

Министерство сельского хозяйства и продовольствия  
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная  
академия ветеринарной медицины

**Кафедра микробиологии и вирусологии**

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ  
И ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ**

Учебно-методическое пособие для студентов по специальностям

1-74 03 02 «Ветеринарная медицина»,

1-74 03 05 «Ветеринарная фармация»,

магистрантов и аспирантов

Витебск  
ВГАВМ  
2021

УДК 573.6.086.83  
ББК 28.070  
И63

Рекомендовано к изданию методической комиссией  
факультета ветеринарной медицины УО «Витебская ордена  
«Знак Почета» государственная академия ветеринарной  
медицины» от 28 мая 2021 г. (протокол № 19)

Авторы:

кандидат ветеринарных наук, доцент *А. А. Вербицкий*; старший преподаватель *А. Г. Кошнеров*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Р. Б. Корочкин*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Ю. А. Столярова*; ассистент *С. Н. Гвоздев*

Рецензенты:

заведующий лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ, доктор биологических наук, доцент *П. П. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Я. П. Яромчик*

**Иммунохимические и молекулярно-генетические методы в биотехнологии и лабораторной практике** : учеб.-метод. пособие для И63 студентов по специальностям 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина», 1-74 03 05 «Ветеринарная фармация», магистрантов и аспирантов / *А. А. Вербицкий [и др.]*. – Витебск : ВГАВМ, 2021. – 68 с.

Пособие написано в соответствии с программой дисциплин «Молекулярная биотехнология и иммунология», «Биотехнология». В нем рассматриваются иммунохимические и молекулярно-генетические методы, применяемые в биотехнологии и лабораторной практике.

**УДК 573.6.086.83**  
**ББК 28.070**

© УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Тема 1. Радиоиммунологический анализ	5
Тема 2. Иммуноферментный анализ	13
Тема 3. Блоттинг	25
Тема 4. Полимеразная цепная реакция	34
Тема 5. Секвенирование нуклеиновых кислот	52
Список использованной литературы	66

## ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология занимает ведущее положение в системе биологических, медицинских, ветеринарных и зоотехнических исследований и представляет собой современную прогрессивную форму промышленной технологии, основу которой составляют биологические объекты – человек, животные, растения, микроорганизмы, клетки и вирусы.

**Биотехнология** – это наука об использовании биологических процессов в производственных целях, которая изучает методы получения полезных для человека целевых продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры.

В соответствии с определением Европейской федерации биотехнологов (ЕФБ, 1984) биотехнология (от греч. *bios* – жизнь, *teken* – искусство, *logos* – слово, учение, наука) базируется на интегральном использовании биохимии, микробиологии и инженерных наук в целях промышленной реализации способностей микроорганизмов, культур клеток тканей и их частей.

Фундаментом современной биотехнологии являются микробиология, вирусология, генетика, биохимия, биофизика, технология, приборостроение. Сочетанное использование основных элементов указанных дисциплин позволяет создавать производственные системы для выпуска биологических препаратов, предназначенных для индикации возбудителей, диагностики, профилактики инфекционных болезней и лечения животных.

По определению Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА – European Medicines Agency), биологические лекарственные препараты – это иммунобиологические лекарственные средства, произведенные путем биотехнологических процессов с применением технологии рекомбинантной ДНК; методов контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков; методов гибрида и моноклональных антител, а также генотерапевтические и соматотерапевтические лекарственные средства.

Современные биотехнологические производства представляют собой сложный комплекс взаимосвязанных биохимических, физико-химических и биологических процессов, оптимизация которых возможна на клеточном, популяционном, биоценоотическом и аппаратурно-технологическом уровне.

Прогресс во многих областях биотехнологии, медицины, ветеринарии в значительной мере связан с широким использованием нового поколения количественных иммунохимических и молекулярно-генетических методов, среди которых наибольшее распространение получили твердофазные варианты радиоиммунного (РИА) и иммуноферментного (ИФА) анализа, блоттинга, полимеразная цепная реакция, секвенирование.

Применение этих методов в биотехнологии обусловлено тем, что они обладают высокой специфичностью, чувствительностью, воспроизводимостью и точностью, позволяющими дать окончательный ответ при исследовании материала, а также производительностью и возможностью автоматизации.

## *Тема 1*

# **РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципами радиоиммунологического анализа, изучить методику его постановки.

**Время, отводимое на изучение темы:** 2 часа.

### **1.1. Принцип метода**

*Радиоиммунологический (радиоиммунный) анализ (РИА)* – метод количественного определения биологически активных веществ в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомым стабильных и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами с последующей детекцией на специальных счетчиках (радиоспектрометрах).

В основе метода лежит применение антигенов и антител, меченных радионуклидами. Такая метка позволяет с помощью современных приборов выявить и количественно определить содержание исследуемого вещества в различных тканях и биологических субстратах.

Основой метода РИА является конкуренция определяемого антигена из биологической жидкости с рассчитанным количеством идентичного антигена, меченного изотопом, за сайты связывания ограниченного количества антител. Комплекс антиген-антитело отделяется от свободного антигена добавлением антивидовых антител (как правило поликлональных), белка А бактерий семейства *Staphylococcaceae*, микробус либо других микрочастиц, меченных антивидовыми антителами к иммуноглобулинам, использованным в качестве центров связывания антигена с последующим центрифугированием. Надосадочная жидкость удаляется, а остаточная радиоактивность иммунных комплексов измеряется на гамма-счетчике. Таким образом, чем больше антигена содержится в биологической жидкости, тем меньшее количество радиоактивно меченного компонента окажется в составе комплексов.

Для количественного определения антигена используются стандарты с известным количеством антигена и необходимо построение калибровочного графика.

Как следует из указанной схемы постановки эксперимента, интенсивность радиоактивного излучения будет обратно пропорциональна концентрации антигена в образце. Позже вышеописанная схема анализа была преобразована в твердофазный вариант, который заключается в иммобилизации антител на поверхности пробирки, где и протекают все реакции. Таким образом, отпадает необходимость в осаждении иммунных комплексов и число стадий процесса сокращается.

Радиоиммунологический анализ произвел революцию в эндокринологии, оказал преобразующее влияние на развитие гематологии и фармакологии. Его разработчикам в 1977 г. была присуждена Нобелевская премия.

К преимуществам РИА относятся:

- высокая чувствительность – способность измерительной системы регистрировать минимальные количества веществ;
- высокая специфичность – способность системы измерять только одну, строго определенную субстанцию;
- надежность – способность определить истинное количество вещества;
- точность, характеризующая воспроизводимость получаемых результатов.

По этим параметрам РИА значительно превосходит классические биологические методы определения – РА, РСК, РНГА и др. РИА имеет много общего с ИФА, а принципиальным отличием является индикаторная метка: вместо фермента используется радиоактивный изотоп.

Однако данный метод имеет ряд недостатков:

- короткий срок жизни антител и антигенов, меченных радиоактивными изотопами, ограниченный периодом его полураспада;
- высокая стоимость разового определения, обусловленная стоимостью регистрирующей аппаратуры;
- отсутствие полевых вариантов регистрирующей аппаратуры, что делает невозможным использование РИА в лабораториях, ведущих широкие серологические обследования;
- усиленные меры по технике безопасности, связанные с радиационным риском для персонала;
- риск загрязнения окружающей среды радиоактивными продуктами.

В настоящее время данный метод используется для анализа низкомолекулярных антигенов (стероидные гормоны, Т3, Т4 и т.д.) в лабораториях, имеющих разрешение и допуск к работам с радиоактивными элементами.

Основные принципы радиоиммунологических методов разработаны в двух независимых научных центрах Нью-Йорка и Лондона. В 1960 г. Yalow R. и Bersol S. опубликовали классическую работу по радиоиммунологическому определению содержания эндогенного инсулина в плазме крови человека, которая ознаменовала новый этап в области применения радионуклидов в биологии.

Наибольшее распространение нашел метод РИА на твердофазных носителях, таких как целлюлоза, декстрин, полимеры и т.п. Он был значительно упрощен и приобрел особую ценность, когда выяснилось, что в качестве твердой фазы для образования иммунных комплексов можно использовать обычные полистирол, поливинилхлорид и другие пластики, исходя из их сорбционной способности. Однако в каждом случае необходимо подбирать оптимальные условия постановки РИА, вследствие различия адсорбционных свойств разных партий используемых полимеров.

Большое внимание уделяют автоматизации РИА, позволяющей не только сократить время анализа, но и повысить его чувствительность, специфичность, точность и воспроизводимость. Полная автоматизация была описана Ekins R.

(1979 г.). Она включала не только обработку проб и подсчет результатов, но и оптимизацию процессов и параметров путем включения в систему компьютера. Более поздним подходом к автоматизации РИА являются разработки дискретных анализаторов и создание модульных систем, состоящих из нескольких модулей: разбавителя образцов, дозатора реагентов, фильтрации и др.

Методом РИА проводится определение различных веществ в биологических субстратах, где он превосходит другие лабораторные методы в плане чувствительности, стоимости анализа, затрат времени и возможности автоматизации. Он позволяет в ряде случаев определить компоненты тканевых экстрактов и жидкостей без их дополнительной очистки и выделения.

**Иммунологический аспект.** С точки зрения взаимодействия антитела и антигена, метод РИА аналогичен серологическим реакциям, используемым в диагностике, и отличается от них способом индикации образования комплекса антиген-антитело.

При появлении чужеродного антигена, иммунологически отличающегося от собственных антигенов, в организме активируются определенные популяции лейкоцитов, выполняющие 2 основные функции иммунной защиты: захват, разрушение и элиминация крупных чужеродных структур (бактерий и вирусов) и формирование иммунного ответа, в том числе, выработка антител против этого антигена.

Антитела, вырабатываемые к какому-либо антигену, являются специфичными, причем антитела, специфичные к одной и той же антигенной детерминанте антигена, обладают идентичной структурой связывающего центра. Вследствие того, что относительно крупные белковые антигены, как правило, имеют несколько различных антигенных детерминант, в организме при иммунном ответе образуется достаточно широкий спектр специфичностей антител, что и обуславливает гетерогенность (неоднородность) популяции антител в организме. Гетерогенность обусловлена также и собственно структурой связывающего центра антител.

С наличием такой гетерогенности антител связана их перекрестная реактивность, которая означает, что некоторые антитела, имеющие очень низкое сродство к вызывающему иммунный ответ антигену, способны также образовывать иммунные комплексы с другими (не родственными) антигенами, имеющими структурно подобные антигенные детерминанты. Таким образом, чем менее специфично антитело, тем больше вероятность перекрестной реакции.

Большинство антител относятся к классу иммуноглобулинов G, являющихся двухвалентными (имеющими два связывающих антиген центра). Это означает, что они способны взаимодействовать с двумя идентичными молекулами антигена. Антигены могут быть одно-, двух- или поливалентными (имеющими один, два или более идентичных по структуре и специфичности антигенных детерминант). Валентность антител и антигенов определяет тип реакции, которая может происходить между ними в системе *in vitro* (в пробирках). Поливалентные антигены, соединяясь в комплексы с двухвалентными или поливалентными антителами, образуют полимолекулярные структуры, называемые приципитатами и агглютинатами. Если существует избыток антител, образуемые ком-

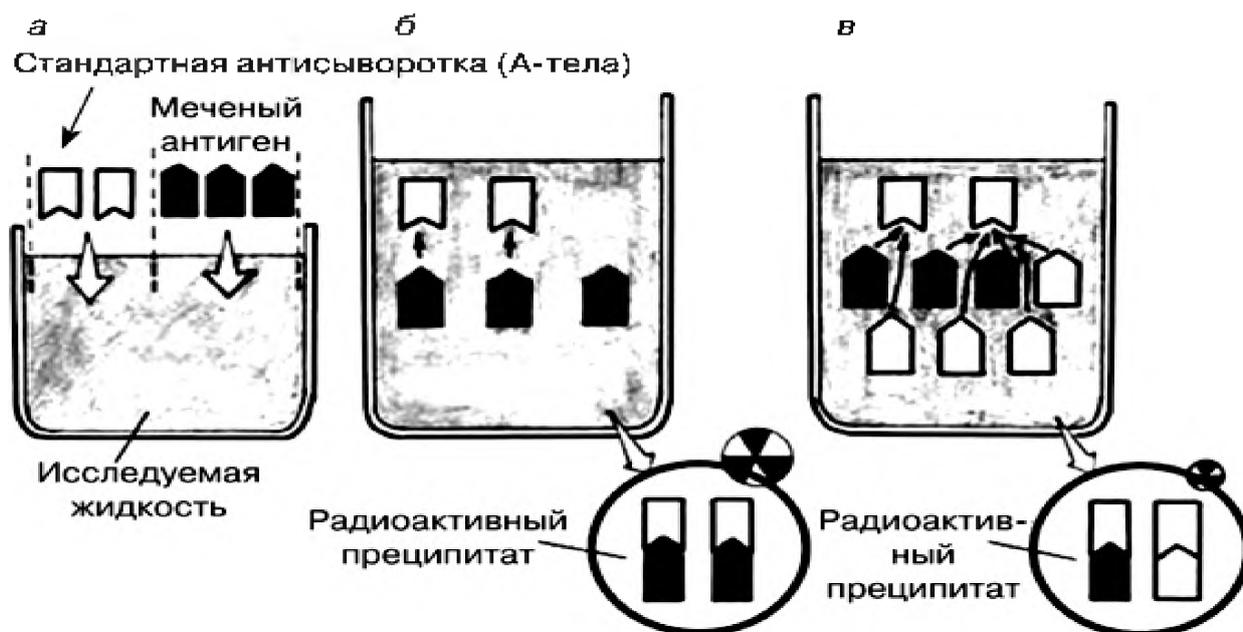
плексы, как правило, являются нерастворимыми. При классических реакциях РИА образуется растворимый комплекс.

**Химический аспект.** В РИА сочетается специфичность, свойственная реакциям «антиген-антитело», с чувствительностью и достаточной простотой, которые дает применение радиоактивной метки. В наибольшей степени эти преимущества сочетаются в конкурентном РИА. Для проведения этого анализа необходимо иметь специфические антисыворотки и меченые антигены при выявлении антигенов и специфические антигены и меченые радионуклидом антитела при выявлении антител.

При выявлении антигенов метод основан на конкуренции определяемого немеченого антигена с известным количеством меченого антигена за ограниченное количество добавленных в систему специфических антител.

При этом количество меченого антигена, который связывается в иммунных комплексах, обратно пропорционально количеству немеченого антигена, содержащегося в исследуемом материале.

Оба конкурирующих взаимодействия представлены на рисунке 1.1.



*а* – добавление в исследуемую жидкость стандартной антисыворотки с антителами и мечеными радиоактивным изотопом; *б* – образование радиоактивных преципитатов при отсутствии в исследуемой жидкости искомого антигена; *в* – образование радиоактивных преципитатов при наличии в исследуемой жидкости искомого антигена

**Рисунок 1.1 – Принцип РИА (по Бургасовой, Безденежных, 1969)**

Специфичность метода может быть снижена из-за перекрестной реактивности антисывороток и гетерогенности антигена. Решающее значение при этом имеет способ получения антисывороток. В идеале хорошо было бы иметь моноспецифические антитела, но их технологически трудно получить. Для РИА считается достаточным 50%-ное связывание меченого антигена в отсутствие холодного антигена. Если константа равновесия является низкой, то количество антител, необходимых для адекватного связывания антигена, должно быть уве-

лично. Однако избыток свободных антител будет снижать действие холодного антигена в этой системе. Чувствительность данной системы будет низкой и в том случае, если меченый антиген будет иметь низкую удельную радиоактивность. В данной ситуации для достаточного связывания меченого антигена потребуется введение в систему большого количества антител.

В растворе, где присутствуют антигены и специфические антитела, между ними устанавливается динамическое равновесие (по закону действия масс).

## 1.2. Радиоактивные изотопы и методы метки

В РИА большое значение имеет выбор радиоактивного изотопа в качестве маркера.

Наиболее часто для этих целей используются изотопы  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  ( $\beta$ -излучатели) и  $^{125}\text{I}$  ( $\gamma$ -излучатель).

Для метки антител и белковых антигенов наиболее перспективными являются  $\gamma$ -излучатели, и в частности,  $^{125}\text{I}$ , несмотря на его более короткий период полураспада, чем у  $^{14}\text{C}$  и  $^3\text{H}$ . Для регистрации мягкого  $\beta$ -излучения этих изотопов требуется более сложное и дорогое оборудование с жидкостцинтилляционной детекцией.

Техника мечения  $\beta$ -излучателями является более трудоемкой и технически сложной. Определение  $\gamma$ -излучения представляет собой значительно более простую и дешевую операцию. Она не требует подготовки образцов, что позволяет экономить время и реактивы.

Необходимым условием для высокой чувствительности РИА является высокая специфическая радиоактивность меченого вещества, что может быть достигнуто в основном при использовании изотопов с  $\gamma$ -излучением. Выбор метода йодирования определяется природой и свойствами изучаемого белка и дальнейшим его использованием. Лактопероксидазный метод (Thorell J. et al., 1971) предпочтительнее, когда необходимо сохранить биологическую активность меченого белка при изучении его *in vivo*. Метод Wolfon A. et al. (1973) нужно применять в тех случаях, когда антиген не может быть помечен другими способами. Большинство белков и полипептидов может быть с успехом йодировано хлораминовым методом без потери их иммунологической специфичности (Hunter W. et al., 1962). Поэтому для РИА во всех случаях, где это возможно, необходимо применять метод метки йодом с использованием хлорамина-Т.

Порядок приготовления и контроль радионуклидных конъюгатов:

- в коническую колбу вносят иммуноглобулины, растворенные в 0,05М ФБР (рН 7,5) с концентрацией 10 мг/мл, и добавляют радиоактивный йод (на 1 мг иммуноглобулинов кролика 1,5-3,2 мКи, крупного рогатого скота – 1,8-2,0 и протеина А – 5,0 мКи);
- реакцию активизируют внесением 0,1-0,2 мг хлорамина-Т, смесь энергично встряхивают в течение 60-75 с при температуре +20...+22°C; реакцию останавливают добавлением по 0,2 мл (2 мг/мл) растворов метабисульфата натрия и йодистого калия;

- смесь наносят на колонку (диаметр 1,6 см, длина 40 см) с сефадексом Г-25 или Г-50 и проводят гель-фильтрацию, используя в качестве элюирующего раствора 0,05М ФБР (рН 7,5); выход белка контролируют торцовым счетчиком, йодированный белок выходит первым пиком.

Полученные радионуклидные конъюгаты контролируют по удельной радиоактивности, проценту кислотонерастворимой фракции и степени йодирования. Удельную радиоактивность препаратов определяют на гамма-счетчике, а содержание белка – по методу Лоури.

### 1.3. Техника постановки РИА

В классическом варианте РИА используется конкурентный тип постановки реакции. В конкурентную среду вводят известное количество меченого антигена, который конкурирует с определяемым антигеном за места связывания специфических антител.

Основные недостатки конкурентных методов заключаются в том, что для каждого определяемого антигена необходимо разрабатывать методы маркировки и способы получения антигенов высокой степени очистки. Если антиген трудно выделить в чистом виде или провести его метку, наиболее подходящими способами его обнаружения являются варианты с использованием меченых антител.

Наибольшее распространение получил «сэндвич»-вариант РИА, который ставят по следующей схеме:

*1 этап.* Полистироловые пластины сенсibiliзируют иммуноглобулинами в концентрации 20-25 мкг/мл в дистиллированной воде в течение 16-18 часов при температуре +20...+22°C.

*2 этап.* Остаточные сорбционно-активные центры на полистироле пластин блокируют 1%-ным раствором БСА в 0,02М ФБР (рН 7,2) в течение 60 минут при температуре +37°C.

*3 этап.* Исследуемые пробы антигенов наслаивают в ФБР (рН 7,4) с 0,05% твин-20 и выдерживают 60 минут при температуре +37°C.

*4 этап.* Специфический конъюгат наслаивают в ФБР (рН 7,4) с 0,05% твин-20 в рабочем разведении 200 тыс. имп./минуту и выдерживают 60 минут при температуре +37°C.

Все компоненты реакции используют в объеме 0,1 мл. После каждого этапа (наслоения) пластину 3-кратно отмывают физиологическим раствором (рН 7,4) с 0,05% твин-20.

При постановке реакции используют контроли:

- *контроль конъюгата:* в первый ряд лунок сенсibiliзированной пластины вместо антигена вносят физиологический раствор (рН 7,4) с 0,05% твин-20. Контроль конъюгата выявляет неспецифическое связывание меченых иммуноглобулинов с сенсibiliзированной пластиной;

- *положительный контроль*: в 2 лунки 2-го ряда сенсibilизированной пластины вносят стандартный специфический антиген;
- *отрицательный контроль*: в 2 лунки 2-го ряда сенсibilизированной пластины вместо антигена вносят питательный бульон.

В качестве другого варианта РИА, особенно ценного в тех случаях, когда исследователь располагает лишь небольшим количеством антител, предложена непрямая методика, при которой используют антивидовые меченые антитела, направленные к иммуноглобулинам применяемой антисыворотки.

На рисунках 1.2 и 1.3 представлены принципиальные схемы жидкофазного и твердофазного вариантов РИА.

