ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА
КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Молекулалық биология

Дәріс 13

Полимеразалық тізбектік реакция туралы түсінік. Полимеразалық тізбектік реакцияның әртүрлілігі. Қолдану аясы

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Полимеразалық тізбектік реакция (ПТР) арқылы ДНҚ-ның нысаналы фрагментін амплификациялау механизмін түсіндіру, әдістің негізгі түрлерін салыстыру және олардың зерттеу мен диагностикада қолданылуын сипаттау.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгеру нәтижесінде білім алушы

1. Полимеразалық тізбектік реакцияның (ПТР) молекулалық мәнін, ашылу тарихын және оның табиғи *in vivo* ДНҚ репликациясымен байланысын сипаттай алады.
2. ПТР реакциясына қажетті компоненттердің (матрицалық ДНҚ, праймерлер, термотөзімді *Taq*-полимераза, dNTPs, буфер ерітіндісі) қызметін және термоциклер аппаратының жұмыс принципін талдай алады.
3. ПТР процесінің негізгі кезеңдерін, соның ішінде амплификация циклінің үш сатысын (денатурация, гибридизация, элонгация) температуралық режимдері бойынша сипаттайды.
4. ПТР амплификациясының өнімдерін агарозды гель электрофорезі және заманауи флуоресцентті әдістер арқылы талдау жолдарын түсіндіре алады.
5. ПТР-дың негізгі түрлерін (классикалық, RT-PCR, Real-Time qPCR, мультиплексті, Nested, Digital PCR) әдістемелік ерекшеліктері мен сезімталдығы бойынша салыстыра алады.
6. ПТР әдісінің медициналық диагностикада, генетикалық мутацияларды анықтауда, криминалистикада (ДНҚ-саусақ ізі) және биотехнологияда қолданылу маңызын дәйектей алады.

