

УДК 663.1

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Лопатина А.Б.*ГОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»,
Пермь, e-mail: panachev@pstu.ru*

В данном научном обзоре рассматриваются теоретические аспекты химических основ проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Принцип действия ПЦР основан на физиологической способности ДНК к репликации. Освещение теоретических вопросов возможности ДНК к самодостраиванию занимает значительное место в данной работе. Приведен детальный разбор последовательности действий при проведении полимеразной цепной реакции, описаны реактивы для проведения данной реакции. В качестве химических реактивов в данной работе приведен пример использования наборов для проведения полимеразной цепной реакции производства ООО НПФ «Литех». Описан алгоритм действий для химического анализа, с полным перечислением всех технических средств, лабораторных установок, лабораторной посуды и условий, приближенных к стерильным, для проведения данной химической реакции. Указаны максимально часто используемые наборы для проведения ПЦР-анализа, представлен их перечень. Освещаются перспективы использования данной химической реакции в ближайшем будущем.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, химические реактивы, ДНК

CHEMICAL FOUNDATIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION

Lopatina A.B.*Perm National Research Polytechnic University, Perm, e-mail: panachev@pstu.ru*

This scientific review of the theoretical aspects of chemical bases of the polymerase chain reaction (PCR). The operating principle of PCR is based on the physiological ability to replication of DNA. Lighting theoretical questions the possibility of DNA to selfbuilding occupies an important place in this work. The detailed analysis of the sequence of actions during the polymerase chain reaction reagents are described for this reaction. As the chemicals in this study is an example of the use of sets for carrying out a polymerase chain reaction production NPF «Litech». Described algorithm of actions for chemical analysis, a full listing of all technical means, ustnovok laboratory, laboratory glassware and conditions close to clean, for a given chemical reaction. Specify the maximum commonly used kits for PCR – analysis, presented a list of them. This highlights the prospects of using a chemical reaction in the near future.

Keywords: polymerase chain reaction, chemical reagents, DNA

Попытки изучения ДНК и химических реакций, протекающих в клетках бактерий, насчитывают уже десятки лет. Успехи современной химии, биохимии и молекулярной химии являются огромными, но даже при таком прогрессивном изучении молекулярных и субмолекулярных процессов загадки природы, сотворившей и встроившей процессы самовосстановления, саморегуляции и репарации ДНК, превосходят все мыслимые и немыслимые ожидания. 2015 год ознаменовался вручением Нобелевской премии трем ученым за вклад в изучение механизмов репарации ДНК. Все химические реакции, происходящие на уровне ДНК бактерии, свойственны и клеткам человеческого организма, за малым исключением или с некоторыми вариациями. Однако голографичность энзимных механизмов и репаративных процессов ДНК бактерии в общем и целом схожи с химическими процессами, протекающими в клетках макроорганизма, что делает задачу изучения химических процессов репарации ДНК микросистем еще более актуальной [2].

В настоящее время современная наука все больше и больше внимания уделяет нанообъектам, молекулярной биологии и молекулярной химии. Безусловно, что первыми объектами для изучения на молекулярном уровне становятся одноклеточные структуры, такие как бактерии, вирусы. ДНК этих структур, являющихся носителями информации, в первую очередь подвергается расщеплению, попыткам синтеза, подвергается различным облучениям, солнечному, радиоактивному, с целью исследования ответной реакции на воздействие этих факторов. Безусловно изучение химических реакций на уровне микробиологических структур экстраполируется на попытки понимания течения подобных процессов и реакций в структурах живого человеческого организма, что и делает эти опыты актуальными и важными. Исследование закономерности мутационных процессов на уровне клеток, а затем и организма человека в целом невозможно, без понимания закономерностей происхождения мутаций на уровне одноклеточных

субъектов химического обеспечения механизмов репарации ДНК микробиологических систем, с экстраполяцией полученных результатов на макроуровень, в том числе на уровень организма человека, что делает изучение этой проблемы важной и актуальной задачей.

