

DOI:10.26104/NNTIK.2023.55.17.019

Нурканбек кызы А., Джапаралиев Н.Т., Омургазиева Ч.М.

ЗАМАНБАП ИЗИЛДӨӨ ЫКМАСЫ:
ПОЛИМЕРАЗДЫК ЧЫНЖЫР РЕАКЦИЯСЫ

Нурканбек кызы А., Джапаралиев Н.Т., Омургазиева Ч.М.

СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ:
ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Nurkanbek kyzy A., N. Dzhaparaliev, Ch. Omurgazieva

MODERN RESEARCH METHOD: POLYMERASE CHAIN REACTION

УДК: 579.69

Полимераздык чынжыр реакциясы (ПЧР) эффективдүү жана ДНК молекуласын көбөйтүү үчүн биологиялык илимдерде колдонулган эң кеңири таралган ыкмалардын бири. ПЧР белгилүү бир ДНК сегментин тез көбөйтүүгө жана белгилүү бир ДНК фрагментинин же гендин миллиарддаган көчүрмөлөрүн түзүүгө мүмкүндүк берген өтө сезимтал ыкма. Ал көлөмгө жана зарядга негизделген визуалдык ыкмалар аркылуу ген тизмектерин аныктоого жана идентификациялоого мүмкүндүк берет. ПЧР гендик инженерияга байланыштуу процесстерди, айрыкча микроорганизмдердин, жаныбарлардын жана өсүмдүктөрдүн геномдорун өзгөртүү үчүн колдонулган ДНК фрагменттерин клондоо иштештеринде маанилүү ролду ойнойт. Бул ыкманын маанилүүлүгү бүт гендеги же хромосомадагы ДНКларды эмес, белгилүү бир максаттуу ырааттуулуктарды гана көбөйтүү болуп эсептелет. Ошондуктан, ПЧР заманбап изилдөөлөрдүн негизги куралы болуп саналат, ПЧРсиз микробдук биотехнологияда бир дагы изилдөө жүргүзүү мүмкүн эмес. Бул макалада ПЧР ыкмасы кандай иштээри жана анда кандай компоненттер колдонулаары жөнүндө кыскача түшүнүк берилет.

Негизги сөздөр: микроорганизм, праймер, ген, нуклеотид, электрофорез, амплификаторы, идентификациялоо.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является эффективным и одним из наиболее распространенных методов, используемых в биологических и медицинских науках для размножения молекулы ДНК-мишени *in vitro*. ПЦР очень чувствительный метод, позволяющий быстро амплифицировать определенный сегмент ДНК и создает миллиарды копий определенного фрагмента ДНК или гена, что позволяет обнаруживать и идентифицировать последовательности генов с помощью визуальных методов, основанных на размере и заряде. ПЦР играет жизненно важную роль в поддержке процессов, связанных с генной инженерией, особенно клонирования фрагментов ДНК, используемых для модификации геномов микроорганизмов, животных и растений. Поэтому, ПЦР является основным инструментом современных исследований, без ПЦР невозможно провести ни одно исследование в микробной биотехнологии. Эта статья представляет собой попытку дать краткое представление о том, как работает метод ПЦР и какие компоненты в нем используются.

Ключевые слова: микроорганизм, праймер, ген, нуклеотид, электрофорез, амплификаторы, идентификация.

Polymerase chain reaction (PCR) is an effective and one of the most common methods used in biological sciences for the reproduction of target DNA molecules in vitro. PCR creates billions of copies of a specific DNA fragment or gene, which allows the detection and identification of gene sequences using visual methods based on size and charge. PCR plays a vital role in supporting processes related to genetic engineering, especially the cloning of DNA

fragments used to modify the genomes of microorganisms, animals and plants. Therefore, PCR is the main tool of modern research, without PCR it is impossible to conduct any research in microbial biotechnology. This article is an attempt to give a brief idea of how the PCR method works and what components are used in it.

Key words: microorganism, primer, gene, nucleotide, electrophoresis, amplifiers, identification.

