



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

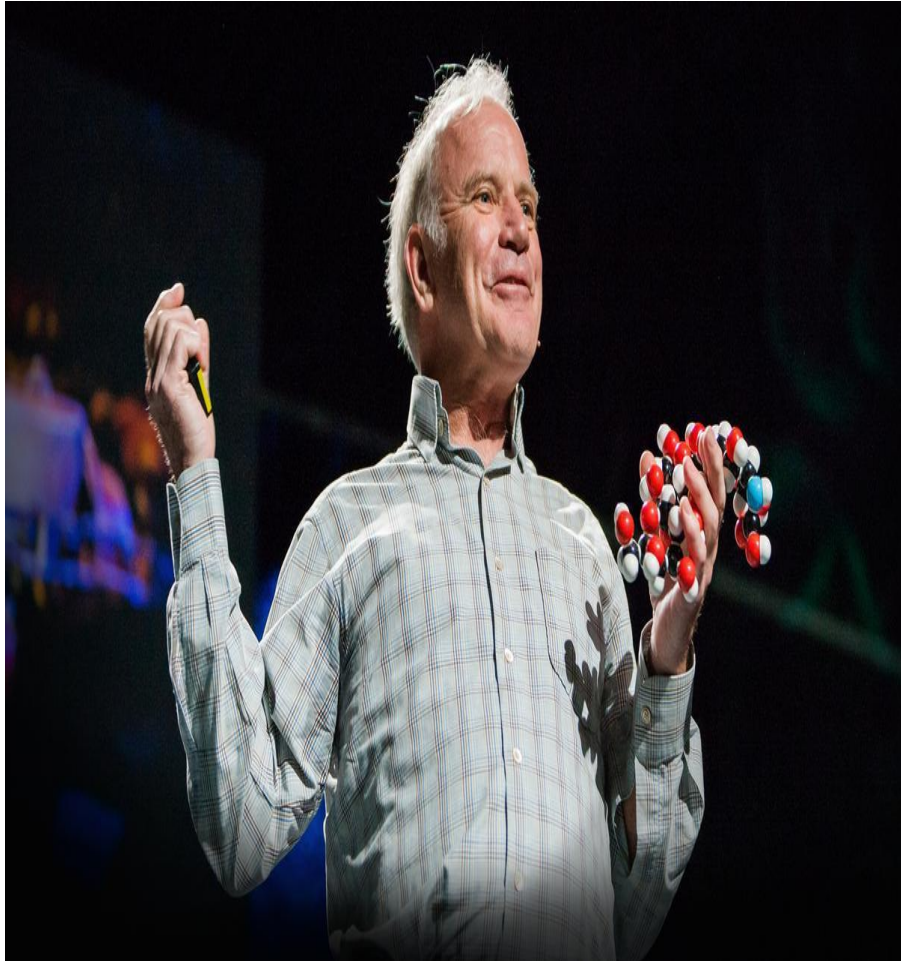
ДӘРІС 5. ПОЛИМЕРАЗДЫҚ ТІЗБЕКТІК РЕАКЦИЯ. КТ-ПТР ӘДІСІМЕН
COVID-19 ДИАГНОСТИКАСЫ

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Дәріс жоспары:

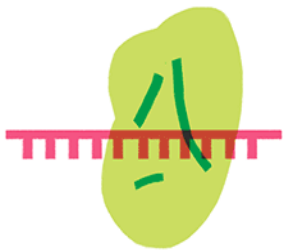
- ПТР-дің ашылу тарихы
- ПТР-дің компоненттері
- Реакция кезеңдері
- ПТР-дің модификациялары
- ПТР әдістерінің қолданылуы
- КТ-ПТР әдісімен Covid-19 анықтау

Қысқаша тарихы



- ПТР - әмбебап әдіс. Ол әр түрлі биологиялық материалдардан – шырыш, зәр, қан, қақырық, эпителиалді жасушалар қырындысынан ДНК-ны анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдістердің көмегімен миллиондаған ДНК фрагменттері ішінен керекті фрагментті табуға мүмкіндік туады.
- ПТР— биологиялық сынамадағы нуклеин қышқылдарының белгілі-бір фрагментінің аз ғана концентрациясын көбейтуге мүмкіндік беретін молекулалық биологияның экспериментальдық әдісі. Яғни, бірнеше сағат ішінде ДНК-ның кез келген бөлшектерін миллиондаған дана күйінде көбейтуге мүмкіндік береді

1957



1957

Американец Артур Корнберг выделил из бактерий *Escherichia coli* фермент ДНК-полимеразу.

1985

Появился первый прототип ПЦР-циклера — Mr. Cycle.

1987

Компания Cetus получила патент на метод ПЦР.



1993

Кэри Мюллис стал лауреатом Нобелевской премии по химии за изобретение ПЦР.

1971

1971

Норвежец Хьяель Клеппе опубликовал в *Journal of Molecular Biology* статью, в которой описал метод, очень похожий на ПЦР.

1976

Ученые из США — Эллис Чиен, Дэвид Эдгар и Джон Трела — выделили термостабильную ДНК-полимеразу из бактерии *Thermus aquaticus* и назвали ее *Taq*-полимеразой.



1988

Первое упоминание о ПЦР с обратной транскрипцией в журнале *Science*.



2000

В Японии предложили метод опосредованной образованием петель изотермической амплификации (LAMP) как альтернативу стандартной ПЦР.

1976

1977

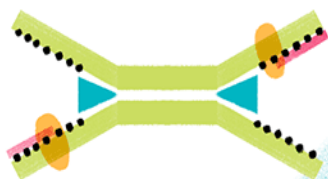
Англичанин Фредерик Сенгер предложил свой метод секвенирования ДНК.

1990

Компания Cetus получила патент на метод ПЦР с *Taq*-полимеразой.

1991

Права на метод ПЦР и использование *Taq*-полимеразы купила компания Hoffmann-La Roche за \$300 млн.



2004

Сотрудники компании New England Biolabs (NEB) разработали технологию хеликазозависимой амплификации.

1985



1992

Сотрудники Roche Molecular Systems разработали метод ПЦР в реальном времени.

2006

Британские ученые из TwistDX LTD разработали метод изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации.

1990

1983

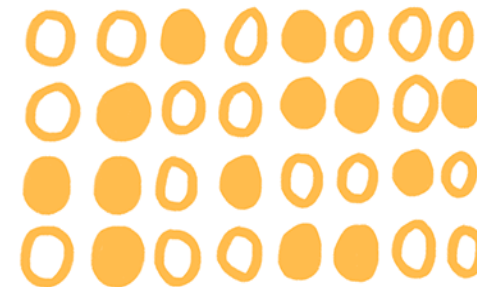
Американец Кэри Мюллис изобрел и протестировал метод ПЦР.

1992

Ученые из Калифорнийского университета в Беркли создали технологию иммуно-ПЦР.

2011

Компания BioRad начала коммерческое использование технологии капельной цифровой ПЦР.



1977 1983



ПТР әдісінің даму тарихы

1957 ж. Американдық Артур Корнберг ішек таяқшасының бактерияларынан ДНҚ полимераза ферментін бөліп алды.
1971 Норвегиялық Хьелль Клеппе ПТР әдісіне өте ұқсас әдісті сипаттайтын «Молекулярлық биология» журналында мақала жариялады.

1976 АҚШ ғалымдары - Эллис Чиен, Дэвид Эдгар және Джон Трела *Thermus aquaticus* бактериясынан термостабильді ДНҚ полимеразасын бөліп алып, оны Тақ полимераза деп атады.

1977 жылы ағылшын Фредерик Сэнгер ДНҚ -ның бірінші реттік құрылымын анықтау әдісін ұсынды. 1983 Америкалық Кэри Муллис ПТР әдісін ойлап тауып, сынақтан өткізді.

1985 жылдың желтоқсанында Science журналы Кэри Муллистің ПТР туралы бірінші мақаласын жариялады

1985 ПТР циклердің бірінші прототипі пайда болды - Mr. Cycle.

1987 жылы жалпыға қолжетімді PCR-1000 Thermal Cycler бірінші құралы сатылымға шықты.

1987 Cetus компаниясы ПТР әдісіне патент алды.

1988 Science журналында кері транскрипциялы ПТР туралы бірінші ескерту жарияланды. 1990 Cetus Тақ полимеразды ПТР әдісіне патент алды.

1991 ПТР әдісі мен Тақ полимеразасын қолдану құқығын Хоффман-Ла Рош 300 миллион долларға сатып алды. 1992 жылы Roche Molecular Systems қызметкерлері ПТР әдісін нақты уақытта жасады.

1992 Берклидегі Калифорния университетінің ғалымдары иммуно-ПТР технологиясын құрды.

1993 Кэри Муллис ПТР ойлап тапқаны үшін химия бойынша Нобель сыйлығын алды.