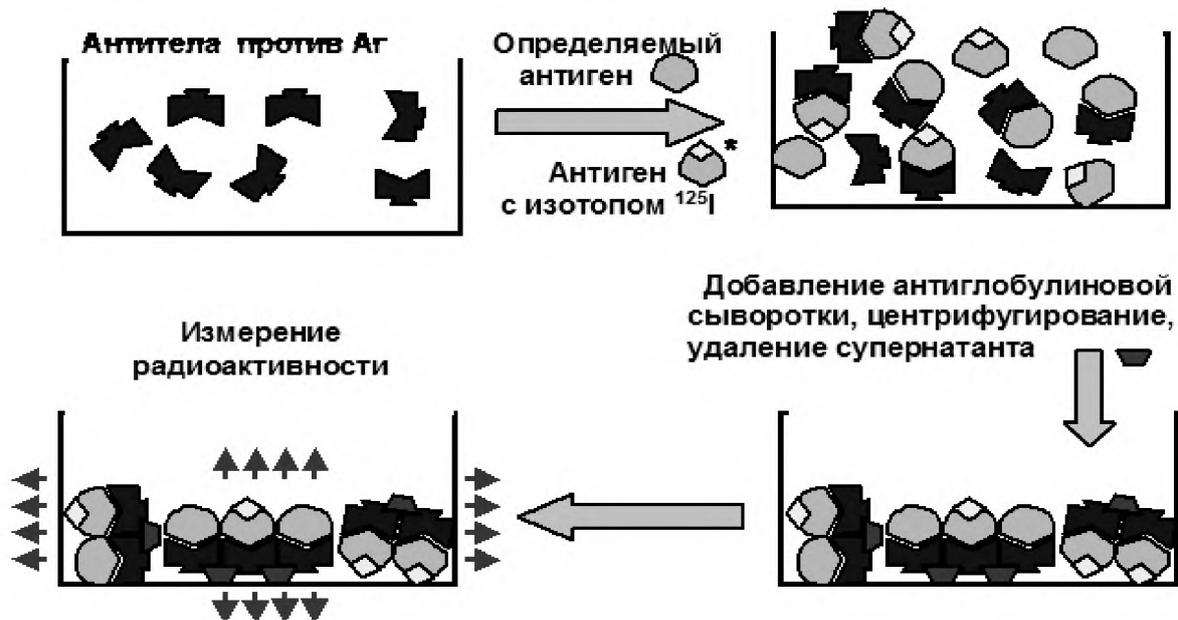


Рисунок 1.2 – Принципиальная схема жидкофазного варианта РИА  
(Герловский Д.О., 2016)

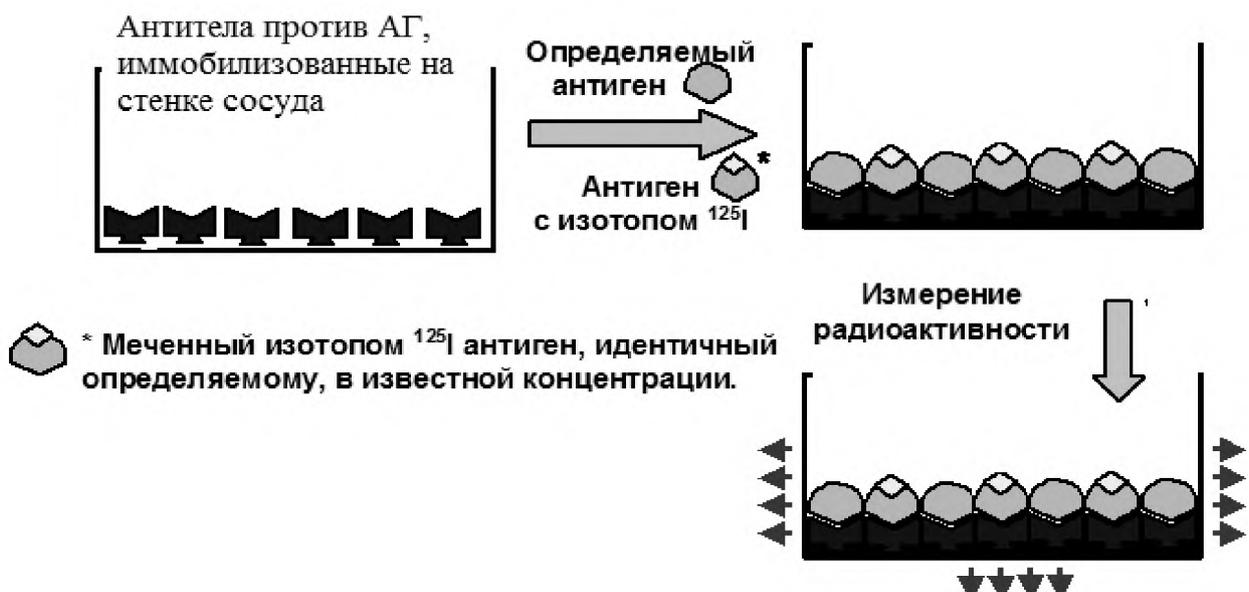


Рисунок 1.3 – Принципиальная схема твердофазного варианта РИА  
(Герловский Д.О., 2016)

## 1.4. Учет и оценка результатов РИА

Важной стадией разработки РИА является учет и оценка результатов.

Данный метод предполагает автоматический инструментальный учет, что исключает субъективность оценки и снижает практически до нуля возможность ошибочного толкования полученных результатов. Инструментальный учет результатов проводят просчетом лунок в колодце гамма-счетчика «Гамма-1». Исследуемая проба считается положительной при превышении счета связанной радиоактивности опытных образцов со специфическим антигеном над контролями в 2,5 и более раз.

Для визуального учета результатов РИА может быть использована автордиография на рентгеновской пленке. Сущность этого процесса заключается в том, что на последнем этапе постановки реакции, после отмывания меченого препарата, под пластинку подкладывается свинцовый коллиматор с отверстиями и лист рентгеновской пленки любой марки. Смонтированная система тщательно изолируется от света и оставляется на экспозицию в течение 24-48 часов. Проявление пленки осуществляется согласно наставлению по ее применению, и сравниваются пятна затемнения от радиоактивного излучения положительных проб и контролей. Проба считается положительной при наличии интенсивно черной окраски.

### Контрольные вопросы

1. В чем заключается сущность радиоиммунного анализа?
2. Какие преимущества и недостатки имеет РИА?
3. Какие компоненты, материалы и оборудование используют при постановке РИА?
4. В чем заключается техника постановки и учета РИА?

## *Тема 2*

### **ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ**

**Цель занятия:** ознакомиться с принципами иммуноферментного анализа, изучить методику его постановки в различных вариантах.

**Время, отводимое на изучение темы:** 2 часа.

#### **2.1. Принцип метода**

*Иммуноферментный анализ (ИФА)* – иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген – антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью субстрата, изменяющего свою окраску под действием фермента.

Метод ИФА является высокочувствительным и высокоспецифичным иммунодиагностическим тестом, с помощью которого проводят качественное и количественное определение различных веществ, обладающих свойствами антигена, гаптена (неполноценного антигена) или антитела. Метод ИФА широко используется для диагностики инфекционных и незаразных заболеваний человека и животных, а также может применяться для подтверждения качества биологических лекарственных препаратов.

Принцип ИФА заключается в специфическом взаимодействии антигена и антитела, создании комплекса «антиген – антитело – конъюгат» и определении образовавшегося комплекса при помощи субстратной смеси по степени окраски. Детекция может быть как прямой (когда исследуемое вещество само обладает ферментативной активностью, либо оно помечено ферментной меткой), так и косвенной или непрямой (когда исследуемое вещество, связавшееся с иммобилизованными на твердой фазе антителами, инкубируется с белками (антитела против иммуноглобулинов, белок А стафилококков и др.), мечеными ферментом).

Качественный анализ позволяет получить информацию о содержании антигена или антитела в исследуемом материале, а при проведении количественного анализа определяют концентрацию антигена или антитела в исследуемом материале с использованием калибровочного графика.

ИФА применяется для определения различных физиологически активных веществ с использованием ферментов в качестве маркеров антигенов и антител. Сочетание высокой специфичности антител и каталитической активности ферментов позволило создать универсальный метод для определения широкого класса соединений в диапазоне концентраций  $10^{-1}$  до  $10^{-12}$  г/мл.

Впервые этот метод был разработан в 1966 г. для обнаружения внутри клеток различных антигенов и антител. До 1971 г. ИФА использовали преимущественно в гистологических исследованиях для определения мест локализации антигенов в срезах тканей различных органов.

В начале 1970-х гг. основное внимание исследователей было направлено на разработку методов ИФА для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях.

Основными направлениями применения ИФА являются:

- контроль качества биопрепаратов и соблюдение норм на предприятиях биологической промышленности;
- ранняя диагностика инфекционных болезней;
- проведение массовых эпизоотологических обследований в целях своевременной профилактики животных от ряда инфекционных заболеваний, наносящих значительный ущерб животноводству;
- определение иммунологического статуса у животных и изучение эффективности применения вакцин.

Метод ИФА включает 3 основных этапа:

- 1) образование иммунного комплекса «антиген (исследуемое вещество) – специфическое к нему антитело» или наоборот;
- 2) формирование связи конъюгата с образовавшимся на предыдущем этапе иммунным комплексом или со свободными местами связывания (детерминантами);
- 3) преобразование субстрата под действием ферментной метки в регистрируемый сигнал в результате биохимической реакции.

Современные методы выполнения иммуноферментного анализа подразделяются на 2 группы, принципиально отличающиеся способом отделения связавшегося с антителами (антигеном) ферментного конъюгата от свободного: гомогенные и гетерогенные.

Методики, в которых все 3 стадии ИФА проходят в растворе, и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, относятся к группе *гомогенных методов ИФА*.

В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит процесс ингибирования активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. В результате реакции «антиген – антитело» активность фермента восстанавливается. При образовании иммунного комплекса «антиген – антитело», содержащего ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена происходит связывание все большего количества антител, и сохраняется все больше свободных конъюгатов «антиген – фермент», способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат.

Существенным достоинством гомогенного ИФА является экспрессность определения, которая составляет 2–5 минут. В настоящее время налажен промышленный выпуск различных тест-систем для быстрого выявления токсинов, стероидных гормонов, гаптенов, лекарственных соединений в биологических жидкостях. К недостаткам следует отнести меньшую чувствительность, чем в гетерогенном ИФА (~ 1 мкг/мл).

Для *гетерогенных методов ИФА* характерно проведение анализа в 2-фазной системе с участием твердой фазы (носителя) и обязательна стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе).

Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют *твердофазными методами*.

Методы относятся к *гомогенно-гетерогенным*, если 1 стадия (образование специфических комплексов) происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

Метод гетерогенного ИФА состоит из 3 основных этапов:

- 1) иммобилизация антигена или антитела на твердой фазе (полученный комплекс называется *иммуносорбентом*);
- 2) удаление несвязавшегося реагента и блокирование сайтов связывания на твердой подложке с помощью блокирующих белков (альбумин, казеин); инкубация анализируемого препарата с иммуносорбентом, чтобы произошло их связывание;
- 3) детекция благодаря ферментативной активности самого исследуемого вещества или благодаря связанной с анализируемым препаратом ферментативной метке (прямой вариант). В некоторых случаях производится дополнительная инкубация комплекса «иммуносорбент – исследуемое вещество» с вторичными антителами, конъюгированными с ферментативной меткой (непрямой вариант).

Количественное определение исследуемого вещества осуществляется путем добавления подходящего для используемого детектора субстрата и сравнения сигнала исследуемого вещества со стандартным образцом.

Метод гетерогенного ИФА подразделяют на неконкурентный и конкурентный ИФА.

Схемы анализа могут быть модифицированы в процессе разработки лекарственного препарата в соответствии с необходимыми требованиями. Изменения должны быть указаны в фармакопейной статье или нормативной документации. Выбор способа постановки ИФА зависит от природы исследуемого вещества и его количества, т.к. разные виды ИФА обладают различной чувствительностью.

Для оценки качества веществ, содержащих антитела, возможно использование специфичных антиидиотипических антител.

**Неконкурентный метод ИФА** подразделяется на несколько видов по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело).

*Прямой вариант ИФА.* Может выполняться 2 способами. В первом случае исследуемое вещество (антиген) непосредственно иммобилизовано на твердой фазе; тогда связавшееся с антигеном меченое антитело является детектором. При выполнении теста иным способом используют иммобилизованные на твердой фазе антитела. В этом случае детектором является исследуемое вещество, меченное ферментом.

*Косвенный (непрямой) вариант ИФА.* При выполнении непрямого варианта ИФА антиген иммобилизован на твердой фазе. После блокировки к антигену прибавляют раствор специфических к нему антител. После инкубации образовавшийся комплекс «антиген – антитело» отмывают от несвязавшихся антител и добавляют меченный ферментом анти-иммуноглобулин, выступающий в роли детектора. Такие детекторы коммерчески доступны для конкретных классов и подклассов иммуноглобулинов, что делает этот формат анализа удобным для изотипирования антител, а использование меченого антииммуноглобулина усиливает сигнал по сравнению с прямым методом иммуноферментного анализа, тем самым увеличивая чувствительность анализа.

Наиболее распространенным неконкурентным методом ИФА является «сэндвич» метод. При его выполнении на твердой фазе иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Затем к ним прибавляют исследуемое вещество, содержащее антиген, и производят инкубирование. После инкубации комплекс «антиген – антитело» отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют вторичные антитела, меченные ферментом, после чего проводят детекцию.

*Конкурентный метод ИФА* подразделяется на несколько видов: по типу детекции (прямой конкурентный, косвенный (непрямой) конкурентный) и по типу иммобилизованного на твердой фазе вещества (антиген или антитело)).

*Прямой конкурентный вариант ИФА.* Для обнаружения или количественного определения растворимых антигенов применяют прямой конкурентный вариант ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном. Для этого используют антиген-специфические антитела, конъюгированные с соответствующим детектором (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, рутений или флуоресцеин).

На твердую фазу иммобилизуют стандартный антиген с последующей блокировкой. Конъюгированное с ферментативной меткой антитело инкубируют с исследуемым веществом (растворимым антигеном). Затем эту смесь добавляют к иммобилизованному антигену, инкубируют, а потом отмывают от несвязавшегося комплекса «антиген – антитело». Следующий шаг заключается в добавлении подходящего субстрата для используемого в качестве метки фермента. Ингибирование реакции, обусловленное наличием 2 антигенов в системе, по сравнению с контрольным образцом без конкурентного растворимого антигена, является обратно пропорциональным значению количества исследуемого вещества.

Выполнение прямого конкурентного варианта ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антителом аналогично прямому конкурентному ИФА с иммобилизованным на твердой фазе антигеном, однако используется для обнаружения или количественного определения антител.

*Косвенный (непрямой) конкурентный вариант ИФА.* Этот способ постановки ИФА аналогичен прямому конкурентному варианту, однако вместо меченого антитела или антигена при детекции используется меченый антииммуноглобулин реагент или меченые вторичные антитела, соответственно.

Все варианты количественных иммуноанализов с использованием меченых антител обладают следующими преимуществами по сравнению с другими вариантами:

- антиген не подвергается метке и, следовательно, нет опасности его повреждения или изменения физико-химических свойств;
- молекулы антител более стабильны и лучше антигенов сохраняют свою активность при мечении;
- имеется возможность определения антигенов, которые с трудом поддаются метке или которые трудно получить в чистом виде;
- в результате использования избытка меченых антител потенциально может наблюдаться более высокая чувствительность и специфичность, т.к. из гетерогенной популяции антител в первую очередь будут реагировать молекулы, обладающие высоким сродством к антигену.

## 2.2. Общие условия проведения метода ИФА

В качестве твердой фазы для проведения иммуноферментного анализа применяют различные материалы: силикон, нитроцеллюлоза, полиамиды, полистирол, поливинилхлорид, полипропилен, акрил и другие. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и другие планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки.

От выбора твердой фазы зависит принцип иммобилизации (гидрофобное, гидрофильное, ковалентное взаимодействие).

Чаще других в качестве твердой фазы используют 96-луночные пластиковые планшеты для микротитрования (рисунок 2.1). Количество лунок в планшете может варьироваться. Планшет может быть прозрачным (колориметрическая детекция) и матовым (хемилюминесцентная детекция, флуориметрия).

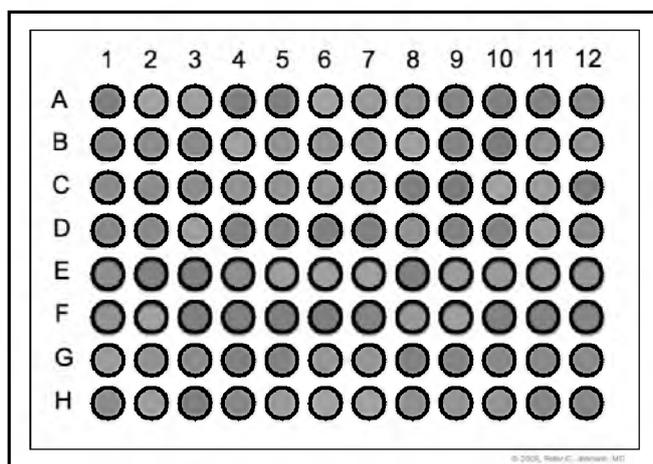


Рисунок 2.1 – Планшет для постановки ИФА (<http://88proof.com>)

Иммобилизацию необходимо проводить без пузырьков воздуха в лунке, так как их присутствие изменяет показание оптической плотности. Возможно использование биотинилированных иммобилизованных реагентов. В этом случае в реакции используют стрептавидин и биотинилированную ферментативную метку. Данный метод используется для усиления сигнала. Время и температура иммобилизации, зависящие от кинетической природы, стабильности и концентрации реагента, должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Все стадии иммуноферментного анализа, промывочные и блокирующие растворы, временные промежутки и температурные условия для каждой стадии, количество оборотов в минуту для инкубации на шейкере, условия детекции также должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации.

Для детекции используются меченные ферментной меткой или другим реагентом антитела.

В качестве ферментной метки могут выступать пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза или галактозидаза.

В качестве детектора могут быть использованы антитела или антигены с другими метками. Выбор реагента-детектора зависит от типа метки, конъюгированной с антителом или антигеном, и способа детекции.

В качестве методов детекции могут быть использованы спектрофотометрия, хемилюминесценция, флуориметрия и другие методы, исходя из выбора метки.

### **2.3. Техника постановки ИФА косвенным неконкурентным методом**

*1 этап – сорбция антигена.* В каждую лунку 96-луночного планшета вносят 0,1–0,5 мкг антигена и 100 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буферного раствора (рН 9,6), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и далее проводят сорбцию при температуре +4°C в течение 16 часов. Возможно использование других буферных растворов с высокими значениями рН. Инкубация проводится при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка (двукратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0), содержащим 0,1% твин-20 (по 300 мкл на лунку), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

*2 этап – блокировка.* Для блокирования мест неспецифического связывания антигенов или антител лунки планшета заполняют фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0) или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации, содержащим 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина или других белков (казеина, желатина, сухого молока и др.), и инкубируют в течение 10–15 минут при комнатной температуре (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

*3 этап – титрование специфических антител.* При необходимости количественной оценки исследуемое вещество (антиген или антитело) титруют в серийных разведениях параллельно со стандартным образцом.

Титрование можно проводить как в горизонтальных, так и в вертикальных рядах планшета. Титрование антител проводится в том случае, если необходимо подобрать оптимальную концентрацию антител или определить их титр, а если оптимальная концентрация или титр антител определены, то используют рекомендованное для данных антител (сыворотки) разведение.

При титровании в первую лунку ряда вносят готовое разведение антител – в среднем 1–10 мкг на лунку, далее производят последовательное разведение антител в лунках. Инкубацию со специфическими антителами проводят в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1% твин-20.

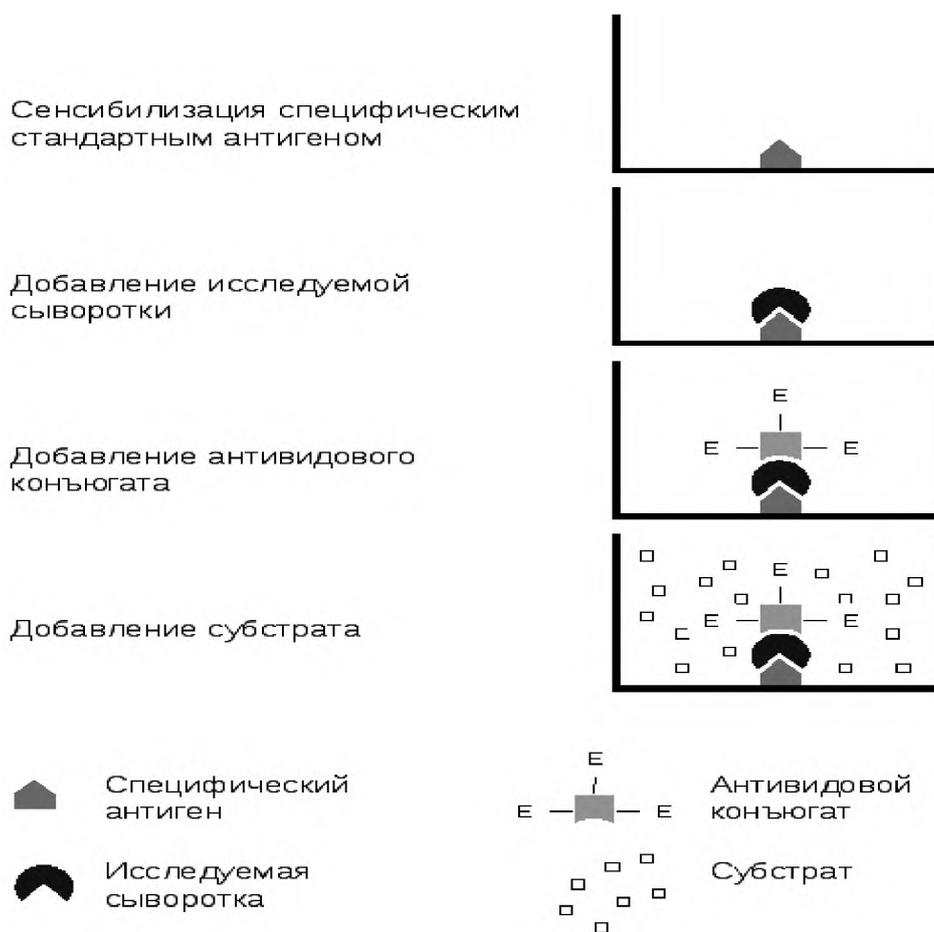
*4 этап – добавление антивидовых (антиглобулиновых) антител, конъюгированных с ферментной меткой.* В качестве детекторных (вторичных) антител используются антивидовые поликлональные антитела, конъюгированные с ферментативной меткой. Чаще всего используются козы или кроличьи антитела, специфичные к целой молекуле или к Fc-фрагментам специфических антител. Концентрация детекторных антител, как правило, указывается производителем в виде разведения исходного раствора (например, 1:1000).

