

Полимеразная цепная реакция (ПЦР): принципы, разновидности и области применения

Полимеразная цепная реакция, или ПЦР, является одним из фундаментальных методов современной молекулярной биологии и ДНК-технологий. Английское название метода — Polymerase Chain Reaction, сокращенно PCR. Основная идея ПЦР заключается в том, что определенный участок ДНК можно избирательно многократно копировать в лабораторных условиях. В результате из относительно небольшого количества исходной ДНК получают большое количество копий конкретной последовательности, достаточное для последующего обнаружения и анализа.

Появление ПЦР существенно изменило молекулярную биологию. До разработки этого метода получение большого количества определенного фрагмента ДНК часто требовало более сложных и длительных процедур, включая молекулярное клонирование. ПЦР позволила значительно ускорить работу с генетическим материалом. Развитие метода в 1980-х годах прежде всего связывают с Кэри Муллисом. В дальнейшем появление термостабильных ДНК-полимераз и автоматических термоциклеров сделало ПЦР стандартным лабораторным методом.

Для понимания ПЦР необходимо вспомнить основной принцип репликации ДНК. В клетке ДНК-полимераза синтезирует новую цепь на основе существующей матрицы. При этом фермент не начинает синтез новой цепи полностью самостоятельно. Ему необходим короткий участок с доступной 3'-ОН-группой, от которого начинается удлинение цепи. В ПЦР эту функцию выполняют искусственно синтезированные короткие олигонуклеотиды, называемые праймерами.

Таким образом, ПЦР представляет собой контролируемое многократное копирование выбранного участка ДНК с помощью двух праймеров и термостабильной ДНК-полимеразы. Два праймера определяют границы амплифицируемого участка. Один связывается с одной цепью ДНК, второй — с противоположной. В результате преимущественно копируется последовательность, расположенная между участками связывания праймеров.

Для проведения классической ПЦР необходимы несколько основных компонентов. Прежде всего нужна матричная ДНК, содержащая исследуемую последовательность. Это может быть геномная ДНК, плазмидная ДНК или другой подходящий ДНК-материал. Второй обязательный компонент — пара праймеров. Третьим компонентом является термостабильная ДНК-полимераза. Также необходимы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты — dATP, dTTP, dGTP и dCTP, которые служат строительными блоками для синтеза новых цепей ДНК. Реакционная смесь содержит буфер, обеспечивающий необходимые химические условия, и двухвалентные ионы, прежде всего Mg^{2+} , необходимые для работы многих ДНК-полимераз.

Одной из наиболее известных термостабильных полимераз является Taq DNA polymerase, первоначально полученная из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Значение термостабильности связано с тем, что во время ПЦР реакционная смесь многократно нагревается до высокой температуры. Обычная нетермостабильная полимераза быстро потеряла бы активность. Taq-полимераза выдерживает многократные температурные циклы, что позволило автоматизировать ПЦР.

Реакция проводится в приборе, называемом термоциклером. Термоциклер автоматически изменяет температуру реакционной смеси в соответствии с заданной программой. Каждый цикл классической ПЦР включает три основных процесса: денатурацию, отжиг праймеров и элонгацию.

Во время денатурации двухцепочечная ДНК нагревается, в результате чего взаимодействия между комплементарными основаниями ослабляются и две цепи разделяются. Образуются одноцепочечные матрицы, доступные для связывания праймеров.

После этого температура снижается и начинается стадия отжига, или annealing. Праймеры находят комплементарные последовательности на матричной ДНК и связываются с ними. Температура отжига является важным параметром реакции. Если условия выбраны неправильно, праймеры могут связываться недостаточно эффективно либо взаимодействовать с неподходящими участками ДНК, что снижает специфичность реакции.

Затем происходит элонгация, или extension. ДНК-полимераза начинает синтезировать новую цепь от 3'-конца праймера, используя матричную цепь ДНК. Синтез новой цепи всегда происходит в направлении 5'→3'.

Эти три процесса многократно повторяются. Именно циклический характер реакции объясняет название «полимеразная цепная реакция».

В идеализированном случае после одного цикла количество целевого продукта удваивается. После второго цикла количество снова увеличивается примерно в два раза и так далее. Поэтому на ранних стадиях реакции амплификация может быть близка к экспоненциальной.

