



**НЕИНВАЗИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА  
И РЕСУС-ФАКТОРА ПЛОДА МЕТОДОМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

**УТВЕРЖДЕНО**

Решением Учебно-методического  
совета ФГБОУ ДПО РМАНПО  
Минздрава России  
«26» марта 2018 г.

**Е. Е. БАРАНОВА, В. А. ГНЕТЕЦКАЯ, М. С. БЕЛЕНИКИН**

**НЕИНВАЗИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА  
И РЕЗУС-ФАКТОРА ПЛОДА  
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Учебное пособие

Москва  
2018

УДК 618.1/2-073:577.113.21:371.3(075.8)

ББК 53.6 + 57.16я73

Б – 241

Неинвазивное определение пола и резус-фактора плода методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Баранова Е. Е., Гнетецкая В. А., Беленикин М. С.; ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывно-го профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2018. – 56 с. ISBN 978-5-7249-2913-4.

Содержание учебного пособия соответствует содержанию основной профессиональной образовательной программы высшего образования – подготовки кадров высшей квалификации в ординатуре и дополнительной профессиональной программы переподготовки врачей по специальности 31.08.30 «Генетика» (разделы 4.3.5 «Амплификационные методы, применяемые в ДНК-диагностике» и 5.5.7 «Пренатальный скрининг по клеткам (ДНК) плода в крови матери»).

Данное учебное пособие посвящено важному современному лабораторному методу – полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени и возможности его применения для определения фрагмента Y-хромосомы и гена RHD плода по крови беременной женщины.

Данное учебное пособие разработано и подготовлено сотрудниками кафедры медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО и департамента молекулярной и биологической физики ФГАУ ВО МФТИ при участии сотрудников Управления научно-методической и образовательной деятельности в соответствии с системой стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу ФГБОУ ДПО РМАНПО.

Учебное пособие предназначено для врачей медико-генетических консультаций и ординаторов, изучающих медицинскую генетику, а также слушателей циклов профессиональной переподготовки врачей по специальности «Генетика».

УДК 618.1/2-073:577.113.21:371.3(075.8)

ББК 53.6 + 57.16я73

Табл. 1; Ил. 7. Библиогр.: 5 назв.

**Рецензенты:** Заведующий кафедрой медицинской генетики ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, д. м. н., профессор – **А. Ю. Асанов**

Заместитель директора по научно-клинической работе ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», д. м. н., профессор – **Р. А. Зинченко**

ISBN 978-5-7249-2913-4

© ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений .....	4
Введение .....	5
<b>ГЛАВА 1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)</b> .....	11
<b>1.1. Основные компоненты ПЦР</b> .....	11
<b>1.2. Дополнительные компоненты ПЦР</b> .....	12
Положительный контроль .....	12
Отрицательный контроль .....	12
Внутренний контроль .....	13
Специальные контроли .....	14
<b>1.3. Основные этапы ПЦР</b> .....	16
<b>1.4. Варианты технологии ПЦР</b> .....	22
<b>1.5. Детекция результатов ПЦР</b> .....	24
<b>1.5.1. Метод гель-электрофореза</b> .....	24
<b>1.5.2. Флуоресцентные методы детекции</b> .....	26
<b>1.6. Детекция результатов ПЦР анализа с использованием гибридизационно-флуоресцентных технологий</b> .....	30
<b>1.6.1. ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR)</b> .....	30
<b>1.6.2. ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ)</b> .....	40
Контрольные вопросы и задания .....	40
<b>ГЛАВА 2. Практическое применение тестов ПЦР в режиме реального времени</b> .....	41
<b>2.1. Пренатальное определение пола плода</b> .....	41
<b>2.1.1. Показания к неинвазивному определению пола плода</b> .....	41
<b>2.1.2. Выявление фрагмента Y хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени</b> .....	43
<b>2.2. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного</b> .....	44
<b>2.2.1. Показания к пренатальному исследованию резус-фактора плода</b> .....	45
<b>2.2.2. Выявление гена RHD плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени</b> .....	49
Контрольные вопросы и задания .....	50
Заключение .....	51
Тестовые вопросы и задания .....	52
Ответы к тестовым вопросам и заданиям .....	54
Список литературы .....	55

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота

**кДНК** – комплементарная ДНК

**кРНК** – комплементарная РНК

**мРНК** – матричная рибонуклеиновая кислота

**НК** – нуклеиновая кислота

**ОТ-ПЦР** (*RT-PCR*) – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

**ПКО** – положительный контрольный образец

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция

**ПЦР-РВ** (*PCR-RT*) – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

**РНК** – рибонуклеиновая кислота

**фетДНК** – фетальная ДНК

**FLASH** (*Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization*) – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, мечеными флуорофорами

**FRET** (*Fluorescence resonance energy transfer*) – флуоресцентный резонансный перенос энергии

**HRM** (*High resolution melting curve analysis*) – анализ кривых плавления с высоким разрешением

**MLPA** (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) – мультиплексная лигазозависимая амплификация зондов

**SNP** (*Single-nucleotide polymorphism*) – однонуклеотидный полиморфизм

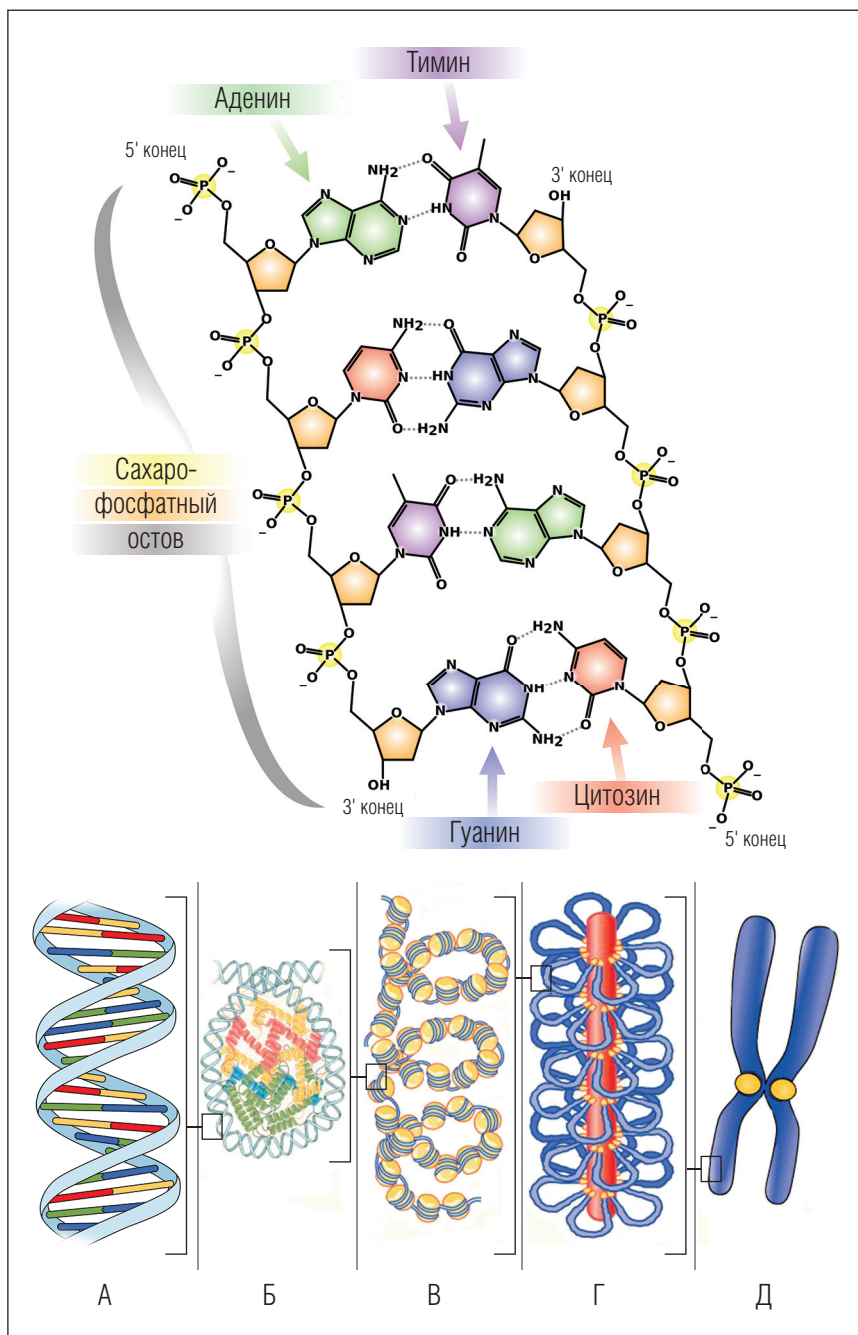
## ВВЕДЕНИЕ

Если XIX век принято называть веком физики, то XX век может быть назван веком биологии благодаря огромному пути, который прошла эта наука. В настоящее время мы входим уже в геномную эру. Между тем, понимание сущности строения генома человека, его функционирования и возможности его редактирования было бы невозможно без ряда ключевых открытий и разработки ключевых молекулярно-генетических технологий.

Вплоть до 50-х годов XX века точное строение ДНК и способ передачи наследственной информации оставались неизвестными, хотя и предполагалось, что ДНК состоит из нуклеотидов (эксперименты О. Эвери, К. Маклауда, М. Маккарти). Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счет дезоксирибозы и фосфатной группы (фосфодиэфирные связи). В подавляющем большинстве случаев (кроме некоторых вирусов, содержащих одноцепочечную ДНК) макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу.

В ДНК встречается четыре вида азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин и цитозин). Азотистые основания одной из цепей соединены с азотистыми основаниями другой цепи водородными связями согласно принципу комплементарности: аденин взаимодействует только с тимином (две водородные связи), гуанин – только с цитозином (три водородные связи) (рис. 1). Двойная спираль ДНК диаметром  $20 \text{ \AA}$  (рис. 1, А) с октамером гистонов (по две молекулы каждого из четырех гистоновых белков, H2A, H2B, H3 и H4) образует нуклеосому диаметром  $100 \text{ \AA}$  (рис. 1, Б). Гистоновый белок H1 связывает нуклеосомы в структуру, называемую соленоидом, диаметром  $300\text{--}500 \text{ \AA}$  (рис. 1, В). В результате очередного витка пространственной упаковки образуется структура диаметром  $2000 \text{ \AA}$  (рис. 1, Г), которая образует хроматиду диаметром  $6000 \text{ \AA}$  (рис. 1, Д).

Каждая цепь служит матрицей при синтезе новой цепи, а последовательность в синтезируемой цепи задается последовательностью комплементарных оснований цепи-матрицы. Асимметричные концы цепи ДНК называются 5' (пять штрих) и 3' (три штрих). Полярность цепи играет важную роль при синтезе ДНК (удлинение цепи возможно только путем присоединения новых нуклеотидов к свободному 3'-концу).



**Рис. 1. Уровни организации ДНК: от образования двойной цепи ДНК до хроматиды**



Количественные соотношения между различными типами азотистых оснований в составе нуклеотидов ДНК были сформулированы в 1949–1951 гг. группой биохимика Э. Чаргаффа и получили название «Правила Чаргаффа». Суть этих правил заключалась в следующем.

1. Количество аденина (А) равно количеству тимина (Т), а гуанина (Г) – цитозина (Ц):  $A = T, G = C$ .
2. Количество пуринов равно количеству пиримидинов:  $A + G = T + C$ .

Правила Чаргаффа наряду с данными рентгеноструктурного анализа сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Д. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году (Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962 года).

В 1955 году А. Корнберг открыл фермент, который назвал ДНК-полимеразой. Этот фермент способен удлинять цепь ДНК, присоединяя нуклеотиды к ее 3'-концу. В искусственных условиях фермент катализирует реакцию достраивания участка искомой ДНК от затравки (праймера), которая комплементарно связана с цепью ДНК (матрицей). Раствор, в котором происходит эта реакция, должен содержать дезоксирибонуклеозидфосфаты (дНТФ), используемые в качестве строительных блоков.

В 1971 году Х. Клеппе и соавторы рассмотрели данные, касающиеся состава ингредиентов реакционной смеси, и принципы использования коротких искусственно синтезированных молекул ДНК-праймеров для получения новых копий ДНК.

Однако возможность использования ПЦР в плане наработки большого количества копий нуклеиновых кислот еще не рассматривалась. Это было связано с техническими трудностями, обусловленными необходимостью трудоемкого синтеза праймеров и нестабильностью фермента. В начале использования метода ПЦР после каждого цикла нагревания – охлаждения ДНК-полимеразу приходилось добавлять в реакционную смесь, так как она быстро инактивировалась при высокой температуре, необходимой для разделения цепей спирали ДНК. Процедура была очень неэффективной, требовала много времени и фермента.

