

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУЧАСНИХ МЕТОДІВ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

*Є.Ю. Кабанець, студентка II курсу факультету ТВППТСБ**

Миколаївський національний аграрний університет

У статті розібрані традиційні й нові методи ампліфікації нуклеїнових кислот. Проведено аналіз вже існуючих наукових публікацій та останніх досліджень з цієї теми. Викладена порівняльна характеристика методів.

Ключові слова: ампліфікація, РНК, ДНК, PCR, NASBA, LCR, RT-PCR.

Постановка проблеми. Ампліфікація – процес утворення копій ділянок нуклеїнових кислот. Наразі існує декілька видів ампліфікації: полімеразна ланцюгова реакція PCR (polymerase chain reaction), лігазна ланцюгова реакція LCR (ligase chain reaction), ампліфікація послідовності основ нуклеїнових кислот NASBA (nucleic acids sequence-based amplification), зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction). Найбільш відомою і популярною є PCR.

Основним завданням ампліфікації є утворення великого числа копій нуклеїнової кислоти, для забезпечення подальшої зручної роботи з необхідною ділянкою та її аналізу.

У даний час існує велике різноманіття методів ампліфікації, кожен з яких має свої переваги та недоліки. У зв'язку з цим постало питання про можливість застосування кожного з методів у певній сфері аналізу.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Є. Шипіцина, М. Унемо зі співавт. провели ряд досліджень для оцінки методів ампліфікації при виявленні *Chlamydia trachomatis*. Було проведено п'ять тестів на основі PCR та один тест,

* Науковий керівник – канд. с.-г. наук, доцент Сметана О.Ю.

заснований на технології NASBA. Досліджувались цервікальні і вагінальні зразки, отримані у жінок, та уретральні зразки й перші порції сечі, взяті у чоловіків. Усі 6 тестів показали достатньо високу чутливість і специфічність для виявлення хламідій при дослідженні матеріалів, отриманих інвазійним та не інвазійним методами. Проте найкраще поєднання чутливості (від 89,7% до 100%) і специфічності (100% у всіх зразках) було продемонстровано новим тестом NASBA [1].

F. Lunel зі співавт., порівнюючи три комерційні тест-системи для кількісного визначення РНК гепатиту С (ВГС), використовуючи методи RT-PCR (Amplacor YCV Monitor, Roche), NASBA (NASBA HCV, Oragon) и метод ампліфікації сигналу bDNA (branched DNA)(Quantiplex HCV RNA, Chiron), показали такі результати чутливості: метод NASBA - 99%, RT-PCR - 94% і bDNA - 88%). Що стосується відтворюваності результатів, то метод RT-PCR програвав NASBA і bDNA [2].

Перспективи використання методу NASBA для діагностики вродженої цитомегаловірусної інфекції (ЦМВІ) описали M. Revello зі співавт. Був представлений аналіз даних, отриманих при пренатальній діагностиці ЦМВІ у 102 жінок з первинною інфекцією. Зразки амніотичної рідини були дослідженні методами культури клітин, PCR, NASBA. При виявленні ДНК ЦМВ методом PCR показник прогностичного значення негативних результатів дорівнював 90,4%, при виявленні мРНК генів IE1, UL65 методом NASBA – 93,2 і 93,3% [3].

S. Morre зі співавт. при аналізі матеріалу від пацієнтів, що мали генітальну хламідійну інфекцію та отримували лікування доксицикліном, методами культури клітин, PCR, NASBA прийшли до висновку, що NASBA може застосовуватись замість культурального методу для оцінки ефективності антимікробної терапії. Порівняно з культуральним тестом NASBA має більш високу чутливість і займає значно менше часу [4].

Постановка завдання – опис та порівняння існуючих методів ампліфікації та визначення галузі їх застосування задля отримання максимально ефективних результатів.

Виклад основного матеріалу дослідження. Почнемо з опису основних етапів та принципів методів PCR, LCR, RT-PCR, NASBA.

Полімеразна ланцюгова реакція. У 1983-1984 рр. К. Mullis провів ряд експериментів по розробці PCR і першим почав використовувати Taq-полімерази. Крім того, К. Mullis розробив алгоритм циклічних змін температури в ході PCR.

Таким чином, сформувався принцип використання PCR, як методу ампліфікації *in vitro* заданих фрагментів ДНК з повністю або частково відомою послідовністю.

Компоненти суміші при PCR: ДНК, буфер, dNTP, DNA-Pol, 2 праймери.