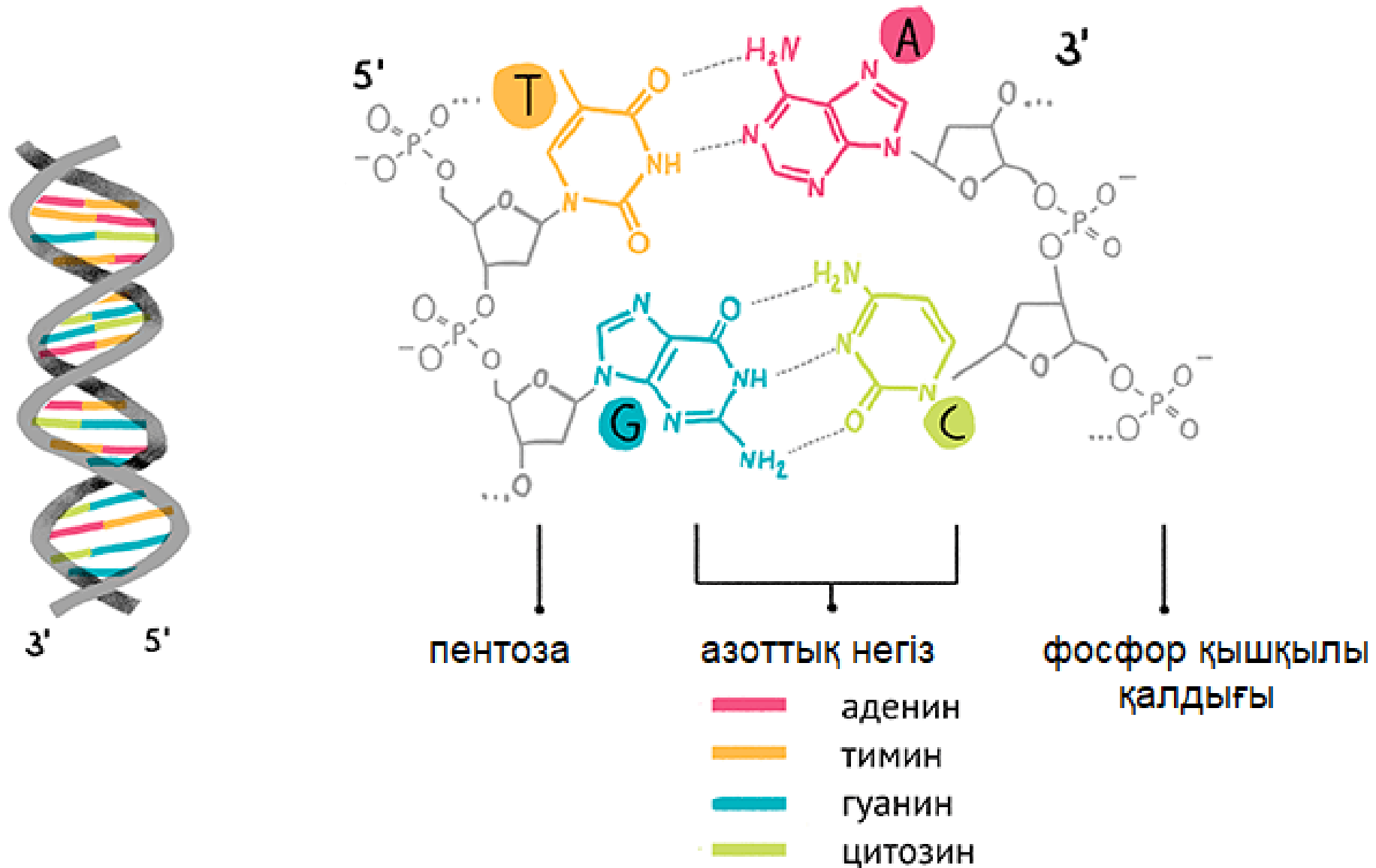
2000 Жапонияда стандартты ПТР -ға балама ретінде ілгек түзумен жүретін изотермиялық амплификациялау әдісі (LAMP) ұсынылды.

2004 New England Biolabs (NEB) қызметкерлері Helicase-тәуелді күшейту технологиясын жасады.

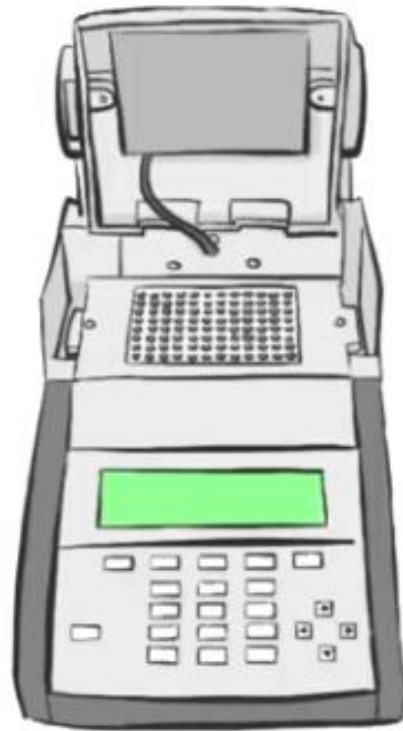
2006 TwistDX LTD британдық ғалымдары изотермиялық рекомбиназамен полимеразалық амплификация әдісін жасады.

2011 жылы BioRad тамшылы цифрлық ПТР технологиясын коммерцияландыруды бастады.

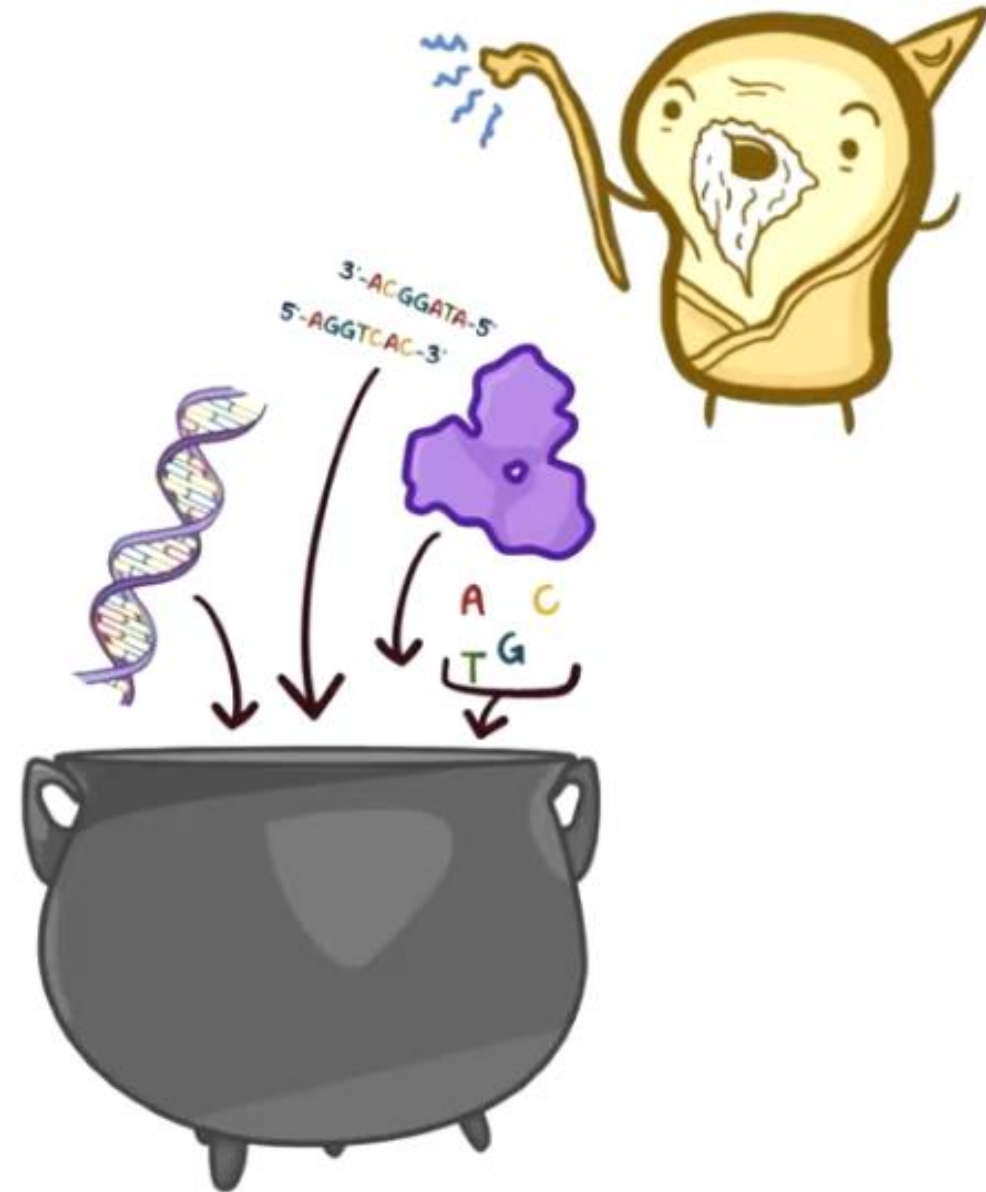
ПТР әдісінің принципі



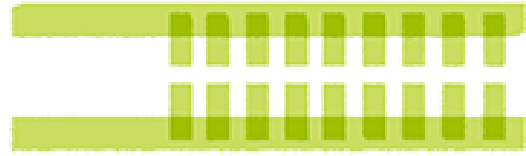
ПТР- ДНК репликациясына негізделген



**АМПЛИФИКАТОР
ТЕРМОЦИКЛЕР**



Реакция компоненттері



ДНК



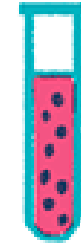
ПРАЙМЕРЫ



НУКЛЕОТИДЫ



ДНК-ПОЛИМЕРАЗА



РАСТВОР

ПТР-ды ең қарапайым жағдайда жасау үшін келесі компоненттер керек болады:

- Амплификация жасалатын ДНК фрагменті бар ДНК-матрица
- Талап етілетін ДНК фрагменті әр түрлі тізбектерінің ұштарына комплиментарлы ген спецификалық екі праймер
- Жоғары температураға тұрақты ДНК-полимераза - ДНК полимеризациясын катализдейтін фермент. ПТР-ді жүзеге асыру үшін қажетті ДНК-полимераза жоғары температурада да өзінің активтілігін сақтап қалуы керек. ПТР-ге қажетті ДНК полимеразалар термофильді бактериялардан бөлініп алынған: *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) және т.б.
- Дезоксирибонуклеозидтрифосфаттар (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Буфер. Қажетті рН-ты ұстап тұру үшін әр түрлі иондары бар ерітінді. Полимеразаның қызметіне қажетті Mg^{2+} иондары және реакция компоненттерінің пробирка қабырғаларына жабысуын болдырмау үшін BSA қосылған ионды емес жуғыш зат Tween-20. ГЦ-ге бай матрица қолданған жағдайда көбіне DMSO (диметилсульфоксид) күшейткіші қосылады, бұл матрицаның комплементарлы аймақтары арасындағы қажетсіз өзара әрекеттесуді болдырмайды.



Барлық компоненттер ПТР үшін арнайы түтіктерде ионсыздандырылған судың қажетті көлемінде араластырылады және амплификаторға (немесе ПТР циклерге) орналастырылады.



ПТР үшін шығын материалдары мен жабдықтар.
а - ПТР пробирка.
b - Bio-Rad шығарған C1000 Touch™ амплификаторы.

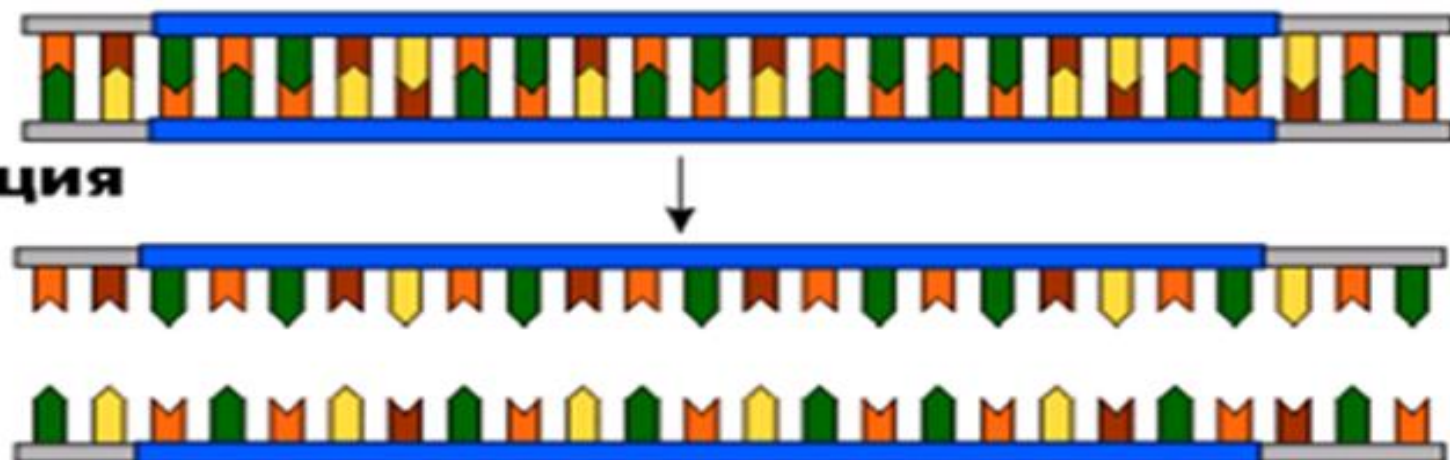
Реакция кезеңдері

ПТР мақсаты - қатаң белгіленген ұзындықтағы (әдетте 2-3 мың жұп негізден аспайтын, ДНҚ) бірдей екі жіпшелі ДНҚ фрагменттерінің жиынтығын алу. Ол үшін 20-30 реакция циклы жүргізіледі. Әр цикл үш кезеңнен тұрады

- **Денатурация.** ДНҚ тізбектері ажырау үшін 0,5-2 мин. қос тізбекті ДНҚ матрицаны $94-96^{\circ} \text{C}$ дейін қыздырады. Бұл кезеңді денатурация деп атайды, өйткені ДНҚ тізбектері арасындағы сутектік байланыстар үзіледі.
- **Жасыту.** Бұл кезеңде праймерлер ДНҚ матрицаның босатылған жіпшелеріне көшірілетін аймақтың әр түрлі жағынан бір-біріне $3'$ ұштарымен қаратылып бекітіледі. Праймерлер тек қажетті учаскелерге комплементарлы жасытылуы үшін оларды жобалау кезінде балқу температурасы (T_m) сияқты маңызды көрсеткішті ескеру қажет. Бұл температурада праймерлердің жартысы мақсатты ДНҚ аймағына бекітіледі. Жасыту T_m - ден $1-5^{\circ} \text{C}$ төмен, бірақ полимеразалық жұмыс үшін оңтайлы температурадан жоғары емес температурада, яғни $40-72^{\circ} \text{C}$ аралығында жүргізіледі. Праймер Tag-полимераза үшін бастаушы қызметін атқарады.
- **Элонгация.** Синтез жүргізу үшін температураны 72°C дейін жоғарылатады. Реакция ұзақтығы 1-2 мин ДНҚ синтезі $5' \rightarrow 3'$ бағытта жүреді.