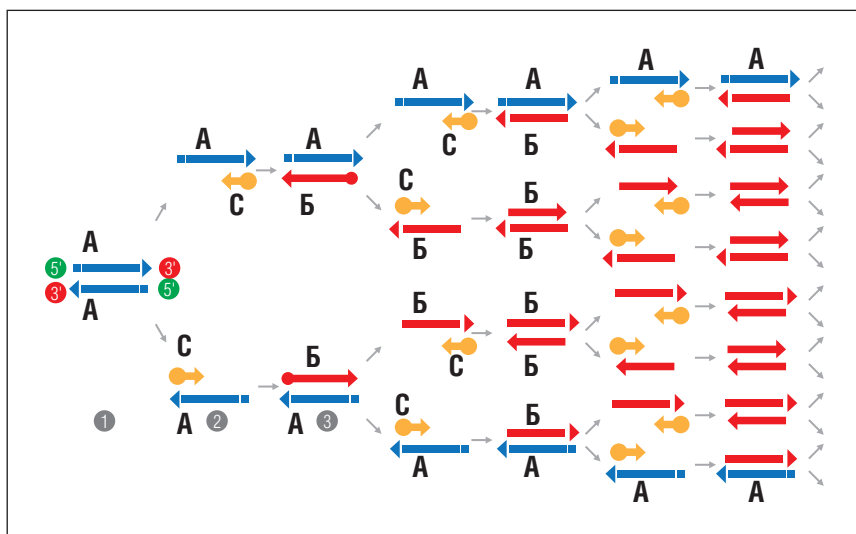
В 1975 г. Т. Брок и Х. Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г. из нее была впервые выделена Taq-полимераза. Преимуществом данного фермента была способность стабильно работать при повышенных температурах (оптимум 72–80°C).

В 1983–1984 гг. К. Муллис провел ряд экспериментов по разработке ПЦР и первым начал использовать Taq-полимеразу вместо неустойчивой к высоким температурам ДНК-полимеразы. Это позволило ускорить рабо-



ты по разработке полимеразной цепной реакции. Кроме того, К. Муллис вместе с Ф. Фалуном разработал алгоритм циклических изменений температуры в ходе полимеразной цепной реакции.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – это метод, позволяющий многократно амплифицировать (копировать) в пробирке определенные участки ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом последующем цикле фрагменты ДНК вновь копируются, что приводит к экспоненциальному увеличению количества исходных копий ДНК (рис. 2).



**Рис. 2. Иллюстрация принципа экспоненциального увеличения количества фрагментов ДНК в процессе проведения реакции ПЦР**

А – исходная последовательность ДНК,  
Б – фрагменты ДНК, получаемые в ходе реакции амплификации,  
С – праймеры. 1, 2, 3 – этапы внутри одного цикла ПЦР  
(1: денатурация ДНК, 2: отжиг праймеров, 3: элонгация цепи)

Как уже сказано выше, метод ПЦР был впервые предложен в 1983 году, а уже в 1985 году Р. Саики с соавторами описал его использование в быстром и точном пренатальном диагностическом тесте на серповидно-клеточную анемию. Разработка принципов ПЦР совершила революцию в молекулярной биологии и генетике, положив начало новому направле-

нию — ДНК-диагностике. Сегодня практически не встречаются работы в области молекулярной биологии, в которых на каком-то из этапов работы не был бы использован метод ПЦР.

Учитывая важность метода ПЦР, автор изобретения К. Муллис в 1993 году получил Нобелевскую премию по химии.

Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека». Были созданы современные технологии секвенирования (расшифровки нуклеотидных последовательностей ДНК). Это, в свою очередь, способствовало значительному росту информационных баз данных, содержащих последовательности ДНК биологических объектов.

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точковых мутаций, описаны десятки различных применений метода.

В 1997 году Д. Ло с соавторами данным методом определил Y-хромосомные последовательности в плазме беременных женщин плодом мужского пола, что положило начало новым методам в пренатальной диагностике — неинвазивным пренатальным тестам.

**Неинвазивный пренатальный тест** — технология анализа внеклеточной ДНК плода, циркулирующей в крови беременной женщины, для скрининга с целью выявления резус-фактора плода, пола плода, трисомии по 21-й хромосоме (синдром Дауна) и/или других параметров. Неинвазивный пренатальный тест может проводиться методами ПЦР, высокопроизводительного секвенирования, с помощью ДНК-микрочипов или с совмещением этих методов.

Внеклеточная ДНК имеет плацентарное происхождение и возникает вследствие апоптоза клеток трофобласта, плаценты и плодных оболочек. Фетальная вкДНК выявляется в плазме крови беременных начиная с 5-й недели гестации, и ее фракция (отношение количества фетальной вкДНК ко всей вкДНК в плазме крови) в период 10–21 недели беременности достигает 10–20%. Фетальная фракция с 10-й недели гестации возрастает в среднем на 0,1% в неделю, а после 21 недели гестации — на 1% в неделю. Значение фетальной фракции зависит также от индекса массы тела женщины и наличия у плода хромосомной патологии.

В акушерско-гинекологической практике часто возникает необходимость определения генотипа плода на ранних сроках беременности. Ранее материал для таких исследований получали только инвазивно, при хорион- или плацентобиопсии и в ходе амнио- и кордоцентеза. Риск самопро-

извольного прерывания беременности в этом случае составляет около 2%, в ряде случаев имеются противопоказания для инвазии. Открытие наличия фетальных ДНК и РНК в материнской крови и послужило основой для развития неинвазивной пренатальной диагностики, которая, в отличие от прежних методов, не представляет угрозы течению беременности, так как материалом для исследования служит кровь матери.

Начиная с 8–10 недель беременности неинвазивное пренатальное тестирование методом ПЦР, например, позволяет проводить исследование фетальной ДНК с точностью до 96–98% для прогнозирования развития резус-конфликта и гемолитической болезни плода, а также определять пол плода, что может быть важно в случае сцепленных с полом заболеваний или заболеваний, лечение которых различается в зависимости от пола.

# ГЛАВА 1. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

## 1.1. ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЦР

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

**Праймеры** – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15–20 до 30 нуклеотидов, комплементарные специфическим участкам комплементарных цепей амплифицируемого участка ДНК-мишени. Праймеры служат затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы и играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов реакции амплификации.

Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы при соблюдении ряда принципиальных важных моментов. При разработке специфичных праймеров особое внимание уделяют 3'-концам праймеров, так как именно с них Taq-полимераза начинает достраивать комплементарную цепь ДНК. При недостаточной специфичности праймеров в процессе амплификации возможно образование побочных ПЦР-продуктов, которые при анализе результатов исследования могут привести к ложноположительным результатам; но главное, для их синтеза будут расходоваться компоненты реакционной смеси, что приведет к значительной потере чувствительности реакции как таковой. Праймеры должны обладать минимально возможной склонностью к образованию димеров и петель (устойчивых двухцепочечных комплексов, образующихся при отжиге прямых и обратных праймеров самих на себя или друг с другом). Необходимо также, чтобы область отжига праймеров находилась в наиболее консервативной области анализируемого участка, вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной специфичности, взятой в качестве критерия при выборе праймеров. При взаимодействии с вариабельной областью отжиг праймеров может не произойти, что приведет к возникновению ложноотрицательного результата.

**Полимераза** (Taq-полимераза) – термостабильный фермент, который обеспечивает достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. То есть в процессе синтеза второй цепи ДНК ее нуклеотидный состав определяется нуклеотидным составом основной цепи ДНК, служащей шаблоном.

**Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов** (дНТФ): дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозин-

трифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй (комплементарной) цепи ДНК.

**Буфер** – реакционная смесь, содержащая дополнительные компоненты, включая ионы, бычий сывороточный альбумин и другие, в концентрациях обеспечивающих оптимальные условия для проведения реакции, а также поддерживающие стабильное значение pH. Например, соли магния необходимы для функционирования фермента полимеразы, бычий сывороточный альбумин используют для уменьшения адгезии (налипания) компонентов буферной смеси (в первую очередь, фермента) к стенкам реакционной пробирки. В зависимости от состава амплифицируемых участков в состав буфера могут быть добавлены дополнительные компоненты, например, диметилсульфоксид в случае использования ДНК-матриц с большим содержанием ГЦ.

**Анализируемый образец** – подготовленный к внесению в реакционную смесь образец, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью-шаблоном для последующего многократного воспроизведения (копирования или, используя профессиональную терминологию, амплифирования). При отсутствии мишени специфический продукт амплификации не образуется.

## 1.2. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЦР

Для удобства детекции и контроля эффективности амплификации в состав реакционной смеси могут быть включены дополнительные компоненты.

### **Положительный контроль**

Положительный контрольный образец (ПКО) представляет собой искусственно синтезированную олигонуклеотидную последовательность, строго соответствующую искомой. Соответственно, праймеры для ПКО и искомой мишени одинаковые, что позволяет удостовериться в работоспособности и сохранности компонентов РС, необходимых для нормального прохождения ПЦР.

### **Отрицательный контроль**

Отрицательный контрольный образец (ОКО) включает в себя все компоненты реакции, но вместо искомой ДНК в него вносится соответствующее количество деионизованной воды или экстракта, не содержащего исследуемой ДНК. Отрицательный контроль необходим для проверки компонентов реакции на отсутствие в них ДНК вследствие контаминации и исключения учета ложноположительных результатов.

## **Внутренний контроль**

Образец ДНК может содержать примеси ингибиторов, которые заметно снижают эффективность ПЦР, а в некоторых случаях могут приводить к полному отсутствию результатов исследования. Кроме того, возможны технические ошибки на этапе составления реакционной смеси (например, забыли добавить какой-либо компонент или саму ДНК), несоблюдение температурного режима хранения наборов реагентов или отдельных их частей (например, размораживание, потеря активности ферментов) и ряд других технических моментов, которые напрямую влияют на результаты ПЦР. Поэтому становится необходимым контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, для чего в состав реакционной смеси вводят дополнительный внутренний контроль.

Внутренний контроль – это искусственно сконструированный препарат ДНК, который имеет принципиально отличную от искомой олигонуклеотидную последовательность. Для внутреннего контроля в состав реакционной смеси вводят собственные, строго комплементарные праймеры.

Концентрация внутреннего контроля в реакционной смеси должна быть такой, чтобы не составлять конкуренции для амплификации даже единичных искомых молекул ДНК.

Интерпретация результатов исследований с учетом внутреннего контроля объясняется в табл. 1.

Наличие ампликонов внутреннего контроля является свидетельством нормального прохождения реакции амплификации. Если ампликоны искомой ДНК отсутствуют, но не образовались также и ампликоны внутреннего контроля, можно сделать вывод о технологических нарушениях либо о наличии в анализируемом образце нежелательных примесей. В любом случае, результат реакции следует признать недостоверным.

Внутренний контроль может быть использован не только непосредственно в составе реакционной смеси для амплификации, но и для контроля качества выделения ДНК. Для этого его вводят в каждую пробирку с исходным или предварительно обработанным образцом, проводят через этап выделения и только потом добавляют в реакционную смесь. Введение внутреннего контроля с известной концентрацией на этапе выделения особенно важно для контроля количественного ПЦР-анализа.

**Табл. 1. Интерпретация результатов исследований методом ПЦР с учетом внутреннего контроля**

Результат ПЦР	Искомая ДНК	Внутренний контроль	Интерпретация
<i>Анализируемые образцы</i>			
«+»	*	—	Обнаружена искомая ДНК (корректный результат)
	*	*	
«-»	—	*	Не обнаружена искомая ДНК (корректный результат)
«НД»	—	—	<i>Недостовверный результат</i>
<i>Положительный контрольный образец (ПКО)</i>			
«+»	*	—	Обнаружен ПКО (корректный результат)
	*	*	
«-»	—	*	Не обнаружен ПКО (некорректный результат, требует проверки)
«НД»	—	—	<i>Недостовверный результат</i>
<i>Отрицательный контрольный образец (ОКО)</i>			
«+»	*	—	Некорректный результат, требует проверки (например: контаминация)
	*	*	
«-»	—	*	Отрицательный результат (корректный результат)
«НД»	—	—	<i>Недостовверный результат</i>

### **Специальные контроли**

Использование специальных контролей при постановке ПЦР позволяет решать ряд задач, в первую очередь касающихся оценки эффективности процесса амплификации и контроля специфичности полученных результатов, а также дает возможность реализовать подход к количественному анализу ДНК.

