

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В МИКРОБИОЛОГИИ (ЛЕКЦИЯ)

© Дмитрий Павлович Гладин¹, Александр Михайлович Корольюк¹, Ирина Владимировна Дробот¹, Надежда Сергеевна Козлова², Ирина Даниловна Анненкова¹

¹ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

² Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова. 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47

Контактная информация: Дмитрий Павлович Гладин — доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. E-mail: gladin1975@mail.ru

Поступила: 02.06.2021

Одобрена: 12.08.2021

Принята к печати: 17.09.2021

Резюме: Молекулярные методы исследования, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), первоначально предназначались исключительно для научных целей. Однако уже тогда предполагали большую перспективу их прикладного применения в будущем. К настоящему времени молекулярно-биологические методы анализа широко используются в медицинской практике, а также во многих других сферах. ПЦР фактически произвела революцию в диагностике инфекционных заболеваний, резко повысив эффективность расшифровки природы различных процессов, обусловленных бактериями, вирусами и микроскопическими грибами. Полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction, PCR) позволяет существенно увеличить число копий (амплифицировать) специфического фрагмента ДНК (РНК) в исследуемой биологической пробе *in vitro* от ничтожно малых количеств до обнаруживаемых величин. В результате этого происходит усиление сигнала в реакционной смеси, что позволяет обнаружить и идентифицировать специфический участок генома возбудителя. Решающее значение этот метод имеет в случае индикации медленно растущих, трудно культивируемых или некультивируемых микроорганизмов, а также при низкой информативности серологического и других методов диагностики. Простота исполнения, высочайшие чувствительность и специфичность принесли этому методу популярность во всем мире. Благодаря ПЦР появилась возможность прямого обнаружения сверхмалых количеств нуклеиновых кислот инфекционных агентов в самых различных биосубстратах.

Ключевые слова: Кэри Мюллис; полимеразная цепная реакция; Tag-полимераза; амплификация.

POLYMERASE CHAIN REACTION IN MICROBIOLOGY (LECTURE)

© Dmitry P. Gladin¹, Alexander M. Korolyuk¹, Irina V. Drobot¹, Nadezhda S. Kozlova², Irina D. Annenkova¹

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 191015, Saint-Petersburg, ul. Kirochnaya, 41. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevsky pr., 47

Contact information: Dmitry P. Gladin — Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology. E-mail: gladin1975@mail.ru

Received: 02.06.2021

Revised: 12.08.2021

Accepted: 17.09.2021

Abstract: Molecular biology techniques, the polymerase chain reaction (PCR) in particular, were originally developed for scientific purposes exclusively. However a great prospective of its practical application in future was obvious. Nowadays the molecular biological techniques of analysis are widely used not only in medical practice but also in many other fields. The PCR has revolutionized the diagnosis of infectious diseases, highly increasing efficiency of detecting nature of the different processes caused by bacteria, viruses and microscopic fungi. The polymerase chain reaction (PCR) significantly amplifies a specific region of DNA (RNA) in the biological material *in vitro* revealing from the smallest traces to a detectable one. As a result the signal is amplified in the reaction mix, allowing detecting and identifying the specific region of the pathogen genome. This technique is crucially important in indicating slow growing, hard-to-culture or unculturable microorganisms moreover when serological and other diagnostic methods show poor sensitivity or specificity. Due to uncomplicated approach and its high sensitivity, specificity the technique has become highly popular around the world. The PCR technique has allowed direct detection of minute amounts of nucleic acid infectious agents in different biological substrates.

Key words: Kary Mullis; polymerase chain reaction; Tag polymerase; amplification.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ПЦР

Полимеразная цепная реакция является гениальным изобретением молодого американского биохимика-исследователя Кэри Мюллиса (Kary Banks Mullis) (рис. 1). По его рассказу, это произошло, когда он мчался на север вдоль Тихоокеанского побережья в автомобиле со спящей подругой, не переставая напряженно думать о своей работе [10, 11]. Выдающиеся перспективы открытого им в 1983 году метода стали очевидны достаточно быстро, поэтому мировое научное признание пришло к его автору сравнительно скоро. Мюллис получил за свое открытие Нобелевскую премию по химии в 1993 году, в возрасте 39 лет, через несколько лет после того, как он и его коллеги по фирме Cetus впервые применили ПЦР на практике. Открытие фактически разделило биологию на две эпохи: до ПЦР и после ПЦР.

Однако споры и пересуды относительно правомочности единоличного приоритета К. Мюллиса в разработке методики ПЦР не утихают до сих пор. В истории науки такие ситуации нередки, потому что почва для эпохальных научных открытий, как правило, подготавливается другими исследователями, обойденными научной славой.

Кроме того, надо заметить, аргументы для критиков щедро предоставлял сам К. Мюллис — личность достаточно неоднозначная. В нем причудливо уживались серьезный, вдумчивый ученый с авантюрным, даже бесшабашным хулиганом, любителем ненормативной лексики. Создается впечатление, что ему нравилось периодически эпатировать почтенных ученых и широкую общественность. Например, рассуждениями о положительном влиянии галлюциногенов на творческие способности — «это опыт, открывающий сознание». Он любил высказаться, что «наукой занимаются люди, которые зависят от того, что им платят за то, что они собираются узнать», а не за то, что они на самом деле производят. Мюллис упорно утверждал, что изменение климата и связь СПИДа с вирусом иммунодефицита человека связаны не с научными данными, а с заговором экологов, правительств и ученых, оберегающих свою карьеру и деньги. Нобелевский лауреат К. Мюллис написал похвальное предисловие к книге «Что, если все, что вы думали о СПИДе, было неверным?» скандальной Кристины Маджоре, шумно не признающей инфекционную природу СПИДа. (Она и ее дочь, будучи ВИЧ-позитивными, потом умерли от СПИДа.) Мюллис рассказывал о встрече со «стандартным инопланетным флуоресцирующим енотом» в своем домике в лесах северной Калифорнии около полуночи в ночь на 1985 год, отрицая, что был на психоделике. Короче говоря, это был неординарный, яркий человек из числа тех ученых, которые, реально добившись большого успеха в своей конкретной области, потом сочли возможным делать необоснованные, даже странные заявления в тех науках, где не проводили никаких исследований. Однако Мюллис всегда признавал важную роль предшественников, чьи работы позволили ему однажды совершить свое открытие.