Введение. Появление полимеразной цепной реакции в биологических науках развивалось с момента ее первого открытия. За последние 100 лет было сделано очень мало открытий, которые могли бы конкурировать с ПЦР, поскольку она произвела революцию в биологических и генетических исследованиях. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – один из наиболее широко используемых методов в современной молекулярной биологии. Этот метод был разработан Нобелевским лауреатом Кэри Мюллисом в 1984 году. Это процесс репликации молекул ДНК-мишени *in vitro* с максимальной точностью, что облегчает их обработку и изучение традиционными методами молекулярной биологии. С момента своего создания ПЦР внесла значительный вклад в изменения и развитие биологических наук. Первая ПЦР-машина была запущена в эксплуатацию в 1988 году. Проект "Геном человека" является результатом ПЦР основанные подходы. Благодаря широкому спектру применений в последние десятилетия появилось множество вариантов метода ПЦР [1-2]. Каждый ПЦР-анализ требует наличия матричных ДНК, праймеров, нуклеотидов и ДНК-полимеразы. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа Taq-полимеразой. *Thermus aquaticus* грамотрицательные палочки, экстремально термофильная бактерия. Обитает в горячих источниках Йеллоустонского национального парка (Международный биосферный заповедник, объектов Всемирного наследия ЮНЕСКО первое в мире НП, США) гейзерах при температурах выше 55⁰С. Впервые открыта Томасом Броком и Фризом в районе Больших фонтанов. Ферменты, продуцирующие *Thermus aquaticus* (рестриктазы TaqI и в особенности Taq-полимераза) активно используются в качестве инструментов для молекулярно-генетических исследований. ДНК-поли-

мераза является основным ферментом, который связывает отдельные нуклеотиды с образованием продуктов ПЦР [2-3].

Процесс ПЦР. ПЦР – это лабораторный метод быстрого получения (амплификации) от миллионов до миллиардов копий определенного сегмента ДНК, который затем можно изучить более подробно. ПЦР включает использование коротких синтетических фрагментов ДНК, называемых праймерами, для выбора сегмента генома для амплификации, а затем несколько раундов синтеза ДНК для амплификации этого сегмента [4]. Доктор Кэри Мюллис, открывшая метод ПЦР, заявила, что он «позволяет вам выбрать фрагмент ДНК, который вас интересует, и получить его столько, сколько вы хотите» (Mullis, 1990). ПЦР можно проводить с использованием исходной ДНК из различных тканей и организмов, включая периферическую кровь, кожу, волосы, слюну и микробы. Для ПЦР необходимы только следовые количества ДНК для получения достаточного количества копий для анализа с использованием обычных лабораторных методов. По этой причине ПЦР является чувствительным анализом [5].

В настоящее время существует две основные области применения ПЦР в биологических науках: системы ПЦР с высокой пропускной способностью и ПЦР-устройства на основе микрофлюидики для приложений по месту оказания медицинской помощи. Также модификации и использование в инновационных областях биомедицины. Например, ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени является золотым стандартом диагностики SARS-CoV-2. Его также можно использовать для приложений РОС, поскольку он является ключевым компонентом системы «от образца до ответа». В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода [2-6].

Каждый ПЦР-тест требует наличия матрицы ДНК, вносимые в молярном избытке 2 короткие однонитевые последовательности ДНК (олигонуклеотидные праймеры), эквимоллярная смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов – дНТФ, $MgCl_2$, KCl и Трис- HCl буфер и термостабильная ДНК-полимераза. Реакционные праймеры определяют точный продукт ДНК, который необходимо амплифицировать. Праймеры-короткие фрагменты ДНК, которые имеют определенную последовательность, комплементарную ДНК-мишени, которую необходимо идентифицировать и реплицировать. Они действуют как точка распространения ДНК-полимеразы. Для успешного проте-

