

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР**

**МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ КАК
СКРИНИНГОВАЯ МОДЕЛЬ ПЕРВИЧНОГО ОТБОРА
НУКЛЕОТРОПНЫХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР**

Одобрено на заседании
научно-экспертного совета
ГФЦ МЗ Украины
(протокол № 9 от 27.10.2004 г.)

**МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ КАК
СКРИНИНГОВАЯ МОДЕЛЬ ПЕРВИЧНОГО ОТБОРА
НУКЛЕОТРОПНЫХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Авторский коллектив:

М.Н.Лебедюк, В.П.Федчук, В.В.Николаевский, Ю.И.Бажора,
В.Й.Кресюн, В.Г.Коляденко, В.И.Степаненко, С.А.Андронати,
С.А.Ляхов, Е.А.Ляхова, Л.А.Литвинова, Г.А.Хорохорина

Рецензенты:

акад. НАН Украины, д-р мед. наук В.П.Широбоков
д-р биол. наук, проф. Т.Л.Карасева
д-р мед. наук Л.Д.Степанковская
канд. мед. наук Л.В.Копяница

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
1 Теоретическое обоснование использования полимеразной цепной реакции в качестве скрининговой модели	6
2 Принцип метода полимеразной цепной реакции	8
3 Базовый комплект оборудования и реактивов	10
4 Планирование рабочих помещений	11
5 Меры по предотвращению контаминации	12
6 Порядок выполнения исследования	12
7 Учет результатов реакции.....	14
8 Преимущества полимеразной цепной реакции по сравнению с другими скрининговыми моделями	15
Литература	16

Введение

В настоящее время наиболее распространенными моделями для скрининга противовирусных средств, применяемыми в экспериментальной медицине и фармакологии, являются:

- скрининг на куриных эмбрионах и фрагментах аллантоисной мембраны;
- скрининг на перевиваемых и первичных культурах клеток;
- скрининг на животных.

Каждый из этих методов имеет свои очевидные преимущества, хорошо отработан и широко применяется. Однако у этих методов имеются и серьезные недостатки. В первую очередь, необходимость работы с активным инфекционным материалом, что чревато инфицированием персонала и возможным возникновением серьезной эпидемической ситуации. Кроме того, метод с использованием клеточных культур предполагает применение дорогостоящих реагентов и фетальной сыворотки крупного рогатого скота (КРС), а модели на животных, к тому же, еще и не вполне согласуются с принципами биоэтики.

Эти соображения и продолжительность сроков исследования при применении указанных моделей, обуславливают актуальность создания новых скрининговых моделей, лишенных вышеуказанных недостатков. В качестве такой модели с целью поиска новых противовирусных препаратов, ингибирующих вирусную репродукцию за счет специфического ингибирования транскрипции и/или репликации вирусного генома может выступать полимеразная цепная реакция (ПЦР). До недавнего времени список химиотерапевтических противовирусных препаратов ограничивался ремантадином и его аналогами, метисазоном, арбидолом и аномальными нуклеотидами. Список инфекций, при которых активны эти препараты, ограничивается вирусами гриппа, вирусами группы герпеса и натуральной оспы. Особое место занимает азидотимидин, активный относительно ВИЧ, но высокая токсичность этого препарата и спектр побочных эффектов, наблюдающихся при его применении, едва ли не сводят на нет его положительные свойства.

С 1996 года в клиническую практику введен АМИКСИН (тило-рон) – противовирусный препарат с уникально широким спек-

тром противовирусного действия и выступающий как индуктор интерферона. Показано, что значительная часть фармакологических свойств амиксина независима от интерферона, им индуцированного. При изучении широкого ряда производных и аналогов амиксина было обнаружено полное отсутствие корреляции между уровнем индуцированного интерферона и уровнем противовирусной защиты. С другой стороны, показано, что амиксин интеркалирует в ДНК, причем значительная часть эффектов (индукция интерферона, ингибирование обратных транскриптаз, избирательное ингибирование синтеза вирусных белков и ряд других) объясняется именно интеркаляцией тилорона в двойную спираль и ингибированием ферментов, субстратом которых являются нуклеиновые кислоты.

Таким образом, нуклеотропные препараты приобретают особое значение как средства противовирусной защиты. С другой стороны, номенклатура имеющихся препаратов этой группы еще не обеспечивает потребностей терапии, что делает поиск новых нуклеотропных препаратов особо актуальным. Очевидно, что метод ПЦР может быть моделью для первичного скрининга новых синтетических и впервые выделенных из природных источников веществ.

