

УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ (МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ)

М. С. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. О. Мельничук,
С. Д. Мельничук, Г. І. Калачнюк

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Наведено всебічну методологічну оцінку умов проведення найбільш поширеного в лабораторній практиці сучасного молекулярно-біологічного методу — полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Особлива увага звертається на чітке і обов'язкове дотримання всіх вимог і правил проведення ПЛР, включаючи етапи підготовки біоматеріалу до дослідження, типової ПЛР-ампліфікації (денатурації, ренатурації і синтезу), отримання на матриці РНК комплементарної ДНК з допомогою ревертази та остаточної детекції продуктів ПЛР-ампліфікації. У цьому аспекті серед варіантів методу полімеразної ланцюгової реакції виділяється ПЛР у реальному часі, в основі якого лежить кількісна детекція утвореного ПЛР-продукту. Всі діагностичні переваги ПЛР-аналізу (пряме визначення наявності збудників, висока специфічність, висока чутливість, універсальність та ін.) досягаються тільки за умов бездоганної чистоти обладнання і засобів у приміщеннях лабораторії, чіткої організації праці та професіоналізму співробітників.

Ключові слова: ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ДНК, κДНК, РНК, ПРАЙМЕР, ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПТАЗНА ПЛР, ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

На теперішній час найбільшого застосування в лабораторній практиці знаходить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [1–16]. Для неї характерні висока специфічність, чутливість, універсальність і короткий час дослідження.

Найчастіше ПЛР застосовують для діагностики інфекційних захворювань, що викликаються агентами, які важко піддаються культивуванню, для визначення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків, пренатальної діагностики й діагностики спадкових захворювань, тестування донорської крові на вірусні патогени, за різних видів генотипування, визначення батьківства, для виявлення мутацій тощо.

У клінічній діагностиці ПЛР використовують для: ранньої діагностики інфекційних захворювань у серонегативних пацієнтів, коли лікування найбільш ефективно; виявлення персистуючих, латентних і рецидивних форм інфекцій; контролю ефективності лікування; епідеміологічних досліджень; діагностики опортуністичних інфекцій, які часто відбуваються на тлі імунodefіциту, внаслідок чого поставити діагноз тільки за результатами серологічних досліджень важко. ПЛР застосовують санітарно-епідеміологічні органи з метою контролю мікробіологічного забруднення оточуючого середовища й харчових продуктів та для виявлення генетично модифікованих джерел харчування [1–4, 6–9, 11–15].

Принцип методу ґрунтується на виявленні у матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) різноманітних біоб'єктів, їхньому вибіркового синтезі до концентрації, за якої їх легко детектувати, і подальшому визначенні продуктів реакції ампліфікації — ампліконів [1–16].

ДНК — унікальний носій генетичної інформації у всіх існуючих на Землі організмів, за винятком РНК-вмісних вірусів.

Унікальна властивість ДНК знаходиться в її здатності подвоюватися після розплітання спіралі та розходження ниток ДНК. Подвоювання ДНК (реплікація)

здійснюється (за принципом компліментарності) ензимом — ДНК-полімеразою. Для того, щоб ензим розпочав свою роботу потрібна наявність початкового дволанцюгового фрагмента ДНК. Такий фрагмент утворюється за взаємодії короткого одноланцюгового фрагмента ДНК, що зветься праймером, із комплементарною ділянкою відповідного ланцюга батьківської ДНК. Реплікація відбувається на двох нитках ДНК, але нарощуються вони в протилежних напрямках. У результаті реплікації із однієї дволанцюгової молекули ДНК утворюється дві дволанцюгові, кожна з яких містить один ланцюг від материнської молекули ДНК та другий, дочірній, — новосинтезований. Звідси витікає, що цикл реплікації ДНК включає три основні стадії: 1) розплітання спіралі ДНК і розходження ланцюгів (денатурацію); 2) приєднання праймерів і 3) добудову дочірнього ланцюга ДНК. У ПЛР вказані процеси здійснюються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається зміною температури інкубованої суміші [1–16].