В 1955 году А. Корнбергом и его коллегами был открыт фермент ДНК-полимераза из *Escherichia coli*. Он позволял

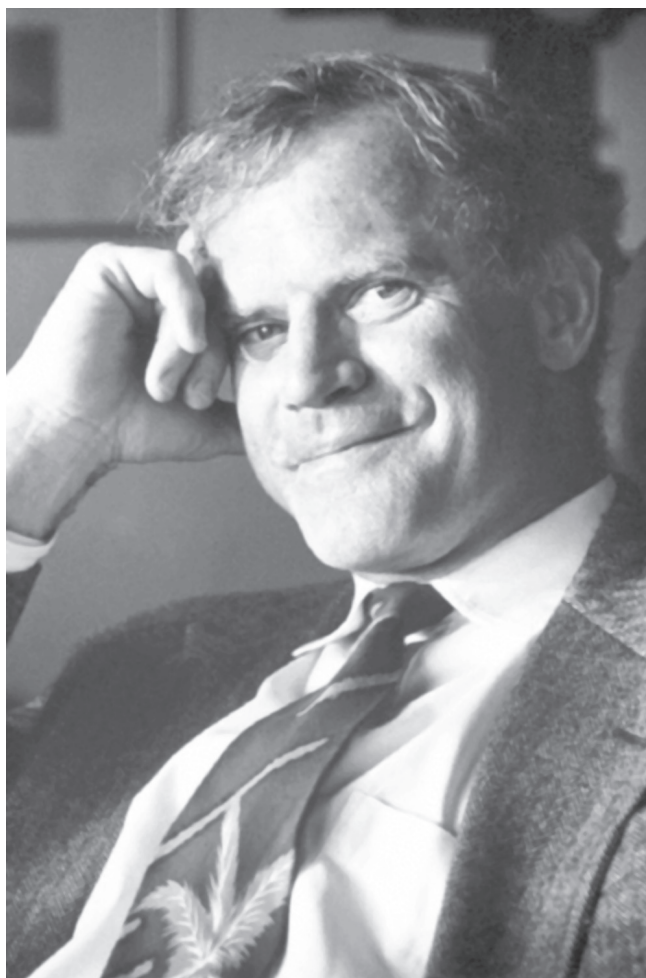


Рис. 1. Кэри Б. Мюллис (1944–2019)

удлинять короткие олигонуклеотидные праймеры (одноцепочечные искусственно синтезированные молекулы ДНК) присоединением к 3'-концу цепи ДНК дополнительных нуклеотидов при условии, что праймер комплементарен ДНК-матрице. В начале 1970-х годов норвежский ученый Х. Клеппе из лаборатории нобелевского лауреата Х. Кораны предложил способ удвоения новообразованных отрезков ДНК, разделяя обе цепи нагреванием до 80–90 °С.

В первой публикации в 1971 году с описанием этой техники Клеппе и соавторы писали: «ДНК-дуплекс (двойная ДНК) должен быть денатурирован для образования одиночных нитей. Эта стадия проводится в присутствии достаточно большого избытка двух подходящих праймеров. После охлаждения можно надеяться получить две структуры, каждая из которых содержит всю длину цепи шаблона, соответствующим образом образованной в комплексе с праймером. Добавление ДНК-полимеразы завершит процесс восстановления репликации, и в результате должны быть получены две молекулы исходного дуплекса. Весь цикл можно повторить, добавляя каждый раз свежую дозу фермента».

Однако это предложение в те годы осталось нереализованным из-за трудоемкого ручного синтеза праймеров и необхо-

димости очистки большого количества ДНК-полимеразы из *E. coli*. К тому же этот фермент быстро инактивировался при высокой температуре в процессе разделения цепей ДНК.

Проницательный и креативный 29-летний биохимик Кэри Мюллис первым предложил наиболее пригодную технологию амплификации ДНК путем многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью ДНК-полимеразы. В это время он работал в Эмеривилле, штат Калифорния, в биотехнологической компании Cetus Corporation, где занимался синтезом коротких цепей ДНК.

Пионерская публикация о ПЦР появилась в 1985 году в журнале «Science» (статья «Ферментативная амплификация геномных последовательностей β-глобина и анализ сайтов рестрикции для диагностики серповидно-клеточной анемии» написана в соавторстве с Р. Сайки и др.). Изложенная в ней процедура была все-таки довольно длительной и трудоемкой, т.к. после каждого цикла нагревание–охлаждение приходилось добавлять в реакционную смесь новую порцию ДНК-полимеразы вместо инактивированной. Требовалось очень много дорогого фермента, поэтому предложение применить для ПЦР уже известную к тому времени термостабильную ДНК-полимеразу (Taq-полимеразу) стало существенным рывком в развитии метода и ускорило его широкое использование. Вторая статья практически той же группы исследователей была опубликована в «Science» через год (1986) с названием «Направленная праймером ферментативная амплификация ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы».

Taq-полимераза была впервые выделена из экстремально термофильной бактерии *Thermus aquaticus* и охарактеризована американским биохимиком А. Чьен с коллегами в 1976 году. (Этот фермент также был независимо описан советскими биохимиками А. Калединым, А. Слюсаренко и С. Городецким в 1980 году. В СССР подобные штаммы выделяли из горячих источников вулканического происхождения на Камчатке.)

T. aquaticus — грамотрицательная палочковидная экстремально термофильная бактерия, живущая в гейзерах и других горячих источниках с температурой выше 55 °С. Она синтезирует устойчивые к высоким температурам ферменты, в частности Taq-полимеразу (термостабильную ДНК-зависимую-ДНК-полимеразу), которая служит незаменимым реактивом в молекулярно-генетических исследованиях. Температурный оптимум Taq-полимеразы составляет 70–80 °С. Этот фермент обладает ДНК-полимеразной и 5',3'-экзонуклеазной активностями, что обеспечивает реализацию ПЦР. Впервые этот термофильный микроорганизм был выделен в 1975 году Томасом Броком и Хадсоном Фризом в районе Больших Фонтанов Йеллоустонского национального парка.