1 - кезең

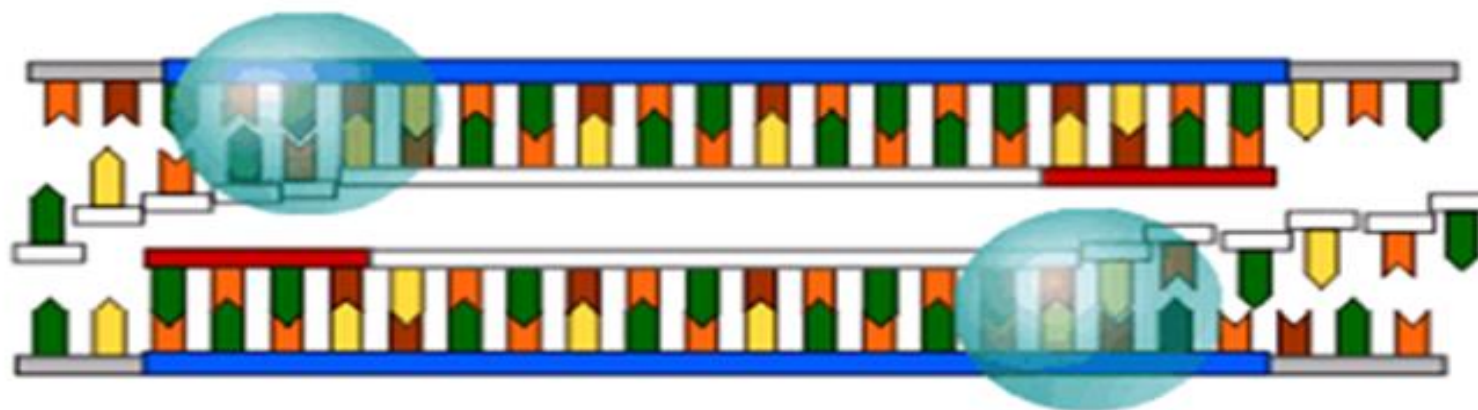
Денатурация
93-95°C



2 - кезең
Праймерлерді
күйдіру
50-65°C

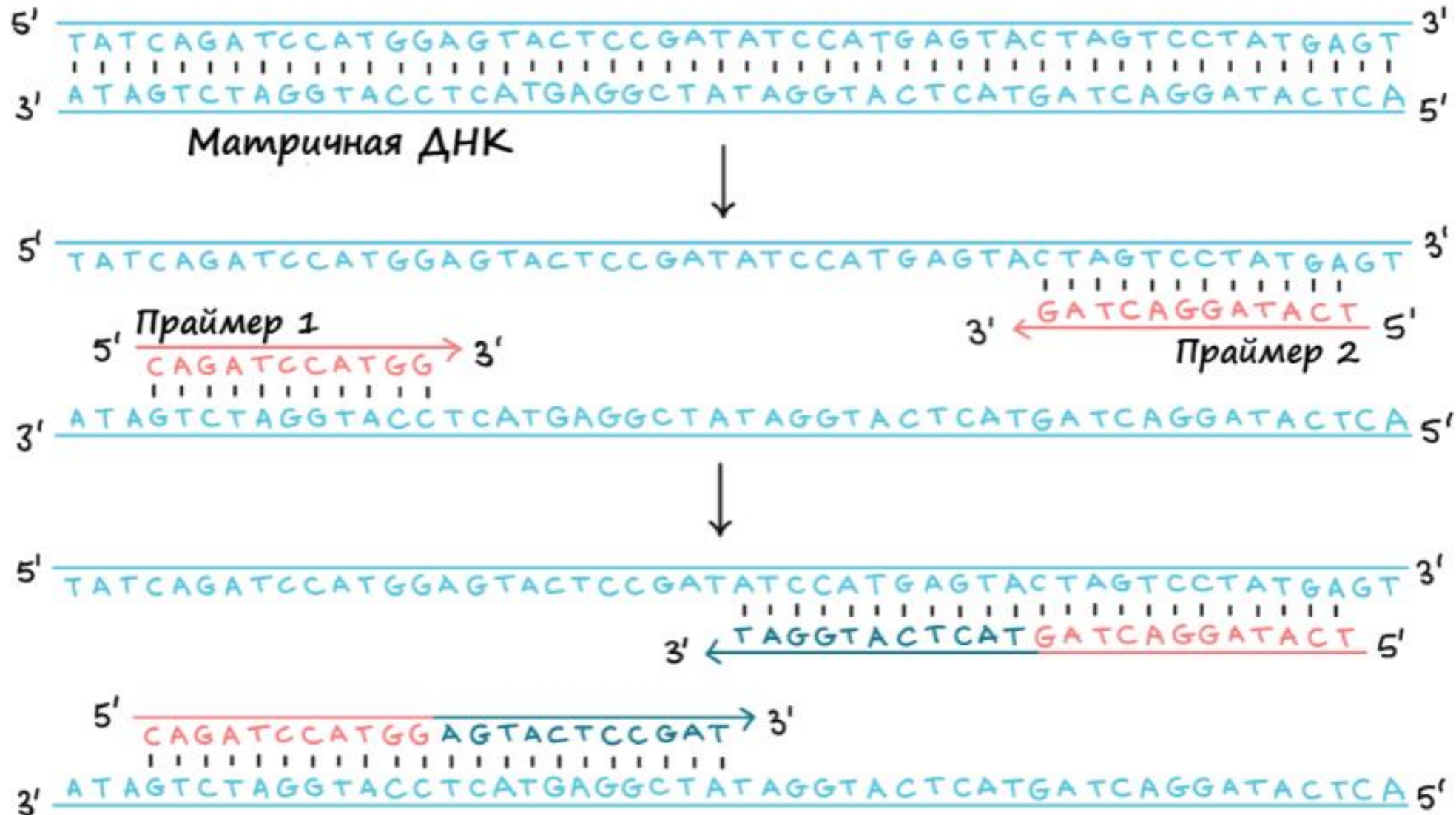


3 - кезең
ДНҚ тізбегін
салып бітіру
72°C



Праймерлер

Праймерлер - ДНК фрагменттерінің басталу және аяқталу аймағына сәйкес келетін ұзындығы 18-30 нуклеотидті ДНК-ның қысқа тізбектері.



Праймерлер

Негізгі параметрлері:

Балқу температурасы t_m : 58-65°C. Праймердің балқу температурасы ПТР кезінде маңызды фактор болып табылады. Балқу температурасын дәл есептеу керек, ал жасыту температурасы балқу температурасынан 5 °C төмен болуы керек. Тым жоғары немесе тым төмен температура ДНҚ полимераза белсенділігінің төмендеуіне әкеледі.

праймер t_m айырмашылықтар 5 ° C аспау керек

Праймер ұзындығы: 18-30 н.ж. Егер ұзындығы тым қысқа немесе тым ұзын болса, праймерлер ДНҚ тізбегіне байланбайды. Ұзындығы өте қысқа праймерлер ДНҚ тізбегінің әртүрлі орындарында спецификалық емес байланыса алады.

$$T_m = 77,1 + 11,7 \lg[K^+] + \frac{41(G + C) - 528}{L} - 0,75[\%DMSO]$$

Праймердегі гуанин мен цитозин G / C құрамы: ~ 40-60%. Праймерлердің 3 'соңында минималды G / C (соңғы бес нуклеотидтің үшеуінен көп емес) гуанин немесе цитозин болуы керек, себебі матрицалық молекуламен үш сутегі байланысын қалыптастырады, бұл ретте гибридтеу тұрақты болады

Екінші құрылым: минимум, олигонуклеотидтер құрылымында шпилька болмауы керек (бір -біріне комплементарлы аймақтар)

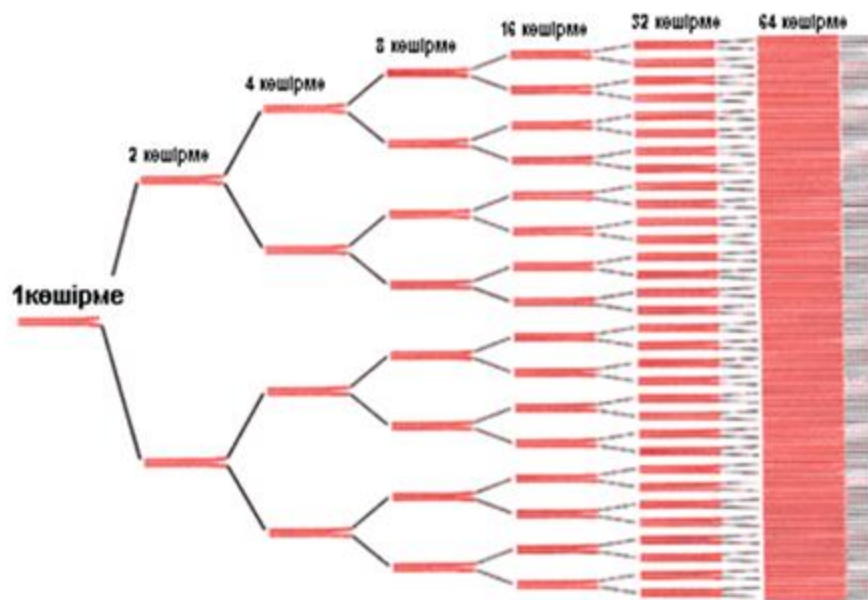
Димерлер: жоқ.

.

