



ПЕРСПЕКТИВНАЯ МЕТОДИКА БЫСТРОЙ ПЦР

П.Горелов, к.б.н., П.Ляхов / info@awt.ru, marketing@awt.ru

В связи с расширением сферы применения полимерезной цепной реакции (ПЦР) требования к ее скорости, эффективности и качеству постоянно возрастают. Со времени разработки в 1985 году [1] метод ПЦР стал ключевым в биологических исследованиях и повседневной диагностике. Приведенная в статье методика быстрой ПЦР имеет существенные преимущества перед аналогами и отвечает требованиям современной медицины.

Специалисты отмечают, что для нагрева и охлаждения блоков прибора используются различные методы, в частности, лампы, резистивные нагреватели, водяное охлаждение. Вместе с тем предпочтение отдается элементам Пельтье, поскольку их применение позволяет создать надежный и компактный прибор [2, 3, 6, 7]. Недостаток существующих приборов – малая скорость нагрева и охлаждения (1–2°С/с) достаточно крупных образцов (200–300 мкм) вследствие использования металлических блоков большого объема и относительно толстых стенок пластиковых лунок. В связи с этим на цикл затрачивается 3–8 мин, а общая продолжительность стандартного эксперимента ПЦР составляет 1,5–3 ч.

Предложенная методика позволяет существенно ускорить проведение ПЦР-исследований без снижения их качества. Быстрая ПЦР применима для широкого круга исследований, связанных с живыми организмами (медицинская, ветеринарная и генодиагностика, биотехнологии, криминалистика, установление отцовства, мутагенез, персонализированная медицина, выявление различных микроорганизмов, типирование, контроль качества сельскохозяйственной продукции, выявление нарушений в работе организма и предрасположенности к ряду заболеваний). На рис.1 представлен прибор qTOWER, в котором по схеме, приведенной на рис.2, реализуется методика быстрой ПЦР.

МЕТОДИКА БЫСТРОЙ ПЦР

Поскольку контроль температурных циклов – одна из главных функций ПЦР, были проведены эксперименты с коммерчески доступными системами. Это позволило создать термин "быстрая ПЦР", так

как 30 циклов амплификации удалось осуществить менее, чем за 30 мин [4, 5].

Преимуществом быстрой ПЦР, помимо сокращения затрачиваемого на исследование времени, является улучшение ее качества. В самом деле, благодаря высокой скорости охлаждения и малому времени отжига праймеры с матрицей связываются точнее, что в свою очередь обеспечивает более высокую специфичность продуктов амплификации.

Быстрые алгоритмы управления активируют элементы Пельтье, которые практически мгновенно регулируют температуру блока. Передача энергии в реакционную смесь благодаря тонким стенкам лунок происходит быстро. В результате при быстрой ПЦР обеспечивается большая тепловая эффективность. Скорость нагрева и охлаждения достигает более 12°С/с, что позволяет провести цикл



Рис.1. Амплификатор qTOWER для быстрой ПЦР

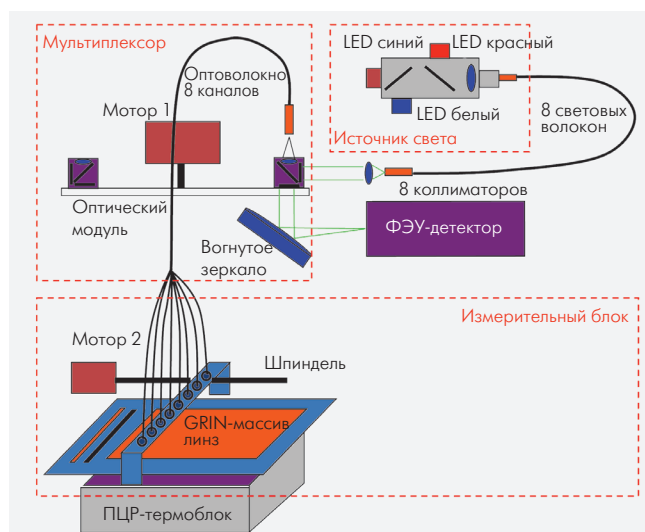


Рис.2. Принципиальная схема амплификатора qTOWER: LED – светодиоды; ФЭУ – фотоэлектронный умножитель; коллиматоры для получения параллельных пучков лучей света или частиц

