

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Полимеразная цепная реакция

ОФС.1.7.2.0013.15

Вводится впервые

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой многократное ферментно-опосредованное умножение (амплификацию) заданного участка ДНК длиной от десятков до нескольких тысяч пар оснований (п.о.), границы которого соответствуют коротким олигонуклеотидным последовательностям – праймерам, т.е. ПЦР представляет собой циклический синтез *in vitro* выбранного фрагмента ДНК. Каждый цикл состоит из трёх этапов: денатурации, гибридизации и синтеза цепи ДНК. Для выявления РНК-содержащих микробов ПЦР проводят после процедуры обратной транскрипции.

Специфичность реакции обеспечивается прежде всего правильным выбором праймеров.

По окончании реакции наличие искомого фрагмента выявляют различными методами. Наиболее распространены электрофоретическое разделение и детекция флуоресценции в режиме реального времени.

ПЦР может применяться как качественная реакция (по принципу «есть – нет»), так и как полуколичественный или количественный метод.

Для проведения анализа могут быть использованы наборы реагентов для ПЦР, зарегистрированные в установленном порядке и валидированные для соответствующих целей.

Пробоподготовка

Определяемая ДНК может быть выделена из исследуемого образца или может вноситься в реакцию без предварительной подготовки.

В первом случае следует подтвердить, что процедура выделения не влияет на результаты ПЦР. С этой целью целесообразно провести аналогичную процедуру выделения с использованием стандартного образца ДНК. Процедура выделения может быть ручной или в автоматическом режиме.

Во втором случае при внесении в реакцию тестируемого материала без проведения его предварительной подготовки, необходимо подтвердить отсутствие влияния на результаты ПЦР веществ, входящих в состав исследуемого образца. Для этого целесообразно использовать метод добавок.

Необходимо предусмотреть использование стандартных или контрольных образцов для оценки эффективности выделения нуклеиновых кислот.

Используемое оборудование, реагенты, стандартные и контрольные образцы, приготовление растворов и все этапы пробоподготовки должны быть указаны в фармакопейной статье и нормативной документации или должна быть приведена ссылка на инструкцию по применению набора реагентов для выделения ДНК/РНК.

Проведение реакции

ПЦР проводят в буферно-солевом растворе с определенным значением pH, содержащем необходимую концентрацию ионов магния, четыре вида дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и термостабильную Taq-полимеразу (ДНК-полимераза ряда микроорганизмов, например, *Termus aquaticus* обладает уникальным свойством сохранять активность при температуре 95°C). Состав буферного раствора, концентрацию реагентов, приготовление растворов указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР. Реакция инициируется парой праймеров, каждый из которых представляет собой последовательность из 20-25 нуклеотидов, один праймер комплементарен последовательности ДНК с 5'-конца амплифицируемого участка, а другой – с 3'-конца. Последовательность праймеров, их

концентрацию указывают в фармакопейной статье и нормативной документации.

Для оценки эффективности амплификации следует использовать положительные и отрицательные стандартные и/или контрольные образцы, указанные в фармакопейной статье и нормативной документации или в инструкции по применению набора реагентов.

ПЦР осуществляют в автоматическом режиме на специальных программируемых приборах – амплификаторах, контролирующих заданные параметры реакции: температуру и длительность отдельных этапов цикла (денатурация, гибридизация и синтез цепи ДНК), число циклов и т.д.

Денатурация. Выдерживание при температуре от 94 до 96 °С в течение установленного времени; при этом двойная цепь денатурируется (расплетается) с образованием двух одноцепочечных молекул ДНК.

Гибридизация (отжиг). При температуре 45 – 65 °С в течение установленного времени происходит гибридизация праймеров и одноцепочечной ДНК-матрицы, в процессе которого праймеры распознают комплементарные им участки матричной ДНК.

Синтез цепи ДНК (элонгация). При температуре 65 – 72 °С в течение установленного времени происходит репликация (дистраивание) одной из одноцепочечных ДНК от точки связывания праймера «вправо» (для одной цепи ДНК) и «влево» (для другой цепи ДНК). В результате вновь синтезируемые молекулы ДНК становятся, в свою очередь, матрицей для аналогичного синтеза новых копий.

Продолжительность цикла составляет 0,5 - 5 мин. Сразу после окончания первого цикла процедура повторяется и происходит экспоненциальное увеличение содержания фрагментов ДНК. Обычно ПЦР состоит из 25–40 циклов. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка ДНК, приводящее к увеличению в геометрической прогрессии общего содержания продуктов реакции.

Эффективность ПЦР и количество синтезированного при этом

заданного фрагмента ДНК зависит от многих факторов, среди которых следует выделить: тип и теплопроводящие характеристики амплификатора, тип используемой ДНК-полимеразы, состав буферного раствора, объем реакционной смеси; длину и первичную структуру праймеров; выбранную специфическую последовательность ДНК.