Дәріс жоспары

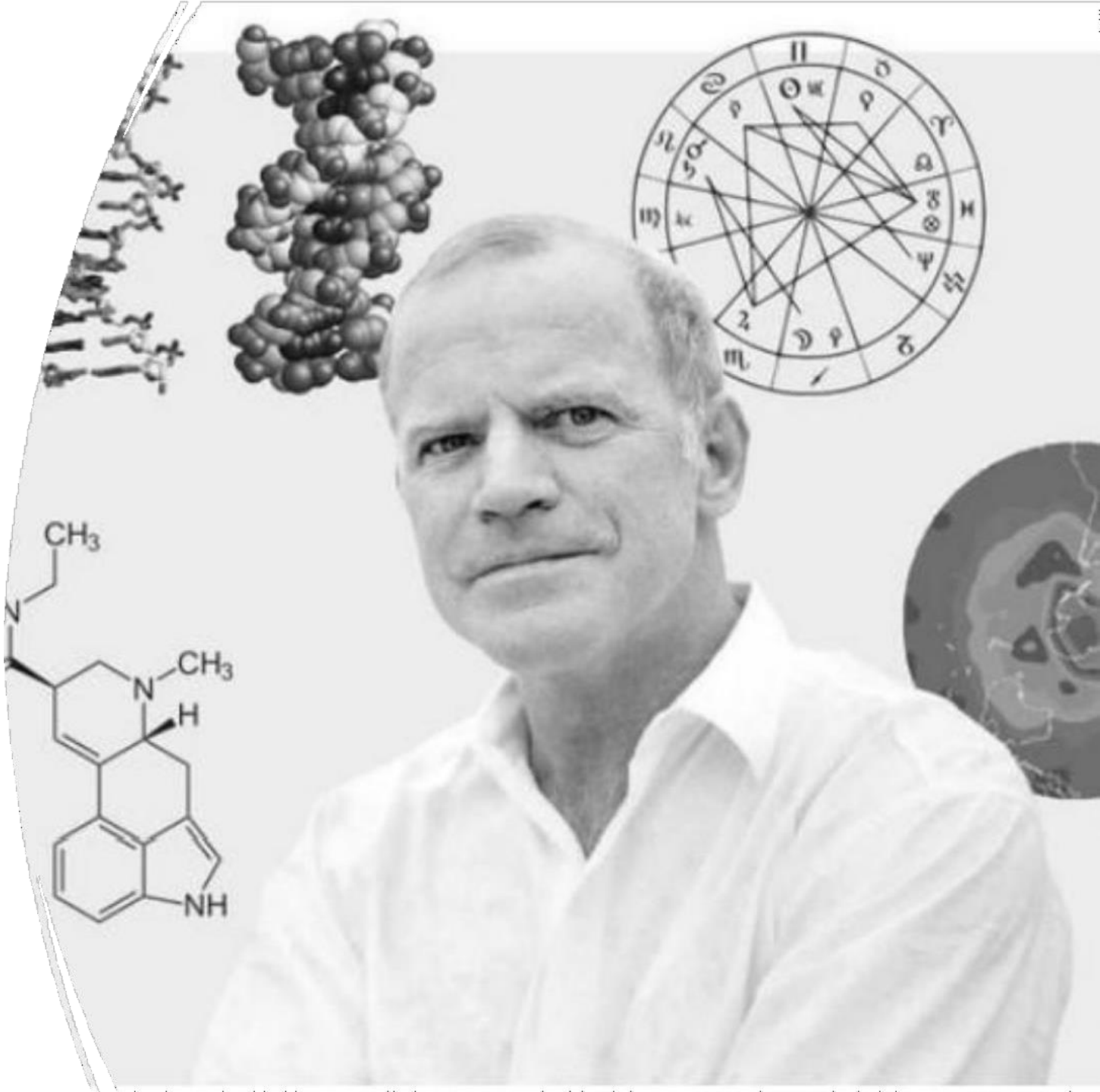
1. **Кіріспе**
2. **Негізгі бөлім**

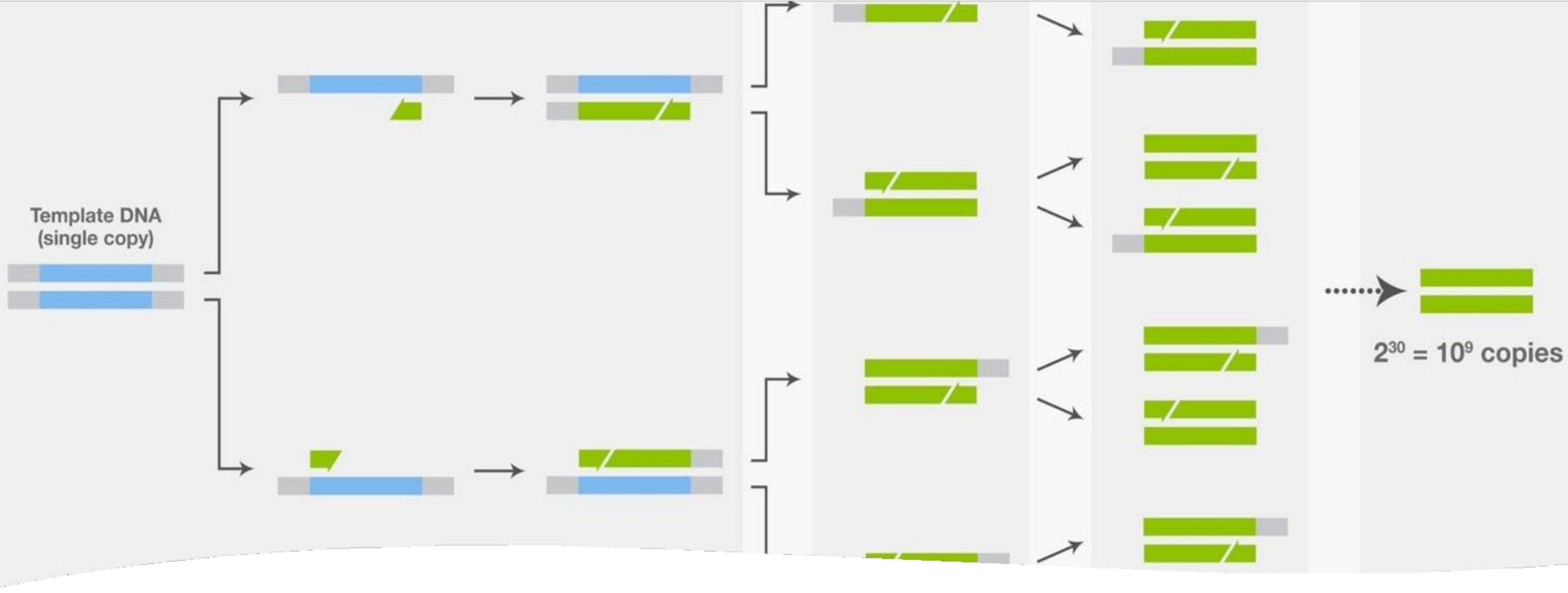
a. ПТР-дың молекулалық негізі және реакция компоненттерінің қызметі.
b. ПТР циклінің сатылары және амплификация өнімдерін талдау.
c. ПТР-дың негізгі түрлері және олардың әдістемелік ерекшеліктері.
d. ПТР-дың молекулалық диагностикада, генетикалық зерттеулерде және криминалистикада қолданылуы.