Теоретическую зависимость можно представить выражением $N = N_0 \times 2^n$, где N_0 — исходное количество молекул-мишеней, а n — число циклов. Например, идеализированное тридцатикратное удвоение соответствует более чем миллиарду копий относительно исходной молекулы.

Однако реальная ПЦР не сохраняет стопроцентную эффективность на протяжении всей реакции. По мере накопления продукта расходуются реагенты, изменяются условия реакции, продукт начинает конкурировать с исходной матрицей, а активность фермента постепенно может снижаться. Поэтому после экспоненциальной фазы реакция замедляется и в конечном итоге приближается к плато.

Праймеры имеют принципиальное значение для специфичности ПЦР. Они фактически сообщают системе, какой участок ДНК необходимо амплифицировать. Если праймеры связываются только с необходимыми последовательностями, преимущественно образуется целевой продукт. Если же праймеры способны связываться с другими участками генома, могут возникать неспецифические продукты.

При проектировании праймеров учитываются их длина, нуклеотидный состав, температура плавления, возможность образования вторичных структур, комплементарность между праймерами и специфичность по отношению к исследуемой последовательности. Особенно нежелательно образование primer dimers — структур, возникающих вследствие взаимодействия праймеров друг с другом. Они могут конкурировать с целевой реакцией.

После завершения обычной ПЦР необходимо определить, образовался ли целевой продукт. Одним из классических способов является гель-электрофорез. Полученные фрагменты ДНК разделяются в геле в зависимости от размера. Параллельно используется DNA ladder — набор фрагментов известной длины. Сравнивая положение PCR-продукта с маркером, можно приблизительно определить его размер.