Метод ПЦР был запатентован К. Мюллисом и передан работодателю, т.е. корпорации Cetus Corporation, в которой он работал химиком-синтетиком в то время. За эту работу он получил от Cetus бонус (премию) в размере 10 тысяч долларов США. В 1992 году Cetus продала уже за 300 миллионов долларов права на метод и патент на использование Taq-полимеразы швейцарской фармацевтической компании Roche Molecular

Systems (ныне Hoffmann-La Roche) — одной из ведущих компаний мира в области фармацевтики и диагностики. Опираясь на сообщение в 1976 году А. Чьен и соавторов о первом выделении и описании термостабильной Taq-полимеразы, компания Promega пыталась в судебном порядке заставить Roche отказаться от исключительных прав на этот фермент.

Патентное сражение за Taq-полимеразу все еще продолжается в нескольких юрисдикциях по всему миру между Roche и Promega несмотря на то, что юридические аргументы вышли за пределы срока действия первоначальных патентов на ПЦР и Taq-полимеразу, срок действия которых истек 28 марта 2005 г. Оспаривали единоличное авторство Мюллиса в открытии ПЦР и коллеги по работе, разгневанные его внезапным уходом из Cetus. Между тем сам Мюллис в своей нобелевской речи рассказывал, как он донимал коллег рассказом о своем внезапном озарении, однако они только отмахивались, не видя ценности в его идее. Возможно, как самокритично признавал сам Мюллис, потому что все привыкли к «дикости» его многочисленных идей.

Таким образом, разработка принципа ПЦР и последующее широкое внедрение метода в различные практические сферы деятельности является продуктом как коллективной, так и индивидуальной работы [12]. Кэри Мюллис был более креативен, более внимателен и подготовлен для того, чтобы правильно оценить и суммировать разрозненные факты, которые были у всех на виду, но значение которых обычно упускалось. Способность внимательно наблюдать и не пропускать — это то, что отличает гениального ученого от многих просто умных исследователей. К сожалению, сравнительно недавно — 7 августа 2019 года — выдающийся изобретатель и неординарный человек Кэри Мюллис умер, не дожив несколько месяцев до своего 75-летия.

ПРИНЦИП И МЕХАНИЗМЫ ПЦР

В основе ПЦР лежит уникальная способность ДНК удваиваться. ДНК представляет собой двойную нить, каждая из которой состоит из нуклеотидов [3, 5].

ДНК реплицируется во всех живых клетках (рис. 2). Главная задача ПЦР — заставить специфический для данного инфекционного агента фрагмент ДНК (РНК) удваиваться *in vitro* в том случае, если он присутствует в пробе. При этом число образовавшихся дочерних фрагментов ДНК также будет возрастать в геометрической прогрессии, то есть возникнет цепная реакция, которую обеспечивает фермент — термостабильная Taq-полимераза.

В конечном итоге образуется огромное число копий искомого фрагмента ДНК (**амплификация**), которые выявляются разными способами. Важно понимать, что происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям. Естественно, это невозможно, если его нет в исследуемом образце. На первом этапе амплификации происходит «расплавление» нити ДНК при действии высокой температуры (95 °С) с образованием двух нитей, на втором