ПТР

1 цикл - 5-10 мин

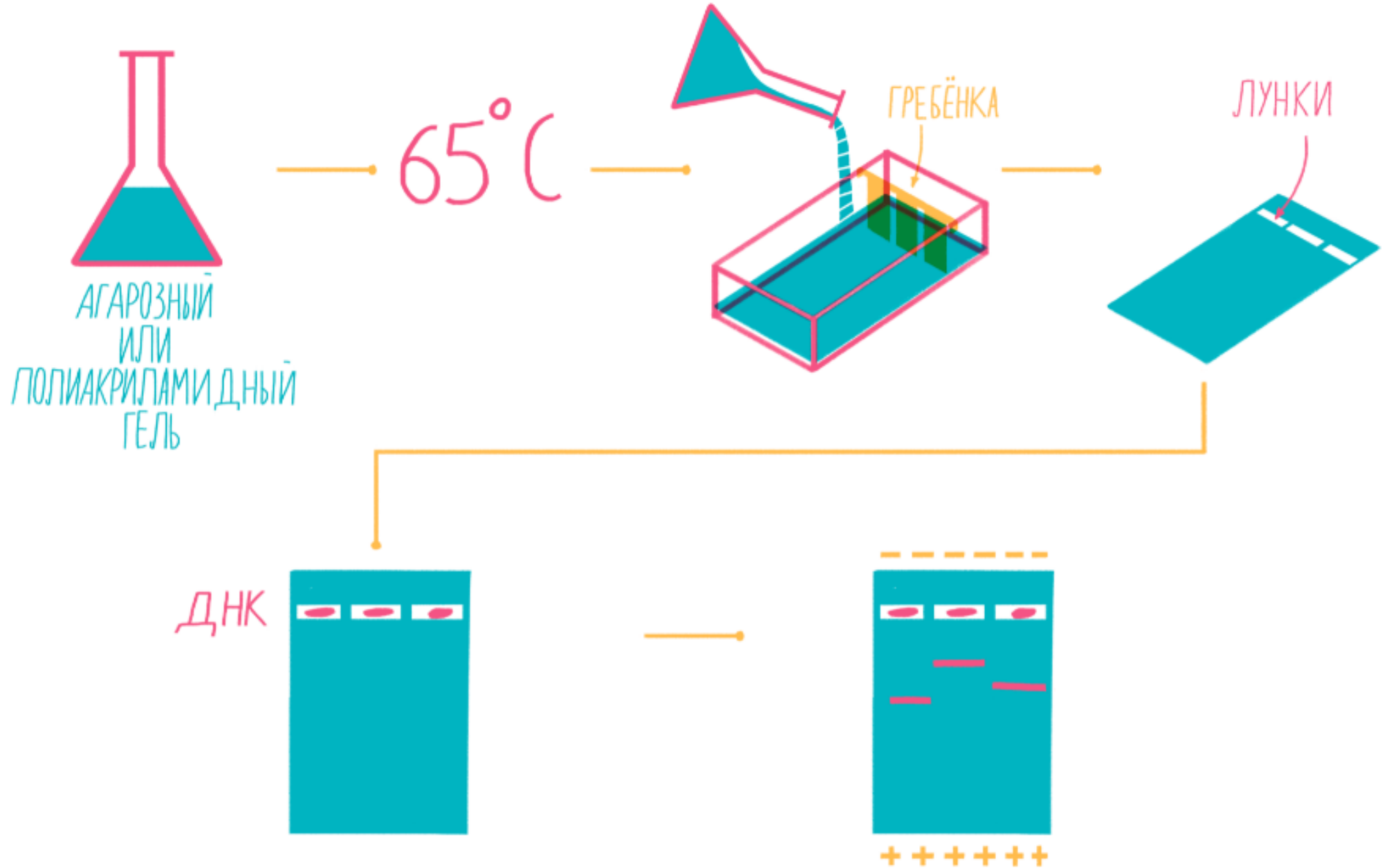
нәтижесінде ДНҚ екі еселенеді



2 → 4 → 8 → 16 → 32 → 64 → 128

40 ЦИКЛ : 2^{40} - 1 099 511 627 776

ПТР өнімдерін визуализациялау



ПТР-дің модификациялары

- Бір-біріне кіргізілген (nested PCR)
- Кері транскрипциялық ПТР (RT PCR)
- Сандық ПТР
- Ұзын фрагментті ПТР (Long range PCR)
- Инвертирлік (Inverse PCR), Асимметриялық ПТР (asymmetric PCR),
- Кездейсоқ амплификацияланған полиморфтық ДНҚ-лар (RAPDs)
- In situ ПТР (Primis) ISH әдісі секілді
- Мультикомплекттік ПТР (multi PCR)
- Метил-спецификалық ПТР

ПТР түрлері

- РПА (рекомбиназалық полимеразды амплификация) термциклерсіз 15 минут ішінде ДНҚ / РНҚ амплификациялау қажет болған жағдайда қолданылады (изотермиялық реакция) Кірістірілген ПТР (nested PCR)- реакцияның қосалқы өнімдерінің санын азайту үшін қолданылады. Екі жұп праймер қолданылады және қатарынан екі реакция жүргізіледі. Праймерлердің екінші жұбы бірінші реакция өнімі ішіндегі ДНҚ фрагментін амплификациялайды.
- Кері транскрипциялы ПТР (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) - РНҚ кітапханасынан белгілі тізбекті амплификациялау, оқшаулау немесе анықтау үшін қолданылады. Кәдімгі ПТР-ге дейін mRNA үлгісінде кері транскриптазаның көмегімен ДНҚ молекуласы синтезделеді және ПТР үшін матрица ретінде пайдаланылатын бір тізбекті кДНҚ алынады. Бұл әдіс көбінесе бұл гендердің қайда және қашан экспрессияланатынын анықтау үшін қолданылады.
- Сандық ПТР (quantitative PCR, Q-PCR) немесе нақты уақыт режимінде полимеразды тізбекті реакция, әрбір реакция циклінде нақты ПТР өнімінің мөлшерін өлшеуді тікелей бақылау үшін қолданылады. Бұл әдіс флуоресцентті таңбаланған ДНҚ зондтарын немесе SYBR Green интеркаляцияланатын бояғышының (немесе оның аналогтарының) реакция өнімінің жинақталуын талдау үшін қолданады.
- Сатылы ПТР (touchdown PCR) - бұл әдісті қолдана отырып, праймерді бейспецификалық байланыстыру әсері азаяды. Бірінші циклдар оңтайлы күйдіру температурасынан жоғары температурада жүргізіледі, содан кейін әрбір бірнеше циклде күйдіру температурасы біртіндеп оптимумға дейін төмендейді. Бұл праймердің бүкіл ұзындығы бойынша қосымша тізбекке будандастырылуы үшін жасалады; ал жасытудың оңтайлы температурасында праймер комплементарлы жіпке гибридизацияланады.
- Цифрлық ПТР (Digital polymerase chain reaction, digital PCR, dPCR, dePCR) - бұл ПТР әдісінің заманауи модификациясы. Дәстүрлі әдіс бір үлгіде бір реакцияны жүргізуді қамтиды, dPCR көмегімен сынама көптеген шағын көлемдерге бөлінеді және әр реакция жеке жүреді. Бұл тіпті сирек кездесетін мутацияларды анықтауға және нуклеин қышқылының нақты мөлшерін анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдіс гендер тізбегіндегі вариацияларды (көшірме санының варианттарын) зерттеу үшін пайдалы. Әдетте жаңа буын секвенирлеу әдісі үшін үлгілерді амплификациялау үшін қолданылады. Droplet Digital PCR - бұл чиптің ұңғымасына түсетін көптеген ұсақ тамшыларға үлгіні шашырату әдісі.

Сатылы ПТР (Touchdown PCR (англ.)) —Алғашқы циклдар оңтайлы қыздыру температурасынан жоғары температурада жүзеге асырылады, содан кейін әрбір бірнеше циклде жану температурасы оңтайлы түрде біртіндеп төмендейді. Бұл праймердің толық ұзындығы бойынша толықтыратын тізбекті гибридизациялауды қамтамасыз ету үшін жасалады, ал оңтайлы тозаңдату температурасы кезінде праймер ішінара қосалқы тізбемен гибридталады. Геномдық ДНҚ бойынша праймердің ішінара гибридизациясы, егер праймерге байланыстыратын көптеген учаскелер болса, арнайы емес күшейтуге әкеледі. Көптеген жағдайларда ПТР алғашқы он циклін 72-75 ° С температурада жүргізуге болады, содан кейін оңтайлы, мысалы, 60-65 ° С дейін төмендейді.

•**Молекулалық колония әдісі** (ПТР гелінде, Ағылшын колониясы - ПТР колониясы) - ПЦР барлық компоненттерімен акриламидті гельді полимерлеу және PCR жүргізу. Талдаған ДНҚ бар нүктелерде молекулалық колониялардың қалыптасуымен күшейту жүреді.

•**cDNA ұштарының жылдам күшейткішімен PCR** (туғаннан кейінгі cDNA ұштарының жылдам өрнектелуі, RACE-PCR).

•**Ұзын үзінділердің ПТР (Long-range PCR)** - ұзартылған ДНҚ аймақтарын амплификациялауға арналған ПТР түрлендіруі (10 мың және одан да көп негіздер). Екі полимераза қоспасын қолданыңыз, олардың біреуі - *Tag* полимераза (ДНҚ-ның ұзын тізбегін синтездеуге қабілетті), екіншісі - 3'-5'-экзонуклеазы белсенділігі бар *Pfu* полимераза. Екінші полимераза бірінші полимеразамен енгізілген қателерді түзету үшін қажет. *Tag* -полимераза ДНҚ синтезін тоқтатады, егер қосымша нуклеотид қосылса. Бұл қосымша нуклеотид *Pfu* полимеразасымен жойылады. Полимераза қоспасы 50: 1 қатынасында немесе 100: 1-ден аз болса, онда *Tag*-полимеразы 25-100 есе көп қабылданады