3. **Қорытынды**
4. **Қолданылған әдебиеттер**

Кіріспе

Полимеразалық тізбектік реакция (ПТР, ағылш. *Polymerase Chain Reaction — PCR*) — ДНҚ молекуласының белгілі бір бөлігін **жасанды жағдайда бірнеше миллион есе көбейтетін** молекулалық биология әдісі.
Бұл әдіс 1983 жылы американдық ғалым **Кэри Муллис** тарапынан ұсынылған және ол үшін 1993 жылы Нобель сыйлығы берілген.
ПТР қазіргі биотехнология, медицина, генетика және криминалистика салаларында негізгі диагностикалық құралға айналды.





ПТР әдісінің мәні

ПТР — табиғи ДНҚ репликация процесінің *in vitro* жағдайындағы үлгісі.
Процесс арнайы **ДНҚ-полимераза ферментінің** көмегімен жүреді, ол ДНҚ тізбегін қалып үлгісі бойынша синтездейді.
Нәтижесінде мақсатты нуклеотидтік тізбек экспоненциалды түрде көбейеді — әр цикл өткен сайын молекула саны екі еселенеді.

ПТР үш негізгі кезеңнен тұрады:

Денатурация (Denaturation): ДНҚ екі тізбегі 94–96°C температурада ажырайды.

Гибридизация (Annealing): Температура 50–65°C-қа төмендетіліп, праймерлер ДНҚ-ға байланысады.

Элонгация (Extension): 72°C температурада **Taq-полимераза** жаңа тізбекті синтездейді.
Бұл үш кезең бір циклді құрайды, әдетте 25–40 цикл орындалады.

ПТР-дың ферменттік негізі



ПТР реакциясында ең маңызды фермент — **Taq-полимераза**.
Ол *Thermus aquaticus* атты термофильді бактериядан алынған және 95°C-қа дейінгі температураға төзімді.
Осы қасиеті реакцияның жоғары температурада тиімді жүруін қамтамасыз етеді.
Қазіргі кезде Pfu, Q5, Phusion сияқты жоғары дәлдіктегі полимеразалар да қолданылады.



ПТР реакциясына қажетті компоненттер

ДНҚ үлгісі (матрица)