Для проведення ПЛР необхідно мати: 1) два синтетичних олігонуклеотидних праймери (довжиною приблизно по 20 нуклеотидів), які комплементарні до ділянок ДНК із протилежних ланцюгів, що фланкують послідовність — мішень (праймери обмежують фрагмент ДНК, який буде мільйони разів скопійований ензимом Taq-ДНК-полімеразою, що приєднується до 3'-кінців праймерів для добудови їх заданої довжини (в декілька сотень пар основ); 2) ДНК-мішень; 3) термостабільну ДНК-полімеразу, яка не губить активності при температурі 95 °С; 4) чотири дезоксирибонуклеотиди і 5) буферну систему для ефективної роботи ДНК-полімерази, що обов'язково містить іони магнію [1–16].

З основних етапів проведення ПЛР обов'язково слід виділити три: 1) підготовка проби біоматеріалу, тобто виділення ДНК або РНК; 2) власне полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР-ампліфікація) і 3) детекція продукту ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти). Детальніше це подається нижче [1–16].

Підготовка проб (виділення ДНК і РНК із біологічного матеріалу). Зразки біооб'єкту спеціально обробляють для перебігу лізису клітин, видалення білкових, полісахаридних і ліпідних компонентів. Для цього використовують різні методи, в тому числі сорбентний, за яким відбувається сорбція ДНК (РНК) на сорбенті після лізису клітин, багатократної відмивки нуклеїнових кислот (НК) і наступної елюції ДНК (РНК) буферним розчином та ін. У результаті такої обробки отримують розчин, який містить ДНК (РНК) досліджуваного об'єкту. Комплект для виділення ДНК (РНК) вибирається в залежності від виду біооб'єкту. Детально методики виділення ДНК (РНК) із біооб'єктів є описані в інструкціях, які додаються виробником до комплекту реагентів для виділення НК. Отриманий розчин ДНК можна зберігати протягом тижня за температури 2–8 °С та до року (за температури –60 °С). Не підлягає зберіганню розчин очищеної РНК. Його необхідно відразу ж використовувати у дослідженнях. Проби можна зберігати тільки у вигляді отриманих з допомогою зворотної транскрипції розчинів комплементарної ДНК (кДНК).

Типова полімеразна ланцюгова реакція. На цьому етапі багатократно повторюють наступні три реакції: денатурації, ренатурації і синтезу.

Перший етап ПЛР — це денатурація зразка ДНК шляхом витримувannya його при температурі 94–95 °С. Крім ДНК, у реакційній суміші мають бути в надлишку два праймери, термостабільна ДНК-полімераза Taq (виділена із *Thermus aquaticus*) і чотири дезоксирибонуклеотиди.

Другий етап ПЛР — ренатурація ДНК, яка відбувається за зниженої температури 50–60 °С. За ренатурації відбувається відпал праймерів, а саме вони гібридизуються з комплементарними послідовностями ДНК (розплавленої ДНК-матриці) з утворенням коротких дволанцюгових ДНК-фрагментів, які необхідні для початку роботи ензиму полімерази. Кожен із праймерів гібридується на одному з двох ланцюгів ДНК-матриці таким чином, щоб кінці праймерів, які здатні видовжуватися були спрямовані назустріч один одному. Приєднавшись до протилежних ланцюгів молекули ДНК, праймери обмежують

собою ту її ділянку, яка в подальшому буде багатократно подвоєна (ампліфікована). Довжина такого фрагменту, що називається ампліконом, зазвичай складає декілька сотень нуклеотидів.

Третій етап ПЛР — синтез фрагмента комплементарного дочірнього ланцюга ДНК (за 70–72 °С, тобто оптимальної температури для активності ДНК-полімерази Taq). У якості будівельного матеріалу використовують чотири дезоксинуклеотидтрифосфати, що знаходяться в суміші. Синтез фрагментів дочірніх ланцюгів ДНК відбувається одночасно на обох ланцюгах материнської ДНК. Далі цикл повторюється знову.

