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

Пән атауы: Геномика және молекулалық диагностика

Дәріс 12

РНҚ диагностикасы және RT-PCR

Лектор: б.ғ.к., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: РНҚ молекулаларының диагностикалық маңызын, Кері транскрипциялы ПЦР (КТ-ПЦР/RT-PCR) әдісінің молекулалық механизмін және заманауи клиникалық РНҚ-диагностикасының негізгі қолдану бағыттарын түсіндіру.

Оқыту нәтижелері

Дәрісті меңгергеннен кейін магистрант:

1. РНҚ молекуласының құрылымдық және функционалдық ерекшеліктерін сипаттай алады.
2. РНҚ диагностикасының негізгі молекулалық принциптерін түсіндіре алады.
3. Биологиялық үлгілерден РНҚ бөліп алу және оның сапасын бағалау әдістерін ажырата алады.
4. Кері транскрипция процесінің молекулалық механизмін түсіндіре алады.
5. RT-PCR және RT-qPCR технологияларының жұмыс принциптерін салыстыра алады.
6. Комплементарлық ДНҚ синтезінің молекулалық диагностикадағы маңызын сипаттай алады.
7. РНҚ диагностикасының инфекциялық ауруларды анықтау мен ген экспрессиясын зерттеудегі қолданылуын талдай алады.
8. RT-PCR нәтижелерінің аналитикалық сенімділігіне әсер ететін факторларды бағалай алады.

Дәрістің жоспары

1. РНҚ молекуласының құрылымдық-функционалдық ерекшеліктері және РНҚ диагностикасының ғылыми негіздері.
2. Кері транскрипция мен RT-PCR технологиясының молекулалық механизмі, негізгі кезеңдері және аналитикалық ерекшеліктері.
3. RT-PCR және RT-qPCR әдістерінің ген экспрессиясын зерттеуде және инфекциялық ауруларды диагностикалауда қолданылуы.



Кіріспе бөлім

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) - бұл ДНҚ молекуласының табиғи жағдайда жүретін репликация (екі еселену) процесін пробиркада жүзеге асыруға бағытталған және миллиондаған нуклеотидтерден тұратын молекулалардың ішінен арнайы зерттеліп жатқан ДНҚ молекуласының бөлігін анықтауға арналған әдіс. Басқаша айтқанда, in vitro жағдайында ДНҚ молекуласының белгілі бір тізбегін ***ферментативті жолмен*** көбейту.

ПТР үшін қажет компоненттер:



ДНҚ



Праймерлер



Нуклеотидтер



ДНҚ-полимераза



Ерітінді

Полимеразды тізбекті реакция





РНҚ ДИАГНОСТИКАСЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ НЕГІЗДЕРІ

РНҚ диагностикасы - жасушадағы гендердің экспрессия деңгейін (транскриптомика) немесе құрамында РНҚ бар вирустардың (РНҚ-вирустар: SARS-CoV-2, ВГС, АИТВ, тұмау) бар-жоғын анықтауға бағытталған молекулалық-генетикалық талдау әдісі.

ДНҚ-мен салыстырғанда РНҚ диагностикасының негізгі өзгешеліктері:

- ***Динамикалық көрсеткіш:*** ДНҚ геномның тұрақты құрылымын көрсетсе, мРНҚ (матрицалық РНҚ) жасушаның берілген уақыт сәтіндегі физиологиялық күйін, стресске жауабын және гендердің белсенділігін көрсетеді.
- ***Тұрақсыздық:*** РНҚ молекуласында 2'-ОН гидроксил тобының болуы оны гидролизге бейім етеді. Сондай-ақ қоршаған ортада РНҚ-ны ыдыратын РНКаза (RNase) ферменттері өте тұрақты әрі белсенді.



РНҚ ДИАГНОСТИКАСЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ НЕГІЗДЕРІ

Стандартты ДНҚ-полимераза РНҚ матрицасын тікелей амплификациялай алмайды. Соған байланысты РНҚ алдымен ***кері транскриптаза (ревертаза)*** ферментінің көмегімен комплементарлы ДНҚ-ға (кДНҚ / cDNA) айналдырылады.

Екі вирустан (Avian myeloblastosis virus және Moloneymurine leukemia virus) бөлініп алынған кері транскриптаза ферменттері қолданылады. Бұл ферменттер ***жоғары температураға төзімсіз***, яғни 42° жоғары белсенділігін жоғалта бастайды. Бұл температурада РНҚ молекуласы оңай екінші реттік құрылым түзеді және реакция тиімділігі төмендейді.