Помимо описанных способов репарации ДНК существуют и уже описанные механизмы ее восстановления, такие как *рекомбинационная репарация* (Homologous recombination), когда для восстановления правильной последовательности ДНК используется ее копия с другой хромосомы, и *воссоединение негомологичных концов* (Microhomology-mediated end joining), когда часть ДНК теряется, но это часто неважно, потому что она приходится на некодирующие области. Оба этих вида репарации используются, когда нужно исправить двуцепочечный разрыв ДНК. Есть системы *толерантности к повреждению* (Translesion synthesis), когда клетка может функционировать и даже делиться, несмотря на то, что с ее геномом не всё в порядке. Есть клеточные *системы ответа на повреждение* (DNA damage response), которые определяют, как клетке вести себя и функционировать в случае повреждения ее ДНК – делиться, остановить деление и попытаться отрепарировать повреждение, погибнуть или использовать еще какой-нибудь неизвестный в настоящее время механизм саморегуляции [3].

Целью данной работы является описание теоретических и практических основ проведения химической реакции полимеразной цепной реакции (ПЦР), широко распространенным методом исследования ДНК.

Строение молекулы ДНК представляет собой сложную структуру. ДНК – это очень длинная нитевидная молекула, состоящая из двух полинуклеотидных цепей, скрученных вокруг общей оси в двойную спираль. Каждая цепь ДНК состоит из большого количества соединенных друг с другом мономерных звеньев – дезоксирибонуклеотидов четырех разных типов: дезоксинуклеотида аденозина, дезоксинуклеотида гуанозина, дезоксинуклеотида тимидина, дезоксинуклеотида – цитидина. Эти мономеры образуют характерные для каждого организма специфические последовательности. Дезоксирибонуклеотиды состоят из трех компонентов: азотистого основания (производного пурина или пиримидина), сахара дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Остатки фосфорной кислоты вы-

полняют структурную роль, образуя сахарофосфатный остов молекулы ДНК. Три-штрих ОН – группы дезоксирибозы одного нуклеотида связаны фосфодиэфирной связью с пять – штрих ОН – группы другого соседнего нуклеотида. Поэтому цепь ДНК обладает полярностью и имеет три – штрих конец и 5 – штрих конец. Азотистые основания несут собственно генетическую информацию. Аденин образует две водородные связи с тиминном, а гуанин образует две водородные связи с цитозином. Эта закономерность лежит в основе принципа комплементарного спаривания оснований. Аденин всегда связывается с тиминном, а гуанин всегда связывается с цитозином.

Цепи ДНК удерживаются вместе благодаря образованию водородных связей между комплементарными парами оснований. При увеличении температуры до 80–90 градусов или изменении рН происходит разрушение водородных связей, что ведет к денатурации молекулы ДНК. При снижении температуры и при введении значений рН к нейтральным расплетенная цепь ДНК самопроизвольно сплетается, образуя исходную двойную спираль. Этот процесс называется ренатурацией [1].

Молекулярные основы метода ПЦР (полимеразной цепной реакции). В основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит процесс естественной репликации ДНК, который включает три этапа. Первый этап – денатурация, расплетение двойной спирали и расхождение нитей. Второй этап – образование коротких двухцепочечных участков ДНК, которые служат затравками для синтеза новых цепей. Третий этап – удлинение обеих цепей затравок, в результате комплементарного достраивания в направлении от пять – штрих к три – штрих концу молекулы ДНК. Материалом для достраивания служат дезоксинуклеотидтрифосфаты. Этот процесс катализируется ферментом ДНК-полимеразой. ДНК-полимераза катализирует последовательное присоединение дезоксирибонуклеотидных остатков к цепи затравки со свободной три – штрих ОН – группой. В этом процессе сначала образуются водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями, а затем образуется фосфодиэфирная связь между остатками рибозы. В результате этой реакции образуется новая цепь ДНК, комплементарная исходной матричной цепи [4].

