. Забезпечує можливість ефективної документації та зберігання результатів ПЛР у комп'ютерній базі даних.



Рисунок 2.4 ПЛР-детектор

Детектор полімеразної ланцюгової реакції флуоресцентний є спеціалізованим приладом, що дозволяє реєструвати флуоресцентне випромінювання світла реакційної суміші в пробірках безпосередньо після ПЛР (рис.2.5.).

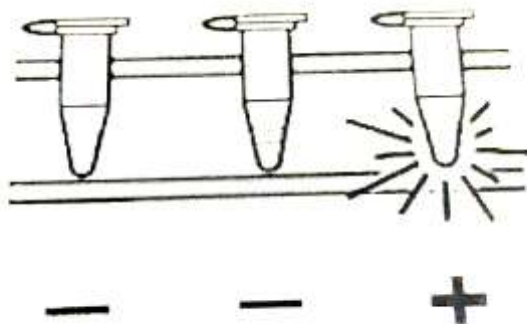


Рисунок 2.5. Флуоресценція у пробірці після проведення ПЛР

Детектор призначений виявлення результатів ПЛР під час використання тест-систем, заснованих на принципах флуоресцентної детекції. Детектор призначений для роботи в умовах лабораторій установ охорони здоров'я та науково-дослідних установ. Детектор не призначений для кількісної оцінки результатів ПЛР.

Прилад складається з наступних основних частин:

- 1) Барабан з лунками для пробірок, встановленого на валу крокового двигуна;
- 2) Двох оптичних блоків;
- 3) Системи охолодження активної частини приладу;
- 4) Мікропроцесорного керуючого модуля;
- 5) Рідкокристалічного індикатора та кнопки управління.

Робота приладу полягає у реєстрації флуоресцентного випромінювання, що виникає у реакційній суміші при освітленні зразка джерелом збудження. Реєстрація проводиться послідовно для кожної пробірки за допомогою позиціонування пробірок щодо оптичного блоку за допомогою крокового двигуна

2.4. Методика ПЛР-ампліфікації ДІК у форматі "Flash")

1. Промаркувати пробірки із запечатаною парафіном сумішшю для ампліфікації (з урахуванням пробірок для негативного контрольного зразка «К-», позитивного контрольного зразка – «К+» та двох нормувальних пробірок – «ФОН»). |

2. Додати в кожную пробірку (крім пробірок «ФОН»), не пошкоджуючи шар парафіну по 10 мкл ретельно перемішаного розчину Таq-полімерази.

До пробірок, маркованих «ФОН», додати по 10 мкл ПЛР-буфера.

3. Додати в кожную пробірку по 1 краплі мінеральної олії.

4. Перенести пробірки до зони пробопідготовки.

5. Додати в кожную пробірку, не пошкоджуючи шар парафіну, по 5 мкл виділеного із зразка препарату ДНК (крім пробірок «К-», «К+», «ФОН»). У пробірки, марковані «К-» та «ФОН», додайте по 5,0 мкл негативного контрольного зразка, що пройшов підготовку, в пробірку, марковану "К+". додайте 5,0 мкл позитивного контрольного зразка.

6. Центрифугувати пробірки при 1000 об/хв протягом 3-5 с.

7. Встановити всі пробірки в ампліфікатор і проведіть ПЛР у режимі, наведеному в таблицях, з урахуванням об'єму реакційної суміші 35 мкл.

Відповідність програм ампліфікації комплектів реагентів наведено у табл.2. 4.

Таблиця 2.2. Режим ампліфікації 1

Температура	Час	Кількість циклів
94 С	1хв	1
94С 64С 67С	5с 5с 5с	5
94С 64С 67С	1с 5с 5с	40
10 С	Зберігання	

Таблиця 2.3. Режим ампліфікації 2

Температура	Час	Кількість циклів
94 С	1хв	1
94С 67С	5с 15с	5
94С 67С	1с 15с	40
ЮС	Зберігання	

Таблиця 2.4. Режим ампліфікації 3

Температура	Час	Кількість циклів
94 С	1хв	1
94С 67С	5с 15с	5
94С 67С	1с 15с	30
10 С	Зберігання	

2.5. Виявлення РНК у пробах за допомогою Gene Pak™ RNA PCR test

Набори реагентів GenePak™ **RNA PCR** test призначені для виявлення вірусної або іншої РНК у плазмі або сироватці крові, зіскрібці або змиві слизової оболонки, екстрактах фекалій або інших проб методом полімеразної ланцюгової реакції, пов'язаної з реакцією зворотної транскрипції. Набір реагентів GenePak™ RNA PCR test може бути використаний у клінічній медицині для виявлення РНК вірусної або іншої природи, для оцінки ефективності та коригування терапії, що проводиться.

Набір реагентів GenePak™ RNA PCR test заснований на використанні двох поєднаних полімеразних реакцій: реакції зворотної транскрипції на основі вірусної або іншої РНК для отримання кДНК і полімеразної ланцюгової реакції для ампліфікації отриманої кДНК матриці.

Набори реагентів GenePak™ RNA PCR test є сухими ліофілізованими сумішами, готовими для ампліфікації виділеної РНК. У наборі реагентів для проведення реакції зворотної транскрипції використано випадковий гексануклеотидний праймер, звертаючи транскрип газу (MMLV-RT) та інгібітор РНКаз (RNAsin), а також використані пара праймерів та Taq ДНК полімераза для проведення PCR. Як матриця для праймерів та проведення RT-PCR використані консервативні послідовності геномів вірусів або іншої РНК.

Детекцію PCR продукту проводять електрофорезом в агарозному гелі, пофарбованому бромистим етидієм, в УФ-світлі з довжиною хвилі 302 нм. За наявності специфічного фрагмента ампліфікації певного розміру судять про присутність вірусної чи іншої РНК у аналізованому матеріалі.

