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

Пән атауы: Геномика және молекулалық диагностика

Дәріс 11

Полимеразды тізбекті реакцияның негізгі принципі. Қалыпты ПТР мен real-time PCR арасындағы айырмашылық

Лектор: к.б.н., Алтыбаева Н. А.

Сабақтың мақсаты:

Полимеразды тізбекті реакцияның (ПТР) негізгі принципін және жұмыс істеу механизмін түсіндіру, ПТР-дің негізгі кезеңдерін сипаттау, қалыпты ПТР мен нақты уақыттағы ПТР (Real-time PCR) әдістерінің ерекшеліктерін салыстыру, олардың генетикалық зерттеулер мен молекулалық диагностикадағы қолданылуын қарастыру.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгергеннен кейін магистрант:

1. ПТР әдісінің молекулалық принциптерін және ДНҚ амплификациясының механизмін түсіндіре алады.
2. Денатурация, праймерлердің байланысуы және элонгация кезеңдерінің ерекшеліктерін сипаттай алады.
3. ПТР реакциясының негізгі компоненттері мен олардың қызметін анықтай алады.
4. Қалыпты ПТР мен real-time PCR әдістерінің жұмыс принциптерін салыстыра алады.
5. Флуоресценттік бояғыштар мен арнайы зондтардың qPCR технологиясындағы қызметін түсіндіре алады.
6. Амплификациялық қисықтарды және Cq (Ct) көрсеткіштерін интерпретациялайды.
7. ПТР нәтижелерінің аналитикалық сезімталдығы мен ерекшелігіне әсер ететін факторларды талдай алады.
8. ПТР технологияларының молекулалық диагностикадағы қолданылуын бағалай алады.

Дәрістің жоспары

1. Полимеразалы тізбекті реакцияның молекулалық негіздері, негізгі компоненттері және ДНҚ амплификациясының кезеңдері.
2. Қалыпты ПТР мен real-time PCR технологияларының жұмыс принциптері, аналитикалық ерекшеліктері және салыстырмалы сипаттамасы.
3. ПТР нәтижелерін анықтау және интерпретациялау әдістері, технологиялардың диагностикалық мүмкіндіктері мен қолданылуы.

Кіріспе

ПТР ұғымы және анықтамасы

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) – молекулалық биология мен генетиканың ең маңызды әдістерінің бірі болып табылатын, белгілі бір ДНҚ фрагментін in vitro жағдайында (яғни тірі жасушадан тыс) көп мөлшерде көбейтуге арналған жоғары дәлдікті әдіс.

ПТР-дың негізгі мәні – зерттелетін ДНҚ тізбегінің нақты бір бөлігін арнайы ферменттердің көмегімен бірнеше рет қайталанып көшірілуі арқылы оның санын экспоненциалды түрде арттыру. Табиғи жағдайда ДНҚ репликациясы жасуша ішінде жүрсе, ПТР осы процесті зертханалық жағдайда жасанды түрде қайталайды. Бұл әдіс арқылы бастапқыда өте аз мөлшерде болған генетикалық материалды (мысалы, бір ғана ДНҚ молекуласы) миллиондаған, тіпті миллиардтаған көшірмеге дейін көбейтуге болады.

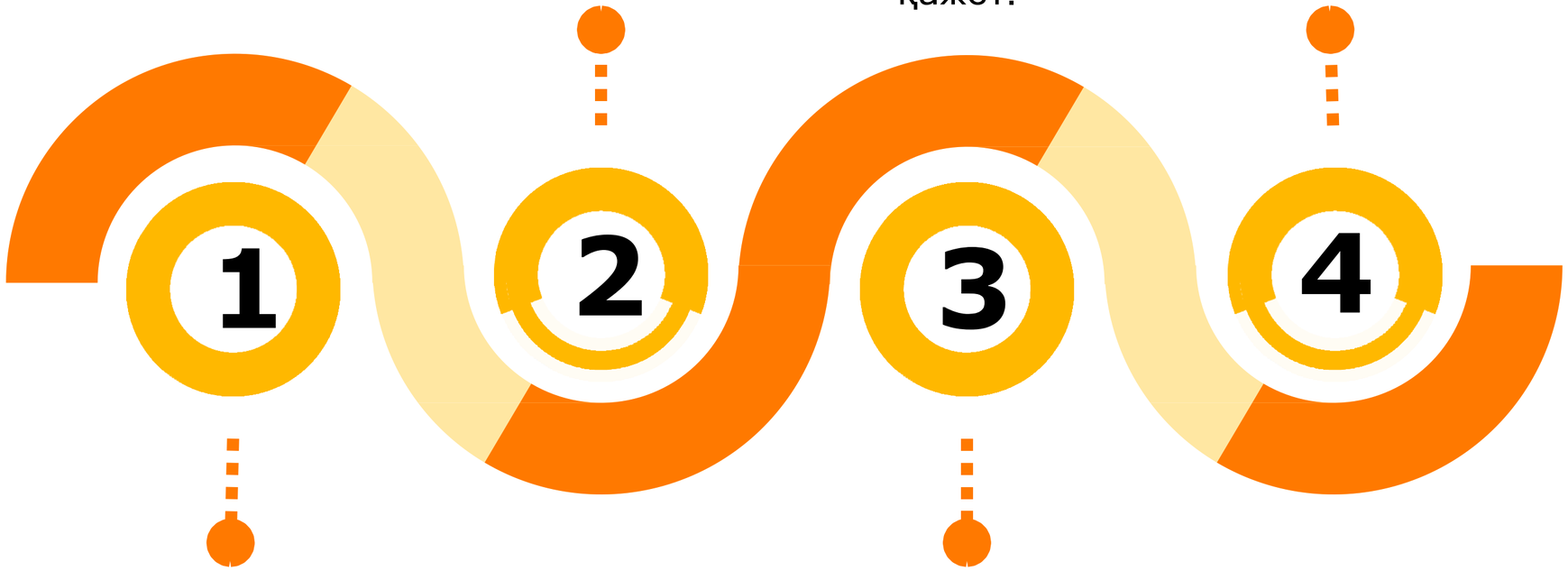


ПТР арқылы ДНҚ-ны көбейту – бастапқы үлгіде ДНҚ мөлшері өте аз болады, ал оны талдау үшін жеткілікті көлемге дейін арттыру қажет.

ПТР арқылы ДНҚ-ны көбейтудің маңызы

Біріншіден, биологиялық үлгілерде ДНҚ мөлшері өте аз болады, сондықтан оны тікелей анықтау немесе талдау қиын. ПТР осы аз мөлшерді көбейтіп, зерттеуге қолайлы деңгейге жеткізеді.

Екіншіден, ПТР бүкіл ДНҚ-ны емес, тек қажетті бір бөлігін ғана таңдап көбейтеді. Бұл нақты генді немесе мутацияны дәл анықтауға мүмкіндік береді.



Үшіншіден, ДНҚ-ны көбейту диагностиканың сезімталдығын арттырады. Яғни ауру қоздырғышы немесе генетикалық өзгеріс аз мөлшерде болса да, оны анықтауға болады.

Қорытындылай келе, ПТР арқылы ДНҚ-ны көбейту аз мөлшердегі генетикалық материалды көбейтіп, нақты және сенімді зерттеу жүргізу үшін қажет.

