

# ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

Дмитрий Сергеевич Иванов  
Научно-производственная фирма «ДНК-Технология»

Современной медициной разработаны подходы к лечению таких социально значимых заболеваний, как гепатит С и ВИЧ, основанные на применении ряда дорогостоящих фармакологических средств. Для контроля за проводимой терапией, оценки ее эффективности необходимы методы, позволяющие точно оценить количество вирусных частиц в крови (вирусная нагрузка). Наиболее удобным, а часто и единственным способом, для такой оценки является так называемый метод ПЦР в реальном времени (Real-time ПЦР). Он позволяет проводить количественную оценку содержания любых патогенов в клинических образцах, а также содержание генно-модифицированных источников (ГМИ) в пище, что является крайне важным, так как вопрос о безвредности таких продуктов остается открытым.

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ В ПЦР-ДИАГНОСТИКЕ

За последние несколько лет метод ПЦР-диагностики и его модификации стали занимать одно из ведущих мест в современной лабораторной практике. Метод ПЦР (метод полимеразной цепной реакции) характеризуется целым рядом уникальных свойств, среди которых надо отметить высокую чувствительность, специфичность, универсальность, быстроту проведения и возможность проведения количественного анализа.

Очевидно, что системы детекции, основанные на использовании флуоресцентных методов, обладают целым рядом преимуществ по сравнению с электрофоретическими и гибридизационными методами анализа, и поэтому они стремительно занимают все более значимое место в области клинической лабораторной диагностики.

Существует несколько модификаций метода флуоресцентной детекции продуктов амплификации. Наиболее эффективными являются методы с использованием гибридизационных олигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора и гасителя флуоресценции. Использование зондов приводит к возрастанию специфичности реакции, так как в этом случае необходимо не только наличие участков, комплементарных праймерам, но и участка, комплементарного используемому зонду.

Зонды добавляют в реакционную смесь вместе с праймерами и остальными компонентами реакции. Поскольку в структуре зонда флуорофор и гаситель находятся в непосредственной близости друг от друга, то перед началом реакции флуоресценция отсутствует. В процессе амплификации, на стадии элонгации, фермент Taq-полимеразы разрушает зонд благодаря своей 5'-экзонуклеазной активности. При этом флуорофор оказывается пространственно отделен от гасителя и становится способным к эффективной флуоресценции. При этом количество разрушенных зондов (а следовательно, и уровень флуоресценции) оказывается пропорциональным количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР.

Измерение уровня флуоресценции может проводиться либо по окончании реакции (как это происходит в хорошо себя зарекомендовавшей системе FLASH), либо по время проведения реакции амплификации (собственно, это и есть real-time ПЦР). Надо отметить, что любые методы детекции результатов амплификации после окончания реакции не позволяют проводить количественный анализ. Связано это с тем, что количество продукта, образовавшегося в процессе реакции, зависит не только от количества молекул ДНК-мишени, находящихся в пробе до начала амплификации, но также и от степени очистки образца и от существования эффекта «плато». Этот эффект проявляется в том, что с определенного цикла амплификации накопление продуктов амплификации замедляется, а в дальнейшем и вовсе прекращается. Следовательно, о количестве молекул ДНК-мишени можно судить только по кинетике накопления продуктов амплификации, которая остается вне поля зрения исследователя при использовании методов детекции после амплификации. Поэтому единственным методом, позволяющим проводить количественный анализ, является real-time ПЦР.

## ВОЗМОЖНОСТИ ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ, ОСНАЩЕННОЙ ДЕТЕКТИРУЮЩИМ АМПЛИФИКАТОРОМ

Пользователь детектирующего амплификатора получает возможность проведения двух типов исследований – качественных (скрининговых) и количественных. Качественное исследование (так сказать, *real-time PCR* в широком смысле этого слова) дает возможность только обнаружить наличие исследуемой ДНК в образце (используется в качестве скринингового метода исследования в службе крови, при диагностике инфекционных заболеваний и т.д.). Количественное исследование (*qPCR*, *kinetic PCR*) дает информацию о количестве копий исследуемой ДНК в образце. В дальнейшем вместо термина «количественное исследование» мы будем использовать термин *qPCR*.