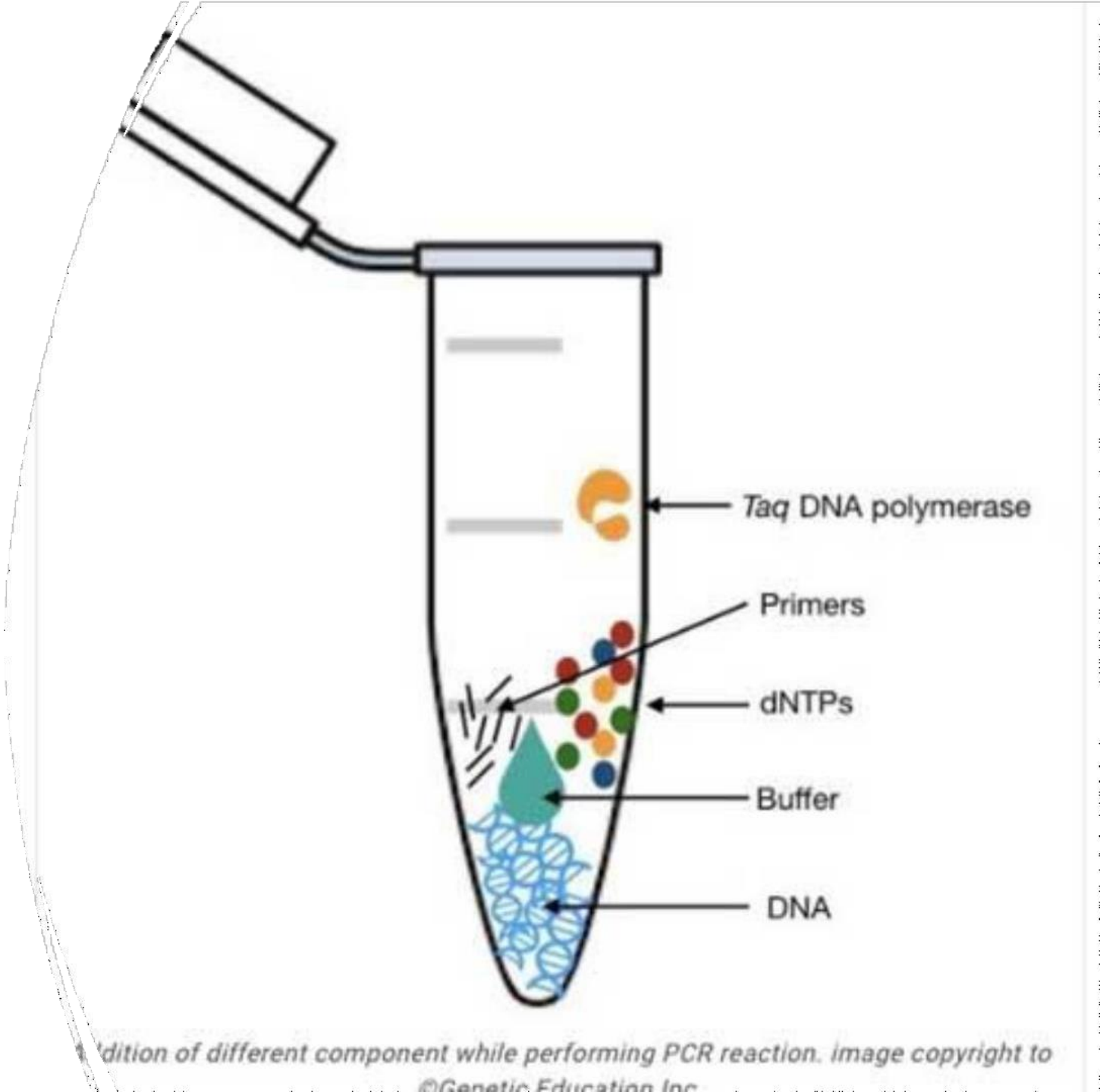
Екі праймер (алдыңғы және артқы)

ДНҚ-полимераза ферменті (Taq polymerase)

Дезоксинуклеотидтрифосфаттар (dNTPs)