1 Теоретическое обоснование использования полимеразной цепной реакции в качестве скрининговой модели

Вирусная репродукция представляет собой целый ряд различных стадий, причем многие из них, как и последовательность их реализации, в значительной степени варьируются от одного семейства возбудителей к другому. Однако для всех вирусов (впрочем, как и для всех без исключения возбудителей инфекционных заболеваний) вне зависимости от видовой принадлежности имеется общий облигатный этап — репликация генома, которая так или иначе проходит через стадию, в которой нуклеиновая кислота возбудителя, будучи двуспиральной, полностью или частично диссоциирует на однонитевые полинуклеотидные цепи. Эта же черта присуща и процессу транскрипции.

Ингибирование диссоциации двуспиральной нуклеиновой кислоты на одонитевые при связывании нуклеотропного препарата, безусловно, должно приводить к ингибированию транскрипции и репликации генома возбудителя, а, следовательно, к блокированию инфекционного процесса. Кроме того, если нуклеотропный препарат – лиганд нуклеиновой кислоты – способен ингибировать полимеразы (ДНК (РНК)-зависимую-ДНК(РНК)полимеразу), то и в этом случае безусловным следствием будет являться ингибирование инфекционного процесса.

В основе ПЦР, как известно, лежит многократная диссоциация двуспиральных молекул и достройка праймированных одонитевых полинуклеотидов до двунитевых под действием Таq-полимеразы.

Таким образом, в обоих случаях имеет место обратимая реакция:



По определению состояние равновесия (соотношение равновесных концентраций исходных веществ и продуктов реакции) обусловлено разницей суммы изобарно-изотермических потенциалов продуктов реакции и суммы изобарно-изотермических потенциалов исходных веществ и инварианта по пути трансформации. Различия между диссоциацией двуспирального полинуклеотида в условиях транскрипции (или репликации) в клетке и в условиях ПЦР заключается лишь в источнике энергии, необходимой для диссоциации набора водородных связей, удерживающих отдельные полинуклеотиды в составе дуплекса. В клетке таким источником служит АТФ, в условиях ПЦР – тепловая энергия (от термоциклера). Поскольку термодинамическое состояние системы инвариантно по источнику энергии, а зависит только лишь от ее величины, то способность лиганда ингибировать диссоциацию в условиях ПЦР означает его способность ингибировать эту же реакцию в любых других условиях, в том числе и в живой клетке. Сказанное справедливо и для случая полимеризации второй цепи по матрице.

Таким образом, с точки зрения изучения ингибирующей способности нуклеотропных агентов, ПЦР может служить адекватной моделью процессов, происходящих в клетке.

2 Принцип метода полимеразной цепной реакции

Метод полимеразной цепной реакции был разработан Кэри Мюллисом (фирма «Cetus», США) в 1983 году. Данная методика в настоящее время широко применяется в научных исследованиях, а также в практическом здравоохранении.

В основе метода ПЦР лежит комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция включает в себя несколько стадий:

На первом этапе (денатурация) необходимо денатурировать ДНК, находящуюся в образце. Для этого нагревают реакционную смесь до 93–95°C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

На втором этапе (отжиг) при наличии искомой ДНК-мишени праймеры отжигаются (присоединяются) к ДНК-мишени. При этом их ориентация обеспечивает фланкирование (ограничение с двух сторон) определенного участка ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если праймеры не находят комплементарных участков, то их отжиг не происходит.

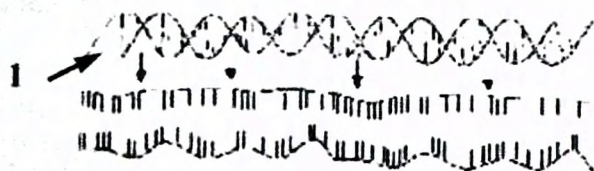
Когда произошел отжиг праймеров, Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3 – конца праймера.

На третьем этапе (элонгация или синтез) доводят температуру в реакционной смеси до оптимума работы фермента. Синтез второй цепи Таq-полимеразой продолжается с максимальной эффективностью.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров к температуре оптимума работы фермента, становится возможным использовать двустадийную ПЦР, совместив две стадии – отжиг и элонгацию – в одной.

В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (тридцать и более раз). В каждом температурном цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (рис.).