РНҚ-дан кДНҚ синтездеуге қажетті праймер түрлері:

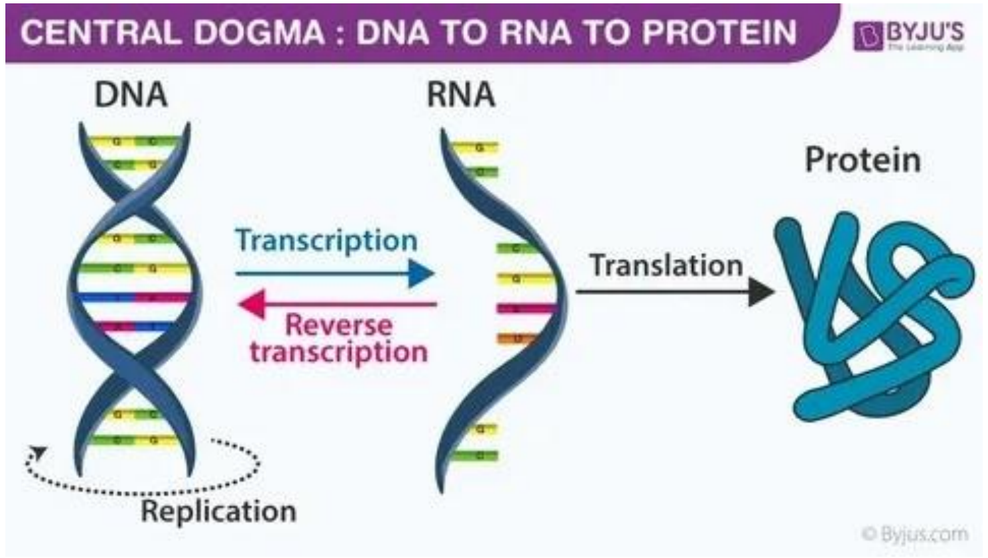
- ***Oligo(dT) праймерлері:*** Эукариоттық мРНҚ-ның 3'-соңындағы Poly(A) құйрығына гибридтеседі. Барлық мРНҚ пулын синтездеуге қолайлы.

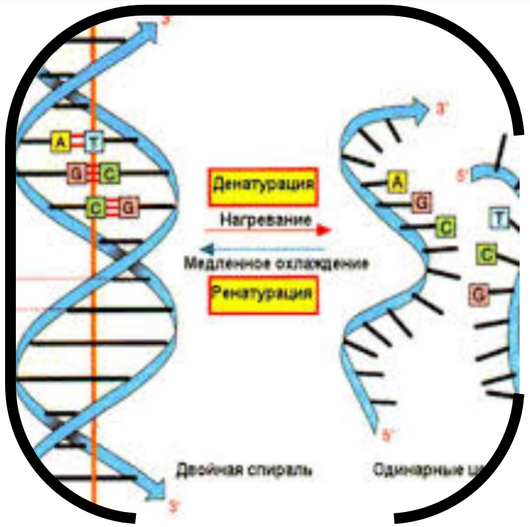
- ***Кездейсоқ гексамерлер*** (Random hexamers): 6 нуклеотидтен тұратын кездейсоқ тізбектер. Барлық РНҚ түрлеріне (рРНҚ, тРНҚ, толық емес мРНҚ) байланысады.

- ***Арнайы (Спецификалық) праймерлер:*** Тек мақсатты РНҚ тізбегіне бағытталған праймер. Вирустық диагностикада жиі қолданылады.

Кері транскрипция ПЦР (RT-PCR)

- **Кері транскрипциялық ПЦР (RT-PCR)** - ДНҚ-дағы РНҚ-ның кері транскрипциясын және ПЦР арқылы арнайы ДНҚ молекулаларын күшейтуді біріктіретін зертханалық әдіс. Ол негізінен белгілі бір РНҚ мөлшерін өлшеу үшін қолданылады. Бұған флуоресценцияны, нақты уақыттағы ПТР немесе сандық ПТР (qPCR) деп аталатын әдісті қолдану арқылы амплификация реакциясын бақылау арқылы қол жеткізіледі.
- Кері транскрипция - ПЦР геннің немесе хромосоманың белгілі бір өзгерістерін анықтау үшін немесе қатерлі ісік сияқты ауруды диагностикалауға көмектесетін белгілі бір гендерді белсендіру үшін пайдалануға болады. Оны инфекцияны диагностикалау және бақылау үшін адамның иммун тапшылығы вирусы (АИТВ) және С гепатиті вирусы сияқты кейбір вирустардың РНҚ-сын зерттеу үшін де пайдалануға болады.