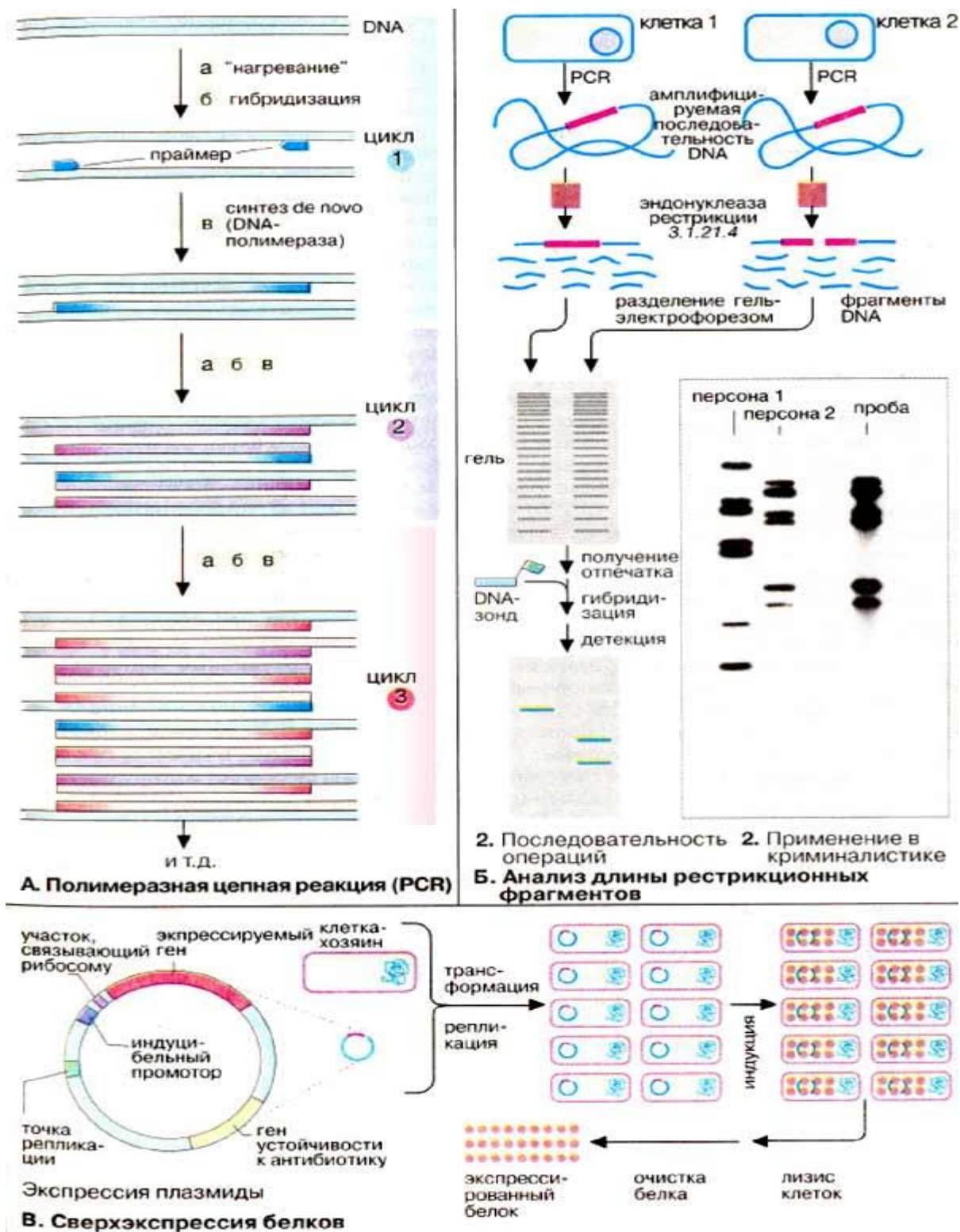


Рисунок 1: Основные молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) и экспрессия рекомбинантных белков.

Если ожидаемый ампликон должен иметь длину, например, 500 пар оснований, наличие отчетливой полосы приблизительно в области 500 бп является одним из признаков успешной амплификации. Однако совпадение размера само по себе не

всегда доказывает идентичность последовательности. При необходимости продукт дополнительно подтверждают, например, секвенированием.

Очень важной частью ПЦР являются контроли. Положительный контроль показывает, способна ли система обнаружить известную мишень. Отрицательный контроль помогает выявить возможную контаминацию или неспецифический сигнал. В зависимости от задачи могут использоваться и дополнительные внутренние контроли.

Контаминация представляет особую проблему именно для ПЦР. Метод способен многократно амплифицировать небольшое количество ДНК, поэтому даже следовые количества постороннего материала способны повлиять на результат. Источниками контаминации могут быть другие биологические образцы, лабораторные поверхности, инструменты или ранее полученные ампликоны. Поэтому организация ПЦР-лаборатории должна минимизировать перенос материала между этапами работы.

Классическая, или endpoint PCR, позволяет установить наличие ампликона после завершения реакции. Результат обычно анализируется электрофоретически. Этот вариант хорошо подходит для многих задач, где необходимо определить присутствие или отсутствие определенной последовательности либо получить фрагмент для дальнейшего исследования.

Однако возможности ПЦР значительно шире классической endpoint PCR. На основе базового принципа разработано большое количество модификаций.

Одной из наиболее важных является ПЦР в реальном времени — real-time PCR, часто обозначаемая как qPCR. В этом случае накопление продукта регистрируется непосредственно в ходе реакции с помощью флуоресцентного сигнала. Чем больше продукта образуется, тем сильнее становится регистрируемый сигнал в соответствующей системе.

Для регистрации могут использоваться красители, взаимодействующие с двухцепочечной ДНК, или специальные последовательностно-специфические зонды. Одним из известных вариантов являются TaqMan-зонды.

В qPCR анализируется не только конечное наличие продукта, но и динамика накопления сигнала. Для количественной интерпретации используется значение цикла, при котором флуоресцентный сигнал достигает заданного уровня. В зависимости от используемой системы и программного обеспечения этот параметр может обозначаться C_q или C_t.

В общем случае образец с большим исходным количеством мишени достигает заданного уровня сигнала раньше, то есть за меньшее количество циклов, чем образец с меньшим исходным количеством. Однако корректная количественная интерпретация требует соответствующих стандартов, контролей и понимания эффективности реакции.

Необходимо различать real-time PCR и reverse-transcription PCR. Сокращение RT-PCR исторически может создавать путаницу, поскольку RT может означать reverse transcription. Поэтому для анализа РНК с количественной регистрацией часто используется более однозначное обозначение RT-qPCR.

Обычная ДНК-полимераза работает с ДНК-матрицей. Если исследователь хочет изучать РНК, например матричную РНК определенного гена, сначала РНК переводят в комплементарную ДНК — cDNA. Этот процесс называется обратной транскрипцией и осуществляется ферментом обратной транскриптазой. Полученная cDNA затем используется как матрица для PCR.

