



# Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті



СӨ

Ж

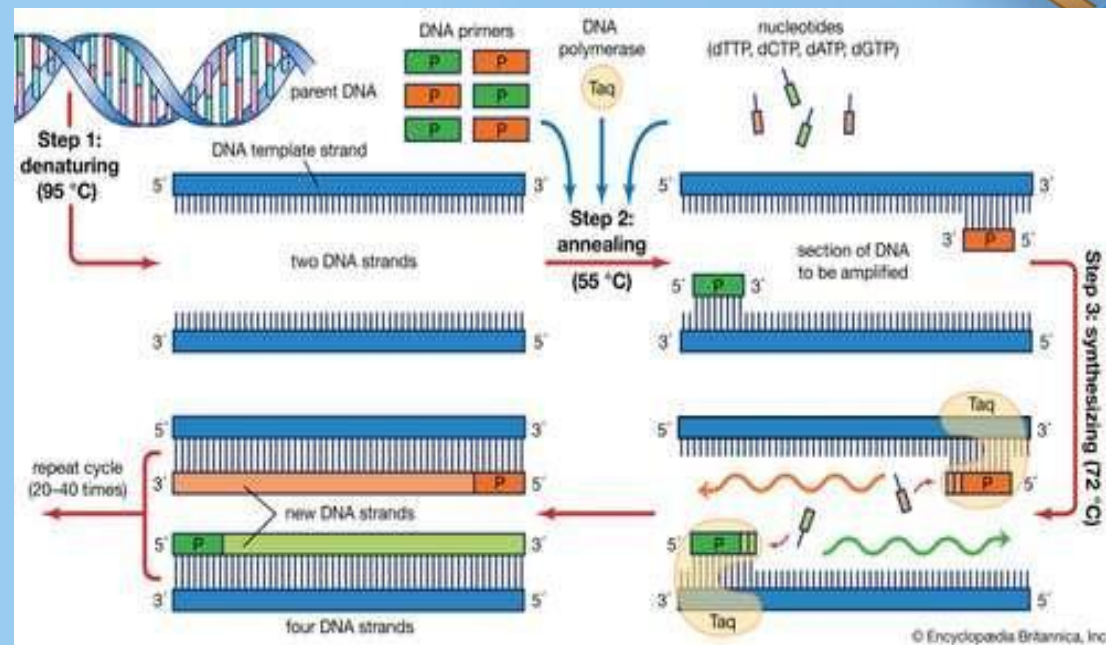
**Орындаған:**

**Тексерген:**

# Кіріспе

**Полимеразды тізбекті реакция (ПТР)-**бұл ДНҚ-ның белгілі бір аймағын қолданып, көптеген (миллион немесе миллиард) көшірме жасалатын кең таралған зертханалық әдіс. ПТР-ның мақсаты - мақсатты ДНҚ аймағын қажетті мөлшерін алып, оны талдауға немесе басқа тәсілмен қолдануға болады.

1983 жылы К. Б. Муллис полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісін ашқан, 1993 жылы Майкл Смитпен бірге химия бойынша Нобель сыйлығын алған. Бұл әдіс термоциклге негізделген.



*Полимеразды тізбекті реакцияның үш сатылы процесі.  
Britannica энциклопедиясы, Inc.*



- *Полимеразная цепная реакция (ПТР)* *in vitro* арқылы жүзеге асырылатын ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін бірнеше рет көшірудің (күшейту) жасанды процесі.
- Бастапқы ДНҚ көшірмелерінің санын бірнеше рет көбейту үшін циклдік реакция қажет. Зертханада ПТР-талдау жүргізу үшін кезеңде жүргізіледі:
- ПТР ерекшелігі праймерлердің ДНҚ-ның қатаң анықталған бөлігін «тану» және молекулалық комплементарлық принципін сәйкес байланыстыру қабілетімен анықталады.
- ПТР-дің негізгі қазғидасы - полимерлеу реакциясы (мономерлі нуклеотидті байланыстыру) полимерлі тізбегін синтездеу) көптеген қайталанатын циклдердің әрқайсысында белгілі