Ашылу тарихы

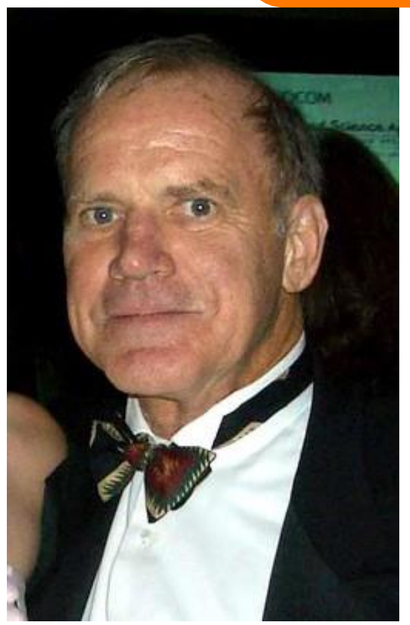
Полимеразды тізбекті реакцияның (ПТР) ашылуы молекулалық биологиядағы маңызды ғылыми жаңалықтардың бірі болып табылады. **XX ғасырдың 70–80 жылдары** генетикалық зерттеулер қарқынды дамығанымен, ДНҚ–ның нақты бір бөлігін жеткілікті мөлшерде алу үлкен мәселе болды. Сол кезде қолданылған әдістер ұзақ уақытты қажет ететін және күрделі болатын. Сондықтан ғалымдар ДНҚ–ның белгілі бір бөлігін тез әрі тиімді көбейту жолын іздеді.

1983 жылы американдық биохимик Kary Mullis осы мәселенің қарапайым шешімін ұсынды.

- Оның идеясы – ДНҚ–ның қажетті бөлігінің екі шетіне арнайы қысқа тізбектер (праймерлер) қосып, сол аймақты бірнеше рет қайталап көбейту. Бұл табиғи ДНҚ көбею процесін зертханалық жағдайда қайталау болып табылады.

Алғашқы тәжірибелерде бұл процесс қолмен жүргізілді. Реакция үш негізгі кезеңнен тұрды: **денатурация** (ДНҚ–ның екі тізбекке ажырауы), **отжиг (ренатурация)** – праймерлердің байланысуы, және **элонгация** – жаңа ДНҚ тізбегінің түзілуі.

Әр цикл сайын ДНҚ мөлшері екі еселеніп, қысқа уақыт ішінде өте көп көшірме жиналады.



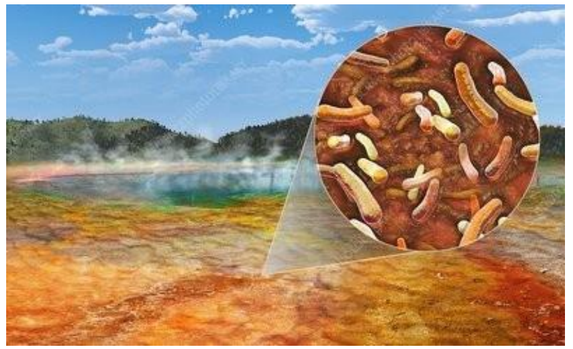
Полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) ашқаны үшін американдық ғалым **Kary Mullis 1993 жылы химия саласы бойынша Нобель сыйлығына ие болды.** Бұл марапат оған ДНҚ–ның нақты бөлігін in vitro жағдайда жылдам және дәл көбейту әдісін ұсынғаны үшін берілді.

Ашылу тарихы

Алғашқы ПТР тәжірибелерінде маңызды қиындықтардың бірі **қолданылған ДНҚ-полимеразаның жоғары температураға төзімсіздігі болды.** Реакцияның денатурация кезеңінде жоғары температура әсерінен фермент белсенділігін жоғалтып, бұзылып қалатын.

Осыған байланысты әрбір циклдан кейін зерттеушілер ферментті қайтадан қолмен қосуға мәжбүр болды. Сонымен қатар, температураны әр кезеңге сәйкес өздігінен өзгертіп, процесті толық бақылау қажет еді. Бұл ПТР жүргізуді ұзақ, еңбекқор және техникалық тұрғыдан күрделі процесс етті.

Аталған мәселе кейіннен термотұрақты ДНҚ–полимеразаның енгізілуі арқылы шешілді. Мұндай ферменттердің бірі – **Taq-полимераза, ол термофильді бактерия – Thermus aquaticus-тан бөлініп алынған.** Бұл фермент жоғары температураға төзімді болғандықтан, денатурация кезеңінде өзінің белсенділігін сақтап қалады.

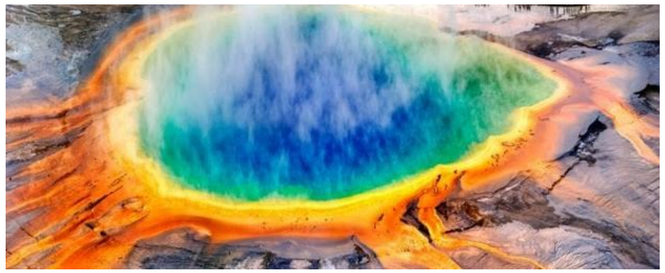


Осының нәтижесінде ПТР реакциясын автоматтандыру мүмкін болды: барлық қажетті компоненттерді бірден реакциялық қоспаға қосып, арнайы құрылғы – термоциклер арқылы температуралық циклдерді автоматты түрде жүргізуге жағдай жасалды. Бұл әдістің жылдамдығын, дәлдігін және тиімділігін айтарлықтай арттырды.

- *Thermus aquaticus – жоғары температурада тіршілік ететін термофильді бактерия.*

Қысқаша ақпарат:

- *Бұл бактерия алғаш рет ыстық бұлақтардан (әсіресе Йеллоустоун ұлттық паркінде) табылған. Ол шамамен 70–75°C температурада жақсы тіршілік етеді, яғни өте ыстық ортаға бейімделген.*
- *Ең маңызды ерекшелігі – осы бактериядан алынған Taq-полимераза ферменті жоғары температураға төзімді. Қарапайым ферменттер ыстықта бұзылып кетсе, бұл фермент ПТР кезінде қолданылатын жоғары температурада да жұмысын сақтайды.*
- *Сондықтан Thermus aquaticus ПТР әдісінің дамуына үлкен үлес қосқан микроорганизм болып саналады.*







- ***Амплификатор (ПТР амплификаторы)** – бұл ДНҚ-ны көбейтуге арналған арнайы құрылғы, оны көбінесе **термоциклер** деп атайды.*
- ***Бұл құрылғының негізгі қызметі** – ПТР реакциясын автоматты түрде жүргізу. Яғни ол реакция қоспасын белгілі бір температуралар арасында бірнеше рет өзгертіп, ДНҚ-ның қажетті бөлігін көбейтеді.*

Амплификатор ПТР-дың үш кезеңін қайталайды:

- *біріншіден, денатурация – ДНҚ қыздырылып, екі тізбекке ажырайды;*
- *екіншіден, отжиг (ренатурация) – праймерлер ДНҚ-ға байланысады;*
- *үшіншіден, элонгация – ДНҚ-полимераза жаңа тізбек синтездейді.*

*Құрылғы осы температуралық циклдерді **ондаған рет дәл және тұрақты түрде қайталайды, нәтижесінде ДНҚ бірнеше есе көбейеді.***

Артықшылықтары

- Біріншіден, **жоғары дәлдікпен жұмыс істейді.** Құрылғы температураны нақты бақылап, ПТР кезеңдерінің дұрыс жүруін қамтамасыз етеді, нәтижесінде сенімді нәтиже алынады.
- Екіншіден, **процесс толық автоматтандырылған.** Зерттеуші тек реакция қоспасын дайындап, құрылғыға орналастырады, ал қалған кезеңдерді амплификатор өзі орындайды.
- Үшіншіден, **жылдам нәтиже береді.** Қысқа уақыт ішінде ДНҚ-ның көп мөлшерін алуға мүмкіндік бар.
- Төртіншіден, **жоғары сезімталдыққа ие. Өте аз мөлшердегі ДНҚ-ны да анықтап, көбейте алады.**
- Бесіншіден, **бір уақытта бірнеше үлгіні зерттеуге болады.** Бұл зерттеу тиімділігін арттырады және уақытты үнемдейді.

