

ПРОБЛЕМИ ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР) ТА ШЛЯХИ ЇХ РОЗВ'ЯЗАННЯ

М.І. Вороняк, М.В. Кокоруз, С.С. Тераз

ДУ «Інститут патології крові
та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Резюме. Проаналізовано проблеми і помилки, що виникають на різних етапах під час проведення ПЛР. Особливу увагу приділено організації лабораторії, проблемі контамінації способам, які дають змогу підвищити рівень ефективності реакції та уникнути хибнопозитивних чи хибнонегативних результатів.

Ключові слова: полімеразно-ланцюгова реакція, контамінація, нуклеїнова кислота, амплікон, хибнопозитивний результат, хибнонегативний результат.

ПРОБЛЕМЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) И СПОСОБЫ ИХ РЕШЕНИЯ

М.И. Вороняк, М.В. Кокоруз, С.С. Тераз

ГУ «Институт патологии крови
и трансфузионной медицины НАМН Украины», Львов

Резюме. Проанализировано проблемы и ошибки, которые возникают на разных этапах при проведении ПЦР. Особенное внимание уделяется организации лаборатории, проблеме контаминации и способам, что дают возможность повысить уровень эффективности реакции и избежать ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Ключевые слова: полимеразно-цепная реакция, контаминация, нуклеиновая кислота, ампликон, ложноположительный результат, ложноотрицательный результат.

THE PROBLEMS OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND METHODS OF THEIR SOLUTION

M.I. Vroniak, M.V. Kokoruz, S.S. Teraz

SI «Institute of Blood Pathology
and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv

Summary. The problems and errors that appear at different stages during PCR have been discussed. Particular attention is given to the organization of the laboratory, the problem of contamination and methods that allow you to improve the efficiency of the reaction and to avoid false positive or false negative results.

Key words: polymerase chain reaction, contamination, nucleic acid, amplicon, false positive result, false negative result.

У сьогоденних науково-практичних дослідженнях широко використовуються молекулярно-біологічні методи. Одним з найбільш поширених з них є метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), який дозволяє *in vitro* досягнути значного збільшення (у геометричній прогресії) кількостей фрагменту заданої ділянки нуклеїнової кислоти (НК) (ДНК чи РНК) в біологічному матеріалі до кількостей, достатніх для її виявлення. Принцип ПЛР подібний до природної реплікації генетичного матеріалу, коли інформація в ДНК батьківської клітини подвоюється (реплікується), і кожна дочірня клітина отримує ідентичні копії [7–10].

Основними перевагами ПЛР порівняно з іншими методами є універсальність, специфічність, чутливість, актуальність відповіді (швидкість отримання результату), можливість доклінічної та ретроспективної діагностики, мінімальний об'єм проби для аналізу, можливість одночасної діагностики кількох досліджуваних генів (ДГ) в одній пробі [6, 7].

ПЛР стає рутинним аналізом в медичній галузі, який дозволяє точно і швидко проводити дослідження у трансплантології, судово-медичній практиці, фармакогенетиці, діагностиці інфекційних та онкологічних захворювань.

Методи молекулярної діагностики в гематології застосовують для з'ясування причин патологічного стану, встановлення діагнозу та контролю ефективності лікування на рівні геномної ДНК, РНК і білків. В онкогематологічній діагностиці висока чутливість методу дає змогу визначати аномальну ДНК в мізерно малих кількостях, що дозволяє виявляти неопластичні клітини на доклінічній стадії пухлинного процесу. Проте, на практиці при постановці реакції виникають проблеми, пов'язані з якістю реагентів, з оснащенням лабораторії, кваліфікацією працівників і т. ін.

Метою даної роботи є оглядово висвітлити причини виникнення помилок та методи їх усунення при проведенні ПЛР. В рамках даної статті ми звернемо особливу увагу на проблему контамінації та основні шляхи її попередження.

При проведенні ПЛР-аналізу виникнення помилок можливе на преаналітичному, аналітичному та постаналітичному етапах. Це може призвести як до хибнопозитивних (ХП) (позитивний результат дослідження, коли ДГ у клінічному матеріалі відсутній), так і хибнонегативних (ХН) (негативний результат при наявності ДГ в зразку) результатів.

На преаналітичному етапі важливу роль слід приділити правильності забору матеріалу:

1. Вірно визначити локалізацію інфекційного процесу, а отже і тип біологічного матеріалу для дослідження (кров, слина, кістковий мозок,

сеча, біоптат і т.п.). Так, наприклад, при поверхневому заборі слизу замість зіскобу клітин при діагностиці хламідіозу можна отримати ХН результат. Для діагностики інфекцій, що передаються статевим шляхом, у більшості випадків дослідження крові є неінформативним, бо ймовірність виявлення збудника у крові дуже низька. ХН результат можна одержати також при заборі матеріалу в період ремісії захворювання [1, 2].

2. Забір крові проводити до лікувальних процедур і уникати використання ряду хімічних сполук (гепарин, лаурилсаркозинат натрію, ізопропанол, фенол і т.д.), які призводять до зниження ефективності ПЛР. При дослідженні сечі, клітинний осад необхідно промити фізіологічним розчином, так як в осаді міститься велика кількість солей і сечовини, які при використанні методів флуорисцентної детекції денатурують зонди, що спричиняє ХП результати.