**1** ДНҚ-ны оқшаулау (денатурация)

**2** ДНҚ фрагменттерін күшейту

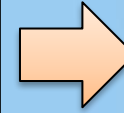
**3** Күшейту ДНҚ өнімдерін анықтау (элонгация)

### Полимеразная цепная реакция



## ПТР кезеңдеріне сипаттама

Науқастың материалына реакцияның "тазалығына" кедергі келтіретін органикалық заттарды ерітетін арнайы сұйықтық қосылады



өңдеу процесінде ДНҚ қос спиралы жеке жіптерге бөлінеді

дәрігер пациенттен зерттеу үшін материал алып, оны арнайы өңдеуге жібереді.

табылады, оның мәні келесідей: қуыздар және полисахаридтер алынады.

ДНҚ күшейтілуінің негізі

ру үшін: ДНҚ молекуласының кішкене өлігі жеткілікті.

ДНҚ-ның бір тізбегін екі есе көбейту арқылы жүзеге асырылатын ДНҚ — ның ДНҚ репликациясын аяқтаудың табиғи процесіне негізделген.

ДНҚ шаблондарын-ДНҚ — ның "клондалуы" болатын инфекциялардың ДНҚ молекулаларын қолданады.

## Элонгация.

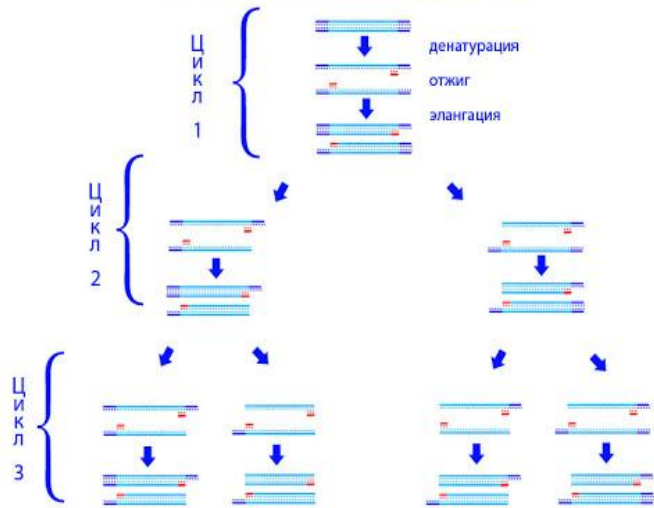
Бұл кезең 7-10 минутқа созылады.



- ДНҚ полимераза матрицалық тізбектегі ер-праймерді қолдана отырып көбейтеді.
- Жиі қолданылатын Taq және Pfu полимераза C-табелсенді.
- Әдетте, ұзарту уақыты әр мың базалық жұп үшін бір минутқа тең қабылданады.
- Элонгация температурасы полимеразаның белсенділігіне байланысты.

Барлық циклдар аяқталғаннан кейін, барлық Бір тізбекті фрагменттерді аяқтау үшін көбінесе соңғы элонгацияның қосымша кезеңі жасалады.