Реєстрацію результатів проводять візуально за допомогою фотографування або сканування відеокамерою.

При використанні як вихідний матеріал відповідних *in vitro* транскриптів (позитивний контрольний зразок) на агарозному гелі після проведення електрофорезу продуктів ампліфікації під УФ світлом повинна з'явитися смуга, що світиться, відповідного розміру.

2.5.1. Пробопідготовка

Приготування робочого розчину сольового буфера. Вміст флакона з 5-кратним сольовим буфером (10 мл) перенести в мірний циліндр, довести бидисгилированою водою до мітки 50 мл, а потім 96% етанолом до мітки 300 мл і перемішати. Отриманий розчин слід зберігати в закритому герметичному посуді при 2-8°C.

У пробірку з 100 мкл плазми або сироватки крові додати 400 мкл РНК лігуючого реагенту. Додати до пробірки 20 мкл суспензії сорбенту NucleoS+™. Перед використанням NucleoS+™ слід інтенсивно струсити на вортексі до повного гомогенного стану. Перемішати пробірку на ротаторі або вручну 5 хв (10-20 об/хв). Додати в пробірку 800 мкл сольового буфера та перемішати перевертаючи пробірку. Центрифугувати пробірку при кімнатній температурі 10-15 сек.

Рекомендується встановлювати пробірки в роторі центрифуги в однаковому положенні для зручності при подальшому видаленні супернатанту. Обережно, не зачіпаючи осад, видалити супернатант, використовуючи водоструминний насос. Додати до осаду 1 мл сольового буфера і ретельно перемішати на вортексі кожную пробірку до гомогенного стану. Центрифугувати пробірку 5-10 сек. за 5000 g. Обережно видалити супернатант. Посушити пробірку з осадом 5 м при 65°C. Додати в пробірку 100 мкл ЕкстраГена Е і суспендувати двічі з інтервалом 15 хв. вміст пробірки на вортексі 5-10 сек. до одержання гомогенної суспензії. Центрифугувати пробірку 1 хв. при максимальних обертах (10000 g). Перенести супернатант чисту пробірку або відразу використовувати 5 мкл для постановки реакції зворотної транскрипції. Готові проби не рекомендується зберігати і слід використовувати для постановки реакції зворотної транскрипції.

2.5.2. Постановка реакції зворотної транскрипції

Технологія ПЛР була творчо розширена, і ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) є одним із найважливіших досягнень. ПЛР у реальному часі часто плутають із ПЛР зі зворотною транскрипцією, але це різні методи. У RT-PCR ампліфікована ДНК одержується з мРНК за допомогою ферментів зворотної транскриптази, ДНК-полімераз, що експресуються РНК-вмісними ретровірусами, для створення комплементарної бібліотеки ДНК (кДНК). Використовуючи послідовності праймерів для цікавих генів, традиційні методи ПЛР можна використовувати з кДНК для якісного вивчення експресії генів. Зараз ПЛР зі зворотною транскрипцією зазвичай використовується разом із ПЛР у реальному часі, що дозволяє кількісно виміряти відносну зміну експресії генів у різних зразках.

2.5.3. Проведення реакції PCR.

Перед початком роботи вийняти з холодильника потрібну кількість безбарвних пробірок ПЛР МастерМікса із вмістом синього кольору для аналізу невідомих проб і для (-) і (+) контрольованих. Відповідно промаркувати. Додати до всіх пробірок по 15 мкл ПЛР розчинника. Розчинення вмісту пробірки не є обов'язковим. Додати у всі пробірки по краплині розплавленого при 65 ° С Дінойла TM (по 20 мкл). Застиглий Дінойл повинен повністю закривати 15 мкл ПЛР МайстерМікса. Перенести у відповідні пробірки поверх застиглого Дінойлу весь об'єм, 10 мкл. вміст червоного кольору після реакції зворотної транскрипції, (-) контроль, (+) контроль та від МастерМікс. Утворюється трифазна система червоного (верхнього) та синього (нижнього) кольорів, розділена ДінойломTM. Пробірки перенести в ампліфікатор та провести ампліфікацію в наступному режимі послідовно пов'язаних програм (таблиця 2.5).

Таблиця 2.5. Режими ампліфікації

	Контроль температури block, матриця	Активне регулювання температури	
		Всередину пробірки і (tube. точний)	Розраховане але (30 мкл алгоритм (sim. у швидкий)
	час температура	час температура	час температура
1	2 хв 95°C	2 хв 95°C	2 хв 95°C
	1цикл	1цикл	1цикл
2	60 сек 95°C 40 сек 58°C 60 сек 74°C	20 сек 95°C 20 сек 58°C 40 сек 74°C 45 циклів	20 сек 95°C 20 сек 58°C 40 сек 74°C 45 циклів
	45циклів		
3	120 сек 74°C	120 сек 74°C	120 сек 74°C
	1цикл	1 цикл	1 цикл