СТРОЕНИЕ И РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

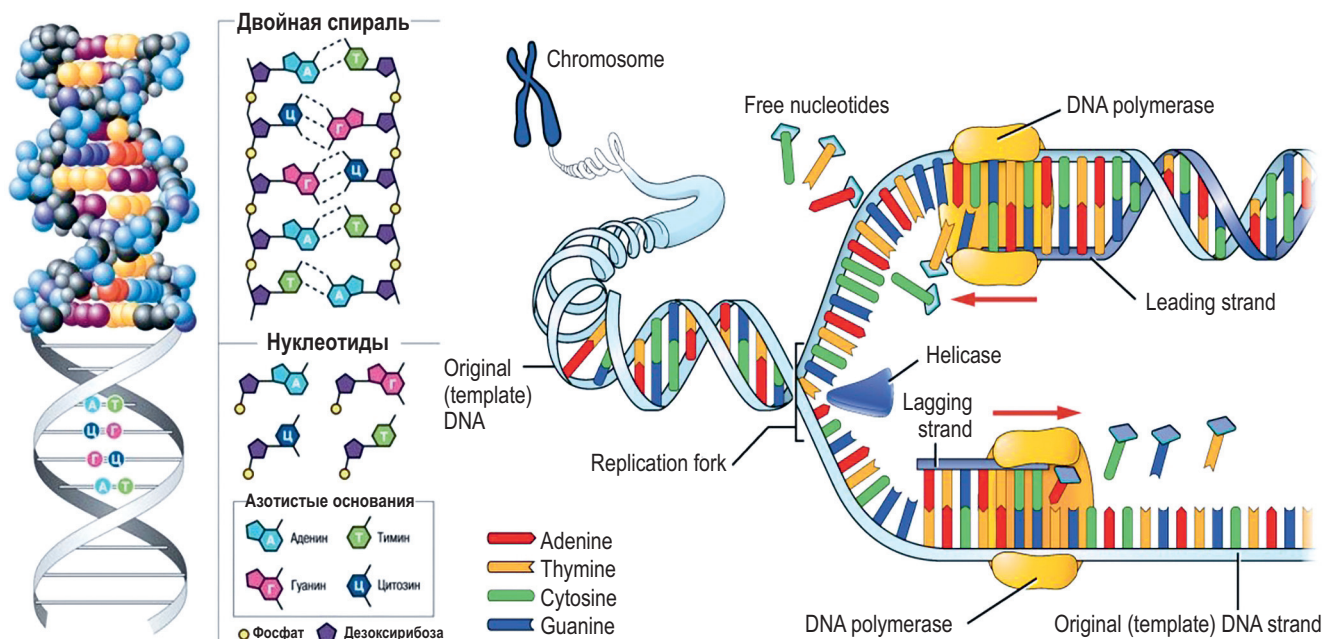


Рис. 2. Схема полуконсервативной репликации ДНК

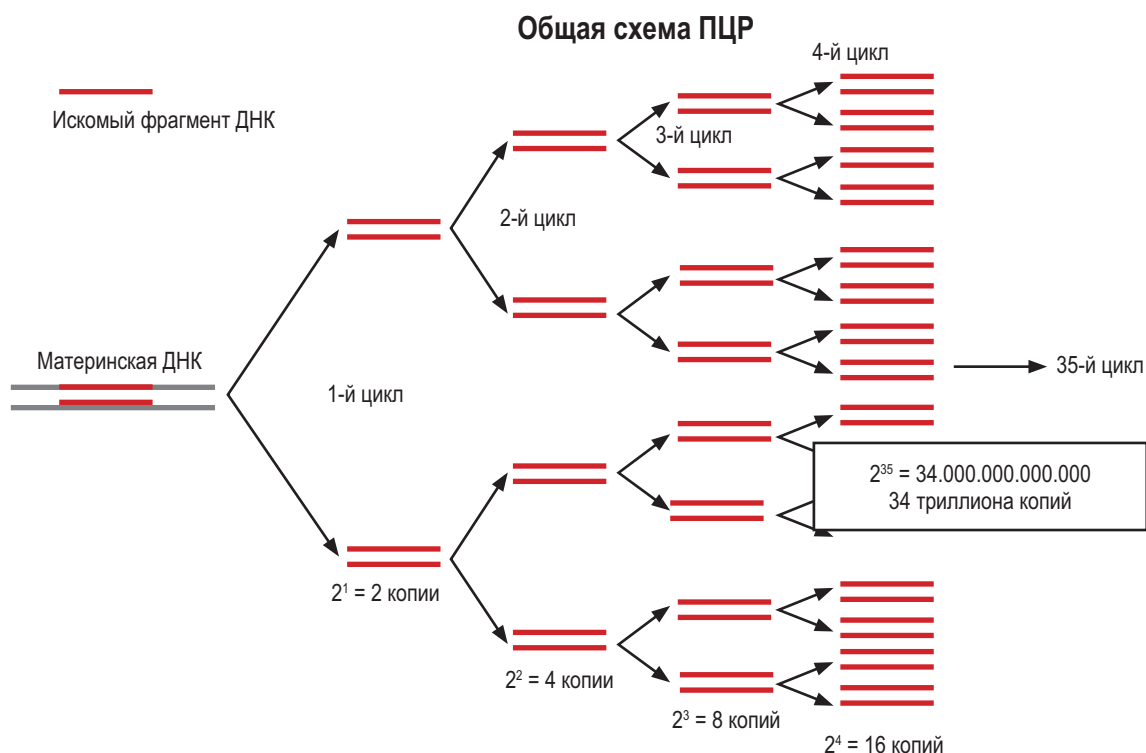


Рис. 3. Схема полимеразной цепной реакции

этапе к каждой нити присоединяются праймеры (50–65 °C) и на третьем этапе происходит достраивание нитей при помощи Taq-полимеразы (72 °C).

Таким образом, ПЦР — это трехэтапный циклический процесс, воспроизводимый в приборах-амплификаторах и

повторяющийся 30–40 раз. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла, в котором происходит образование специфического продукта ДНК-ампликона. В последующих циклах ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом,

происходит накопление ампликонов в реакционной смеси по формуле 2^n , где n — число циклов амплификации (рис. 3). Если даже изначально в материале находилась только одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30–40 циклов в растворе накапливается 10^8 молекул ампликонов, которые выявляются при помощи различных методов детекции.

КОМПОНЕНТЫ ПЦР

Проведение полимеразной цепной реакции обеспечивается наличием в реакционной смеси ряда обязательных ингредиентов (рис. 4).

Для классического варианта ПЦР требуются следующие компоненты.

1. **ДНК-матрица**, содержащая специфический фрагмент ДНК, который требуется размножить (амплифицировать). При отсутствии ДНК-мишени специфические продукты амплификации (ампликоны) не образуются.

2. **Праймеры** — синтетические олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, комплементарные искомому специфическому фрагменту ДНК. Для проведения ПЦР используются два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей специфического фрагмента ДНК (один праймер для «плюс» цепи, второй — для «минус» цепи). Присоединившись к противоположным цепям молекулы ДНК, праймеры ограничивают тот участок, который будет амплифицироваться. Именно на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами основана специфичность ПЦР. Определение структуры и конструирование праймеров является самым ответственным моментом работы. Требуется подобрать такой фрагмент молекулы ДНК, который бы отличался генетической консервативностью и присутствовал только у интересующего вида микроорганизма или исследуемого гена. Это выполняется при помощи специальных компьютерных программ, содержащих информацию о нуклеотидной последовательности генов. Информацию о последовательностях генов получают на сайтах международных компьютерных банков (Gen bank, EMBL). Прежде всего, праймеры должны быть специфичными. Особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. Область связывания (отжига) праймеров с цепью

ДНК не должна находиться в зоне мутаций в пределах видовой специфичности микроорганизмов, взятой в качестве критерия выбора праймера. При попадании в такую область отжиг праймеров не происходит и возрастает вероятность ложноотрицательного результата.

3. **Taq-полимераза (термостабильная ДНК-полимераза)**. Как было отмечено выше, этот фермент был выделен из термофильной бактерии *T. aquaticus*. Taq-полимераза является гомологом ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, однако отличается термостабильностью (температурный оптимум составляет 79–80 °C). Этот фермент обладает ДНК-полимеразной и 5',3'-экзонуклеазной активностями, что делает его незаменимым для проведения ПЦР. Он состоит из 832 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 94 кДа. Это ключевое свойство данной ДНК-полимеразы делает ее пригодной для ПЦР. Период полужизни фермента при температуре 92,5 °C составляет 130 минут, что позволяет проводить многочисленные циклы амплификации. Скорость работы Taq-полимеразы составляет примерно 60 нуклеотидов в секунду при 72 °C. В настоящее время кроме первоначального варианта Taq-полимеразы используют термостабильные ДНК-полимеразы, выделенные из других термофилов — *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза), *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза) и другие.

4. **Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)**. Они представляют собой строительный материал, так называемые «кирпичики» ПЦР, из которых Taq-полимераза строит вторую цепь ДНК. Дезоксинуклеотидтрифосфаты представляют собой смесь дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ).

5. **Ионы магния** необходимы для работы Taq-полимеразы.