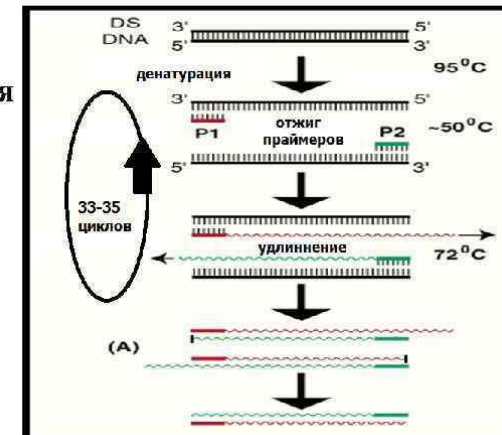
### Полимеразная цепная реакция



### ПЦР

#### Стадии ПЦР

- Денатурация
- Отжиг
- Элонгация



- *Қарапайым жағдайда ПТР жүргізу үшін келесі компоненттер қажет:*
  - Термостабелді ДНК полимераза-ДНК полимерлеу реакциясын катализдейтін фермент
  - Қажетті ДНК фрагментінің әртүрлі тізбектерінің қарама-қарсы ұштарына қосымша екі праймер.
  - ПТР қолдану үшін полимераза ұзақ уақыт бойы жоғары температурада белсенді болуы керек, сондықтан термофилдерден оқшауланған ферменттер қолданылады
  - Дезоксирибонуклеозид трифосфаттары (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
  - Полимераза жұмыс істеуі үшін қажет  $Mg^{2+}$  иондары.
  - Реакцияның қажетті жағдайларын қамтамасыз ететін буферлік ерітінді—рН, ерітіндінің иондық күші.
  - Реакциялық қоспаның булануын болдырмау үшін пробиркаға жоғары қайнаған май, мысалы, вазелин қосылады.

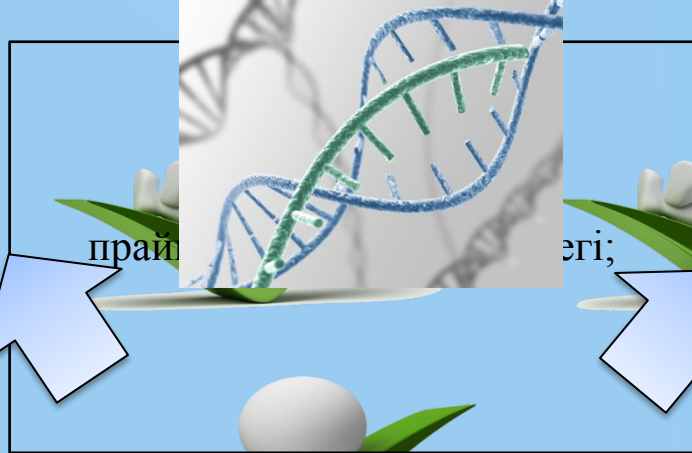
**Thermusaquaticus (Taq-полимераза),**

**Pyrococcus furiosus (Pfu-полимераза)**

**Pyrococcus woesei (Pwo-полимераза)**

**Thermophilus (Tth-полимераза)**

ПТР үшін  
праймерлерді жобалау кезінде бі  
рнеше параметрлерді ескеру қажет. Олардың ішінде ең  
маңыздылары бар:

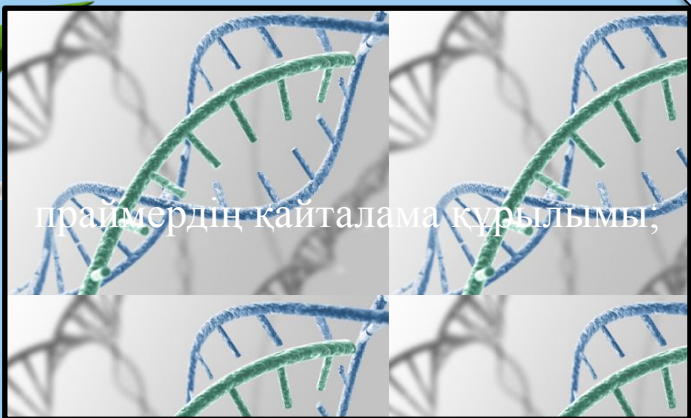


праймер ұзындығы;

мақсатты сайттың  
екінші құрылымы;

G / C мазмұны және  
полипиримидинді (T, C)  
немесе полипуринді (A, G) созылған  
учаскелер;

булқу температурасы ( $T_m$ )  
және күйдіру температурасы;



праймерлердің гомо- және  
гетеродимеризациясы.

• **Праймер ұзындығы**

• Ең дұрысы, праймердің мөлшері 15-тен 30 нуклеотид болмауы керек, егер бұл арнайы қолдану үшін қажет болса.