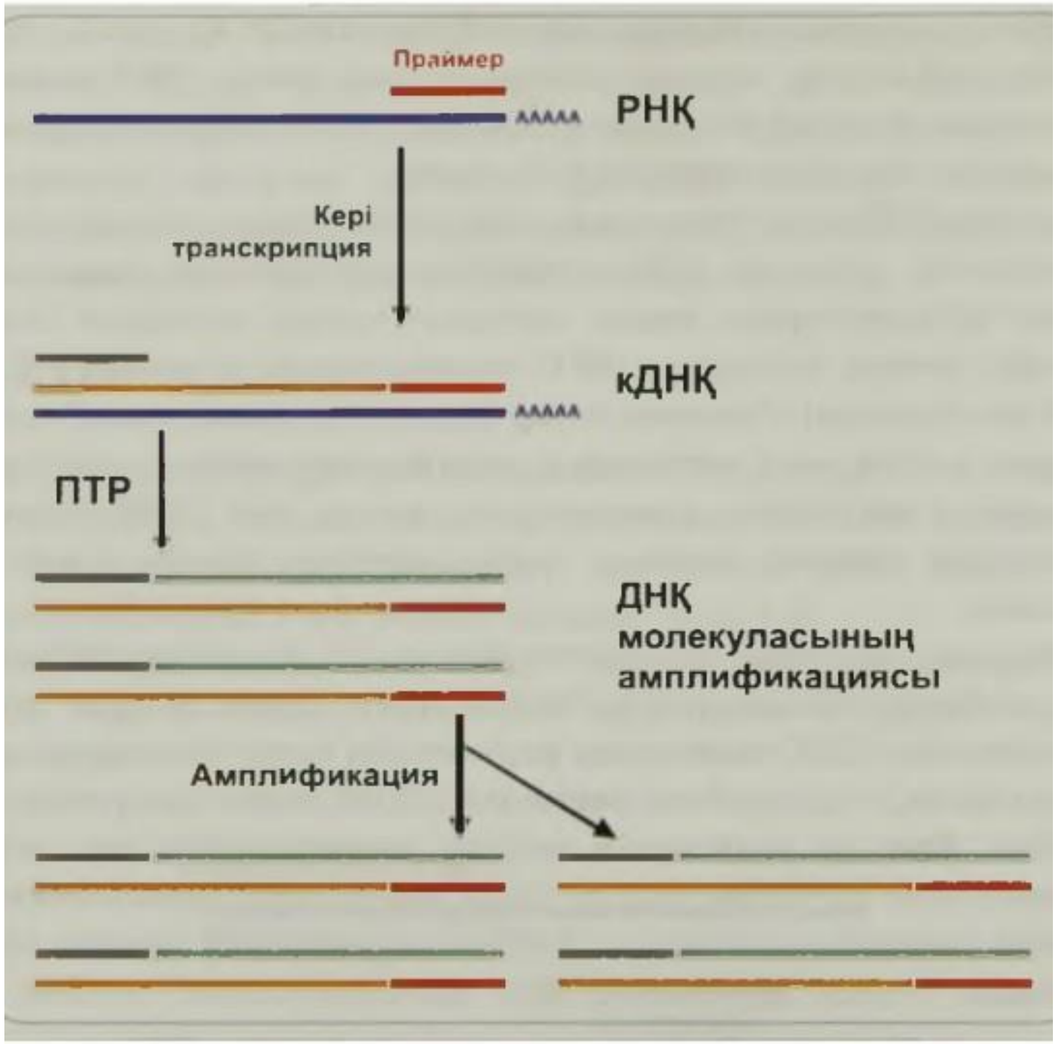




Тарихы

- РНҚ диагностикасының тарихы 1970 жылы бастау алады. Howard Temin және David Baltimore бір-бірінен тәуелсіз түрде ретровирустардан ***кері транскриптаза*** (геномдық РНҚ негізінде комплементарлы ДНҚ - кДНҚ синтездейтін ревертаза ферменті) ферментін тапты.
- Осы ашылуға дейін генетикада «Орталық догма» бойынша генетикалық ақпарат тек ДНҚ - РНҚ - ақуыз бағытында өтеді деп есептелетін. Кері транскриптазаның табылуы ақпараттың кері бағытта да (РНҚ - ДНҚ) берілетінін дәлелдеп, 1975 жылы бұл ғалымдарға Нобель сыйлығы берілді.
- Классикалық ПЦР тек ДНҚ-ны көбейте алатындықтан, ғалымдар РНҚ вирустарын (мысалы, Тұмау, АҚТҚ, Гепатит С) анықтау және жасушадағы РНҚ экспрессиясын зерттеу үшін ***екі әдісті*** біріктірді:
- 1 кезең (Кері транскрипция): РНҚ матрицасынан кері транскриптаза арқылы комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) алынады.
- 2 кезең (ПЦР): Пайда болған кДНҚ классикалық ПЦР арқылы көбейтіледі.