Метод ПЦР представляет собой определение короткого специфического участка

ДНК. Если взять пару полинуклеотидных затравок – праймеров, комплементарных границам короткого специфического участка ДНК, то, используя процесс естественной репликации, можно получить точную копию этого фрагмента. После многократного повторения циклов репликации происходит накопление фрагментов ДНК строго определенной длины, которые можно достоверно идентифицировать. Процесс накопления фрагментов называется амплификацией. Этот принцип, лежащий в основе метода ПЦР, был разработан в 1983 году американским биохимиком Кэрри Б. Мюллісом. В каждом цикле амплификации происходит удвоение числа копий искомого фрагмента ДНК, то есть накопление фрагментов происходит по экспоненциальному закону и за 30–40 циклов амплификации в растворе накапливается до 10^8 молекул фрагментов ДНК. Для проведения ПЦР необходимы следующие компоненты: ДНК-матрица, олигонуклеотидные затравки, праймеры, комплементарные границам участка молекулы ДНК, дезоксинуклеотид трифосфат и фермент ДНК-полимеразы. Реакция проводится в специальном буфере, обеспечивающем оптимальные условия для ее проведения. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов с различными температурными режимами. На первом этапе, проводимом при 93–95 °С в течение 30–40 секунд, происходит денатурация исходной матричной ДНК. На втором этапе при 50–65 °С происходит комплементарное присоединение, отжиг праймеров к соответствующим последовательностям на границе специфического участка. Время отжига составляет от 20 до 60 секунд. Третий этап амплификации проводится при температуре 70–72 °С. Это температура оптимальной активности фермента ДНК-полимеразы. На этом этапе происходит достраивание цепей праймеров. В современной методике проведения ПЦР используется термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из термофильных бактерий. Термостабильная ДНК-полимераза выдерживает нагревание до высоких температур, что избавляет от необходимости добавлять новую порцию ДНК-полимеразы в каждом новом цикле амплификации. После завершения первого цикла амплификации в растворе находится двухцепочечная молекула ДНК, состоящая из одной материнской цепи и одной новой синтезированной цепи, ограниченной с одной стороны праймером [5].

Во втором цикле амплификации, включающем все три этапа: денатурацию, отжиг праймеров и синтез новых цепей, – образуются двухцепочечные молекулы, состоящие из матричной цепи, частично ограниченной цепи и коротких фрагментов ДНК, ограниченных праймерами с двух сторон. Эти короткие фрагменты называются ампликонами. Во всех последующих циклах все новые синтезированные цепи могут служить матрицами для синтеза новых молекул.

Начиная с третьего цикла амплификации в растворе накапливаются короткие ампликоны. Процесс амплификации проводится в специально программируемом термостате – амплификаторе, который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур и временных интервалов. Обычно процесс амплификации включает 30–40 циклов. За это время расходуются некоторые исходные компоненты реакций, а в растворе накапливается до 10^8 молекул ампликонов. Этого количества достаточно для достоверной детекции фрагментов методом электрофореза в агарозном геле.

Диагностические наборы. НПФ «Литех» выпускает диагностические наборы для определения методом ПЦР ДНК следующих возбудителей инфекционных заболеваний: хламидии, микоплазмы, микоплазмы пневмонии, микоплазмы гениталие, уреаплазмы, гарднереллы, трихомонады, микобактерии туберкулеза, герпес, цитомегаловирус, гепатит В, гепатит С, гепатит G, – и наборы для определения резистентности микрофлоры к тетрациклину и эритромицину и др., что показано в таблице.