Утворені в першому циклі ампліфікації фрагменти ланцюгів ДНК є матрицями для другого циклу. Фрагменти, що утворилися у перших двох циклах є матрицями для третього і т.д. Таким чином, новостворені фрагменти виступають матрицями для синтезу нових ланцюгів ДНК у наступному циклі ампліфікації, тобто відбувається ланцюгова реакція. Загалом кількість копій фрагмента збільшується в геометричній прогресії і відбувається накопичення ампліконів у розчині за формулою $2 \cdot n$, де n – кількість циклів ампліфікації. Всі реакції проводять у пробірках, що знаходяться в термостаті. Розробка програмованих термостатів (термоциклерів або ампліфікаторів), які за заданою програмою здійснюють циклічну зміну температур, створила передумови для широкого впровадження методу ПЛР у практику лабораторної клінічної діагностики. Зміну температурних режимів і їх підтримку ці прилади виконують автоматично. Тривалість кожного складає кілька хвилин.

Для синтезу праймерів, які є специфічними до певної ДНК-мішені, потрібно знати нуклеотидну послідовність ДНК відповідного патогенного мікроорганізму. Основним критерієм підбору праймерів є комплементарність матриці. У цьому випадку в ході ПЛР буде ампліфікуватися тільки специфічна ділянка ДНК, довжина якої рівна сумарній довжині двох праймерів і фрагмента ДНК між ними. Підбір оптимальної температури, відпал праймерів на матриці – це важливий фактор, який впливає на ефективність і специфічність ампліфікації.

Модифікація методу ПЛР або проведення зворотної транскрипції на матриці РНК. Зворотна транскрипція — це двостадійний процес (що виконується як у двох пробірках, так і в одній без втрати чутливості). За першої стадії отримують на матриці РНК відповідний ланцюг, комплементарної ДНК (кДНК). Наприклад, зворотну транскрипцію використовують для виявлення генетичного матеріалу РНК-вмісних збудників (вірус гепатиту С). Ензим, який синтезує кДНК на матриці РНК, називають зворотною транскриптазою (ревертазою). Під час другої стадії утворена ДНК-копія вірусної РНК ампліфікується.

Детекція продуктів ПЛР–ампліфікації. Існують різні способи детекції реакції ПЛР. Специфічні ПЛР-продукти (амплікони) визначають електрофоретичним розділенням ампліфікаційної суміші в зафарбованому бромистим етидієм агарозному гелі. Бромистий етидій зв'язується з фрагментами дволанцюгової ДНК, які проявляються в гелі у вигляді світлих смуг за УФ-опромінення ($\lambda=290\text{--}330$ нм). Для візуалізації таких смуг у гелі за УФ-опромінення використовують спеціальний прилад — транслюмінатор, а отримані результати документують фотографуванням. Фрагменти ДНК розділяються за молекулярною масою в агарозному гелі. Специфічність смуг ампліфікованої ДНК підтверджується їхнім розміщенням стосовно до маркерів молекулярної маси і розміщення фрагмента позитивного контролю ампліфікації. Додаткові докази специфічності амплікона можна одержати методами рестрикційного аналізу, гібридизації і прямого секвенування. До технологій, які є альтернативними способу детекції продуктів ампліфікації, відносять модифіковані системи аналізу з використанням флюорисцентних барвників. При цьому продукти реакції аналізують з допомогою флюориметрії. Пробірки із ампліфікатора надходять в детектор, де, не відкриваючи їх, реєструють флюорисценцію. Рівні флюоресценції виявляються пропорційними кількості утворених специфічних продуктів ПЛР. У таких варіантах аналізу

флуоресценцію реєструють після закінчення реакції і тому метод не вважається кількісним. Важливо те, що результати ПЛР фіксують за наявності флуоресценції в закритих пробірках. Звідси вирішується одна з важливих проблем ПЛР — контамінація ампліконами.