Инкубация с вторичными мечеными антителами проводится в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1% твин-20.

Инкубация проводится в течение 10 минут при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

*5 этап – проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта.* В лунки вносят по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп-реагент», который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах (наиболее часто в качестве «стоп-реагента» применяют серную кислоту).



**Рисунок 2.2 – Схема постановки косвенного (непрямого) варианта ИФА**

## 2.4. Техника постановки ИФА прямым неконкурентным методом

Методика прямого ИФА имеет лишь небольшие отличия от методики непрямого неконкурентного ИФА.

Первый и второй этапы одинаковы в обоих типах анализа. Отличие заключается в том, что в прямом варианте ИФА на третьем этапе используют специфические исследуемому антигену антитела, конъюгированные с ферментной меткой, и они прямо взаимодействуют с исследуемым веществом. При необходимости также можно проводить титрование конъюгатов аналогично принципу, описанному ранее для неконъюгированных антител. Четвертый этап в рамках прямого неконкурентного ИФА не проводится.

## 2.5. Техника постановки «сэндвич»-варианта ИФА (метод двойных антител)

В данном варианте ИФА используется пара антител (первичные и вторичные), специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена (рисунок 2.3).

*1 этап – сорбция антигена.* В каждую лунку 96-луночного планшета вносят 0,1-0,5 мкг антигена и 100 мкл 0,05 М карбонат-бикарбонатного буферного

раствора (рН 9,6), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации, и далее проводят сорбцию при температуре +4°C в течение 16 часов. Возможно использование других буферных растворов с высокими значениями рН. Инкубация проводится при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка (двукратная) несвязавшихся молекул антигена осуществляется фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0), содержащим 0,1% твин-20 (по 300 мкл на лунку), если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

*2 этап – блокировка.* Для блокирования мест неспецифического связывания антигенов или антител лунки планшета заполняют фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0) или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или в нормативной документации, содержащим 1%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина или других белков (казеина, желатина, сухого молока и др.), и инкубируют в течение 10–15 минут при комнатной температуре (если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации).

*3 этап – инкубация с антигеном.* В лунки планшета с преадсорбированными антителами вносят по 50 мкл исследуемого вещества и стандартных разведений антигена, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

Разведения антигена должны быть приготовлены на основе фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1% твин-20, поскольку твин-20 снижает неспецифическое связывание белковых молекул друг с другом и с поверхностью планшета. Исследуемое вещество и стандартные разведения антигена вносят попарно в соседние в горизонтальном ряду лунки (либо по 3 повторности), используя по 2 (3) лунки на каждое разведение белка.

Инкубацию проводят при комнатной температуре в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз фосфатно-солевым буферным раствором (рН 9,0), содержащим 0,1% твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

*4 этап – инкубация с антителами, конъюгированными с ферментной меткой.* В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора специфических антител, конъюгированных с ферментной меткой. Оптимальная концентрация конъюгированных антител, как правило, указывается в фармакопейной статье или нормативной документации (обычно используют концентрацию 2–4 мкг/мл).

Инкубация с антителами, содержащими ферментную метку, проводится в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка осуществляется не менее 3–4 раз с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (рН 9,0), содержащего 0,1% твин-20, или другим буферным раствором, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации.

5 этап – проведение ферментативной реакции, сопровождающейся появлением окрашенного продукта. В лунки вносят по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп-реагент», который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах (наиболее часто в качестве «стоп-реагента» применяют серную кислоту).

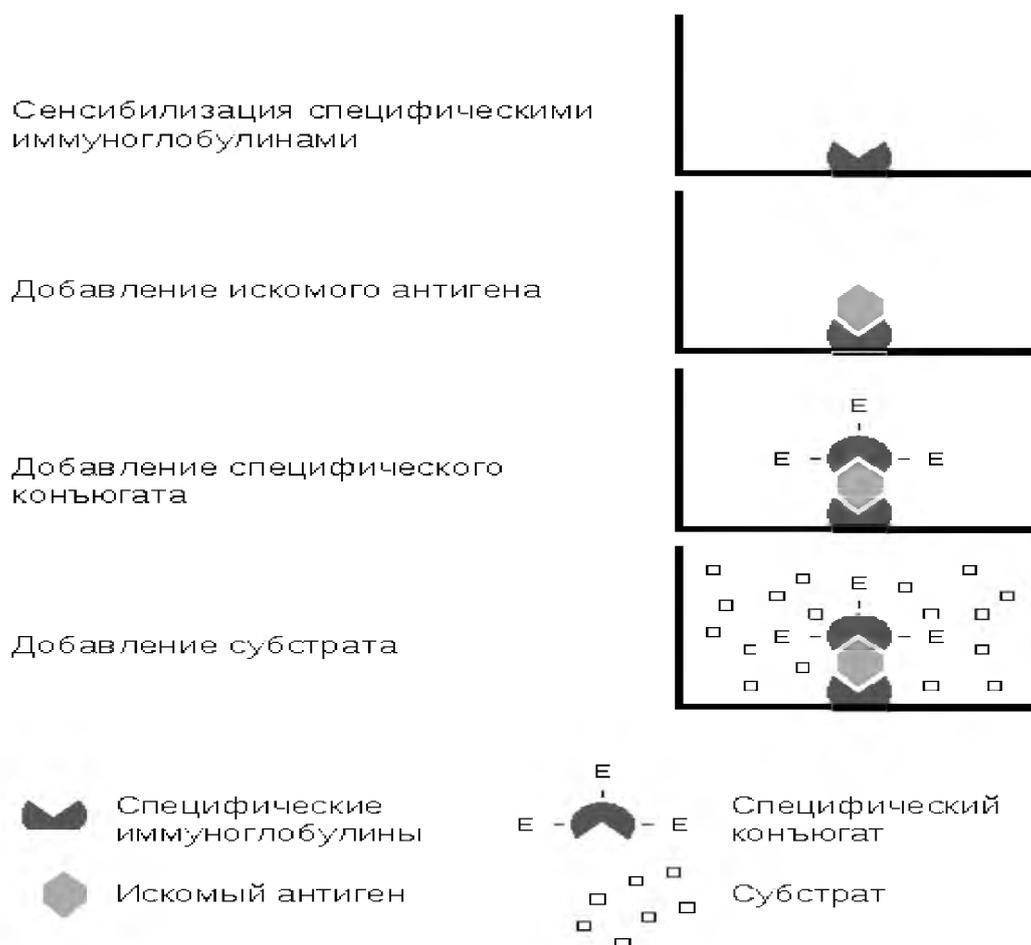


Рисунок 2.3 – «Сэндвич»-вариант ИФА

## 2.6. Учет и оценка результатов ИФА

Учет результатов ИФА проводят визуально по интенсивности окраски в разведениях исследуемой пробы или при помощи регистрирующих приборов.

Визуальный учет результатов прост и удобен при исследовании проб, содержащих антитела или антигены в высокой концентрации. При этом реакцию оценивают положительно при наличии интенсивной коричневой окраски.

В методе ингибирования ИФА, в отличие от других, отрицательные сыворотки дают интенсивное окрашивание, а сыворотки, имеющие антитела, – не окрашиваются. Это объясняется тем, что отрицательные сыворотки не взаимодействуют с антигеном (нет антител), и он тем самым сохраняет свободные валентности для связывания с конъюгатом, а это позднее выявляется субстратом. В свою очередь сыворотки, имеющие антитела, реагируют с антигеном, и у не-

го не остается свободных валентностей для взаимодействия с конъюгатом, а как следствие – отсутствие окрашивания.

Для более точного (объективного) измерения применяют регистрирующие приборы – спектрофотометры (рисунок 2.4), которые одновременно позволяют определить концентрацию в пробе материала по заранее построенной стандартной кривой в зависимости от оптической плотности пробы. В данном случае реакцию оценивают положительно при оптической плотности исследуемой пробы, в 2 и более раза превосходящей плотность отрицательного контроля.

Принцип учета и оценка результатов в методе ингибирования ИФА аналогичны, с той лишь разницей, что исследуемая проба считается положительной, если имеет оптическую плотность в 2 и более раза ниже оптической плотности отрицательного контроля.

Инструментальный учет результатов удобно проводить на сканирующем спектрофотометре типа Titertek Multiskan, который позволяет быстро оценивать цветную реакцию в лунках полистироловых панелей. Он распечатывает замеренные с высокой точностью значения оптической плотности и позволяет применять светофильтры с разной длиной волны в зависимости от цвета продукта ферментативной реакции.

Результаты количественного метода ИФА рассчитывают по линейной калибровочной кривой с обратной регрессией или с помощью комплексного метода, использующего нелинейную калибровочную кривую с обратной регрессией.

Методика интерпретации результатов зависит от используемого способа постановки ИФА. Например, по результатам испытания с помощью калибровочной кривой можно оценивать концентрацию неизвестного образца, проводить оценку полумаксимальной концентрации ингибирования или эффективной концентрации. Это позволяет определять количество исследуемого вещества или его активность в сравнении с эталонным/калибровочным стандартным образцом.

Обычно вид калибровочной кривой при выполнении количественного метода ИФА, характеризующий концентрацию анализируемого препарата, зависит от рассчитанного среднего значения нелинейно. В связи с этим, рекомендуется использовать различные математические модели для анализа полученной кривой.

В остальных случаях метод ИФА используют как качественный метод, позволяющий оценить наличие того или иного исследуемого вещества в пробе в пределах чувствительности методики.



**Рисунок 2.4 – Автоматический спектрофотометр для учета ИФА**  
(<http://www.tradekorea.com>)

### **Контрольные вопросы**

1. Какой принцип лежит в основе иммуноферментного анализа?
2. Какие преимущества и недостатки имеет иммуноферментный анализ?
3. На какие группы подразделяются все методики постановки ИФА? С какой целью они используются?
4. Какие варианты постановки твердофазного ИФА применяются в настоящее время? На чем они основаны?

### Тема 3 БЛОТТИНГ

**Цель занятия:** ознакомиться с основными принципами блоттинга, гибридизации, их применением в биотехнологии.

**Время, отводимое на изучение темы:** 2 часа.

#### 3.1. Понятие о блоттинге, ДНК-зондах и гибридизации

**Блоттинг** (от англ. blotting – промокание, получение реплики пятен) – техника, используемая для перемещения макромолекул (ДНК, РНК или белков) из геля (после их электрофоретического разделения) на носитель, который связывает их (обычно нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр), с сохранением того же физического разделения, которое произошло в геле.

Метод переноса пятен ДНК первоначально разработал Е. Саузерн (E. Southern) и в честь него данный метод получил название саузернблоттинг (южный перенос). Метод переноса фрагментов РНК называют нозернблоттинг (северный перенос), а метод переноса фрагментов белка – вестернблоттинг (западный перенос).

Метод ДНК-зондов лежит в сущности большой группы методов, названных *in situ-гибридизация*, основанных на обнаружении искомой нуклеиновой кислоты с помощью меченных различным образом ДНК-зондов.

**ДНК-зонд** – это олигонуклеотид (короткий одноцепочечный фрагмент ДНК) длиной 15–1000 нуклеотидов, меченный какой-либо меткой (радиоактивной, химической или флуоресцентной).

Метод диагностики вирусных болезней с помощью ДНК-зондов основан на способности специфического связывания двух комплементарных фрагментов ДНК или РНК, один из которых имеет метку. При этом считается, что если происходит регистрация метки, то произошло связывание специфического участка с зондом, и таким образом проба является положительной.

В основе данного метода лежит явление денатурации-ренатурации двухцепочечной ДНК. Если ДНК нагреть до температуры +90...+100°C, то она разделится на 2 одноцепочечные нити, т.е. произойдет *денатурация*.

Понижение температуры до +60...+65°C ведет к ренатурации ДНК, т.е. восстановлению двухцепочечной структуры. При этом если к денатурированной ДНК добавить меченные любым образом фрагменты комплементарной ДНК (ДНК-зонд), то часть молекул свяжутся с ним. Если же ДНК-зонд не комплементарен, то он не сможет присоединиться. Таким образом, можно установить, имеется ли в исследуемой нуклеиновой кислоте искомая последовательность.

Этот процесс возможен для любых одинарных цепей: ДНК – ДНК, РНК – РНК, ДНК – РНК.

### 3.2. Саузернблоттинг

*Саузерн-блоттинг, саузерн-блот гибридизация, саузерн-блот-анализ (Southern blotting, Southern blot hybridization, Southern blot analysis)* – метод идентификации участков ДНК, содержащих комплементарные ДНК-зонду нуклеотидные последовательности, среди смеси рестрикционных фрагментов ДНК, электрофоретически разделенных по размерам в геле и фиксированных на твердом носителе (обычно нитроцеллюлозные или нейлоновые фильтры).

Метод предложен Е. Саузерном в 1975 г. Это первый метод диагностики на молекулярном уровне. В настоящее время он в значительной степени вытеснен методами, основанными на ПЦР, и прямым секвенированием.

Для постановки этой реакции необходим исследуемый материал (любой биологический материал, содержащий нуклеиновые кислоты), специфический ДНК-зонд, буферный раствор, нитроцеллюлозные мембраны, а также, в зависимости от техники исполнения, различное оборудование.

При постановке реакции выполняются следующие этапы (рисунок 3.1).

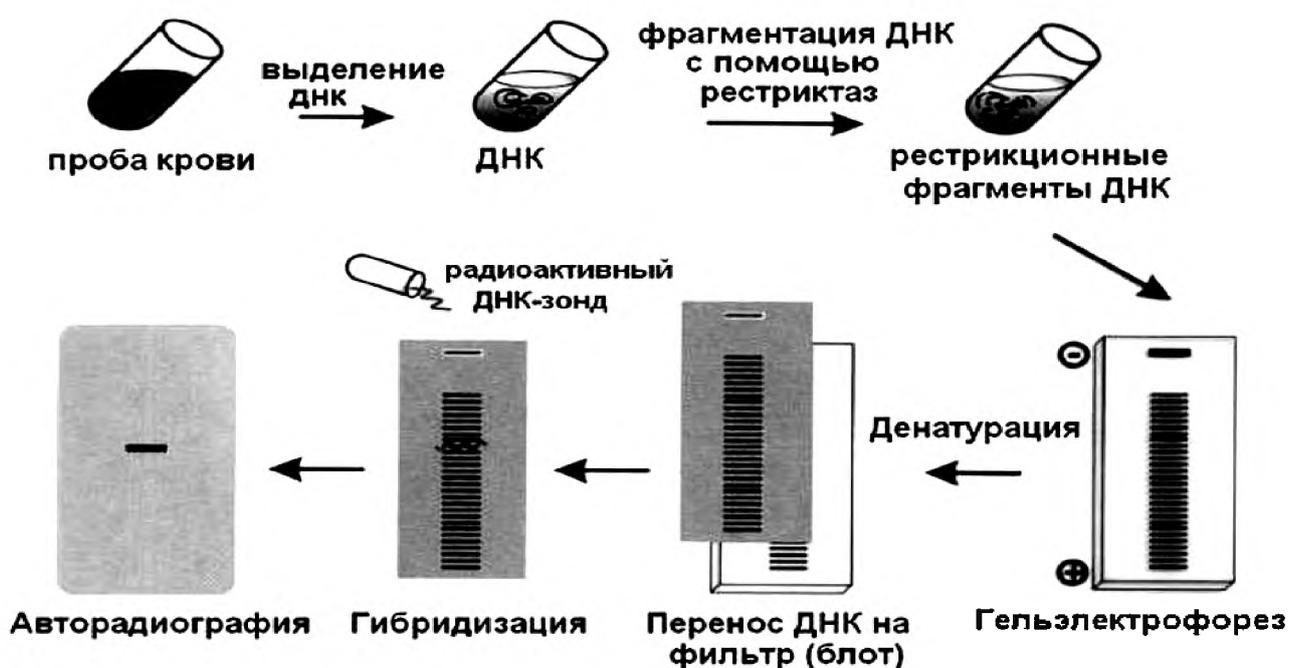


Рисунок 3.1 – Саузерн-блот гибридизация (<https://en.ppt-online.org>)

*1-й этап – получение ДНК-зонда.* ДНК-зонды можно получить путем клонирования или синтетически.

До недавнего времени основным способом получения ДНК-зондов было клонирование участков ДНК в бактериальные клетки. Для этого проводилось выделение необходимого патогена, накопление его на питательных средах или культурах клеток. Выделенные нуклеиновые кислоты разрезались рестриктазами и проводился электрофорез. При сравнении электрофореграмм возбудителя из различных источников определялись консервативные участки, которые использовались в клонировании.

Клонирование фрагментов ДНК или генов представляет собой процесс вставки гена в бактериальную клетку с целью накопления этого фрагмента или кодируемого этим участком белка. Для этого используются плазмиды – кольцевые молекулы ДНК, которые придают определенные свойства микроорганизму (плазмиды присутствуют в бактериальных клетках и не связаны с основным геномом, но при делении клеток происходит копирование плазмид, поэтому дочерние клетки микроорганизмов также будут иметь плазмиды).

Необходимые участки ДНК встраивают в плазмиду, которую затем вставляют в бактерию. Далее бактериальные клетки накапливают культуральным способом. В результате увеличения числа клеток увеличивается и число плазмид. Таким образом, производится копирование необходимого фрагмента ДНК *in vivo*. Материал для приготовления зонда получают при выделении плазмидной ДНК из бактерий. Из него путем мечения радиоактивным фосфором и последующей денатурации двухцепочечной ДНК получают ДНК-зонд.

Данный способ получения зондов достаточно трудоемок. В настоящее время, благодаря открытию новых способов биоорганического синтеза и разработке автоматических синтезаторов олигонуклеотидов, ДНК-зонды получают искусственным путем, при котором достаточно задать необходимую последовательность нуклеотидов и прибор самостоятельно выполнит все этапы синтеза и мечения зонда.

**2-й этап – выделение нуклеиновых кислот.** Классическим методом выделения ДНК считается *фенол-хлороформная экстракция* (или триазольная для РНК). Суть метода основана на растворимости ДНК или РНК в водной фазе и нерастворимости в органической.

Первоначально исследуемый материал подвергают воздействию протеиназы К (фермент, расщепляющий белки на более короткие пептиды). При этом происходит освобождение нуклеиновой кислоты от окружающих ее белков (реакция проходит в буферном растворе на основе воды). Далее добавляют органическую фазу, и содержащийся в ней фенол осаждает белки и растворяет в себе другие органические вещества, при этом нуклеиновая кислота остается в водной фазе.

После центрифугирования водная и органическая фаза четко разделяются, водная фаза отбирается в чистую пробирку и к ней добавляется следующая органическая фаза (смесь фенола и хлороформа) для более глубокой очистки ДНК в водной фазе от лишних веществ.

После нескольких отмывок органическими фазами проводят осаждение нуклеиновых кислот с помощью этилового или изопропилового спирта в водной фазе для отделения их от растворимых в воде побочных веществ (нуклеиновые кислоты в присутствии спиртов выпадают в осадок).

Высушивая и растворяя нуклеиновую кислоту в деионизированной воде, получают ДНК или РНК.

Данный способ выделения достаточно трудоемкий, длительный и связан с использованием токсических веществ, однако в результате получается высокоочищенная ДНК или РНК.

Наиболее распространенный метод *экстракции нуклеиновых кислот* основан на *использовании сорбентов*. Сорбент представляет собой мелкодисперсный порошок, нерастворимый в воде, обладающий свойством осаждать на своей поверхности нуклеиновые кислоты в присутствии сильных ионных растворов. Первоначально, как и в предыдущем методе, используют лизирующий раствор (протеиназа К или другие вещества) для разрушения белков.

После осаждения нерастворимых частиц и переноса супернатанта в чистую пробирку, добавляют сорбент и буферный раствор. Под воздействием буфера ДНК или РНК переходит в нерастворимое состояние и осаждается на сорбенте.

После этого, ресуспендируя и осаждая сорбент, проводят его отмывку буферными растворами от примесей исследуемой пробы.

По окончании этого процесса сорбент высушивают и добавляют деионизированную воду. При этом нуклеиновые кислоты переходят с сорбента в воду.

Для автоматизации процесса выделения нуклеиновых кислот используют специальный сорбент на основе магнитных частиц. Формирование осадка сорбента в этом случае достигается за счет магнитного поля, а не центрифугирования как в случае обычного сорбента. Такие приборы значительно сокращают время выделения нуклеиновых кислот из большого количества образцов и избавляют этот процесс от человеческого фактора. Их используют в крупных лабораториях, куда ежедневно поступает более 50 проб на анализ.