Наборы реагентов
для ПЦР производства ООО НПФ «Литех»

Chlamydia	Полимик-Хл
Mycoplasma pneumoniae	Полимик-1
Mycoplasma genitalium	Полимик-2
Ureaplasma	Уреапол
Gardnerella	Гардпол
Trichomonas	Трипол
Mycobacterium tuberculosis	Политуб
Herpes	Герпол
Hepatitis	Полигеп
Определение устойчивости к тетрациклину / эритромицину	Тетрапол / Эритропол

В состав набора входит: реакционная смесь 300 мл, деионизованная вода 2 мл, минеральное масло 2 мл, раствор Таq-полимеразы 25 мкл, контрольная ДНК – 50 мкл. Реакционная смесь содержит пару специфических праймеров, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, краситель и внутренний контроль, ПЦР буфер. Набор должен храниться при минус 20 °С. Срок годности набора 6 месяцев.

Каждый набор для проведения ПЦР комплектуется отдельным набором для выделения ДНК, который содержит 2 лизирующих раствора: раствор I – 30 мл, раствор II – 10 мл, промывочный раствор 200 мл, сорбент – 1 мл, ТЕ-буфер – 5 мл. Набор для выделения ДНК может храниться при плюс 4 °С.

Проведение анализа начинается с забора материала. Исследуемый материал – соскобы эпителиальных клеток, чаще это соскобы буккальных эпителиальных клеток, с помощью одноразового зонда переносятся в пробирку объемом 1,5 мл, со 100 мкл физиологического раствора NaCl 0,9%. Приготовленную пробу используют для выделения ДНК или хранят при минус 20 °С до 2-х недель. На этапе выделения ДНК необходимо следующее лабораторное оборудование: пипетки дозаторы, микроцентрифуга вортекс, высокоскоростная микроцентрифуга, насос с колбой-ловушкой, содержащей дезинфицирующий раствор, твердотельный термостат. В пробирку с пробой клинического материала добавляют 300 мкл раствора I и 10 мкл суспензии сорбента из набора для выделения ДНК. Пробирку выдерживают 10 минут в комнатной температуре, несколько раз встряхивая на вортексе. Затем пробы центрифугируют 15 секунд на микроцентрифуге при 8000–12000 оборотов в минуту. Надосадочный раствор отбрасывают в колбу с дезинфицирующим раствором. К осадку добавляют 100 мкл раствора II, встряхивают на вортексе. Осаждают сорбент в течение 15 секунд, супернатант отбрасывают. В пробирку добавляют 1 мл промывочного раствора 3, центрифугируют и удаляют раствор. Процедуру отмывки повторяют еще 2 раза. После того как из пробирки удалены остатки раствора 3, открытые пробирки с остатком сорбента помещают в термостат и подсушивают в течение 40 минут при 45–55 °С. Затем в пробирки добавляют 50 мкл ТЕ-буфера. Пробирки закрывают, перемешивают на вортексе и выдерживают в течение 40 минут при 45–55 °С в термостате. После

центрифугирования из пробирок отбирают водную фазу и используют ее в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации. Раствор ДНК может храниться при плюс четырех градусах в течение недели, а при минус 20 °С в течение 6 месяцев.

Для проведения реакции амплификации необходимо следующее лабораторное оборудование: программируемый термостат, амплификатор, микроцентрифуга вортекс и пипетки-дозаторы. 5 мкл раствора ДНК из обработанной клинической пробы переносят в специальную пробирку для проведения амплификации объемом в 500 мкл. Диагностический набор размораживают и готовят смесь реактивов для проведения реакции. Из расчета на одну пробу необходимо смешать: 2,5 мкл реакционной смеси, 17,5 мкл воды, 0,2 мкл Таq-полимеразы. После добавления Таq-полимеразы смесь перемешивают пипеткой и 20 мкл приготовленной смеси добавляют в пробирки с образцом ДНК из клинической пробы. В качестве положительного контроля реакции в смесь реактивов добавляют в пробирку к 5 мкл раствора контрольной ДНК из диагностического набора. В качестве отрицательного контроля в смесь реактивов добавляют в пробирку к 5 мкл воды. К подготовленным пробам добавляют по одной капле минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе проведения реакции. Пробирки центрифугируют 3–5 секунд на микроцентрифуге вортексе, чтобы масло равномерно распределилось по поверхности пробы. Пробирки переносят в амплификатор и проводят реакцию по заданной программе. Для определения каждого возбудителя существует своя программа проведения амплификации. Для наборов ПОЛИМИК используют следующие программы: 94 °С – 40 секунд, 58 °С – 30 секунд, 72 °С – 30 секунд. Реакция включает в себя 30 циклов. Количество проб, которые можно анализировать одновременно, зависит от производительности амплификата. Полученную в реакции амплификации смесь необходимо проанализировать. Для этого используется метод горизонтального электрофореза в агарозном геле. На этом этапе необходимы: источник тока и камера для электрофореза, пипетки-дозаторы, агароза, 50-кратный ТАЕ-буфер, 1 % бромистого этидия, ультрафиолетовый трансиллюминатор для визуализации гелей.