Кожен цикл ампліфікації складається з трьох етапів:

1. Денатурація – це перехід ДНК з дволанцюгової форми в одноланцюгову при розриві водневих зв'язків між комплементарними парами основ під впливом високих температур (94-96°C).

2. Відпал (ренатурація) – це приєднання праймерів до одноланцюгової ДНК-мішені. Праймери підбирають так, що вони обмежують шуканий фрагмент і комплементарні протилежним ланцюгам ДНК. Відпал відбувається відповідно до правила комплементарності Чаргаффа. Якщо ця умова не дотримана, то відпалу праймерів не відбувається. Температура перебігу цього етапу становить 55°C.

3. Елонгація (синтез). Після відпалу праймерів Taq-полімераза починає добудовування другого ланцюга ДНК з 3'-кінця праймера. Температуру в реакційній суміші доводять до оптимуму роботи Taq-полімерази (72-80°C), яка з максимальною ефективністю починає синтез другого ланцюга ДНК від 3'-кінця праймера, пов'язаного з матрицею, і рухається в напрямку від 3 'до 5' кінця.

Температурний цикл ампліфікації багаторазово повторюється (30 і більше разів). На кожному циклі кількість синтезованих копій фрагмента ДНК подвоюється.

На даний момент PCR застосовується у медицині та системі санітарно-епідеміологічного контролю для діагностики інфекцій, імунних патологій і

спадкових захворювань, у ветеринарії та рослинництві для діагностики інфекцій та встановлення видової належності, у судовій медицині, генній інженерії, мікробіології та генетиці [5].

Лігазна ланцюгова реакція. Винайдення термостабільної лігази дало початок новому методу ампліфікації, названому лігазна ланцюгова реакція (LCR). Відкрив цей метод F. Varany у 1991 році для виявлення нормальної та мутантної ДНК.

LCR не відбувається, якщо 3'-кінцевий нуклеотид першого праймера або 5'-кінцевий нуклеотид другого некомплементарні відповідним нуклеотидам аналізованої ДНК. Тому при наявності мутації в тих сайтах ДНК, де праймери стикаються один з одним, в реакцію зі своїм партнером вступає тільки змінений праймер, повністю комплементарний аналізованій мутантній ДНК, тобто продукт реакції утворюється лише при наявності в реакційній суміші «мутантного» праймера. Принципи, що лежать в основі методу визначення мутацій за допомогою LCR, схожі з принципами алель-специфічної ПЛР [6].

Компоненти суміші при LCR: ДНК, буфер, 4 праймери, лігаза.

Кожен цикл ампліфікації складається з трьох етапів:

1. Денатурація. Спочатку проводять денатурацію дволанцюгової ДНК при 95 ° С, для отримання двох одноланцюгових ДНК.
2. Відпал (ренатурація). Наступним етапом є відпал праймерів при 50° С. Олігонуклеотиди зв'язуються специфічними ферментами ланцюгів ДНК-матриці.
3. Елонгація (синтез). Температура підвищується для дії лігази, і праймери зшиваються завдяки утворенню фосфодієфірних зв'язків.

Далі процес повторюється для ново-синтезованих ланцюгів ДНК (другий етап).

Ці дві стадії циклу повторюються багато разів, в результаті чого відбувається експоненціальне зростання з'єднаних ковалентним зв'язком олігонуклеотидів.

Зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція. Метод був заснований у 1977 році після відкриття зворотної транскриптази в ході

дослідження вірусної реплікації генетичного матеріалу. З того часу він став широко використовуватись для виявлення РНК і його кількісного визначення.

Завдяки своїй простоті, специфічності і чутливості RT-PCR має широкий діапазон застосувань: від визначення кількості клітин дріжджів у вині до більш складних застосувань в якості діагностичних засобів для виявлення інфекційних агентів, таких як вірус пташиного грипу [7]. Ампліфікація послідовності основ нуклеїнових кислот.

RT-PCR є метод ампліфікації специфічного фрагмента РНК. Одноланцюгову молекулу РНК перетворюють в реакції зворотної транскрипції в комплементарну ДНК (сDNA) і далі ампліфікують вже одноланцюгову молекулу ДНК, використовуючи традиційну ПЛР.

Компоненти суміші: RT: 1 праймер, РНК, буфер, ревертаза вірусу лейкозу мишей Молоні (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV) чи вірусу мієлобластозу птаці (avian myeloblastosis virus – AMV), dNTP. PCR: сDNA, буфер, dNTP, DNA-Pol, 2 праймери.