Таким образом, общая логика RT-PCR выглядит следующим образом: РНК → обратная транскрипция → cDNA → PCR → анализ продукта. Если после обратной транскрипции применяется qPCR, схема будет: РНК → cDNA → qPCR → количественная оценка.

RT-qPCR широко используется при исследовании экспрессии генов. Если необходимо сравнить уровень экспрессии определенного гена в различных клетках или экспериментальных условиях, анализируют количество соответствующей РНК после ее преобразования в cDNA. При этом необходимы подходящие референсные гены и корректные методы нормализации.

Еще одной разновидностью является multiplex PCR. В обычной реакции используется одна пара праймеров для одной мишени. В multiplex PCR в одну реакционную смесь добавляется несколько пар праймеров, что позволяет одновременно амплифицировать несколько генетических участков.

Преимуществом multiplex PCR является возможность получить больше информации из одного образца при меньшем расходе реагентов и материала. Однако разработка такой системы сложнее, поскольку несколько пар праймеров должны эффективно работать в одинаковых реакционных условиях и не мешать друг другу.

Multiplex PCR используется, например, при анализе нескольких генетических маркеров, идентификации различных микроорганизмов и некоторых диагностических панелях.

Существует также allele-specific PCR, или аллель-специфическая ПЦР. Ее задача заключается в различении определенных вариантов последовательности. Праймер проектируется таким образом, чтобы его эффективное удлинение зависело от соответствия определенному аллелю. Такой подход может использоваться для генотипирования известных вариантов.

Другим подходом является PCR-RFLP. Сначала интересующий участок амплифицируется с помощью ПЦР. Затем PCR-продукт обрабатывается определенной рестриктазой. Если генетический вариант создает или разрушает сайт узнавания рестрикционного фермента, после обработки образуются фрагменты различной длины. Эти фрагменты можно разделить электрофорезом и по характеру полос определить генотип.

Следовательно, PCR-RFLP объединяет три основных принципа: амплификацию определенного участка ДНК, рестрикционный анализ и электрофоретическое разделение фрагментов.

Для повышения специфичности существуют различные модификации ПЦР. Например, в nested PCR используются два последовательных этапа амплификации с двумя наборами праймеров. Второй набор направлен на участок внутри первого ампликона. Такой подход способен повысить специфичность обнаружения, хотя одновременно требует особенно строгого контроля риска переноса ампликонов.

Hot-start PCR использует подходы, при которых активность полимеразы ограничивается до начала соответствующего температурного этапа реакции. Это помогает уменьшить образование некоторых неспецифических продуктов во время приготовления смеси и начального нагревания.

Еще одним важным направлением является digital PCR, или dPCR. В отличие от традиционной qPCR, реакционная смесь распределяется на большое количество отдельных микрообъемных реакций. После амплификации определяется доля положительных и отрицательных реакций, а исходное количество мишени рассчитывается с использованием статистической модели. Такой подход позволяет проводить высокочувствительное абсолютное количественное определение определенных последовательностей.

Digital PCR применяется при исследовании редких генетических вариантов, низкочастотных мишеней, вариаций числа копий и в других задачах, где необходима высокая чувствительность и точность количественного анализа.

Важным параметром ПЦР является специфичность. Под специфичностью понимают способность системы преимущественно амплифицировать именно необходимую последовательность. На нее влияют последовательности праймеров, температура отжига, концентрация компонентов, свойства полимеразы и качество исходной матрицы.

Второй характеристикой является чувствительность — способность обнаруживать небольшое количество исследуемой мишени. Высокая чувствительность является большим преимуществом ПЦР, но одновременно делает метод особенно чувствительным к контаминации.

Еще одной важной характеристикой является эффективность амплификации. В идеализированной модели эффективность соответствует удвоению количества продукта в каждом цикле. В реальных условиях эффективность может отличаться, поэтому при количественном анализе необходимо учитывать характеристики конкретной реакции.

Качество исходной ДНК существенно влияет на результат. Если препарат содержит ингибиторы, полимеразная реакция может протекать менее эффективно. Поэтому этапы выделения, очистки и количественного определения ДНК непосредственно связаны с успешностью ПЦР.

