

## ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТЫ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ В ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ

Е.В. Воропаев<sup>1</sup>, А.В. Воропаева<sup>2</sup>, О.В. Осипкина<sup>1</sup>, О.Ю. Баранов<sup>3</sup>, А.Н. Волченко<sup>1</sup>

УО "Гомельский государственный медицинский университет"<sup>1</sup>, Гомель, Беларусь

ГУ "Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека"<sup>2</sup>, Гомель, Беларусь

ГНУ "Институт леса Национальной академии наук Беларуси"<sup>3</sup>, Гомель, Беларусь

*В клиничко-диагностических и научно-исследовательских лабораториях активно используются молекулярно-генетические методы диагностики. Для корректной работы с нуклеиновыми кислотами в лаборатории необходима организация комплекса соответствующих мероприятий. В работе сделан анализ типичных ошибок при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) и даны практические рекомендации по их устранению.*

**Ключевые слова:** ПЦР, ДНК, РНК, контроль качества.

### Введение

Активное использование методов молекулярно-генетической диагностики в практике клиничко-диагностических и научных лабораторий обуславливает необходимость правильной организации работы с нуклеиновыми кислотами. Наиболее распространены методы, в основе которых лежит принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР), способной увеличивать количество копий исходного образца в миллионы раз в течение нескольких часов [3, 6]. В основе метода ПЦР лежит принцип умножения исходной ДНК матрицы в геометрической прогрессии в процессе прохождения температурных циклов.

В настоящее время для проведения ПЦР разработан и доступен для широкого использования набор оборудования, выпускаемый различными производителями, основным в котором является так называемый термоциклер (амплификатор), или программируемый термостат [1, 2, 6], обеспечивающий температурный и временной контроль стадий полимеразной цепной реакции в ходе амплификации, или многократного копирования ДНК в условиях *in vitro*.

Преимущества диагностики методом ПЦР:

1. Высокая специфичность, которая обусловлена подбором праймеров, комплементарных уникальной нуклеотидной последовательностью тестируемых образцов.
2. Адекватная чувствительность, позволяющая диагностировать не только острые, но и персистирующие формы.
3. Возможность одновременного тестирования нескольких мишеней в одном образце (при проведении так называемой мультиплекс-ПЦР).
4. Возможность быстрого получения результата (при использовании ПЦР в реальном времени в течение 3-4 часов).
5. Возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы (анализ экспрессии генов, хромосомных транслокаций, трансгенный анализ).
6. Возможность анализа точечных мутаций.
7. Снижающаяся себестоимость проведения анализа, связанная с постоянным совершенствованием реакционных смесей и внедрением в процесс диагностики автоматизации и роботизации. Применение данного оборудования в лабораторной практике позволяет максимально снизить влияние субъективных факторов и значительно увеличить количество исследований.

Несмотря на вышеперечисленные преимущества, анализ на основе ПЦР имеет ряд недостатков и ограничений, связанных с физико-химическими и функциональными особенностями нуклеиновых кислот и долей

субъективной оценки полученных результатов, что может приводить как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам [4].

**Целью** данной работы является анализ основных факторов, приводящих к ошибкам разного характера при проведении молекулярно-генетической диагностики и разработка рекомендаций по их предотвращению и своевременному устранению.

### *Проблемы, возникающие при работе с нуклеиновыми кислотами*

Метод ПЦР включает следующие основные этапы:

- 1) пробоподготовка;
- 2) получение препаратов нуклеиновых кислот (выделение);
- 3) проведение полимеразной цепной реакции (амплификация);
- 4) анализ полученных продуктов ПЦР (детекция);
- 5) обсуждение результатов.

Рассмотрим основные ошибки, возникающие на каждом из этих этапов.

### *Пробоподготовка*

Основные ошибки, возникающие в ходе пробоподготовки, связаны с забором биологического материала, доставкой его в лабораторию и хранением.

При заборе клиничко-биологического материала необходимо иметь четкие знания о локализации искомого агента, возможности его извлечения и хранения образца [5]. Забор биологического материала производят в специальные транспортные среды, позволяющие длительно сохранять пробы, препятствуя их деградации (транспортная среда для соскобов и мазков, 0,9% NaCl, RNA-Later). Деградированный биологический материал или его отсутствие из-за неправильного забора приводят к ложноотрицательным результатам.

Транспортировка проб в лабораторию должна осуществляться в термосах или термоконтейнерах с соблюдением правил хранения биологического материала и правил транспортировки потенциально инфицированного материала [4]. Желательно проводить аликвотирование исследуемого биологического материала для возможного повторного или дополнительного исследования.