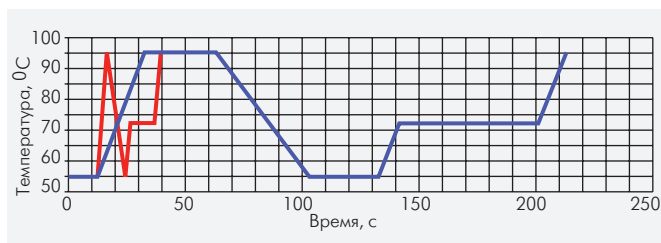


Рис.3. Продолжительность быстрой ПЦР (красная линия) и стандартной ПЦР (синяя линия)

за 20 с, а реализовать протоколы ПЦР с 30 циклами за 8-15 мин [4, 5, 7].

Малая продолжительность зависит от высокой скорости изменения температуры амплификатора и очень короткого времени удержания трех температурных фаз ПЦР (денатурации, отжига, элонгации – этапа биосинтеза молекул нуклеиновых кислот) (рис.3). В обычных амплификаторах большая часть времени уходит на изменение температуры металлического блока и пластиковых стенок форм, в которых находятся образцы. Продолжительность же температурных циклов в быстрой ПЦР почти полностью связана с химическими (денатурация цепочек ДНК) или биохимическими (синтез ДНК) процессами [7].

ВЫСОКАЯ СКОРОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Практическая полезность амплификатора определяется рабочими параметрами (скоростями

нагрева и охлаждения, т.е. тепловой эффективностью). Однако более важны характеристики молекулярно-биологических экспериментов (продолжительность протоколов ПЦР, выход и качество продуктов). В частности, в медицинской диагностике и в криминалистике от скорости ПЦР зависит продолжительность серии анализов. В предложенном методе реализована возможность проведения ПЦР с высокими скоростью и точностью воспроизведения ДНК, что особенно важно при клонировании или секвенировании ДНК и генов [6, 7].

В быстрой ПЦР используются стандартные ферменты, буферы и другие компоненты. Конечная концентрация компонентов при быстрой ПЦР соответствует ей при стандартном процессе. Таким образом, пользователь имеет возможность продолжать работать со своими реагентами и получать более специфичные и точные результаты за относительно короткий промежуток времени.

В целом следует подчеркнуть, что реализована сверхбыстрая амплификация, позволяющая достичь значительно более высокой специфичности продуктов ПЦР при обработке ДНК-фрагментов разной длины и происхождения. Важно отметить, что преимущества ПЦР достигнуты благодаря комбинации элементов Пельтье и микропланшета в качестве носителя образца.

Амплификаторы для быстрой ПЦР (SpeedCycler² и qTOWER) разработаны в рамках совместного проекта Analytik Jena, Life Science, Hans-Knöll-Institut für Naturstoff Forschung (Германия) и группы компаний AWTech (Россия).

Литература

1. **Mullis K.** The Polymerase Chain Reaction, Nobel Lecture, December 8, 1993. LEX PRIX NOBEL. The Nobel Prizes. Almqvist and Wiksell Int., Stockholm, Sweden.
2. **Saiki R.K. et al.** – Science, 1985, v.230, p.1350.
3. **Mullis K.B.** – Scientific American, 1990, v.56.
4. **Mullis K., Ferre F. and Gibbs R.** Rapid Cycle DNA Amplification In, The polymerase chain reaction. – FL, Springer, 1994, p.174-181.
5. **Innis M., Gelfand D., Sninsky J.** Rapid Thermal Cycling & PCR Kinetics In: PCR Methods Manual. – San Diego, Academic Press, 1999, 211-229.
6. **Seise B., Brinker A. et al.** Chip-based detection system for the on-site analysis of animal diseases. – Eng. Life Sci., 2011, v.11, №2, 148-156.
7. **Hermann H., Knippschild C., Berka A.** Ultrafast DNA amplification with a rapid PCR system, LabTechnology, Biotechnology Division Analytik Jena AG. – Germany, Jena, 2010.