Принципиальным моментом является постановка специальных контролей при исследовании сложных многокомпонентных систем, таких как биоценозы, поскольку появляется возможность качественного и количественного анализа взаимодействия компонентов системы и характеристики их отношения к биотопу.



К специальным контролям можно отнести следующие:

- ❖ маркеры длин фрагментов ДНК;
- ❖ контроль фона;
- ❖ стандарты и калибраторы;
- ❖ контроль взятия материала.

Маркеры длин фрагментов ДНК используются при детекции результатов ПЦР методом гель-электрофореза. Стандарты (маркеры) представляют собой фрагменты двухцепочечной ДНК строго определенной длины, позволяющие идентифицировать и охарактеризовать полосы, полученные в геле, и оценить результаты анализа с точки зрения их специфичности.

Контроль фона используется для ПЦР с флуоресцентными методами детекции результатов, причем данный тип контроля наиболее актуален для ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке».

Анализ уровней флуоресценции искомой мишени и фоновой флуоресценции позволяет установить некоторое пороговое значение и определить критерии достоверности положительного и отрицательного результатов ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке». Важно, что величина фоновой флуоресценции может зависеть от свойств меченных зондов; изменения концентрации отдельных компонентов реакционной смеси в зависимости от серии, режима и продолжительности хранения; используемого пластика; особенностей регистрирующей аппаратуры. Поэтому фоновые пробы должны готовиться в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов, рекомендациями производителя и к каждой новой серии наборов реагентов.

Стандарты и калибраторы наиболее часто используются при осуществлении количественного анализа методом ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Стандарт – произвольный фрагмент ДНК, ограниченный теми же праймерами, что и для искомой мишени. Известные концентрации стандарта соответствуют определенным значениям порогового цикла  $C_t$  (номер первого цикла, в котором происходит увеличение флуоресцентного сигнала репортерной группы по сравнению с уровнем фонового сигнала. Его величина зависит от исходного количества копий матрицы и от эффективности амплификации ДНК). Введение этого типа контролей предполагает построение калибровочного графика, из которого находят концентрацию искомой ДНК в исследуемом образце. Точность метода зависит от того, насколько условия ПЦР серии стандартов (прежде всего эффективность амплификации) близки к условиям ПЦР экспериментальных образцов.

Для определения количества матрицы в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) существуют следующие варианты стандартов:

- ❖ очищенный продукт ПЦР-РВ;
- ❖ рекомбинантная ДНК;
- ❖ синтетический олигонуклеотид, содержащий амплифицируемую последовательность.

Использование стандартов и калибраторов позволяет определить концентрацию ДНК в двух вариантах (например, при анализе на наличие патогенных микроорганизмов в пробе):

- ❖ количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в единице объема клинического образца (ГЭ/мл), что отражает абсолютную концентрацию данных микроорганизмов в клиническом материале;
- ❖ расчет соотношения количества геномов на количество геномов клеток человека. Для этой цели в ПЦР-смеси наряду с калибраторами ДНК микроорганизма присутствуют калибраторы человеческой ДНК. Полученные таким образом относительные значения концентрации ДНК микроорганизма к ДНК человека могут отражать плотность обсемененности искомыми микроорганизмами.

Контроль взятия материала – ключевой момент в определении качества взятой для исследования пробы. Данный подход позволяет исключить ошибки преаналитического этапа при исследовании биологического материала, содержащего клетки человека, и избежать получения недостоверных, ложноположительных или ложноотрицательных результатов ПЦР. Кроме того, он может быть использован для оценки количества геномной ДНК человека.

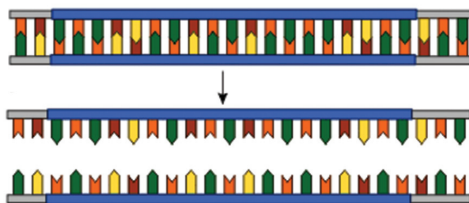
Существующий в настоящее время спектр подходов и инструментальных методов проведения ПЦР позволяет оптимизировать работу любой лаборатории, обеспечивать должный контроль качества и эффективность прохождения ПЦР, а также обеспечивать получение достоверных результатов.

### **1.3. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПЦР**

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечиваются определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов (рис. 3):

## 1-й цикл амплификации

1-й этап  
**Денатурация**  
93–95°C

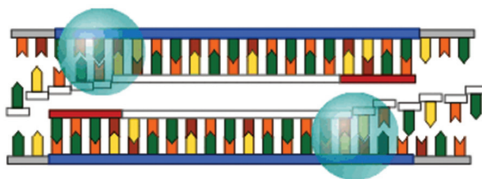


Искомый фрагмент ДНК

2-й этап  
**Отжиг праймеров**  
50–65°C

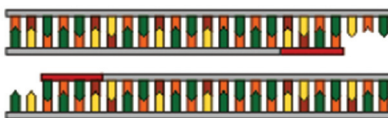


3-й этап  
**Синтез цепи ДНК**  
72°C



## 2-ой цикл амплификации

1-й этап  
**Денатурация**



2-й этап  
**Отжиг праймеров**



3-й этап  
**Синтез цепи ДНК**



Рис. 3. Основные этапы ПЦР: денатурация двухцепочечной ДНК, отжиг праймеров, синтез цепи ДНК

1. Денатурация – это переход ДНК из двухцепочечной формы в одноцепочечную при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований комплементарных цепей ДНК под воздействием высоких температур (94–96°C).
2. Отжиг – это связывание праймеров с одноцепочечной ДНК-матрицей, после чего праймер функционирует в качестве затравки для синтеза второй цепи ДНК. Праймеры подбирают так, чтобы они ограничивали искомым фрагмент ДНК и были комплементарны обеим цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа (см. выше). Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. На температуру отжига влияет состав праймеров, температура отжига обычно выбирается на 4–5°C ниже температуры плавления праймеров.
3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров полимеразы начинают достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера с использованием дНТФ. На этом этапе температуру реакционной смеси поддерживают на оптимальном для работы полимеразы уровне и она зависит от типа используемой полимеразы. Время стадии элонгации зависит как от типа полимеразы, так и от размера амплифицируемого фрагмента. Как правило, время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований.

Температурный цикл амплификации повторяется многократно (30 и более раз), что приводит к экспоненциальному увеличению количества синтезированных копий фрагментов ДНК (рис. 2).

Результатом циклического процесса ПЦР является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A(n) = M \cdot 2^n, \text{ где:}$$

$A(n)$  – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации после прохождения цикла  $n$ ;

$M$  – начальное количество ДНК-мишеней;

$n$  – число циклов амплификации;

$2$  – коэффициент эффективности реакции ПЦР (эффективность ПЦР).

Эффективность ПЦР близка к 2 в оптимальных условиях проведения реакции, однако реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации ниже и составляет ~ 80–95%. Коэффициент эффективности ПЦР меняется на протяжении всей реакции и обычно уменьшается к концу

вследствие целого ряда причин. Приведем некоторые из них: в реакционной смеси снижается концентрация одного из компонентов реакции; ингибиторы ПЦР могут оказывать большее влияние на ход реакции ПЦР, чем в начале процесса; может возникнуть конкуренция между процессами отжига праймеров и ассоциации ампликонов между собой. Наличие в образце ингибиторов реакции ПЦР может привести к существенному уменьшению значения эффективности реакции ПЦР, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает формула:

$A(n) = M * (1+E)^n$ ,  $0 < E < 1$ , где  $E$  – значение эффективности реакции.

В процессе амплификации на исходной цепи синтезируются также и длинные фрагменты, однако их накопление происходит в арифметической прогрессии по формуле:

$K(n) = M * n$ , где  $K(n)$  – количество длинных продуктов амплификации (фрагментов), полученных после цикла  $n$ .

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Эффективность реакции оказывает существенное влияние на скорость наработки ДНК в ходе проведения ПЦР. Даже небольшие изменения эффективности реакции ведут к существенным различиям в получаемых в ходе эксперимента результатах ПЦР. Используя вышеприведенную формулу, можно легко оценить влияние эффективности реакции на конечный выход продукта: при 30 циклах амплификации изменения значения величины эффективности ПЦР на 0,1 (10%) приведет к разнице в количестве продукта в 4 раза, при отличии на 0,15 (15%) – в 10 раз, а при отличии на 0,2 (20%) – почти в 25 раз. Приведенные цифры иллюстрируют важность корректной оценки эффективности реакции для точного сравнения результатов количественного ПЦР-исследования.

### **«Эффект плато»**

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – «эффект плато». Термин «эффект плато» используют для описания процесса накопления продуктов ПЦР на последних циклах амплификации.

На достижение «эффекта плато» влияют:

- ❖ утилизация субстратов (дНТФ и праймеров);
- ❖ стабильность реагентов (дНТФ и фермента);
- ❖ количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы;
- ❖ неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу;
- ❖ концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

## 1.4. ВАРИАНТЫ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР

На данный момент разработаны варианты постановки ПЦР, направленные на решение следующих задач: увеличение эффективности реакции и снижение риска образования неспецифических продуктов; проведение качественного и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК.

Наиболее распространенными модификациями ПЦР являются:

- ❖ ПЦР с «горячим» стартом (Hot-start PCR),
- ❖ ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR),
- ❖ мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР.

**ПЦР с «горячим» стартом** (англ. *Hot-start PCR*) – модификация метода, направленная на предотвращение неспецифического взаимодействия компонентов реакционной смеси до достижения оптимальных условий амплификации.

В зависимости от ГЦ-состава и размера праймеры имеют определенную температуру плавления ( $T_m$  – температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером в присутствии фермента – полимеразы). При соблюдении оптимальных условий (температура отжига праймеров близка по значениям к температуре плавления) праймер образует стабильную комплементарную связь с матрицей. Если же температура реакционной смеси ниже  $T_m$ , то возможен неспецифический отжиг праймера на матрицу, образование димеров. Если в данный момент активный фермент в реакционной смеси отсутствует, то элонгации образовавшегося неспецифического комплекса не происходит, что позволяет избежать ложноположительных результатов ПЦР.

Реализация «горячего» старта возможна двумя основными способами.

1. Блокировка полимеразы антителами или имитирующими антитела небольшими молекулами типа Affibody. Полимераза становится активной

только при предварительном прогревании реакционной смеси при температуре 95°C в течение 10 минут – условия, при которых разрушаются связи полимеразы–антитела.

2. Использование легкоплавкого парафина отделяет полимеразу от компонентов реакционной смеси, предотвращая их преждевременное взаимодействие. Парафин плавится при достижении реакционной смесью температуры выше 55°C, что достаточно для начала специфического взаимодействия между компонентами реакционной смеси.

При реализации данного подхода важным моментом является использование минерального масла, которое при нагревании обеспечивает равномерность расплавления парафина и поддержание однородности условий реакции (снижение риска агрегации кристаллов парафина и конденсации компонентов реакционной смеси).

Таким образом, ПЦР с «горячим» стартом позволяет минимизировать вероятность образования неспецифических продуктов ПЦР и возможность получения ложноположительных результатов анализа.

**ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR)** используется для идентификации известной последовательности РНК. Суть реакции заключается в синтезе двухцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК. Для этого одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции (ОТ, англ. *RT, reverse transcription*) в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже ДНК-матрицу, используя традиционную ПЦР.

**Мультиплексная (мультипраймерная) ПЦР** – одновременная амплификация двух и более искомым последовательностей ДНК в одной пробирке. Каждая пара праймеров для мультиплексной ПЦР должна быть строго специфична соответствующей искомой мишени, а условия прохождения циклов должны обеспечивать равноэффективный отжиг всех участвующих в реакции пар праймеров, чтобы выход амплифицируемых продуктов был по возможности одинаковым. Преимуществом данного метода является возможность проведения скрининговых исследований, с минимальными затратами на расходные материалы. Кроме того, из одного образца можно получить максимум информации в рамках одной постановки ПЦР.

В настоящее время разработаны и используются десятки вариантов проведения ПЦР, применяемые для разных задач. Кратко перечислим некоторые из них.



**Гнездовая ПЦР (ПЦР со вложенной парой праймеров)** (англ. *Nested PCR*); применяется для уменьшения количества неспецифических (побочных) продуктов реакции. При проведении ПЦР используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции амплификации. С помощью второй пары праймеров амплифицируют участок ДНК внутри продукта первой реакции.

