

Преимущества метода ПЦР в реальном времени (Real Time PCR)

В.Е. Колупаев

ООО «Био-Рад Лаборатории», Москва

Сегодня метод количественного определения продуктов ПЦР непосредственно во время амплификации (Real Time) становится одним из наиболее популярных методов как в клинической генодиагностике, так и в научных исследованиях [1]. Отказ от электрофоретической детекции как отдельного этапа исследования позволяет полностью исключить контаминацию продуктами реакции, разместить лабораторию ПЦР в одной комнате, практически «на одном столе». Кроме снижения трудозатрат и увеличения достоверности результатов, метод обладает целым рядом других важнейших преимуществ, таких как возможность количественной оценки исходного наследственного материала [2], а также параллельную детекцию до 4 инфекций в одном образце [3].

Одна из наиболее значимых проблем ПЦР-диагностики — возможность получения ложнопозитивных результатов вследствие контаминации продуктами реакции. Исключение контаминации требует безукоризненного выполнения целого списка требований [4]. В условиях постоянного увеличения потока анализов вероятность контаминации из-за ошибок персонала непрерывно возрастает, а определение источника требует много времени и средств.

Специфические продукты реакции попадают в окружающую среду, как правило, на этапе детекции при переносе ампликона из реакционной пробирки в гель или планшет гибридационного анализа (рис. 1). Перенос даже следовых количеств такого контаминирующего агента в реакционную пробирку приводит к амплификации специфического участка ДНК и ложнопозитивному результату.

Успехи флюориметрических технологий, а также разработка прибора, который позволяет измерять концентрацию ампликонов непосредственно в ходе реакции, привели к созданию метода ПЦР в реальном времени [5]. Внедрение этого метода в лабораторную практику позволило полностью отказаться от отдельного этапа регистрации:

- практически устранить угрозу контаминации специфическими продуктами реакции;

- снизить строгие требования к организации лабораторного процесса;
- сократить трудозатраты и время анализа;
- проводить ПЦР-анализ в одном помещении.



Рис. 1. Опасность контаминации при переносе ампликона на этапе детекции

Принцип метода — детекция одновременно с амплификацией

Метод основан на измерении флюоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации конечного продукта ПЦР. Важнейшей особенностью метода является синхронизация регистрации и амплификации. Это дает возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого наследственного материала. Если сопоставить кинетику реакции в исследуемых и стандартных образцах, можно сделать вывод о концентрации исследуемого возбудителя в сыворотке. Как правило, прилагаемое программное обеспечение позволяет осуществлять эту операцию автоматически. Было показано, что в сравнении с другими количественными методами ПЦР-диагностики ПЦР в реальном времени является наиболее эффективной и наименее трудоемкой методикой [6].

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют следующие наиболее распространенные подходы:

1. Интеркалирующие красители. Этот способ детекции основан на том факте, что флюоресценция бромистого этидия и SYBR Green I значительно возрастает при их внедрении в в двойную цепь молекулы ДНК [5]. Добавление этих красителей в реакционную смесь позволяет наблюдать за накоплением продуктов амплификации непосредственно во время реакции.

2. ДНК-зонды. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входит флюоресцентная метка и гаситель флюоресценции [2, 3, 5, 7]. Когда зонд находится в растворе гаситель поглощает испускаемое флюоресцентной меткой излучение и свечение отсутствует. В ходе ПЦР происходит присоединение ДНК-зонда к комплементарной цепи ДНК, происходит разъединение флюоресцентной метки и гасителя, что приводит к увеличению детектируемого свечения. Очевидно, что чем больше ампликонов было наработано на данный момент времени, тем интенсивнее будет свечение (рис. 2).

Оборудование

Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный прибор, который состоит из трех блоков: амплификатора (термического блока), флюоресцентного детектора и компьютера. Фирма «Био-Рад» устанавливает оптический модуль на базовую модель амплификатора (рис. 3).