### 1. Возможность проведения количественного анализа

Применение системы детекции результатов ПЦР в режиме реального времени, наряду с ответом о наличии или отсутствии ДНК-мишени в исследуемом образце, позволяет также оценить и количество копий этой ДНК, что в ряде случаев позволяет уточнить диагноз и выбрать более адекватный метод лечения. Так, уже разработаны и апробированы в клинике критерии эффективности противовирусной терапии для лечения гепатита С и ВИЧ. Основным критерием эффективности проводимого лечения является концентрация вирионов в крови (уровень вирусной нагрузки). Если в процессе лечения не происходит снижения вирусной нагрузки по истечении определенного срока, это свидетельствует о недостаточной эффективности терапии и требует смены схемы лечения пациента (изменения доз, кратности введения препаратов и т.д.).

Для проведения *qPCR* необходим специальный амплификатор со встроенной системой детекции флуоресценции. Накопление продукта ПЦР в таких ДНК-амплификаторах фиксируется непосредственно во время амплификации, что позволяет оценить кинетику прохождения реакции и построить график увеличения количества ДНК в амплификационной пробирке.

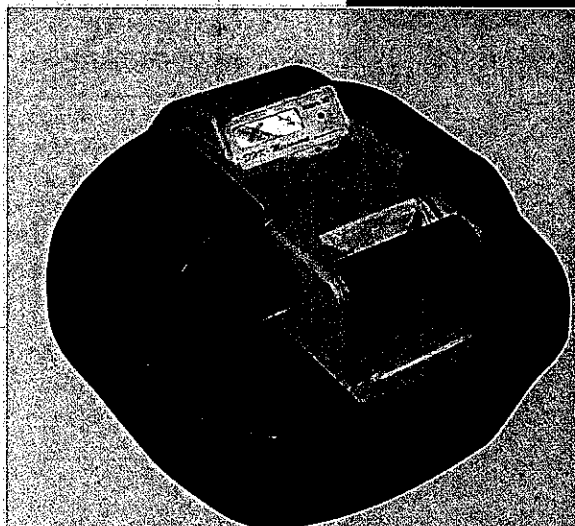
Сравнивая такой график с данными, полученными для серии стандартных кривых (полученных на образцах с известным количеством копий ДНК), можно сделать вывод о количестве детектируемой ДНК в исследуемом образце (или РНК после проведения обратной транскрипции до стадии амплификации), что позволяет определить вирусную нагрузку в крови пациента. В настоящее время на российском рынке представлены тест-системы для количественного определения методом *qPCR* вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов В и С. Уже созданы тест-системы для количественного определения также и цитомегаловируса (который является серьезной проблемой для пациентов с иммунодефицитными состояниями, вызванными ВИЧ-инфекцией, либо получающих иммуносупрессивную терапию после пересадки органов).

Кроме того, с помощью определения количества ДНК-мишени можно определять содержание в продуктах генно-модифицированных источников (ГМИ). Основано такое определение на том, что в векторах для экспрессии трансгена в растениях используются регуляторные участки, которые обычно не встречаются в растениях, так называемый 35S-промотор и NOS-терминатор. Определяя их содержание, можно сделать вывод о процентном содержании ГМИ в пище. Такие тест-системы на российском рынке уже представлены и используются в практической деятельности.

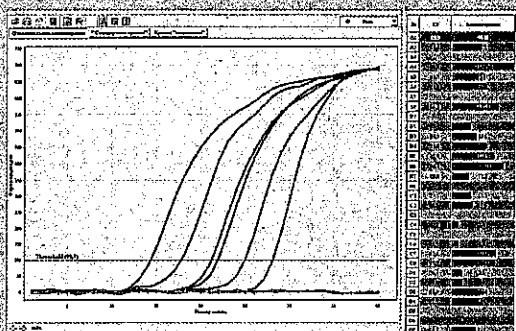
В дополнение к этим двум областям разрабатываются тест-системы для определения экспрессии генов. Такие тест-системы позволяют оценивать уровень экспрессии таких важных регуляторных белков, как цитокины, в биоптате из очага поражения (например, из язвы желудка).