кания реакции праймеры подбирают так, чтобы каждый из них был способен по принципу комплементарности связываться с соответствующей ему нуклеотидной последовательностью одной из двух нитей ДНК-мишени. ДНК-полимераза является основным ферментом, который связывает отдельные нуклеотиды с образованием продукта ПЦР. Нуклеотиды содержат четыре основания: аденин, тимин, цитозин и гуанин (А, Т, С, G), которые присутствуют в ДНК. Они действуют как строительные блоки, которые ДНК-полимераза использует для создания конечного продукта ПЦР. Область молекулы ДНК, ограниченная с двух сторон праймерами, которую принято называть амплифицируемой областью, может составлять от 100 (и менее) до нескольких сотен пар оснований [3-7]. Чтобы начать ПЦР реакционную смесь нагревают до разделения 2 нитей ДНК-мишени, процесс, называемый денатурацией. Затем охлаждают, чтобы позволить праймерам связаться с комплементарными им участками, процесс, называемый гибридизацией или отжиг. Отжиг между праймером и ДНК-мишенью происходит только тогда, когда они находятся в комплементарном порядке (например, в ДНК). После этого ДНК-полимераза инициирует удлинение праймеров по направлению друг к другу на их 3'-концах, используя добавленные в реакционную смесь дНТФ, которые последовательно присоединяются в соответствии с нуклеотидным составом амплифицируемой области ДНК-мишени. В следующем цикле реакции вновь нагревают образовавшиеся продукты полимеризации для их отделения от ДНК-мишени. Теперь каждый из образовавшихся *de novo* продуктов реакции, а также первоначальная последовательность ДНК могут служить в качестве шаблона для последующих «раундов» связывания праймера и реакции полимеризации. Теоретически в конце каждого цикла должно происходить удвоение числа продуктов ПЦР [4-8]. Таким образом, после *n*-го числа циклов ПЦР количество ограниченной праймерами нуклеотидной последовательности может быть увеличено в 2^n раз. Для постановки реакции используют программируемые термостаты – термоциклеры (амплификаторы), в которых осуществляется контроль над временем протекания и температурой каждого шага очередного цикла реакции и за количеством самих циклов. В идеале после 20 циклов ПЦР количество копий искомым последовательности ДНК увеличивается в 10^6 раз, а после 30 – в 10^9 раз. На практике процесс амплификации не может быть полностью эффективным вследствие недостаточной оптимизации условий реакции или наличия в биологическом материале ингибиторов ДНК-полимеразы [9].

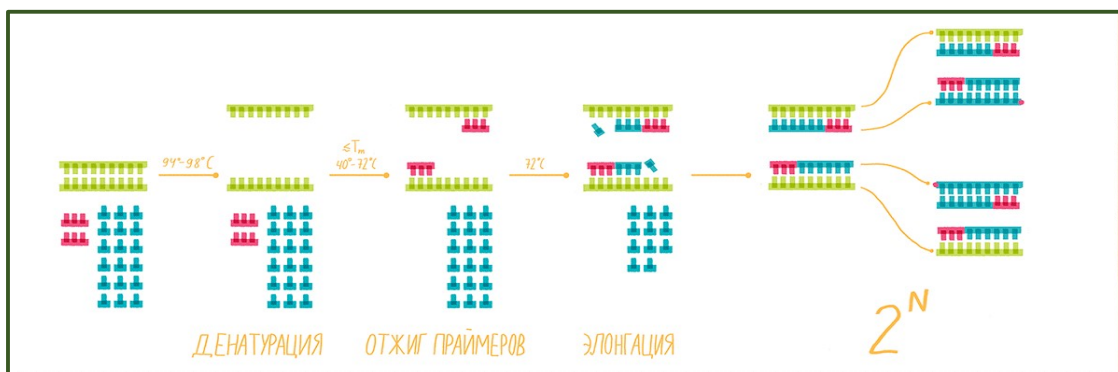


Рис. 1. Полимеразная цепная реакция.

Источник: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>

Анализ продукта ПЦР. Существует два основных метода визуализации продуктов ПЦР: (1) окрашивание амплифицированного продукта ДНК химическим красителем, таким как бромид этидия, который интеркалирует между двумя цепями дуплекса, или (2) мечение ПЦР-праймера или нуклеотида флуоресцентными красителями. Флуорофоры против ПЦР-амплификация. Последний метод позволяет немедленно интегрировать продукт ПЦР. Наиболее часто используемым методом анализа продуктов ПЦР является использование гель-агарозного электрофореза, который разделяет продукты ДНК в соответствии с их размером и зарядом. Электрофорез в агарозном геле – самый простой метод визуализации и анализа продукта ПЦР [7-10].