Термический блок, как правило, рассчитан на 96 образцов с использованием прозрачных ПЦР-пробирок или микропланшетов стандартного фор-

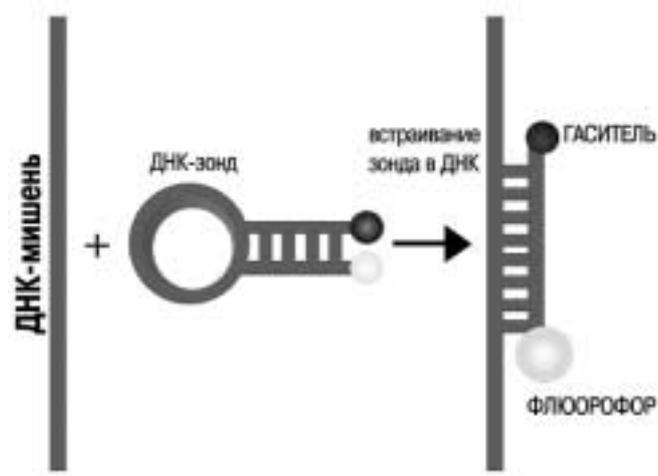


Рис. 2. Схема работы ДНК-зонда



Рис. 3. Прибор для ПЦР в реальном времени. На рисунке представлен Ай-Сайклер АйКью производства «Био-Рад Лаборатории» (США)

мата (исключение составляет прибор «Лайт Сайклер» компании Хофман-ла-Рош, в котором ПЦР проводится в капиллярах). Регистрация флюоресцентного сигнала происходит одновременно во всех образцах. Данные отображаются на экране компьютера для каждой пробы. По окончании анализа автоматически строится калибровочная кривая, и рассчитывается содержание исследуемого материала в образцах (рис. 4).

Оптический модуль содержит источник света и несколько пар эмиссионных-экстинционных фильтров, либо установленных стационарно, либо сменных, а также регистрирующее устройство. Прибор позволяет одновременно использовать несколько флюорофоров, конъюгированных с разными специфическими ДНК-зондами. Таким образом,

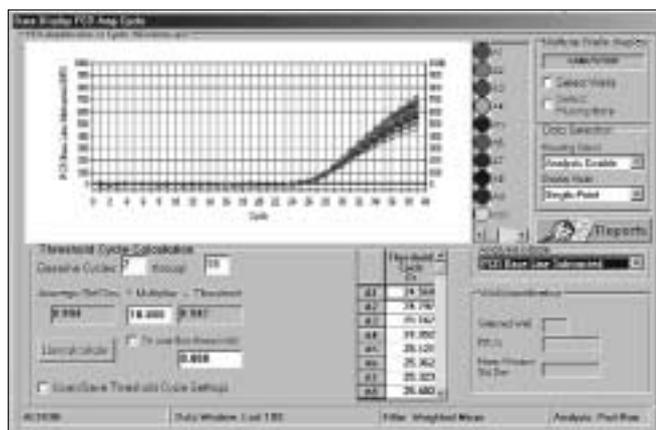


Рис. 4. Отображение регистрируемых данных на экране компьютера. Прибор Ай-Сайклер АйКью производства «Био-Рад Лаборатории» (США)

появляется возможность одновременного исследования нескольких типов ДНК-фрагментов, например, до 4 инфекций в одной пробе [3].

Однако такой тип исследований, как правило, ставит перед исследователем определенные технологические проблемы, например, подбор флуориметрических красителей с неперекрывающимся спектром излучения [8]. Способы их решения тесно связано с возможностями, заключенным в конструкции анализатора: сменные фильтры позволяют значительно расширить список флуорофоров и выбрать оптимальную комбинацию.

Таким образом, совмещение этапов амплификации и детекции в методе ПЦР в реальном времени позволяет существенно повысить достоверность ПЦР-анализа, исключив возможность контаминации, а также значительно сократить трудоемкость исследования, задействовав в аналитическом процессе минимум сотрудников.

Благодаря возможности количественной оценки и одновременного анализа нескольких параметров, метод предоставляет исследователю принципиально новые возможности в генодиагностике.

Разработка и изготовление широкого спектра тестов для ПЦР в реальном времени осуществляется в России специалистами ЦНИИ Эпидемиологии.

Литература

1. Godfrey T., Norwood D., Shaad N. Real-time PCR: Emerging Application. На сайте www.bio.com, 2002
2. Saha B. K., Tian B., Bucy R. P. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe, *Journal of Virological Methods*. 2001, 93: 33-42
3. Vet J. A. M., Majithia A. R., Marras S. A. E., Tyagi S., Dube S., Poiesz B. J., Kramer F. R. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 6394-6399
4. Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора РФ. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. М., 1995. Утверждены 22 июня 1995: 3-4
5. Higuchi R. Kinetic PCR Analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 1993, 11: 1026-1030.
6. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, 25: 169-193
7. Tyagi S., and Kramer F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14: 303-308.
8. El-Hajj H.H., Marras S. A. E., Tyagi S., Kramer F.R. Alland D. Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Tube with Molecular Beacons. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39-11: 4131-4137