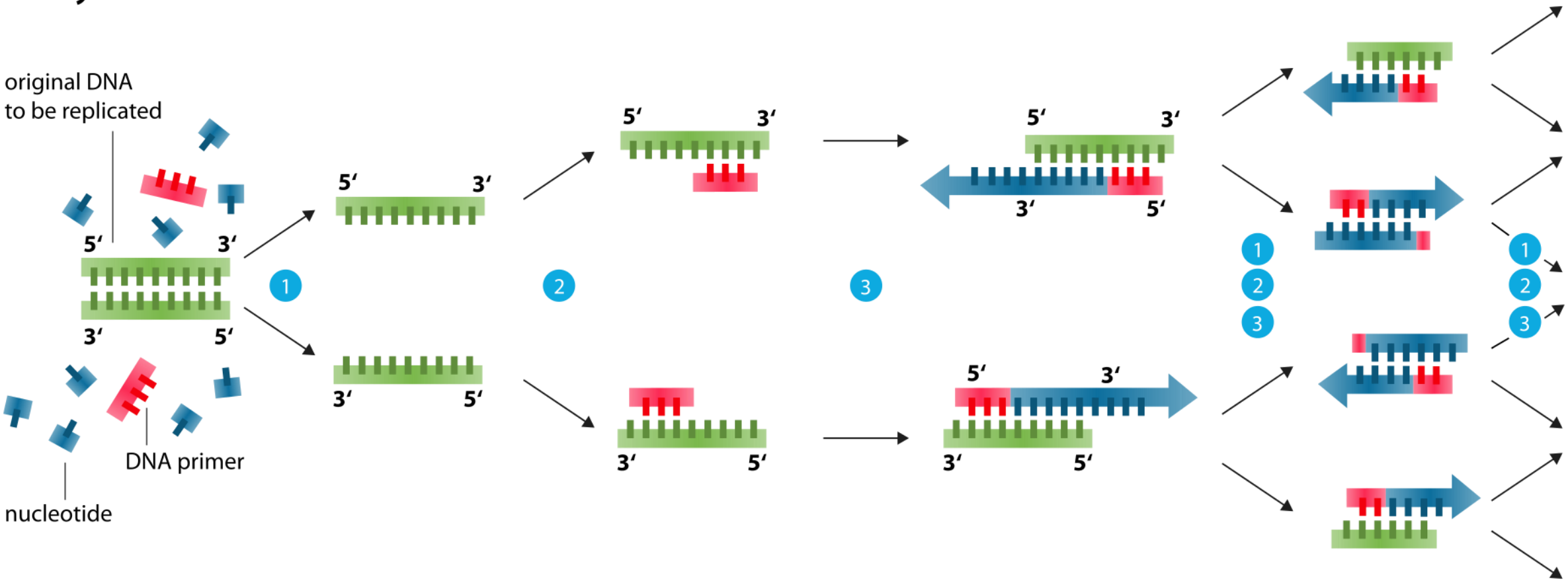
Буфер ерітіндісі (Tris-HCl, $MgCl_2$, KCl)

Термостабильді орта (термоциклді аппарат)



dition of different component while performing PCR reaction. image copyright to ©Genetic Education Inc

Polymerase chain reaction - PCR



1. **Denaturation** at 94-96°C
2. **Annealing** at ~68°C
3. **Elongation** at ca. 72 °C

ПТР аппараты (термоциклдер)

Термоциклдер – бұл ДНҚ амплификациясын жүргізетін автоматтандырылған құрылғы. Құрылғы белгілі бір уақыт аралығында температураны дәл өзгертіп отырады, бұл реакцияның әр сатысын қамтамасыз етеді. Қазіргі термоциклдер бірнеше үлгіні бір мезетте өңдеуге мүмкіндік береді және температура дәлдігін ±0.1°C деңгейінде ұстайды.



ПТР түрлері

а) Классикалық ПТР (Conventional PCR)	ә) Кері транскриптазалық ПТР (RT-PCR)	б) Нақты уақыттағы ПТР (Real-Time PCR немесе qPCR)	в) Мультиплексті ПТР (Multiplex PCR)	г) Nested ПТР (екі сатылы ПТР)	ғ) Digital PCR (сандық ПТР)
• Бұл ПТР-дың алғашқы түрі, нәтижелер **агарозды гель электрофорезі** арқылы анықталады. Амплификация аяқталған соң ДНҚ өнімдері бояғышпен (мысалы, этидий бромидімен) боялады және ультракүлгін жарықта жолақтар ретінде көрінеді. Классикалық ПТР тек сапалық талдау жүргізуге мүмкіндік береді (бар немесе жоқ деп анықтайды).	• Бұл әдіс РНҚ молекулаларын зерттеу үшін қолданылады. Алдымен **кері транскриптаза** ферменті арқылы РНҚ-дан комплементарлы ДНҚ (cDNA) түзіледі, содан кейін классикалық ПТР жүргізіледі. Бұл әдіс РНҚ-вирустарды, соның ішінде **SARS-CoV-2**, **ВИЧ**, **гепатит С** вирусын анықтауда қолданылады.	• Бұл әдіс ПТР өнімінің жиналуын нақты уақытта бақылайды. Флуоресцентті бояғыштар немесе зондтар арқылы амплификацияның әр циклі кезінде сигналдың артуы тіркеледі. Осылайша, ген экспрессия деңгейі мен нуклеин қышқылының бастапқы мөлшері сандық түрде есептеледі.	• Бір реакцияда бірнеше праймер жиынтығы қолданылып, әртүрлі гендер немесе патогендер бір мезгілде анықталады. Бұл әдіс клиникалық диагностикада, мысалы, вирустық және бактериалдық коинфекцияларды анықтауда өте тиімді.	• Бұл әдісте екі реттік амплификация жүреді. Бірінші кезеңде кең аймақ көбейтіліп, екінші кезеңде ішкі аймақ арнайы праймерлермен қайта амплификацияланады. Бұл әдіс жоғары нақтылық қажет ететін жағдайларда (мысалы, сирек ДНҚ үлгілерінде) қолданылады.	• Digital PCR — үлгіні мыңдаған микрокамераларға бөліп, әр камерада тәуелсіз амплификация жүргізу арқылы абсолютті мөлшерлеу әдісі. Бұл әдіс сирек мутацияларды анықтауда, ісік биомаркерлерін сандық бағалауда және вирус жүктемесін дәл өлшеуде қолданылады.