- **РПА** (Recombinase Polymerase Amplification) - ДТС / RNA күшейту 15 минут ішінде жылу циклді (изотермиялық реакциясыз) қажет болған жерде пайдаланылады [18] [19]
- **Кірістірілген ПТР** (Nested PCR (Eng.)) - реакцияның қосалқы өнімдерінің санын азайту үшін қолданылады. Екі жұп праймерлер қолданылады және екі дәйекті реакция орындалады. Алғашқы реакция өнімі ішінде праймерлердің екінші жұбы ДНҚ аймағын күшейтеді.
- **Инвертелген ПТР** (Кері ПТР (Eng.)) - қажетті тізбектегі шағын бөлік белгілі болған жағдайда қолданылады. Бұл әдіс, әсіресе, ДНҚ-ның геномға енгізілгеннен кейін көрші дәйектілікті анықтау қажет болған кезде пайдалы. Инвертелген ПТР-ны енгізу үшін шектеулермен ДНҚ кесу сериясы жүргізіледі, одан кейін фрагменттерді жалғау (лигатура) орындалады. Нәтижесінде белгілі фрагмент белгісіз аймақтың екі жағында да пайда болады, содан соң ПТР әдеттегідей орындалуы мүмкін.
- **Кері транскрипциясы бар ПТР** (Reverse Transcription PCR, RT-PCR (ағылшын)) - RNA кітапханасынан белгілі бір тізбекті күшейту, оқшаулау немесе анықтау үшін қолданылады. Дәстүрлі ПТР алдында бір ретті DNA молекуласы рРТҚ арқылы mRNA үлгісінде синтезделеді және ПТР үлгісі ретінде пайдаланылатын бір реттік қапталған cDNA алынады. Бұл әдіс осы гендерді қайда және қашан көрсетілетінін жиі анықтайды.
- **Асимметриялық ПТР** (Ағылшын асимметриялық ПТР) - бастапқы ДНҚ тізбегінің біреуін күшейту қажет болған кезде жүзеге асырылады. Кейбір дәйекті және гибридизациялық талдауларда қолданылады. ПТР кәдімгідей жүзеге асырылады, тек бір праймердің үлкен артықшылығы қабылданады. Әр түрлі шоғырлануы бар праймерлерді пайдаланатын *Exponential-PCR* (LATE-PCR) және жоғары концентрациялы праймер жоғары концентрациялы праймерден жоғары (балқу нүктесі) таңдалады. ПЦР жоғары қыздыру температурасында жүзеге асырылады, осылайша реакцияның барлық циклдарында тиімділігін сақтауға болады.

•**Раппе** (Полиморфтық ДНҚ-ны Кездейсоқ амплификациялау), полиморфтық ДНҚ-ны кездейсоқ амплификациялай отырып, ПТР генетикалық жүйедегі ұқсас ағзаларды, мысалы, өсірілетін өсімдіктердің, ит тұқымдарының немесе тығыз байланысты микроорганизмдердің әртүрлі сорттарын ажырату қажет болғанда қолданылады. Бұл әдіс бойынша әдетте бір кішкентай праймер (шамамен 10 б.п.) қолданылады. Бұл праймер зерттелген ағзалардың кездейсоқ ДНҚ аймақтарына ішінара қосымша болады. Шартты таңдау арқылы (праймер ұзындығы, оның құрамы, температурасы және т.б.) екі организм үшін ПТР үлгісінде қанағаттанарлық айырмашылыққа қол жеткізуге болады.

•**Топқа тән ПТР** (топқа тән ПТР) - осы тізбектер бойынша консервативті праймерлерді қолданатын бір немесе бірнеше түрлердің ішінде тиісті тізбектерге арналған ПТР. Мысалы, рибосомалық гендер үшін әмбебап праймерлерді таңдау **18с** және **26с** түрге тән аралық кеңістікті күшейту үшін: ген тізбегі **18с** және **26с** түрлер арасындағы консервативті, сондықтан зерттелген барлық түрлер үшін осы гендер арасындағы ПТР орындалады. Бұл әдіске керісінше **бірегей PCR** (ең бірегей ПТР), онда міндет барлық байланыстылардың тек бірізділігін күшейту үшін праймерлерді таңдау болып табылады.

•**ПТР ыстық бастау арқылы** (Ағылшын ПТР) - ДНҚ полимеразы көмегімен ПТР модификациясы, онда полимеразды белсенділік антиденелермен немесе антиденелерді имитациялайтын Affiody түріндегі кішкентай молекулалармен, яғни ПТР-де бірінші денатурациядан бұрын реакцияны орнатқан кезде, бөлме температурасында блокталады. Әдетте, бірінші денатурация 95°C кезінде 10 минутта жүргізіледі.

•**Виртуалды PCR** геномның, хромосоманың, дөңгелек ДНҚ-ның немесе ДНҚ-ның әлеуетті күшейтуін болжау үшін праймерлік тізбектердің тізбесін (немесе ДНҚ-зондтарын) пайдалана отырып, теориялық полимеразалық тізбекті реакцияны компьютерлік талдаудың математикалық әдісі (силикс PCR, сандық PCR, электрондық PCR, e-PCR) кез-келген ДНҚ бөлімі.

Real Time PCR

Нақты уақыттағы ПТР әдісі өнімнің жинақталу процесін бақылауға мүмкіндік беретін флуоресценция сигналын детектеуге негізделген. ПТР (Realtime PCR) әдісінің мәні электрофорезсіз арнайы құрылғы көмегімен амплификация өнімдерінің жинақталуын зерттеу болып табылады. Амплификация өнімдерінің жинақталу кинетикасы матрицаның алғашқы санымен байланысты болғандықтан, бұл оның санын дәлме-дәл бағалауға мүмкіндік береді. Классикалық ПТР қарағанда бұл әдістің ерекшелігі зерттелетін өнімдерде ДНҚ/РНҚ нақты сандық анықтауға болатындығы және электрофорез сатысының болмауы, ПТР зертханасында жұмыс жасауға қойылатын ерекше қатаң талаптар және алынған нәтижелерді автоматты түрде тіркеу және түсіндірілуі. Электрофорез сатысының болмауының артықшылығы, жалған оң көрсеткіш санын азайтуға мүмкіндік береді.

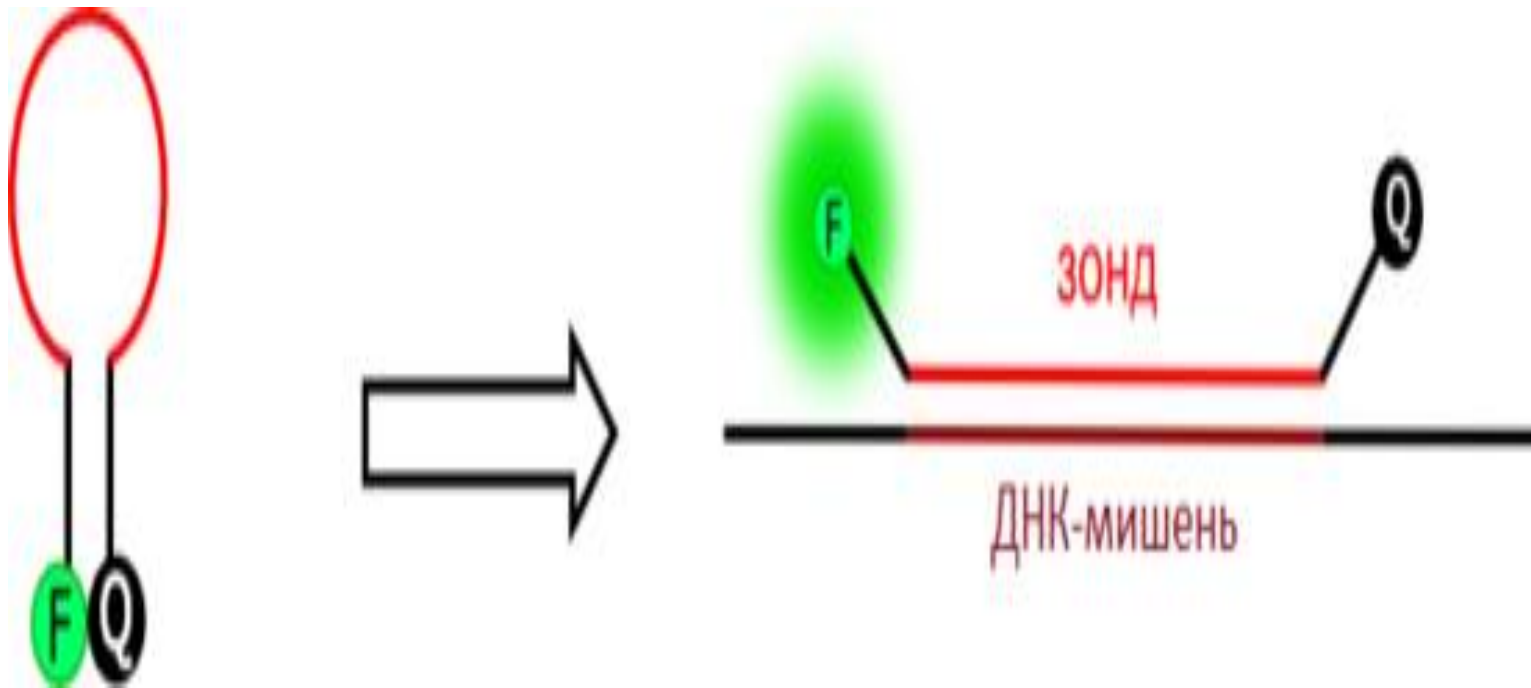
Зондтардың әртүрлілігі

Екі еселенген ДНҚ-ны таңбалау. ДНҚ-мен спецификалық емес байланысатын химиялық агенттерді қолдану

- ✓ Бұл жағдайда затбелгі (метка) ДНҚ қос спиральына араласуға қабілетті химиялық қосылыс болып табылады. Спецификалық емес бояғыштар ДНҚ-ның бір тізбегімен емес, қос тізбегімен байланысады. Мұндай зонд, РСР өнімдерімен өзара әрекеттескенде конформациясын өзгертіп, флуороформға айналады. Детекция әр циклдың соңында денатурация басталмай тұрып өткізіледі. Осындай бояуларға мысал ретінде кеңінен қолданылатын SibrGreen1 болуы мүмкін. Реакциялық қоспаға SibrGreen1 бояғышын қосқанда ДНҚ-ның қос тізбегімен байланысып, флуоресцент интенсивтілігі көбейеді. Денатурация процесі кезінде ДНҚ тізбегінен алыстайды және флуоресцент интенсивтілігі азаяды. Полимеризация сатысында бояғыш ПЦР-дің өнімімен қайтадан бірігеді. Полимеризация аяқталғанда бояғыш нуклеин қышқылымен толығымен байланысады. Және бұл флуоресцент интенсивтілігінің тез көбеюіне әкеледі.