ПЛР у реальному часі. ПЛР у режимі реального часу — це один із сучасних варіантів методу. В основі цього варіанту лежить кількісна детекція флуоресцентного сигналу, який збільшується пропорційно кількості ПЛР продукту. Результат реакції можна реєструвати на екрані монітора комп'ютера безпосередньо в процесі ПЛР-ампліфікації. Для кількісних варіантів досліджень у режимі ПЛР необхідно мати відповідні стандарти, які використовують для побудови калібрувальних кривих після проведення полімеразної ланцюгової реакції.

Використовуючи згадані криві, можна вирахувати невідому вихідну кількість копій ДНК (РНК) у зразках. Із основних переваг ПЛР у реальному часі слід виділити наступні: 1) реєстрація інтенсивності флуоресценції вказує на кількість інфекційного агента в пробі; 2) виключається головна причина лжепозитивних результатів — розсіювання продуктів ампліфікації з аерозолями і персоналом у процесі гель-електрофоретичної детекції; 3) потрібно лише декілька годин для отримання результату (швидкість аналізу); 4) наявність додаткового специфічного зонду (який є комплементарним внутрішній ділянці фрагмента, що ампліфікується) знижує ризик отримання лжепозитивних результатів і збільшує чутливість аналізу; 5) з'являється можливість проводити множинну ПЛР, тобто реєструвати в одній пробірці наявність декількох інфекційних агентів, використовуючи різні флуоресцентні барвники і 6) з'являється можливість ідентифікувати в продукті ампліфікації поодинокі нуклеотидні заміни.

Заслугують окремої уваги й інші нижче перелічені переваги ПЛР як методу діагностики інфекційних захворювань.

Пряме визначення наявності збудників. Виявлення специфічної ділянки ДНК — збудника методом ПЛР є прямим доказом присутності збудника інфекції. Численні традиційні діагностики, зокрема імуноензимний аналіз, детектують білки-маркери, які є продуктами життєдіяльності інфекційних агентів. А це лише опосередковано свідчить про наявність інфекції.

Висока специфічність. У досліджуваному матеріалі ідентифікують унікальний і цілком характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК. Специфічність задається нуклеотидною послідовністю праймерів, що зводить до мінімуму ризик отримання лжерезультатів на відміну від імунологічних методів аналізу, де часто трапляються помилки у зв'язку з антигенами, що перекресно реагують.

Висока чутливість. ПЛР-аналіз дозволяє виявляти збудників інфекційних захворювань у тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити вже неможливо. Чутливість ПЛР-аналізу наближається до 10 – 100 клітин у пробі.

Універсальність процедури виявлення різних збудників. Матеріалом для дослідження методом ПЛР є ДНК збудника. Це дозволяє діагностувати декілька збудників в одному зразку. Адже за подібністю хімічного складу всіх НК визначаються уніфіковані методи виділення ДНК/РНК. Для ПЛР-діагностики практично всіх інфекційних захворювань можуть бути використані один набір обладнання, універсальні процедури підготування проб та проведення аналізу.

Висока швидкість отримання результату. Для ПЛР-аналізу не потрібно виділяти збудника з культури. Це значно скорочує час дослідження. Уніфіковані методи виділення НК, автоматизація ампліфікації і детекції продуктів реакції дають можливість проведення повного аналізу протягом одного робочого дня.

Можливість діагностики не тільки гострих, але й латентних інфекцій. Особливе значення метод ПЛР має для діагностики важкокультивованих і персистуючих

мікроорганізмів, з якими часто зустрічаються при латентних і хронічних інфекціях. ПЛР-діагностика є також дуже ефективною по відношенню збудників з високою антигенною мінливістю (наприклад, вірусів грипу).

Обмеження методу ПЛР може бути через те, що, по-перше, ампліфікується ДНК як живих, так неживих мікроорганізмів. Це обумовлює вимоги до інтерпретації і термінів проведення досліджень при контролі ефективності лікування. Контроль необхідно здійснювати через певний проміжок часу, протягом якого відбувається повна елімінація збудника. По-друге, теоретично існує можливість перехресних реакцій (наприклад, у результаті неадекватного підбору праймерів). Це може призвести до появи лжепозитивних результатів.