• **Балқу температурасы.** Олигонуклеотидті праймердің температурасына қатысты ережелерді қатаң орындай отырып жасалуы керек. Температураның күшейту аз болса, есе мүлдем жұмыс істемейді.

• **Бір жұп.** Егер екі праймердің ұзындығы айтарлықтай өзгерсе, онда бірінші праймердің мөлшерін сақтай отырып (немесе 5' және 3' ұштарын мөлшерін ұлғайту).

• **Праймерді "тазарту" температурасы.**

• Тап праймері - бұл праймерді матрицамен будау кезінде қолданылатын температура. Та 4-5°C (және кейбірауторлардың пікірінше, 1-2°C)  $T_m$  праймерінен төмен.

• Егер праймерлер екеуі де бірдей балқу температурасына ие болса, онда праймерлер  $T_m$  -гес әйкес температурасына ие болса, онда праймерлердің ұзындығын өйткені жоғары  $T_m$  праймеріне таңдау керек.

• Егер праймерлер екеуі де бірдей балқу температурасына ие болса, онда праймерлер  $T_m$  -гес әйкес температурасына ие болса, онда праймерлердің ұзындығын өйткені жоғары  $T_m$  праймеріне таңдау керек.

• Егер праймердің ұзындығы айтарлықтай өзгерсе, онда бірінші праймердің мөлшерін сақтай отырып (немесе 5' және 3' ұштарын мөлшерін ұлғайту).

• **Праймерді "тазарту" температурасы.**

• Тап праймері - бұл праймерді матрицамен будау кезінде қолданылатын температура. Та 4-5°C (және кейбірауторлардың пікірінше, 1-2°C)  $T_m$  праймерінен төмен.



# ПТР компоненттері

- **Праймер.** Шамамен 15-30 нуклеотидтерден тұратын, жасанды арнайы синтезатордың көмегімен синтезделетін қысқа олигонуклеотидтер. Праймерлер амплификация үшін керек. Праймер матрицалық ДНҚ молекуласының белгілі-бір бөлігіне комплементарлық принцип бойынша жабысып, ары қарай ДНҚ полимераза ДНҚ бөлігін синтездейді.
- **Тaq-полимераза** – температураға төзімді фермент, негізінен комплементарлы принципте 3'-соңына жабысады да, тізбекті құрастыруға кіріседі. Фермент өз атауын *Thermis aquaticus* термофильді бактериялардан штаммпродуцент атауымен алды.
- **Дизоксинуклеотидүшфосфаттар қосындысы (dNTP):** dATP, dGTP, dCTP, dTTP болуы керек. ДНҚ молекуласының екінші комплементарлы тізбегін Таq-полимераза ферменті арқылы синтездеуге қолданылатын «құрылыс материалы».



