

# ПЦР-диагностика

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР, PCR)** изобрёл в 1983 году Кэри Мюллис (американский учёный). Впоследствии он получил за это изобретение Нобелевскую премию. В настоящее время ПЦР-диагностика является, одним из самых точных и чувствительных методов диагностики инфекционных заболеваний.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

В основе метода ПЦР лежит многократное удвоение определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). В результате нарабатываются количества ДНК, достаточные для визуальной детекции. При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Кроме простого увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией), ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

## Специфичность и применение

ПЦР - метод молекулярной диагностики, ставший для ряда инфекций «золотым стандартом», проверен временем и тщательно апробирован клинически. Метод ПЦР позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя.

ПЦР позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоёмким микробиологическим методам, что особенно актуально в гинекологии и урологии при диагностике урогенитальных инфекций, передающихся половым путем (ИППП).

Также, этим методом проводят диагностику вирусных инфекций, таких как гепатиты, ВИЧ и др. Чувствительность метода значительно превосходит таковую у иммунохимических и микробиологических методов, а принцип метода позволяет диагностировать наличие инфекций со значительной антигенной изменчивостью.

Специфичность ПЦР при использовании технологии PCR даже для всех вирусных, хламидийных, микоплазменных, уреоплазменных и большинства других бактериальных инфекций достигает 100%. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами

(иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно.

Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и скрыто существующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях.

Применение ПЦР-диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов. Методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от больного, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т. д.). В урологической и гинекологической практике - для выявления хламидиоза, уреаплазмоза, гонореи, герпеса, гарднереллёза, микоплазменной инфекции, ВПЧ - вирусов папилломы человека; в пульмонологии - для дифференциальной диагностики вирусных и бактериальных пневмоний, туберкулёза; в гастроэнтерологии - для выявления хеликобактериоза; в клинике инфекционных заболеваний - в качестве экспресс-метода диагностики сальмонеллёза, дифтерии, вирусных гепатитов В, С и G; в гематологии - для выявления цитомегаловирусной инфекции, онковирусов.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами - короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18 - 30 букв. Каждый из праймеров сопоставим (комплементарен) с одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

После соединения (гибридизации) матрицы с праймером (отжиг), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

## **Проведение ПЦР**

*Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:*

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (А, G, С, Т);
- ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее  $0,1^{\circ}C$ . Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Добавление специфических ферментов может увеличить выход ПЦР-реакции.

## **Ход реакции**

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20 - 35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94 - 96°C (или до 98°C, если используется особенно термостабильная полимеразы) на 0,5 - 2 минуты, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется **денатурацией** — разрушаются водородные связи между двумя цепями. Иногда перед первым циклом проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 2 - 5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров.

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется **отжигом**. Температура отжига зависит от праймеров и обычно выбирается на 4 - 5°C ниже их температуры плавления. Время стадии — 0,5 - 2 минут.

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия **элонгации**. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы наиболее активны при 72°C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 10 - 15 мин.