6. **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

7. **Дополнительные компоненты**. Для удобства детекции и контроля амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены **внутренние контроли и ДНК-зонды**. Внутренние контроли — гетерологичный специфическому фрагменту ДНК, ограниченный праймерами. Представляет собой альтернативную матрицу для ПЦР и позволяет контролировать процесс

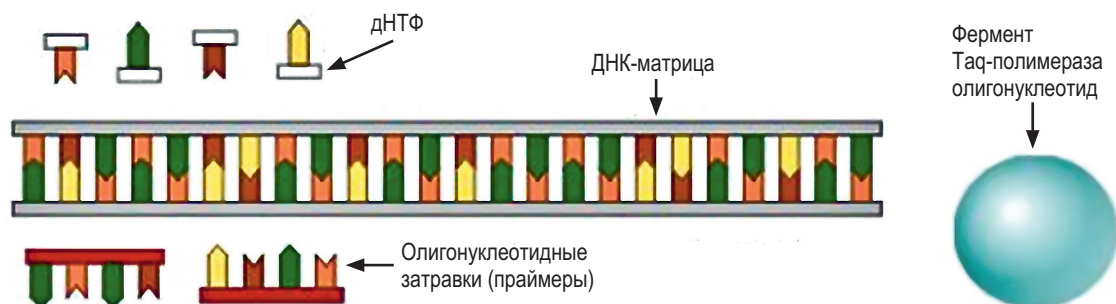


Рис. 4. Основные ингредиенты для постановки ПЦР

амплификации в каждой конкретной пробирке. ДНК-зонды — искусственно синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные ампликонам (продуктам реакции) и меченные флуоресцентными или изотопными метками [9].

СТАДИИ ПЦР

Полимеразную цепную реакцию проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое нагревание и охлаждение пробирок. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, с точностью температуры не менее 0,1 °C. ПЦР представляет собой трехэтапный циклический процесс (рис. 5). Обычно при проведении ПЦР выполняется 20–40 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Каждая стадия протекает при определенной

температуре, создаваемой в амплификаторе: денатурация (94–95 °C), отжиг праймеров (50–60 °C) и элонгация (удлинение) цепи ДНК (72 °C).

Денатурация. Во время денатурации происходит «расплавление» двуцепочечной ДНК, то есть расплетение ее нитей. ДНК переходит в однонитевую форму, ее нити расходятся, так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2–5 минут для полной денатурации матрицы ДНК. Время денатурации ДНК в последующих циклах составляет 30–40 секунд.

Отжиг. Когда цепи ДНК разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Присоединение праймеров происходит комплементарно соответствующим последовательностям на противоположных

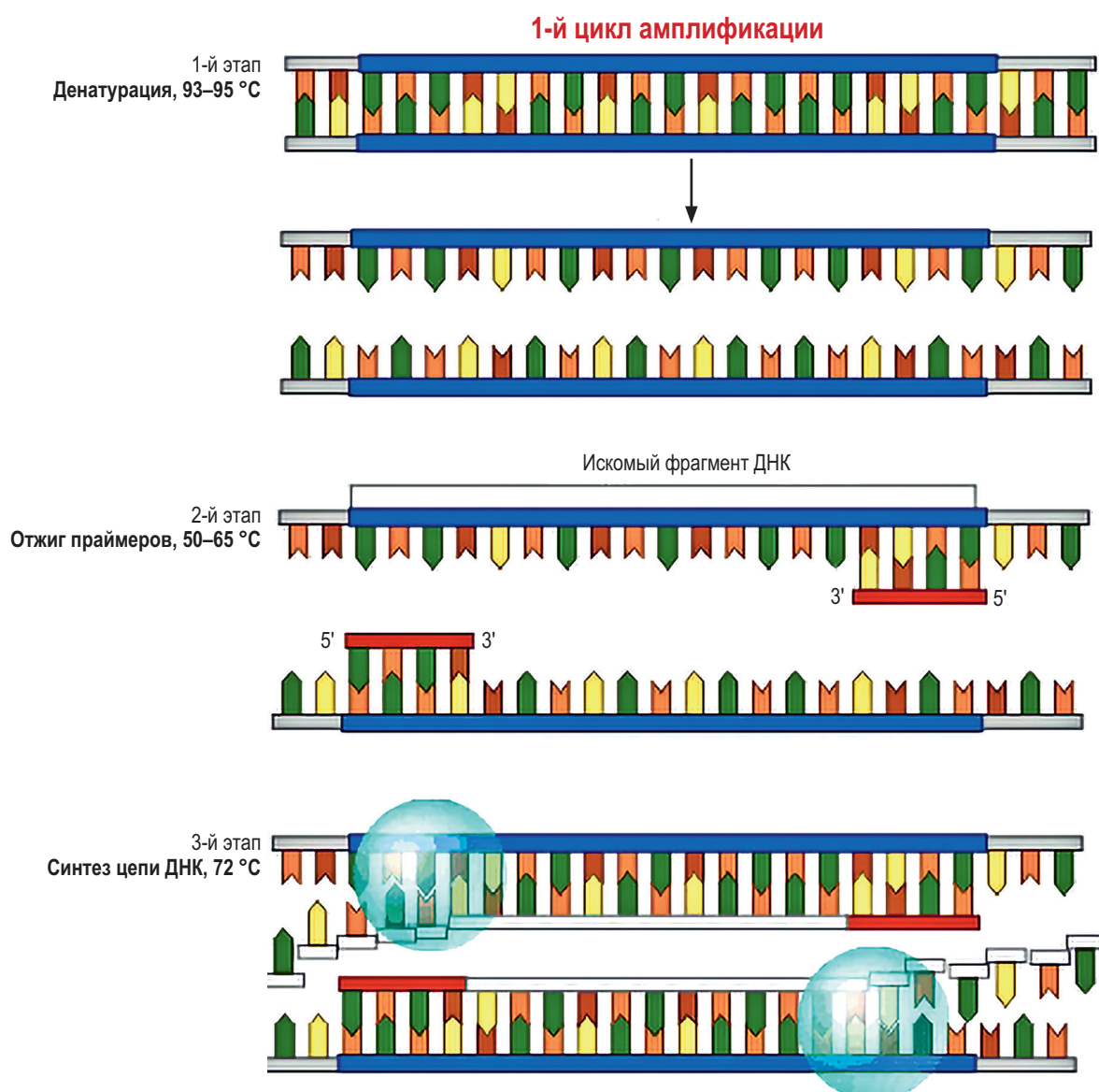


Рис. 5. Основные этапы ПЦР

цепях ДНК на границах специфического участка. После отжига праймеры строго ограничивают специфический фрагмент ДНК, и именно он будет в последующем амплифицироваться. Время отжига праймеров — 20–60 секунд.

Элонгация. Представляет собой процесс достраивания цепей ДНК специфического участка. При образовании комплекса праймер–матрица появляются условия для связывания с ним Taq-полимеразы. Достраивание цепей ДНК происходит от 5-конца к 3-концу цепи в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Эта стадия длится 20–40 секунд. После прохождения трех этапов цикл повторяется вновь, а количество копий искомого фрагмента ДНК увеличивается в геометрической прогрессии.