ПТР сатылары (Steps of PCR)

Полимеразалық тізбектік реакция (ПТР) кез келген түрінде үш негізгі сатыдан тұрады:
денатурация, **гибридизация (праймерлердің байланысуы)** және **элонгация (созылу)**.
Осы негізгі сатылардан бөлек, реакцияның басындағы **дайындық кезеңі** мен соңындағы **өнімді талдау кезеңі** де маңызды орын алады.

Жалпы алғанда, ПТР процесін үш негізгі кезеңге бөлуге болады:
Алдын ала дайындық (Pre-preparation)
Амплификация (Amplification)
Өнімді талдау (Product analysis)

Алдын ала дайындық (Pre-preparation)

Бұл - термоцикл ішінде нақты полимеразалық тізбектік реакция басталмай тұрып жүргізілетін алғашқы кезең. Бұл сатыда реакциялық қоспа дайындалып, мақсатты ДНҚ немесе РНҚ фрагментін амплификациялау үшін алдын ала бағдарламаланған термоциклерге жүктеледі.

Үлгідегі ДНҚ немесе РНҚ алдын ала экстракцияланады және сақталады (дайын нуклеин қышқылдарын да қолдануға болады).
Барлық материалдар мен реактивтер дайындалады, жұмыс аумағы тазаланады, қауіпсіздік шаралары сақталады, реакциялық аймақ РНҚазалардан қорғалады, реагенттер жұмыс температурасына жеткізіледі.

Одан кейін:

- үлгі алынады немесе сақтаудан шығарылады;
- ПТР реакциялық қоспасы дайындалады;
- термоциклер қажетті параметрлерге (температура, уақыт, цикл саны) бағдарламаланады;
- реакциялық қоспа арнайы түтікшелерге құйылып, құрылғыға жүктеледі.

Амплификация кезеңі (Amplification)

Бұл — ПТР-дың негізгі реакциялық бөлігі.
Амплификация процесі **циклдік түрде** өтеді және үш дәйекті сатыдан тұрады:
I. Денатурация, **II. Гибридизация (Annealing)**, **III. Элонгация (Elongation)**.
Циклдер саны зерттеу мақсатына қарай **25–40** аралығында болады.

- **I-саты: Денатурация (Denaturation)**
  Бұл — амплификация реакциясының бірінші кезеңі, мұнда қос тізбекті ДНҚ жоғары температура әсерінен екі жеке тізбекке ажырайды.
- **Температура:** шамамен 94°C (90–95°C диапазонында).
- **Уақыты:** 30–90 секунд.
- Бұл температурада сутектік байланыстар үзіліп, ДНҚ екі біртізбекті матрицаға айналады:

  dsDNA → 2 ssDNA templates

  Маңызы: Бұл қадам жаңа тізбектердің түзілуі үшін негіз дайындайды. Егер денатурация толық жүрмесе, реакцияның тиімділігі төмендейді.

II-саты: Гибридизация немесе праймерлердің байланысуы (Annealing)	Денатурациядан кейін температура төмендетіліп, праймерлер матрицалық ДНҚ-ның комплементарлы аймақтарына байланысады.
	Температура: 55–70°C (праймердің GC құрамына байланысты).
	Уақыты: 30–60 секунд.
	Механизм:
	Алдыңғы праймер (forward primer) антисенс тізбектің комплементарлы аймағына байланысады.
	Кері праймер (reverse primer) сенс тізбектің комплементарлы бөлігіне байланысады.
	Реакция: ssDNA + Forward және Reverse праймерлер → ssDNA + байланысқан праймерлер
	Маңызы: Бұл кезең амплификацияның нақты аймаққа бағытталуын қамтамасыз етеді.