1988 жылы M.A. Frohman және оның әріптестері РНҚ тізбектерін ПЦР арқылы күшейту тәсілін сипаттап, RT-PCR стандартын іске қосты.



4.7-сурет. Кері транскрипция арқылы жүретін ПТР (*RT-PCR*)

1. Бірінші тізбектің реакциясы:

Комплементарлы ДНҚ (cDNA) кері транскриптаза ферменті арқылы dNTP-ден мРНҚ үлгісінде түзіледі. Реакция компоненттері ДНҚ праймерімен және кері транскриптаза буферімен 37 °C температурада бір сағатқа араласады.

2. Екінші тізбектің реакциясы:

Кері транскрипция аяқталғаннан кейін және мРНҚ шаблонында cDNA түзілгеннен кейін келесі циклдар стандартты ПТР әдісімен жасалады.
30 күшейту циклынан кейін қажетті тізбектің миллиондаған көшірмелері жасалады.

Сипаттамасы	Бір сатылы RT-PCR (One-step RT-PCR)	Екі сатылы RT-PCR (Two-step RT-PCR)
Реакция орны	Кері транскриптация мен ПТР бір пробиркада өтеді.	Кері транскриптация мен ПТР бөлек екі реакцияда өтеді.
Артықшылығы	Жылдам, контаминация қаупі төмен, рутинді диагностикаға ыңғайлы.	кДНҚ қоры сақталады, бір үлгінен бірнеше генді талдауға болады.
Кемшілігі	Реакция жағдайларын (буфер, температура) оңтайландыру қиынырақ.	Уақытты көп алады, пробиркаларды ашқанда контаминация қаупі жоғары.

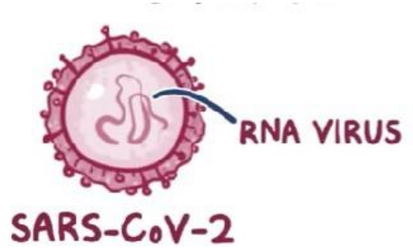
РНҚ ДИАГНОСТИКАСЫНЫҢ ПРАКТИКАЛЫҚ ҚОЛДАНЫСЫ

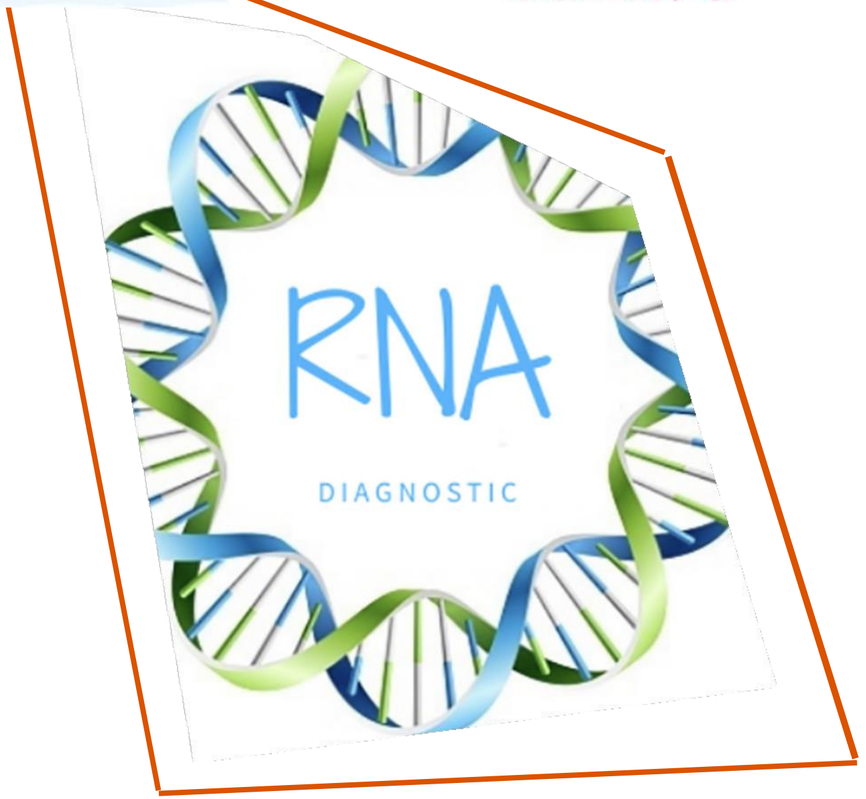
Инфекциялық ПТР-диагностика: РНҚ-вирустардың геномын анықтау және вирустық жүктемені (viral load) сан жағынан бағалау (SARS-CoV-2, Гепатит С, АИТВ-1).