Таблица 1

Специфичные праймеры для амплификации фрагмента гена

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Универсальный бактериальный праймер 16S Ррнк	27F (5'-AGRGTТТGATYHTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TASGGHTACSTTGTТACGACTT-3')
Универсальный архейный праймер	21F (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') и 958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3')
Универсальные праймеры для микромицетов	ITS4 R (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ITS5 F (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')

Таблица 2

Режим ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК

Температура			Время			Описания этапа
27F/1492R	ITS4 R/ ITS5 F	21F/958R	27F/1492R	ITS4 R/ ITS5 F	21F/958R	
95 °С	95°С	94°С	2 мин	51 сек	30 сек	Предварительный нагрев
94 °С	95°С	94°С	30 сек	30 сек	15 сек	Денатурация
55 °С	52°С	47°С	30 сек	30 сек	30 сек	Отжиг
72 °С	72°С	68°С	2мин	1 мин	1:30 мин	Синтез
72 °С	72°С	68°С	7 мин	10 мин	20 мин	Окончательный синтез
5 °С	4°С	4°С	∞	∞	∞	Хранение
35 циклов						

ПЦР позволяет определить метод и размер продукта. Серия предсказанных продуктов ДНК определенного размера действует как молекулярный маркер в сочетании с гелем, который помогает определить размер продукта (рис. 2) [11-12].

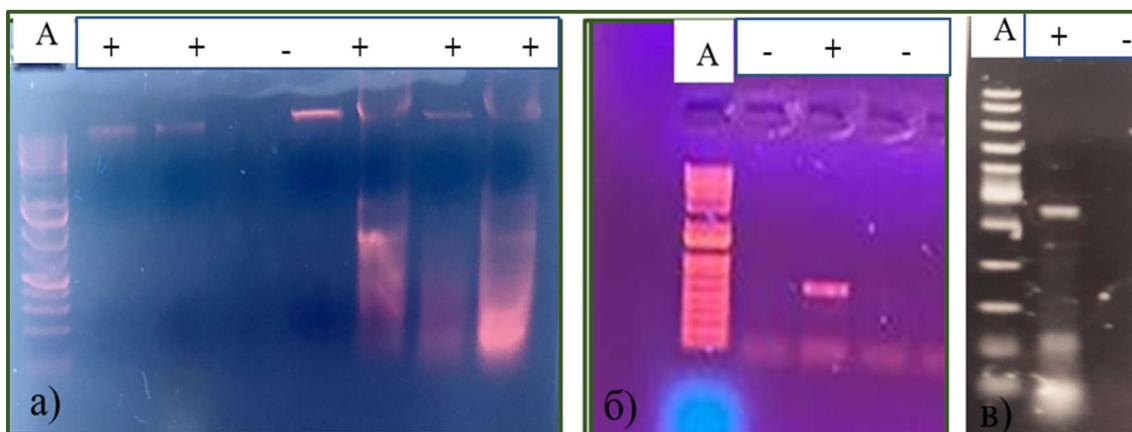


Рис. 2. Визуализация продуктов ПЦР на агарозном геле. Окрашенный бромистым этидием агарозный гель, показывающий продукты ПЦР микроорганизмов: *а)* универсальных бактериальных праймеров 16S рРНК, *б)* архейных праймеров 21F/958R и *в)* универсальные праймеры для микромицетов ITS4 / ITS5.