III-саты: Элонгация (Elongation)

Бұл — амплификация реакциясының соңғы кезеңі, мұнда температура **72°C**-қа көтеріледі — бұл **Taq ДНҚ-полимеразаның** оңтайлы температурасы.

Фермент праймердің 3’-ұшынан бастап жаңа ДНҚ тізбегін **5’→3’** бағытында синтездейді. Ол реакциялық қоспадағы **дезоксинуклеотид трифосфаттарды (dNTPs)** пайдаланып, фосфодиэфирлік байланыстар түзе отырып, жаңа тізбек құрайды.

Жүру жылдамдығы: шамамен 1 кбп / 0,5–1 минут.

Нәтиже: бір бастапқы қос тізбектен екі жаңа қос тізбек түзіледі.

2 ssDNA + dNTPs → 2 жаңа dsDNA

Маңызы: Бұл қадамда нақты амплификация жүзеге асады, яғни мақсатты фрагменттің көшірмелері түзіледі.

3. Өнімді талдау кезеңі (Product Analysis Phase)

Бұл — ПТР аяқталғаннан кейінгі кезең, мұнда алынған өнімнің (ампликонның) сапасы мен көлемі тексеріледі.

Негізгі талдау әдісі — **агарозды гель электрофорезі**.
Ол арқылы амплификацияланған ДНҚ немесе РНҚ өнімдерінің болуы және шамасы анықталады. Гель бояғыштармен (мысалы, **этидий бромиді** немесе **SYBR Green**) өңделіп, ультракүлгін сәуледе флуоресцентті жолақтар түрінде көрінеді.

Кейбір заманауи ПТР түрлерінде (мысалы, **нақты уақыттағы ПТР / Real-Time PCR**) өнімді талдау бөлек кезең ретінде қажет емес, себебі амплификация барысы тікелей бақыланады.

Полимеразалық тізбектік реакцияның (ПТР) қолданылу аясы

1. Организмдерді анықтау және жіктеу	ПТР микроорганизмдерді түрішілік (субспецификалық) деңгейге дейін анықтау үшін кеңінен қолданылады. Бұл әдіс классикалық микробиологиялық идентификация уақытын бірнеше тәуліктен бірнеше сағатқа дейін қысқартты.
	Сонымен қатар ПТР арқылы **жоғары сатыдағы жануарларды** да анықтауға және жүйелі түрде жіктеуге болады. Тіпті **қазба қалдықтарынан алынған ДНҚ үлгілері** де амплификацияланып, қазіргі тірі организмдермен салыстырылады.

2. Жұқпалы ауруларды анықтау (Инфекциялық диагноз)

ПТР патогендерді анықтауда жоғары дәлдік пен жылдамдық қамтамасыз етеді.
Бұл әдіс тек инфекцияны анықтауға ғана емес, сонымен бірге **антибиотикке төзімділік гендерін** табуға да мүмкіндік береді, бұл дұрыс емдеу тактикасын таңдауға көмектеседі.

ПТР арқылы анықталатын ауруларға мысалдар:

- **АИТВ (HIV)**
- **SARS-CoV-2**
- **адам Т-жасушалы лейкемия вирусы (HTLV-I және II)**
- **туберкулез**,
- **гепатит вирустары**,
- **энтеровирустар**,
- **жыныстық жолмен берілетін аурулар (ЖЖБА)** және т.б.

3. Гендік мутациялар мен тұқым қуалайтын ауруларды анықтау

Геннің кез келген бөлігінде пайда болған мутацияны ПТР арқылы анықтауға болады.
Осы мутациялар негізінде **тұқым қуалайтын аурулардың болуы** дәлелденеді.
ПТР **ДНҚ полиморфизмін** талдауда да қолданылады, ол да кейбір генетикалық бұзылыстармен байланысты болуы мүмкін.

Медицинада ПТР — **туа біткен ауруларды**, **генетикалық ақауларды**, сондай-ақ **қатерлі ісік жасушаларын ерте анықтауда** аса маңызды құрал болып табылады.