### *Выделение нуклеиновых кислот*

На этапе выделения нуклеиновых кислот к ложноположительным результатам приводят следующие факторы: контаминация исследуемых образцов различными биологическими агентами вирусной, бактериальной или иной природы, перекрестная контаминация от образца к образцу, загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий и

условия, в которых организованы исследования.

К ложноотрицательным или неопределенным результатам на данной стадии работы приводит в основном несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, неисправность оборудования, что приводит к низкому количественному выходу, деградации полученных препаратов, наличию в них ингибиторов ПЦР.

#### *Амплификация*

На этапе проведения амплификации ложноположительные результаты возникают в результате загрязнения выделенных нуклеиновых кислот и реакционных смесей положительными образцами, а также продуктами ПЦР (ампликонами) при неправильной организации работ.

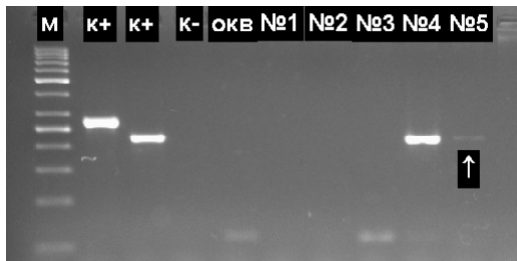
Попадание в реакционную пробирку даже следовых количеств искомой ДНК приводит к амплификации (многократному умножению) в процессе ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, - ложноположительному результату. При несоблюдении точности движения биологического материала, зонирования помещений может происходить контаминация продуктами ПЦР реакционных смесей и выделенных нуклеиновых кислот, что в последующем приводит к ложноположительным результатам, а также появлению ПЦР-артефактов (шмеров, праймер-димеров). Ложноположительные результаты возникают также при перекрестной контаминации проб и загрязнении реагентов.

Ложноотрицательные результаты возникают при отсутствии, деградации или небольшом количестве исследуемой ДНК в пробах выделенных нуклеиновых кислот.

ПЦР-диагностика РНК-содержащего биологического материала включает этап синтеза ДНК, выступающей в качестве исходной матрицы для последующей амплификации, в связи с этим ложноотрицательные или неопределенные результаты возникают при отсутствии или небольшом количестве исследуемой РНК в пробах выделенных нуклеиновых кислот, деградации РНК в процессе хранения, разрушении РНК-азами, а также при неэффективной обратной транскрипции.

#### *Детекция*

На этапе анализа продуктов ПЦР (детекции) ложноположительные результаты связаны с перекрестной контаминацией от пробы к пробе при раскапывании образцов, однако их проявление зачастую носит слабо выраженный характер. Примером вышесказанного является возникновение слабоокрашенных специфических полос в электрофоретических спектрах отрицательных образцов, располагающихся рядом с позитивными образцами, что показано на рисунке 1.

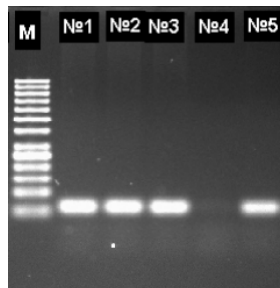


**Рисунок 1 - Электрофореграмма, демонстрирующая появление ложноположительного результата**

Как видно на рисунке 1, образец № 4 является позитивным, так как проявляется в виде зоны, совпадающей с положительным контрольным образцом. Образец № 5 является отрицательным, однако проявляется слабоокрашенной зоной (показана белой стрелкой), что объясняется перекрестной контаминацией при раскапывании образцов. Для верификации результата необходима по-

вторная электрофоретическая детекция.

Причиной появления ложноотрицательных результатов может явиться несоблюдение технологии внесения продуктов ПЦР в гель, что приводит к вымыванию ампликонов из геля во время электрофореза. На рисунке 2 представлена фореграмма, на которой одной из причин отсутствия специфической зоны является вымывание ампликонов из геля.



**Рисунок 2 - Электрофореграмма, демонстрирующая появление ложноотрицательного результата**

Как видно на рисунке 2, все образцы проявились на фореграмме ярко выраженными зонами, кроме образца № 4. Априори искомая зона должна быть во всех образцах ДНК, так как данный участок ДНК присутствует в геноме человека, но возможен полиморфизм внутри зоны, который выявляется другими методами, например секвенированием или рестрикционным анализом. В этом случае ложноотрицательный результат может объясняться отсутствием или деградацией ДНК в пробе, а также вымыванием ампликонов из геля из-за несоблюдения правил внесения в гель ПЦР продукта.