1. Реакція першого ланцюжка ($t=37^{\circ}\text{C}$).

Перший етап. До РНК приєднується ДНК-праймер.

Другий етап. На матриці мРНК зворотня транскриптаза, використовуючи dNTP синтезує комплементарну ДНК(сDNA).

2. Реакція другого ланцюжка.

Після того як зворотна транскрипція закінчена і утворена сDNA на матриці мРНК, виконуються ПЛР за стандартною методикою [8].

Метод NASBA відкрив у 1991 році J. Compton. Він охарактеризував його як «праймер-залежна технологія, що може використовуватись для продовження ампліфікації нуклеїнових кислот у єдиній суміші, при єдиній температурі» [9]. Одразу після винайдення метод став застосовуватись для експрес-аналізу та визначення кількості HIV-1 у сироватці пацієнтів.

NASBA дозволяє ампліфікувати РНК. Головною його перевагою над зворотно-транскрипційною полімеразною ланцюговою реакцією (ЗТ-ПЛР) є ізотермічність, адже ця реакція може проводитись без зміни температури. Метод

став застосовуватись у медичній діагностиці, де давав більш швидкі результати і мав більшу специфічність.

Компоненти суміші при NASBA: РНК, буфер, 2 праймери, ревертаза вірусу мієлобластозу птиці (avian myeloblastosis virus – AMV), РНК-полімераза фага Т7, РНКаза II *Escherichia coli*, DNA-Pol .

Реакція протікає при фіксованій температурі 41° С.

Лінійна фаза:

Перший етап. Праймер Р1, що комплементарний ділянці РНК-мішені та містить промоторну послідовність Т7 RNA-Pol, гібридується з РНК.

Другий етап. Додається суміш ферментів. AMV-ревертаза подовжує праймер Р1 і створює ДНК-копію з РНК-матриці, таким чином формується гібрид РНК/кДНК.

Третій етап. РНКаза II гідролізує РНК, залишаючи одноланцюгову ДНК. З нею гібридується другий праймер Р2.

Четвертий етап. DNA-Pol подовжує вже другий праймер. Формується дволанцюгова ДНК і промотор Т7 RNA-Pol починає функціонувати.

П'ятий етап. Т7 RNA-Pol створює багато копій РНК на щойно утвореній ДНК. Ці копії відповідають вихідному ланцюгу РНК.

Циклічна фаза:

Перший етап. Праймер Р2 гібридується з синтезованою РНК.

Другий етап. AMV-ревертаза подовжує праймер Р2 і створює ДНК-копію.

Третій етап. РНКаза II розщеплює РНК частину гібриду РНК/кДНК. Праймер Р1 зв'язується з кДНК.

Четвертий етап. DNA-Pol подовжує праймер Р1, формуючи дволанцюгову ДНК.

П'ятий етап. Т7 RNA-Pol синтезує нову РНК, запускаючи новий цикл [10].

У таблиці 1 наведено підсумкову порівняльну характеристику розглянутих методів ампліфікації.

Порівняльна характеристика методів PCR, NASBA, LCR, RT-PCR

Параметр	Метод ампліфікації НК			
	PCR	LCR	NASBA	RT-PCR
Мішень	ДНК	ДНК	РНК	РНК
Кількість праймерів	2	4	2	1 для етапу ЗТ, 2 для етапу ПЛР
Компоненти суміші	ДНК, буфер, dNTP, DNA-Pol, 2 праймери.	ДНК, буфер, 4 праймери, лігаза.	РНК, буфер, 2 праймери, AMV-ревертаза, T7 RNA-Pol, DNA-Pol, РНКаза Н.	ЗТ: 1 праймер, РНК, буфер, ревертаза, dNTP. ПЛР: сDNA, буфер, dNTP, DNA-Pol, 2 праймери.
Кількість стадій 1 циклу	3	3	10 при першому циклі, 5 при наступних циклах	2 при ЗТ, 3 при ПЛР
Кількість циклів	20-30	15-25	25-30	30
Тривалість	1.5-2 години	1.5-2 години	1-2 години	2,5-3 години
Чутливість	95-99%	95-100%	99%	94%
Матеріал, що ампліфікується	Живі та неживі клітини	Неживі клітини	Живі клітини	Живі та неживі клітини
Можливість виявлення одночасно декількох збудників	+	+	+	+
Температура	Різниться в залежності від стадії	Різниться в залежності від стадії	Стабільна: 41° С	37° С при ЗТ, різниться в залежності від стадії при ПЛР