ПОСТАНОВКА ПЦР

Выделение нуклеиновых кислот. Экстракция нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) является важнейшим этапом ПЦР. Взятые образцы клинического или иного материала помещают в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл. Следует пользоваться пробирками, стенки которых лишены ДНК-аз и РНК-аз, так как это препятствует разрушению искоемых нуклеиновых кислот указанными ферментами. Методики выделения нуклеиновых кислот из образцов зависят от вида исследуемого материала и типа

выделяемой нуклеиновой кислоты. В настоящее время фирмы-производители реагентов для ПЦР в инструкциях детально описывают этапы выделения, а сам процесс экстракции нуклеиновых кислот для врача клинико-диагностической лаборатории представляет чисто механическую работу.

Амплификация. Этап амплификации искомого фрагмента ДНК происходит в амплификаторе (рис. 6). Этот прибор позволяет создавать заданную температуру и многократно повторять циклы амплификации, что ведет к накоплению ампликонов в реакционной смеси.

Перед проведением амплификации необходимо приготовить реакционную смесь. Для этого необходимы пробирки объемом 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от размера лунок в амплификаторе). В эти пробирки вносится амплификационная смесь, состоящая из выделенных нуклеиновых кислот, праймеров, раствора дНТФ, ПЦР-буфера и Taq-полимеразы. Все ингредиенты реакции добавляются строго в определенных количествах. Конечный объем смеси составляет обычно 25 мкл.

В каждую пробирку добавляют каплю минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси. Затем пробирки помещают в амплификатор и запускают соответствующую программу. Время проведения амплификации в зависимости от заданной программы может составлять от 1,5 до 3 часов.



Рис. 6. Образцы амплификаторов



Рис. 7. Флуоресцентный детектор продуктов амплификации (а); оборудование для проведения ПЦР в режиме реального времени (б)

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

Электрофоретическая детекция. Метод основан на выявлении амплифицированных фрагментов ДНК при помощи электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Последний образует с фрагментами ДНК комплекс, который светится в виде полос при облучении геля УФ-лучами. В лунки геля помещают исследуемые и контрольные образцы и проводят электрофорез в течение 15–20 минут. После процедуры электрофореза гель помещают на трансиллюминатор (прибор, излучающий ультрафиолет) и выявляют фрагменты ДНК в виде светящихся полос. Гель фотографируют для документации результатов.

Существенным недостатком электрофоретической детекции является высокий риск контаминации исследуемых образцов продуктами амплификации вследствие необходимости открытия пробирок и субъективизм учета результатов. В связи с этим для электрофореза необходимо отдельное помещение и сотрудники, не участвующие в проведении этапов выделения нуклеиновых кислот и амплификации [8].

Гибридизационно-флуоресцентная детекция. В основе гибридизационно-флуоресцентной детекции лежит принцип гибридизации (связывания) флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате которой происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Присутствие такого зонда в реакционной смеси позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации после окончания полимеразной цепной реакции (детекция по «конечной точке», End-point analysis) или в процессе ПЦР (детекция в режиме реального времени, Real-time PCR) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. В первом случае учет результатов осуществляется при помощи флуоресцентного детектора, в

который помещают пробирки после проведения амплификации, что позволяет оценить результаты качественно (рис. 7).

При постановке ПЦР в режиме реального времени амплификатор является одновременно и детектором. Таким образом, одновременно происходит и амплификация, и регистрация ее продуктов, что позволяет в реальном времени количественно анализировать накопление ампликонов. В настоящее время это основной и наиболее часто применяемый метод в рутинной практике клинично-диагностических лабораторий. Он позволяет количественно определить число копий ДНК/РНК, что незаменимо при диагностике вирусных инфекций (вирусные гепатиты, ВИЧ), а также для определения интенсивности инфекционного процесса и контроля проводимой терапии.

В обоих случаях детекция результатов ПЦР осуществляется без извлечения продуктов реакции из пробирок, что позволяет свести к минимуму риск контаминации продуктами ПЦР и возникновению ложноположительных результатов. ПЦР-лаборатории с детекцией по конечной точке и в режиме реального времени не требуют отдельного помещения для учета результатов, что существенно сокращает затраты. Дополнительным преимуществом гибридизационно-флуоресцентной детекции является возможность автоматизировать учет результатов анализа и снизить субъективизм интерпретации результатов (рис. 7).

ДОСТОИНСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПЦР

Прямое обнаружение возбудителя. Многие методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, например иммуноферментный анализ (ИФА), выявляют продукты жизнедеятельности патогенных микроорганизмов, маркерные белки и антитела к ним. Это позволяет лишь косвенно судить о нали-

чий самого инфекционного агента. Выявление специфического фрагмента ДНК при помощи ПЦР уверенно свидетельствует о наличии возбудителя в исследуемом материале.

Высокая чувствительность. ПЦР-анализ выявляет наличие возбудителя даже в тех случаях, когда другими методами это сделать невозможно. Высокая чувствительность (10–100 микробных клеток в пробе) позволяет обнаружить ДНК/РНК возбудителя на ранних стадиях, когда другие методы неэффективны. Нередко патоген замаскирован клеточными структурами и антителами. В этих случаях ПЦР незаменим как метод прямого обнаружения патогенного микроорганизма.

Высокая специфичность. Специфичность метода определяется подбором специфических праймеров, способных связаться исключительно только с фрагментом ДНК искомого микроорганизма. Это свойство позволяет выявить ДНК инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и ДНК клеток организма хозяина.

Универсальность постановки ПЦР. Сходство химической структуры нуклеиновых кислот дала возможность унифицировать методику и определить в одной пробе несколько возбудителей, например возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП).

Быстрота постановки и высокая скорость получения результата. Очень важное преимущество ПЦР — отсутствие культуральной микробиологической работы. ПЦР-анализ максимально облегчен и во многом автоматизирован. Простота и удобство постановки ПЦР делает возможным получение результата через 2–3 часа.

Высокая эффективность ПЦР при индикации трудно культивируемых, некультивируемых или персистирующих форм микроорганизмов. Это крайне необходимо при диагностике латентных и хронических инфекций, а также для выявления микроорганизмов с высокой антигенной изменчивостью.