**Инвертированная ПЦР** (англ. *Inverse PCR*) используется в том случае, когда известна последовательность какого-то одного фрагмента ДНК, но в результате ПЦР необходимо амплифицировать фрагмент, включающий окружение участка с известной последовательностью. Инвертированная ПЦР обычно используется для определения соседних последовательностей после вставки фрагмента ДНК в геном, например, определение координат встраивания известного вируса. Для проведения инвертированной ПЦР проводят три этапа: (1) разрезают молекулу ДНК рестриктазами (это эндонуклеазы, распознающие специфические сайты размером 6–8 нуклеотидов), (2) закольцовывают полученные фрагменты с помощью фермента лигазы, (3) используя праймеры, комплементарные к известной последовательности, проводят амплификацию неизвестного фрагмента.

**Асимметричная ПЦР** (англ. *Asymmetric PCR*) проводится в случае необходимости амплификации одной из цепей исходной ДНК. Асимметричная ПЦР используется в некоторых методиках секвенирования и гибридного анализа. Процесс ПЦР проводится аналогично классической ПЦР, модификация заключается в использовании большого избытка одного из праймеров.

**ПЦР длинных фрагментов** (англ. *Long-range PCR*) – вариант проведения ПЦР для амплификации участков ДНК длиной 5–10 и более тысяч пар оснований (в «обычном» варианте ПЦР получают фрагменты размером 2–3 тысячи пар оснований). В этом варианте часто используют смесь двух полимераз: *Taq*-полимеразы, которая характеризуется высокой процессивностью (способностью за один «проход» синтезировать длинную цепь ДНК) и *Pfu*-полимеразы, которая обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью и необходима для удаления некомплементарных нуклеотидов (то есть выполняет коррекцию ошибок).

Перечислим названия еще нескольких вариантов проведения ПЦР: групп-специфическая ПЦР (англ. *Group-specific PCR*), ПЦР с быстрой амплификацией концов кДНК (англ. *Rapid amplification of cDNA ends, RACE-PCR*), метод молекулярных колоний (англ. *PCR Colony*), ПЦР со случай-

ной амплификацией полиморфной ДНК (англ. *Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD*), ступенчатая ПЦР (англ. *Touchdown PCR*), «холодная» ПЦР (англ. *Co-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR*), метилспецифичная ПЦР (англ. *Methylation-specific PCR*), ПЦР с перекрывающимися праймерами (англ. *Overlap extension PCR*), сборочная ПЦР (англ. *Assembly PCR*), твердофазная ПЦР (англ. *Solid phase PCR*), цифровая ПЦР (англ. *Digital PCR*), капельная цифровая ПЦР (англ. *Droplet digital PCR*).

Твердофазная и цифровая ПЦР занимают важное место в современных инструментальных методах исследований. Твердофазную ПЦР применяют при подготовке к проведению высокопроизводительного секвенирования с помощью платформы Illumina. На поверхности проточной ячейки равномерно расположены праймеры, комплементарные адаптерам, присоединенным к фрагментам ДНК, которые предстоит секвенировать. В ходе проведения амплификации на поверхности проточной ячейки формируются области, состоящие из фрагментов, имеющих идентичный нуклеотидный состав.

Дальнейшим продолжением развития метода ПЦР в реальном времени является метод цифровой ПЦР и капельной цифровой ПЦР. В отличие от стандартной ПЦР, проходящей во всем объеме образца, при проведении цифровой ПЦР пробу «делят» на небольшие зоны, в каждой из которых ПЦР проводится независимо от соседних областей. Существуют разные реализации метода деления на отдельные зоны, например, при использовании масляной эмульсии. Реакцию проводят в микролуночных планшетах, а визуализацию – с помощью TaqMan-зондов или интеркалирующих красителей. Существенным недостатком такой реализации метода цифровой ПЦР была высокая трудоемкость ввиду необходимости физического разделения каждой пробы на большое число (сотни и тысячи) отдельных зон. Для преодоления этих недостатков был разработан метод капельной цифровой ПЦР. При проведении капельной цифровой ПЦР из исходной реакционной смеси создается водно-масляная эмульсия, которая внутри одной пробирки с помощью автоматического генератора капель разделяется на тысячи и десятки тысяч микрокапель. Генетический материал (как фоновая ДНК, так и ДНК-матрица) распределяется среди капель-микрореакторов случайным образом. После проведения реакции амплификации на финальном этапе производится измерение и подсчет уровня сигнала в каждой микрокапле.

### **Кратко перечислим основные вехи в развитии метода ПЦР:**

1957 г. – А. Корнберг выделил фермент ДНК-полимеразу из бактерии *Escherichia coli*;

1976 г. – выделение термостабильной ДНК-полимеразы из бактерии *Thermus aquaticus*, которую назвали *Taq*-полимеразой;

1983 г. – появление метода ПЦР (К. Муллис);

1987 г. – компания Cetus, в которой работал К. Муллис, получила патент на принцип метода ПЦР;

1990 г. – компания Cetus получила патент на метод ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы;

1991 г. – приобретение компанией Hoffmann-La Roche права на метод ПЦР и использование *Taq*-полимеразы;

1992 г. – сотрудники компании Roche Molecular Systems (дочерняя компания Hoffmann-La Roche) разработали метод ПЦР в реальном времени;

1993 г. – К. Муллис получил Нобелевскую премию по химии за изобретение ПЦР;

2011 г. – начало коммерческого использования технологии капельной цифровой ПЦР.

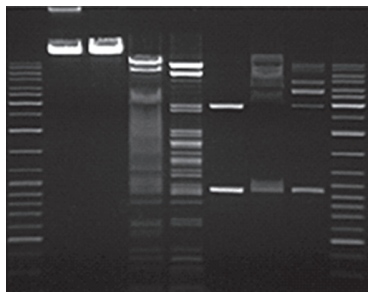
## **1.5. ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР**

На сегодняшний день существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- ❖ электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле);
- ❖ гибридизационно-ферментный;
- ❖ гибридизационно-флуоресцентный:
  - регистрация продукта после окончания реакции амплификации – «анализ по конечной точке»;
  - детекция продукта в режиме реального времени.

### **1.5.1. Метод гель-электрофореза**

Наиболее распространенным до недавнего времени являлся метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру (рис. 4). В этом случае визуализацию результатов проводят в пластине агарозного геля, который представляет собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5–2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например, бромистого этидия.



**Рис. 4. Разделение молекул ДНК в агарозном геле**

Застывшая агароза образует пространственную структуру. При заливке с помощью гребенки в геле формируют лунки, в которые вносят продукты амплификации. Пластины геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения.

Под воздействием электрического тока отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле в направлении положительно заряженного электрода. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Молекулы красителя встраиваются (интеркалируют) в молекулу ДНК таким образом, чтобы располагаться параллельно пуриновым и пиримидиновым фрагментам нуклеотидов.

Размер молекулы влияет на скорость движения фрагмента при проведении электрофореза. Чем больше размер фрагмента, тем меньшее расстояние этот фрагмент успевает пройти. После окончания электрофореза (обычно время проведения электрофореза 10–60 минут) гель помещают на стекло УФ-трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной, поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с методом горизонтального электрофореза. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид и специальную камеру для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК с точностью до одного нуклеотида. Однако приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее приготовления агарозного, кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

Оба варианта электрофоретической детекции позволяют осуществлять только качественный анализ и сопряжены с рядом недостатков:

- ❖ большие временные затраты времени на стадию детекции;
- ❖ невозможность автоматизации;
- ❖ сложности и субъективность трактовки результатов;
- ❖ высокий риск контаминации и большие затраты на ее устранение:
  - повышенные требования к организации лаборатории;
  - максимальное удаление зоны детекции от зоны проведения ПЦР;
  - выделение отдельного сотрудника на стадию детекции;
  - постоянный контроль смывов;
  - большое количество отрицательных контрольных образцов «К—» для контроля контаминации ампликонами, что приводит к увеличению объема расходных материалов и времени для подготовки к проведению детекции.

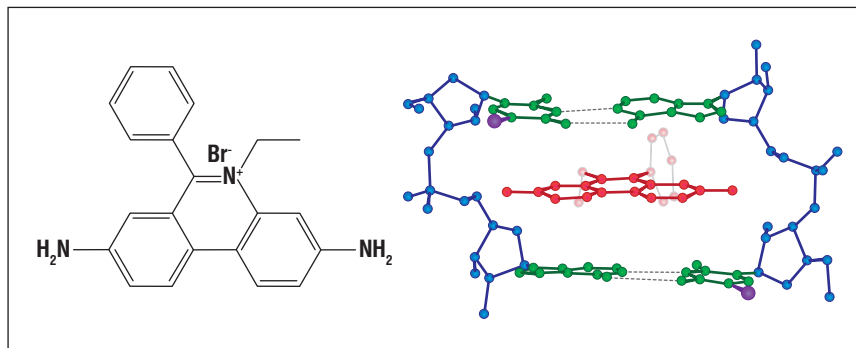
### **1.5.2. Флуоресцентные методы детекции**

Флуоресцентные методы детекции построены на использовании флуорохромов – молекул, обладающих способностью к свечению в результате поглощения световой энергии. Детекция осуществляется специальными приборами после амплификации (ПЦР с анализом результатов «по конечной точке») либо в процессе амплификации (ПЦР в режиме «реального времени»).

Технология позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Также менее строгие требования предъявляются к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов.

Технологии, которые получили коммерческую реализацию, используют интеркалирующие красители либо флуорофоры в составе олигонуклеотидных гибридизационных зондов.

Интеркалирующие красители (лат. *intercalatio* – ‘вставка, добавка’) – молекулы, способные обратимо встраиваться (интеркалировать) между двумя комплементарными парами нуклеотидов в двуспиральной ДНК или РНК (рис. 5).



**Рис. 5. Принцип действия интеркалирующих красителей на примере бромида этидия (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид).** Бромид этидия интеркалирует в молекулу ДНК, т.е. встраивается между основаниями двойной спирали ДНК. Агарозный гель, окрашенный бромистым этидием при освещении ультрафиолетовым светом флуоресцирует слабым оранжевым цветом. При связывании с ДНК интенсивность флуоресценции увеличивается в несколько десятков раз, что позволяет визуализировать продукты ПЦР (см. рис. 4)

Наиболее распространенными интеркалирующими красителями являются: бромистый этидий (EtBr), SYBR Green I, SYBR Gold, LCGreen, SYTO 9, Eva Green и другие. Их преимущество – относительная дешевизна как самого красителя, так и наборов реагентов с их использованием. Однако есть существенный недостаток: способность связываться с любой двуцепочечной ДНК, появляющейся в реакционной смеси, которая может быть как целевым продуктом ПЦР, так и артефактом. Поэтому для получения корректных результатов необходимо дополнительное изучение продуктов амплификации с помощью «плавления» ампликонов. Кроме того, избыток SYBR Green I ингибирует активность *Taq*-полимеразы, что может привести к получению ложноотрицательных результатов ПЦР.

В связи с этим, для диагностических целей обычно используют наборы реагентов, в состав которых входят гибридационные зонды, – более дорогая, но значительно более точная технология. В основе технологии – резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET), который базируется на обмене энергии между двумя фотоактивными молекулами или группами, одна из которых выступает донором (первый флуоресцентный краситель), а другая – акцептором (второй флуоресцентный краситель или «темновой» тушитель) энергии. Эффективность переноса энергии зависит от взаимного расположения донора и акцептора. На данный момент существует несколько вариантов таких зондов: TaqMan, Molecular Beacons, Amplifluor, Scorpion, Duplex Scorpion и другие. Кратко для примера рассмотрим принцип работы первых трех вариантов реализации зондов.

Линейно разрушаемые зонды (TaqMan). В данном подходе к небольшому олигонуклеотиду, комплементарному амплифицируемому фрагменту, пришивают два флуорофора – репортер и гаситель флуоресценции (возможно использование как концевой, так и внутреннего мечения олигонуклеотида). В отсутствие ДНК мишени флуорофор и гаситель сближены и флуоресценция подавлена (по механизму FRET, когда гаситель поглощает сигнал от репортера). В ходе реакции амплификации *Taq*-полимеразы, движущаяся по одноцепочной ДНК-шаблону (стадия элонгации), разрушает зонд, вследствие чего флуорофоры пространственно отдаляются друг от друга и гаситель становится неспособным поглощать сигнал репортера, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала. Интенсивность сигнала возрастает с каждым циклом ПЦР пропорционально накоплению ампликонов.

Зонды с инвертированным концевым повтором («молекулярные маяки», Molecular Beacons). Вариантом технологии TaqMan является использование зондов, несущих короткий (5–8 пар нуклеотидов) инвертированный концевой повтор. Молекулярные маяки – короткие одноцепочечные фрагменты ДНК (олигонуклеотиды), образующие структуру типа «стебель – петля» («шпилька»), на концах которой располагают флуорофор и гаситель. За счет близкого расположения флуорофора и гасителя такие зонды обладают очень низким уровнем флуоресценции. В данной реализации технологии, в отличие от TaqMan, флуоресценция детектируется на этапе отжига – при гибридизации с ампликоном молекула зонда «разворачивается», что ведет к существенному повышению уровня флуоресценции. Использование контактного гашения несколько повышает разнообразие применяемых флуорофоров.