Висновки і перспективи подальших досліджень. Наразі найбільш популярним є метод полімеразної ланцюгової реакції. Він має низку позитивних

якостей: є досить точним і специфічним, забезпечує пряме виявлення збудника у пробі, адже направлений на його ДНК, може застосовуватись для виявлення латентних інфекцій, ефективний для вивчення збудників з високою антигенетичною активністю і внутрішньоклітинних паразитів, може виявляти одразу декілька збудників у одній пробі, має високу швидкість. Є в нього й декілька недоліків: ампліфікує як живі так і мертві клітини, що викликає труднощі при лікуванні, має високу чутливість, що забезпечує виявлення мікроорганізмів які можуть існувати у людини в невеликій кількості, дає різні результати при використанні різних тест-систем, необхідність маніпуляцій зі зразками може викликати додаткову контамінацію. Деякі з цих недоліків успішно виправленні у PCR в реальному часі.

Метод лігазної ланцюгової реакції також має багато переваг: він забезпечує виявлення делецій і дуплікацій цілих екзотів генів, має більшу специфічність порівняно з PCR, менш схильний до впливу інгібіторів реакції, має більшу швидкість порівняно з культуральними методами. Недоліком методу є ампліфікація неживих клітин.

Метод NASBA має такі переваги: може проводитись без зміни температури, адже реакція є ізотермічною, має більшу чутливість порівняно із RT-PCR, за цієї реакції немає необхідності синтезувати кДНК і проводити обробку ДНКазою для видалення «фонові» ДНК, ампліфікує тільки живі клітини, що є досить важливим при діагностиці грибкових та бактеріальних інфекцій. Недоліками є велика вартість і складність дослідження, тому часто використовується лише для перевірки результатів PCR.

Підсумовуючи плюси та мінуси усіх наведених методів ампліфікації, можна зробити висновок, що для аналізу можна застосовувати усі методи, усі з них мають багато переваг і дають гарні результати. Звісно вибір тест-систем також залежить від фінансової можливості лабораторій, адже вони потребують різних затрат, тому варто звертати увагу і на цей фактор. Також важливим фактором вибору є речовина, яку необхідно ампліфікувати. Наприклад, якщо

досліджується РНК, то більш доцільним є метод NASBA, а якщо слід виявити мутантну ДНК, то – LCR.

Знаючи які результати мають LCR та NASBA можна стверджувати, що в недалекому майбутньому саме вони займуть гідне місце в арсеналі діагностичних засобів сучасних лабораторій.

Список використаних джерел

1. Шипицына Е. Оценка методов амплификации нуклеиновых кислот используемых в России для выявления *Chlamydia trachomatis* / Е.Шипицына, Е.Золотоверхая, М.Унемо // Журнал акушерства и женских болезней. – 2008. – №4. – С. 44-54.
2. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and monitor assay / F.Lunel, P.Cresta, D.Vitour et al. // Hepatology. – 1999. – Vol. 29. – P. 528-535.
3. Revello M.G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection / M.G.Revello, G.Gerna // J.Clin.Virol. – 2004. – Vol. 29. – P. 71-83.
4. Monitoring of *Chlamydia trachomatis* infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence-based amplification / S.A.Morre, P.T.G.Sillekens, M.V.Jacobs et al. // J.Clin.Pathol. – 1998. – Vol. 51. – P. 149-154.
5. Зорина В. Основы полимеразной цепной реакции / В.Зорина. М. : ДНК-технология, 2012. – 78 с.
6. Barany F. The ligase chain reaction in a PCR world / F. Barany // Genome Res. – 1991. – November. – P. 1-149.
7. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays / S.A.Bustin // J. Mol. Endocrinol. – 2000. – October. – P. 93-169.
8. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification / J. Compton // Nature. – 1991. – P. 2-91.

9. Schmittgen T.D. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods / T.D.Schmittgen, B.A.Zakrajsek, A.G.Mills // *Anal. Biochem.* – 2000. – October. – P. 194–204.
10. Шипицына Е.В. Метод амплификации нуклеиновых кислот NASBA (nucleic acids sequence-based amplification) и возможности его применения в акушерско-гинекологической практике / Е.В.Шипицына, О.В.Будиловская, А.М. Савичева // *Журнал акушерства и женских болезней.* – 2005. – №. 2. – С. 83-89.