**3-й этап – гибридизация.** После получения ДНК-зонда и выделения нуклеиновых кислот из материала переходят к стадии гибридизации. В зависимости от длины выделенной ДНК, ее сразу наносят на мембрану или подвергают рестрикции и фракционированию. При исследовании высокомолекулярной ДНК ее следует разрезать на фрагменты (рестрикция) для облегчения связывания с ДНК-зондом. После этого проводят электрофорез для разделения ДНК на фракции (фракционирование) и перенос на мембрану аналогично иммуноблоттингу.

Также на мембрану наносят положительные и отрицательные контроли. После этого мембрану покрывают стеклом с нанесенным на нем ДНК-зондом и нагревают до температуры  $+80^{\circ}\text{C}$  для денатурации ДНК в течение 20 минут. Затем снижают температуру до  $+50\dots+60^{\circ}\text{C}$  и выдерживают 2 часа для связывания зонда и исследуемой ДНК. По окончании мембрану промывают для удаления несвязавшегося ДНК-зонда и проводят учет результатов.

Если в качестве метки использовался радиоактивный фосфор, то мембрану прикладывают к фотопластинке, которую затем проявляют. Наличие темных пятен указывает на гибридизацию зонда и исследуемой ДНК, что свидетельствует о наличии искомого фрагмента ДНК.

В случае использования флуоресцентных меток мембрану просматривают в ультрафиолетовом свете, при этом светящиеся пятна указывают на положительные пробы; в случае применения химически меченных ДНК-зондов детекция искомым нуклеиновых кислот производится по обнаружению цветных меток.

Достоинствами данного метода являются высокая чувствительность и специфичность, универсальность, отсутствие необходимости в стерильной работе и математической обработке результатов. Незаменимым преимуществом метода ДНК-зондов является возможность индикации в клетке интегрированного вирусного генома, когда другие методы диагностики, основанные на обнаружении вирионных компонентов, неэффективны.

Недостатком является относительная сложность получения ДНК-зондов.

В настоящее время диагностика вирусных болезней с помощью ДНК-зондов отошла на второй план и заменена ПЦР как более простым в исполнении методом. Метод ДНК-зондов получил свое дальнейшее развитие в *технологии ДНК-чипов* – высокотехнологичном методе, который позволит выявлять одновременно тысячи различных возбудителей в ходе одной реакции. Суть метода заключается в нанесении ДНК-зондов на микрочип (до 40 тысяч вариаций). Каждая точка чипа содержит уникальный зонд. Гибридизация с исследуемой ДНК приводит к люминесценции, которая регистрируется прибором.

### 3.3. Нозерн-блоттинг

*Нозерн-блоттинг, нозерн-блот гибридизация, нозерн-блот анализ (Northern blotting, Northern blot hybridization, Northern blot analysis)* – метод, сходный с методом Саузерн-блот гибридизации, но используемый применительно к РНК.

Метод предложен Дж. Олвайном с сотрудниками в 1977 г. Он позволяет выявлять индивидуальные РНК в сложной популяции этих молекул.

Суммарный препарат РНК первоначально разделяют электрофоретически в геле, а затем переносят на нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтр. После фиксации РНК на фильтре с помощью спекания или УФ-облучения этот фильтр используют для гибридизации с одноцепочечными мечеными зондами (рисунок 3.2).

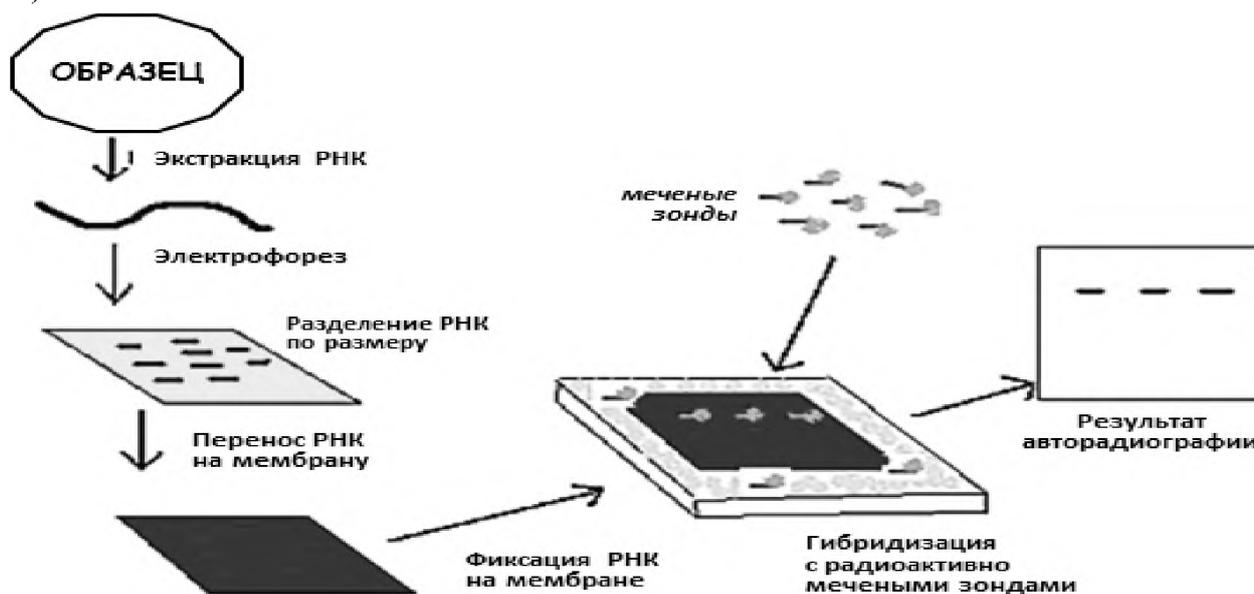


Рисунок 3.2 – Нозерн-блот гибридизация (<https://ru.wikipedia.org>)

### 3.4. Вестернблоттинг (иммуноблоттинг)

**Вестернблоттинг, иммуноблоттинг (Western blot)** – высокочувствительный метод выявления белков в исследуемом материале, основанный на электрофоретическом разделении их в геле и последующей детекции с помощью конъюгированных антител.

Данный метод был разработан в лаборатории Джорджа Старка в Стэнфорде.

Сущность метода заключается в специфическом связывании выявляемого белка, предварительно разделенного на фракции электрофорезом и перенесенного на специальную подложку, с первичными и вторичными антителами, последние из которых конъюгированы (связаны) с различными метками (ферментная, флуоресцентная или радиоактивная). В зависимости от типа метки зависит способ учета реакции.

Назначение иммуноблоттинга сводится к выявлению специфических белков возбудителей инфекционных болезней, специфических антител в исследуемых сыворотках, когда чувствительность других серологических реакций не позволяет их применять.

Техника постановки сводится к выполнению следующих этапов (рисунок 3.3).

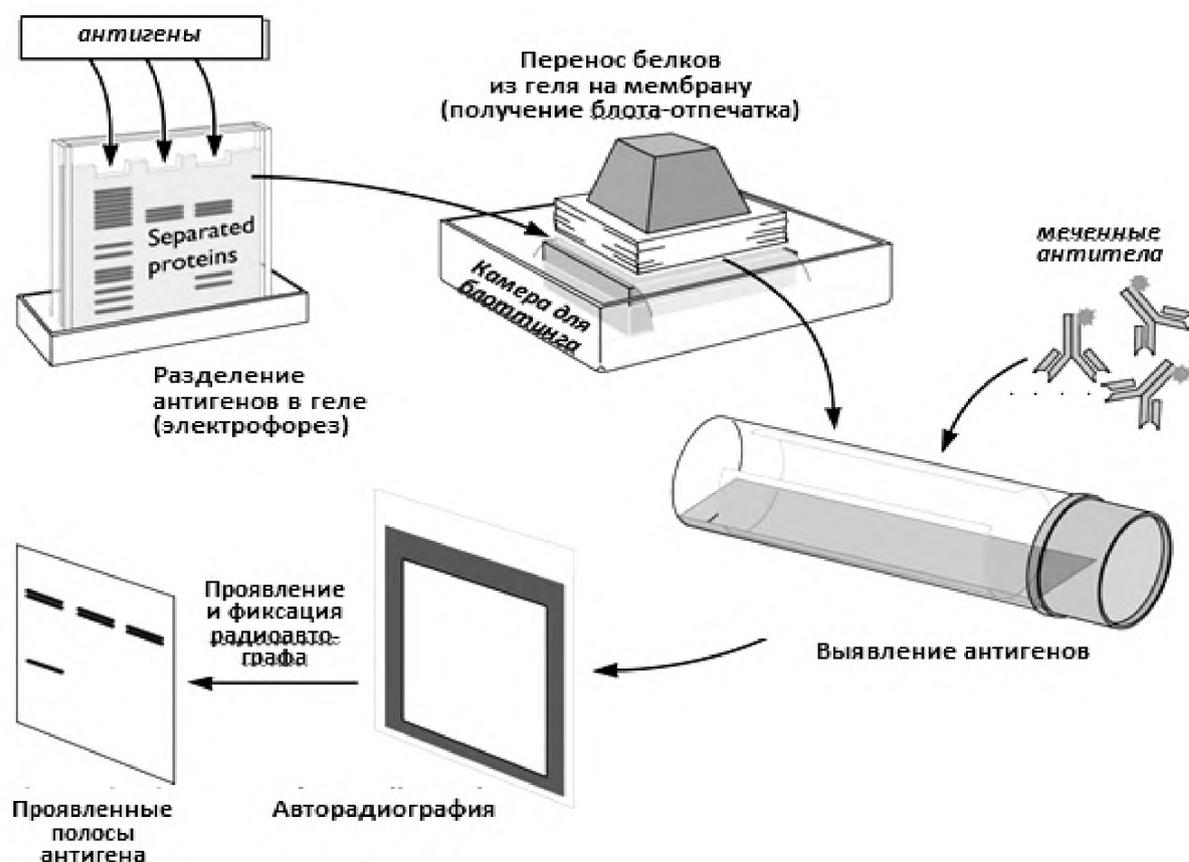


Рисунок 3.3 – Иммуноблоттинг (<https://docplayer.com>)

Для постановки иммуноблоттинга необходимы следующие *компоненты*:

- исследуемый материал (кусочки органов и тканей, биологические жидкости организма, культуры клеток и т.п.);
- специфическая сыворотка (содержит антитела против выявляемого белка);
- вторичные конъюгированные антитела;
- субстрат (если используются фермент-меченные антитела), полиакриламидный гель (ПААГ);
- буферные растворы для пробоподготовки, электрофореза, блокирования и промывки подложки.

Также для выполнения данной реакции необходим набор оборудования, включающий камеры для вертикального электрофореза и заливки гелей, источники тока, ванночки для инкубации подложек, одноканальные пипетки переменного объема и сопутствующие им расходные материалы.

**1-й этап – пробоподготовка.** Заключается в разрушении клеток и переводе белков в растворимое состояние. При использовании тканей или кусочков органов их предварительно измельчают с помощью блендера, гомогенизатора или ультразвука. Далее, для более полного разрушения клеток используют лизирующие растворы, а для перевода нерастворимых белков в растворимое состояние – растворы детергентов. Как правило, в клетках и тканях содержатся протеолитические ферменты, способные разрушать белки, поэтому этот этап обычно проводят при низкой температуре (это значительно снижает активность ферментов), а также применяют ингибиторы протеаз и фосфотаз.

Биологические жидкости организма возможно использовать без предварительной пробоподготовки.

**2-й этап – гель-электрофорез.** Проводят для разделения белков исследуемого материала на фракции в зависимости от их молекулярной массы, изоэлектрической точки, электрического заряда или сочетания этих параметров.

В качестве геля используют ПААГ, варьируя концентрацию которого можно получить качественное разделение как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных фракций белков.

Наиболее распространенный метод – разделение белков по молекулярной массе в денатурирующем ПААГ (SDS-PAGE).

Белки имеют вторичные и третичные структуры, которые формируют разнообразие пространственные молекулы, что влияет на их подвижность в геле. Поэтому белки с различной молекулярной массой способны двигаться в геле с одинаковой скоростью и формировать линии фракций на одном уровне. Для устранения влияния пространственной структуры на качество результата применяют денатурирующие вещества (например, додецилсульфат натрия), которые разрушают вторичные и третичные связи и позволяют разделяться белкам только по молекулярной массе.

На этом этапе предварительно заливают гель в камеру для заливки, представляющую 2 стекла, соединенных штативом. Сверху ставится гребенка, которая формирует лунки для внесения исследуемых проб. После застывания геля, достают гребенку и помещают в гель-кассету, которую помещают в камеру для

вертикального электрофореза, а камеру заполняют анодным и катодным буферными растворами для электрофореза.

Затем вносят образцы в лунки, закрывают камеру крышкой, подключают к источнику тока. На нем задают параметры электрофореза (сила тока или напряжение и время электрофореза) и включают подачу напряжения в камеру по введенным параметрам.

В процессе электрофореза белки разделяются на фракции в зависимости от их молекулярной массы – более легкие фракции будут двигаться быстрее и по окончании электрофореза будут находиться дальше от начальной точки (лунки) по сравнению с белками с высокой молекулярной массой.

**3-й этап – перенос белков на мембраны.** Находящиеся в геле белки недоступны для взаимодействия с антителами, поэтому их переносят из геля на специальные мембраны (нитроцеллюлозные или поливинилденфторидные), которые обладают способностью неспецифически связывать белки.

Перенос белков можно осуществить 2 способами:

- поверх геля кладут мембрану, а сверху нее – стопку фильтровальной бумаги и помещают в ванночку с буфером для переноса. Под воздействием капиллярных сил буфер двигается к бумаге и уносит с собой белки из геля, которые связываются с мембраной (этот способ требует значительных затрат времени);
- кассету, состоящую из слоя фильтровальной бумаги, мембраны, геля и еще одного слоя фильтровальной бумаги, помещают в камеру для электрофореза с буфером для переноса. Под воздействием электрического тока белки двигаются к аноду и связываются с мембраной, которая находится на пути их движения. Таким образом, осуществляется перенос белков на мембрану с учетом их разделения по молекулярной массе, полученного при первом электрофорезе.

**4-й этап – блокирование мембраны.** В связи с тем, что антитела являются белками, они способны связываться не только со специфическим белком, но и с самой мембраной. Чтобы последнее не происходило, проводят блокирование мембраны – связывание участков мембраны, свободных от белков, с неспецифическими белковыми молекулами.

Для этого помещают мембрану в раствор бычьего сывороточного альбумина или обезжиренного сухого молока с добавлением детергентов (Твин-20 или Тритон X-100). После этой процедуры на мембране не остается места для связывания антител, кроме как области с целевым (выявляемым) белком.

**5-й этап – детекция белка с помощью специфических антител.** Выявление целевого белка на подложке аналогично непрямому гистохимическому варианту ИФА или РИФ. Первоначально мембрану помещают в раствор специфических выявляемому белку антител (первичные антитела) и проводят инкубацию. Режим инкубации может варьироваться от 30 минут до 12–16 часов. По окончании инкубации мембрану отмывают от несвязавшихся антител и помещают в раствор вторичных антител.

Вторичные антитела представляют собой антивидовые антитела (способны связываться практически с любыми антителами определенного вида животного-

го) с прикрепленной меткой. После инкубации также проводится отмывка мембраны.

В случае применения ферментной метки дополнительно мембрана помещается в раствор субстрата, который при взаимодействии с ферментной меткой антител образует нерастворимый цветной продукт в месте локализации комплекса «определяемый белок – первичное антитело – вторичное меченное антитело». Для ограничения роста пятна проводят отмывку мембраны по истечении времени инкубации с субстратом.

Учет результатов проводят в зависимости от метки, используемой во вторичных антителах.

При использовании радиоактивной метки мембрану прикладывают к фотопластинке, которую потом проявляют. Наличие темных пятен на ней свидетельствует о воздействии радиоактивной метки и указывает на наличие специфического белка в исследуемой пробе.

При использовании ферментной метки в случае положительной пробы на мембране появляются окрашенные участки (пятна), которые выявляются визуально (менее информативно) или с помощью приборов денситометров (измеряют оптическую плотность пятна) и спектрофотометров (измеряют оптическую плотность на заданной длине волны). Полученные данные с приборов позволяют провести количественный учет результатов относительно положительного контроля.

При использовании люминесцентной метки мембрана помещается в прибор, который облучает ее возбуждающим светом. При наличии положительных проб фотосенсор прибора будет регистрировать флуоресценцию метки и ее интенсивность.

Преимуществом данного метода является высокая специфичность и чувствительность, прямое определение возбудителя инфекции. Этот метод незаменим для диагностики прионных инфекций, т.к. их невозможно культивировать классическими методами, а ПЦР-диагностика невозможна в связи с отсутствием у них нуклеиновых кислот.

Недостатком метода является необходимость приобретения дорогостоящего оборудования и тест-систем, а также обучение персонала ввиду сложности техники постановки.

### **Контрольные вопросы**

1. Что понимают под термином «блоттинг»? Какие существуют разновидности блоттинга?
2. В чем заключается сущность саузернблоттинга?
3. Чем нозернблоттинг отличается от саузернблот гибридации?
4. В чем заключается сущность иммуноблоттинга?

## Тема 4 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

**Цель занятия:** ознакомиться с основными этапами выполнения полимеразной цепной реакции и областями ее практического применения.

**Время, отводимое на изучение темы:** 2 часа.

### 4.1. Понятие и сущность метода

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.

Полимеразная цепная реакция основана на обнаружении у любого вида микроорганизмов высококонсервативных участков нуклеиновой кислоты, свойственных только данному виду. Путем анализа предварительно установленной последовательности нуклеотидов нуклеиновой кислоты возбудителя (ДНК или РНК) и сравнения ее с последовательностями, имеющимися в Международном Банке нуклеотидных последовательностей, проводят выявление таких участков. ПЦР позволяет многократно скопировать эти участки, и, благодаря высокой концентрации скопированных специфических участков (*ампликонов*), их можно визуализировать с помощью электрофореza.

Полимеразная цепная реакция является одним из самых мощных и дешевых лабораторных методов. Его появление привело к революционным изменениям в науке и медицине. И если сейчас для генетических экспресс-анализов появляются альтернативные техники, не требующие сложной аппаратуры, то в генетической инженерии ПЦР по-прежнему просто незаменима. Самые ценные свойства этого метода – совместимость с другими техниками и невероятная пластичность: они позволяют ученым с минимальными усилиями решать совершенно разные задачи.

Области применения ПЦР отражены в таблице 1.

**Таблица 1 – Области применения ПЦР в различных сферах деятельности**

<i>Биотехнологические процессы и генетическая инженерия</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• секвенирование ДНК, основанное на ПЦР, в ходе которой в синтезируемую цепь включается меченный флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотид, что приводит к терминции синтеза и позволяет определить положение конкретных нуклеотидов после разделения в геле (то есть пошагово прочитать их последовательность);</li><li>• клонирование ДНК для исследования функций генов, их взаимодействия, создания синтетических ДНК, генетически модифицированных организмов и др.;</li><li>• мутагенез, основанный на внесении изменений в ДНК посредством ПЦР;</li><li>• создание гибридизационных зондов для различных видов блоттинга;</li><li>• анализ экспрессии генов в тканях и отдельных клетках в разных условиях.</li></ul>
---	--

<i>Сельское хозяйство</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• обнаружение патогенов (бактерий, грибов, вирусов) у растений и животных;</li> <li>• диагностика наследственных заболеваний домашних и сельскохозяйственных животных;</li> <li>• анализ пищевых продуктов на содержание генетических модификаций;</li> <li>• обнаружение X-хромосомы у животных, пол которых трудно определить невооруженным глазом (у рыб, рептилий, попугаев).</li> </ul>
<i>Медицина</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• анализ клинических образцов на наличие инфекционных агентов бактериальной и вирусной природы (ВИЧ, вирусов гепатита и герпеса, хламидий, хеликобактера, туберкулезных микобактерий и т.д.);</li> <li>• диагностика лейкемии, лимфомы и других видов неоплазий, которые можно определить по мутациям в определенных генах;</li> <li>• мониторинг опухолевых заболеваний после терапии;</li> <li>• диагностика наследственных заболеваний, вызываемых мутациями отдельных генов (серповидноклеточной анемии, бокового амиотрофического склероза, фенилкетонурии, муковисцидоза, мышечной дистрофии и т.п.);</li> <li>• генетическое определение дозировок индивидуально подобранных препаратов;</li> <li>• тканевая типизация перед трансплантацией органов;</li> <li>• обнаружение хромосомных кроссинговеров, делеций, инсерций, транслокаций и инверсий в отдельных сперматозоидах до оплодотворения.</li> </ul>

#### 4.2. Качественная (классическая) ПЦР

Для постановки ПЦР требуются следующие **компоненты**:

- *анализируемая ДНК* (это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плазида, хромосома или геном клетки полностью. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка);
- *праймеры* – это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15-30 нуклеотидов), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3'- и 5'-концы;
- *нуклеотиды* (дезоксинуклеотидтрифосфаты), необходимые для синтеза новых цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ. Обычно вносятся в реакционную смесь в равных концентрациях;
- *ДНК-полимераза* – фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3'-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (*Taq-полимераза*), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu-полимераза*) и *Pyrococcus woesei* (*Pwo-полимераза*). Первая – самая производительная, а две другие – более точные;
- *буферный раствор*, содержащий различные ионы для поддержания нужного рН, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный

детергент Tween-20 в сочетании с бычьим сывороточным альбумином (BSA) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер – диметилсульфоксид (ДМСО), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.

**Техника проведения ПЦР** состоит из 3 этапов:

- выделение нуклеиновых кислот;
- постановка ПЦР;
- учет результатов.