Взяття клінічного матеріалу. Взяття матеріалу, його попередня обробка, зберігання і перевезення та передача в інші організації здійснюється згідно інструкційно-методичних документів, які регламентують виконання досліджень для кожного виду збудника інфекцій, інструкцій до комплектів реагентів та у відповідності з діючими Санітарними правилами.

З метою запобігання розкладу НК рекомендують використовувати спеціальні транспортні середовища, які розроблені та рекомендовані виробниками комплектів реагентів у залежності від виду матеріалу.

Перевезення і зберігання біоматеріалу необхідно здійснювати за умов холодового ланцюга із забезпеченням контролю встановленого температурного режиму з допомогою термоіндикаторів. У залежності від транспортного середовища, виду біоматеріалу і температурного режиму терміни перевезення і зберігання зразка можуть змінюватися. Зважаючи на можливість розпаду ДНК чи РНК у клінічному матеріалі, терміни зберігання і транспортування його мають бути мінімальними. За умов неможливості доставити зразки в ПЛР-лабораторію протягом необхідного часу їх заморожують (-20 °C). Допускається тільки одноразове короткочасне заморожування-розморожування біоматеріалу. Кожен біологічний зразок може бути біоматеріалом для ПЛР. Проби крові (плазми) використовують у якісних і кількісних дослідженнях, а проби сироватки крові – тільки для якісного ПЛР-аналізу. З метою виключення контамінації клінічний матеріал необхідно відбирати з допомогою стерильних одноразових інструментів (шприців, відповідних зондів, засобів відбору проб тощо) у одноразові стерильні пластикові контейнери (наприклад, пробірки «Епендорф»). Клінічні зразки потрібно зберігати окремо від реагентів.

Організація праці у ПЛР-лабораторіях [6]. Вимоги до організації праці в ПЛР-лабораторіях узагальнені і сформульовані у нормативних документах і методичних вказівках. У останніх визначаються принципи організації лабораторії та етапи виконання аналізу з використанням ПЛР: відбір проб, первинна обробка, зберігання, умови перевезення, знезаражування біоматеріалу, виділення НК, проведення зворотної транскрипції і/або ампліфікації, облік і реєстрація результатів дослідження біоматеріалу харчових продуктів, матеріалу з навколишнього середовища.

Методичними вказівками регламентуються дії персоналу лабораторій при виконанні досліджень з допомогою методів ампліфікації НК, що проводяться з використанням зареєстрованих у встановленому порядку комплектів реагентів та обладнання.

ПЛР-діагностика інфекцій пов'язана з проблемою (що зумовлена високою чутливістю методу) — можливістю контамінації. Правильна організація ПЛР-лабораторії має принципове значення для отримання вірогідних результатів і суттєво залежить від методу детекції продуктів ампліфікації. За умов використання методу горизонтального електрофорезу, етапу детекції необхідно приділяти особливу увагу, адже він є основним джерелом контамінації. Приміщення для електрофорезу має бути розміщене в такому місці, що виключає попадання ампліконів в інші технологічні зони лабораторії. Окрім цього потрібний окремий співробітник, ретельно продумана система вентиляції, відсутність

можливості переміщення пробірок, штативів та іншого обладнання із кімнати для електрофорезу в інші приміщення.

Співробітник, що займається ПЛР-діагностикою, у своїй роботі зустрічається з двома видами контамінації: 1) перехресної контамінації від проби до проби (наприклад, в процесі обробки клінічних зразків), що веде до появи спорадичних лжепозитивних результатів і 2) контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами), яка має найбільше значення, адже в процесі ПЛР амплікони накопичуються у великих кількостях і служать ідеальними продуктами для реампліфікації.

До появи систематичних лжепозитивних результатів призводить контамінація слідовими кількостями ампліконів посуду, автоматичних піпеток, лабораторного обладнання, поверхонь лабораторних столів і навіть поверхні шкіри співробітників лабораторії.