Элонгация кезіндегі таңбалау. Флуоресцентті зондтарды қолдану

- ✓ 5' және 3' соңына флуорофор мен сөндіргіші тігілген зонд қолданылады. Егер зондтың реттілігі өте ұзақ болмаса, тіпті ДНК-байланыстағы күйде, екі химиялық реактивтер бір-бірімен өзара әрекеттесе алады және флуоресценция шығарылмайды. Элонгация кезінде 5'-3'-экзонуклеазалық белсенділігі бар ДНК полимераза, бір нуклеотидтен зондты мақсатты ДНК-дан ажыратады. Осы процестің нәтижесінде флуорофор да, оның сөндіргіші де ерітіндіге сіңіп бір-біріне жақын тұста табылу ықтималдығы кішкентай болады және флуоресценция қалпына келеді



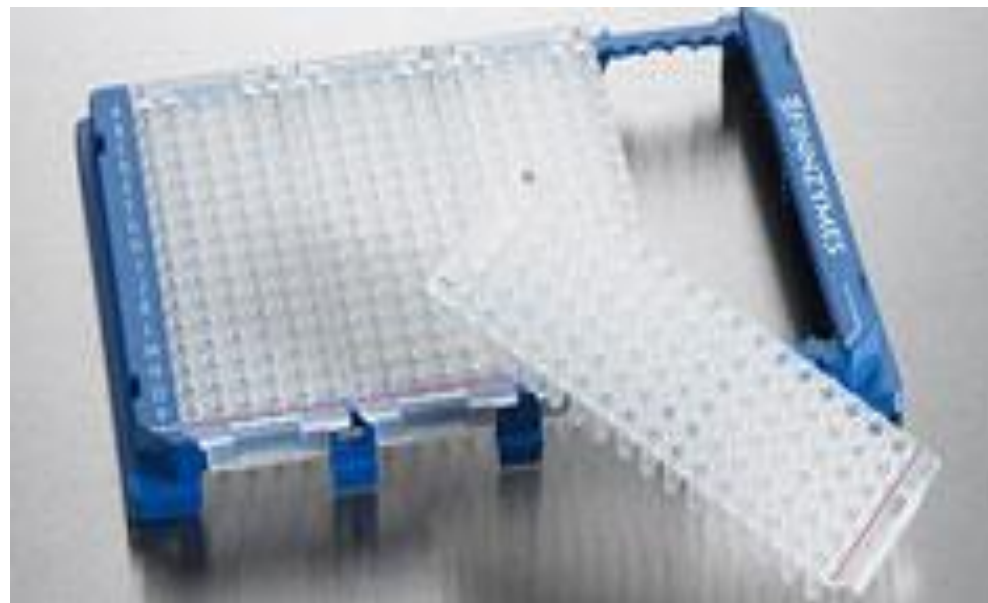
Амплификатор

PCR Real Time – флюориметрмен бірге арнайы амплификаторда жүргізеді. ПТР процесінде амплификация нәтижесі есептеліп шығады. Кеңінен қолданылмайтын себебі – құралдың қымбат тұруы.



- Амплификатор (термоциклер) құралы 0,1 °C дәлдікпен мезгіл мезгіл пробиркаларды салқындатып, қыздырып тұрады. ПТР үшін флуоресценттік детектормен жабдықталған құралдар жасалған. Автоматталған қақпағы және микропланшеттер үшін бөлімдері бар құралдар шығарылады, оларды автоматталған жүйелерге қосуға болады.

- Зерттеу ұзақ уақытты қажет етпейді. Қазіргі жаңа технологияның дамыған кезеңінде қоздырғышты бөліп алу және өсіру, одан нуклеин қышқылын бөліп алу үрдістері толығымен стандартталған және автоматтандырылған. Әдістің автоматизациялығы қолмен жүргізілетін зерттеу кезінде кездесетін мүмкін қателіктерді азайтады. Нәтиже бірнеше сағаттың ішінде алынуы мүмкін.



Кәдімгі ПТР мен нақты уақыттағы ПТР арасындағы айырмашылық неде?

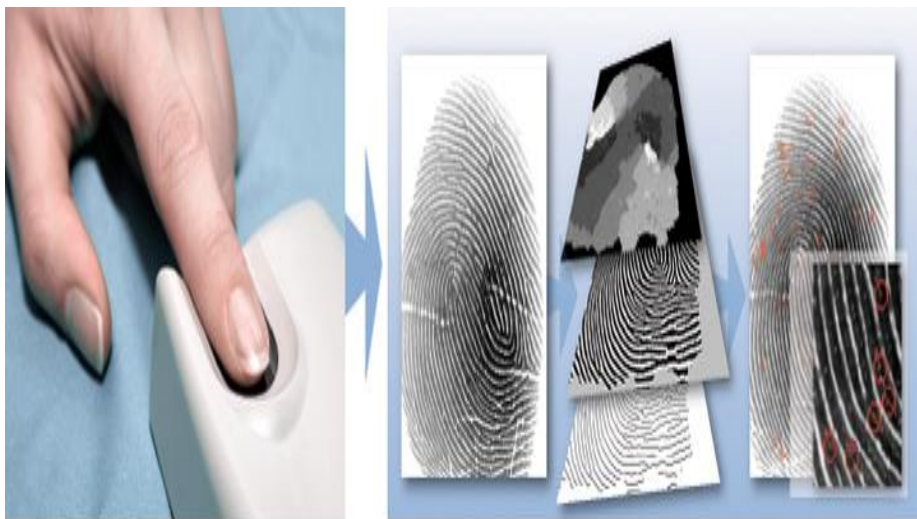
- Кәдімгі ПТР көп уақытты қажет етеді, өйткені күшейтілген ПТР өнімдерін талдау үшін гель электрофорезін қолданады. Керісінше, нақты уақыт режимінде ПТР аз уақытты алады, өйткені реакцияның алғашқы фазаларында күшейтуді анықтай алады.
- Нақты уақыттағы ПТР деректерді ПТР экспоненциалды өсу кезеңінде, ал дәстүрлі ПТР реакцияның соңғы нүктесінде жинайды.
- Кәдімгі ПТР нәтижелері өте дәл болмауы мүмкін, бірақ нақты уақыттағы ПТР нәтижелері өте дәл.
- Нақты уақыттағы ПТР кәдімгі PCR-ге қарағанда сезімтал.
- Кәдімгі ПТР ажыратымдылығы өте төмен, ал нақты уақыттағы ПТР жоғары ажыратымдылыққа байланысты өте аз өзгерістерді анықтай алады.
- Кәдімгі ПТР-ді анықтауда қысқа динамикалық диапазон бар, ал нақты уақытта ПТР-де кең динамикалық диапазон бар.
- Кәдімгі ПТР айырмашылығы, нақты уақыт режимінде ПТР-де автоматтандырылған анықтау әдістері бар.
- Кәдімгі ПТР нақты уақыттағы ПТР-ге қарағанда өте күрделі және еңбек сыйымдылығы жоғары.
- Нақты уақыттағы ПТР-ге қарағанда, қарапайым ПТР өлі және тірі бактерияларды ажырата алмайды.

Қолданылуы:

ПТР биологиялық практикада ДНҚ-ны амплификациялаудан басқа ПТР нуклеин қышқылдарына әр түрлі әсер етуге мүмкіндік береді (мутация, ДНҚ фрагменттерін тұтастыру, гендерді клондау, жаңа гендерді бөліп шығару).