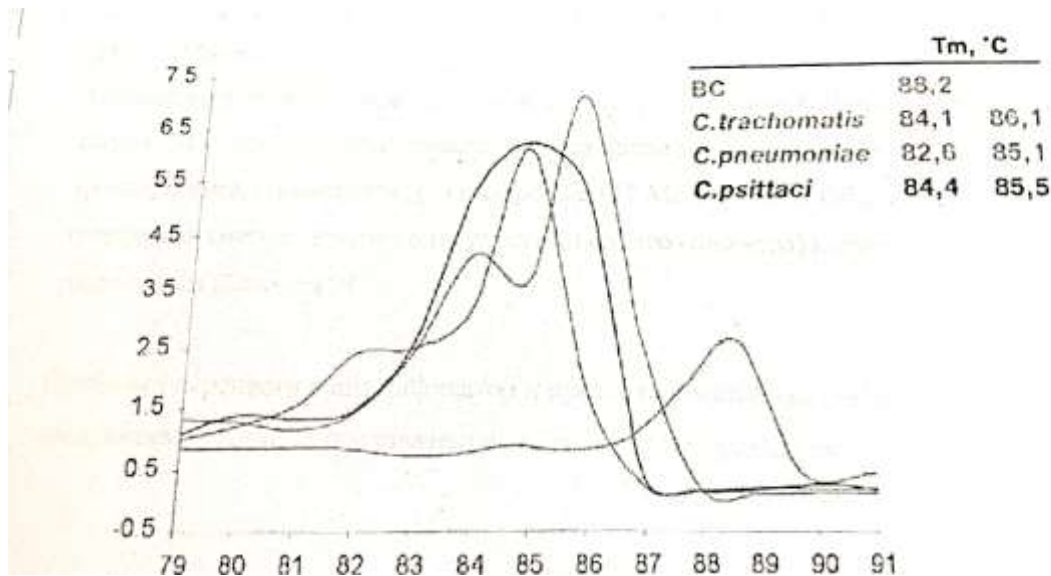


Рисунок 2.6. Диференціальний аналіз кривих плавлення ПЛР-продуктів

Для детекції PCR-продукту використовуються флуоресцентні барвники, що забезпечують флуоресценцію прямо пропорційну кількості ПЛР-продукту - репортерну флуоресценцію. Механізми генерації репортерної флуоресценції різняться в залежності від типу real-time PCR. Кінетична крива РСК у координатах "Рівень репортерної флуоресценції - цикл ампліфікації" має сигмоїдну форму (рис. 2.6), на ній можна виділити три стадії:

1. Стадію ініціації (коли PCR-продукти ще не детектується флуоресцентною міткою).
2. Експоненційну стадію (в якій спостерігається експоненційна залежність кількості флуоресценції від циклу PCR).
3. Плато (стадію насичення).

2.6. Візуалізація результатів ПЛР

2.6.1. Проведення гель-електрофорезу

Приготування робочого розчину буфера для електрофорезу (TBE).

Розчинити вміст флакона з буфером для електрофорезу (TBE) в 1 л дистильованої води. Розчин TBE буфера використовується також і для

приготування ага різного гелю. Готовий TBE буфер може зберігатися при температурі 20°C протягом 6 місяців.

Приготування агарозного гелю. У об'ємному колбу 500 мл внести вміст флакона з агарозою, додати 200 мл готового TBE буфера і помістити колбу на електричну плитку. Довести вміст колби до кипіння і після того, як агароз повністю розплавиться (через 2-3 хв), колбу з агарозою зняти з плитки. Готова агароза має бути прозорою і не повинна містити нерозплавлених частинок.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю.

Встановити кришку з ванною на камеру, а платформу для заливки гелю помістити у ванну. Встановити гребінку (можна встановити 2 або 3 гребінки, залежно від кількості аналізованих проб) на платформу.

У конічну колбу з готовою агарозою внести 15 мкл (1 краплю) бромистого лідія, обережно перемішати вміст колби рівномірними обертальними рухами. Після цього розплавлену агарозу охолодити приблизно до температури 50°З кімнатної температури або в теплій водяній бані.

Охолоджену приблизно до температури 50° З розплавлену агарозу налити на платформу. Товщина шару агарози має бути близько 4 мм.

Після застигання агарози (приблизно через 25” 30 хв) обережно, щоб не порвати кишені, вийняти гребінку, а платформу з агарозним гелем перенести з ванни в електрофоретичну камеру. Залити достатній обсяг буфера TBE в електрофоретичну камеру так, щоб буфер покривав агарозний гель шаром приблизно 1-2 мм. Відібрати 12-14 мкл продукту ампліфікації з-під Динойлу™ і додати у відповідну лунку агарозного гелю, обережно, щоб запобігти перетіканню РСК продукту з однієї кишені в іншу.

Встановити кришку на камеру, підключити електрофоретичну камеру до джерела живлення, встановити на джерелі живлення напругу 100-200 (не більше 15 в/см). Через 20-30 хв (приблизно 1 см прогону синьої фарби) електрофоретичну камеру відключити від джерела живлення, від'єднати дроти від камери, зняти кришку з електрофоретичної камери.

Вийняти платформу з агарозним гелем з електрофоретичної камери, дати рідини стекти з гелю та обережно промити агарозний гель водою. Обережно помістити агарозний гель на УФ-трансілюмінатор. Надіти захисну маску або встановити захисний екран, увімкнути трансілюмінатор та проаналізувати отримані результати.