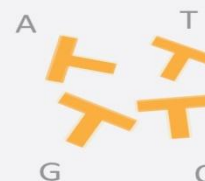
DNA  
Template



Primers



DNA  
Polymerase



dNTPs



Buffer/Cofactors

# ПТР компоненттері

- **Буферлік ерітінді-** құрамында  $Mg^{2+}$  ионы бар, ферменттің белсенділігін қолдау үшін қажетті реакциялық орта.  $Mg^{2+}$  ионы ПТР-дағы ДНҚ-полимеразаға қажетті кофактор болып табылады. Реакциялық қоспаның көптеген компоненттері осы иондар, соның ішінде ДНҚ-матрица, праймерампликондар және ар дНТФ байланыстырады. ДНҚ матрицасы зерттеудің нысаны болып табылады, яғни биологиялық материалдың (қан, тін, бактериялық медениет және т.б.) оқшауланған ДНҚ үлгісі. Олар хромосомалар, нуклеотидтер, плазмидтер немесе тірі ағзалардың әртүрлі түрлерінің генетикалық материал қоспасы болуы мүмкін.
- ДНҚ матрицасы зерттеудің нысаны болып табылады, яғни биологиялық материалдың (қан, тін, бактериялық медениет және т.б.) оқшауланған ДНҚ үлгісі. Олар хромосомалар, нуклеотидтер, плазмидтер немесе тірі ағзалардың әртүрлі түрлерінің генетикалық материал қоспасы болуы мүмкін. ДНҚ матрицасы арнайы әзірленген праймерлермен анықталатын бірегей дәйектілікті (генетикалық маркерлер) қамтиды. ПТР үшін әдетте ДНҚ матрицасының 10-нан 100 нг-қа дейін қолданылады. Сонымен ДНҚ-матрица-амплифицирлеу үшін қажетті ДНҚ үлескісі бар бөлігі. Зерттелетін үлгі-алдын ала биологиялық материалдан бөлініп алынған геномдық ДНҚ молекуласы.

## Праймер дизайны

**Праймерлер**-ұзындығы-25 нуклеотидті ДНК-ның қысқа жіптері, оларды күшейту үшін ДНК фрагменттерінің басталу және аяқталу аймағына сәйкес келеді. Праймерлер алға және кері праймер болуы мүмкін. Бұл праймерлер ДНК фрагментін белгілі бір нүктелерде байланыстырады, онда ДНК полимеразасын сол жерде орналасқан арнайы праймермен байланыстырады және жаңа ДНК тізбегін синтездеуге кіріседі.

- Праймерлерді таңдау ПТР процесінің маңызды аспектісі болып табылады. Праймердің ұзындығын таңдау маңызды. Идеал ұзындығы 18-25 нуклеотид болар еді. Егер ұзындық тым қысқа немесе тым ұзын болса, праймерлер ДНК тізбегіне байланбайды, оны дәл күшейту керек. Ұзындығы өте қысқа праймерлер ДНК тізбегінің әртүрлі орындарында спецификалық емес праймерді тазартуға әкеледі.

Праймерлердің үш негізгі түрі бар:

-Олиго dT праймеры

-Кездейсоқ жүйе. Әдетте, немесе гексамер немесе наномер пайдаланылады.

-Ген-спецификалық праймер, мРНК зерттеу үшін қолданылады.

## Праймерлердің балқу температурасын есептеу

Жақсы праймердегі гуанин мен цитозин (GC) мөлшері 40-60 аралығында болуы керек. Праймерді тазарту температурасы мен балқу температурасы ПТР кезінде өмірлік маңызды фактор болып табылады. Балқу температурасын дәл есептеу керек, ал грунтты тазарту температурасы балқу температурасынан 5°C төмен болуы керек. Балқу температурасы 60 °C және 75°C болуы керек. Тым жоғары немесе тым төмен температура ДНҚ полимераза белсенділігінің төмендеуіне әкеледі.

### *Accurate $T_m$ Calculation*

$$T_m = \frac{\sum \Delta H^\circ_{n-n}}{\sum \Delta S^\circ_{n-n} + R \ln C_t} - 273.15$$

# Праймерлердің балқу температурасын есептеу

Калькулятор праймерлердің ұсынылған балқу температурасы мен ПТР жасыту температурасын ПТР-да қолданылатын праймер жұбы, праймер концентрациясы және ДНҚ-полимеразаның реттілігі негізінде есептейді. Калькулятор сонымен қатар праймер ұзындығын, GC пайызын, молекулалық массаны және сөну коэффициентін есептейді.

Өзгертілген Allawi & SantaLucia термодинамикалық әдісі  $T_m$  және Platinum SuperFi, Phusion және Phire ДНҚ полимеразаларымен реакциялардың күйдіру температурасын есептеу үшін қолданылады. Параметрлер праймерде нақтылықты жоғарылату және жоғары өнімділікті сақтау мақсатында реттелді.