Кемшіліктері

- Біріншіден, **контаминацияға өте сезімтал.** Өте аз бөгде ДНҚ түссе де, ол да бірге көбейіп кетеді, нәтижесінде жалған оң нәтиже шығуы мүмкін.
- Екіншіден, **нақты жағдайларды дәл сақтау қажет. Температура, уақыт, реагенттердің концентрациясы сәл өзгерсе, нәтиже дұрыс шықпауы мүмкін.** Яғни әдіс өте «сезімтал» және қателікке бейім.
- Үшіншіден, **мутацияны тікелей көрсетпейді.** Амплификатор тек ДНҚ-ны көбейтеді, ал нақты мутация бар-жоғын анықтау үшін қосымша әдістер (мысалы,электрофорез, секвенирлеу) қажет.
- Төртіншіден, **құрылғы мен реагенттер қымбат болуы мүмкін.** Әсіресе жоғары сапалы амплификаторлар мен ферменттер зертхана үшін қаржылық шығын талап етеді.
- Бесіншіден, **білікті маман қажет.** Құрылғы автоматты болғанымен, нәтижені дұрыс түсіндіру және тәжірибені дұрыс қою үшін арнайы білім керек.

ПТР-дың маңызы және қолданылу салалары

ПТР-дың ең кең қолданылатын салаларының бірі:

- Біріншіден,- **медицинада инфекциялық аурулар диагностикасында ПТР ең маңызды әдістердің бірі болып табылады.** Бұл әдіс вирустар мен бактериялардың генетикалық материалын өте аз мөлшерде болса да анықтай алады. Мысалы, вирустық инфекциялар, бактериялық аурулар және паразиттік инфекциялар ерте кезеңде дәл диагностикаланады.
- Екіншіден, **онкологияда ПТР ісікке байланысты генетикалық өзгерістерді анықтауда қолданылады.** Бұл әдіс арқылы мутациялар, онкогендердің белсенділігі немесе ісікке тән маркерлер анықталады. Сонымен қатар, қатерлі ісікті ерте кезеңде табуға және ем нәтижесін бақылауға мүмкіндік береді.
- Үшіншіден, **тұқым қуалайтын ауруларды анықтауда ПТР маңызды рөл атқарады.** Генетикалық мутацияларды анықтау арқылы әртүрлі тұқым қуалайтын патологияларды диагностикалауға болады.
- Төртіншіден, **репродуктивті медицинада** қолданылады. Преимплантациялық генетикалық тестілеу кезінде эмбрионның бір немесе бірнеше жасушасынан алынған ДНҚ зерттеледі. Мұндай жағдайда материал өте аз болғандықтан, ПТР арқылы оны көбейту міндетті кезең болып табылады. Бұл әдіс эмбриондағы генетикалық ақауларды анықтауға және дені сау эмбрионды таңдауға мүмкіндік береді.
- Бесіншіден, **криминалистикада қолданылады.** Қылмыс орнында қалған қан, шаш немесе сілекей өте аз болуы мүмкін. ПТР сол ДНҚ-ны көбейтіп, адамның кім екенін анықтауға мүмкіндік береді.
- Алтыншыдан, **әкелік немесе туыстықты анықтауда** қолданылады. ПТР арқылы адамдардың ДНҚ-сын салыстырып, олардың туыстық байланысын дәлелдеуге болады.
- Жетіншіден, **ғылыми зерттеулерде қолданылады.** Ғалымдар гендердің қалай жұмыс істейтінін, мутацияларды және генетикалық ерекшеліктерді зерттеу үшін ПТР-ды пайдаланады.
- Сегізіншіден, **ауыл шаруашылығында қолданылады.** Өсімдіктер мен жануарлардың ауруға төзімділігі немесе пайдалы қасиеттерін зерттеу үшін ДНҚ талданады.

ПТР кезеңдері

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) бірнеше бірізді кезеңдерден тұрады және ол ДНҚ-ны үлгіден бөліп алудан басталады.

- Біріншіден, **ДНҚ-ны бөліп алу (экстракция)** жүргізіледі. Бұл кезеңде зерттелетін материалдан (қан, сілекей, тін, эмбрион жасушасы және т.б.) ДНҚ алынады. Жасуша мембраналары бұзылып, ақуыздар мен басқа компоненттерден тазартылып, таза ДНҚ ерітіндісі дайындалады. Бұл - ПТР үшін бастапқы материал.
- Екіншіден, **реакциялық қоспаны дайындау жүзеге асады.** Қоспа құрамына матрицалық ДНҚ, праймерлер, дезоксирибонуклеотидтер (dNTP), ДНҚ-полимераза (көбінесе Taq-полимераза), буфер ерітіндісі және Mg^{2+} иондары кіреді. Осы компоненттер ПТР процесінің жүруіне қажетті барлық жағдайды қамтамасыз етеді.
- Үшіншіден, **амплификация процесі (ПТР циклдері)** басталады. Бұл процесс термоциклерде бірнеше рет қайталанатын үш негізгі кезеңнен тұрады:

- **Денатурация (94–95°C):** жоғары температура әсерінен қос тізбекті ДНҚ екі біртізбекті молекулаға ажырайды.
- **Отжиг (ренатурация) (50–65°C):** температура төмендетіліп, праймерлер ДНҚ-ның комплементарлы аймақтарына байланысады.
- **Элонгация (72°C):** ДНҚ-полимераза праймерден бастап жаңа тізбекті синтездейді.

Бұл үш кезең бір циклды құрайды және әдетте **25–40 рет қайталанады.** Әр цикл сайын ДНҚ мөлшері екі еселеніп, көп мөлшерде көшірме жиналады.

- Төртіншіден, **ПТР өнімін талдау жүргізіледі.** Көбейтілген ДНҚ арнайы әдістермен тексеріледі. Мысалы, электрофорез арқылы оның бар-жоғы және өлшемі анықталады немесе секвенирлеу арқылы нақты нуклеотидтік реттілігі зерттеледі.

Сонымен, ПТР процесі ДНҚ-ны бөліп алудан бастап, оны көбейту және нәтижені талдауға дейінгі бірнеше кезеңнен тұратын жүйелі әдіс болып табылады. Бұл әдіс генетикалық ақпаратты дәл және сенімді зерттеуге мүмкіндік береді.