*1-й этап – выделение нуклеиновых кислот.* В настоящее время разработано много методик выделения нуклеиновых кислот, которые отличаются по механизму выделения, скорости исполнения и качеству выделенных нуклеиновых кислот.

Классическим методом выделения ДНК считается фенол-хлороформная экстракция (или триазольная для РНК). Суть метода основана на растворимости ДНК или РНК в водной фазе и нерастворимости в органической. Первоначально исследуемый материал подвергают воздействию протеиназы К (фермент, расщепляющий белки на более короткие пептиды). При этом происходит освобождение нуклеиновой кислоты от окружающих ее белков (реакция проходит в буферном растворе на основе воды). Далее добавляют органическую фазу, и содержащейся в ней фенол осаждает белки и растворяет в себе другие органические вещества, при этом нуклеиновая кислота остается в водной фазе. После центрифугирования водная и органическая фаза четко разделяются, водная фаза отбирается в чистую пробирку и к ней добавляется следующая органическая фаза (смесь фенола и хлороформа) для более глубокой очистки ДНК в водной фазе от лишних веществ. После нескольких отмывок органическими фазами проводят осаждение нуклеиновых кислот с помощью этилового или изопропилового спирта в водной фазе для отделения их от растворимых в воде побочных веществ (нуклеиновые кислоты в присутствии спиртов выпадают в осадок). Высушивая и растворяя нуклеиновую кислоту в деионизированной воде, получают ДНК или РНК. Данный способ выделения достаточно трудоемкий, длительный и связан с использованием токсических веществ, однако в результате получается высокоочищенная ДНК или РНК.

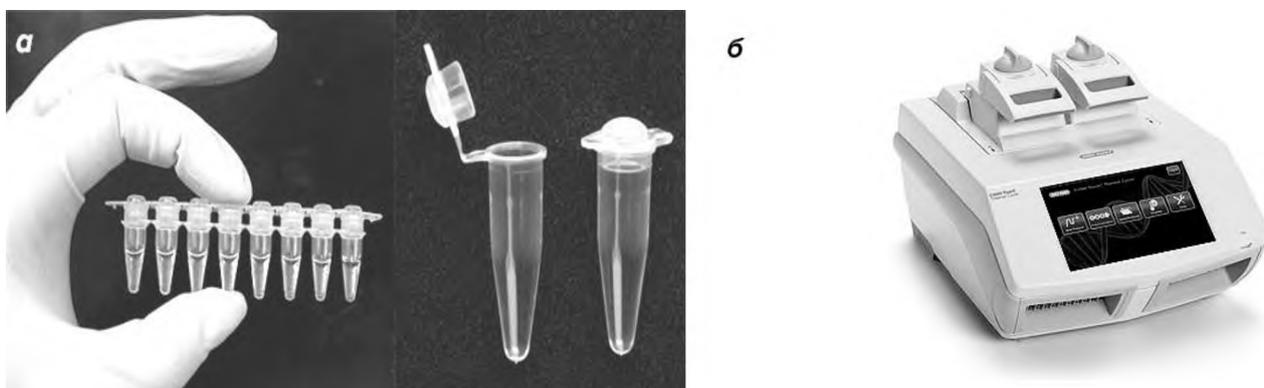
Наиболее распространенный метод экстракции нуклеиновых кислот основан на использовании сорбентов. Сорбент представляет собой мелкодисперсный порошок, нерастворимый в воде, обладающий свойством осаждать на своей поверхности нуклеиновые кислоты в присутствии сильных ионных растворов. Первоначально, как и в предыдущем методе, используют лизирующий раствор (протеиназа К или другие вещества) для разрушения белков. После осаждения нерастворимых частиц и переноса супернатанта в чистую пробирку добавляют сорбент и буферный раствор. Под воздействием буфера ДНК или РНК переходит в нерастворимое состояние и осаждается на сорбенте. После этого, ресуспендируя и осаждая сорбент, проводят его отмывку буферными растворами от примесей исследуемой пробы. По окончании этого процесса сорбент вы-

сушивают и добавляют деионизированную воду. При этом нуклеиновые кислоты переходят с сорбента в воду.

Для автоматизации процесса выделения нуклеиновых кислот используют специальный сорбент на основе магнитных частиц. Формирование осадка сорбента в этом случае достигается за счет магнитного поля, а не центрифугирования, как в случае обычного сорбента. Такие приборы значительно сокращают время выделения нуклеиновых кислот из большого количества образцов и избавляют этот процесс от человеческого фактора. Их используют в крупных лабораториях, куда ежедневно поступает более 50 проб на анализ.

Для некоторых модификаций ПЦР возможно использование материала без предварительной экстракции нуклеиновой кислоты, но при этом необходимо использовать высокостабильные разновидности Taq-полимеразы, которые не подвержены ингибированию веществами, содержащимися в исследуемом материале.

**2-й этап – постановка ПЦР.** Для этого готовят реакционную смесь компонентов с учетом их концентрации. Количество каждого компонента, необходимого для одной реакции, умножают на количество проб (сумма исследуемых образцов и контролей) плюс 1 (для компенсации погрешностей пипетирования) и вносят в таком объеме в реакционную смесь. Далее разносят смесь по отдельным пробиркам и после этого вносят выделенную ДНК или РНК. Пробирки плотно закрывают и помещают в амплификатор (рисунок 4.1). В него вводят программу температурно-временных циклов реакции и запускают.



*а – ПЦР-пробирки; б – Амплификатор C1000 Touch™ производства Bio-Rad*

**Рисунок 4.1 – Расходные материалы и оборудование для ПЦР**  
(<https://biomolecula.ru>)

Цель ПЦР – получить множество одинаковых двухцепочечных кусочков ДНК строго определенной длины (обычно не более 2–3 тысяч пар нуклеотидов, т.п.н.).

Для этого проводят 20–30 циклов реакции. Каждый цикл состоит из 3 стадий (рисунок 4.2):

**Денатурация ДНК  
(95°C)**



**Отжиг праймеров  
(55-65°C)**



**Полимеризация цепей ДНК  
(72°C)**

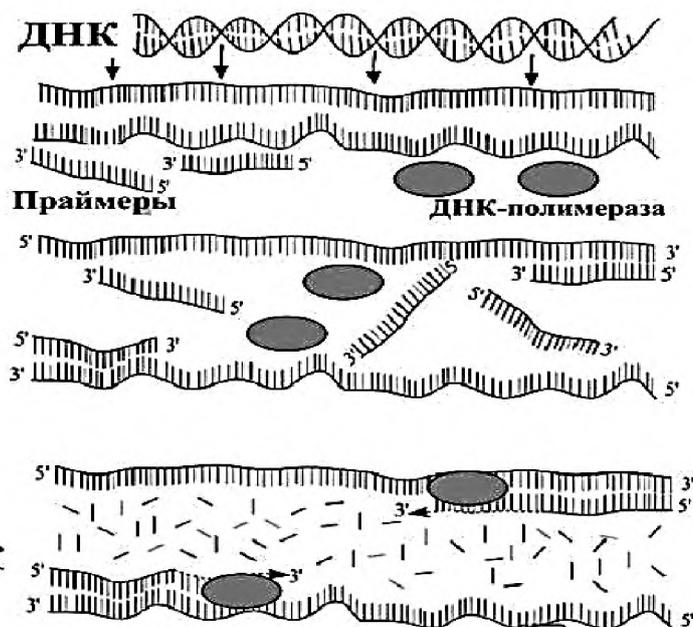


Рисунок 4.2 – Стадии ПЦР (<http://www.myshared.ru>)

*1-я стадия – денатурация.* Чтобы полимераза могла работать, 2 цепи ДНК-матрицы нужно разъединить. Для этого реакционную смесь нагревают до +94...+98°C. В таких условиях разрушаются водородные связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

*2-я стадия – отжиг праймеров.* На этом этапе праймеры специфично присоединяются к освободившимся цепям ДНК-матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу (рисунок 4.2). Чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками, при их конструировании необходимо учитывать такую важную характеристику, как температура плавления – это расчетная температура, при которой половина праймеров присоединяется к целевому участку ДНК. Отжиг проводят при температуре на 1-5°C ниже температуры плавления, но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах +40...+72°C.

В идеале праймеры должны соответствовать следующим критериям: температуры плавления двух праймеров не должны различаться более чем на 5°C; ГЦ-состав их должен уложиться в интервал 40–60%; в структуре олигонуклеотидов не должно быть шпилек (участков, комплементарных друг другу); праймеры не должны образовывать дуплексы (спариваться) друг с другом; лучше, если на 3'-конце праймера будет гуанин или цитозин, так как они образуют с комплементарными основаниями 3 водородные связи (между А и Т образуются 2 связи), что делает комплекс праймер-матрица более стабильным.

В реальности редко получается соблюсти все условия из-за множества причин. Однако чем больше критериев соблюдено при создании праймеров, тем выше вероятность правильной их работы.

Чтобы разработать эффективные праймеры, необходимо знать последовательность ДНК у концов целевого участка и, руководствуясь упомянутыми критериями, выбрать подходящие фрагменты, которым будут комплементарны

будущие праймеры. Все это удобно делать в специальных компьютерных программах (например, PrimerSelect).

**3-я стадия – элонгация.** Представляет собой синтез ДНК под действием фермента ДНК-полимеразы, которая последовательно выстраивает цепь ДНК (полимер) из нуклеотидов (мономеров), т.е. полимеризует их. Данный этап чаще проводят при температуре  $+72^{\circ}\text{C}$ , которая является оптимальной для работы Taq-полимеразы. Фермент присоединяется к комплексам праймер-матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера.

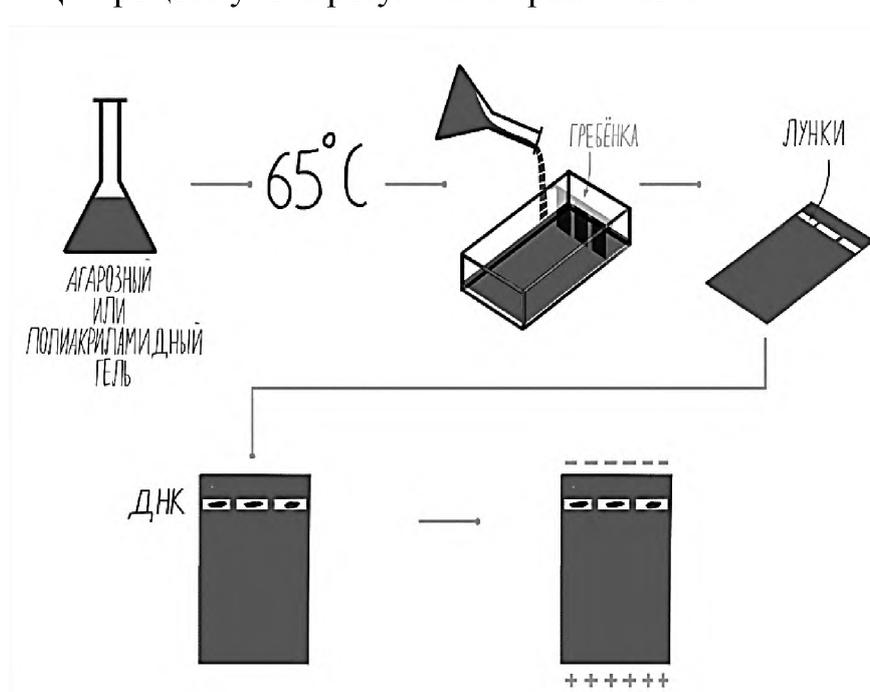
Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50–60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-циклера задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов.

Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально.

После прохождения всех циклов в реакционной смеси образуется столько специфических двухцепочечных продуктов, что их «массив» можно увидеть невооруженным глазом – проведя гель-электрофорез.

Через 25–30 циклов количество функциональных молекул полимеразы в реакционной смеси истощается. В связи с этим, чтобы добиться еще большего выхода продукта, содержимое пробирки можно разбавить, например, в 1000 раз и снова использовать для амплификации с уже новыми рабочими компонентами.

**3-й этап – учет результатов.** В зависимости от исполняемой методики ПЦР процесс учета результатов различается.



**Рисунок 4.3 – Подготовка геля для горизонтального электрофореза (<https://biomolecula.ru>)**

Классическая ПЦР после ее проведения требует проведения визуализации результатов, т.к. внешний вид реакционной смеси до и после реакции одинаков. Для этого используют электрофоретическое разделение продуктов амплификации в агаровом геле (рисунок 4.3).

В микроволновой печи расплавляется гель, и в него вносится бромистый этидий. Расплавленную агарозу заливают в камеру для

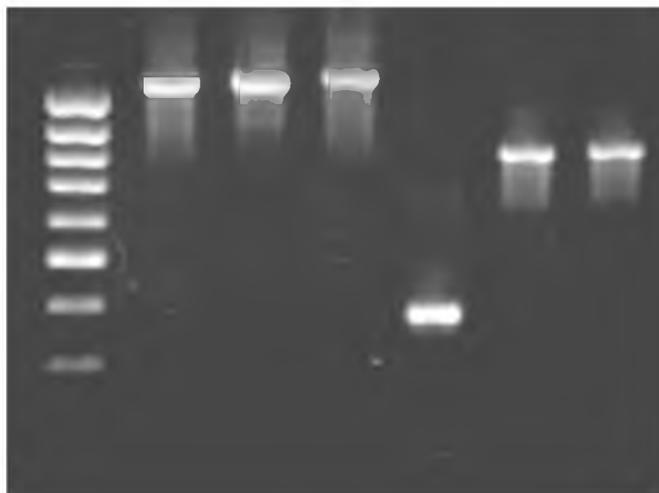
заливки гелей и устанавливают гребенку, которая формирует лунки в геле. После застывания геля, его переносят в камеру для электрофореза. Реакционную смесь смешивают с буфером для внесения, чтобы она после внесения в лунки не диффундировала в буферный раствор, и переносят в лунки геля. Камеру для электрофореза подключают к источнику тока, устанавливают силу тока и время и включают подачу напряжения в камеру. По окончании электрофореза гель переносят на трансиллюминатор (прибор, просвечивающий гель ультрафиолетом) и просматривают в ультрафиолетовом свете.

Под воздействием электрического поля ДНК будет двигаться в геле в зависимости от молекулярной массы. Чем длиннее фрагмент, тем медленнее будет его движение через гель. Таким образом, происходит разделение содержимого реакционной смеси на фракции (рисунок 4.4).

Содержащийся в геле бромистый этидий способен излучать оранжево-красное свечение в ультрафиолете и связываться с двухцепочечной ДНК, поэтому проходящие через гель ампликоны будут присоединять к себе молекулы этого вещества. Содержание бромистого этидия в геле очень низкое, поэтому сам гель не «светится». Но ампликоны, проходя через гель, встраивают в себя его молекулы и формируют зоны высокой концентрации бромистого этидия, которые в ультрафиолете проявляются в виде светящихся ярких оранжево-красных полос.

Наличие светящейся полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о наличии искомого фрагмента нуклеиновой кислоты в исследуемой пробе, т.е. проба положительная. Если полоса отсутствует или ее уровень не совпадает с положительным контролем, то она считается отрицательной. В отрицательном контроле не должно быть никаких светящихся полос. Если же они появляются, то это свидетельствует о нарушении правил работы или контаминации реактивов. Отсутствие специфической полосы в положительном контроле свидетельствует о неэффективной экстракции ДНК или неправильно приготовленной реакционной смеси.

Гель-электрофорез представляет собой трудоемкий процесс, требующий дополнительного времени на проведение анализа. Кроме того, разнесение продуктов амплификации может привести к загрязнению помещений ими.



**Рисунок 4.4 – Амплифицированные участки ДНК в агарозном геле после электрофореза:** вертикальные дорожки – отдельные пробы, соответствующие разным бактериальным штаммам; горизонтальные полоски на каждой дорожке – фрагменты ДНК разной длины (<https://upload.wikimedia.org>)

### 4.3. ПЦР в реальном времени



**Рисунок 4.5 – Амплификатор для real-time PCR (CFX384 Touch™)**  
(<https://biomolecula.ru>)

**ПЦР в реальном времени** (*количественная ПЦР, real-time PCR*) позволяет не только обнаружить в пробе целевую нуклеотидную последовательность, но и измерить количество ее копий, а значит, и рассчитать, сколько же было исходной матрицы. Этой матрицей может быть как ДНК, так и РНК. В последнем случае первой стадией будет обратная транскрипция.

Метод real-time ПЦР не требует визуализации продуктов реакции с помощью гелеэлектрофореза – их накопление фиксируют в реальном времени оптические датчики, вмонтированные в амплификатор и настроенные на определенную длину волны, испускаемую флуоресцирующими метками.

При этом используют 2 типа меток: *интеркалирующие агенты* и *зонды с флуорофорами*.

Самый популярный интеркалирующий агент – SYBR Green – флуорофор, резко увеличивающий флуоресценцию (в 1000 раз) после связывания с двухцепочечной молекулой ДНК. Таким образом, увеличение флуоресценции будет пропорционально увеличению количества ДНК в каждом цикле ПЦР. К сожалению, интеркалирующие агенты обладают низкой специфичностью: они могут связываться и с «побочными» продуктами реакции, и с димерами праймеров. Однако тщательный подбор праймеров и условий ПЦР минимизирует этот недостаток.

Систем зондов с флуорофорами достаточно много. К наиболее распространенным относятся:

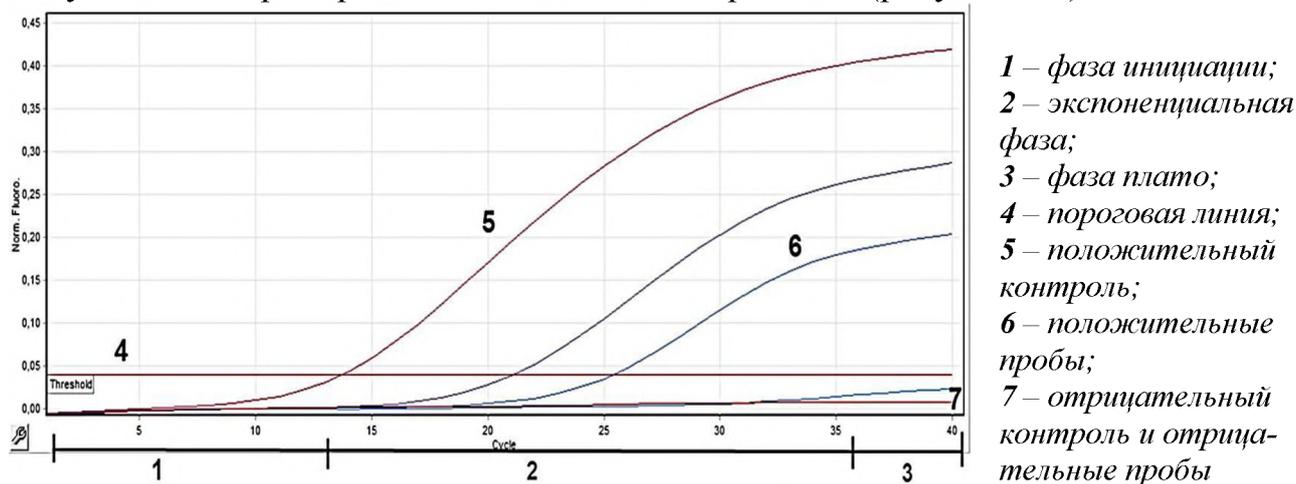
- *TaqMan* – это небольшой олигонуклеотид, комплементарный внутреннему участку амплифицируемого фрагмента ДНК, содержит два флуорофора: репортер и гаситель. Когда они находятся на одном зонде (т.е. близко друг к другу), гаситель поглощает сигнал от репортера. Во время амплификации движущаяся по ДНК полимеразы разрушает зонд, репортер и гаситель отдаляются друг от друга, и флуоресценция репортера становится заметной;

- *молекулярные маяки* – это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК, образующие петлю со шпилькой, на концах которой «пришиты» репортер и гаситель. Пока шпилька существует, гаситель находится рядом с репортером, подавляя его свечение. Как только зонд соединяется петлей с комплементарным участком ДНК, репортер и гаситель оказываются достаточно далеко друг от друга, чтобы началась флуоресценция, которая фиксируется на этапе отжига праймеров;

- *скортионы* – это структуры, подобные молекулярным маякам, только на 3'-конце после гасителя к ним пришит праймер, с которого и начинается амплификация ДНК. Сигнал от репортера фиксируют в следующем цикле реак-

ции: двухцепочечная молекула ДНК денатурирует, на этапе отжига праймеров раскрывается шпилька зонда, и он, изгибаясь как хвост скорпиона, комплементарно соединяется с цепочкой ДНК, синтезированной как продолжение его праймера. Таким образом репортер с гасителем разносятся в пространстве, и появляется свечение.

Процесс учета результатов при ПЦР в реальном времени сводится к анализу графика кривых флуоресценции, который строится на основании данных, полученных с прибора после каждого цикла реакции (рисунок 4.6).



**Рисунок 4.6 – График кривых амплификации (ННП ПВМ и Б УО ВГАВМ)**

На графике ось абсцисс соответствует циклу реакции, ось ординат – уровень флуоресценции. В начале реакции количество ампликонов невелико, и поэтому флуоресценция в пробирке ниже предела детекции прибора и соответствует фоновому уровню.

С каждым циклом реакции количество ампликонов экспоненциально увеличивается и, соответственно, увеличивается флуоресценция. В определенный момент уровень флуоресценции преодолевает уровень чувствительности прибора и отмечается подъем графика. Эта фаза от начала реакции до начала подъема графика называется фазой инициации.