Розділ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У ході виконання дипломної роботи та протягом проходження переддипломної практики у ПЛР-лабораторії було проведено близько 5000 аналізів щодо визначення ДНК таких збудників як вірус простого герпесу 1 і 2, гарднерелла вагіналіс, гепатит С і В, нейсерія гонореї, кандида, краснуха, мікоплазма хомініс та геніталіум, папілома, трихомонас вагіналіс, токсоплазма гондії, хламідія, уреаплазма, пітомегаловірус. Дані про кількість аналізів, відсоток виявлення патогену у чоловіків та жінок представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Найменування збудника	Інтерпретація	Жінки		Чоловіки	
		кількість аналізів	% виявлення	кількість аналізів	% виявлення
HSV VI	ДНК не виявлене	454	45.38%	67	97.10%
	ДНК виявлене	22	4.62%	2	2.90%
	Підсумки	476	100.00%	69	100.00%
HSV2	ДНК не виявлене	697	91.11%	113	93.39%
	ДНК виявлене	68	8.89%	8	6.61%
	Підсумки	765	100.00%	121	100.00%
Gardnerella vaginalis	ДНК не виявлене	420	39.18%	347	61.31%
	ДНК виявлене	652	60.82%	219	38.69%
	Підсумки	1072	100.00%	566	100.00%
HCV (гепатит С)	ДНК не виявлене	53	98.15%	69	98.57%
	ДНК виявлене	1	1.85%	1	1.43%
	Підсумки	54	100.00%	70	100.00%
HBV (гепатит В)	ДНК не виявлене	77	88.51%	95	90.48%
	ДНК виявлене	10	11.49%	10	9.52%
	Підсумки	87	100.00%	105	100.00%
Neisseria gonorrhoeae	ДНК не виявлене	312	99.36%	182	98.38%
	ДНК виявлене	2	0.64%	3	1.62%
	Підсумки	314	100.00%	185	100.00%
Candida albicans	ДНК не виявлене	177	80.82%	60	95.24%
	ДНК виявлене	42	19.18%	3	4.76%
	Підсумки	219	100.00%	63	100.00%
Rubella virus	ДНК не виявлене	137	97.16%	3	100.00%
	ДНК виявлене	4	2.84%		
	Підсумки	141	100.00%	3	100.00%
Mycoplasma hominis	ДНК не виявлене	2036	91.79%	616	99.04%
	ДНК виявлене	182	8.21%	6	0.96%
	Підсумки	2218	100.00%	622	100.00%
Mycoplasma genitalium	ДНК не виявлене	1847	98.19%	582	96.84%
	ДНК виявлене	34	1.81%	19	3.16%
	Підсумки	1881	100.00%	601	100.00%

HPV	ДІ ІК не виявлено	675	64.66%	84	80.00%
	ДНК виявлено	369	35.34%	21	20.00%
	Підсумки	1044	100.00%	105	100.00%
Toxoplasma gondii	ДНК не виявлено	356	100.00%	25	100.00%
	Підсумки	356	100.00%	25	100.00%
Trichomonas vaginalis	ДНК не виявлено	758	97.68%	282	99.65%
	ДНК виявлено	18	2.32	1	0.35%
	Підсумки	776	100.00%	283	100.00%
Ureaplasma	ДНК не виявлено	1346	41.44%	682	74.21%
	ДНК виявлено	1902	58.56%	237	25.79%
	Підсумки	3248	100.00%	919	100.00%
Chlamydia trachomatis	ДНК не виявлено	2690	92.82	716	93.23%
	ДНК виявлено	208	7.18	52	6.77%
	Підсумки	2898	100.00%	768	100.00%
CMV (цитомегаловірус)	ДНК не виявлено	518	94.01%	62	96.88%
	ДНК виявлено	33	5.99%	2	3.13%
	Підсумки	551	100.00%	64	100.00%
Загальні підсумки		16286	100.00%	4685	100.00%

Проаналізувавши базу даних результатів виявлення ДНК збудників патогенних процесів маємо таку залежність (рис. 3.1).

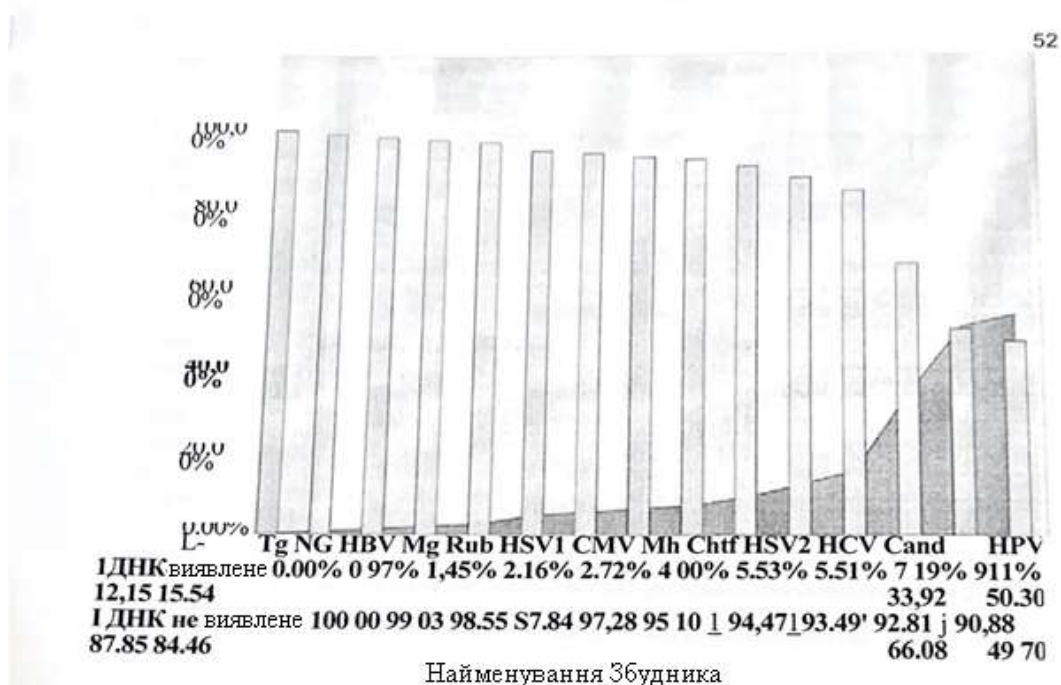


Рисунок 3.1. Загальні результати виявлення ДНК збудників

З діаграми, представленої на рис. 3.2. видно, що такі вірусні захворювання як нейссерія гонореї та мікоплазми геніталіум частіше зустрічаються у чоловіків. За час проведення досліджень вірус краснухи було виявлено лише у жінок, а ДНК токсоплазми гондії не виявлено ні у чоловіків, ні у жінок. Найбільш поширеними захворюваннями виявилися гарднереллез та уреаплазмоз як у чоловіків, так і у жінок.