Зазвичай визначити джерело контамінації буває дуже важко, а сам процес її ліквідації потребує значних витрат часу та засобів. Дотримання вимог, що ставляться до планування приміщень ПЛР-лабораторій і проведення самих аналізів, виключає можливість контамінації та отримання лжепозитивних результатів. У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути достатній набір реагентів, автоматичних піпеток, наконечників, пластикової і скляної посуду, лабораторного обладнання, халатів і рукавиць, що використовуються тільки в даному приміщенні і не виносяться в інші. Обладнання, матеріали та інвентар у кожній кімнаті відповідним чином маркуються.

За умов досліджень з використанням ампліфікації нуклеїнових кислот обов'язкове забезпечення потоковості руху матеріалу, проб НК, продуктів ампліфікації. Робота в лабораторії має бути організована тільки в одному напрямку від пре-ПЛР-приміщень до пост-ПЛР-приміщень.

У ПЛР-лабораторіях, що використовуються з діагностичною метою, здійснюють регулярний внутрішньолaboratorний контроль якості досліджень з періодичністю, яка залежить від обсягу роботи і визначеної керівником лабораторії, але не менше одного разу на квартал.

Лабораторія має брати участь у встановленому порядку в заходах (програмах) по зовнішній оцінці якості лабораторних досліджень за конкретними нозологічними формами не менше одного разу на рік.

Внутрішньолaboratorний і зовнішній контроль якості лабораторних досліджень здійснюють шляхом аналізу шифрованих атестованих контрольних панелей, які містять позитивні й негативні проби. Під час внутрішньолaboratorного контролю якості використовують атестовані на наявність аналізу (його кількості) панелі виробників комерційних наборів або внутрішньолaboratorні атестовані зразки, що містять і не містять НК конкретних збудників у різній концентрації, стабільні умови зберігання. Варто зазначити, що широке використання ДНК-діагностики ні в якій мірі не відмінює методи імунохімічних та інших біохімічних досліджень, а, навпаки, доповнює їх [4]. Комплексне дослідження організму різними методами дає лікарю-клініцисту більшу інформацію як про наявність інфекційного агента, так і про імунний статус, що дозволяє точніше ставити діагноз, назначати відповідне етіотропне лікування і вести його подальший контрольний процес.

Висновки

1. Найбільш поширений в лабораторній практиці молекулярно-біологічний метод — полімеразна ланцюгова реакція при використанні потребує обов'язкового дотримання всіх вимог і правил проведення ПЛР.

2. Для уникнення одержання лжепозитивних результатів необхідно регулярно (щоквартально) проводити внутрішньолaboratorний контроль, а зовнішню оцінку якості роботи ПЛР-лабораторії — не менше одного разу на рік.

3. Широке використання методу ДНК-діагностики ні в якому разі не відмінює імунохімічні, цитологічні, біохімічні та інші методи досліджень, а, навпаки, доповнює їх.

Перспективи подальших досліджень. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції у комплексі з імунохімічними, цитологічними, біохімічними та іншими методами досліджень доповнить характеристику біоматеріалу.

*M. S. Kalachniuk, L. G. Kalachniuk, D. O. Mel'nychuk,
S. D. Mel'nychuk, G. I. Kalachniuk*

TERMS OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN LABORATORY PRACTICE (METHODOLOGICAL ASPECT)

S u m m a r y

It was presented a comprehensive assessment of the methodological conditions carrying out one of the most common in laboratory practice of modern molecular biological methods — polymerase chain reaction (PCR). Particular attention is drawn to the clear and mandatory compliance with all requirements and regulations of the PCR, including the stages of preparation of biological material for research, a typical polymerase chain reaction (denaturation, renaturation and synthesis), getting on the RNA template complementary DNA using revertase and definitive detection of PCR amplification products . In this respect, among the variants of the polymerase chain reaction, there is real-time PCR, which is based on the quantitative detection of the PCR-product. All the diagnostic advantages of PCR (direct determination of the presence of pathogens, high specificity, versatility, etc.) is achieved only under conditions of perfect cleanliness of equipment and tools in the laboratory, precise organization of work and professionalism.