Например, исследователь может получить высокую концентрацию ДНК на спектрофотометре, но реакция будет работать плохо из-за присутствия загрязнителей. Именно поэтому высокая концентрация ДНК не является единственным показателем пригодности материала.

ПЦР широко используется в медицинской диагностике и биомедицинских исследованиях. С ее помощью можно обнаруживать определенные генетические последовательности, исследовать наследственные варианты, проводить генотипирование и анализировать экспрессию генов при использовании обратной транскрипции.

Большое значение ПЦР имеет в микробиологии. Если известна характерная генетическая последовательность микроорганизма, соответствующая система может использоваться для ее обнаружения. При этом молекулярное обнаружение последовательности и оценка биологического состояния микроорганизма — не всегда одно и то же, поэтому результаты должны интерпретироваться с учетом типа образца и поставленной задачи.

В генетике ПЦР является одним из основных методов подготовки материала для анализа полиморфизмов. Интересующий участок гена сначала амплифицируется, а затем может исследоваться методом PCR-RFLP, секвенированием по Сэнгеру или другими способами.

ПЦР используется и при молекулярном клонировании. Необходимый ген или другой участок ДНК можно амплифицировать, после чего полученный фрагмент используется для создания рекомбинантной конструкции.

В криминалистической генетике PCR позволяет амплифицировать определенные генетические маркеры из ограниченного количества биологического материала. Особенно важную роль играет анализ STR-локусов, который позволяет формировать генетические профили.

В сельском хозяйстве ПЦР применяется для генотипирования растений и животных, исследования генетических маркеров, выявления определенных патогенов и молекулярной характеристики селекционного материала.

В экологических исследованиях ПЦР и qPCR используются при анализе environmental DNA, или eDNA. ДНК организмов может обнаруживаться в образцах воды, почвы и других компонентов окружающей среды. Это позволяет исследовать

присутствие определенных видов без непосредственного обнаружения каждого организма.

ПЦР тесно связана с секвенированием. Перед секвенированием по Сэнгеру часто амплифицируется конкретный участок ДНК. В технологиях NGS амплификация также может использоваться на различных этапах подготовки библиотек, хотя конкретные схемы зависят от платформы и экспериментального дизайна.

Несмотря на огромные возможности, ПЦР имеет ограничения. Метод обнаруживает определенную нуклеотидную последовательность, но сам факт обнаружения этой последовательности не всегда позволяет сделать полный биологический или клинический вывод. Кроме того, ошибки проектирования праймеров, загрязнение образцов, наличие ингибиторов, низкое качество матрицы и неправильная интерпретация могут привести к недостоверным результатам.

Возможны ложноположительные результаты, когда сигнал обнаруживается при отсутствии интересующей исследователя мишени в исходном образце, например вследствие контаминации. Возможны и ложноотрицательные результаты, когда мишень присутствует, но не обнаруживается из-за недостаточного количества материала, ингибирования реакции, проблем с праймерами или других факторов.

Поэтому корректная ПЦР включает не только реакционную смесь и термоциклер, но и полноценную систему контроля качества: правильный отбор и хранение образца, качественное выделение ДНК или РНК, корректный дизайн праймеров и зондов, соответствующие положительные и отрицательные контроли и правильную интерпретацию результатов.

Если представить весь процесс ПЦР в упрощенном виде, получится следующая последовательность:

биологический образец → выделение ДНК или РНК → оценка качества и количества → подготовка реакционной смеси → денатурация → отжиг праймеров → элонгация → многократное повторение циклов → регистрация или анализ продукта → интерпретация результата.