1. *ДНҚ бөліп алу (DNA extraction)*

Бұл кезеңнің негізгі мақсаты - жасушаның ішіндегі генетикалық материалды (ДНҚ) басқа барлық молекулалардан бөліп алып, таза күйде алу. Жасуша ішінде ДНҚ жалғыз болмайды. **Оның айналасында көптеген басқа биомолекулалар болады:** белоктар, липидтер, РНҚ және әртүрлі органеллалар. **Сондықтан зерттеу жүргізу үшін алдымен жасушаны бұзып, осы артық компоненттердің барлығын жою қажет.**

1. Алдымен зерттелетін материал алынады. Бұл қан жасушалары, ұлпа жасушалар болуы мүмкін. Зерттелетін жасушалар арнайы ерітіндіге салынып, **lysis buffer (лайсис буфер)** деп аталатын ерітіндімен өңделеді. Бұл ерітінді жасуша қабығын бұзып, оның ішіндегі барлық құрамды сыртқа шығарады.
2. Жасушаны бұзу үшін көбінесе **SDS (содиум додецил сульфат)** қолданылады. SDS - бұл детергент, яғни майларды ерітетін зат. Жасуша мембранасы негізінен липидтерден тұратындықтан, **SDS сол липидтерді бұзып, мембрананы ерітеді. Нәтижесінде жасуша қабығы бұзылып, оның ішіндегі барлық компоненттер, соның ішінде ядродан ДНҚ, ерітіндіге шығады.**
3. Бірақ жасуша бұзылғаннан кейін ерітіндіде тек ДНҚ ғана емес, сонымен қатар гистон белоктары, ферменттер және басқа белок молекулалары болады. Бұл белоктар ДНҚ-мен байланысып тұруы мүмкін және кейінгі зерттеулерге кедергі жасайды. Сондықтан ерітіндіге **Proteinase K (протеиназа К) ферменті** қосылады. Бұл фермент белоктарды ыдыратып, оларды ДНҚ-дан ажыратады. Нәтижесінде ДНҚ еркін күйде қалады.
4. Келесі қадамда ерітіндіде әлі де РНҚ молекулалары болуы мүмкін. Ал Southern blot әдісінде тек ДНҚ зерттеледі. Сондықтан ерітіндіге **RNase деп аталатын фермент** қосылады. RNase РНҚ молекулаларын ыдыратып, оларды ерітіндіден жояды. Осылайша ерітіндіде негізінен тек ДНҚ молекулалары ғана қалады.
5. Одан кейін ДНҚ-ны толық тазарту үшін көбінесе **фенол-хлороформ экстракциясы немесе этанолмен тұндыру әдісі** қолданылады. Бұл кезеңде белоктар мен басқа молекулалар бөлініп кетеді, ал ДНҚ тұнба түрінде бөлінеді. Кейін бұл тұнба буфер ерітіндісінде қайта ерітіледі. Нәтижесінде зерттеу үшін қолдануға болатын таза геномдық ДНҚ ерітіндісі алынады.

ДНҚ молекуласын бөліп алу әдістері

ДНҚ молекуласын бөліп алу алға қойылған міндетке, талдау уақытына және ДНҚ-ның тазалық дәрежесіне байланысты.

Органикалық ерітінділер арқылы бөліп алу

Силики (силикагель) арқылы бөліп алу

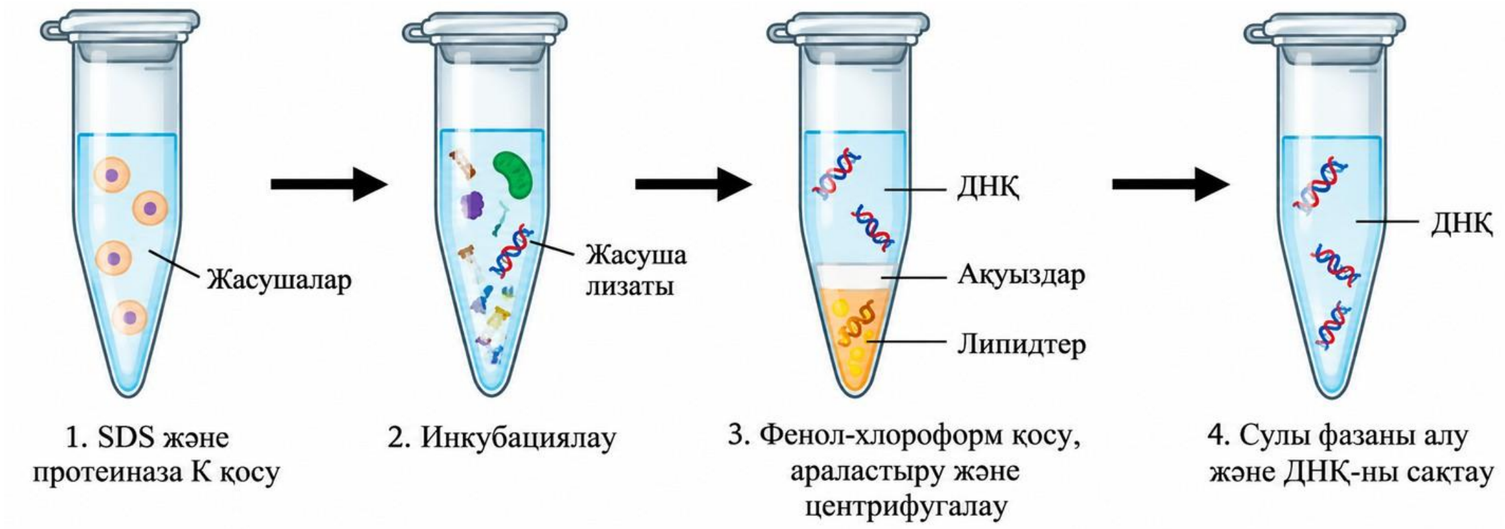
Гель-фильтрация арқылы бөліп алу

Магнитті бөлшектермен байланыстыру арқылы бөліп алу

Микроцентрифугалық колонкаларда бөліп алу

Қағаз фильтрлерден экстракциялау арқылы бөліп алу

ДНҚ бөліп алу (DNA extraction)



1.Жасушалар (Cells)

Алдымен пробиркада жасушалар болады. ДНҚ осы жасушалардың ішінде орналасқан.

2.SDS және Proteinase K қосу

Жасушаларға SDS және Proteinase K қосылады.

- SDS - жасуша мембранасын бұзады.
- Proteinase K - белоктарды ыдыратады.

Нәтижесінде жасуша бұзылып, оның ішіндегі барлық молекулалар ерітіндіге шығады. Бұл cell lysate (жасуша лизаты) деп аталады.

3. Инкубация (Incubate)

Қоспа белгілі бір температурада ұсталады. Бұл кезде белоктар толық ыдырап, ДНҚ еркін күйге өтеді.

4.Фенол-хлороформ қосу (Phenol-chloroform)

Ерітіндіге phenol-chloroform қосылып, центрифуга жасалады.