После этого идет экспоненциальная фаза, при которой количество ампликонов растет по экспоненциальному закону. При истощении реакционной смеси, когда один из компонентов реакции заканчивается, количество образуемых ампликонов уменьшается и флуоресценция остается неизменной – фаза плато.

По окончании реакции определяют пороговую линию, которая соответствует уровню фоновой флуоресценции. Все исследуемые образцы, чьи кривые амплификации пересекают пороговую линию, считаются положительными, остальные – отрицательными.

По сравнению с классической ПЦР модификация в реальном времени обладает следующими преимуществами:

- скорость проведения анализа увеличивается за счет отсутствия учета реакции методом электрофореза;
- отсутствие контаминации лабораторных помещений продуктами амплификации, т.к. не требуется открывать пробирки и проводить пипетирование амплифицированной ДНК;

- возможность наблюдения за ходом реакции и получения предварительных результатов до окончания реакции;
- при введении положительных контролей с заранее известной концентрацией можно получить количественные данные исследуемых образцов.

Недостатки данного метода связаны с возможностью получения ложноположительных результатов при использовании нестабильного зонда (при его самопроизвольном разрушении во время реакции), а также ложноотрицательных результатов (при изменчивости организма зонд может терять специфичность и не присоединяться к матрице ДНК).

Применяют ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов, одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) и хромосомных aberrаций, для обнаружения конкретных патогенов и белков (иммуно-ПЦР в реальном времени).

#### 4.4. Другие варианты проведения ПЦР

Сегодня существуют десятки вариантов проведения ПЦР для разных целей, для повышения специфичности и эффективности. Разберем лишь несколько наиболее популярных и интересных.

**ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)** применяют при работе с вирусами, геном которых представлен молекулой РНК, в диагностике некоторых видов рака по специфическим транскриптам опухолевых клеток, а также в геной инженерии, если нужно экспрессировать эукариотический ген в бактериальных клетках.

Полимеразная цепная реакция может идти исключительно на матрице ДНК, поэтому если в образце присутствует мРНК (матричная РНК, на основе которой строятся клеточные белки), то сначала ее необходимо «переписать» в ДНК. Для этого применяют реакцию обратной транскрипции, в которой фермент обратная транскриптаза по матрице РНК строит комплементарную ДНК (кДНК), а потом с этой ДНК проводят обычную ПЦР, как описано выше.

Эта реакция обычно осуществляется в следующих разновидностях:

1) *двухпробирочный метод* (в первой пробирке при +37°C по матрице РНК синтезируют кДНК, а затем во второй пробирке проводят стандартную ПЦР) применяют для исследования некоторого набора генов. При этом высока вероятность ошибок при пипетировании и загрязнения образца при переносе во вторую пробирку, но однажды проведя обратную транскрипцию, полученную кДНК можно использовать в нескольких экспериментах с разными целями;

2) *однопробирочный метод* (все реагенты смешивают вместе, дают отстояться в течение 1 часа при +37°C и помещают в амплификатор) применяют при большом количестве образцов, но малом количестве изучаемых генов. При этом в ПЦР участвует вся синтезированная кДНК, и повторить реакцию уже невозможно, однако время проведения эксперимента существенно сокращается.

ОТ-ПЦР можно проводить и с одним ферментом – Tth-полимеразой (термостабильная полимераз, выделенная из бактерии *Thermus thermophilus* HB-8),

которая обладает двойной активностью: в присутствии ионов магния – полимеразной, а в присутствии ионов марганца – обратнотранскриптазной. Причем обе реакции могут идти при +70°C, что очень важно в случае ГЦ-богатых РНК, которые охотно образуют «шпильки»: высокая температура поддерживает матрицу в денатурированном состоянии, повышает специфичность отжига праймеров и позволяет эффективно копировать сложные молекулы.

Однако в присутствии марганца точность полимеразы сильно снижается, и кДНК содержит множество ошибок. Чтобы этого избежать, после реакции обратной транскрипции в пробирку вносят ЭДТА, которая образует с марганцем устойчивый комплекс, тем самым выводя его из реакции. Затем добавляют магний и проводят ПЦР.

**Иммуно-ПЦР.** Помимо качественного и количественного определения в пробе нуклеиновых кислот возникает необходимость детектировать ферменты, гормоны, токсины, антитела и другие молекулы. В большинстве случаев для этого используют иммуноферментный анализ (ИФА). Чувствительность метода позволяет определять даже несколько нанограммов антигена в пробе, однако отдельные молекулы ИФА выявить не в состоянии. Этот недостаток удалось устранить, разработав технологию иммуно-ПЦР, в которой соединены принципы ИФА и ПЦР.

Иммуно-ПЦР применяют для поиска в пробах вирусных антигенов, опухлеассоциированных антигенов, прионов, бактериальных белков, токсинов (в том числе и небелковых) и других веществ.

Суть метода заключается в том, что пробы помещают в специальные пробирки, материал которых обладает высокой антигенсвязывающей способностью и термостойкостью. К ним добавляют специфические антитела с «пришитыми» ДНК-метками длиной 150–300 п.н. Когда антитела присоединятся к искомым молекулам (антигенам), иммобилизованным на стенках пробирок, производят многократную промывку, чтобы удалить непрореагировавшие меченые антитела. Затем в эти же пробирки заливают смесь для ПЦР в реальном времени (с интеркалирующим агентом или зондом), помещают их в циклер и проводят реакцию, во время которой амплифицируются ДНК-метки на антителах, связанных с антигенами. Так получают сведения не только о наличии антигенов в пробе, но и об их количестве.

Иммуно-ПЦР по разрешающей способности превосходит ИФА на 2–5 порядков и выявляет антиген, даже когда невозможно сконцентрировать пробу либо на ранних стадиях бактериальной или вирусной инфекции. Кроме того, иммуно-ПЦР позволяет одновременно обнаруживать много разных антигенов, т.к. к антителам «пришиты» разные ДНК, амплифицируемые с уникальными праймерами, для которых можно использовать зонды разных конструкций.

**ПЦР с горячим стартом (hot start PCR).** Известно, что Taq-полимераза может проявлять небольшую активность при комнатной температуре и даже когда пробирка с реакционной смесью находится во льду. Поэтому фермент всегда добавляют в смесь непосредственно перед запуском реакции. Но если,

например, проб много, то какие-то из них некоторое время будут стоять уже с полимеразой, пока экспериментатор внесет ее во все пробирки. В этом случае есть вероятность получения неспецифически амплифицированных фрагментов. Чтобы избежать такой неприятности, используют ПЦР с горячим стартом, где в смесь добавляют полимеразу в комплексе с антителами, блокирующими ее активность. На первой стадии ПЦР (при  $+95^{\circ}\text{C}$ ) антитела денатурируют, полимеразы освобождается и только тогда начинает работу.

**Ступенчатая ПЦР** (*touchdown PCR*). При оптимальной температуре отжига праймеры иногда могут связываться и с не идеально комплементарными им участками, а вот если эту температуру немного повысить (например, до  $+72^{\circ}\text{C}$ ), то специфичность гибридизации праймеров с матрицей можно существенно увеличить. На этом и основана ступенчатая ПЦР: первые циклы проводят при повышенной температуре отжига, постепенно снижая ее до оптимальной в следующих циклах. В результате поначалу вероятность неспецифичной амплификации снижается до минимума, а далее уже размноженные копии нужного фрагмента будут успешно конкурировать за праймеры с не полностью комплементарными им участками ДНК-матрицы.

**«Холодная» ПЦР** (*COLD-PCR – CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR*). Применяется, когда необходимо выявить, например, однонуклеотидную мутацию гена, но при этом проба содержит ДНК-матрицу как с мутантным геном, так и с геном «дикого типа». Такая смесь типична для биоптатов или образцов крови онкологических больных, и потому этот анализ востребован в медицине для ранней диагностики рака или его рецидивов, а также для назначения индивидуальной терапии на основе молекулярного профилирования. Если делать стандартную ПЦР, то амплифицируются и мутантные, и немутантные аллели интересующего гена, причем последних будет значительно больше, и выявить мутацию будет очень трудно.

Принцип «холодной» ПЦР основан на том, что замена даже одного нуклеотида в одной из цепей ДНК-фрагмента приводит к изменению его температуры плавления, т.е. температуры, при которой 2 цепи ДНК отсоединятся друг от друга. Это изменение составляет обычно  $0,2\text{--}1,5^{\circ}\text{C}$  для фрагментов длиной до 200 п.н. Такая пониженная температура называется критической температурой денатурации ( $T_c$ ): при ней эффективность ПЦР резко падает из-за малого числа денатурированных матриц. При  $T_c$  матрицы «дикого типа» денатурировать уже не будут, но будут те, в которых одна из цепей содержит нуклеотидную замену, отчего их  $T_m$  снижается до значения  $T_c$ .

Для получения таких коротких диагностических матриц интересующий фрагмент вначале выделяют из тотальной ДНК биоматериала с помощью стандартной ПЦР. Мутантные формы среди этих фрагментов ищут уже с помощью COLD-PCR, которая проходит в несколько этапов:

- стандартная денатурация при  $+94^{\circ}\text{C}$ ;
- гибридизация при  $+70^{\circ}\text{C}$ , во время которой образуются гомодуплексы (обе цепи ДНК «дикого типа» или же обе мутантных, что ма-

ловоятно из-за их низкого содержания в исходной пробе) и гетеродуплексы целевых фрагментов (одна цепь «дикого типа», вторая – мутантная). В гетеродуплексе как минимум один нуклеотид (измененный) не может образовать водородных связей со своим «правильным» визави, что выражается в понижении температуры плавления такого дуплекса;

- критическая денатурация при  $T_c$  (денатурируют лишь гетеродуплексы; гомодуплексы остаются в двухцепочечном состоянии);
- отжиг праймеров (может идти только на разошедшихся цепях гетеродуплекса);
- элонгация.

После окончания всех циклов реакции полученные копии интересующего фрагмента секвенируют, чтобы точно установить место и тип мутации.

**ПЦР длинных фрагментов (*long-range PCR*)** применяется, когда нужно амплифицировать очень длинные фрагменты – более 5 т.п.н. В *long-range PCR* часто используют две полимеразы: Taq и Pfu. Первая может за один проход синтезировать длинную цепь ДНК, но при этом «застревает», совершив ошибку, потому что не умеет вырезать только что вставленные нуклеотиды. Вторая полимеразы менее процессивна, зато способна исправлять ошибки. Так они друг другу и помогают: Taq ошибается, а Pfu исправляет, давая возможность первой закончить синтез.

**Мультиплексная ПЦР (*multiplex PCR*)**. Бывают случаи, когда в одной пробе необходимо выявить сразу несколько последовательностей. Например, при инфекции несколькими патогенами, при диагностике комплекса заболеваний или при выявлении мутаций. И чтобы не проводить много реакций, экономить время и реактивы – применяют ПЦР со множеством праймеров. Суть ее в том, что в одну пробирку с ДНК-матрицей добавляют целый набор праймеров для одновременной амплификации нескольких интересующих фрагментов.

Однако при этом надо соблюдать такие условия: температуры отжига праймеров не должны сильно различаться (т.е. длина каждого праймера должна быть 18–28 нуклеотидов, а ГЦ-состав – 45–60%); каждый набор праймеров должен давать фрагмент, отличный от других по размеру, чтобы после электрофореза в геле полосы не совпадали.

**ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК (*Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD*)** применяется, когда нужно различить сходные геномы: виды бактерий, сорта растений, породы собак и т.д. Используют небольшой праймер (до 10 н.), который может гибридизоваться со многими случайными участками генома. Если правильно подобрать последовательность праймера и условия реакции, то в геле после электрофореза пробы будут отличаться друг от друга количеством и (или) расположением полос.

При всей схожести метода с *гер-PCR*, последнюю все-таки считают независимой техникой, отличающейся от *RAPD* своими характеристиками. Так,

RAPD менее специфична и хуже воспроизводится: любая мутация в комплементарном праймеру участке матрицы приводит к тому, что короткий праймер не гибридизуется с ним, и соответствующей полосы в геле не будет. Удлинение праймеров в гер-PCR до 20-22 н. сильно повышает воспроизводимость результатов.

**Асимметричная ПЦР** (*asymmetric PCR*) проводится при необходимости получить амплифицированную копию участка только одной из цепей ДНК (например, для последующей гибридизации). В таком случае в реакционной смеси концентрация одного праймера должна быть намного выше, чем другого, и тогда на выходе будут превалировать фрагменты нужной цепи.

**Метилспецифичная ПЦР** (*methylation-specific PCR*). Геномная ДНК живых организмов, как правило, метилирована: после синтеза ДНК к небольшому проценту цитозинов и аденинов фермент ДНК-метилтрансфераза присоединяет метильную группу. Цели метилирования разнообразны: от регуляции экспрессии отдельных генов до регуляции целых процессов, таких как старение или канцерогенез.

Это свойство геномной ДНК эксплуатирует метилспецифичная ПЦР. Такой вариант ПЦР применяют, чтобы понять, метилирован ли определенный участок ДНК по цитозину.

Перед постановкой реакции ДНК-матрицу обрабатывают бисульфитом. Он преобразует неметилированные цитозины в урацилы, которые распознаются праймерами и полимеразой как тимины, а метилированные цитозины не трогают. Затем проводят 2 реакции с разными праймерами: в одну пробирку вносят праймеры, специфичные к последовательности с цитозинами, а в другую – к последовательности с урацилами. Если амплификация прошла в первой пробирке, значит ДНК на этом участке метилирована, если во второй – не метилирована.

**Гнездовая, или вложенная ПЦР** (*nested PCR*) – ПЦР со вложенной парой праймеров применяется для уменьшения вероятности амплификации неспецифических фрагментов. Если, например, какие-то из праймеров «сядут» на незапланированные участки, после электрофореза в геле можно получить несколько полос – целевого фрагмента и побочных.

Чтобы повысить специфичность реакции, используют 2 набора праймеров: первый – для амплификации более длинного фрагмента, второй – для амплификации внутреннего участка этого фрагмента. Несколько раундов ПЦР проводят с первым набором, а затем добавляют второй. Чтобы избежать продолжения амплификации с первыми праймерами, оба набора разрабатывают для отжига при разных температурах.

**Инвертированная ПЦР** (*inverse PCR*) используется, когда известна последовательность (сиквенс) какого-то участка ДНК, но нужно амплифицировать вовсе не его, а то неизвестное, что его окружает (например, необходимо узнать, в какое место генома встроился вирус с известным сиквенсом).

Инвертированная ПЦР, которая состоит из нескольких этапов:

- ДНК, где есть участок с известной последовательностью, разрезают крупнощепящей рестриктазой. Такие эндонуклеазы распознают сайты длиной 6–8 нуклеотидов, а поскольку таких мест в геноме не может быть слишком много, ДНК режется на крупные куски – фрагменты длиной несколько т.п.н. (важно учесть, чтобы сайта узнавания выбранной рестриктазы не было внутри известного нам участка: он должен войти целиком в один из крупных рестрикционных фрагментов);
- ферментом лигазой полученные фрагменты закольцовывают;
- используя праймеры к известной последовательности, но ориентированные снаружки от нее, амплифицируют ту самую, неизвестную, которую потом можно, например, секвенировать.

*ПЦР с перекрывающимися праймерами*, или *ПЦР с продлением перекрывания* (*overlap extension PCR*). Чаще всего для соединения двух фрагментов двухцепочечной ДНК используют метод рестрикции/лигирования, когда края этих фрагментов разрезают одинаковыми эндонуклеазами с образованием «липких» концов, а потом соединяют их с помощью лигазы. Однако с этой целью можно применять и метод ПЦР. ПЦР с перекрывающимися праймерами, выполняется в несколько этапов:

- для каждого фрагмента ДНК-матрицы конструируют 2 праймера: один обычный, а второй (гибридирующий со стороны будущей сшивки фрагментов) на 5'-конце несет небольшую последовательность, соответствующую концу другого фрагмента, того, что будут пришивать;
- проводят 2 отдельные ПЦР – для каждого из фрагментов (в результате последовательность, содержащаяся на 5'-концах «стыковочных» праймеров, уже входит в состав новообразованных амплифицированных фрагментов);
- содержимое обеих пробирок смешивают и используют уже только 2 праймера – для дальних (внешних) концов (поскольку оба фрагмента содержат на одном конце последовательности, комплементарные друг другу, во время отжига праймеров фрагменты гибридизуются, а их перекрывающиеся 3'-концы служат праймерами; таким образом, получаются длинные молекулы, состоящие из 2 фрагментов).

Этот же вариант ПЦР, но с небольшими модификациями, используют и для внесения мутаций, например, если из длинного фрагмента ДНК надо удалить какой-то участок.

**Сборочная ПЦР** (*assembly PCR*) используется для сборки синтетических молекул ДНК из отдельных фрагментов, например, чтобы получить синтетические гены или даже целые геномы.

В сборочной ПЦР используют одноцепочечные олигонуклеотиды длиной до 50 н., одна часть которых предназначена для образования одной цепи ДНК, а другая – для образования другой. Важно, чтобы эти олигонуклеотиды частично перекрывались концами (примерно на 20 нуклеотидов) с «соседями» на будущей противоположной цепи, поскольку они сами будут работать и праймерами, и матрицей.

Во время первых 30 циклов ПЦР концы олигонуклеотидов удлиняются по матрице фрагментов противоположной цепи. К концу процесса каждый олигонуклеотид удлинится настолько, что превратится в отдельную цепочку будущей синтетической ДНК. Тогда в реакцию добавляют пару праймеров, комплементарных концам этой ДНК, и проводят дополнительные 23 цикла, получая на выходе множество копий синтетической ДНК.

**Твердофазная ПЦР** (*solid phase PCR*) применяется для получения ДНК-микрочипов или при секвенировании на платформе Illumina.

К твердой поверхности 5'-концами пришивают праймеры, добавляют реакционную смесь и проводят твердофазную ПЦР.

В первом цикле удлиняется некоторое количество праймеров, затем проводят промывку, чтобы удалить свободно плавающие в растворе ДНК-матрицы, добавляют новый раствор (но уже без матриц) и продолжают ПЦР.

Одноцепочечные ДНК, торчащие над поверхностью, на этапе отжига изгибаются и гибридизуются с какими-то из соседних праймеров, становясь матрицами для удлинения этих праймеров.

На этапе денатурации обе цепи расходятся, но все равно остаются прикрепленными к поверхности, так как представляют собой продолжения праймеров.

**In situ ПЦР** – это реакция, которую проводят непосредственно в клетках или тканях, например, для изучения внутриклеточного развития вирусов.

Сначала клетки или ткань фиксируют на предметном стекле и обрабатывают протеазой, чтобы расщепить белки и освободить ДНК (или РНК, если собираются проводить ОТ-ПЦР). Затем прямо на стекло добавляют смесь для ПЦР и ставят препарат в амплификатор. Выявляют получившиеся фрагменты либо ДНК-гибридизацией, либо иммунологическими методами.

**Капельная цифровая ПЦР.** Цифровая ПЦР (*digital PCR*) – более точный и воспроизводимый метод количественного определения ДНК, чем ПЦР в реальном времени. Стандартная ПЦР проходит во всем объеме образца, а при цифровой пробу делят на большое количество маленьких субъединиц (компартов) и проводят ПЦР в каждой из них отдельно.

Методы разделения на компартменты в различных технологиях цифровой ПЦР отличаются друг от друга (используют масляную эмульсию, капилляры и т.д.), а реакцию проводят в планшетах с микролунами. Результаты визуализи-

руют чаще всего с помощью системы TaqMan, но иногда применяют и интеркалирующие агенты, например, зеленую флуоресцирующую краску EvaGreen.

Метод кПЦР разработали австралийцы Алек Морли и Памела Сайкс в 1992 г., когда исследовали больных лейкемией. В последующие годы разные исследовательские группы разрабатывали свои варианты, в том числе и варианты компарментализации. Все они имели существенный недостаток – высокую трудоемкость: пробу надо было разделять на сотни (а то и тысячи) реакций объемом по несколько микролитров каждая или проводить дополнительные реакции (например, иммобилизацию праймеров на магнитных шариках и гибридизацию продуктов ПЦР с флуоресцентными пробами, как в технологии BEAMing), а затем отдельно анализировать результаты.

От этих проблем экспериментаторов избавила капельная цифровая ПЦР (кцПЦР), или по-английски droplet digital PCR (ddPCR). Общеизвестным лидером в этой области является система цифровой капельной ПЦР — QX200 производства компании Bio-Rad. Эту методику разработала компания QuantaLife, а в 2011 г. Bio-Rad приобрела права на технологию.

В ddPCR из 20 мкл образца, в котором требуется определить количество исследуемой ДНК, создают водно-масляную эмульсию. Реакционную смесь разделяют на приблизительно 20 000 капель-реакций объемом около 1 нл каждая с помощью автоматического генератора капель. При этом генетический материал распределяется по каплям случайным образом: в них попадают как ДНК-мишени, так и фоновая ДНК. Процесс распределения целевой ДНК по каплям чисто случайный и подчиняется закону распределения малых чисел Пуассона. Перед разделением образца на капли не обязательно разводить его до концентрации, чтобы в каждой капле было либо 0, либо 1 копия ДНК-мишени: при анализе результатов учитываются ситуации, когда в одной капле находится более 1 копии мишени.

Капли вносят в 96-луночный планшет для ПЦР и помещают в циклер. Реакция проходит независимо в каждой капле. В тех каплях, куда попала ДНК-мишень, образуется ПЦР-продукт, что приводит к увеличению уровня флуоресцентного сигнала от флуоресцентной метки: либо TaqMan-зондов, либо интеркалирующего красителя. После ПЦР в специальном устройстве (ридере) капли независимо друг от друга проверяют на наличие или отсутствие в них флуоресцентного сигнала. Количество капель с положительным и отрицательным сигналами подсчитывают для каждого образца, а программное обеспечение выдает концентрацию ДНК-мишени в виде числа копий в микролитре. Анализ продукта проходит в конечной точке после проведения ПЦР.