ПТР медициналық практикада:

- ПТР диагностика жұқпалы аурулар қоздырғышын басқа әдістермен (иммунологиялық, бактериологиялық, микроскопиялық) анықтау мүмкін болмаған жағдайда қолданылады.
- Қазіргі таңда ПТР-ны: археология, медициналық практикада әр түрлі тұқым қуалау, жұқпалы ауруларда, сот медициналық сараптамасында, генетикада әкесін анықтауда қолданады



Зерттеу материалдары

Зерттеуде әдетте әр түрлі биоматериалдар қолданылады:

- Несеп. Бұл талдау ерлердегі несеп - жыныс жолдарының инфекциясын және әйелдерде зәр шығару жолдарының инфекцияларын анықтай алады.
- Сілекей. Ол туберкулезді және басқа өкпе ауруларын анықтау үшін қолданылады.
- Биологиялық сұйықтықтар - амниотикалық сұйықтық, жұлын, буын сұйықтығы және т.б.
- Шырышты қабаттардан мысалы мұрын немесе жұтқыншақтан алынған сынықтар. Ол негізінен жыныстық жолмен берілетін ауруларды, сондай -ақ коронавирусты анықтау үшін қолданылады.
- Қан, сарысу, плазма. Олар CMV (цитомегаловирус), ВИЧ, В, С, D, G гепатиттерін, герпесті және адам генін зерттеу үшін қолданылады.
- Биоптаттар. Олар биопсиямен алынады.

ПТР қолдану

- 1.Клиникалық медицина.
 - Бактериялық және вирустық сипаттағы инфекциялық агенттердің болуына клиникалық үлгілерді талдау: АИТВ, гепатит және герпес вирустары, хламидиоз, *H. pylori*, микобактерия туберкулезі және т.б. Белгілі бір гендердің мутациясымен анықталатын лейкемия, лимфома және неоплазияның басқа түрлерінің диагностикасы. Терапиядан кейін ісік ауруларын бақылау. Жеке гендердің мутациясынан туындайтын тұқым қуалайтын аурулардың диагностикасы: орақ жасушалы анемия, амиотрофиялық бүйірлік склероз, фенилкетонурия, муковисцидоз, бұлшықет дистрофиясы және т.б.
- 2. Дараланған медицина.
 - Барлық дәрі -дәрмектер барлық адамдарға бірдей әсер етпейді. Бір зат әр науқаста метаболикалық процестердің ерекшеліктеріне байланысты бір науқасқа көмектеседі және екіншісіне уытты немесе аллергиялық болуы мүмкін. Сондықтан жеке таңдалған препараттардың жеке таңдалған дозалары ең тиімді болып табылады. Метаболикалық айырмашылықтар әдетте генетикалық түрде анықталады. Науқасты осындай ерекшеліктердің өзіндік «генетикалық паспортына» айналдыра отырып, оның негізінде дұрыс емдеуді таңдауға болады. Орган трансплантациясы алдында тіндерді теру. Ұрықтанар алдында жеке сперматозоидтарда хромосомалық кроссинговер, делеция, инсерция, транслокацияны және инверсияны анықтау.

2. Сот сараптамасы және сот медицинасы

Қылмыскерлер мен құрбандарды қылмыс орнынан қан, шаш және ұрықтан алынған ДНҚ арқылы анықтау. Әкелік және басқа туыстық қатынастарды орнату. Түсініксіз өлімнің себептерін зерттеу («молекулалық аутопсия») - морфологиялық және физиологиялық мәліметтермен ұштастыра

3. Гендік инженерия

ДНҚ клондау арқылы гендердің қызметтерін, олардың өзара әрекеттесуін, синтетикалық ДНҚ -ны, генетикалық түрлендірілген организмдерді және т.б. жасайды ПТР негізделген ДНҚ сиквенсі, флуоресцентті заттаңбамен немесе радиоактивті изотоппен белгіленген дидеоксинуклеотид синтезделген тізбекке қосылады, ол синтезді тоқтатады және гелде бөлінгеннен кейін нақты нуклеотидтердің орнын анықтауға мүмкіндік береді. ПТР көмегімен ДНҚ өзгеруіне негізделген мутагенез. Блоттаудың әр түріне будандастыру зондтарын құру. Әр түрлі жағдайда ұлпалар мен жеке жасушаларда гендердің экспрессиясын талдау.

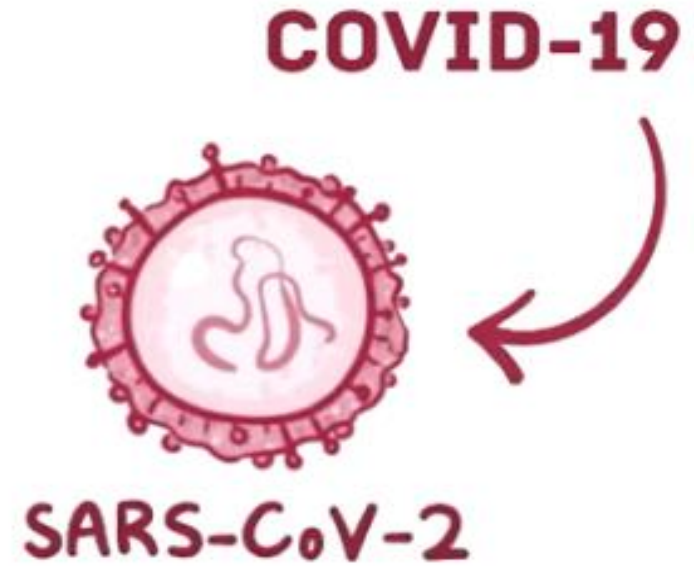
4. Антропология, палеонтология

Эволюциялық биологияда түрлер арасындағы байланысты зерттеу. Адамдардың қоныс аударуы мен әр түрлі этностар, ұлттар мен нәсілдер арасындағы байланысты зерттеу. Жойылған жануарлар мен адамның ата - бабаларын зерттеу. Тарихи тұлғалардың ДНҚ зерттеулері, мысалы, Николай II, ағылшын королі Ричард III, Мысыр перғауындары, т.б.

5. Ауыл шаруашылығы

Өсімдіктер мен жануарлардың қоздырғыштарын (бактериялар, саңырауқұлақтар, вирустар) анықтау. Үй және ауыл шаруашылығы жануарларының тұқым қуалайтын ауруларының диагностикасы. Азық - түлік өнімдерінің генетикалық модификациясына талдау. Көзбен жынысын анықтау қиын жануарларда X хромосомасын анықтау: мысалы, балықтар, бауырымен жорғалаушылар, попугайлар.

КТ-ПТР әдісімен Covid-19 анықтау



ПТР әдісінің маңызды артықшылықтарының бірі - жоғары сезімталдық - 95-ден 100% дейін. Алайда, бұл жеңілдіктер келесі шарттардың сақталуы қажет:

1. биологиялық материалдарды дұрыс жинау, тасымалдау,
2. стерильді, бір реттік құралдар, арнайы зертханалар мен білікті қызметкерлердің болуы,
3. анализ кезінде әдістер мен нұсқауларға қатаң қарау

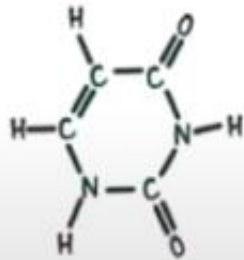
Кері транскрипциялы ПТР - КТ-ПТР



РНК-ВИРУС

SARS-CoV-2

РНК



УРАЦИЛ

* комплементарлы ДНҚ тізбегі

РНК: 3'-AAGUCCAGU-5'

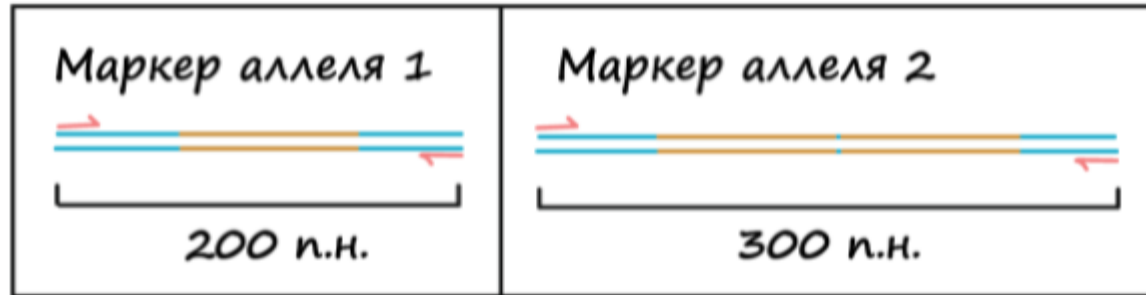
ДНҚ: 5'-TTCAAGGTC A-3'

Кері транскрипция ПТР әдісі - КТ-ПТР



Праймерлер SARS-CoV-2 вирусының нақты гендерінің ашық оқу шеңберлеріне: ORF1ab, нуклеокапсидті ақуыз гені (N) және E гені ұштарына комплементарлы.

Мысалы: сот сараптамасындағы ПТР



ДНК какого подозреваемого совпадает с ДНК, полученного с места преступления?

Выберите 1 ответ:

- Подозреваемый 1
- Подозреваемый 2
- Подозреваемый 3
- Ни один из подозреваемых