Бұл кезеңде ерітінді екі қабатқа бөлінеді:

- жоғарғы қабат - ДНҚ
- төменгі қабат - белоктар мен липидтер

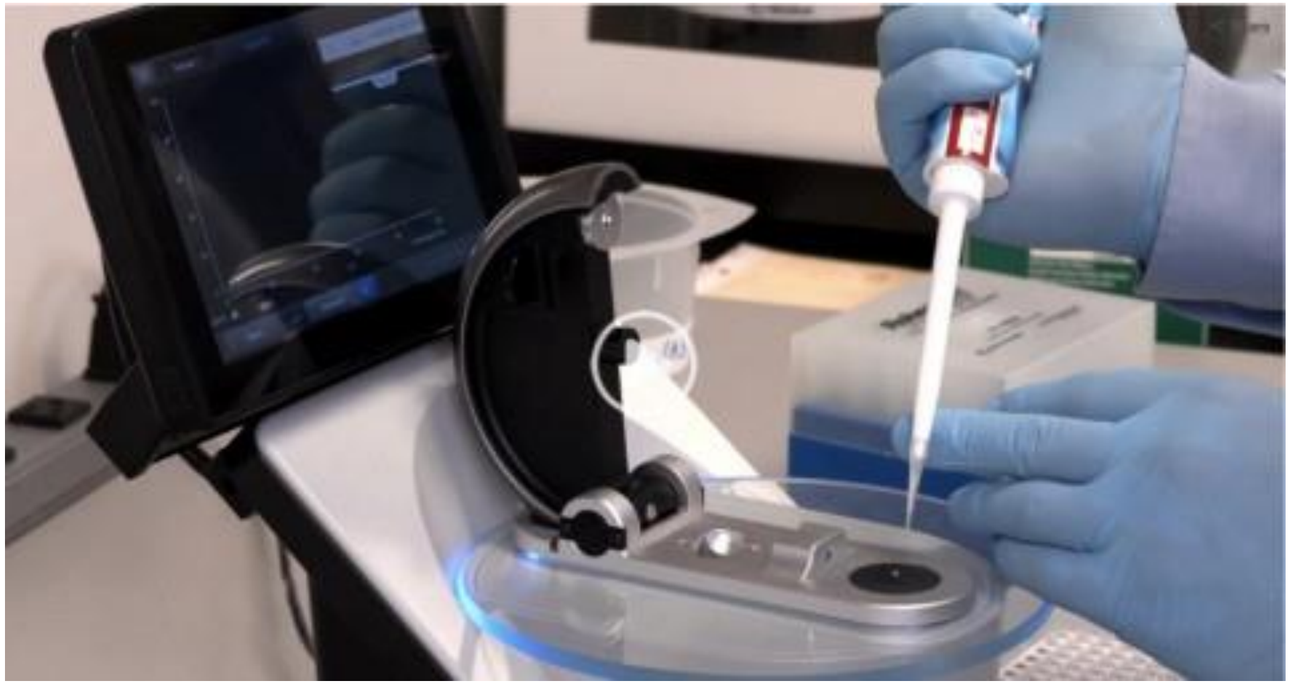
5. ДНҚ алу

Жоғарғы қабаттағы ДНҚ бар ерітінді алынып, жаңа пробиркаға көшіріледі.

Нәтижесінде таза ДНҚ алынады, оны кейін молекулалық зерттеулерде қолдануға болады.

ДНҚ тазалығын тексеретін аппарат





ДНҚ бөлініп алынғаннан кейін оның тазалығы мен концентрациясын тексеру керек. Бұл үшін көбінесе **NanoDrop спектрофотометрі** қолданылады. Үлгіден 1-2 микролитр аппаратқа тамызамыз. Аппарат ультракүлгін жарықты (UV light) пайдаланады. ДНҚ молекулалары 260 нм (нанометр) толқын ұзындығында жарықты жұтады. Ал белоктар көбінесе 280 нм толқын ұзындығында жарықты жұтады.

- Нәтижесінде экранда A260/A280 қатынасы шығады. Егер экранда шамамен 1.8 көрсетсе, онда ДНҚ таза деп есептеледі.
- 1.8 шамасында → ДНҚ таза
- 1.6-1.7 → белок араласқан болуы мүмкін
- 2.0-ден жоғары → РНҚ болуы мүмкін

ДНҚ тазалығы мен контаминацияны бақылау – ПТР нәтижесінің дәлдігі мен сенімділігінің негізгі шарты болып табылады

ДНҚ таза болмауының салдары

- Біріншіден, ПТР дұрыс жүрмейді.

Егер ДНҚ құрамында бөгде заттар (ақуыздар, фенол, тұздар) болса, олар ДНҚ-полимеразаның жұмысын тежейді. Нәтижесінде ДНҚ мүлде көбеймей қалады немесе өте әлсіз көбейеді.

- Екіншіден, жалған нәтиже беруі мүмкін.

Таза емес үлгіде реакция бұзылып, дұрыс емес нәтиже (false negative немесе false positive) алынуы мүмкін.

Контаминацияның (бөгде ДНҚ түсуі) салдары

- Біріншіден, жалған оң нәтиже (false positive) пайда болады.

Яғни шын мәнінде жоқ ДНҚ анықталғандай көрінеді, себебі бөгде ДНҚ да бірге көбейеді.

- Екіншіден, нәтиже бұрмаланады.

Үлгіде нақты қандай ДНҚ бар екенін ажырату қиын болады.

- Үшіншіден, диагностикада қателікке әкеледі.

Мысалы, ауру жоқ болса да «бар» деп шығуы мүмкін.



ДНҚ таза болмауы мен контаминацияны болдырмау жолдары

- **Біріншіден, ДНҚ-ны дұрыс тазалау қажет.**

Экстракция кезінде ақуыздар, липидтер және басқа қоспалар толық жойылуы тиіс (Proteinase K, фенол-хлороформ, т.б.).

- **Екіншіден, стерильді жағдайда жұмыс істеу керек.**

Құралдар, пробиркалар және жұмыс орны таза болуы қажет. Қолғап, стерильді ұштар (tips) қолданылуы тиіс.

- **Үшіншіден, әр үлгі үшін бөлек құрал қолдану.**

Пипетканың ұшын (tip) әр қолданған сайын ауыстыру керек, әйтпесе ДНҚ араласып кетуі мүмкін.

- **Төртіншіден, жұмыс аймақтарын бөлу**.

ДНҚ бөлу, ПТР дайындау және өнімді талдау бөлек орындарда жүргізілуі керек.

- **Бесіншіден, бақылау үлгілерін қолдану.**

(negative control) – контаминация бар-жоғын тексеруге көмектеседі.

- **Алтыншыдан, реагенттерді дұрыс сақтау.**

Ферменттер мен ерітінділер дұрыс температурада сақталуы керек, әйтпесе реакция бұзылады.

2. Реакциялық қоспаның құрамы және оның маңызы

ПТР жүргізу үшін арнайы реакциялық қоспа дайындалады. Бұл қоспа – ДНҚ-ны көбейтуге қажетті барлық компоненттерден тұратын жүйе. Әрбір компоненттің өз қызметі бар және олардың дұрыс қатынасы ПТР нәтижесіне тікелей әсер етеді.

- Біріншіден, **матрицалық ДНҚ** – бұл зерттелетін бастапқы материал. Яғни көбейтілетін ДНҚ осы болады. Егер ДНҚ болмаса, ПТР жүрмейді.
- Екіншіден, **праймерлер** – қысқа ДНҚ тізбектері, олар көбейтілетін аймақтың шекарасын анықтайды. Праймерлер ДНҚ-ның нақты бөлігіне байланысып, сол жерден бастап көбейту процесін бастайды.
- Үшіншіден, **дезоксирибонуклеотидтер (dNTP)** – жаңа ДНҚ тізбегін құруға қажетті «құрылыс материалы». Олар (A, T, G, C) негіздерінен тұрады және полимераза осы нуклеотидтерді пайдаланып жаңа тізбекті синтездейді.
- Төртіншіден, **ДНҚ-полимераза (Taq-полимераза)** – негізгі фермент. Ол праймерден бастап жаңа ДНҚ тізбегін құрастырады. Бұл фермент жоғары температурада да жұмыс істей алады, сондықтан ПТР үшін өте маңызды.
- Бесіншіден, **буфер ерітіндісі** – реакцияға қолайлы химиялық орта жасайды. Ол pH деңгейін тұрақты ұстап, ферменттің дұрыс жұмыс істеуін қамтамасыз етеді.
- Алтыншыдан, **Mg^{2+} иондары** – полимераза үшін қажет кофактор. Яғни ферменттің белсенді жұмыс істеуі үшін міндетті элемент. Егер Mg^{2+} жетіспесе немесе артық болса, реакция дұрыс жүрмейді.