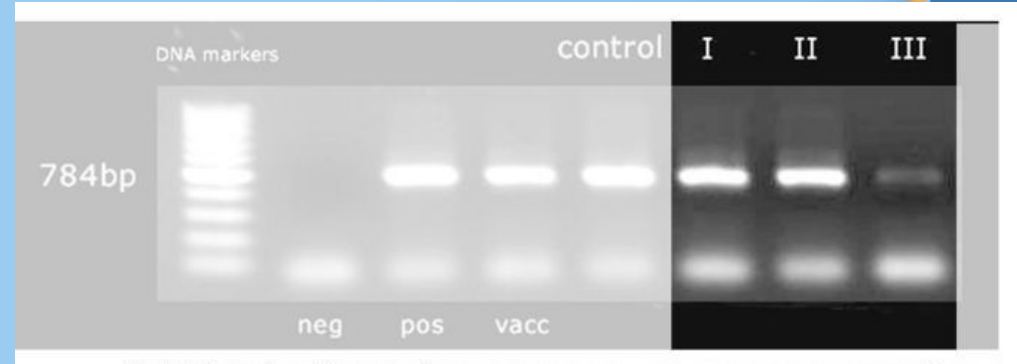
Бұл калькуляторды пайдалану үшін ДНҚ-полимеразды таңдап, праймер тізбегін енгізіңіз немесе қойыңыз және соңғы праймер концентрациясын енгізіңіз.  $T_m$  мәндері, күйдіру температурасы және басқа деректер автоматты түрде жасалады.

Қажет болса, матрица-праймер жұбының әр тіркесімі үшін идеалды күйдіру температурасын одан әрі оңтайландыру және эмпирикалық түрде анықтау үшін температура градиентін қолданыңыз. Күйдіру температурасының градиенті компьютердің жасыту температурасынан  $6-10^{\circ}\text{C}$  төмен температурада басталып, созылу температурасына дейін жоғарылауы керек (екі сатылы ПТР).

# Классикалық ПТР

**Классикалық форматтағы полимеразды тізбекті реакция.** ДНҚ және ДНҚ құрамды микроорганизмдердің күдікті мутацияларын анықтауға қолданылған. Ол оның бастапқы фрагменті ген-спецификалық праймерлердің көмегімен амплифицирленеді. Реакцияның соңғы нәтижесі зерттелетін материалдағы ДНҚ нысанасының бар екендігін көрсетеді.

Кері транскрипциясы бар полимеразды тізбекті реакция. РНҚ құрамды вирустардың геномының арнайы учаскелерін анықтау немесе нысана-геннің транскрипциясын зерттеу үшін,



алдымен ревертаза ферментімен катализдейтін қайтымды транскрипция реакциясын пайдаланып, РНҚ-матрицадан ДНҚ-көшірмесін алады. Осылайша синтезделген қосымша ДНҚ-лар ПТР-де ген-спецификалық праймерлер үшін матрицалар болып табылады.