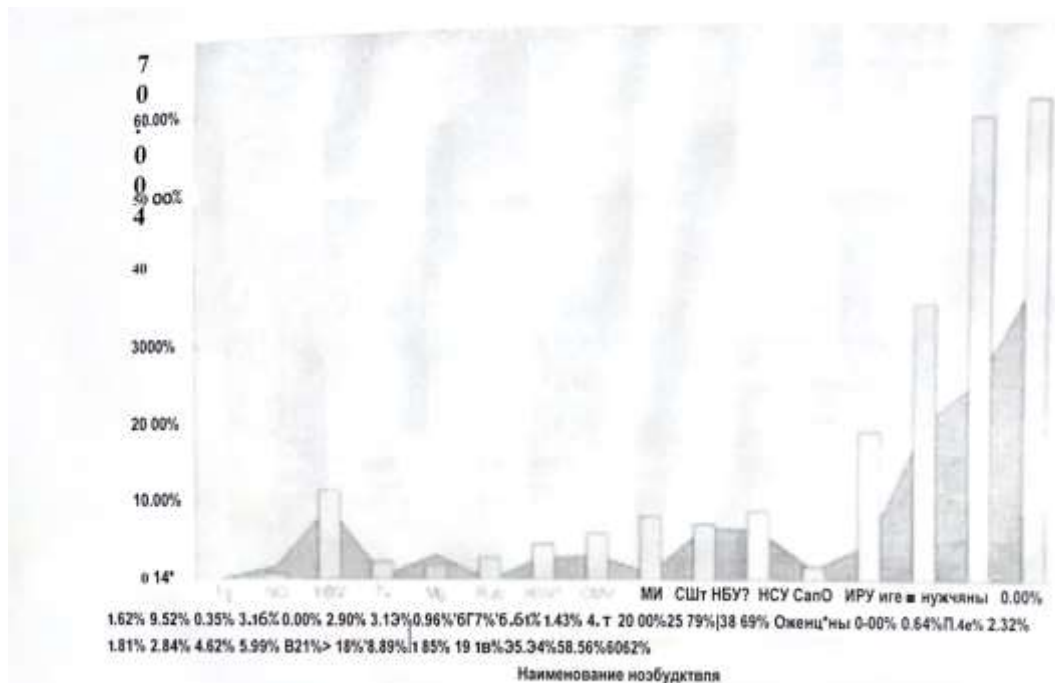


Рисунок 3.2. Відсоткове співвідношення виявлення ДНК збудників у чоловіків та жінок

Для обліку результатів аналізів було використано декілька видів детекції продуктів ПЛР-ампліфікації ДНК. У більшості методик на етапі детекції проводиться поділ суміші продуктів ампліфікації, одержаної на стадії ампліфікації, методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі. До проведення електрофоретичного поділу, до ампліфікаційної суміші додається розчин бромистого етидію, що утворює з двонитковими фрагментами ДНК міцні сполуки. Ці сполуки під дією УФ-опромінювання здатні флуоресціювати, що реєструється у вигляді помаранчево-червоних смуг, що

світяться після електрофоретного розділення ампліфікаційної суміші в агарозному гелі.

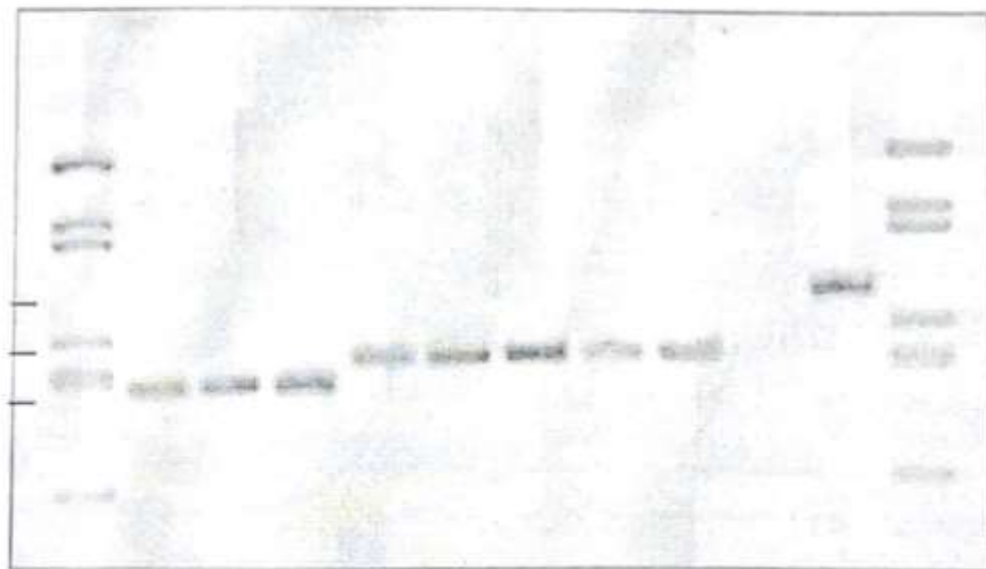


Рисунок 3.3. Контроль результатів за допомогою гель-електрофорезу

3.1. Детекція та облік результатів ампліфікації в режимі реального часу на приладах ДТ-322 або iCycler iQ (Bio-Rad).

Незважаючи на те, що використовується для проведення ПЛР Taq-полімераза погано подовжує праймери з неспареним 3'-кінцевим нуклеотидом, вона здатна у невеликому відсотку випадків подовжувати такий праймер. При великій кількості циклів ампліфікації продукт утворюється з усіх пар праймерів незалежно від генотипу досліджуваного зразка. Причому після закінчення реакції кількість ДНК у всіх пробірках приблизно дорівнює. Прилад Real-Time будує криві накопичення кількості ДНК у пробірці під час реакції. Чим раніше починається осі кривої, тим ефективніше працює дана пара праймерів (рис. 3.4.).