3. Амплификация процесі (ПТР циклдері)

Үшіншіден, ПТР-дың негізгі кезеңі - **амплификация процесі**, яғни ДНҚ-ны көбейту кезеңі. Бұл процесс арнайы құрылғы - **термоциклерде** жүреді және бірнеше рет қайталанатын температуралық циклдерден тұрады. Әр цикл үш негізгі кезеңнен құралады:

- денатурация,
- отжиг (ренатурация)
- элонгация.



Амплификатор (термоциклер)

Денатурация кезеңі

Денатурация - ПТР-дың бастапқы және ең маңызды кезеңдерінің бірі. Бұл кезеңде ДНҚ-ның қос тізбегі **жоғары температураның (94–95°C)** әсерінен ажырайды.

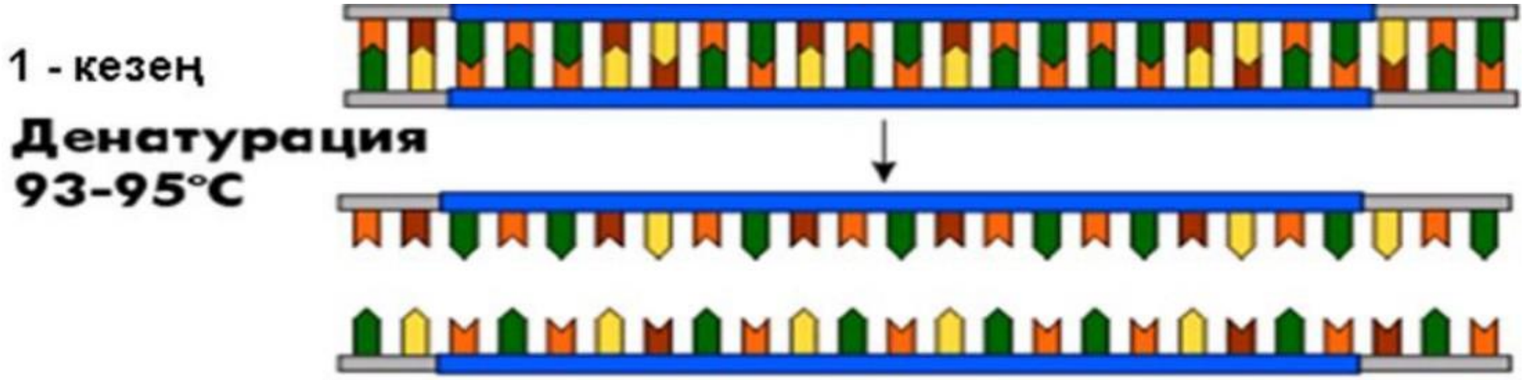
- ДНҚ-ның екі тізбегі бір-бірімен әлсіз сутектік байланыстар арқылы байланысқан, сондықтан жоғары температура әсерінен бұл байланыстар үзіліп, молекула екі жеке біртізбекті ДНҚ-ға бөлінеді.

Бұл кезде:

- ДНҚ-ның екінші реттік құрылымы (қос спираль) бұзылады,
- бірақ бірінші реттік құрылымы (нуклеотидтер реті) сақталады.

ДНҚ-ның дәл осы ажырауы ПТР үшін өте маңызды, себебі праймерлер тек біртізбекті ДНҚ-ға ғана байланыса алады.

Алғашқы цикл алдында көбінесе ұзақ бастапқы денатурация **(2–5 минут)** жүргізіледі. Бұл барлық ДНҚ молекулаларын толық ажырату үшін қажет. Кейінгі циклдарда бұл кезең қысқарып **(20–40 секунд)** қайталанып отырады.



Отжиг (жабысу, ренатурация) кезеңі

Бұл кезеңде температура **50–65°C-қа дейін төмендетіледі.** Осы жағдайда **праймерлер біртізбекті ДНҚ-ның өзіне сәйкес аймақтарына байланысады.**
Праймерлердің байланысуы комплементарлық принципке (Чаргафф ережесіне) негізделеді:
- A ↔ T
- G ↔ C

Яғни праймер тек өзіне дәл сәйкес келетін тізбекке ғана жабысады. Осы арқылы ДНҚ-ның қай бөлігі көбейетіндігі анықталады.
Праймерлер екі түрлі болады:
- forward (алдыңғы),
- reverse (кері),

және олар ДНҚ-ның екі қарама-қарсы тізбегінің екі шетіне байланысады.
Бұл кезеңнің маңызы өте жоғары, себебі:
- дұрыс байланыс → нақты өнім
- қате байланыс → артық, қажетсіз өнімдер

Температураны дұрыс таңдау өте маңызды:
- жоғары болса → праймер мүлде байланыспайды
- төмен болса → басқа жерге де жабысып кетеді

Сондықтан отжиг температурасы праймердің балқу температурасына (Tm) байланысты таңдалады (әдетте 3-5°C төмен).



Элонгация (синтез) кезеңі

Бұл кезеңде температура шамамен **72°C-қа дейін көтеріледі**. Бұл - **ДНҚ-полимеразаның ең белсенді жұмыс істейтін температурасы.**

Полимераза:

- праймердің 3'-ұшынан бастайды
- матрицалық ДНҚ бойымен қозғалады
- жаңа тізбекті 5' → 3' бағытта синтездейді

Бұл өте маңызды принцип:

ДНҚ әрқашан тек 5' → 3' бағытта синтезделеді

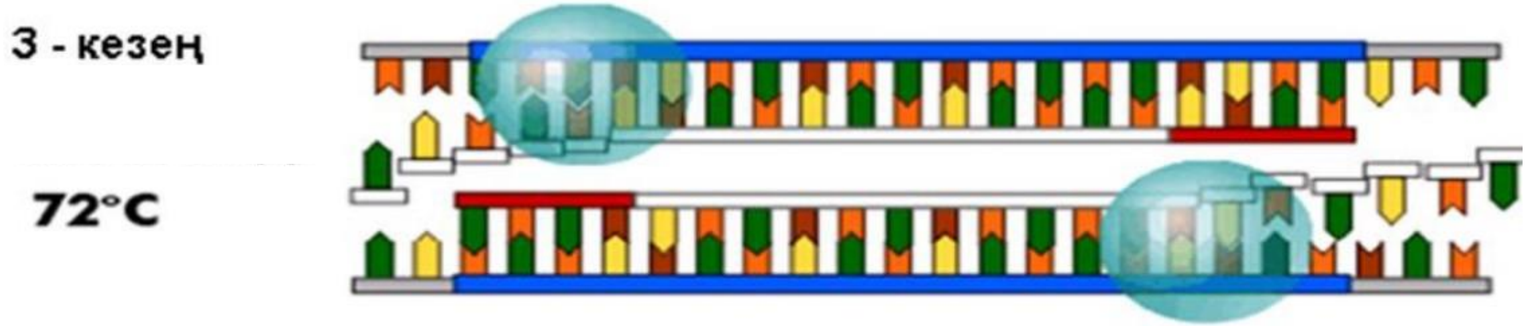
Синтез кезінде:

- матрицалық ДНҚ «үлгі» ретінде қолданылады
- dNTP-тер комплементарлы түрде қосылады (мысалы A → T, G → C)

Элонгация уақыты көбейтілетін фрагменттің ұзындығына байланысты:

- шамамен 1000 нуклеотид = 1 минут

Соңында жиі финалдық элонгация (7-10 минут) жүргізіледі. Бұл толық синтезделмей қалған барлық тізбектерді аяқтау үшін қажет.



