

УДК 614

Черевата Г.В. студентка гр. РД-21м

Науковий керівник: Говоруха Олена Юріївна, старший викладач кафедри загальної медицини з курсом фізичної терапії

(Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, м. Дніпро, Україна)

АНАЛІТИЧНИЙ МЕТОД ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Поява полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) радикально змінила біологічну науку з її першого відкриття. Вперше це дозволило специфічно виявляти та виробляти великі кількості ДНК. Стратегії, що ґрунтуються на ПЛР, стимулювали величезні наукові зусилля, такі як проект «Геном людини». Цей метод в даний час широко використовується клініцистами та дослідниками для діагностики захворювань, клонування та секвенування генів, а також для проведення складних кількісних та геномних досліджень швидким та дуже чутливим чином.

ПЛР – це простий, але елегантний ферментативний аналіз, що дозволяє ампліфікувати певний фрагмент ДНК зі складного пулу ДНК. Доктор Кері Мулліс, який відкрив метод ПЛР і заявив, що він «дозволяє вам вибрати частину ДНК, що вас цікавить, і отримати її стільки, скільки ви хочете».

ПЛР можна проводити з використанням вихідної ДНК з різних тканин та організмів, включаючи периферичну кров, шкіру, волосся, слину та мікроби. Для ПЛР потрібні лише слідові кількості ДНК для отримання достатньої кількості копій для аналізу з використанням звичайних лабораторних методів. З цієї причини ПЛР є чутливим аналізом.

Кожен аналіз ПЛР вимагає присутності матричної ДНК, праймерів, нуклеотидів та ДНК-полімерази. ДНК-полімераза є ключовим ферментом, який пов'язує окремі нуклеотиди разом із утворенням продукту ПЛР. Нуклеотиди включають чотири основи - аденін, тимін, цитозин і гуанін (А, Т, Ц, Г), які знаходяться в ДНК. Вони діють як будівельні блоки, які використовуються ДНК-полімеразою для створення кінцевого продукту ПЛР. Праймери реакції визначають точний продукт ДНК, який потрібно ампліфікувати. Праймери – це короткі фрагменти ДНК з певною послідовністю, комплементарної ДНК-мішені, яку необхідно виявити та ампліфікувати. Вони є точкою розширення для ДНК-полімерази.

Існує два основних методи візуалізації продуктів ПЛР:

- забарвлення ампліфікованого продукту ДНК хімічним барвником, таким як бромистий етидій, який інтеркалює між двома ланцюгами дуплексу;
- позначення праймерів або нуклеотидів ПЛР флуоресцентними барвниками (флуорофорами) перед ПЛР.

Кількісний аналіз у режимі реального часу надає інформацію, що виходить за межі простого виявлення ДНК. Він показує, яка частина певної ДНК чи гена є у зразку. ПЛР дозволяє виявляти, так і кількісно визначати продукт ПЛР в режимі реального часу під час його синтезу. Два поширені методи, що використовуються для виявлення та кількісного визначення продукту, включають флуоресцентні барвники, які неспецифічно інтеркалюють з дволанцюговою ДНК, а також ДНК-зонди, специфічні для послідовності, що складаються з флуоресцентно мічених частинок. Вони дозволяють виявляти лише після гібридизації зонда з його комплементарною ДНК-мішенню. ПЛР в реальному часі можна комбінувати зі зворотною транскрипцією, яка дозволяє перетворити інформаційну РНК на кДНК (тобто зворотну транскрипцію), після чого проводиться кількісна оцінка кДНК за допомогою кількісної ПЛР. Кількісне визначення бажаного гена під час експоненційної ампліфікації дозволяє уникнути

проблем, пов'язаних із кінцевою точкою ПЛР, тобто аналізом після завершення завершального циклу ПЛР.

ПЛР має безліч переваг. По-перше, це проста для розуміння та використання техніка, яка швидко дає результати. Це високочутливий метод, що дозволяє виробляти від мільйонів до мільярдів копій конкретного продукту для секвенування, клонування та аналізу. Перевага ПЛР полягає у кількісному визначенні синтезованого продукту. Таким чином, його можна використовувати для аналізу змін рівнів експресії генів у пухлинах, мікробах чи інших хворобливих станах.

Майбутнє ПЛР багатообіцяюче, оскільки вона поєднує різні аналізи і підходи для глибшого розуміння різних комбінацій генів. Наприклад, у дослідженні, спрямованому на те, щоб у майбутньому зв'язати окремі таксоми в мікробному співтоваристві з конкретними метаболічними процесами та зондування стабільних ізотопів було поєднано з ПЛР.

Перелік посилань

1. Мікробіологія: Підр. для студ. / І.Л. Дикий, І.Ю. Холупяк, Н.Ю. Шевельова, та ін. 2-е вид.– Х.: Професіонал, 2006. – 433 с.
2. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія»: підручник для студ ВНЗ/Андріанова Т.В., Бобир В.В., Виноград В.О. [та ін.]; за ред В.П. Широбокова. – Вінниця: «Нова книга», 2011 – 951 с.
3. Данилейченко В.В. Мікробіологія з основами імунології: підручник для медичних вузів / В.В. Данилейченко, Й.М. Федечко, О.П. Корнійчук . – 2-ге вид., перероб. та доп . – Київ: Медицина, 2009. – 391 с.
4. Практична мікробіологія: Посібник /С.І. Климнюк, І.О.Ситник, М.С. Творко, В.П. Широбоков. – Тернопіль, Укрмедкнига, [2004]. – 440с.
5. Галяс В. Л. Біохімічний і біотехнологічний словник / В. Л. Галяс, А.Г. Колотницький. – Львів: Оріяна, 2006. 468 с.
6. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56–61. 64–5.
7. Weier HU, Gray JW. A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA*. 1988;7(6):441–7.
8. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 2008;44(5):619–26.
9. Valasek MA, Reza JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 2005;29(3):151–9.
10. Stahlberg A, Thomsen C, Ruff D, et al. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and Proteins in the same single cell. *Clin Chem*. 2012; 58:1682–1691.