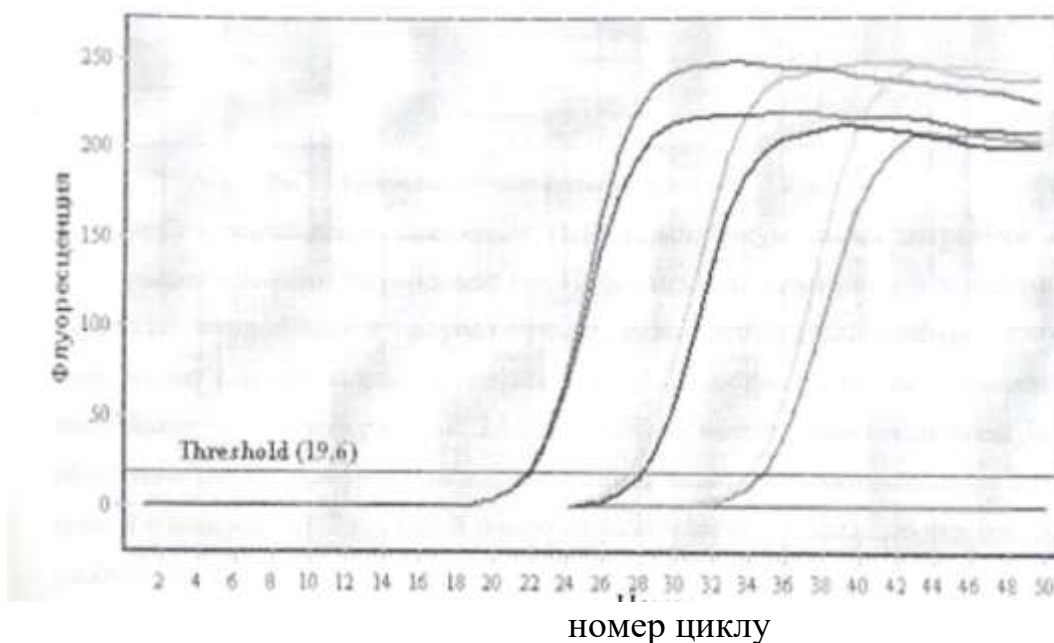


Рисунок 3.4. Графіки накопичення ДНК, отримані з використанням детектуючого ампліфікатора Real-Time

ДНК-зонди, які використовуються для детекції продуктів ампліфікації специфічного продукту та внутрішнього контрольного образу, мічені флуоресцентними мітками FAM та HEX відповідно.

Збільшення флуоресценції може бути пов'язано як із накопиченням специфічного продукту, так і неспецифічного (праймери, димери, тримери). Для отримання коректних результатів необхідне додаткове вивчення отриманих ампліконів за допомогою побудови про кривих плавлення (melting curves).

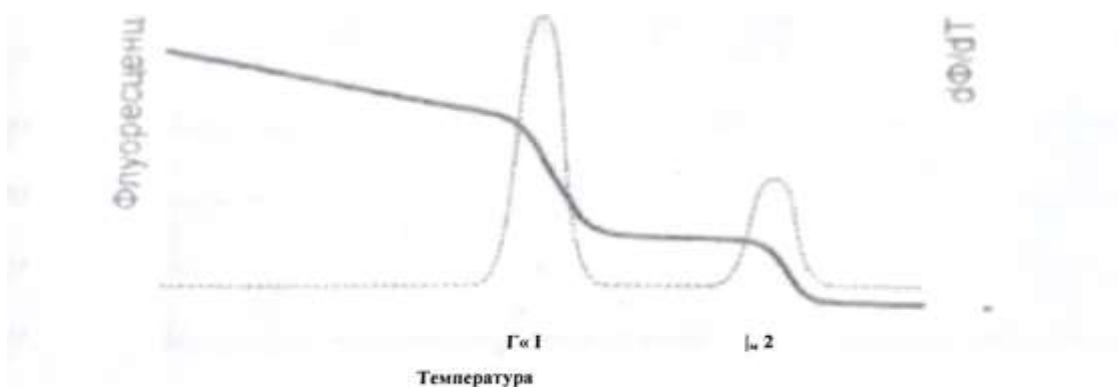


Рисунок 3.5. Криві плавлення продукту ампліфікації

Для цього після закінчення ПЛР реакційну суміш нагрівають і безперервно вимірюють флуоресценцію. Після досягнення температури плавлення продукту ампліфікації флуоресценція різко знижується. Кожне різке зменшення флуоресценції на графіці (рис. 3.5.) відповідає числу смужок, одержуваних на електрофорезі (рис. 3.3.), тобто різних типів ампліконон. Для полегшення роботи з одержаною інформацією проводять диференціальний аналіз кривої плавлення (рис.3.6). Такий спосіб візуалізації отриманих даних набагато зручніший для розуміння та аналізу.