### 2. Возможность проведения качественного анализа

Качественный анализ используется при проведении скрининговых исследований и диагностике безусловно-патогенных микроорганизмов, когда требуется установить сам факт инфицированности. В этих случаях мы получаем информацию о наличии или отсутствии в образце интересующих нас молекул ДНК или РНК (для обнаружения молекул РНК перед постановкой амплификации требуется проведение реакции обратной транскрипции).



Детектирующий амплификатор



Результаты эксперимента, полученного на этом амплификаторе

### **3. Снижение требований в организации диагностической лаборатории**

Напомним, что один из самых больших недостатков агарозного гель-электрофореза и гибридоанализа как методов детекции продуктов амплификации – необходимость открывания пробирки с амплификационной смесью после окончания реакции для проведения детекции. Именно необходимость переноса реакционной смеси в лунку геля или лунку планшета и связанная с этим опасность контаминации влекут за собой ряд требований: лаборатория должна быть разделена на зоны для каждой стадии ПЦР-диагностики, необходимо специальное оборудование для организации воздушных потоков, в каждой зоне лаборатории должны работать отдельные сотрудники и т.д. Это необходимо для исключения попадания ампликонов в другие диагностические зоны.

Зачастую такие высокие требования не могут быть выполнены в полном объеме даже в крупных диагностических центрах. В этой связи чрезвычайно важным является внедрение методов детекции результатов ПЦР, проводимых без открывания реакционной пробирки. Кроме того, применение агарозного гель-электрофореза потенциально опасно из-за использования инткалирующего красителя бромистого этидия и жесткого ультрафиолетового излучения (работа с бромистым этидием требует соответствия организации работ санитарным правилам СанПиН 2.1.7.728-99 и согласования с Комитетом по охране окружающей среды и природных ресурсов).

### **4. Повышение надежности документирования, интерпретации и хранения анализа**

Надо отметить, что ответственность врача перед пациентом при диагностике ВИЧ и вирусных гепатитов значительно выше, чем при диагностике ЗППП, поэтому необходимо исключить субъективность при интерпретации результатов ПЦР. Использование электрофореза для детекции результатов ПЦР, как правило, связано с визуальным анализом полученных данных. Это может вызывать ряд ошибок при документировании и интерпретации результатов исследования, в то время как автоматизированная система фиксации данных с детектирующих амплификаторов в память персонального компьютера позволяет исключить субъективность интерпретации результатов и вести эффективную документацию и хранение информации. Удобный интерфейс программного обеспечения позволяет быстро и точно оценить результат тестирования с возможностью выведения на принтер отчета о проведенном анализе. В комбинации с электронной версией журнала регистрации результатов анализов отчет может быть быстро переформатирован по форме стандартного клинического протокола.

### **5. Снижение трудоемкости и времени проведения анализа**

Применение real-time PCR позволяет существенно снизить трудоемкость и время проведения анализа (время детекции фактически равно нулю, так как измерение флуоресценции происходит непосредственно в процессе прохождения амплификации). Использование возможностей электронного заполнения клинического протокола позволяет существенно ускорить этап подготовки отчета и исключает вероятность внесения ошибок на данном этапе.

### **ВЫВОДЫ**

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что метод real-time ПЦР характеризуется следующими особенностями:

1. Возможность проведения как качественного, так и количественного анализа.
  2. Отсутствие опасности контаминации ампликонами.
  3. Высокая скорость проведения анализа.
  4. Технологичность.
  5. Наличие на российском рынке целого ряда приборов как отечественного, так и импортного производства, позволяющих детектировать флуоресценцию стандартных красителей непосредственно в реакционной пробирке в процессе проведения амплификации.
  6. Наличие зарегистрированных отечественных тест-систем для таких приборов.
- Таким образом, уже сейчас созданы все условия для широкого внедрения надежного количественного метода ДНК-диагностики в системе государственного здравоохранения и санэпиднадзора.

*Для получения дополнительной информации вы всегда можете обратиться к нам*

**НПФ «ДНК-Технология»**

Тел.: (095) 116-49-02, 117-78-22.

E-mail: mail@dna-technology.ru

Internet: www.dna-technology.ru