Меченные праймеры с адаптерной последовательностью (Amplifluor). Существует несколько вариантов использования адаптерных 5'-концевых



последовательностей для регистрации накопления продукта с участием флуоресцентно меченого праймера. В наиболее простом варианте реализации праймер несет дополнительную последовательность на 5'-конце, способную образовывать шпильчатую структуру (типа «стебель – петля», причем «стебель» обычно делают в 5–6 пар нуклеотидов, большинство из которых G-C) (в литературе такие системы получили название праймеров «амплифлюр»). Праймеры несут флуоресцентную метку (флуорофор) и гаситель флуоресценции, расположенные так, что первоначально при образовании шпильчатой структуры флуорофор и гаситель оказываются сближены. В ходе реакции шпилька меченого праймера раскрывается (меченный праймер становится частью двухцепочечного продукта), что приводит к усилению сигнала.

Праймер-зонды «скорпионы» (Scorpion). С целью минимизации детекции неспецифичных продуктов реакции в данном варианте реализации метода гибридизационный зонд и праймер объединены в одну молекулу. Для этого к 3'-концу зонда со структурой типа «стебель – петля» после гасителя прикреплен праймер, с которого начинается амплификация ДНК. Петлевая часть адаптерной шпильки комплементарна внутренней части образующегося фрагмента. Конструкция «скорпионов» практически полностью повторяет описанные выше меченные праймеры типа Amplifluor с той лишь разницей, что адаптер отделен от праймера блоком синтеза второй цепи ДНК (с целью избежания его удвоения). Таким образом, после образования продукта реакции петлевая часть адаптерной последовательности может гибридизоваться на внутреннюю часть фрагмента, что ведет к расхождению флуорофора и гасителя флуоресценции, а это приводит к возрастанию уровня детектируемого сигнала.

Используемый вариант зондов накладывает определенные ограничения на подбор подходящих последовательностей. Рассмотрим два наиболее часто встречающихся вида зондов – TaqMan и Molecular Beacons.

Самыми неприхотливыми в части дизайна являются линейные разрушаемые зонды (TaqMan). Ключевым моментом для их эффективной работы является превышение  $T_m$  зонда на 5–10°C над  $T_m$  праймеров, используемых для амплификации фрагмента. Это необходимо для того, чтобы зонд успевал провзаимодействовать с ампликоном до того, как полимеразы начнет синтезировать комплементарную цепь. При выборе последовательности зонда рекомендуется подобрать расположение меченого нуклеотида на расстоянии около 15 оснований от гасителя флуоресценции (такое расположение максимально удалит флуорофор от гасителя при образовании двухцепочечной структуры).

Система с инвертированным концевым повтором «молекулярные маяки» (Molecular Beacons) более сложна в разработке. При поиске эффективного зонда необходимо подобрать  $T_m$  зонда,  $T_m$  праймеров и  $T_m$  инвертированного концевого повтора примерно в соотношении  $70^\circ\text{C} / 60^\circ\text{C} / 50^\circ\text{C}$ . В этом случае в ходе проведения ПЦР при  $50^\circ\text{C}$  или при комнатной температуре (при анализе «по конечной точке») будет получен сигнал за счет «разворачивания» молекулы зонда.

## **1.6. ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

Несмотря на разнообразие вариантов конструирования систем для идентификации мишени (ДНК/РНК), существуют два базовых подхода к детекции результатов ПЦР-анализа с использованием гибридационно-флуоресцентных технологий:

- ❖ ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR),
- ❖ ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ).

Одним из ключевых преимуществ методов ПЦР, основанных на этих подходах является отсутствие необходимости извлечения продукта амплификации из пробирки, поскольку регистрация результатов проводится в закрытой пробирке. Таким образом, решается одна из ключевых лабораторных проблем – проблема контаминации.

### **1.6.1. ПЦР с анализом результатов «по конечной точке»**

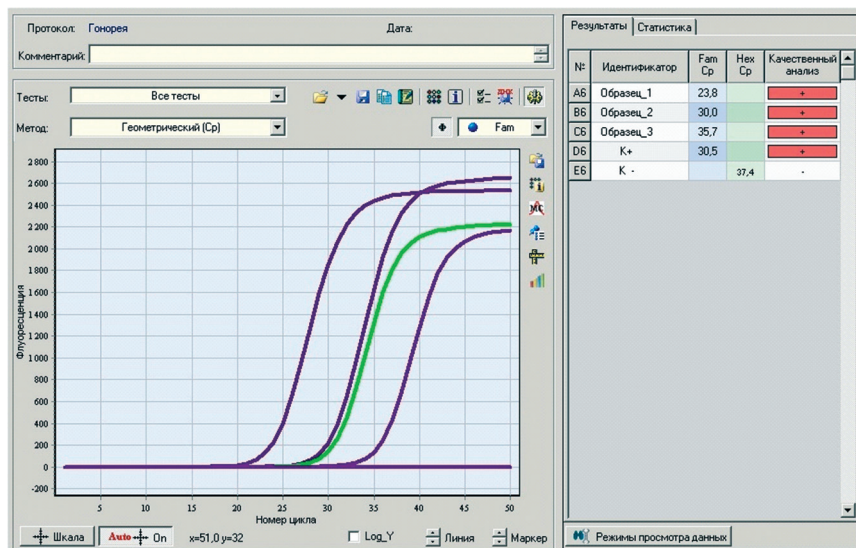
ПЦР с анализом результатов «по конечной точке» (End-point PCR) – это модификация метода ПЦР, которая позволяет учитывать результаты реакции по наличию флуоресценции после амплификации.

Одним из таких вариантов модификации метода ПЦР является метод FLASH (FLUorescent Amplification-based Specific Hybridization) – специфическая гибридизация в процессе амплификации с ДНК-зондами, меченными флуорофорами. Метод позволяет проводить только качественный анализ, что существенно ограничивает диагностические возможности лаборатории, однако характеризуется простотой получения результата при невысоких затратах на оборудование и расходные материалы.

### **1.6.2. ПЦР в режиме «реального времени»**

ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ) используется для одновременной амплификации, детекции и (при необходимости) измерения количества искомой мишени (рис.6А и рис.6Б). Преимуществом

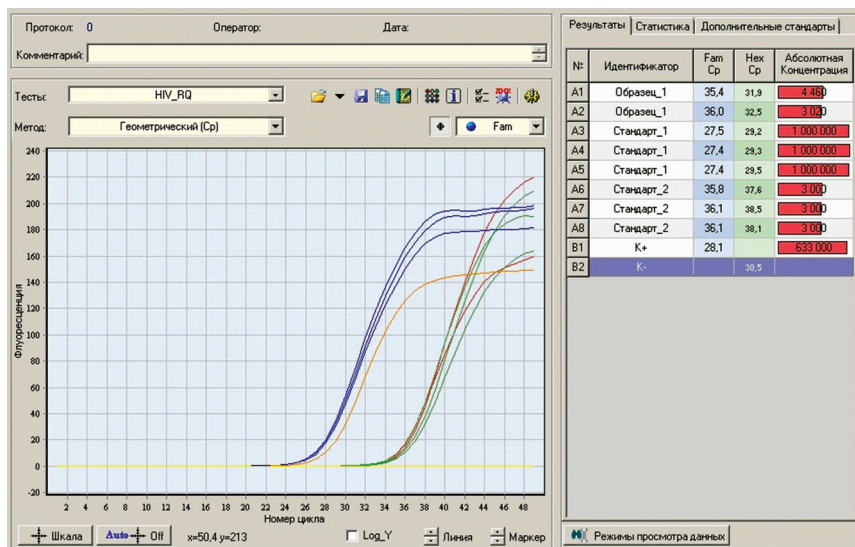
данного подхода является возможность количественного определения специфической последовательности ДНК в образце после каждого цикла амплификации.



### Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
A6	Образец_1	23,8		+
B6	Образец_2	30,0		+
C6	Образец_3	35,7		+
D6	K+	30,5		+
E6	K-		37,4	-

**Рис. 6А. Качественный анализ.**  
**Результаты исследований в формате ПЦР-РВ (детектирующий амплификатор «ДТпрайм» ООО «НПО «ДНК-Технология»»)**



## Определение абсолютной концентрации

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Концентрация, копий/мл
A1	Образец_1 (HIV_RQ)	35,4	31,9	4 460
A2	Образец_1 (HIV_RQ)	36,0	32,5	3 020+
A3	Стандарт_1 (HIV_RQ)	27,5	29,2	1 000 000
A4	Стандарт_1 (HIV_RQ)	27,4	29,3	1 000 000
A5	Стандарт_1 (HIV_RQ)	27,4	29,5	1 000 000
A6	Стандарт_2 (HIV_RQ)	35,8	37,6	3 000
A7	Стандарт_2 (HIV_RQ)	36,1	38,5	3 000
A8	Стандарт_2 (HIV_RQ)	36,1	38,1	3 000
B1	K+ (HIV_RQ)	28,1		633 000
B2	K- (HIV_RQ)		30,5	

**Рис. 6Б. Количественный анализ.**

**Результаты исследований в формате ПЦР-РВ (детектирующий амплификатор «ДТпрайм» ООО «НПО «ДНК-Технология»»**

Для анализа результатов ПЦР-РВ используют специальные ДНК-амплификаторы, например, «ДТпрайм» или «ДТлайт» производства ООО «НПО ДНК-Технология», CFX (BioRad, США), iCycler iQ5 (BioRad, США), LightCycler (Roche, США), COBAS Amplicor (Roche, США), ABI PRISM (Applied Biosystems, США), StepOnePlus (Applied Biosystems,

США), RotorGene (Qiagen, GmbH Германия), Stratagene (Agilent, США), Smart Cycler и GeneXpert System (Cepheid, США) и другие, с оптическим блоком, позволяющие детектировать и измерять флуоресценцию внутри реакционной пробирки в ходе проведения реакции амплификации.

Одной из важных характеристик амплификаторов для проведения ПЦР в режиме реального времени является число каналов детекции флуоресценции и число каналов регулирования температуры. В большинстве современных амплификаторов число каналов детекции сигнала составляет 4–6, а число каналов регулирования температуры – 6. В качестве примера рассмотрим преимущества и недостатки трех широко используемых моделей амплификаторов.

Амплификатор iCycler iQ позволяет устанавливать пользователю до пяти оптических каналов, характеристики которых определяются сменными фильтрами: от 515–545 нм для канала 1 до 670–700 нм для канала 5. Главными недостатками прибора являются достаточно широкие полосы пропускания фильтров (что приводит к увеличению взаимного влияния красителей), а также специфическая система калибровок, призванная скомпенсировать ошибки оптических измерений.

Амплификатор StepOnePlus имеет четыре канала детекции, однако все они расположены в узком диапазоне длин волн – 520–610 нм, что может ограничивать использование полноценных мультиплексных систем с четырьмя красителями.

Амплификатор «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) имеет 4 канала детекции флуоресценции – в диапазоне 520–670 нм. При этом возможна установка пятого канала. А используемая комбинация длин волн обеспечивает возможность использования практически любых красителей, имеющих спектры возбуждения и поглощения в видимом диапазоне. Более современными вариантами амплификатора являются модели «DTPrime» и «DTlite».

Несмотря на достаточное развитие приборной базы для ПЦР в реальном времени, сохраняется возможность ее дальнейшего совершенствования. К таким улучшениям можно отнести:

1. увеличение числа образцов в одной постановке (достигается увеличением числа лунок до 384 или 1536 при сохранении габаритных размеров планшета);
2. сокращение времени на проведение ПЦР за счет использования новых материалов и технологий;
3. увеличение числа оптических каналов (позволяет проводить ПЦР для большего числа объектов одновременно);

4. автоматизацию процессов, использование в составе оборудования роботизированных станций, выполняющих работу по пробоподготовке, внесению образцов и компонентов реакционной смеси;
5. повышение надежности амплификатора за счет совершенствования отдельных узлов и компонентов прибора (например, замену галогеновых ламп на более долговечные светодиодные).

Большинство флуоресцирующих соединений, используемых при проведении ПЦР в реальном времени, представляют собой гетероциклические или полиароматические углеводороды. В настоящее время для визуализации результатов используется порядка нескольких десятков флуорофоров. Пригодность того или иного флуорофора для целей ПЦР зависит в первую очередь от эффективности поглощения и испускания фотонов, а также от способности к повторению циклов поглощения-испускания (числа циклов до фотообесцвечивания).