*M. C. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. А. Мельничук,
С. Д. Мельничук, Г. И. Калачнюк*

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ (МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ)

А н н о т а ц и я

Приведена всесторонняя методологическая оценка условий проведения наиболее распространённого в лабораторной практике современного молекулярно-биологического метода — полимеразной цепной реакции (ПЦР). Особенное внимание обращается на четкое и обязательное выполнение всех требований и правил проведения ПЦР, включая этапы подготовки биоматериала для исследований, типичной полимеразной цепной реакции (денатурации, ренатурации и синтеза), получение на матрице РНК комплементарной ДНК с помощью ревертазы и окончательной детекции продуктов ПЦР-амплификации. В этом аспекте среди вариантов метода полимеразной цепной реакции следует выделить ПЦР в реальном времени, в основании которого находится количественная детекция образовавшегося ПЦР-продукта. Все диагностические преимущества ПЦР-анализа (прямое определение присутствия возбудителей, высокая специфичность, универсальность и др.) достигаются только в условиях безупречной чистоты оборудования и средств в помещениях лаборатории, четкой организации труда и профессионализма сотрудников.

1. Федоренко В. О. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. — Л. : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 277 с.
2. Мельничук Д. О. Ветеринарна клінічна біохімія : Навч. посіб. / Д. О. Мельничук, С. Д. Мельничук, В. А. Грищенко та ін. — К. : Видавничий центр НУБіП України, 2010. — 464 с.
3. Глазко В. И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика : Навч. посіб. / В. И. Глазко, Г. В. Глазко; Ин-т агроэкологии и биотехнологии УААН. — К. : КВІЦ, 2003. — 640 с.
4. Влізло В. В. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін. ; за ред. В. В. Влізла. — Львів : СПОЛОМ, 2012. — 764 с.
5. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. — К. : Поліграфконсалтинг, 2003. — 520 с.
6. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV группы патогенности : Методические указания МУ 1.3.2569-09. — М. : Госсанэпиднадзор, 2009.
7. Стегній Б. Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська ; ред. Б. Т. Стегній, А. П. Герілович. — Х. : НТМТ, 2010. — 227 с.
8. Романенко В. Н. Полимеразная цепная реакция: принципы, достижения, перспективы использования в диагностике инфекций / В. Н. Романенко, И. В. Свистунов, О. А. Лавриненко // Лабораторная диагностика. — 1998. — № 4. — С. 45–51.
9. Шагинян И. А. ПЦР-генетическое титрование патогенных микроорганизмов (обзор) / И. А. Шагинян, А. Л. Гицбург // Генетика. — 1995. — Т. 51, № 5. — С. 600–610.
10. Шевченко Є. А. Визначення ДНК-поліморфізму кролів за ISSR-маркерами / Є. А. Шевченко, К. В. Копилов // Біологія тварин. — 2011. — Т. 13, № 1–2. — С. 384–391.
11. Developing Methodologies for the Use of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomiasis : Prepared under the Framework of an RCA Project with the Technical Support of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture / IAEA-TECDOC-1559. — IAEA, 2007. — 294 p.
12. Cheng D. Long PCR / D. Cheng, Sh.-Y. Chang, P. Gravitt, R. Reppas // Nature. — 1994. — Vol. 369. — P. 684–685.
13. Edwards K. Real-time PCR: An essential guide / K. Edwards, J. Logan, N. Saunders. — Wymondham : Horizon Bioscience, 2004. — 346 p.
14. Kuzmak J. Wykrywanie prowirusowego DNA wirusa białaczki bydła metoda polymerase chain reaction (PCR) / J. Kuzmak, J. Gtundbolck, B. Kozaczynska // Medycyna Vet. — 1993. — Vol. 49. — P. 312–315.
15. Sambrook J. Molecular cloning / J. Sambrook, D. Russell. — N.Y. : Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. — 2222 p.
16. The Use of Non-structural Proteins of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) to Differentiate Between Vaccinated and Infected Animals Publication Prepared under the Framework of an RCA Project with the Technical Support of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture / IAEA-TECDOC-1546. — IAEA, 2007. — 221 p.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Стапай П. В.