Таким образом, нарушение правил забора биологического материала, организации работ, технологии проведения исследования являются причинами неверной диагностики и, соответственно, неправильно подобранной терапии, что в конечном итоге может нанести вред пациенту.

#### *Организация контроля качества на этапах проведения ПЦР*

Концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа [6]. После получения препарата ДНК проводят его качественный и количественный анализ, используя спектрофотометр, например, безкюветный спектрофотометр ND - 1000 или более современный NanoDrop 2000c производства компании NanoDrop Technologies, Inc. или NanoPhotometer® Pearl производства MIDSCl's. Для определения количества ДНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм, что позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Оптическая плотность, равная 1, соответствует приблизительно 50 мкг/мл двухцепочечной ДНК. Соотношение экстинций 260 нм/280 нм позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,67 [6]. Если препарат содержит примесь белка, то D260/D280 меньше указанного выше значения, и необходимо провести дополнительную очистку препарата. Кроме того, при необходимости проводят дополнительное измерение препаратов при 320 нм. В чистых препаратах значение D320 должно стремиться к нулю. После спектрофотометрического анализа препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, используются для проведения ПЦР.

Количество ДНК-образца, вносимого в реакционную смесь, должно находиться в пределах от 20 до 50 нг, что является оптимальным для проведения реакции амплификации, избыточное же количество вносимой ДНК ингибирует ПЦР и приводит к ложноотрицательным результатам [6].

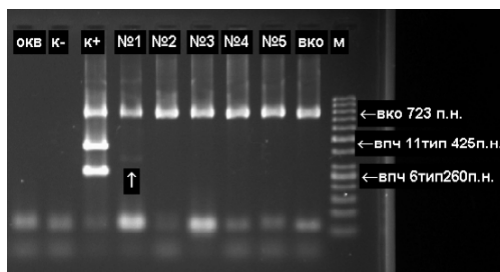
При проведении ПЦР-исследований, начиная с этапа выделения нуклеиновых кислот, параллельно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться контроли, позволяющие проанализировать каждый из этапов ПЦР.

Виды контролей: внутренний контроль, положительный контроль, отрицательный контроль, специальные контроли.

Внутренний контрольный образец (ВКО) представляет собой препарат ДНК, несхожий с искомым участком ДНК, или праймер для выявления гена, который обязательно должен присутствовать в искомой пробе [3].

Например, в некоторых тест-системах, предназначенных для выявления ДНК инфекционных агентов, в качестве внутреннего контроля используют участок ДНК  $\square$ -глобинового гена человека, который является участком генома человека и должен всегда присутствовать в образце в достаточном количестве. Размер продукта амплификации внутреннего контроля подбирают так, чтобы он отличался от специфических ампликонов в 2 и более раз. В результате, независимо от наличия микроорганизма в биологическом образце, внутренний контроль приводит к образованию ампликонов, которые отличаются по размеру от специфических ампликонов, характерных для данного микроорганизма. Если на фореграмме отсутствует зона, характерная для искомого микроорганизма, и зона, соответствующая внутреннему контролю, результат реакции недостоверен, и для исследуемого образца необходимо заново выделить ДНК.

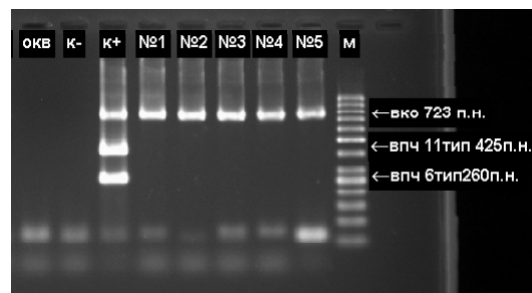
В качестве положительного контроля (позитивный, К+) обычно используется препарат ДНК искомого агента. Неспецифические ампликоны отличаются по размеру от ампликонов, соответствующих положительному контрольному образцу. Они могут быть как большего, так и меньшего размеров по сравнению с положительным контролем, это иллюстрирует рисунок 3.



**Рисунок 3** - Электрофореграмма, иллюстрирующая сомнительный результат при выявлении и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 6 и 11 типов

Как видно на рисунке 3, во всех исследуемых образцах амплифицируется зона, характерная для внутреннего контрольного образца (ДНК человека), в положительном контроле (К+) есть специфические зоны (показаны стрелками), а в отрицательном контроле (К-) амплификация отсутствует, следовательно, результат для образцов № 2, 3, 4, 5 можно считать достоверным - в данных образцах отсутствует ВПЧ 6 и 11 типов. Однако в образце № 1 присутствует полоса (показана стрелкой), близкая к специфическим. Такой результат является сомнительным и требует перестановки. Результат повторного исследования приведен на рисунке 4.