Онкология: Изоформалардың транскрипциялық белсенділігін, онкогендердің экспрессиясын және химерлі гендерді (бейімделген транслокациялар, мысалы BCR-ABL) анықтау.

Өсімдіктер мен жануарлар биотехнологиясы: Стресс факторларына жауап беретін гендердің жауабын зерттеу.







COVID-19 ДИАГНОСТИКАСЫНДАҒЫ RT-PCR

RT-PCR (Кері транскриптациялық полимеразды тізбекті реакция) - COVID-19 пандемиясы кезінде бүкіл әлем бойынша SARS-CoV-2 вирусын анықтауда ең негізгі, жоғары сезімталдыққа ие және сенімді ***"алтын стандарт"*** ретінде бекітілген молекулалық-генетикалық әдіс.

SARS-CoV-2 - оң тізбекті РНҚ-вирус. Стандартты ПТР тек ДНҚ-мен жұмыс істей алатындықтан, вирус РНҚ-сын анықтау үшін алдымен кері транскриптация (RT) арқылы комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделеді.

Бұл реакция екі негізгі қадамнан тұрады:

1. Кері транскриптация (RT сатысы): Пациенттің мұрын-жұтқыншағынан алынған жағындыдан вирус РНҚ-сы бөліп алынады. Оған ревертаза деп аталатын арнайы фермент қосылып, вирус РНҚ-сының негізінде оған толық комплементарлы ДНҚ (кДНҚ) синтезделеді. Бұл саты РНҚ-дағы ақпаратты ПТР-ге түсінікті ДНҚ форматына көшіріп береді.
2. ПТР амплификациясы (PCR сатысы): Пайда болған тұрақты кДНҚ енді ПТР аппаратында миллиондаған есе көбейтіледі. Реакция барысында арнайы флуоресцентті зондтар вирус ДНҚ-сына байланысып, жарық сигналын береді.

Егер құрал флуоресцентті сигналды тіркесе (Ct мәні анықталса), бұл үлгіде вирус РНҚ-сының болғанын, яғни адамның COVID-19 жұқтырғанын (оң нәтиже) дәлелдейді.



RT-PCR АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ

- Сезімталдық: RT-PCR жоғары сезімталдыққа ие және ген экспрессиясының немесе вирустар мен басқа қоздырғыштардың концентрациясының өте төмен деңгейін анықтай алады.

- Ерекшелік: RT-PCR әдісі мақсатты РНҚ немесе ДНҚ молекулаларын арнайы күшейтуге мүмкіндік береді, бұл детекцияның жоғары ерекшелігін қамтамасыз етеді және жалған нәтижелерді азайтады.

- Жоғары жылдамдық және автоматтандыру: заманауи RT-PCR әдістері жоғары жылдамдыққа ие және оларды қысқа мерзімде көптеген үлгілерді талдауға мүмкіндік беретін оңай автоматтандыруға болады.

- Көптеген үлгілерді зерттеу мүмкіндігі: RT-PCR белгілі бір гендердің немесе патогендердің болуы немесе экспрессия деңгейі үшін көптеген үлгілерді бір уақытта талдауға мүмкіндік береді.

RT-PCR КЕМШІЛІКТЕРІ

- Бастапқы материалдың сапасына қойылатын талаптар: RT-PCR кері транскрипция үшін жоғары сапалы және таза РНҚ қажет, бұл үлгілердің кейбір түрлерімен жұмыс істегенде немесе ингибиторлар болған кезде қиындық тудыруы мүмкін.