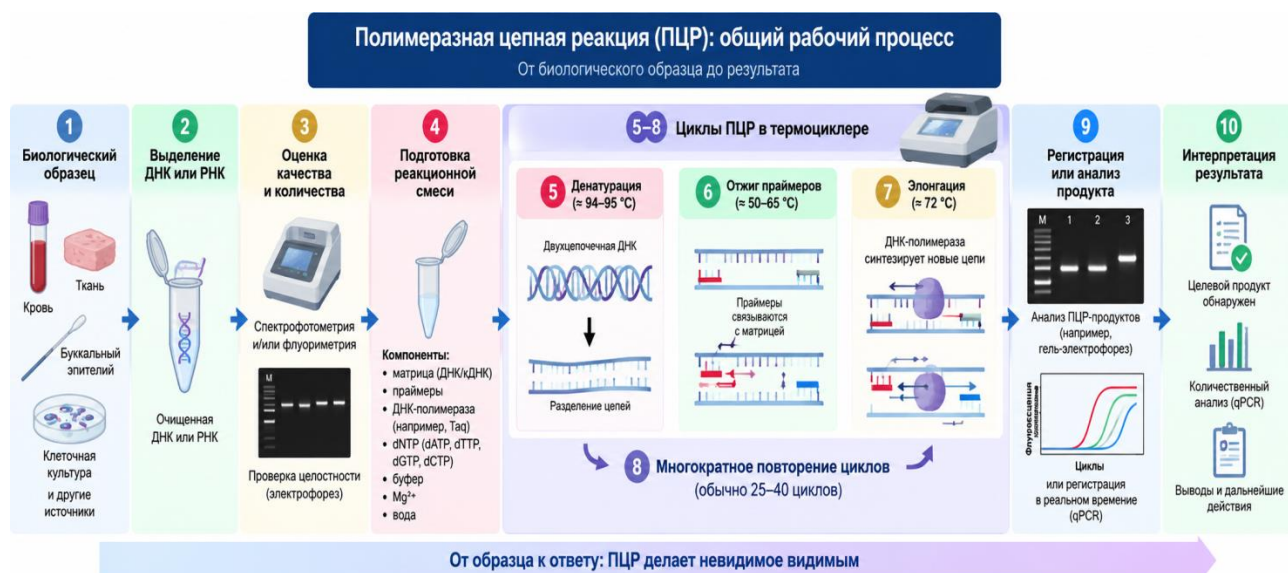


Рисунок 2: Общая схема проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР): от подготовки биологического образца до анализа и интерпретации результатов.

Различные виды ПЦР решают разные задачи. Классическая endpoint PCR отвечает прежде всего на вопрос о наличии и размере амплифицированного продукта.

qPCR позволяет регистрировать накопление продукта в реальном времени и проводить количественный анализ. RT-PCR дает возможность работать с РНК после стадии обратной транскрипции. RT-qPCR сочетает обратную транскрипцию с количественной PCR. Multiplex PCR позволяет одновременно исследовать несколько мишеней. Allele-specific PCR используется для различения определенных генетических вариантов. PCR-RFLP сочетает амплификацию с рестрикционным анализом. Digital PCR обеспечивает высокочувствительное количественное определение путем разделения образца на множество отдельных реакций.

Таким образом, ПЦР следует рассматривать не как один метод, а как целое семейство технологий, основанных на общем принципе ферментативной амплификации нуклеиновых кислот.

Для будущего специалиста по биотехнологии важно понимать не только последовательность температурных стадий, но и логику метода. Праймеры определяют, какой участок будет копироваться. ДНК-полимераза синтезирует новые цепи. dNTP являются строительным материалом. Mg^{2+} и буфер создают необходимые условия для работы фермента. Термоциклер обеспечивает повторение температурных стадий. Контроли позволяют оценивать надежность результата.

Главный принцип можно сформулировать следующим образом: ПЦР превращает небольшое количество определенной генетической последовательности в количество копий, достаточное для надежного обнаружения и дальнейшего анализа.

В упрощенном виде один цикл можно представить как:

двухцепочечная ДНК → денатурация → две отдельные цепи → отжиг праймеров → элонгация ДНК-полимеразой → новые двухцепочечные молекулы → следующий цикл.

При многократном повторении этой последовательности происходит значительное накопление целевого ампликона.

Таким образом, полимеразная цепная реакция является одной из центральных технологий современной молекулярной биологии. Она объединяет знания о структуре ДНК, принципе комплементарности, работе ДНК-полимеразы и температурной денатурации нуклеиновых кислот. На основе классической ПЦР были созданы многочисленные специализированные методы, позволяющие решать задачи от простого обнаружения фрагмента ДНК до количественного анализа, исследования экспрессии генов и высокочувствительного обнаружения редких вариантов.

Понимание принципов ПЦР является необходимой основой для дальнейшего изучения генотипирования, секвенирования, молекулярной диагностики, геномики и других направлений ДНК-технологий.