По принципу использования флуорофоры можно разделить на две группы: дуплекс-специфические интеркалирующие красители и красители для мечения олигонуклеотидов. Дуплекс-специфические интеркалирующие красители характеризуются способностью существенно изменять квантовый выход (отношение числа выпущенных фотонов к числу фотонов, поглощенных флуорофором) при связывании с двухцепочечной молекулой ДНК или РНК. К таким красителям относят бромистый этидий, SYBR Green, SYBR Gold и др. В настоящее время такие флуорофоры используют либо для неспецифичного окрашивания ДНК, либо для регистрации момента гибридизации меченного синтетического олигонуклеотида и амплифицированной ДНК. Другую группу составляют соединения, квантовый выход которых не зависит от образования комплекса с ДНК и которые удобно присоединять к синтетическим олигонуклеотидам в процессе синтеза праймеров или проб.

Необходимо также обращать внимание на ряд лабораторных моментов, способных оказать влияние на результаты ПЦР в реальном времени. Один из ключевых моментов – качественная очистка нуклеиновых кислот от примесей.

Детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из трех последовательных участков:

- 1 – базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора);
- 2 – экспоненциальная амплификация;
- 3 – плато.

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации. Мониторинг сигнала позволяет построить кинетическую кривую реакции, при этом момент заметного увеличения сигнала и отрыва его от фонового – так называемый пороговый цикл – зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

Оборудование для ПЦР-РВ открывает широкий спектр возможностей, например:

- ❖ мультиплексный качественный и количественный анализ;
- ❖ ОТ-ПЦР для измерения малых количеств мРНК, в том числе с количественной оценкой содержания искомой мРНК;
- ❖ технология плавления.

Принципы мультиплексной ПЦР и ОТ-ПЦР рассмотрены выше и широко используются в рутинной лабораторной практике. Интерес представляют диагностические возможности технологии плавления.

**Плавление** – двухэтапная технология ПЦР-РВ, когда на первом этапе осуществляется стандартная амплификация искомой мишени без детекции результатов накопления продукта амплификации, а на втором этапе происходит постепенное нагревание реакционной смеси, при котором двухцепочечный накопленный продукт денатурирует, то есть разделяется на одиночные нити ДНК. Флуоресцентная метка, связанная с двухцепочечной ДНК, при этом отделяется, и (в зависимости от вариантов реализации технологии плавления) детектируемая флуоресценция либо возрастает, либо убывает.

**Профиль плавления** – уникальная характеристика, которая определяется для каждой нуклеотидной последовательности содержанием ГЦ-пар. При правильной организации протокола анализ кривых плавления является очень чувствительным методом, позволяя обнаруживать замены одного нуклеотида в идентичных последовательностях, поэтому данная технология наиболее часто используется для генотипирования и идентификации SNP (однонуклеотидный полиморфизм, англ. *Single nucleotide polymorphism* – отличие последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом).

Наиболее распространенными вариантами технологии плавления являются: HRM и метод прилегающих проб.



**Технология анализа кривых плавления с высоким разрешением HRM** (англ. *High Resolution Melting*) базируется на гетеродуплексном анализе с использованием интеркалирующего красителя.

Первый этап – стандартная ПЦР, приводящая к накоплению ампликонов, которые содержат исходную (условно «нормальную») и измененную (SNP) последовательности нуклеотидов. Поскольку в реакционной смеси содержится интеркалирующий краситель типа SYBR Green (или иной), на этапе элонгации он встраивается в двойную цепь и флуоресцирует, на этапе денатурации краситель высвобождается в реакционную смесь и флуоресценция прекращается. Тем не менее, наличие или отсутствие флуоресценции на данном этапе не детектируется.

На втором этапе температуру реакционной смеси снижают до 25°C – условие, при котором одноцепочечные ампликоны в произвольном порядке (с низкой специфичностью с точки зрения принципа комплементарности) связываются между собой – формируются дуплексы. При этом в реакционной смеси присутствуют два типа дуплексов:

- ❖ высокоспецифичные (полностью комплементарные) гомодуплексы (условно: «нормальный» ампликон + «нормальный» ампликон, SNP-ампликон + SNP-ампликон);
- ❖ низкоспецифичные (частично комплементарные) гетеродуплексы (условно: «нормальный» ампликон + SNP-ампликон).

При этом происходит встраивание интеркалирующего красителя между цепями дуплекса и он начинает флуоресцировать. На этом этапе температуру реакционной смеси начинают постепенно повышать и фиксировать флуоресцентный сигнал. Плавление (расхождение цепей дуплекса) сопровождается высвобождением в реакционную смесь интеркалирующего красителя и, как следствие, убыванием флуоресценции. Принципиальной является разница температур плавления каждого вида гомо- и гетеродуплексов, что позволяет их идентифицировать по сочетанию конкретной температуры с уровнем флуоресценции.

Особенностью и плюсом HRM-анализа является чрезвычайно малый шаг увеличения температуры на втором этапе: не более 0,1–0,3°C, что позволяет не только идентифицировать уже известные SNP, но и обнаруживать новые однонуклеотидные замены. Однако такой малый шаг является одновременно и минусом, поскольку не остается возможности для визуальной интерпретации результатов. Кривые плавления для разных генотипов почти не отличаются, и эти минимальные различия необходимо обрабатывать математическими методами, что потенциально увеличивает

ошибку в интерпретации результатов, особенно в случае гетерозигот. В рутинной диагностической практике более надежным является использование другого варианта технологии плавления – *метода примыкающих проб*.

Первый этап метода примыкающих проб аналогичен технологии HRM – стандартная ПЦР, приводящая к накоплению ампликонов, которые содержат исходную (условно «нормальную») и измененную (содержащую SNP) последовательности нуклеотидов. Принципиальным отличием от технологии HRM является то, что в реакционную смесь вводят не интеркалирующий краситель, а зонды, меченные флуорофорами.

Для повышения качества и специфичности SNP-генотипирования используют два типа зондов (реализовано компанией «ДНК-Технология»): сиквентс-специфичные типизирующие зонды (нуклеотидная последовательность зонда строго специфична участку искомой матрицы в зоне предполагаемого полиморфизма) и универсальный тугоплавкий зонд с гасителем флуоресценции (нуклеотидная последовательность этого зонда комплементарна участку матрицы вне зоны предполагаемого полиморфизма, но в непосредственной близости от нее). Важной особенностью является и то, что для идентификации конкретного SNP используется пара зондов, меченных разными флуорофорами, то есть становится возможной «двойная проверка» результата гибридизации «зонд – мишень».

Так же, как и в технологии HRM, наличие или отсутствие флуоресценции на первом этапе не детектируется.

На втором этапе температуру реакционной смеси снижают до 25°C – условие, при котором одноцепочечные ампликоны в произвольном порядке (с низкой специфичностью с точки зрения принципа комплементарности) связываются с зондами – формируются дуплексы. При этом в состав каждого дуплекса входит универсальный тугоплавкий зонд, который блокирует флуоресценцию типизирующих зондов. В реакционной смеси присутствует два типа дуплексов:

- ❖ высокоспецифичные (полностью комплементарные) гомодуплексы (условно: «нормальный» ампликон + «нормальный» типизирующий зонд, SNP-ампликон + SNP-типизирующий зонд);
- ❖ низкоспецифичные (частично комплементарные) гетеродуплексы (условно: «нормальный» ампликон + SNP-типизирующий зонд или SNP-ампликон + «нормальный» типизирующий зонд).

На этом этапе температуру реакционной смеси начинают постепенно повышать и фиксировать флуоресцентный сигнал. Плавление (расхождение цепей дуплекса) сопровождается высвобождением в реакционную смесь не

интеркалирующего красителя, как в технологии HRM, а универсального зонда с гасителем флуоресценции и, как следствие, нарастанием флуоресцентного сигнала. Так же, как и в технологии HRM, температуры плавления каждого вида гомо- и гетеродуплексов отличаются, что позволяет их идентифицировать по сочетанию конкретной температуры с уровнем флуоресценции.

Плюсом данной технологии по сравнению с HRM-анализом является определение аллельных вариантов гена в диапазоне температур не менее 4–5°C – максимальная стабильность и воспроизводимость результатов, не имеет технологических аналогов. Кривые плавления для разных генотипов существенно отличаются по температурам и могут быть оценены как программно, так и визуально, что принципиально важно для идентификации гетерозигот (рис. 7). Минус технологии плавления по методу примыкающих проб – невозможность выявления новых (ранее неизвестных) SNP.

С точки зрения вариантов идентификации SNP достаточно распространена *аллель-специфическая ПЦР*, которая строится на использовании аллель-специфических праймеров. Для реализации технологии могут быть использованы два варианта универсальных праймеров. Первый вариант: праймер должен быть строго комплементарен по своему 3'-концевому нуклеотиду соответствующему нуклеотиду матричной ДНК. В противном случае эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается и при определенных сочетаниях ошибочно спаренных нуклеотидов может отсутствовать вообще. Второй вариант: универсальный праймер содержит 3'-концевой нуклеотид, всегда некомплементарный матрице, а мутантный нуклеотид матрицы попадает в его внутреннюю часть. В этом случае продукты ПЦР отсутствуют, если в гибриде во внутреннюю часть праймера попадает любой некомплементарный мутантный нуклеотид матричной ДНК вне зависимости от его точной локализации. Такие праймеры позволяют обнаруживать любые точечные мутации в гомозиготном состоянии.

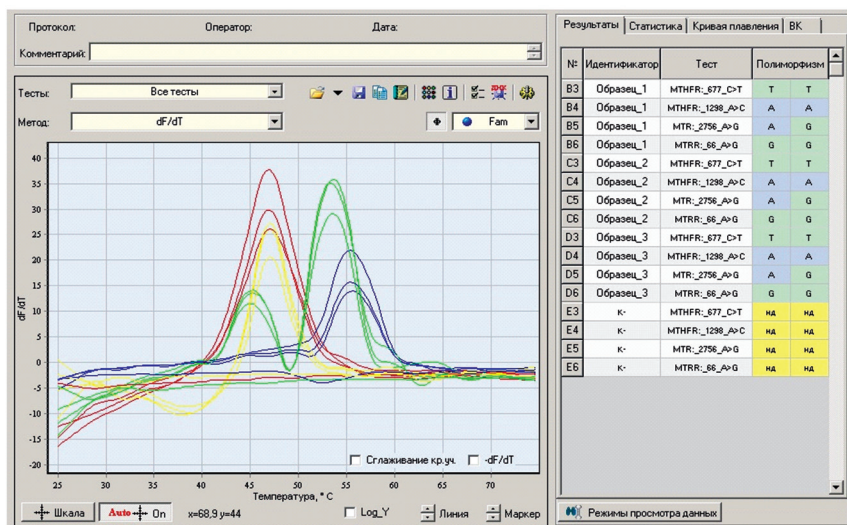
Для выявления гетерозиготного состояния анализируемого гена могут быть использованы «мутантный» и «нормальный» праймеры разных размеров, которые различаются по длине их 5'-концевых последовательностей, полностью комплементарных анализируемой ДНК. В этом случае в процессе ПЦР в реакционную смесь можно одновременно добавлять оба аллель-специфических праймера вместе с общим для обоих встречным праймером.

Идентификация SNP происходит по сравнению  $C_p$  (метод прямого сравнения кривых разгорания флуоресценции) между «нормой» и «мутацией».

Минусом данной технологии в большинстве коммерческих тестов является необходимость использования двух пробирок для выявления единственного SNP, что делает систему уязвимой и зависимой от:

- ❖ наличия/отсутствия ингибиторов (в одной пробирке может быть, в другой – нет);
- ❖ необходимости полной синхронности старта ПЦР в обеих пробирках;
- ❖ равномерности внесения реагентов и ДНК в обе пробирки.

В совокупности метод ПЦР-РВ обладает широким спектром вариантов реализации и точек приложения в научной и клинической практике. Существенным плюсом технологии является возможность частичной или полной автоматизации процесса, что позволяет стандартизовать условия работы, повысить качество получаемых результатов и увеличить пропускную способность лаборатории.