Разнообразие исследуемого материала. В качестве образца для ПЦР-исследования можно брать не только материал от больного, но также многие другие субстраты, в которых могут быть искомые молекулы ДНК [1, 2, 4]. К ним относятся вода, почва, продукты питания, смывы и многое другое, что позволяет широко использовать ПЦР в санитарной микробиологии.

Основным ограничением использования метода ПЦР является возможность ускользания от обнаружения некоторых высокоизменчивых патогенных микроорганизмов. Если мутация произошла в амплифицируемом участке генома, то он становится неуловимым для прежней тест-системы. Еще один недостаток ПЦР — невозможность дифференциации нуклеиновых кислот жизнеспособных и мертвых микроорганизмов, что снижает ценность контроля этим методом эффективности этиотропной терапии.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР В МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Среди множества различных направлений клинической диагностики медицинская микробиология занимает лидиру-

ющее место по количеству приложений, использующих технологию ПЦР. Внедрение ПЦР в повседневную практику клинико-диагностических лабораторий существенно расширило возможности клинической микробиологии, основу которой составляет бактериологическое исследование. Традиционные методы исследования хорошо оправдывают себя при диагностике инфекций, вызванных легко культивируемыми микроорганизмами.

Однако спектр микроорганизмов, которые могут быть чрезвычайно чувствительны к взятию, транспортировке исследуемого материала и условиям культивирования, очень широк. К таким патогенам относятся пневмококки, микоплазмы, гемофилы, нейссерии, бордетеллы, облигатные неспоровые анаэробы и многие другие. Медленный рост на питательных средах таких микроорганизмов, как микобактерии, является еще одним ограничением, связанным с использованием культуральных методов. Многие возбудители из числа облигатных внутриклеточных паразитов (риккетсии, хламидии, вирусы) не способны к росту на искусственных питательных средах. Традиционные микробиологические методы, как правило, основаны на использовании фенотипических тестов. Однако фенотипическая вариабельность многих патогенов может привести к неверной идентификации. Универсальность ПЦР, базирующаяся на сочетании высочайшей чувствительности и специфичности, позволяет выявлять практически все патогенные микроорганизмы.

В этот список можно включить:

- социально значимые инфекции — туберкулез, ИППП, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция;
- особо опасные инфекции, возникновение которых всегда расценивается как чрезвычайная ситуация, — чума, желтая лихорадка, геморрагические лихорадки Ласса, Эбола, Марбург и другие [8];
- эпидемические инфекции, способные нанести серьезный ущерб здоровью населения, — новая коронавирусная инфекция (COVID-19), тяжелый острый респираторный синдром (SARS), грипп, вызванный совсем новым подтипом вируса гриппа А и др.;
- TORCH-инфекции — токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирусная инфекция, другие герпетические инфекции; особенно актуальна своевременная диагностика этих заболеваний у беременных.

ПЦР незаменим при контроле эффективности терапии многих инфекционных заболеваний.

Для такой цели наиболее пригодна ПЦР в варианте **NASBA-тест** (Nucleic acid sequence based amplification). Основу метода составляет амплификация РНК возбудителей при участии обратной транскриптазы. Тест был разработан в 1991 году Дж. Комптоном и использован для диагностики ВИЧ-инфекции. Преимуществом этого метода является обнаружение только живых клеток, в которых синтезируется РНК. Дело в том, что молекула ДНК стабильна как в живых, так и в мертвых клетках. В связи с этим обнаружение ДНК не всегда говорит о присутствии в организме жизнеспособных микроор-



ганизмов. Что касается РНК, то она очень нестабильна и после гибели микроорганизма в результате проводимой терапии быстро разрушается. Это свойство теста особенно актуально после проводимого лечения. Обычную ПЦР, выявляющую ДНК, можно применять не ранее чем через 3–4 недели после окончания лечения, а NASBA уже через 5–7 дней. Кроме этого, NASBA обладает очень высокой чувствительностью, что позволяет диагностировать инфекции на ранних стадиях.

Использование ПЦР для детекции генов резистентности к антимикробным препаратам непосредственно в исследуемом материале от больного или в чистой культуре возбудителя позволяет сократить сроки исследования и быстро получить информацию о резистентности штамма (табл. 1). Все большую актуальность приобретает детекция генов резистентности у возбудителей госпитальных инфекций [6, 7] (MRSA-штаммы *S. aureus*, энтеробактерий, устойчивых к цефалоспорином третьего поколения и карбапенемам), *M. tuberculosis*, устойчивых к противотуберкулезным препаратам, а также некоторых вирусов, резистентных к химиопрепаратам (герпес, ВИЧ).

Использование ПЦР для генотипирования микроорганизмов. ПЦР широко используют для определения клонального родства штаммов микроорганизмов, что особенно ценно при эпидемиологических исследованиях. Генотипирование на основе ПЦР отличается универсальностью, более точным уровнем дифференциации, а также возможностью использования количественных методов для оценки идентичности штаммов. Различные варианты ПЦР с целью генотипирования приведены в таблице 2.

Кроме этого, полимеразная цепная реакция используется в санитарной микробиологии и генной инженерии для конструирования промышленных штаммов микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние четыре десятилетия метод ПЦР доказал свое огромное научное и прикладное значение, с его помощью были реализованы масштабные исследования в области медицины и биологии, совершен поистине гигантский прорыв в диагностике широкого спектра инфекционных и генетических

Таблица 1

Примеры использования ПЦР для выявления резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Микроорганизм	Антимикробные препараты	Генетические механизмы резистентности, выявляемые ПЦР
<i>S. aureus</i>	Метициллин (оксациллин) и другие бета-лактамы	Наличие гена <i>tesA</i> , кодирующего дополнительный пенициллин-связывающий белок (ПСБ-2а)
Энтеробактерии (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>)	Цефалоспорины 3 поколения	Гены <i>TEM</i> , <i>SHV</i> и <i>OXA</i> бета-лактамаз расширенного спектра действия
Энтеробактерии (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>), <i>Acinetobacter</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Карбапенемы	Гены, кодирующие синтез NDM, VIN, OXA, KPC и IMP-карбапенемаз
<i>M. tuberculosis</i>	Изониазид	Мутации в гене каталаза-пероксидазы (<i>katG</i>)
	Рифампицин	Мутации в гене бета-субъединицы РНК-полимеразы (<i>rpoB</i>)
	Этамбутол	Мутации в гене <i>embB</i> , кодирующем синтез арабиногалактана
	Стрептомицин	Мутации в генах 16S рРНК (<i>rrs</i>) и рибосомного белка S12 (<i>rpsL</i>)
	Фторхинолоны	Мутации в гене ДНК-гиразы (<i>gyrA</i>)
Вирус простого герпеса (ВПГ)	Ацикловир	Мутации в гене тимидинкиназы (<i>tk</i>), реже в гене ДНК-полимеразы
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	Ингибиторы обратной транскриптазы	Мутации в гене полимеразы (<i>pol</i>)