ПТР-дің температуралық режимі (амплификация бағдарламасы)

1 цикл – бастапқы денатурация – **1 рет**

94–95 °С – 1 рет (1–5 минут)

2 цикл – **25–35 рет**

1) денатурация – 94–95 °С (15–60 секунд)
2) праймерлердің байланысуы (отжиг) – **45–60** °С аралығында (15–60 секунд)
3) элонгация (ұзару) – 72 °С (15–30 секунд)

3 цикл – соңғы элонгация – **1 рет**

72 °С – (5–8 минут)

4 цикл – реакциялық қоспаның салқындауы – **шексіз**

4–10 °С

- Алдымен реакция **бастапқы денатурация кезеңінен** өтеді. Бұл кезеңде температура 94-95°C-қа дейін көтеріліп, 1-5 минут ұсталады. Осы кезде ДНҚ-ның қос тізбегі толық ажырап, екі біртізбекті молекулаға бөлінеді. Бұл кезең ПТР-дың дұрыс басталуы үшін қажет.
- Одан кейін негізгі кезең - **амплификация циклдары басталады. Бұл цикл әдетте 25–35 рет қайталанады** және әр цикл үш кезеңнен тұрады. Бірінші, денатурация кезінде ДНҚ қайтадан ажырайды (94-95°C, 15-60 секунд). Екінші, отжиг кезеңінде температура төмендетіліп (шамамен 45-60°C), праймерлер ДНҚ-ның қажетті бөлігіне байланысады. Үшінші, элонгация кезеңінде (72°C) ДНҚ-полимераза жаңа тізбекті синтездейді. Осы үш кезеңнің әрқайсысы бірнеше секундтан ғана созылады, бірақ бірнеше рет қайталану нәтижесінде ДНҚ мөлшері өте көп көбейеді.
- Негізгі циклдар аяқталғаннан кейін **соңғы элонгация кезеңі жүргізіледі (72°C, 5–8 минут).** Бұл кезеңде толық синтезделмей қалған ДНҚ тізбектері аяқталады.
- **Соңында реакция салқындату кезеңіне өтеді** (шамамен 4-10°C). Бұл кезде реакция тоқтап, алынған ДНҚ тұрақты күйде сақталады.

4. ПТР өнімін талдау

Төртіншіден, ПТР аяқталғаннан кейін алынған өнім - **ампликон (көбейтілген ДНҚ фрагменті)** міндетті түрде талданады. Бұл кезеңнің мақсаты - ПТР дұрыс жүрді ме, нақты қажетті ДНҚ бөлігі көбейді ме және оның сапасы қандай екенін анықтау.
Ең жиі қолданылатын әдістердің бірі - **электрофорез.** Бұл әдісте ПТР өнімдері арнайы гельге салынып, **электр тогының әсерімен қозғалады.** ДНҚ молекулаларының қозғалысы олардың ұзындығына байланысты болады: қысқа фрагменттер жылдамырақ, ал ұзындары баяу қозғалады.

- Нәтижесінде гельде белгілі бір «жолақтар» (band) пайда болады. Осы жолақтардың болуы ПТР өнімінің бар екенін көрсетеді, ал олардың орналасуына қарап ДНҚ фрагментінің шамамен өлшемін анықтауға болады.

Алайда электрофорез тек ДНҚ-ның бар-жоғын және ұзындығын көрсетеді, бірақ оның ішкі құрылымын немесе нақты нуклеотидтік құрамын анықтай алмайды. Осы үшін **секвенирлеу әдісі** қолданылады. Секвенирлеу барысында ДНҚ-ның нақты нуклеотидтер реті (A, T, G, C) анықталады. Бұл әдіс мутацияларды дәл табуға, ген құрылымын зерттеуге және генетикалық өзгерістерді нақты сипаттауға мүмкіндік береді.

Қалыпты ПТР әдісі

Қалыпты ПТР (Conventional PCR) - ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін зертханалық жағдайда бірнеше миллион көшірмеге дейін көбейтуге мүмкіндік беретін молекулалық-генетикалық әдіс. Бұл әдіс ДНҚ құрамындағы белгілі бір генді немесе генетикалық өзгерісті анықтау үшін қолданылады.

Қалыпты ПТР үш негізгі кезеңнен тұрады. **Бірінші кезең** - денатурация, мұнда ДНҚ 94-95 °C температурада қыздырылып, екі тізбекке ажырайды. **Екінші кезең** - праймерлердің байланысуы, яғни температура шамамен 50-65 °C дейін төмендегенде праймерлер ДНҚ-ның қажетті аймақтарына байланысады. **Үшінші кезең** - элонгация, мұнда 72 °C температурада Taq ДНҚ-полимераза ферменті жаңа ДНҚ тізбектерін синтездейді. Бұл кезеңдер әдетте 25-35 рет қайталанып, қажетті ДНҚ фрагментінің көшірмелері көбейеді.

- **Қалыпты ПТР-дің негізгі ерекшелігі** - нәтиже реакция аяқталғаннан кейін анықталады. Ол үшін ПТР өнімдері агарозды гель-электрофорез арқылы бөлініп, арнайы бояғыштың көмегімен визуализацияланады. Гельде қажетті өлшемдегі ДНҚ жолағының пайда болуы зерттелетін фрагменттің бар екенін көрсетеді. Алайда бұл әдіс бастапқы ДНҚ мөлшерін дәл анықтауға арналмаған.

Нақты уақыттағы ПТР (Real-time PCR) әдісі

Нақты уақыттағы ПТР (Real-time PCR немесе qPCR) – ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін көбейтумен қатар, оның мөлшерін реакция барысында флуоресценттік сигнал арқылы бақылауға мүмкіндік беретін молекулалық-генетикалық әдіс.
Бұл әдістің негізгі кезеңдері қалыпты ПТР-мен бірдей: денатурация, праймерлердің байланысуы және элонгация. Бірақ Real-time PCR кезінде реакциялық қоспаға қосымша флуоресценттік бояғыштар (мысалы, SYBR Green) немесе арнайы флуоресценттік зондтар (мысалы, TaqMan) қосылады.
ДНҚ көшірмелерінің саны көбейген сайын флуоресценттік сигнал да артады. Арнайы оптикалық жүйесі бар ПТР аппараты әр циклдегі сигналды тіркеп, нәтижені компьютер экранында амплификация қисығы түрінде көрсетеді.

- **Real-time PCR әдісінде маңызды көрсеткіштердің бірі** – Cq (немесе Ct) мәні. Бұл флуоресценттік сигналдың белгіленген шекті деңгейден асқан цикл нөмірін білдіреді. Егер бастапқы үлгіде ДНҚ көп болса, сигнал шекті деңгейге ертерек жетеді, яғни Cq мәні төмен болады. Ал бастапқы ДНҚ мөлшері аз болса, Cq мәні жоғары болады.