### Идентификатор образца: Образец\_1

№	Наименование исследования	Результаты	
		Генотип	
1	MTHFR:_77_C>T	T	T
2	MTHFR:_1298_A>C	A	A
3	MTR:_2756_A>G	A	G
4	MTRR:_66_A>G	G	G

**Рис. 7. Анализ кривых плавления (метода примыкающих проб) в формате ПЦР-РВ (детектирующий амплификатор «ДТпрайм» ООО «НПО «ДНК-Технология»», набор реагентов «Генетика метаболизма фолатов»)**

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ:

1. Какой способ детекции основан на разделении фрагментов ДНК по размеру под действием электрического тока?
2. Какая разница между электрофорезом в полиакриламидном и агарозном геле?
3. Благодаря какому открытию стало возможно проведение ПЦР для наработки большого количества копий нуклеиновых кислот?
4. Что такое праймеры?
5. От каких факторов зависит специфичность ПЦР?
6. Назовите этапы ПЦР.
7. Какие преимущества у метода ПЦР со способом детекции в реальном времени?
8. Назовите компоненты (состав) реакционной смеси для проведения ПЦР.
9. Ионы какого металла необходимы для функционирования ДНК-полимеразы?
10. Какие факторы влияют на эффективность проведения ПЦР?
11. Для чего нужен положительный и отрицательный контроль при проведении реакции ПЦР?
12. Для каких целей используют внутренний контроль?
13. В каких случаях используется ПЦР с «горячим» стартом?
14. Назовите наиболее распространенные варианты технологии ПЦР.
15. Назовите основное преимущество мультиплексной ПЦР.
16. На чем основаны флуоресцентные методы детекции сигнала?
17. Какой принцип функционирования интеркалирующих красителей? Приведите пример красителя.
18. Опишите принцип работы гибридационных зондов и преимущества их использования.
19. Кратко опишите принцип функционирования зондов TaqMan.
20. Сколько каналов детекции сигнала имеют амплификаторы для детекции сигнала в режиме реального времени?

## ГЛАВА 2. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТОВ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

### 2.1. ПРЕНАТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ПЛОДА

#### 2.1.1. Показания к неинвазивному определению пола плода

В случае наличия в семье сцепленных с полом заболеваний выяснение пола плода в первом/начале второго триместра может быть важным. В этом случае возможно проведение инвазивной пренатальной диагностики и прерывания беременности по медицинским показаниям при носительстве мутаций в генах, сцепленных с полом (например, гемофилии или прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера), у плода мужского пола.

Также врачу важно знать пол плода для принятия решения о возможности гормональной терапии беременной в случае наличия у пациентки гиперандрогении надпочечникового генеза (врожденная дисплазия коры надпочечников, ВДКН) или других маскулинизирующих эндокринных заболеваний.

Основным методом пренатального установления пола будущего ребенка сегодня является ультразвуковая диагностика, однако на ранних сроках беременности этот метод не имеет необходимой точности, а инвазивные методы имеют небольшой (0,5–1%, по последним данным), но риск прерывания беременности. Поэтому было необходимо наличие метода, по которому с высокой достоверностью можно было бы устанавливать пол плода и уже по этим результатам принимать решения об инвазивной пренатальной диагностике или о лечении.

Открытие Д. Ло наличия внеклеточной ДНК, а именно: фрагмента Y-хромосомы плода мужского пола у беременных женщин, послужило началом развития неинвазивных пренатальных тестов. А само неинвазивное определение пола плода по фрагменту Y-хромосомы в крови беременной женщины методом ПЦР в реальном времени является одним из самых распространенных применений неинвазивных пренатальных тестов.

Показания к проведению исследования:

- ❖ маскулинизирующие эндокринные заболевания, в том числе врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), для коррекции проведения лекарственной терапии;
- ❖ при носительстве женщинами генов гемофилии и других заболеваний, сцепленных с полом (умственная отсталость, связанная

с X-хромосомой; миодистрофия; адренолейкодистрофия; синдром Альпорта; иммунодефицит, связанный с X-хромосомой; пигментный ретинит; гидроцефалия, связанная с X-хромосомой; синдром Лоу; X-связанный ихтиоз);

- ❖ предполагаемые нарушения детерминации пола плода по результатам УЗИ.

В данном случае имеется возможность, начиная с 8 недель беременности, получить информацию о поле плода для решения вопроса о дальнейшей тактике ведения беременности.

Между тем имеется и опасность немедицинского применения данного метода, например, селекции по полу. В соответствии с этическими принципами, использование пренатальной диагностики для селекции по полу вне ситуаций риска сцепленных с полом заболеваний неприемлемо (не причинение вреда). В странах Европы ПАСЕ (Парламентская Ассамблея Совета Европы) была принята Резолюция 1829 (2011 года): «Выбор пола ребенка до его рождения». В документе прописаны следующие рекомендации:

- ❖ рекомендовать всем профильными органам государственной власти выпустить рекомендации для всего медицинского персонала, работающего в этой области, чтобы в тех случаях, когда в соответствии с действующими правовыми нормами предоставляется информация о поле плода, такая информация преподносилась в положительном ключе вне зависимости от пола плода;
- ❖ принять законодательство, направленное на запрещение практики дородового выбора пола ребенка при применении вспомогательных репродуктивных технологий за исключением случаев предотвращения передачи тяжелых наследственных заболеваний.

В Российской Федерации действует Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ (ред. от 29.12.2017) «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», статья 55, пункт 4: «При использовании вспомогательных репродуктивных технологий выбор пола будущего ребенка не допускается, за исключением случаев возможности наследования заболеваний, связанных с полом». В случае неинвазивного определения пола плода не используются вспомогательные репродуктивные технологии. Таким образом, Федеральный закон № 323-ФЗ запрещает определение пола только на предимплантационной стадии, не запрещая, тем не менее, прерывание беременности по желанию женщины на сроке до 12 недель (статья 56 «Искусственное прерывание беременности»).



Несмотря на отсутствие законодательного запрета определения пола плода в срок до 12 недель беременности без клинических показаний, рекомендуется при отсутствии клинических показаний для такого рода исследований избегать его проведения из-за опасений, что единственной целью такого тестирования является идентификация биологического пола плода.

### **2.1.2. Выявление фрагмента Y хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени**

Набор реагентов для выявления фрагмента Y-хромосомы плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени «Пол плода» предназначен для обнаружения мультикопийного фрагмента Y-хромосомы плода в крови беременной женщины методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

**Метод:** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный мультиплексный анализ.

#### **Принцип метода.**

В основе работы наборов реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров, комплементарных специфическому участку ДНК, и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров *Taq*-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

**Набор реагентов «Пол плода» включает:** смесь для амплификации, специфичную для определения наличия мультикопийного фрагмента Y-хромосомы и геномной ДНК человека (контроль взятия материала). Контроль взятия материала используется для анализа качества выделения и позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для исследования. Расчет результатов исследования основан на оценке значений *Sr* индикаторных циклов исследуемых мишеней.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несет флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию



уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации мультикопийного фрагмента Y-хромосомы, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации контроля взятия материала, входит флуоресцентный краситель Hex. Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

**Исследование с использованием набора реагентов состоит из следующих этапов:** выделение ДНК (пробоподготовка) с обязательным использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ и ПЦР-амплификация в режиме реального времени с использованием набора реагентов «Пол плода» (общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия) согласно инструкции производителя. Для анализа результатов исследования, полученных с помощью набора реагентов «Пол плода» компанией «ДНК-Технология», разработано специализированное программное обеспечение.

## 2.2. ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ ПЛОДА И НОВОРОЖДЕННОГО

**Гемолитическая болезнь плода и новорожденного (МКБ-10: P55)** — изоиммунная гемолитическая анемия, возникающая из-за несовместимости крови матери и плода по эритроцитарным антигенам, при этом антигены локализуются на эритроцитах плода, а антитела на них вырабатываются в организме матери.

Развитие гемолитической болезни плода и новорожденного возможно в случае, если мать антиген-отрицательна, а плод антиген-положителен. Причем из-за исходной персистенции анти-А и/или анти-В у женщины в случае групповой несовместимости конфликт может возникнуть уже при первой беременности, реализация гемолитической болезни плода и новорожденного по резус-фактору, как правило, происходит при повторных беременностях. Возможно развитие гемолитической болезни по редким факторам крови. Однако тяжелая анемия плода и новорожденного обычно развивается именно в случае конфликта, обусловленного резус-несовместимостью.

В данном случае фактором риска являются как предшествующие беременности и аборт резус-положительного плода без введения антирезус-иммуноглобулина, так и травмы органов брюшной полости, проведение инвазивной пренатальной диагностики во время настоящей беременности. В случае, если первая беременность была резус-положительным плодом, и в отсутствие введения антирезусного иммуноглобулина организм женщины вероятней всего сенсibilизирован и возможен риск гемолитической болезни плода. Но даже и без подобного анамнеза полностью исключить развитие резус-конфликта в паре с резус-отрицательной женщиной и резус-положительным мужчиной нельзя.

Согласно данным Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации и Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава Российской Федерации, гемолитическая болезнь плода и новорожденного, водянка плода, обусловленная гемолитической болезнью, ядерная желтуха в 2016 году диагностировалась у *10,1 новорожденного на тысячу родившихся живыми*, при этом показатели перинатальной смертности остаются высокими – *0,03 на тысячу*, частота развития резус-изоиммунизации также за последние годы не получила существенной тенденции к снижению.

Для снижения перинатальной заболеваемости и смертности необходима организация профилактических мер на уровне национальной системы здравоохранения. Например, за 20 лет профилактики в Великобритании частота резус-изоиммунизации снизилась почти в 30 раз, до 1,6 случая на 100 000 родов.

### **2.2.1. Показания к пренатальному исследованию резус-фактора плода**

**Резус-конфликт** – это образование антирезусных антител у резус-отрицательной матери на эритроцитарные антигены резус-положительного плода. Эти антитела могут вызвать гемолиз (разрушение) эритроцитов плода, что в наиболее тяжелых случаях может привести к водянке (генерализованному отеку) плода, отечному синдрому у новорожденного и к смерти плода или новорожденного.

Исходя из того, что около 14% населения Европы имеют отрицательный резус-фактор, практически при каждой десятой беременности мать является резус-отрицательной, а плод – резус-положительным, что потенциально может привести к резус-конфликту.

При планировании беременности всем женщинам определяют резус-фактор. Если у женщины определяется отрицательный резус-фактор, а у мужчины – положительный резус-фактор, то имеется высокая вероятность наличия у ребенка положительного резус-фактора.

Следует отличать определение резус-фактора с помощью серологического метода

- ❖ Серологический метод – исследуется наличие D-антигена на эритроцитах крови.
- ❖ Метод ПЦР – наличие гена *RHD*.

У 1% серологически резус-отрицательных лиц определяется наличие гена *RHD*. Это происходит в следующих случаях:

- ❖ ген *RHD* присутствует, и генотипически резус-фактор будет положительным, но в результате мутаций D-антиген не синтезируется и серологическим методом определяется отрицательный резус-фактор;
- ❖ ген *RHD* присутствует полностью или частично, и генотипически резус-фактор будет положительным, но в результате мутаций синтезируется измененный D-антиген, что серологически определяется как нестабильно отрицательный (или слабopоложительный) резус-фактор.

В случае если резус-фактор беременной женщины генотипически положительный (присутствует ген *RHD*), то резус-фактор плода определить методом ПЦР невозможно. Для таких пациенток наблюдение за течением беременности необходимо проводить по схеме ведения резус-отрицательных пациенток с возможностью развития резус-конфликта.

Отрицательный резус-фактор генетически наследуется как аутосомно-рецессивное состояние, то есть если у мужчины серологически определяется положительный резус-фактор, то он может быть как гомо-, так и гетерозиготой. Если отец – гомозигота с обеими полноценными копиями гена *RHD*, то 100% детей в такой семье будут резус-положительными, а если гетерозигота – то 50%.

В случае гетерозиготного генотипа отца по резус-фактору (*RHD*+/*RHD*-) семьям, пережившим гибель плодов или новорожденных от гемолитической болезни плода, возможно проведение преимплантационной генетической диагностики (ПГД) в программе ЭКО с переносом эмбрионов с гомозиготным резус-отрицательным генотипом. Если же отец гомозиготен по гену *RHD*, то в такой ситуации возможно проводить только профилактику резус-конфликта.

Разработка тест-системы на ген *RHD* – довольно трудная задача. Дело в том, что система группы крови резус кодируется двумя генами: *RHD* (антиген D) и *RHCE* (антигены C, c, E и e), имеющими высокую степень гомологии. Поэтому в тест-системах используется не только ПЦР или секвенирование гена *RHD*, но и метод MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*, мультиплексная лигазозависимая амплификация зондов).

Определение генотипа отца может быть важно, если планируется ЭКО с ПГД, в остальных случаях в парах с резус-отрицательной женщиной и резус-положительным мужчиной рекомендуется проводить профилактику резус-конфликта.

Выделяют неспецифическую и специфическую профилактику резус-конфликта.