В кцПЦР определение количества ДНК-мишени проводят не относительно, используя калибровочную кривую, как в случае с ПЦР в реальном времени, а прямым подсчетом капель с наличием или отсутствием в них ДНК-мишени. Это существенно увеличивает стабильность системы и ее устойчивость к ингибиторам ПЦР.

При наличии только двух флуоресцентных каналов (FAM и HEX/VIC) система позволяет запускать 4–5-плексные реакции за счет использования смеси зондов с одной нуклеотидной последовательностью, но меченных красителями

FAM и HEX/VIC в различных пропорциях. Возможно также проводить 2-3-плексные реакции с интеркалирующим красителем EvaGreen, используя различную «емкость» разноразмерных ПЦР-продуктов для интеркалятора, что позволяет независимо подсчитать количество этих продуктов по разнице уровня их флуоресценции.

С помощью капельной цифровой ПЦР можно определять:

- количество интересующих молекул ДНК в образце;
- до 0,01% минорного, например мутантного, генома в присутствии генома нормальной ткани;
- вариации числа копий гена (copy number variation, CNV);
- уровень экспрессии генов и микроРНК, включая детекцию небольших (до 10%) изменений уровня экспрессии;
- различия в геномном контенте и экспрессии между единичными клетками.

Метод активно используют в различных областях, но наиболее часто при проведении онкоисследований, включая анализ свободной циркулирующей ДНК и образцов жидкой биопсии (EGFR, BRAF, KRAS и т.д.); детекции нужных вариантов в экспериментах по геномному редактированию (CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN); изучении геномики единичных клеток (single cell).

Несмотря на сходство применения цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени, скорее всего, в будущем ddPCR будет постепенно вытеснять real-time PCR как основной ПЦР-метод количественного определения ДНК.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем заключается сущность полимеразной цепной реакции? Каково практическое применение ПЦР в биотехнологических процессах?
2. Каким образом осуществляется постановка ПЦР в классическом варианте?
3. В чем заключается сущность метода ПЦР с обратной транскрипцией? В каких случаях он применяется?
4. В чем заключается сущность метода ПЦР в реальном времени? Каковы преимущества данного метода по сравнению с качественной ПЦР?
5. В чем заключается сущность метода иммуно-ПЦР? В каких случаях он применяется?
6. Какие разновидности ПЦР разработаны к настоящему времени? В чем заключается их сущность?

## *Тема 5*

### **СЕКВЕНИРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

**Цель занятия:** ознакомиться с основными принципами секвенирования нуклеиновых кислот.

**Время, отводимое на изучение темы:** 2 часа.

#### **5.1. Понятие о секвенировании нуклеиновых кислот. Исторические аспекты. Практическое применение**

В 1869 г. Иоганн Фридрих Мишер выделил из находившихся в гное клеток неизвестное на тот момент вещество, содержащее азот и фосфор, которое он назвал нуклеином, а затем (из-за его химических свойств) – нуклеиновой кислотой. Первоначально считалось, что молекулы нуклеиновых кислот являются резервом фосфора в клетках, однако уже в первой половине XX в. ученые доказали их наследственную природу. Тогда же появилось понятие гена (наименьшей структурной и функциональной единицы наследственности) и сформировалась новая наука – генетика.

Вплоть до середины прошлого века структура носителей генетической информации и способы ее передачи оставались неясными. Модель двойной спирали ДНК, которая входит во все современные учебники генетики и молекулярной биологии, предложили в 1953 г. Френсис Крик и Джеймс Уотсон (за это в 1962 г. ученые получили Нобелевскую премию). Последовавшие следом открытие генетического кода и разработка центральной догмы молекулярной биологии дали мощный толчок к развитию естественных наук, в первую очередь – генетики.

Осознав основные принципы функционирования нуклеиновых кислот, научное сообщество предприняло грандиозные усилия для того, чтобы разработать быстрые и эффективные методы определения их первичной последовательности – как это принято говорить сегодня, секвенирования.

**Секвенирование нуклеиновых кислот** – определение первичной последовательности нуклеотидов в составе макромолекул, несущих наследственную информацию.

Спустя десятилетия после открытия Уотсона и Крика в биологической науке наступила новая эпоха — эра секвенирования нуклеиновых кислот и геномики.

Почти четверть века назад в США стартовал грандиозный по своему масштабу научный проект, посвященный определению последовательности генома человека. Основной его целью стала расшифровка генетической информации, заключенной в хромосомах, которые мы наследуем от своих родителей. В течение 13 лет многочисленные исследовательские группы по всему миру работали над определением полной последовательности генома человека. Используя полученные данные, появилась возможность искать и находить участки ДНК, связанные с генетически обусловленными заболеваниями. И если природа многих

моногенных болезней (вызываемых отказом единственного гена нашего генома) стала понятна уже давно, то некоторые заболевания (сердечно-сосудистые, онкологические, болезни Альцгеймера и Паркинсона) являются многофакторными: вызвать их может широкий спектр изменений генома, многие из которых до сих пор неизвестны. Информация о генетических вариантах, связанных с человеческими недугами, позволяет формировать научно обоснованный подход при их диагностике и лечении.

Расшифровка и аннотация (маркировка генов и других объектов в последовательности ДНК) генома человека поставили вопрос об использовании генетической информации как для диагностики заболеваний и их долгосрочного прогнозирования у человека, так и для исследования популяционной структуры сообществ, этногенеза и эволюционных процессов. Применение современных технологий секвенирования и генотипирования предлагает перспективные способы решения задач современной медицинской геномики и эпигеномики.

Такие результаты могут быть использованы при создании систем для проведения дифференциальной диагностики и выявления генетической природы заболеваний, для проведения персональной терапии и подбора методик лечения на основе анализа индивидуальных генетических характеристик. Решение таких задач тесно связано с разработкой эффективных алгоритмов и математических моделей для биоинформатической обработки данных геномного секвенирования и их использованием на базе суперкомпьютерных кластеров.

Геномные исследования позволяют решать массу задач как прикладного, так и фундаментального плана. Благодаря им разрабатываются новые лекарства и продукты, они же позволяют проникнуть в глубокую историю человечества или понять причину массового вымирания видов.

В настоящее время разработано несколько способов секвенирования нуклеиновых кислот. Самый популярный и надежный из них – секвенирование по Сэнгеру – позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар оснований (п.о.) и используется для небольших фрагментов генома/генов или для валидации результатов более современного секвенирования «нового поколения» (next-generation sequencing, NGS), где размер 1 прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 п.о.

В отличие от секвенирования по Сэнгеру, методы секвенирования «нового поколения» используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала, которое необходимо, например, для ресеквенирования и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований. Помимо этого, NGS-секвенирование значительно производительнее, позволяя одновременно считывать миллионы и даже миллиарды коротких фрагментов. Такой рост производительности привел к возможности определения последовательности сразу десятков геномов (в зависимости от их размера) за 1 запуск прибора.

Стремительно развивающиеся новые технологии секвенирования ДНК позволяют быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне их геномов. Главным итогом развития геномных и постгеномных технологий стало существенное расширение возможностей изучения генетической природы

целого спектра заболеваний. Масштабные ассоциативные исследования на больших клинических выборках позволяют получать данные о генетических характеристиках, присущих конкретным группам (семьям, популяциям), развивая методы персонализированной медицины. В связи с этим, изучение механизмов генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям и выявление специфических генетических маркеров сегодня имеет особую актуальность.

Технологической основой для подобных исследовательских и сугубо прикладных проектов служат геномные секвенаторы (приборы, на которых проводятся секвенирование), поставляемые различными коммерческими компаниями, такими как Illumina, Thermo Fisher Scientific, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences и др.

Современные технологии делают процесс секвенирования ДНК рутинной процедурой, особенно в том случае, когда речь идет об организмах с уже известной последовательностью генома – их последующая биоинформатическая обработка не представляет значительного труда, поскольку исследователь уже имеет референсный (ранее отсеквенированный) геном, который позволяет избежать ошибок при анализе полученных данных. При анализе нового, неопубликованного ранее генома (*de novo* секвенирование и сборка) перед исследователем стоит ряд более сложных задач, в ходе решения которых он пытается сложить единичные фрагменты в цельную последовательность, используя многочисленные математические алгоритмы и компьютерные мощности.

Однако наибольший интерес представляет не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует: какие гены обеспечивают жизнедеятельность клетки, как происходит регуляция (включение или выключение генов) или какие генные пути начинают работать в ответ на стрессовые факторы.

Все современные секвенирующие платформы отличаются от метода секвенирования по Сэнгеру тем, что не требуют этапа клонирования фрагментов ДНК. Это экономит рабочее время и позволяет избежать ряда проблем с клонированием АТ-богатых участков.

Кроме методов, предложенных Сэнгером, в конце прошлого века развивались и другие подходы к определению последовательности нуклеиновых кислот, которые (в частности, метод химической дегградации, разработанный Максамом и Гилбертом) не получили дальнейшего распространения из-за быстрого развития энзимологии, которая предоставила преимущество методу «терминаторов» Сэнгера.

## 5.2. Технологии секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. В частности, оно используется для:

- секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов;

- идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных);
- валидации данных, полученных на платформах секвенирования нового поколения (NGS);
- микросателлитного анализа;
- анализа делеций и инсерций (малых и протяженных).

Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310.

Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью секвенирования «нового поколения», однако главные преимущества секвенирования по Сэнгеру – высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов – сохраняют актуальность этого типа определения последовательности нуклеиновых кислот.

### *«Плюс-минус» метод секвенирования ДНК*

Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918–2013) – единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 гг.). Первую премию присудили за установление структур белков, особенно инсулина, а вторую награду ему вручили за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот.

Методику секвенирования ДНК с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов и ДНК-полимераза (или фрагмента Кленова ДНК-полимераза I) предложили Сэнгер и его коллеги в 1977 г., причем с течением времени этот метод прошел несколько модификаций и к настоящему моменту считается золотым стандартом современного секвенирования.

Первоначально Ф. Сэнгер и Алан Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК, который можно подразделить на 2 основные стадии (рисунок 5.1):

- полимеразная цепная реакция, в которой используется ДНК, фермент (ДНК-полимераза), олигонуклеотидные праймеры и смесь 4 дезоксинуклеотидов (А, Т, G и С), причем 1 из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по  $\alpha$ -положению фосфата ( $^{32}\text{P}$ );
- очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках).

Смесь делят на 8 равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводят 4 ПЦР-реакции в присутствии каждого из 4 типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводят 4 ПЦР-реакции в отсутствии каждого из них. Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в

«плюс»-системе терминация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного дезоксирибонуклеозидтрифосфата, а в «минус»-системе – перед ним.

Метод получил название «плюс-минус», поскольку реакцию полимеризации в нем изначально проводили либо в отсутствие одного из 4 типов нуклеотидов («минус»-система), либо в присутствии только одного нуклеотида («плюс»-система), что ограничивает возможность наращивания полинуклеотидной цепи, т. е. останавливает (терминирует) ее синтез из-за недостатка соответствующего нуклеотида.

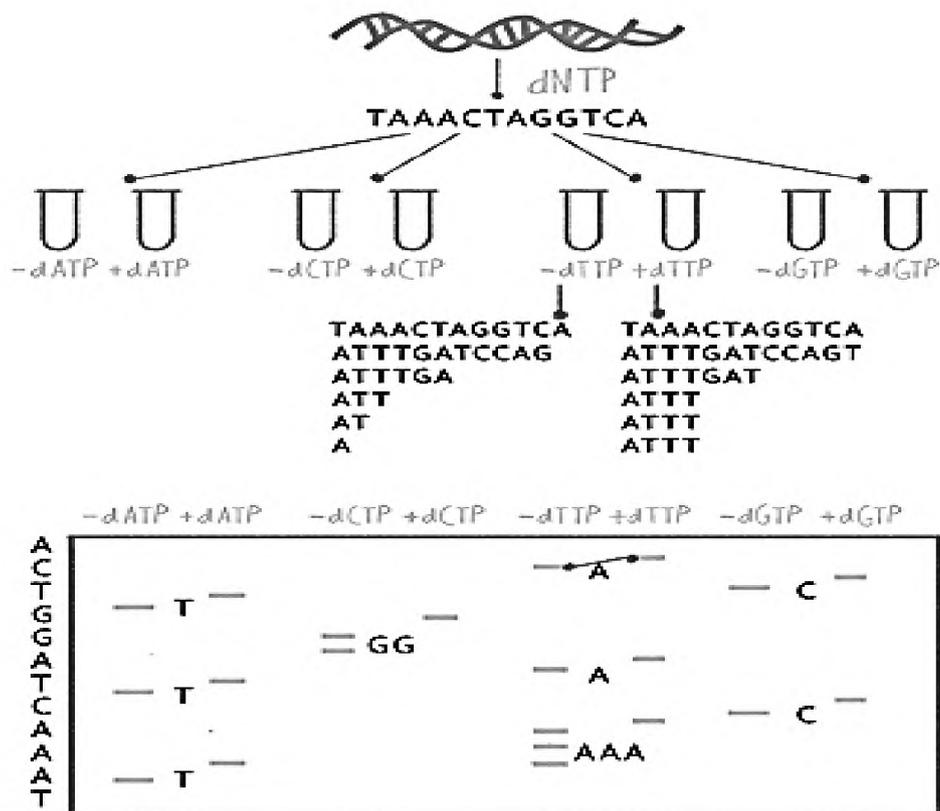


Рисунок 5.1 – «Плюс-минус» метод секвенирования ДНК  
(<https://biomolecula.ru>)

### Метод «терминаторов» секвенирования ДНК (метод «обрыва цепи»)

Спустя несколько лет Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов» или метода «обрыва цепи».

Суть этого метода заключается в том, что в реакционную смесь добавляют аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности ее дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся «обломку» можно установить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК (рисунок 5.2).

При секвенировании методом «терминаторов» используют ДНК-полимеразу, олигонуклеотидные праймеры и смесь 4 дезоксирибонуклеотидов (А, Т, G и С), один из которых радиоактивно помечен по α-положению фосфата ( $^{32}\text{P}$ ).

В каждую из 4 реакций добавляется по одному 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфату (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), которые терминируют дальнейшую реакцию (синтез комплементарной молекулы ДНК с матрицы). Таким образом, в каждой пробирке образуется набор фрагментов ДНК разной длины, которые заканчиваются одним и тем же нуклеотидом. Затем полученные фрагменты визуализируют с помощью электрофореза и, сравнивая длины фрагментов из 4 реакций с ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP, восстанавливают последовательность ДНК.

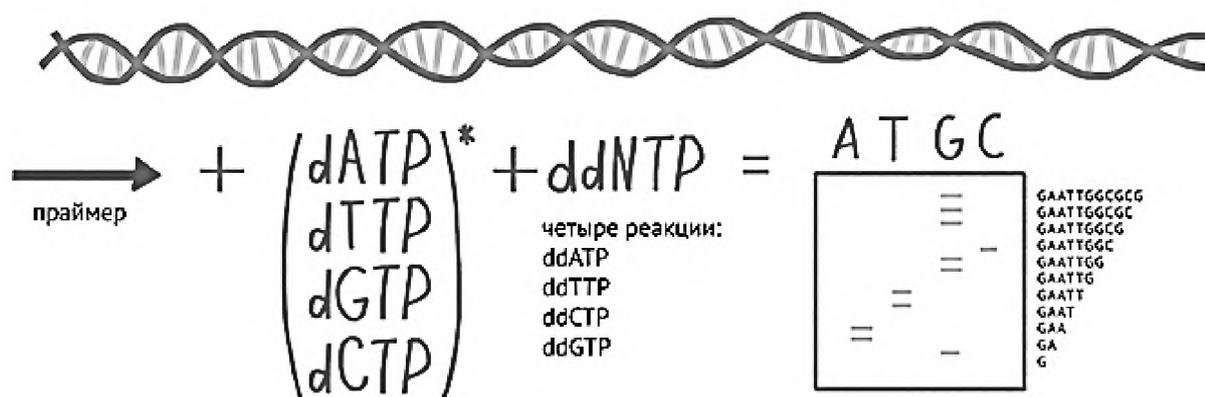


Рисунок 5.2 – Метод «терминаторов» (<https://biomolecula.ru>)

Автоматизированные модификации метода «терминаторов» активно применяются до сих пор в специальных приборах – секвенаторах.

Открытие многочисленных флуоресцентных молекул позволило отказаться от использования радиоактивной метки и сделало возможным проведение реакции в 1 пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом, а выстроившиеся в синтезируемую цепочку ДНК меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции, предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента.

### 5.3. Технологии секвенирования «нового поколения» (next-generation sequencing – NGS)

За последние полтора десятилетия были разработаны и продолжают успешно развиваться совершенно новые технологии определения последовательности нуклеиновых кислот, в основе которых лежит стремление к миниатюризации, автоматизации, увеличению объема получаемых данных, а также удешевлению процесса.

Появление секвенирования «нового поколения» впервые позволило значительно ускорить и удешевить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Более того, появилась реальная возможность одновременно оценивать экспрессию (работу) тысяч генов в организмах, тканях и единичных клетках (секвени-

рование транскриптомов), а также анализировать регуляцию их активности (анализ экспрессии микроРНК и метилирования генома).

В настоящее время на рынке представлено сразу несколько разработок, позволяющих определять последовательность полных геномов организмов, проводить анализ экспрессии генов и метилирования генома. Эти подходы реализуются на секвенаторах нового поколения производства коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Часть разработанных платформ уже ушли с рынка (GS FLX, 454/Roche или HeliScope/Helicos Bioscience); другие, пройдя несколько реинкарнаций и модификаций, прочно закрепились на нем (Illumina и Thermo Fisher Scientific); третьи только начинают занимать свою нишу и находят своего потребителя (Oxford Nanopore Technologies).

Появление высокопроизводительных технологий секвенирования сопровождается прогрессом программного обеспечения: создаются алгоритмы с открытым программным кодом, появляются открытые источники данных и платформы для вычислений. Новые математические и информационные технологии позволяют геномике развиваться быстрее и использовать более сложные алгоритмы. Эти алгоритмы могут включать в себя сразу несколько приложений и программ и позволяют работать с очень большим объемом данных.

Общий принцип пробоподготовки для большинства современных (NGS) секвенаторов включает фрагментирование ДНК, привязку к субстрату, амплификацию фрагментов с помощью ПЦР (в одномолекулярном секвенировании от ПЦР удалось отказаться) и последующее считывание последовательности нуклеиновых кислот. В отличие от метода секвенирования по Сэнгеру, современные платформы обеспечивают параллельное проведение миллиардов реакций в малых объемах, что позволяет получить намного больший объем информации на выходе.

Секвенирование «нового поколения» применяется как для анализа геномов организмов, для которых уже доступен референсный геном (*ресеквенирование*), так и для того, чтобы впервые расшифровать геном организма (*секвенирование de novo*).

Для *ресеквенирования* успешно используют платформы, генерирующие большое количество коротких чтений (секвенируемых фрагментов ДНК), поскольку даже относительно короткие фрагменты ДНК успешно картируются (картирование (выравнивание) – процесс биоинформатического поиска расположения конкретного короткого фрагмента в полной геномной последовательности) на референсный геном (последовательность ДНК в цифровом виде, составленную учеными как общий репрезентативный пример последовательности генома конкретного вида) при биоинформатическом анализе данных. Такие выравненные чтения могут использоваться для поиска однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), малых делеций и инсерций или других структурных изменений в геноме.

Для *секвенирования de novo* и сборки новых, ранее не прочитанных, геномов, использование коротких чтений сильно усложняет сборку, особенно в случае больших по размеру и сложно устроенных геномов эукариот (например,

полиплоидных геномов). В этих случаях используют комбинированный подход – сочетание платформ, генерирующих как короткие, так и длинные чтения.

В то же время наибольший интерес представляет отнюдь не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует.

Благодаря новым подходам, обеспечивающим производительность и относительную доступность методов секвенирования (NGS), появилась реальная возможность проводить ранее технически недоступные исследования:

- *полногеномный анализ* (в том числе, ресеквенирование и секвенирование *de novo*). Ресеквенирование полных геномов человека в интересах персонализированной медицины или секвенирование ранее не изученных геномов вирусов, бактерий, архей, растений, грибов и животных как с чисто фундаментальными, так и прикладными целями;
- *секвенирование РНК (RNA-Seq)*, позволяющее оценивать экспрессию генов не только качественно, но и количественно. Существует возможность отдельно оценивать экспрессию кодирующих и регуляторных РНК. Данные методики направлены на изучение работы генома (активности его генов, в том числе генов-регуляторов) в разных клетках, тканях и органах;
- *метагеномное секвенирование* – оценка разнообразия микроорганизмов в различных образцах. Позволяет оценивать бактериальное разнообразие в различных средах, например, в кишечнике человека, донных отложениях озера Байкал или в горячих источниках Камчатки;
- *анализ ДНК-белковых взаимодействий (ChIP-Seq)* – изучение влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на экспрессию генов, а через нее на фенотипические и физиологические особенности клеток, органов и тканей;
- *бисульфитное секвенирование* и его модификации (например, RRBS) – оценка метилирования в геноме или его участках. Влияние метилирования регуляторных участков генома на уровень экспрессии генов через подавление их транскрипционной активности;
- *таргетное секвенирование* (экзомное секвенирование, секвенирование митохондриальных генов, секвенирование ампликонов). Секвенирование отдельных (выбранных исследователем) участков генома, например, только генов митохондриальной ДНК, кодирующих белки генов или генов, для которых уже описано участие в процессах онкогенеза. Таргетное секвенирование позволяет значительно снизить стоимость эксперимента (из расчета на один образец) и многократно увеличить количество анализируемых образцов.