# ПТР жүргізетін шарттар



Биологиялық материалдарды дайындау



ПТР қою



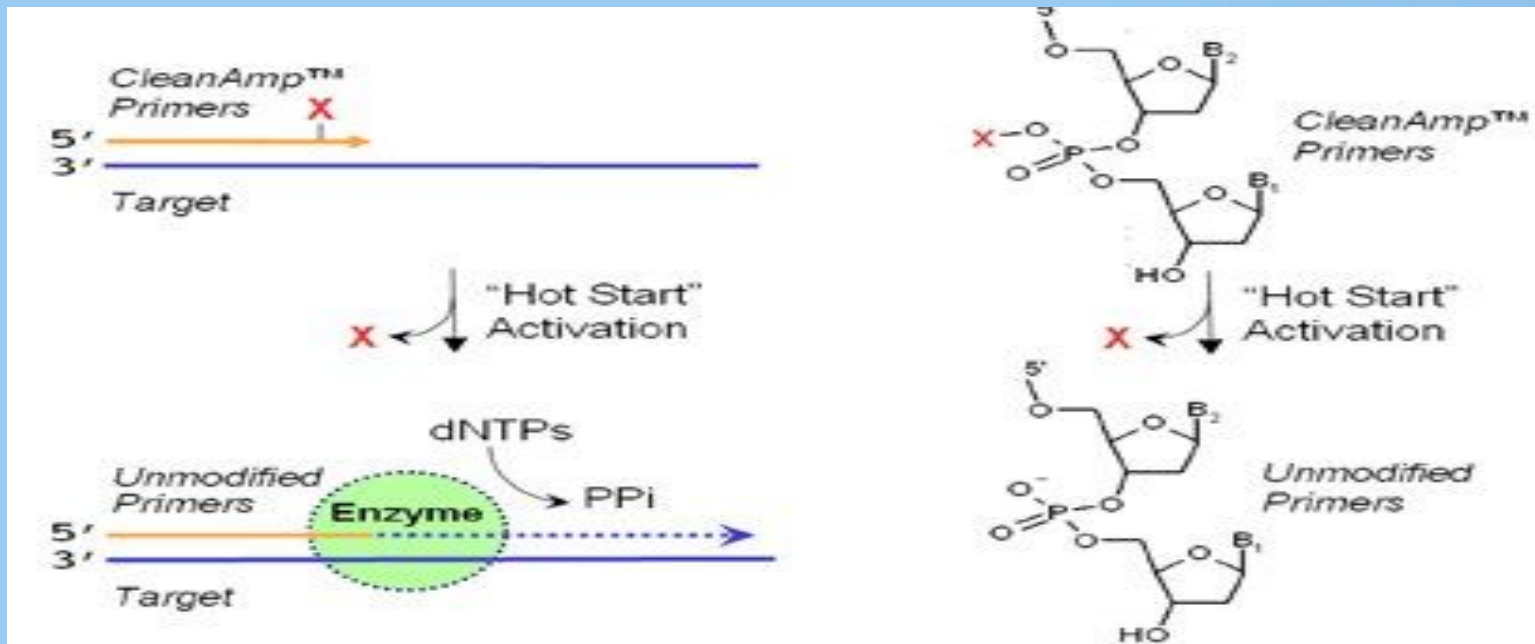
Нәтижелерді талдау

## Кері транскрипция арқылы жүретін ПТР

**(RT-PCR)** Кері транскрипция арқылы жүретін ПТР (RT-PCR) – геномы РНҚ молекуласынан тұратын организмдерді зерттеуде кеңінен қолданылады. Бірінші кезеңде аРНҚ молекуласын матрица ретінде қолдана отырып ревертаза (кері транскриптаза) ферменті арқылы біртүзбекті ДНҚ молекуласын синтездейді.

Бұл синтезделген ДНҚ молекуласы келесі реттегі реакцияға қолданылады. Ол үшін екі вирустан бөлініп алынған кері транскриптаза ферменттерін қолданылады. Бұл ревертазаларды қолдану бірнеше қиындықтарды тудырады. Біріншіден олар жоғары температурада төзімсіз, яғни 42° жоғары температурада жоғары белсенділігі төмендейді.

ПТР жүргізу. “Ыстық” нүктеден басталатын ПТР (hot-start PCR) – праймерлердің арнайы жабысуына қажетті температураға дейін ДНК полимераза ферментінің белсенділігін бастай отырып жүргізілетін ПТР әдісінің жетілдірілген түрі.





# Реал-тайм ПТР

Молекулярлық биологияда реал-тайм ПТР (немесе сандық ПТР, нақты уақыттық ПТР, qPCR, qRT-ПТР) - бір мезгілде берілген ДНҚ молекуласының мөлшерін өлшеу үшін полимеразды тізбекті реакция әдісіне негізделген зертханалық әдіс..