3. Руйнація НК, як результат неправильного транспортування і зберігання. Зразки слід зберігати при температурі від 2 до 8°C протягом 24–48 годин. Для більш тривалого зберігання рекомендоване заморожування (як виняток – цільна кров). Це регламентується методичними рекомендаціями «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» [2].

Для попередження виникнення ХП помилок при заборі слід використовувати виключно стерильні одноразові системи, рукавиці, пробірки, так як при недотриманні цих правил виникає ризик контамінації біологічного матеріалу «чужорідною» НК.

Контамінація матеріалу може відбутися і на аналітичному етапі. Основні види контамінації: перехресна – виникає в процесі обробки клінічних зразків і призводить до спорадичних ХП результатів; контамінація продуктами ампліфікації – під час ПЛР амплікони нагромаджуються у великих кількостях та слугують продуктами для реампліфікації; контамінація слідовими кількостями ампліконів лабораторного посуду, дозаторів, обладнання, та навіть шкіри персоналу, що веде до систематичних ХП результатів.

Для попередження контамінації слід дотримуватися основних правил: поділ приміщення на функціональні робочі зони; збереження поточності і напрямку руху матеріалу; для кожної зони повинні бути окремі халати і рукавиці; окремий набір дозаторів і обладнання; одноразовий пластик з маркуванням «DNase, RNase-free», і наконечники з фільтром; хімічна та ультрафіолетова дезінфекція всіх робочих поверхонь [3]. Правила облаштування робочих зон, вимоги до витратних матеріалів і обладнання, способи уникнення контамінації регламентуються наказом МОЗ України від 24.01.2008 № 26 [4].

Для усунення контамінації безпосередньо під час ампліфікації існує декілька способів. Одним із них є використання фермента N-урацил-глікозилази (УГ). УГ розщеплює молекули ДНК, що містять у своєму складі урацил. Реакцію ампліфікації проводять з використанням суміші dNTPs, в якій dTTP замінений на dUTP), і в результаті термоцикування всі амплікони, що утворилися в пробірці міститимуть урацил. Якщо додати в реакційну суміш УГ перед етапом ампліфікації, то амплікони, що потрапили в реакційну суміш зруйнуються, а нативна ДНК залишиться неушкодженою і слугуватиме в подальшому мішенню в реакції ампліфікації.

Інший спосіб інактивації ампліконів – фотохімічний вплив на молекули ДНК. З цією метою використовують сполуки псоралену, які активуються короточасною дією ультрафіолетового світла. Модифіковані цими сполуками молекули ДНК не можуть брати участь в реакції ампліфікації [3].

Але жоден із цих методів не дає 100% гарантії уникнення контамінації, а отже існує ризик отримання ХП та ХН результатів.

З метою підтвердження відсутності контамінації необхідно кожну серію експериментів супроводжувати постановкою негативних контролів (К-). В якості К- можуть використовуватися: вода, реакційна суміш, зразки генетичного матеріалу, що негативні за ДГ. Для контролю за якістю проходження основних етапів аналізу (забір, транспортування, зберігання, виділення НК, проведення реакції зворотної транскрипції чи безпосередньо реакції ампліфікації) обов'язковим є використання позитивних контролів (К+), що дозволяють оцінити ефективність реакції і якість реагентів. При проведенні кількісного ПЛР-аналізу слід використовувати серію калібраторів, що містять кількісно охарактеризовані ДГ, які використовуються для побудови калібрувальних прямих, а також в якості К+ [3–5].

Постановка К+, К-, калібраторів, використання УГ, сполук псоралену, знижують ризик появи ХП і ХН результатів на вищезгаданих етапах дослідження.

Отже, для отримання достовірних результатів дослідження клінічного матеріалу обов'язковим є дотримання вимог та правил проведення ПЛР, що регламентуються діючими методичними рекомендаціями та наказами.

Література

1. Клинические рекомендации «Ведение больных инфекциями, передаваемыми половым путем, и урогенитальными инфекциями» // XII Всероссийский съезд дерматовенерологов и косметологов, 26–29 июня 2012 г., г. Москва, Россия. – М., 2012. – С. 8, 90–97.

2. Методичні рекомендації «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції», затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України від 30.07.2013, № 662. – 34 ст.

3. Методическое пособие «Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР)», Москва 2012 г. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf>.

4. Про затвердження державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами», наказ МОЗ України від 24.01.2008, № 26.

5. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов [и др.]. Под ред. Д.В. Ребрикова. 2-е изд., испр. и доп. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

6. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти) / М.С. Калачнюк, Л.Г. Калачнюк, Д.О. Мельничук [та ін.] // Біологія тварин. – 2012. – 14, № 1. – С. 660–667.

7. Чумак А.А. Молекулярно-генетичні дослідження в лабораторній діагностиці на сучасному етапі / А.А. Чумак // Лабораторна діагностика. – 2009. – № 1 (47). – С. 3–11.

8. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona [et al.] // Science. – 1985. – Vol. 230. – P. 1350–1354.

9. Mullis K.B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction / K.B. Mullis, F.A. Faloona // Methods in Enzymology. – New York: Academ. Press. – 1987. – Vol. 155. – P. 335–350.

10. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction / K.B. Mullis // Scientific American. – 1990. – № 262(4). – P. 56–65.