

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
DMCO (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.

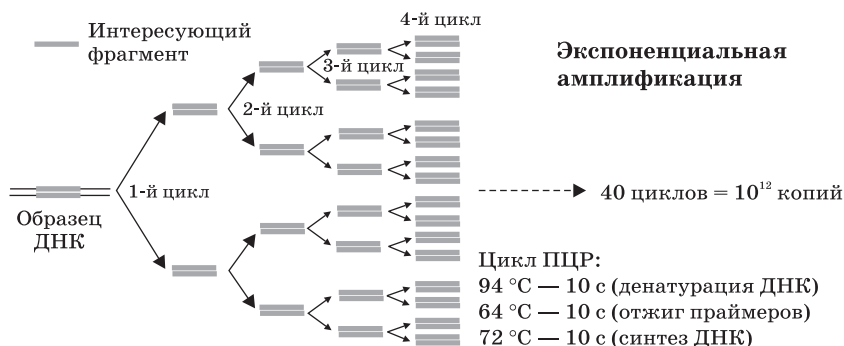


Рис. 1.1. Принцип экспоненциальной амплификации ДНК в ходе ПЦР

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 упрощало технику измерения и делало 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

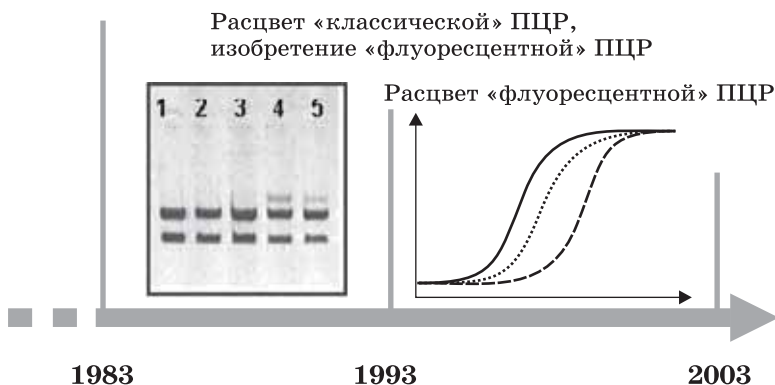


Рис. 1.2. Этапы развития метода ПЦР

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).

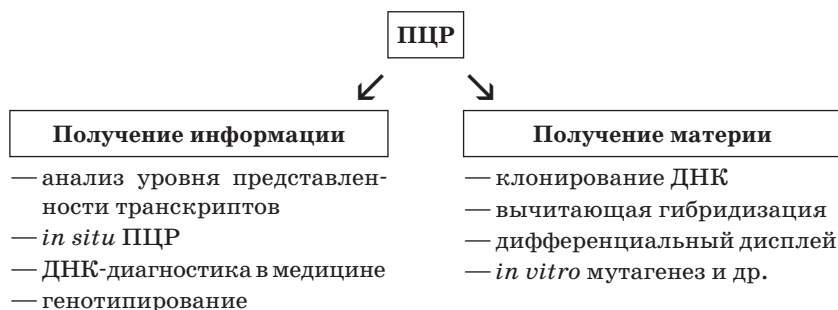


Рис. 1.3. Разделение ПЦР по принципу решаемой задачи. ПЦР «в реальном времени» наилучшим образом подходит для «информационной» ПЦР

[...]