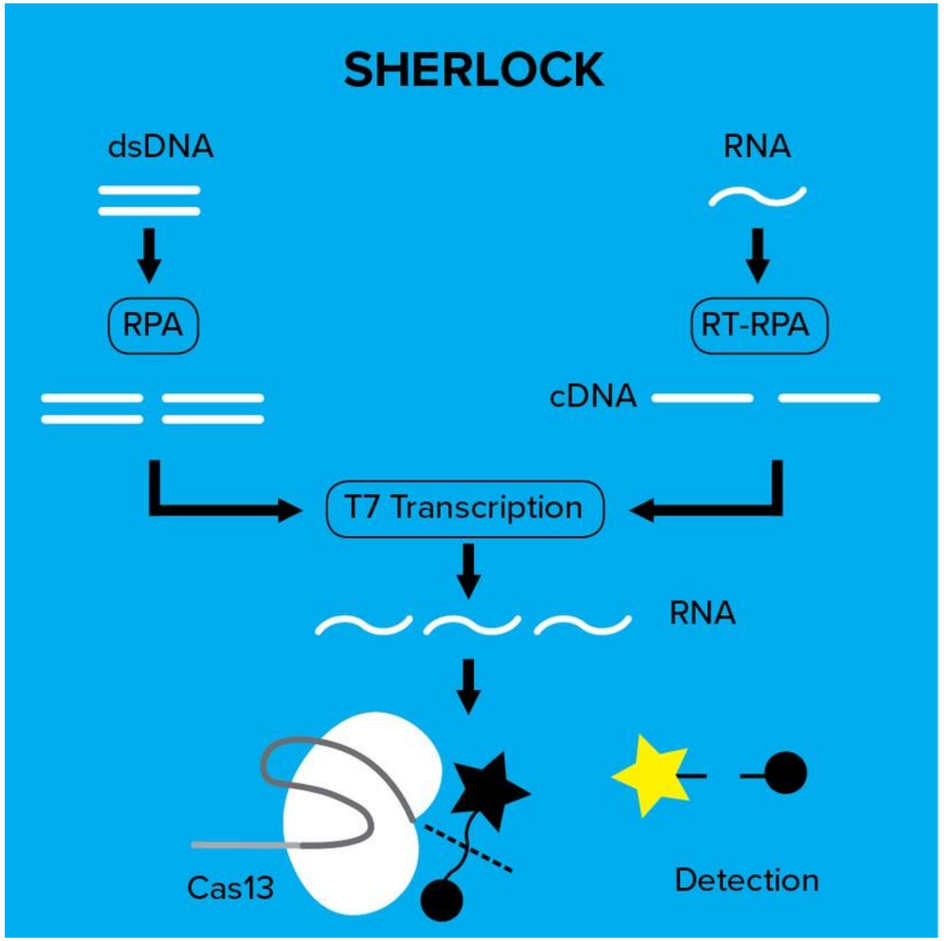
- Ластану мүмкіндігі: әдістің жоғары сезімталдығына байланысты үлгілер арасында айқаспалы ластану қаупі бар, бұл жалған нәтижелерге әкелуі мүмкін.

- Шығындар: жаңа технологиялардың пайда болуымен RT-PCR құны төмендегенімен, бұл әдіс әлі де айтарлықтай жабдық пен реагент шығындарын талап етуі мүмкін.

РНҚ ДИАГНОСТИКАНЫҢ НЕГІЗГІ ЗАМАНАУИ БАҒЫТТАРЫ

CRISPR негізіндегі экспресс-диагностика (SHERLOCK)

- CRISPR - Cas ферменттерінің (әсіресе РНҚ-ны арнайы кесетін ***Cas13*** және ДНҚ/РНҚ-ны кесетін ***Cas12***) жанама кесу (collateral cleavage) қасиетіне негізделген. Нысаналы РНҚ-ға бағытталған нұсқаушы РНҚ (guide RNA) қосылған кезде, **Cas13 ферменті белсендіріліп**, айналадағы басқа молекулаларды (репортерлерді) жаппай кеседі. Бұл процесс арнайы флуоресцентті немесе қағаз жолақшаларда (lateral flow) көрінетін сигнал береді.
- ПЦР аппаратынсыз, бөлме температурасында немесе тест-жолақтарда (lateral flow assay) 15-30 минут ішінде инфекцияларды (вирустар, бактериялар) және жекелеген SNP мутацияларды дәл анықтайды (POC - Point-of-Care диагностика). Зика, Денге, тұмау вирустарын және COVID-19 (SARS-CoV-2) анықтауда қолданылады.



