

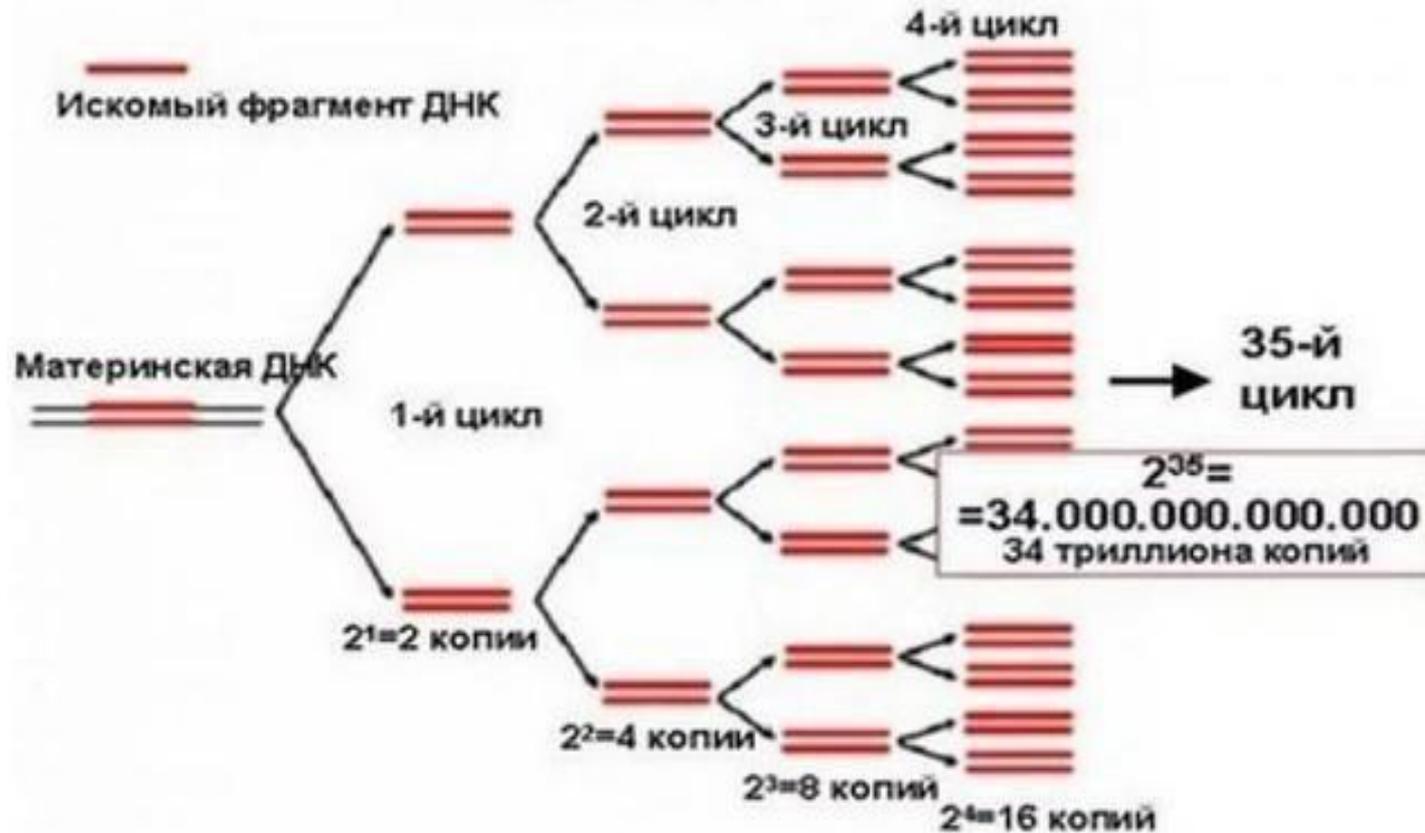
ITP REAL TIME

Қысқаша тарихы



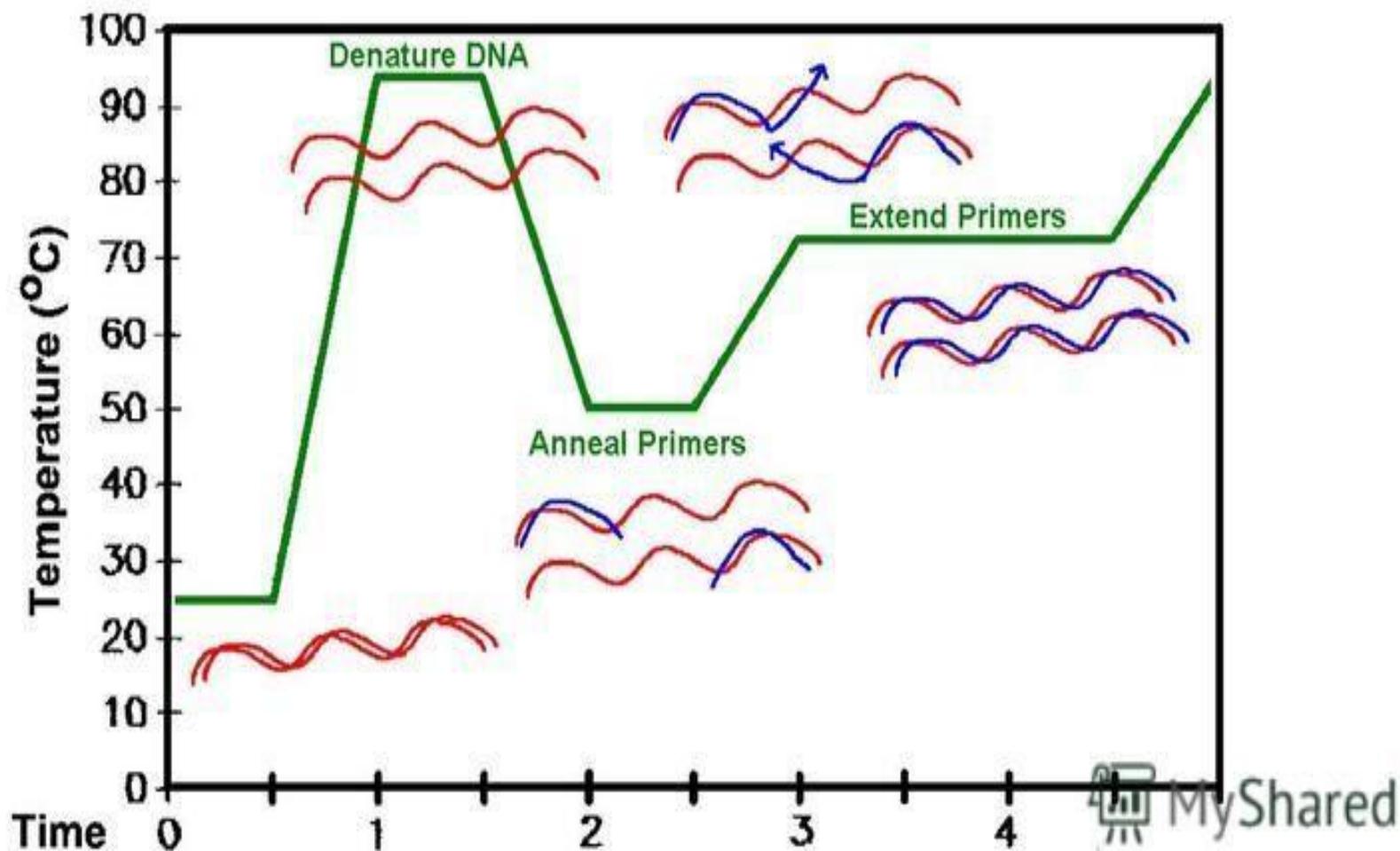
- ПТР - әмбебап әдіс, себебі бөтен ДНК-ны әр түрлі биологиялық материалдардан – шырыш, зәр, қан, қақырық, эпителиалді жасушалар қырындысынан анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдістердің көмегімен миллиондаған ДНК фрагменттері ішінен керекті фрагментті табуға мүмкіндік туады.
- Полимеразды тізбекті реакцияны ең алғаш 1983 жылы американдық ғалым К.Мюллис ашқан және ол осы ашқан жаңалығы үшін Нобель сыйлығына ие болған. Себебі ПТР мүмкін еместі мүмкін етті.