Как правило, когда ПЦР используется для обнаружения наличия или отсутствия определенного продукта ДНК, ее называют качественной ПЦР. Качественная ПЦР является хорошим методом для использования, когда ПЦР проводится для целей клонирования или идентификации бактерии, архея и микромицетов. Например, в работе C1000 Touch Thermal cycler (США) качественная ПЦР использовалась для идентификации почвенные и водные микроорганизмы. Используя геномную ДНК, выделенную из микроорганизмов и праймеры, специфичные для бактериальных, архейных и микромицетных генов, мы смогли продемонстрировать присутствие бактериального гена из 1500 пары оснований (п.н.), архейного гена 700-800 п.н. и микромицетного гена 420-825 п.н. образцов по наличию продукта ПЦР. Полоса длиной пары оснований, как видно на 1% агарозном геле с бромистым этидием (рис. 2.). Первая дорожка, отмеченная (А), является молекулярным маркером, который используется для определения размера обнаруженного продукта ПЦР. Наличие микробного специфического гена, обнаруженного с помощью ПЦР, отмечено (+); отсутствие микробного гена отмечено (-).

Молекулярно-генетические исследования проводились с целью нашего визита на курс обучения в лаборатории «Экстремофилы и биотехнология» Бергенского университета в Норвегии под руководством профессора Nils Kare Birkeland и руководителя проекта в Кыргызстане к.б.н., доцента Омургазиевой Ч.М. В ходе исследований выполнены следующие работы: экстракция ДНК как из образцов воды и почвы, так и бактериальных изолятов и культур. Проверка качества очищенной ДНК в качестве подготовки к секвенированию следующего поколения и Illumina. Прове-

дено анализ ПЦР с использованием универсальных бактериальных праймером для гена 16S рРНК, а также секвенирование по Сэнгеру с последующим биоинформационным и филогенетическим анализом полученных нуклеотидных последовательностей. Последовательности образца сравнивали в базы данных Gen Bank с использованием поисковых программ BLAST для определения их близких родственников и приблизительной филогенетической принадлежности.

Таким образом, технология ПЦР представляет собой мощный инструмент микробной биологии. При обнаружении, идентификации и типировании микроорганизмов пригодность этого метода не вызывает сомнений. ПЦР более чувствительна, чем биологическое окрашивание и посев, которые в настоящее время считаются золотыми стандартами при исследовании микроорганизмами.

Благодарность. Работа была поддержана благодаря проекту DIKU CPEA-LT- 2017/ 10061 «Microbial Biotechnological Research Network of Higher Education» под руководством профессора Nils Kare Birkeland и заведующей лабораторией «Экологическая микробиология» Института биологии Национальной Академии наук Кыргызской Республики, к.б.н., доцента Омургазиевой Ч.М.

Литература:

1. Wages J.M. Polymerase chain reaction (PCR) // Elsevier. 2005. - С. 243-250.
2. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени: учебник / Д.В. Ребриков, Д.В. Саматов, Д.Ю. Трофимов. - Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.
3. Giasuddin A.S.M. Polymerase chain reaction technique: fundamental aspects and applications in clinical diagnostics // Journal of Islamic Academy of Sciences. 1995. V.8:1. - P. 29-32.
4. Лопухов Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л.В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2000. - Т. 2. - № 3. - С. 96-106.

5. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction // *Scientific American*. 1990;262(4):56–61. 64-5.
6. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction // *Scientific American*. 1990. V. 262(4):56-61. P. 64.
7. Perry D. Isolation of DNA and RNA / D. Perry, J. David // *Methods in Molecular Medicine*. - 2001. - V. 31. - P. 25-30.
8. Botes M., de Kwaadsteniet M., Cloete T.E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water // *Food Microbiol*. 2011 Aug;28(5):848–61.
9. Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N. and Veal D.A. PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil // *Letters in Applied Microbiology*. 1997. V.25. P. 303–307.
10. Reiner Westermeier. *Gelelektrophorese*. 2019. P. 943-944.
11. Stefanova K. Archaeal and bacterial diversity in two hot springs from geothermal regions in Bulgaria as demonstrated by 16S rRNA and GH-57 genes / K.Stefanova // *International Microbiology*. 2015. Vol. 18. P. 217-223.
12. Mohlenhoff P. Muller L., Gorbushina A.A. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects // *FEMS Microbiology Letters*. 2001. - P. 169-173.
13. Дуденко Е.В., Сыдыкова С. Результат полимеразной цепной реакции и жизнеспособность микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом легких. / *Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана*. 2017. - №. 8. - С. 54-56.