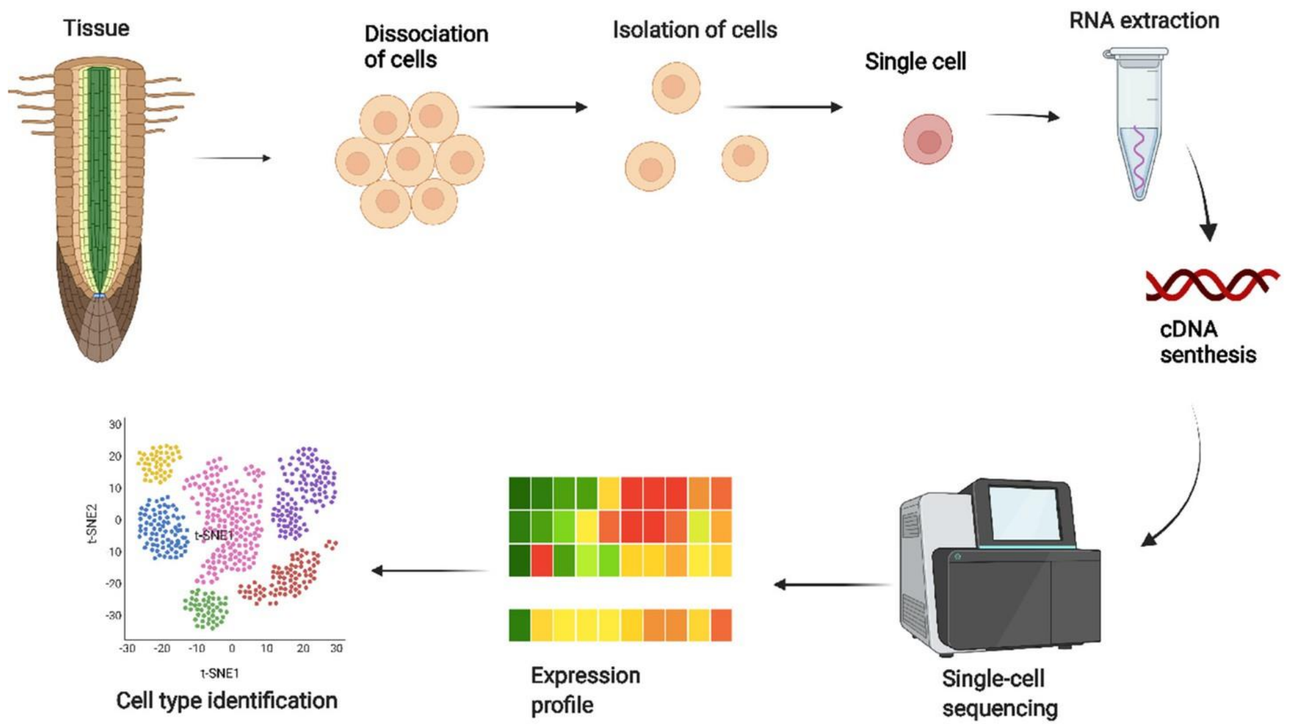
РНҚ ДИАГНОСТИКАНЫҢ НЕГІЗГІ ЗАМАНАУИ БАҒЫТТАРЫ

Бір жасушалы транскриптомика (Single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)

- Бұрын транскриптомика бүкіл ұлпадан алынған «орташа» РНҚ-ны талдаса, scRNA-seq әрбір жасушаның экспрессиялық профилін жеке-жеке оқуға мүмкіндік береді.

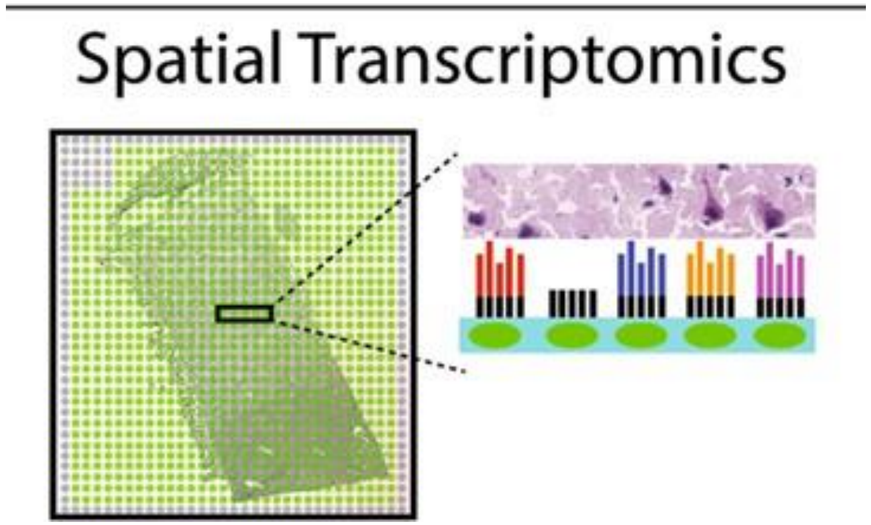
Қолданылуы:

- Онкологияда ісік микроортасындағы сирек кездесетін діңдік немесе резистентті жасушаларды анықтау.
- Репродуктивті медицинада эмбриогенездің алғашқы сатыларындағы жасушалардың дифференциациясын бақылау.
- Иммунологияда аутоиммундық аурулар кезіндегі иммундық жасушалардың субпопуляцияларын картаға түсіру.