Регистрация результатов: в камеру для электрофореза заливают разбавленный ТАЕ-буфер, к 1,5 г агарозы добавляют 2 мл 50-кратного ТАЕ-буфера и 100 мл дистиллированной воды. Расплавляют смесь на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавляют к расплаву 10 мкл бромистого этидия. На планшете для заливки геля установить гребенки для расплава геля, по 2 гребенки на каждый планшет. Заливают в планшет расплав агарозы 50–60 °С. После застывания агарозы вынуть гребенки и просматривать результат. В карманы геля наносят по 10–15 мкл амплификата, наносят положительный и отрицательный контроль. Подключают камеру к источнику тока и задают напряжение, соответствующее напряженности электрического тока 10–15 В/см, разделение проводится в течение от 30 до 45 минут в направлении от катода к аноду. После проведения фореза отключают напряжение, вынимают гель из камер и переносят на стекло трансиллюминатора. Фрагменты ДНК проявляются в виде светящихся красно-оранжевых полос. В положительном контроле выявляют полосу, размеры которой для каждого микроорганизма индивидуальны. В отрицательном контроле полоса на этом уровне должна отсутствовать. В анализируемых пробах отсутствие полосы строго на уровне контроля свидетельствует об отсутствии данного конкретного возбудителя в крови. Наличие полосы строго на уровне полосы положительного контроля говорит о наличии данного конкретного возбудителя в крови. Появление полосы в отрицательном контроле указывает на контаминацию компонентов пробы. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием светофильтров.

Таким образом, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет опреде-

лить наличие чужеродной ДНК в крови, что является важным диагностическим методом многих инфекционных заболеваний. Высокая чувствительность данного метода осложняет его проведение, поскольку всегда существует риск контаминировать исследуемый материал и всю лабораторную посуду другими инфекционными агентами, что заставляет проводить исследование в условиях, приближенных к стерильным, однако и это не дает уверенности в том, что результаты контрольной отрицательной пробы могут быть положительными [6].

Однако грамотный анализ полученных результатов при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет расшифровать и выделить положительную реакцию отрицательного контроля на контаминированный инфекционный агент.

В России основные исследования ДНК ведутся в нескольких лабораториях Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в Новосибирске; есть группы, работающие в этом направлении в МГУ, Институте молекулярной генетики РАН, Институте цитологии РАН в Санкт-Петербурге, Петербургском институте ядерной физики.

Список литературы

1. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симукова Н.А., Турчинский М.Ф., Шибяев В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1970. – 718 с.
2. Лопатина А.Б. Химическое обеспечение механизмов репарации ДНК микробиологических систем // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 12. – С. 37–41.
3. Лопатина А.Б. Особенности химического состава мертвого моря и свойства комплекса DN-1 // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 11–2. – С. 149–152.
4. Рис Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам: пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 142 с.
5. Сетлоу Р., Поллард Э. Молекулярная биофизика. – М.: Мир, 1964. – 440 с.
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с.