4. ДНҚ-саусақ ізін анықтау (DNA Fingerprinting)

- Криминалистикада ПТР **ДНҚ-саусақ ізін (ДНҚ профиль)** алу үшін қолданылады. Бұл әдіс **қылмыскерді немесе жеке тұлғаны анықтау**, сондай-ақ **ата-аналық қатынасты дәлелдеу** мақсатында пайдаланылады.

5. Генді секвенирлеу (Gene Sequencing)

- Гендік секвенирлеу жүргізу үшін алдымен мақсатты геннің көптеген көшірмесін алу қажет, ол **ПТР арқылы** жүзеге асырылады.
  Қазіргі барлық секвенирлеу технологияларының негізгі кезеңдерінің бірі — **амплификация процесі (ПТР)**.

6. ДНҚ мен РНҚ-ның сандық анықтамасы (Quantification)

- ПТР үлгідегі ДНҚ мен РНҚ мөлшерін анықтау үшін де қолданылады. Бұл мақсатта **сандық нақты уақыттағы ПТР (Real-Time qPCR)** жиі пайдаланылады.
  Мұнда реакция барысы нақты уақытта бақыланып, өнімнің концентрациясы есептеледі.

Қорытынды

Трансляция - ақуыз синтезінің негізгі кезеңі. Трансляция процесі дәлдік пен үйлесімділікті талап ететін күрделі механизм болып табылады.

Ақуыздар ағзаның барлық тіршілік процестерін қамтамасыз етеді.

РНҚ - жасушадағы ақуыз синтезін қамтамасыз ететін негізгі биомолекула. Оның үш негізгі түрі - **мРНҚ, тРНҚ және рРНҚ** — өзара тығыз байланыста жұмыс істеп, генетикалық ақпараттың ДНҚ-дан ақуызға дейін жеткізілуін жүзеге асырады.

мРНҚ - ақпарат тасымалдаушысы, тРНҚ - аминқышқылдарын рибосомаға жеткізуші, ал рРНҚ - рибосоманың құрылымдық және каталитикалық бөлігі болып табылады.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар:

1. ПТР әдісінің негізгі мәні неде және реакция қоспасының құрамына кіретін әрбір компоненттің (праймерлер, *Taq*-полимераза, dNTPs, буфер) атқаратын қызметін сипаттаңыз.
2. Неліктен ПТР реакциясында қарапайым ДНҚ-полимераза емес, *Thermus aquaticus* бактериясынан алынған термотөзімді Taq-полимераза қолданылады?
3. ПТР амплификация циклінің негізгі үш сатысын (денатурация, гибридизация, элонгация) және олардың әрқайсысы жүретін температуралық режимдер мен молекулалық процестерді түсіндіріңіз.
4. Кері транскриптазалық ПТР (RT-PCR) мен нақты уақыттағы ПТР-дың (Real-Time qPCR) классикалық ПТР-дан басты айырмашылықтары мен артықшылықтары қандай?
5. ПТР әдісінің заманауи медициналық диагностикада (жұқпалы және тұқым қуалайтын ауруларды анықтауда) және криминалистикада қолданылуына нақты мысалдар келтіріңіз.

Қолданылған әдебиеттер

1. Берсімбаев РІ Молекулалық биология – 2016, Қазақ университеті, Алматы
2. Льюин Б. Гены. – М.: Бином. Лаборатория знаний. 2012. – 896 с.
3. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger. - Molecular Cell Biology. – 2021
4. Т. А. Муминов, Е. У. Куандыко. Основы молекулярной биологии: курс лекций // Алматы: ССК, 2017. - 222 с.
5. Огурцов А.Н., Близнюк О.Н., Масалитина Н.Ю. Основы генной инженерии и биоинженерии. Учебное пособие. Часть 1.: Молекулярные основы генных технологий. Харьков: НТУ "ХПИ", 2018. 288 с.
6. Уилсон К., Уолкер Дж.: Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Серия: Методы в биологии. Издательство: Лаборатория знаний, 2021 г.

Ғаламтор ресурстар:

1. http://elibrary.kaznu.kz/ru
2. http://molbiol.ru/
3. http://gene-quant:fication.info/