## Real-time ПЦР



Бұл әдіс ПТР-дың жалпы принциптерінде қолданады. Негізгі айырмашылығы, амплификацияланғаннан кейін ДНҚ көлемі нақты уақытта өлшенеді. Сандық көрсеткішті анықтау үшін екі әдіс қолданылады: екі еселенген ДНҚ молекулаларымен араласқан флуоресцентті бояғыштар, гибридизациядан кейін ДНҚ-ның комплементарлы учаскілерімен флуоресценцияланатын модификацияланған олигонуклеотидтер.

Жиі нақты уақыттық ПТР КР-ПТР (кері транскрипция) сәйкестендіріледі, бұл аз мөлшерде мРНҚ көлемін өлшеу үшін, зерттеушіге жасушада осы мРНҚ мазмұны туралы сандық ақпаратты және ген экспрессиясы туралы ақпарат алуға мүмкіндік береді.



# Кері транскрипция реакциясы бар нақты уақыттық ПТР

- ✓ Нақты уақыт ішінде стандартты ПТР жүргізу алдында ДНҚ синтезі үшін кері транскрипция реакциясын жүргізу керек. Кері транскрипция реакциясы кері-транскриптазамен ферментпен орындалады. Реакцияны праймерді қоспай, жүзеге асыруға болады, алайда, праймер қосылған кезде ең үлкен тиімділікке қол жеткізіледі.  
**Праймерлердің үш негізгі түрі бар:**

- 1
  - ОлигодТпраймеры
- 2
  - Кездейсоқ жүйе. Әдетте, немесе гексамер немесе нонамер пайдаланылады.
- 3
  - Ген-спецификалық праймер, мРНК зерттеу үшін қолданылады.

# ПТР қолдану аясы

Қазіргі таңда ПТР-ны :

- ❖ Археологияда,
- ❖ Сот медициналық сараптамасында
- ❖ Генетикада әкесін анықтауда,
- ❖ Жұқпалы аурулар қоздырғышын анықтауда қолданады.

ПТР-диагностика сонымен қатар әмбебап әдіс, себебі бөтен ДНК- ны әр түрлі биологиялық материалдардан – шырыш, зәр, қан, қақырық, эпителиалді жасушалар қырындысынан анықтауға мүмкіндік береді. ПТР диагностика жыныстық жолмен таралатын аурулар, әсіресе, жасырын немесе созылмалы –хламидиоз, уреплазмоз, гонорея, гарднереллез, микоплазматикалық инфекцияларды анықтауда кеңінен орын алған. Себебі, аталған аурулардың қоздырғыштарын зертхана жағдайында қарапайым жолмен өсіріп бөліп алу өте қиын және серологиялық реакцияларда антиденелер аз анықталады. Сондай-ақ, ПТР диагностиканың көмегімен папиллома вирусын, вирусты гепатиттерді анықтауға болады. ПТР диагностика сонымен қатар генетикалық дактилоскопия, пренаталдық диагностика және т.б. жүргізуге зор мүмкіндік береді.

# Қорытынды

- Қорытындылай келе, ПТР-белгілі бір нуклеотидті тізбектің миллиондаған көшірмесін тез арада (бірнеше сағат ішінде) *in vitro* көбейтіп алуға мүмкіндік беретін, нуклеин қышқылдары фрагментін амплификациялау әдісі. 1985ж.қараша айында *Science* журналында ПТР әдісіне байланысты алғашқы мақала жарияланған. Амплификация-ДНҚ-ның белгілі бір аймағының қосымша көшірмелері түзілу үрдісі. ДНҚ-ны амплификациялаудан басқа ПТР нуклеин қышқылдарына әр түрлі әсер етуге мүмкіндік береді (мутация, ДНҚ фрагменттерін тұтастыру). Сонымен қатар, ПТР биологиялық және медициналық практикада кеңінен пайдаланылады, мысалы тұқым қуалайтын немесе инфекциялық ауруларды анықтау, әкелікті орнату, гендерді клондау, жаңа гендерді бөліп шығару, т.б. Әдіс нуклеин қышқылының белгілі бір үлескісінің қайталанып отыратын таңдаулы көшірмеленуіне негізделген