Используемое оборудование и режим амплификации указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР.

Детекция продуктов амплификации

Электрофоретическое разделение. Продукты амплификации анализируют с помощью различных методов электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Для визуализации ДНК используют окрашивание интеркалирующим красителем (обычно - бромистым этидием, дающим характерное красноватое свечение при исследовании в проходящем ультрафиолетовом свете), серебра нитратом или используют мечение различными флюорохромами, дающими флюоресценцию определенной длины волны при возбуждении лазерным лучом. Для оценки размеров амплифицированных фрагментов используют маркеры и стандартные образцы.

Концентрацию геля, приготовление растворов, маркеры, стандартные образцы и условия электрофореза указывают в фармакопейной статье или нормативной документации.

Детекция флюоресценции в режиме реального времени. Способ детекции амплифицированного фрагмента с использованием флюоресцентных меток возможен при проведении ПЦР в реальном времени (Real Time PCR). Отличительной чертой данного метода, в сравнении с классической ПЦР, является возможность не только качественного (по конечной точке или в режиме «реального времени»), но и количественного определения ДНК/РНК в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза и автоматическая регистрация детектируемого сигнала.

Метод основан на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации продукта ПЦР, что в сочетании с возможностью оценить кинетику процесса позволяет проводить количественное определение выбранной последовательности.

Для постановки ПЦР в реальном времени необходим амплификатор, обладающий способностью возбуждать и детектировать флуоресценцию на каждом цикле амплификации. Прибор состоит из трех блоков: амплификатора (термический блок), флуоресцентного детектора и компьютера с прилагаемым программным обеспечением.

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют интеркалирующие красители (например, SybrGreen I) или специфические флуоресцентные зонды (например, система TaqMan). В первом варианте флуоресцентный краситель связывается с синтезируемой двухцепочечной ДНК с возникновением флуоресцентного свечения.

Во втором варианте используются ДНК-зонды, в состав которых введена флуоресцентная метка и гаситель флуоресценции. На стадии элонгации полимераза синтезирует комплементарную цепь ДНК и по достижении участка зонда расщепляет его, благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности. В результате происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя, что приводит к появлению детектируемого свечения.

Используемые реагенты, оборудование, условия ПЦР и программу расчета указывают в фармакопейной статье и нормативной документации или приводят ссылку на инструкцию по применению набора реагентов для ПЦР.

Оценка результатов

Полученные результаты учитывают, если одновременные испытания положительных и отрицательных стандартных или контрольных образцов дают соответственно положительные и отрицательные ответы.

При необходимости определения нуклеиновой кислоты, для которой установлено предельно допустимое содержание ДНК, следует проводить сравнение с результатом ПЦР стандартного образца с соответствующей концентрацией.

Для количественного определения специфической нуклеиновой кислоты следует использовать метод ПЦР в реальном времени и стандартный образец, аттестованный в установленном порядке.

Обеспечение качества

Используемое оборудование должно быть аттестовано в установленном порядке.

Методика на основе ПЦР для неколичественного определения должна быть охарактеризована по специфичности и аналитической чувствительности. Аналитическую чувствительность определяют как минимальное количество целевых последовательностей (ДНК/РНК) в единице объема образца, которое может быть обнаружено в 100 % образцов при 10-кратном проведении анализа или в 95 % образцов при 24-кратном проведении анализа. Количество ДНК/РНК может быть выражено в международных единицах или числом копий.

Методика для количественного определения должна быть охарактеризована по специфичности, диапазону линейности, правильности и прецизионности. Для установления указанных характеристик используются соответствующие международные стандартные образцы, а также стандартные образцы, аттестованные в установленном порядке.

Стандартные и контрольные образцы

Используемые стандартные образцы должны быть аттестованы в установленном порядке, контрольные образцы – охарактеризованы по необходимым показателям. Могут использоваться стандартные и контрольные образцы набора реагентов после валидации методики.

При каждой постановке ПЦР необходимо предусмотреть использование следующих образцов:

- положительный стандартный и/или контрольный образец, предназначенные для оценки эффективности всех этапов ПЦР, которые должны содержать определенное количество целевой последовательности;
- положительный контрольный образец, содержащий определенное количество целевой последовательности, предназначенный для оценки этапа амплификации;
- отрицательный контрольный образец, являющийся свободным от целевых последовательностей, для контроля отсутствия ложноположительных результатов, начиная с этапа пробоподготовки;
- отрицательный контрольный образец, являющийся свободным от целевых последовательностей, для контроля отсутствия ложноположительных результатов на этапе амплификации.