Таблица 2

Примеры генетического типирования микроорганизмов при использовании различных модификаций ПЦР

Метод	Основной принцип	Область применения
RAPD (AP-PCR)	Амплификация произвольных участков генома в условиях нестрогого связывания праймеров	Локальные эпидемиологические исследования любых штаммов микроорганизмов, выделяемых на питательных средах
Rep-PCR	Амплификация участков генома, ограниченных консервативными повторяющимися последовательностями ДНК	Типирование большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов
ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP)	Амплификация специфических участков ДНК и их расщепление с помощью рестриктаз	Типирование возбудителей, находящихся непосредственно в клинических образцах или культуре клеток

заболеваний, а также в онкопатологии. Накопленная за этот период информация позволила сформировать принципиально новый, персонализированный подход к комплексному обследованию пациентов и определить альтернативные варианты терапии с учетом особенностей их генотипа и популяционной принадлежности.

ПЦР используется для точной идентификации как отдельных патогенов, так и для характеристики смешанных популяций, например микробиоты кишечника. ПЦР необходима для анализа ДНК человека на мутации и полиморфизмы, а также для типирования тканей и крови, что важно в трансплантологии. Так называемую «дактилоскопию» ДНК на основе ПЦР можно считать наиболее значимым достижением в судебной экспертизе за последние 50 лет. Использование ПЦР принесло пользу и за пределами медицины: теперь ДНК можно секвенировать из высушенных или окаменелых образцов, возраст которых составляет тысячи и даже миллионы лет. Это произвело революцию в палеонтологии.

Хотя в историческом масштабе идея метода многократного увеличения числа копий искомой молекулы ДНК возникла относительно недавно, ПЦР стала неотъемлемой частью глобальных научных исследований и лабораторной практики, продолжая при этом совершенствоваться и развиваться.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.В., Алипов А.Н., Андреев В.А. и др. Медицинские лабораторные технологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
2. Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики. Справочно-информационное издание для ПЦР-лабораторий. М.: ИнтерЛабСервис; 2012.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М.: Мир; 2002.
4. Горбунова В.Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная Литература; 1997.
5. Клаг У.С., Каммингс М.Р. Основы генетики. Пер. с англ. А.А. Лушниковой, С. М. Мусаткина. М.: Техносфера; 2009.
6. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В.. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 2(3): 96–106.
7. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации. М.; 2014.
8. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.
9. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие для врачей. М.: ДНК-технология; 2012.
10. Kary Mullis. The Polymerase Chain Reaction. Nobel Lecture 1993. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/lecture/> (Accessed 11.10.2021).

11. Mullis K.B. The Unusual Origins of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American. 1990; 262(4): 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.
12. Shampo M.A., Kyle R.A., Kary B. Mullis — Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. Mayo Clinic Proceedings. 2002; 77(7): 606–742. DOI:10.4065/77.7.606.

REFERENCES

1. Alekseev V.V., Alipov A.N., Andreev V.A. i dr. Medicinskie laboratornye tekhnologii [Medical laboratory technologies]. Moskva: GEOTAR-Media Publ.; 2013. (in Russian)
2. Vzyatie, transportirovka, khranenie klinicheskogo materiala dlya PCR-dagnostiki [Sampling, transportation and storage of clinical material for PCR-diagnosis]. Spravochno-informacionnoe izdanie dlya PCR-laboratoriy. Moskva: InterLabServis Publ.; 2012. (in Russian)
3. Glik B., Pasternak J. Molekulyarnaya biotekhnologiya. Printsipy i primeneniye [Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA Per. s angl. Moskva: Mir Publ.; 2002 (in Russian)
4. Gorbunova V.N. Vvedenie v molekulyarnuyu diagnostiku i genoterapiyu nasledstvennykh zabolevanij [Introduction to molecular diagnostics and gene therapy of hereditary diseases]. Sankt-Peterburg: Special'naya Literatura Publ.; 1997. (in Russian)
5. Klag U.S., Kammings M.R. Osnovy genetiki [Concepts of genetics]. Per. s angl. A.A. Lushnikovoy, S.M. Musatkina. Moskva: Tekhnosfera Publ.; 2009. (in Russian)
6. Lopukhov L.B., Edelshteyn M.V. Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya v klinicheskoy mikrobiologicheskoy diagnostike [Polymerase chain reaction in clinical microbiological diagnosis]. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2000; 2(3): 96–106. (in Russian)
7. Molekularno-geneticheskiy monitoring v sisteme epidemiologicheskogo nadzora za infektsiyami, svyazannymi s okazaniem meditsinskoy pomoshchi [Molecular and genetic monitoring in the system of epidemiological surveillance of infections, associated with medical assistance]. Federalnye klinicheskie rekomendatsii. Moskva: 2009. (in Russian)
8. Organizatsiya raboty laboratoriy, ispolzuyushchikh metody amplifikatsii nukleinovyykh kislot pri rabote s materialom, soderzhashchim mikroorganizmy I–IV grupp patogennosti [Management of laboratory work, performing methods of amplification in nucleic acids when investigating pathogenic microorganisms of the risk groups I–IV]. MU 1.3.2569-09. Moskva; 2009. (in Russian)
9. Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii (PCR) [Polymerase chain reaction basics]. Metodicheskoe posobie dlya vrachey. Moskva: DNK-tehnologiya Publ.; 2012. (in Russian)
10. Kary Mullis. The Polymerase Chain Reaction. Nobel Lecture 1993. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/lecture/> (Accessed 11.10.2021).
11. Mullis K.B. The Unusual Origins of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American. 1990; 262(4): 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>.
12. Shampo M.A., Kyle R.A., Kary B. Mullis — Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. Mayo Clinic Proceedings. 2002; 77(7): 606–742. DOI:10.4065/77.7.606.