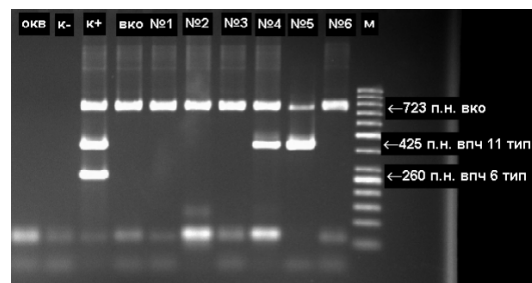
Как показано на рисунке 4, при повторном исследовании очевидно, что в образце № 1 амплифицируется зона, характерная для внутреннего контрольного образца (ДНК человека) и не амплифицируются зоны, соответствующие ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов. Таким образом, образец №1 следует считать негативным, так как в данной пробе не содержится ДНК ВПЧ 6 и 11 типов.



**Рисунок 4** - Электрофореграмма, иллюстрирующая повторное исследование для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов

Существует два вида отрицательных контролей: отрицательный контроль выделения (ОКВ, В-), применяемый на всех этапах ПЦР, отрицательный контроль амплификации (негативный, К-). Отрицательные контроли включают в себя все компоненты реакции, но вместо препарата ДНК содержат деионизованную воду или буфер, не содержащий исследуемую ДНК. Отрицательный контроль выделения необходим для подтверждения чистоты реагентов и расходных материалов, отсутствия перекрестной контаминации от пробы к пробе на стадии выделения. Отрицательный контроль амплификации должен быть включен для того, чтобы убедиться, что реакционная смесь и пробы не были контаминированы нуклеиновыми кислотами на этапе амплификации.

К специальным контролям относят: маркеры длин фрагментов ДНК (обозначаемый буквой "м" на фореграммах), стандарты и калибраторы (применяются при проведении ПЦР в реальном времени) и др. Применение разных видов контролей представлено на рисунке 5.



**Рисунок 5** - Электрофореграмма, иллюстрирующая выявление и дифференциацию ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов

На данной фореграмме представлены пять различных контролей: внутренний контроль - фрагмент ДНК человека (ВКО), положительный контроль (К+), отрицательный контроль выделения (ОКВ), отрицательный контроль амплификации (К-) и специальный контроль - маркер длин фрагментов ДНК. Результат данного исследования достоверен, так как в отрицательных контролях отсутствует амплификация, в положительном контроле присутствуют специфические зоны, во всех исследуемых образцах присутствует зона, характерная для внутреннего контрольного образца. Два образца - № 4, № 5 - позитивны по ДНК ВПЧ 11 типа, так как они содержат ярко выраженную зону, характерную для положительного образца ДНК ВПЧ 11 типа.

Принципы организации лаборатории для проведения молекулярно-генетических исследований.

На сегодняшний день в Республике Беларусь при организации и контроле функционирования существующих ПЦР- лабораторий применяют нормативные документы,

касающиеся в большей степени работы микробиологических лабораторий [5]. Однако действующие нормативные документы не учитывают всех особенностей метода ПЦР.

В соответствии с этапами проведения анализа лаборатория должна включать следующие последовательно расположенные рабочие зоны (помещения):

1. Рабочая зона 1 - для приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала.
2. Рабочая зона 2 - для выделения нуклеиновых кислот.
3. Рабочая зона 3 - для проведения реакции амплификации и учета ее результатов при использовании гибридо-флюоресцентного метода детекции.
4. Рабочая зона 4 - для учета результатов реакции амплификации нуклеиновых кислот методом электрофореза, гибридо-ферментным методом, методом секвенирования.

Помещения рабочих зон должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, водопроводом, канализацией, электричеством и отоплением, средствами пожаротушения, естественным и искусственным освещением и бактерицидными лампами. В каждой рабочей зоне необходим набор соответствующего лабораторного оборудования, мебели, пластиковой и стеклянной посуды, расходных материалов, защитной одежды, уборочного инвентаря, которые должны быть промаркированы. Их применение в других зонах исключается. Поверхность лабораторного оборудования и мебели должны быть устойчивы к действию моющих и дезинфицирующих средств, ультрафиолетового излучения. Обеззараживание исследуемого материала производят в помещении для автоклавирования. Кроме рабочих зон необходимы кабинет заведующего лабораторией, комнаты персонала, комната приема пищи, туалет, подсобные помещения, которые должны быть вынесены за пределы рабочей зоны.