Оценка уровня метилирования генома, например, позволяет определить, какие генные пути и сети включаются в ответ на меняющиеся факторы окружающей среды; такие работы зачастую проводят для изучения эволюционных механизмов в живых системах. Изучение экспрессии кодирующих белки и не-

кодирующих РНК в разных тканях и клетках также позволяет понять и описать гены, вовлеченные в жизнедеятельность клеток, органов и организмов.

### **Пиросеквенирование**

Одним из первых предложенных методов глубокого секвенирования было пиросеквенирование, подразумевающее «секвенирование путем синтеза». Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащем матрицей для синтеза) комплементарную цепь.

Технологию пиросеквенирования предложил в 1996 г. Пол Нирен с коллегами из Королевского технологического института в Стокгольме, затем ее воплотили в приборе GS FLX, 454 производства Roche (2008 г.). Этим методом можно определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 пар оснований.

подавляющее большинство NGS-методов требуют предварительной фрагментации ДНК для упрощения ферментативных реакций. К обоим концам фрагментированной ДНК «пришивают» ДНК-адаптеры (данная конструкция называется ДНК-библиотекой), необходимые для эмульсионной ПЦР (эПЦР) на магнитных сферах и последующего секвенирования.

Готовые ДНК-библиотеки иммобилизуют на магнитных сферах. Затем магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой доставляют на проточную ячейку, где в присутствии праймера, дезоксинуклеотидтрифосфатов и ферментов (ДНК-полимеразы, люциферазы, АТФ-сульфуриказы) происходит циклический синтез новой цепи.

Во время цикла пиросеквенирования при образовании фосфодиэфирной связи между матричной цепочкой ДНК и нуклеотидом синтезируемой цепи выделяется пирофосфат, который запускает каскад химических реакций, приводящих к выделению АТФ, необходимой для реакции окисления люциферина с выделением кванта света, который фиксируют аналоговой интегральной микросхемой (ПЗС-матрицей), состоящей из светочувствительных фотодиодов. Нуклеотиды, не вовлеченные в синтез новой цепи, удаляют из проточной ячейки, и начинается следующий реакционный цикл, в ходе которого добавляют дезоксинуклеотидтрифосфат другого типа (рисунок 5.3).

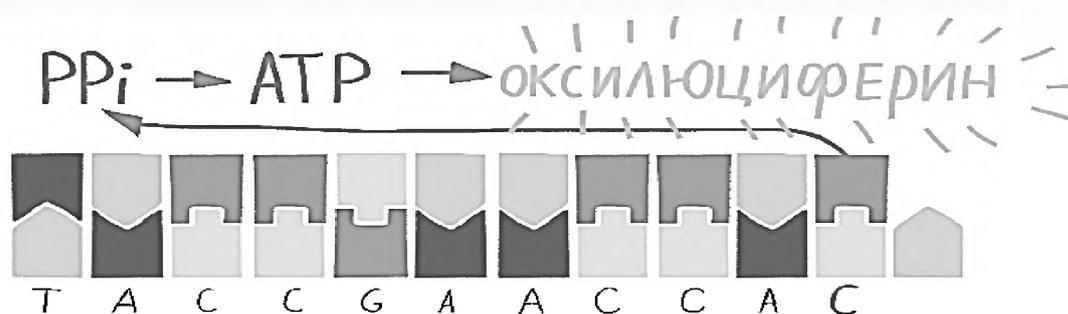


Рисунок 5.3 – Принцип пиросеквенирования (<https://biomolecula.ru>)

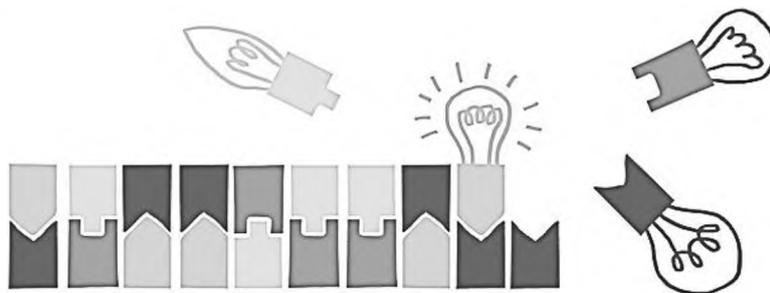
### ***Секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов***

Технология секвенирования на молекулярных кластерах, так же как и пиросеквенирование, подразумевает синтез новой молекулы ДНК по матрице.

Этот метод начали разрабатывать еще в середине 90-х гг. прошлого века химики Шанкар Баласубраманиан и Дэвид Кленерман из Кембриджа, изучавшие работу ДНК-полимеразы на молекулярном уровне, используя флуоресцентно меченые нуклеотиды и ДНК-матрицу, иммобилизованную на поверхности.

Метод заключается в том, что к обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для ПЦР и последующего секвенирования на молекулярных кластерах. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования. Реакционная смесь для синтеза комплементарной ДНК подается на поверхность проточной ячейки и содержит ферменты, олигонуклеотиды, а также 4 типа флуоресцентно меченых дезоксинуклеозидтрифосфатов. После включения в синтезируемую цепь ДНК нуклеотида-терминатора идентифицируют с помощью ПЗС-матрицы тип включенного нуклеотида и его положение. Затем терминирующая группа и флуоресцентная краска отщепляются от нуклеотида, и цикл синтеза повторяется. Эта серия шагов продолжается определенное количество раз, число которых задает пользователь (рисунок 5.4).

Размер чтений, получаемых с секвенатора, может достигать 300 п.о. (прибор Illumina MiSeq). Кроме того, серия секвенаторов 2017 г. NovaSeq позволяет определять последовательность до 48 геномов человека за 1 запуск прибора.



**Рисунок 5.4 – Принцип секвенирования на молекулярных кластерах**  
(<https://biomolecula.ru>)

### ***Циклическое лигазное секвенирование***

Технология циклического лигазного секвенирования была разработана группой Джорджа Макдональда Черча и, в отличие от представленных выше, использует метод лигирования (формирование химических связей между нуклеотидами при помощи специального фермента – лигазы).

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером 25–75 п.о. К обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для эПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования на проточной ячейке.

Магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой помещают на проточную ячейку, где и происходит секвенирование с помощью лигирования восьминуклеотидных зондов, несущих 4 различных флуорофора на 5'-конце. Флуоресценция считывается с помощью специальной камеры после каждого цикла секвенирования и затем переводится в последовательность нуклеотидов (рисунок 5.5).

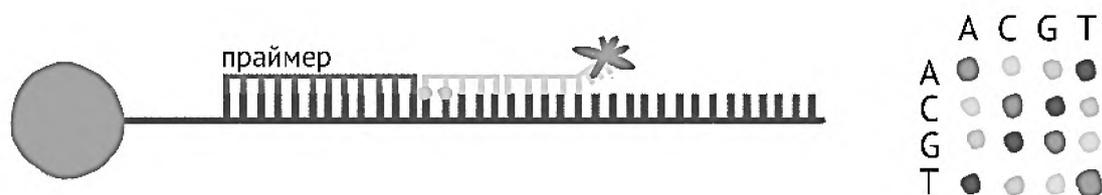


Рисунок 5.5 – Принцип лигазного секвенирования (<https://biomolecula.ru>)

Зонды для секвенирования можно разделить на несколько участков (начиная с 3'-конца): первые 2 нуклеотида зонда лигируются к комплементарным участкам на секвенируемой ДНК-библиотеке, нуклеотиды с 3-го по 5-й – вырожденные (т.е. могут гибридизоваться с любыми 3 нуклеотидами секвенируемой ДНК-библиотеки). Нуклеотиды с 6-го по 8-й также способны гибридизоваться с любыми 3 нуклеотидами секвенируемой ДНК-библиотеки, однако они отщепляются вместе с флуоресцентным красителем в конце каждого цикла секвенирования.

Технология лигазного секвенирования применялась в приборах, выпускаемых под брендом SOLiD. Спустя несколько поколений приборов пробоподготовку усовершенствовали, и на рынок вышла новая линейка приборов – 5500, 5500xl, а также 5500w, использующий изотермальную ПЦР (WildFire технология) для клонирования ДНК-библиотек.

### Ионное полупроводниковое секвенирование

Ионное полупроводниковое секвенирование, основанное на технологии PostLight™, разработано компанией Ion Torrent и в настоящее время применяется в приборах, реализуемых Thermo Fisher Scientific – Ion S5 / Ion S5 XL, Ion Proton, Ion Personal Genome Machine (PGM).

Технология, предлагаемая в этой приборной линейке, основана на использовании полупроводниковых микрочипов для секвенирования. Принцип полупроводникового секвенирования основан на обнаружении ионов водорода, которые выделяются во время полимеризации ДНК. Суть этого подхода заключается в регистрации локального изменения pH на микрочипе в момент удлинения синтезируемой цепи ДНК-полимеразой на ДНК-матрице (рисунок 5.6).

Пробоподготовка (приготовление ДНК-библиотек) напоминает таковую при циклическом лигажном секвенировании. Первоначально ДНК фрагментируют, затем к концам полученных фрагментов лигируют специфические ДНК-адаптеры, необходимые для эмульсионной ПЦР на магнитных сферах и последующего секвенирования.

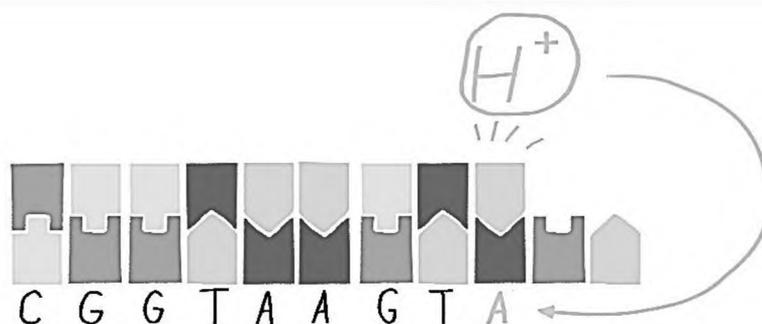


Рисунок 5.6 – Принцип ионного полупроводникового секвенирования  
(<https://biomolecula.ru>)

### Одномолекулярное секвенирование

Одномолекулярное секвенирование длинных фрагментов ДНК может найти свое применение в самых разнообразных областях, и, что самое интересное, при работе с единичными клетками позволяет описывать их молекулярный «портрет». Это особенно важно при анализе транскриптомов клеток, позволяя описывать все возможные изоформы активных генов.

Разработано несколько технологий одномолекулярного секвенирования: SMRT-секвенирование, нанопоровое секвенирование и др.

*SMRT-секвенирование (single molecule real time sequencing)*, предложенное сотрудниками компании Pacific Biosciences, позволило отказаться от проведения полимеразной цепной реакции при пробоподготовке и дало возможность наблюдать за работой ДНК-полимеразы, наращивающей синтезируемую цепь, в реальном времени.

Создание платформы Pacific Biosciences не только решило проблему ПЦР-дубликатов, но и значительно увеличило длину чтений, что крайне важно при сборке геномов *de novo*.

Суть метода заключается в определении нуклеотидной последовательности фрагментов геномной ДНК размером до 20 000 п.о. с лигированными к их концам специфическими ДНК-адаптерами, необходимыми для последующего секвенирования.

Сама реакция секвенирования молекул ДНК проходит в специальных ячейках (SMRT-ячейки) на прозрачной (кремниевой) подложке, с напыленным на нее слоем алюминия. В основе метода лежит использование технологии Zero-mode waveguide (ZMW). Сквозь дно в ячейку подается свет, однако благодаря особенностям ее строения, пучок фотонов не рассеивается, а освещает только конкретную часть (на подложке), где закреплена молекула phi29 ДНК-полимеразы. Эта полимеразы была выбрана в качестве «считывающего» фермента благодаря своей высокой точности, скорости синтеза дочерней цепи и эффективной работе с нуклеотидами, несущими флуоресцентную метку.

Смысл SMRT-секвенирования схож с описанными ранее методами секвенирования «нового поколения»: ДНК-полимераза достраивает вторую цепь исследуемой молекулы ДНК, используя нуклеотиды, меченные различными флуоресцентными метками, которые регистрируют при помощи конфокальной микроскопии.

Нанопоровое секвенирование было разработано в конце XX века, когда группа американских ученых наглядно продемонстрировала возможность побуждать молекулы ДНК и РНК проходить сквозь ионный канал диаметром 2,6 нм в двуслойной липидной мембране под воздействием электрического поля. Более того, уже тогда исследователи сумели различать ДНК и РНК, а также оценивать длину входящих в нанопору олигонуклеотидов. Спустя 13 лет впервые продемонстрировали возможность определения последовательности нуклеиновых кислот нанопоровым секвенированием, а затем данную технологию представила на рынок компания Oxford Nanopore Technologies.

Принцип нанопорового секвенирования основан на измерении меняющейся силы тока при прохождении молекулы нуклеиновой кислоты сквозь нанопору в двуслойной мембране (рисунок 5.7).

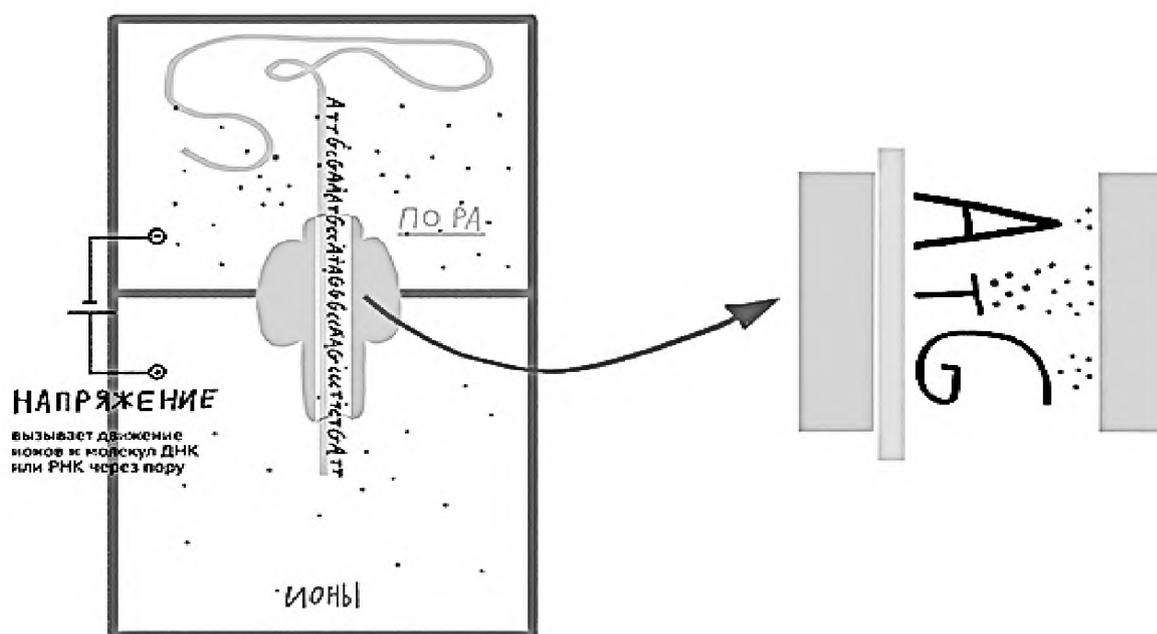


Рисунок 5.7 – Принцип нанопорового секвенирования (<https://biomolecula.ru>)

Суть работы нанопоровых систем (MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION), предложенных британской компанией, достаточно проста. Реакционная камера, в которой проходит процесс считывания последовательности нуклеиновых кислот, разделена двухслойной мембраной с единичной порой. К камере прикладывается напряжение, вызывающее движение ионов и молекул ДНК или РНК через пору. При прохождении молекулы нуклеиновой кислоты сечение поры (доступное для миграции ионов) уменьшается, в результате чего сила тока падает. Таким образом, считывая изменение силы тока, можно определять тип нуклеотида, проходящего через пору в конкретный отрезок времени.

### **Контрольные вопросы**

1. Что понимают под термином «секвенирование»?
2. С какой целью в биотехнологии применяются технологии секвенирования нуклеиновых кислот?
3. В чем заключается сущность технологий секвенирования по Сэнгеру?
4. В чем заключается сущность технологий секвенирования нового поколения?

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология биологически активных веществ : учебное пособие для студентов высших учебных заведений / ред.: И. М. Грачева, Л. А. Иванова. – Москва : НПО «Элевар», 2006. – 453 с.
2. Васильев, Д. А. Современные методы иммунодиагностики инфекционных болезней (радиоиммунологический анализ, иммуноферментный анализ) : учебное пособие / Д. А. Васильев, П. И. Барышников, Б. В. Новиков. – Ульяновск : УГСХА, 1998. – 38 с.
3. Вирусология. Практикум : учебное пособие / Р. Б. Корочкин [и др.] ; под ред. Р. Б. Корочкина. – Минск : ИВЦ Минфина. – 256 с.
4. Герловский, Д. О. Прикладные аспекты иммунологии : курс лекций / Д. О. Герловский. – Минск : БГУ, 2016. – 138 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение [Электронный ресурс] / Б. Глик, Дж. Пастернак ; пер. Н. В. Баскакова [и др.] ; ред. Н. К. Янковский. – Москва : Мир, 2002. – 589 с. – Режим доступа : <https://topuch.ru/glik-b-pasternak-dj-molekulyarnaya-biotehnologiya-principi-i-p/index.html>. – Дата доступа : 06.10.2021.
6. Гринь, С. А. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / С. А. Гринь ; ГНУ ВНИИЭВ РАСХН. – Щелково, 2008. – 52 с.
7. Краснопольский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов : учебное пособие / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
8. Основы фармацевтической биотехнологии : учебное пособие / Т. П. Прищеп [и др.]. – Ростов-на-Дону ; Феникс ; Томск : Издательство НТЛ, 2006. – 256 с.
9. Промышленная микробиология : учебное пособие для вузов по специальностям «Микробиология» и «Биология» / З. А. Аркадьева [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – Москва : Высшая школа, 1989. – 688 с.
10. Разговоров, П. Б. Технология получения биологически активных веществ : учебное пособие / П. Б. Разговоров. – Иваново : Ивановский государственный химико-технологический университет, 2010. – 72 с.
11. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электронное учебное пособие / Н. А. Войнов [и др.] ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – 1 электрон. опт. диск (DVD).

## **КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ**

Кафедра микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ является одной из профилирующих кафедр в системе обучения врача ветеринарной медицины и была образована в числе первых после учреждения Витебского ветеринарного института. Вся история кафедры является воплощением высокого профессионального отношения ее коллектива к своей работе, так как в первые десятилетия ее существования был создан тот прекрасный задел, определивший ее последующую успешную работу. К числу важных можно отнести работу первых руководителей кафедры – Николая Ивановича Михеева, Сергея Николаевича Филкова и других. Вклад же в развитие кафедры Нины Ивановны Смирновой иначе как выдающимся назвать невозможно. Под ее руководством при кафедре была организована вирусологическая лаборатория, расширены дисциплины преподавания.

В настоящее время преподавательский состав кафедры включает одного профессора, пять доцентов, одного старшего преподавателя и четырех ассистентов. При кафедре ежегодно проходят обучение 1-2 аспиранта. В педагогической, научной и методической работе сотрудникам кафедры оказывают помощь четыре лаборанта.

Основная работа кафедры микробиологии и вирусологии посвящена обучению студентов всех специальностей нашего учреждения образования по ключевым дисциплинам: микробиология и иммунология, вирусология, микология и биотехнология. На занятиях студентам доступны практически все виды оборудования, используемых в современных лабораториях. Теоретический материал излагается с привлечением технических средств обучения и видеофильмов, а также специально разрабатываемых сотрудниками кафедры учебно-методических пособий и научно-методических рекомендаций.

Выполнение научных исследований и изысканий является неотъемлемой частью в работе кафедры. Основным направлением научной работы кафедры является разработка методов и средств диагностики, терапии и профилактики инфекционных болезней животных. Для ее выполнения имеются три прекрасно оснащенные лаборатории: бактериологическая, вирусологическая и студенческая. Многие разработки сотрудников кафедры находят постоянное внедрение и применение в производстве. К проведению научных исследований активно привлекаются студенты из студенческого научного общества.

Кафедра микробиологии и вирусологии оказывает практические и консультативные услуги сельскохозяйственному производству через хоздоговорные тематики по вопросам лабораторной диагностики, разработки и апробации средств лечения и профилактики инфекционных болезней.

*По интересующим вопросам обращаться по*

*тел.: (+375212) 33-16-26*

*E-mail: [microviru@vsavm.by](mailto:microviru@vsavm.by)*

Учебное издание

**Вербицкий** Анатолий Анатольевич,  
**Кошнеров** Андрей Геннадьевич,  
**Корочкин** Рудольф Борисович и др.

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ И  
ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск А. А. Вербицкий  
Технический редактор О. В. Луговая  
Компьютерный набор Е. А. Пригун  
Компьютерная верстка Т. А. Никитенко  
Корректор Т. А. Никитенко

Подписано в печать 07.10.2021. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография.

Усл. печ. л. 4,25. Уч.-изд. л. 3,67. Тираж 90 экз. Заказ 2180.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»  
государственная академия ветеринарной медицины».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.

Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.

Тел.: (0212) 48-17-82.

E-mail: rio@vsavm.by

<http://www.vsavm.by>