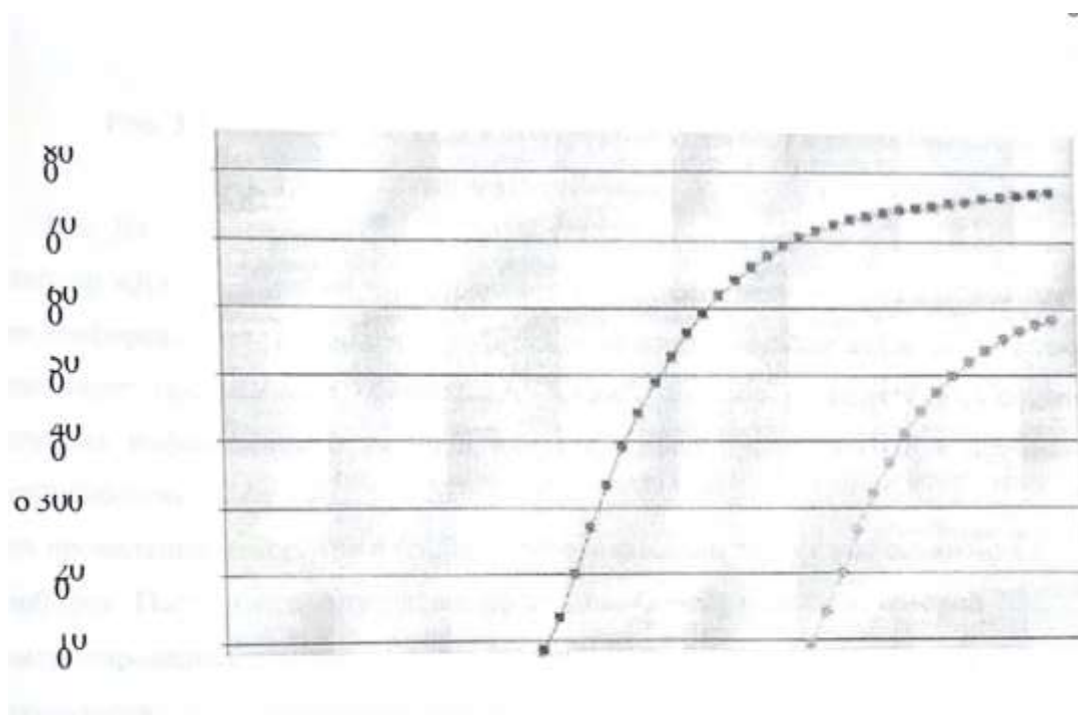


Рисунок 3.6. Кінетичні криві real-time PCR

3.3. Реєстрація результатів ПЛР флуоресцентним детектором

ПЛР-детектор «Джин» дозволяв нам реєструвати результати ампліфікації без проведення електрофорезу (не відкриваючи пробірки). «Джин» підключається до комп'ютера та використовує програмне забезпечення "Gene", яке дозволяє за короткий термін отримати інформацію про наявність або відсутність продукту ПЦР у пробірці після ампліфікації.

Для проведення вимірювання прилад послідовно завантажують серії по 12 пробірок. Після цього запускалася програма Gene, за допомогою якої контролювався вимірювання свічення в пробірках та оброблялася результати.

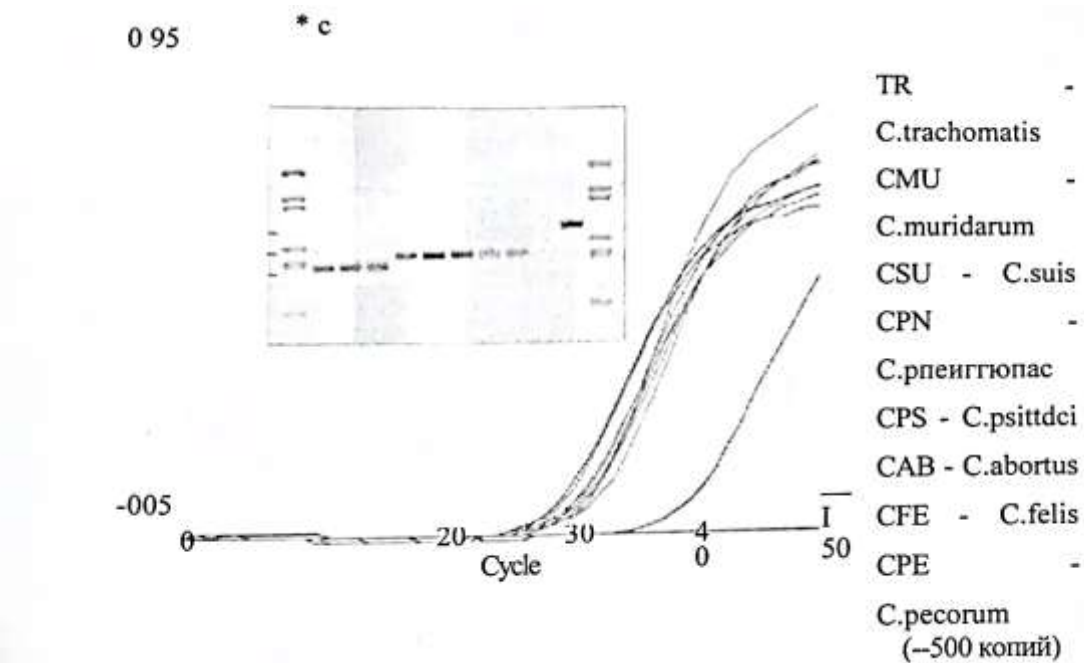


Рисунок 3.7. ПЛР в режимі реального часу та контроль результатів за допомогою гелелектрофорезу