При выполнении работ необходимо соблюдать поточность движения персонала, исследуемого материала, проб нуклеиновых кислот, продуктов амплификации во избежание контаминации образцов продуктами амплификации из зоны детекции. В связи с вышеизложенным необходимы следующие меры: перенос проб из одной рабочей зоны в другую, а также их хранение в данных помещениях осуществляют в плотно закрывающихся контейнерах (штативах), обрабатываемых дезинфицирующими средствами после каждого использования; образцы проб, содержащих нуклеиновые кислоты, и ампликоны хранят отдельно от реагентов в разных холодильниках; оправданным решением является создание в ПЦР-лаборатории локальной компьютерной сети для обмена информацией между зоной детекции и кабинетом сотрудников, анализирующих результаты.

Значительное внимание должно уделяться вопросам дезинфекции рабочих поверхностей, оборудования, обработке помещений. Для этих целей должны использоваться комбинированные моющие и дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в Республике Беларусь. В зоне детекции продуктов амплификации при проведении генеральной уборки необходимо использовать хлорсодержащие дезинфицирующие средства, обладающие способностью инактивировать ампликоны.

Следует периодически проводить внутрилабораторный контроль на наличие нуклеиновых кислот, выявление которых наиболее часто проводится в лаборатории. При выявлении положительных результатов проводят деконтаминацию загрязненных помещений одним из регламентируемых способов, затем проводят контроль деконтаминации [5]. Кроме того, для оценки качества работы ПЦР-лаборатории необходимо применять зашифрованные внутрилабораторные контрольные положительные и отрицательные образцы, что в западноевропейских странах, а в последнее время и в России становится рутинной практикой организации работы лаборатории.

Таким образом, для правильной организации работы ПЦР-лаборатории и проведения высококачественных молекулярно-генетических исследований необходимо использовать весь возможный комплекс вышеперечисленных мероприятий, для чего необходима регламентация всех сторон этого вида лабораторной диагностики на республиканском уровне.

#### Литература

1. Алгоритм определения генотипов и аллельных вариантов *Helicobacter pylori* с использованием полимеразной цепной реакции / А.В. Воропаева, Е.В. Воропаев, О.Ю. Баранов, С.В. Жаворонок, С.И. Пиманов, Е.В. Макаренко, В.Е. Падутов // Инструкция по применению: утверждена МЗ РБ, рег.№: 008-02.08.-Гомель, 2009.-24 с.
2. Методика молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний на основе анализа изменений экспрессии генов циклинов семейств А, В, С, D и E / Е.В. Воропаев, О.Ю. Баранов, А.В. Воропаева, В.Н. Беляковский, С.Л. Ачинович, В.Е. Падутов // Инструкция по применению: утверждена МЗ РБ, рег.№: 063-0610.-Гомель, 2010.-15 с.
3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. - М.: Мир, 1999. - 558 с., ил.
4. Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции / С.А. Костюк, Н.Д. Коломиец, О.В. Тонко, Н.Л. Сергейчик, Н.Н. Левшина // Инструкция по применению: утверждена МЗ РБ, рег.№ 090-1008.-Минск, 2008.-8 с.
5. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности. Методические указания. МУ 1.3.1888-04 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004).
6. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. - Мн.: Юнипол, 2007.-176 с.: ил.

## GUIDELINES FOR WORK WITH NUCLEIC ACIDS IN PCR LABORATORY

E.V. Voropaev<sup>1</sup>, A.V. Voropaeva<sup>2</sup>, O.V. Osipkina<sup>1</sup>, O.Y. Baranov<sup>3</sup>, A.N. Volchenko<sup>1</sup>

Educational Establishment "Gomel State Medical University"<sup>1</sup>, Gomel, Belarus State Institution "Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology"<sup>2</sup>, Gomel, Belarus

State Scientific Institution the Institute of Forest<sup>3</sup>, Gomel, Belarus

*In the clinical diagnostic and research laboratories different molecular genetics methods of diagnosis are widely used. For proper organization of work with nucleic acids in the laboratory it is necessary to provide a complex of adequate measures. The analysis of typical errors during polymerase chain reaction (PCR) has been made and practical recommendations to eliminate them have been given in the paper.*

**Keywords:** PCR, DNA, RNA, quality control.

Поступила 19.11.2012