Общая схема ПЦР



- ПТР әдісі *in vitro* жағдайында ферменттер көмегімен ДНК-ның белгілі бөліктерін бірнеше комплементарлыққа сәйкес іріктеу жолымен көшірмелеуіне негізделген. ПТР көмегімен ДНК-ның салыстырмалы қысқа бөліктері амплификацияланады. Әдетте көшірген ДНК бөліктерінің ұзындығын 3000–дай жұп негіздер құрайды.

Полимеразалық тізбектік реакция



Реакция кезеңдері

- 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.
- Тізбектер ажырағаннан кейін температураны $50-60^{\circ}\text{C}$ дейін төмендетеді. Сол кезде праймерлер бір тізбекті матрицамен комплементарлы байланысады.
- Температура жоғары болса, праймер нашар байланысады, ал төмен болса праймер басқа бөлікпен байланысып, дұрыс нәтиже бермейді. Праймер Tag-полимераза үшін бастаушы қызметін атқарады. Праймер 3'-үшінде ОН- тобы бар, содан кейін ДНҚ,- полимераза репликация реакциясын бастап, матрица аяғына дейін жатады. Кейінгі репликация реакциясын жүргізу үшін температураны 72°C дейін жоғарылатады. Реакция ұзақтығы 1-2 мин ДНҚ синтезі $5' \rightarrow 3'$ бағытта жүреді.

Стадии Полимеразной Цепной Реакции

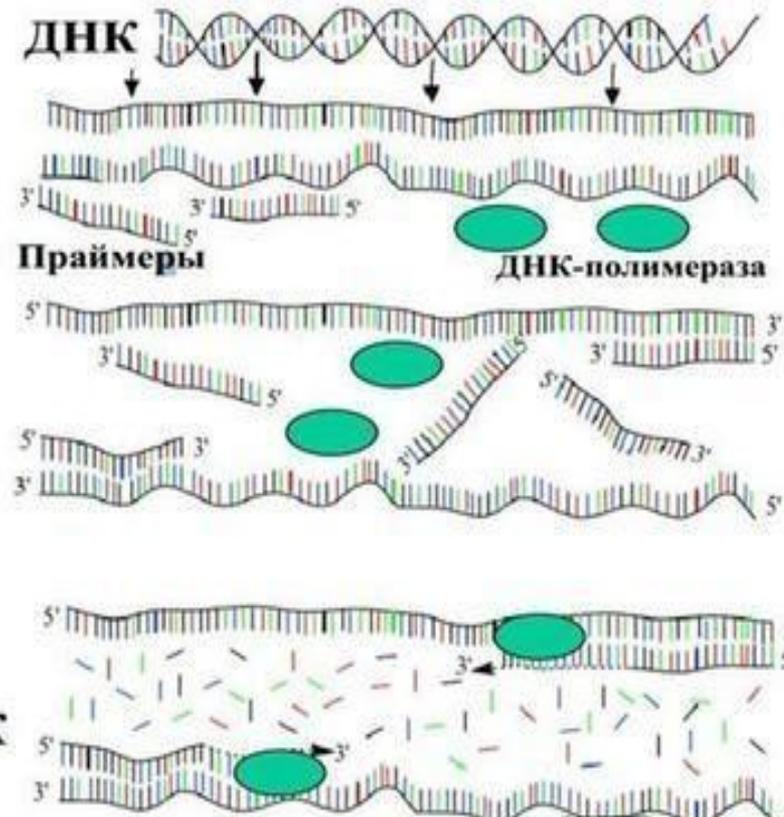
Денатурация ДНК
(95°C)



Отжиг праймеров
(55-65°C)



Полимеризация цепей ДНК
(72°C)



- Келесі циклды жоғарыдағыдай ретпен жүргіземіз
- 94-96°С қыздырып тізбектерді ажырату
- 50-60°С праймерін қосу
- 70-72°С ДНК синтезі
- Екінші цикл нәтижесінде керекті реттерден тұратын таза екі бір тізбекті ДНК түзіледі.
- Үшінші циклде 8 молекула ДНК синтезделеді. Солардың екеуі керекті реттерден ғана тұратын қос тізбекті ДНК болады, ал төрт қос тізбекті ДНК-ның бір тізбектері керекті реттерден тұрады. Циклдерді ары қарай жалғастырған сайын тек керекті реттерден ғана тұратын қос тізбекті ДНК геометриялық прогрессия принципімен арта береді.
- Төртінші циклде олардың саны 8-ге, бесінші циклде 22, ал 20 циклде - 1.048536, 30 циклде - 1,073741764-ке жетеді. Мұндай керекті реттері бар ДНК-ны ампликон дейді. Егер бір цикл 3 минутта болады деп есептелінсе, онда 2 сағат ішінде ДНК-ның миллиардтаған копиясын (ампликонды) алуға болады.