Real-time PCR әдісі ДНҚ-ның бар-жоғын анықтаумен қатар, арнайы стандарттар немесе салыстырмалы есептеу әдістері арқылы оның бастапқы мөлшерін бағалауға мүмкіндік береді. Бұл әдіс инфекциялық ауруларды диагностикалауда, ген экспрессиясын зерттеуде (РНҚ алдын ала кДНҚ-ға айналдырылған жағдайда) және генетикалық зерттеулерде кеңінен қолданылады.

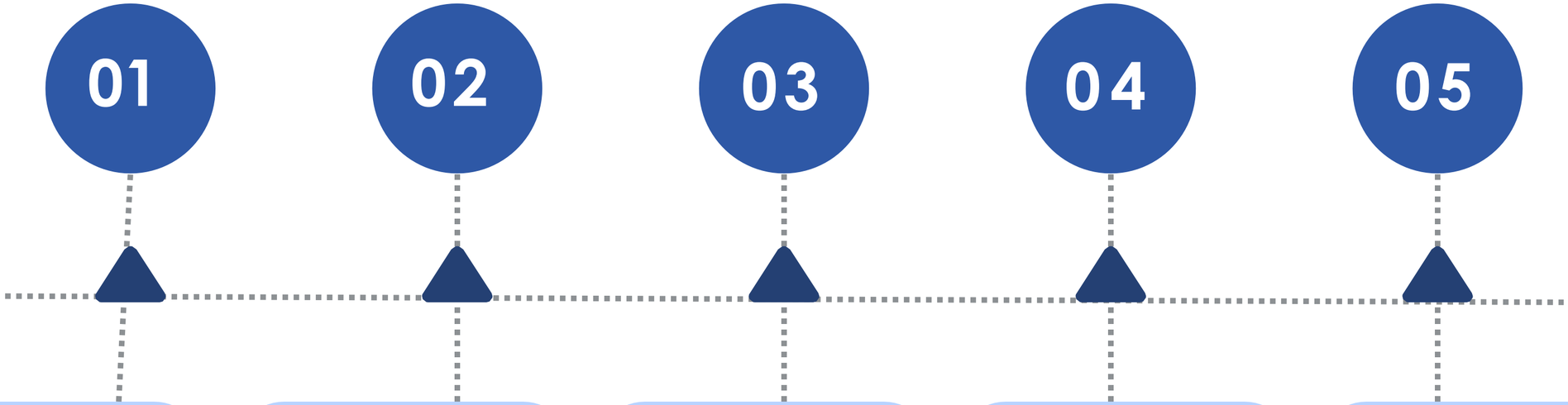
Қалыпты ПТР мен Real-time PCR арасындағы негізгі айырмашылықтар

Қалыпты ПТР мен Real-time PCR әдістерінің негізгі мақсаты - ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін көбейту. Екі әдісте де ДНҚ-полимераза, праймерлер, нуклеотидтер және температуралық циклдер қолданылады. Алайда олардың нәтижені анықтау тәсілдері мен мүмкіндіктері әртүрлі.

- **Қалыпты ПТР кезінде** ДНҚ көбейтілгеннен кейін реакция өнімі агарозды гель-электрофорез арқылы зерттеледі. Нәтижесінде қажетті ДНҚ фрагментінің бар-жоғы және оның шамамен ұзындығы анықталады. Сондықтан бұл әдіс негізінен сапалық талдау үшін қолданылады.
- **Real-time PCR кезінде** ДНҚ-ның көбеюі реакция жүріп жатқан уақытта флуоресценттік сигнал арқылы бақыланады. Нәтижесінде зерттелетін ДНҚ фрагментінің бар-жоғын анықтауға және оның бастапқы мөлшерін бағалауға болады. Сонымен қатар, әдетте гель-электрофорез жүргізу қажет емес.

Real-time PCR әдісінің артықшылығы - нәтижені реакция барысында бақылау, сандық талдау жүргізу және реакциядан кейін сынаманы ашу қажеттілігінің азаюы арқылы контаминация қаупін төмендету. Бірақ бұл әдіс арнайы оптикалық жүйесі бар аппаратты және қымбатырақ реагенттерді қажет етеді.

ПТР әдістерінің негізгі қолданылу салалары:



Инфекциялық аурулардың диагностикасы

Бактериялар мен вирустардың генетикалық материалын анықтау үшін қолданылады. Мысалы, туберкулез, В гепатиті және COVID-19 инфекцияларын диагностикалауда пайдаланылады.

Тұқым қуалайтын аурулардың диагностикасы

Муковисцидоз, орақ тәрізді жасушалы анемия және талассемия сияқты ауруларға байланысты генетикалық өзгерістерді анықтауға көмектеседі.

Онкологиялық диагностика

Қатерлі ісік жасушаларындағы белгілі бір генетикалық мутацияларды анықтау және кейбір жағдайларда емдеу тиімділігін бақылау үшін қолданылады.

Репродуктивті генетика

Бедеулікке байланысты кейбір генетикалық өзгерістерді анықтау, сондай-ақ эмбриондарға преимплантациялық генетикалық зерттеу жүргізу кезінде қолданылады.

Пренаталдық диагностика

Ұрықтың кейбір тұқым қуалайтын ауруларын және белгілі генетикалық мутацияларын анықтауға мүмкіндік береді.

Қорытынды

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) - ДНҚ-ның белгілі бір бөлігін бірнеше миллион көшірмеге дейін көбейтуге мүмкіндік беретін маңызды молекулалық-генетикалық әдіс. Оның негізгі принципі денатурация, праймерлердің байланысуы және элонгация кезеңдеріне негізделген. Қалыпты ПТР мен нақты уақыттағы ПТР-дің (Real-time PCR) басты айырмашылығы - нәтижені анықтау тәсілінде. Қалыпты ПТР ДНҚ фрагментінің бар-жоғын реакция аяқталғаннан кейін анықтаса, Real-time PCR ДНҚ-ның көбеюін реакция барысында бақылап, оның бастапқы мөлшерін бағалауға мүмкіндік береді. Екі әдіс те тұқым қуалайтын ауруларды, генетикалық өзгерістерді және инфекциялық қоздырғыштарды анықтауда маңызды рөл атқарады.

Өзін-өзі тексеруге арналған сұрақтар

1. Полимеразалы тізбекті реакцияның негізгі принципі қандай?
2. ПТР реакциясының үш негізгі кезеңін сипаттаңыз.
3. ПТР реакциясына қандай компоненттер қажет?
4. Қалыпты ПТР мен real-time PCR арасындағы негізгі айырмашылықтар қандай?
5. Real-time PCR әдісінде флуоресценттік сигнал қалай қалыптасады?
6. Cq (Ct) көрсеткіші нені білдіреді?
7. SYBR Green мен TaqMan зондтарының айырмашылықтары қандай?
8. ПТР нәтижелерінде жалған оң және жалған теріс жауаптардың пайда болу себептері қандай?
9. Амплификациялық қисықтар қалай интерпретацияланады?

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Берсімбаев Р. І. Молекулалық биология. - Алматы: Қазақ университеті, 2016.
2. Огурцов А. Н., Близнюк О. Н., Масалитина Н. Ю. Основы генной инженерии и биоинженерии. Часть 1: Молекулярные основы генных технологий. - Харьков: НТУ «ХПИ», 2018.
3. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. - Лаборатория знаний, 2021.

Ғаламтор ресурстары

4. http://molbiol.ru/