ВИСНОВКИ

1. Проведено порівняння різних методик детекції та обліку результатів ПЛР-ампліфікації ДНК: гель-електрофорез, Real-Time, Flash.
2. Проаналізовано базу даних результатів виявлення збудників патогенних процесів. Наведено відсоткове співвідношення виявлення ДНК патогену у чоловіків та жінок.
3. Показано, що найбільш повна характеристика збудника можлива за комбінованого використання горизонтального електрофорезу, ампліфікації в режимі реального часу, флуоресцентного детектора.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kloppe, K. et al. Studies on polynucleotides. Repair replications of short synthetic DNA's catalyzed by DNA polymerases. In: J. Mol. Biol. 1971. Bd. 56, P. 341-361.
2. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-273.
3. Gavrilov M, Yang JYC, Zou RS, Ma W, Lee CY, Mohapatra S, Kang J, Liao TW, Myong S, Ha T. Engineered helicase replaces thermocycler in DNA amplification while retaining desired PCR characteristics. Nat Commun. 2022 Oct 23;13(1):6312.
4. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. J Hematol Oncol. 2022 Sep 12;15(1):131.
5. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. Biotechniques. 2020 Oct;69(4):317-325.
6. Wee SK, Sivalingam SP, Yap EPH. Rapid Direct Nucleic Acid Amplification Test without RNA Extraction for SARS-CoV-2 Using a Portable PCR Thermocycler. Genes (Basel). 2020 Jun 18;11(6):664.
7. Hu X, Feng S, Shi K, Shi Y, Yin Y, Long F, Wei X, Li Z. Development of a quadruplex real-time quantitative RT-PCR for detection and differentiation of PHEV, PRV, CSFV, and JEV. Front Vet Sci. 2023 Oct 31;10:1276505.
8. М. С. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, Г. І. Калачнюк. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти). Біологія тварин, 2012, т. 14, № 1–2. С. 108-116. <https://aminbiol.com.ua/2012pdf/108.pdf>
9. Jansson L, Hedman J. Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase. Biomol Detect Quantif. 2019 Mar 2;17:100082.
10. Методичні рекомендації до розділу «Молекулярна біотехнологія» курсу «Загальна біотехнологія», упоряд.: Драницина А. С., Савчук О. М., Гребіник Д. М., Кравченко О.О., Остапченко Л. І. Київський національний імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології та медицини», Київ. 2018. 185 с.

https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Metodychni_vkazivky_Molekul_biotechnology/Metodychni_vkazivky_Molekul_biotechnology.pdf

11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-994.
12. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol.* 2019 Apr-Jun;36(2):116-117.
13. Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9306564.
14. Musapa M, Kumwenda T, Mkulama M, Chishimba S, Norris DE, Thuma PE, Mharakurwa S. A simple Chelex protocol for DNA extraction from *Anopheles* spp. *J Vis Exp.* 2013 Jan 9;(71):3281.
15. Honeywood MJ, Jeffries-Miles S, Wong K, Harrington C, Burns CC, Oberste MS, Bowen MD, Vega E. Use of guanidine thiocyanate-based nucleic acid extraction buffers to inactivate poliovirus in potentially infectious materials. *J Virol Methods.* 2021 Nov; 297: 114262.
16. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal.* 1999;13(3):133-140.
17. D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorczyca P, Kaplan JC. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.* 1991 Jul 11;19(13):3749.
18. Birch D.E., Kolmodin L., Wong J., Zangenberg G.A., Zoccoli M.A., McKinney N., Young K.K.Y. Simplified Hot Start PCR. *Nature.* 1996;381:445–446.
19. Moretti T., Koons B., Budowle B. Enhancement of PCR Amplification Yield and Specificity Using AmpliTaq Gold(TM) DNA Polymerase. *Biotechniques.* 1998;25:716–722.

20. Sharkey D.J., Scalice E.R., Christy K.G., Atwood S.M., Daiss J.L. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction. *Bio/Technology*. 1994;12:506–509.
21. Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A. TaqStart Antibody(TM): “Hot Start” PCR Facilitated by a Neutralizing Monoclonal Antibody Directed against Taq DNA Polymerase. *Biotechniques*. 1994;16:1134–1137.
22. Mizuguchi H., Nakatsuji M., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T. Characterization and Application to Hot Start PCR of Neutralizing Monoclonal Antibodies against KOD DNA Polymerase. *J. Biochem*. 1999;126:762–768.
23. Dang C., Jayasena S.D. Oligonucleotide Inhibitors OfTaqDNA Polymerase Facilitate Detection of Low Copy Number Targets by PCR. *J. Mol. Biol*. 1996;264:268–278.
24. Lin Y., Jayasena S.D. Inhibition of Multiple Thermostable DNA Polymerases by a Heterodimeric Aptamer. *J. Mol. Biol*. 1997;271:100–111.
25. Kaijalainen S., Karhunen P.J., Lalu K., Lindström K. An Alternative Hot Start Technique for PCR in Small Volumes Using Beads of Wax-Embedded Reaction Components Dried in Trehalose. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:2959–2960.
26. Barnes W.M., Rowlyk K.R. Magnesium Precipitate Hot Start Method for PCR. *Mol. Cell. Probes*. 2002;16:167–171.
27. Kaboev O.K. PCR Hot Start Using Primers with the Structure of Molecular Beacons (Hairpin-like Structure) *Nucleic Acids Res*. 2000;28:e94.
28. Ailenberg M., Silverman M. Controlled Hot Start and Improved Specificity in Carrying Out PCR Utilizing Touch-Up and Loop Incorporated Primers (TULIPS) *Biotechniques*. 2000;29:1018–1024.
29. Kermekchiev M.B., Tzekov A., Barnes W.M. Cold-Sensitive Mutants of Taq DNA Polymerase Provide a Hot Start for PCR. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:6139–6147.

30. Lee SJ, Park SY, Lee KH, Lee MW, Yu CY, Maeng J, Kim HD, Kim SW. Development of a Simple Direct and Hot-Start PCR Using *Escherichia coli*-Expressing Taq DNA Polymerase. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 13;24(14):11405.
31. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2003 Oct;38(5):518-24.
32. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
33. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997 Feb 15;245(2):154-60.
34. Yao Y, Nellåker C, Karlsson H. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. *Mol Cell Probes*. 2006 Oct;20(5):311-6.
35. Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem*. 2000 Feb;46(2):147-8.
36. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):995-1001.
37. Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*. 1998 Jan;16(1):49-53.
38. Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення». Постанова № 24 від 09.07.2003р. про затвердження методичних вказівок Міністерства охорони здоров'я України «Полімеразна ланцюгова реакція для виявлення збудників патологічних процесів».