К неспецифической профилактике относят предотвращение абортов у женщин с резус-отрицательной кровью, переливание крови только с учетом резус-принадлежности.

Специфическую профилактику проводят резус-отрицательным женщинам антирезус-иммуноглобулином по схеме, описанной в клинических рекомендациях «Резус-сенсibilизация. Гемолитическая болезнь плода», утвержденных Российским обществом акушеров-гинекологов 14 апреля 2017 г.

Лечение, в случае развившегося резус-конфликта, может включать внутриутробное переливание крови плоду через пуповину (кордоцентез), благодаря которому можно скомпенсировать явления анемии, однако сам по себе кордоцентез является опасной для плода процедурой. В любом случае, ведение беременности, угрожаемой по резус-конфликту, требует особого внимания от врача и серьезных финансовых затрат. Поэтому на первое место выходит важность определения точного статуса плода по резус-фактору.

Определение генотипа плода по резус-фактору ранее могло быть достигнуто только с помощью инвазивных процедур, однако эти методы несут не только риск потери беременности, но и дополнительный риск материнской сенсibilизации к RhD из-за смешения крови плода и материнской крови.

Успехи в развитии молекулярно-генетических технологий в настоящее время сделали возможным неинвазивное определение резус-генотипа плода уже в конце первого триместра беременности путем пренатального тестирования свободной ДНК плода в образцах крови матери.

Наиболее современные технологии определения гена *RHD* методом ПЦР основаны на количественном определении материнской и фетальной ДНК,

что позволяет исключать ошибочные результаты, чувствительность и специфичность в данном случае достигает 98–100%.

Возможность неинвазивного определения Rh-генотипа плода у резус-отрицательных беременных женщин позволяет снизить затраты на ведение беременности, избежать многократного скринингового определения резус-антител и обеспечить профилактическое применение антирезусной иммунопрофилактики только при резус-положительном генотипе плода.

**Важно!** При отсутствии возможности определения резус-генотипа плода беременность при резус-отрицательной матери и резус-положительном отце должна быть проведена как беременность резус-положительным плодом.

Определение резус-фактора методом ПЦР в режиме реального времени заключается в определении гена *RHD*, кодирующего D-антиген. Традиционный серологический метод основан на выявлении непосредственно D-антигена на эритроцитах крови.

Чаще всего отрицательный резус-фактор обусловлен полным отсутствием гена *RHD*. В этом случае резус-фактор определяется как отрицательный серологическим методом и методом ПЦР, то есть результаты исследований совпадают.

Набор реагентов для выявления гена *RHD* плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени может использоваться в рамках пренатального скрининга осложненных течения беременностей у резус-отрицательных женщин. Важно, что данный способ исследования ДНК плода (фетальной ДНК, фетДНК) в крови матери относится к неинвазивным процедурам, не несет угрозы течению беременности и не вызывает осложнений.

Апoptотическая фетДНК обнаруживается в материнской плазме в небольшом количестве, которое возрастает с увеличением срока гестации, зависит от состояния плаценты и особенностей течения беременности. Исследования фетДНК возможно проводить, начиная со срока 8–10 недель. Точность результата составляет 96–100% и зависит от количества ДНК плода, обнаруживаемой в материнской плазме. Данная величина обусловлена состоянием плаценты и возрастает с увеличением срока беременности.

При отсутствии в крови беременной женщины антирезусных антител на сроке 20 недель рекомендуется исследование фетДНК для оценки необходимости введения иммуноглобулина.

Обнаружение гена *RHD* у плода говорит о его генотипически положительном резус-факторе. Иммунная система серологически резус-отрица-

тельных женщин при беременности резус-положительным плодом синтезирует анти-D антитела, что может приводить к развитию резус-конфликта и гемолитической болезни плода.

При ведении беременности у резус-отрицательной пациентки необходимо определение гена *RHD* плода для своевременного расчета риска развития резус-конфликта и проведения профилактических мероприятий.

### **2.2.2. Выявление гена *RHD* плода в крови матери методом ПЦР в режиме реального времени**

**Метод:** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени.

#### **Принцип действия метода**

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки. В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несет флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

**Исследование состоит из следующих этапов:** выделение ДНК (пробоподготовка) с использованием комплекта реагентов «ПРОБА-НК-ФЕТ» производства ООО «ДНК-Технология ТС» и ПЦР-амплификация в режиме реального времени с использованием набора реагентов «Резус-фактор плода» производства ООО «ДНК-Технология ТС», все этапы осуществляются согласно инструкции производителя.

**Набор реагентов «Резус-фактор плода» включает:** смесь для амплификации для определения наличия двух экзонов гена *RHD* (7 и 10) и геномной ДНК человека (контроль взятия материала). Контроль взятия материала используется для анализа качества выделения и позволяет определить, достаточно ли полученного количества ДНК для исследования. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции 7 и 10 экзонов гена *RHD*, включены флуоресцентные метки Fam и Rox соответственно. В состав ДНК-зондов, используемых для определения контроля взятия материала, входит флуоресцентный краситель Hex.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ:

1. Какие клинические показания для пренатального определения пола плода?
2. Какие этические проблемы возможны в случае раннего пренатального определения пола плода?
3. Что такое гемолитическая болезнь плода и новорожденного?
4. В каких случаях возможно развитие резус-конфликта?
5. Какие существуют виды профилактики резус-конфликта?
6. Какие существуют способы определения резус-фактора?
7. В каких случаях у серологически резус-отрицательной женщины исследование наличия гена *RHD* плода будет неинформативно?
8. Назовите наиболее частую причину отрицательного резус-фактора.
9. Начиная с какого срока беременности информативно исследование фетальной ДНК?
10. На каком сроке беременности будете рекомендовать пациентке исследование фетальной ДНК для определения необходимости введения иммуноглобулина при отсутствии в крови антирезусных антител и почему?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учебное пособие «Неинвазивное определение пола и резус-фактора плода методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» посвящено одному из важнейших современных лабораторных методов, а именно: методу полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени и возможности его применения в революционном методе исследования генотипа плода по крови беременной женщины. Обнаружение фрагментов внеклеточной ДНК плода в плазме крови беременных женщин в 1997 году явилось началом новой эры – развития неинвазивных пренатальных тестов.

В настоящее время малоинвазивные или неинвазивные методы определения хромосомных или генетических патологий, определения пола плода и резус-фактора играют все большую роль в клинической практике.

В учебном пособии подробно рассматриваются как теоретические, так и практические аспекты использования метода ПЦР в реальном времени, перечислены основные модификации этого метода, особенности метода полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.

Важной особенностью этого метода является возможность его применения для неинвазивного исследования резус-фактора по наличию гена *RHD* плода и определения пола по наличию фрагментов Y-хромосомы.

В пособии обсуждается важность и простота неинвазивного определения пола и резус-фактора плода с помощью ПЦР в режиме «реального времени».

Особый упор в пособии сделан на эффективность и многообразие метода ПЦР, а также на возможность его применения в клинической практике. Более подробную информацию по вариантам методов ПЦР, а также по клиническим аспектам его применения и ситуациям, описанным в пособии, можно найти в специальных публикациях, которые указаны в списке литературы.



# ТЕСТОВЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

**ИНСТРУКЦИЯ: Выберите один правильный ответ**

**1. Электрофорез является методом:**

- А.** Определения нуклеотидов в последовательности ДНК
- Б.** Разделения фрагментов ДНК по размеру под действием электрического тока
- В.** Определения количества вирусных частиц
- Г.** Определения активности ферментов
- Д.** Исследования кариотипа

**2. Для электрофореза используется:**

- А.** Клонированный фрагмент ДНК
- Б.** Акриламидный или агарозный гель
- В.** Термостойкая полимераз
- Г.** Ферменты рестрикции
- Д.** Векторная последовательность

**3. ПЦР применяется в медицине для:**

- А.** Определения концентрации белков в сыворотке
- Б.** Исследования хромосом
- В.** Определения мозаичного хромосомного клона
- Г.** Определения скорости оседания эритроцитов
- Д.** Определения мутаций в ДНК

**4. ПЦР стала возможной благодаря открытию:**

- А.** РНК-полимеразы
- Б.** ДНК-полимеразы
- В.** Термостабильной ДНК-полимеразы
- Г.** Теломеразы
- Д.** Рестриктазы EcoRI

**5. Праймеры — это:**

- А.** Меченные фрагменты ДНК, определенной локализации на хромосоме
- Б.** Фрагменты ДНК длиной 500–1000 нуклеотидов
- В.** Короткие 20–25 нуклеотидов, специфические фрагменты ДНК
- Г.** Фрагменты ДНК, встроенные в векторную систему для размножения
- Д.** Короткие полипептиды произвольного состава

- 6. Неспецифическая профилактика резус-конфликта — это:**
- А.** Введение антирезус-иммуноглобулина
  - Б.** Сохранение первой и последующих беременностей у женщины с отрицательным резус-фактором
  - В.** Выбор партнера с отрицательным резус-фактором
  - Г.** Определение резус-фактора плода инвазивным методом
  - Д.** Определение резус-фактора плода неинвазивным методом
- 7. В чем заключается главная особенность метода ПЦР в реальном времени?**
- А.** Определение количества ПЦР-продукта в конце реакции амплификации
  - Б.** Детекция ПЦР-продукта по мере его накопления
  - В.** Определяется конструкцией используемого оборудования
  - Г.** Определяется использованием специфических зондов
- 8. Влияет ли состав нуклеотидной последовательности на профиль плавления?**
- А.** Не влияет
  - Б.** Влияет
  - В.** Влияет для последовательностей с повышенным содержанием АГ-, АТ-, ГЦ- или ГТ-пар

**ИНСТРУКЦИЯ: В заданиях 9 и 10 выберите правильный ответ следующим образом**

- А** — Если правильными являются варианты ответов 1, 2, 3
- Б** — Если правильными являются варианты ответов 1 и 3
- В** — Если правильными являются варианты ответов 2 и 4
- Г** — Если правильным является вариант ответа 4
- Д** — Если правильными являются варианты ответов 1, 2, 3, 4

**9. В процессе ПЦР выделяют стадии:**

- 1.** Денатурация ДНК
- 2.** Отжиг праймеров
- 3.** Элонгация цепи
- 4.** Гибридизация

## 10. Специфичность ПЦР зависит от:

1. Концентрации ионов магния
2. Температуры отжига праймеров
3. Специфичности праймеров
4. Времени элонгации

## ОТВЕТЫ К ТЕСТОВЫМ ВОПРОСАМ И ЗАДАНИЯМ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Б	Б	Д	В	В	Б	Б	Б	А	А

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### ОСНОВНАЯ:

1. Амплификатор детектирующий ДТпрайм. Руководство по эксплуатации. ООО «НПО ДНК-Технология». Протвино. 2016.
2. Избранные клинические рекомендации по неонатологии. Под ред. Е. Н. Байбариной, Д. Н. Дегтярева. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2016. – 237 с.
3. ПЦР в реальном времени. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. и др. Под общей редакцией Д. В. Ребрикова. 2009. Бином. Москва.
4. Резус-сенсбилизация. Гемолитическая болезнь плода. Клинические рекомендации (протокол). Москва, 2017. Савельева Г. М., Адамян Л. В., Курцер М. А., Сичинава Л. Г., с соавт. – 16 с.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ:

5. Ресурс для специалистов в области молекулярной биологии и клинической диагностики: <http://www.dna-technology.ru/information/>
6. National Institute for Health and Care Excellence. High-throughput non-invasive prenatal testing for fetal RHD genotype 1: Recommendations. <https://www.nice.org.uk/guidance/dg25/chapter/1-Recommendations> (Accessed on August 09, 2017).
7. Real-time PCR. Edited by M.Tevfik Dorak. 2006. Published by Taylor & Francis Group.
8. Roberto Biassoni and Alessandro Raso (eds.), Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1160, DOI 10.1007/978-1-4939-0733-5\_16, Humana Press, 2014.

**БАРАНОВА Елена Евгеньевна  
ГНЕТЕЦКАЯ Валентина Анатольевна  
БЕЛЕНИКИН Максим Сергеевич**

**НЕИНВАЗИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА  
И РЕЗУС-ФАКТОРА ПЛОДА  
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Учебное пособие

Редактор.....

Подписано в печать ... Формат 60x90 1/16

Печать ... Бумага ...

Усл. печ. л...

Тираж ... экз.

Заказ № ...

Российская медицинская академия  
непрерывного профессионального образования  
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России  
Ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, Москва, 123995  
Электронный адрес [www.rmapo.ru](http://www.rmapo.ru)  
E-mail: [rmapo@rmapo.ru](mailto:rmapo@rmapo.ru)