РНҚ ДИАГНОСТИКАНЫҢ НЕГІЗГІ ЗАМАНАУИ БАҒЫТТАРЫ

Кеңістіктік транскриптомика (Spatial Transcriptomics)



- Жасушаларды оқшауламай, ұлпа гистологиялық кесіндісінің үстінде тікелей РНҚ экспрессиясын зерттеу.
- РНҚ молекулаларының ұлпада қай жерде (орналасуын) экспрессияланып жатқанын сақтайды. Бұл ісік шекараларын, ***нейродегенеративті аурулардағы*** (Альцгеймер, Паркинсон) ми ұлпасының өзгерістерін диагностикалауда төңкеріс жасады.

РНҚ-диагностиканың негізгі трендтері мен болашағы

Мультиомикалық диагностика:
РНҚ талдауын ДНҚ мутацияларымен (NGS), протеомикамен және метаболомикамен бірге кешенді диагностикалық панельдерге біріктіру.

AI және биоинформатика интеграциясы:
Транскриптомалық деректердің өте үлкен көлемін (big data) өңдеу үшін машиналық оқыту (ML) алгоритмдері қолданылады. Бұл мыңдаған РНҚ экспрессияларының ішінен нақты ауруға тән «РНҚ-сигнатураны» (RNA signature) табуға мүмкіндік береді.

Персонализацияланған терапия мониторингі:
мРНҚ және таргетті терапияны (мысалы, антисенстік олигонуклеотидтер - ASO) қабылдап жатқан пациенттерде емнің тиімділігін транскриптомалық деңгейде нақты уақытта бақылау.

ҚОРЫТЫНДЫ

Қорытындылай келе, РНҚ диагностикасы мен RT-PCR (кері транскрипциялық полимеразды тізбекті реакция) заманауи молекулалық биология, вирусология және медицинаның ең маңызды әрі жоғары сезімтал зерттеу құралдарының бірі болып табылады. ДНҚ геномның тұрақты құрылымын көрсетсе, РНҚ диагностикасы жасушаның нақты уақыттағы физиологиялық күйін, гендердің экспрессиялық белсенділігін және қауіпті вирус қоздырғыштарының (соның ішінде SARS-CoV-2) бар-жоғын дәл анықтауға мүмкіндік береді.

РНҚ молекуласының табиғи тұрақсыздығы мен тез ыдырайтын қасиетіне қарамастан, кері транскриптация (ревертаза ферменті) арқылы оны тұрақты кДНҚ форматына көшіріп, ПТР көмегімен миллиондаған есе көбейту ғылымдағы үлкен серпіліс болды. Бұл әдіс арқылы инфекциялық ауруларды ерте кезеңде айнытпай тануға, вирус мөлшерін (Ct мәні арқылы вирустық жүктемені) сандық тұрғыдан бағалауға, сондай-ақ онкологиялық және генетикалық патологияларды терең зерттеуге жол ашылды.

ӨЗІН-ӨЗІ ТЕКСЕРУГЕ АРНАЛҒАН СҰРАҚТАР

1.РНҚ диагностикасының негізгі мақсаты қандай?
2.ДНҚ және РНҚ молекулаларының құрылымдық айырмашылықтары неде?
3.РНҚ бөліп алу барысында қандай зертханалық талаптар сақталуы тиіс?
4.Кері транскрипция процесі қандай фермент арқылы жүзеге асырылады?
5.RT-PCR технологиясының негізгі кезеңдерін сипаттаңыз.
6.RT-PCR және RT-qPCR әдістерінің айырмашылығы неде?
7.РНҚ геномы бар вирустарды диагностикалауда RT-PCR қалай қолданылады?
8.РНҚ деградациясы молекулалық зерттеу нәтижелеріне қалай әсер етеді?

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. – М.: Лаборатория знаний, 2021.
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. Берсімбаев Р. І. Молекулалық биология. – Алматы: Қазақ университеті, 2016.
4. Молекулалық биология бойынша ақпараттық ресурс. – URL: http://molbiol.ru/