ПТР-дің модификациялары

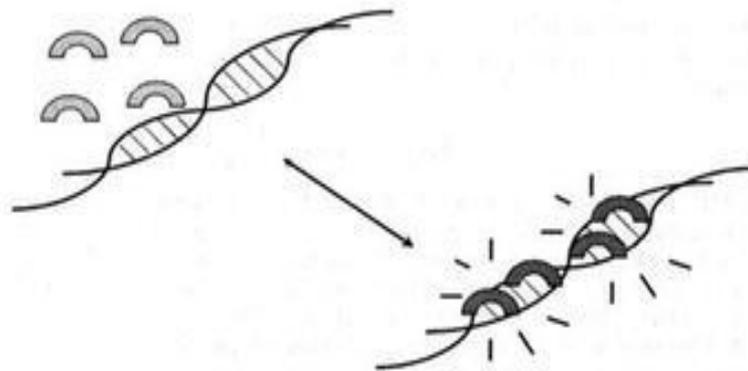
- Бір-біріне кіргізілген (nested PCR)
- Кері транскрипциялық ПТР (RT PCR)
- Сандық ПТР
- Ұзын фрагментті ПТР (Long range PCR)
- Инвертирлік (Inverse PCR), Асимметриялық ПТР (asymmetric PCR),
- Кездейсоқ амплификацияланған полиморфтық ДНҚ-лар (RAPDs)
- In situ ПТР (Primis) ISH әдісі секілді
- Мультикомплекстік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

PCR Real Time

- Ампликондардың санын флуоресцентті анықтаудың екі әдісі бар:
- 1. – ДНК-мен спецификалық емес байланысатын химиялық агенттерді қолдану
- 2. – Флуоресцентті зондарды қолдану (TagMan зонды және Молекулярлық скорпиондар (Molecular beacons))

1. – ДНК-мен спецификалық емес байланысатын химиялық агенттерді қолдану

- Спецификалық емес бояғыштар ДНК-ның бір тізбегімен емес, қос тізбегімен байланысады. Кенінен қолданылатыны - SibrGreen1 бояғышы.
- Реакциялық қоспаға SibrGreen1 бояғышын қосқанда ДНК-ның қос тізбегімен байланысып, флуоресцент интенсивтілігі көбейеді. Денатурация процесі кезінде ДНК 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.



PCR Real Time артықшылықтары

- Сынама құрамы және жүріп жатқан реакция жайлы информацияны пробирканы ашпай-ақ білуге болады. Бұл нәтижені тез алуға және контаминацияның максималды аз болуына көмектеседі.
- Бір реакцияда бірнеше инфекциянды агенттерді флуоресцентті бояғыштардың көмегімен тіркеуге болады.

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.

ПТР артықшылықтары



- 1) Жұқпалы ауруларды қоздырушылардың диагностикасында ПТР өте сезімтал және арнайылығы жоғары әдіс болады
- 2) Диагностиканы жүргізуде әр түрлі клиникалық материалды қолдануға болады (қан, сілекей т.б)
- 3) Бір мезгілде бір биологиялық сынамада бірнеше микроорганизмді анықтауға мүмкіндік береді
- 4) Зертханаға материалды жеткізгенде ауру қоздырғышты тірідей алып келу міндетті емес
- 5) Анализ өте жылдам жасалады
- 6) Кейбір микроорганизмдерді тек ПТР-мен анықтайды, мыс. *Mycoplasma genitalium*
- 7) Кейбір жұқпалы аурулар симптомсыз, яғни ауруға тән белгілер бермей өтеді. Сондықтан ПТР қолданғанда ауру қоздырғыштардың барын табуға мүмкіндік береді. Мысалы, гонорея, хламидоз т.б.

- 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.