Основные этапы полимеразной цепной реакции



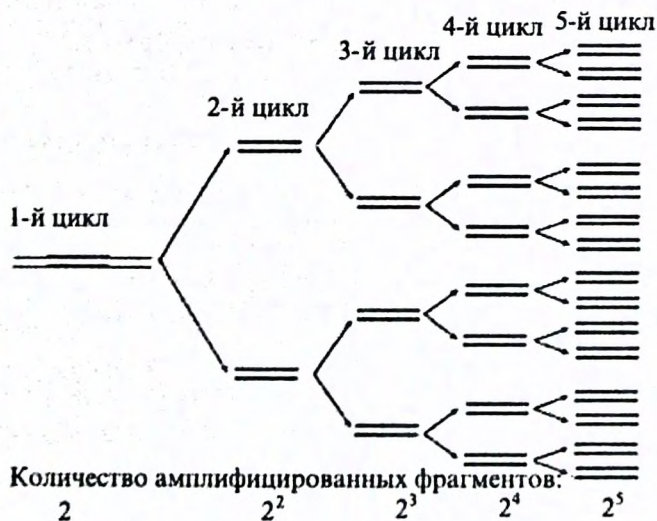
Первый шаг цикла:
денатурация



Второй шаг цикла:
отжиг праймеров



Третий шаг цикла:
синтез



Происходит
увеличение
количества
фрагментов в
геометрической
прогрессии

Рисунок. Принципиальная схема метода полимеразной цепной реакции.

1 – Исходная ДНК-матрица

2 – Праймеры

3 – Дезоксинуклеотидтрифосфаты

Результатом циклического синтеза является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое теоретически можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2n - n - 1) \sim 2n, \text{ где}$$

A – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M – начальное количество ДНК-мишеней;

n – число циклов амплификации.

Фактически же значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78–97%, в зависимости от выбранных для амплификации генов. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции это значение может быть намного меньше, поэтому практическое значение количества специфических продуктов амплификации лучше описывает уравнение:

$$A = M \cdot (1 + E) \cdot n, \text{ где}$$

E – значение эффективности реакции.

Следует заметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты. Но их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии по формуле:

$$K = M \cdot n,$$

где K – количество длинных неспецифических продуктов реакции амплификации, n – число циклов амплификации.

Короткие дискретные фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляющиеся в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Таким образом, данный метод основан на способности ДНК – полимеразы достраивать одноцепочечную ДНК с образованием двухцепочечной молекулы.

3 Базовый комплект оборудования и реактивов

3.1 Оборудование:

- многоканальный амплификатор – термостат четырехканальный программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик-Украина» (ТУ 25636704.002-99);
- система электрофореза ЭФС-01У (ТУ 25636704.004-99);

- термостат твердотельный ТТ1 (ТУ 25636704.003-99);
 - трансиллюминатор (ТУ 25636704.005-99);
 - микроцентрифуга «Вортекс» CV1500 (НТЛ, Польша) – 2,5 тыс. об./мин;
 - ПЦР-бокс (комплектуется по заявке покупателя);
 - набор полуавтоматических микродозаторов до 10, 20, 200, 1000 мкл (НТЛ, Польша);
 - набор пробирок на 0,6 и 1,6 мл. (QSP, США);
 - компьютерная программа «DNA Imager» (видеосистема для обработки результатов исследований).
- 3.2. Комплект реактивов для ПЦР – амплификации ДНК:
- ПЦР буфер;
 - смесь 4-х дезоксинуклеотидтрифосфатов и праймеров;
 - Таq-полимераза;
 - положительный контроль;
 - минеральное масло для ПЦР;
 - парафин для ПЦР.
- 3.3. Комплект реактивов для детекции продуктов амплификации:
- смесь для приготовления электрофорезного буфера;
 - агарозный гель.

4 Планирование рабочих помещений

При планировании и оборудовании помещений для проведения лабораторных исследований методом полимеразной цепной реакции необходимо применять основные принципы организации работы, изложенные в инструкции «О соблюдении противоэпидемиологического режима в клинико-диагностических лабораториях» от 22.04 1997 г., г. Одесса.

При организации лабораторного отделения для проведения ПЦР-диагностики необходимо иметь три несмежные помещения общей площадью до 30 м²:

1. Комната для пробоподготовки исследуемого материала и выделения ДНК;
2. Комната для приготовления рабочих растворов и постановки ПЦР;
3. Комната для детекции результатов амплификации.

5 Меры по предотвращению контаминации

Для предотвращения контаминации основные виды работ при проведении ПЦР-диагностики (подготовка проб, проведение ПЦР и электрофорез) должны быть изолированы друг от друга. С этой целью:

- целесообразно отдельные этапы работ проводить в ламинар-боксе;
- перемещение исследуемого материала, растворов, посуды и т.д. должно производиться только в одном направлении: из первой комнаты во вторую, затем в третью;
- в каждом из указанных помещений должен быть свой набор реагентов, полуавтоматических микродозаторов, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в пределах данного помещения;
- приготовление реактивов должно производиться в отдельной чистой комнате; растворы должны храниться и использоваться в виде небольших порций (аликвот);
- одноразовые наконечники для микродозаторов перед уничтожением следует обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию нуклеиновых кислот (0,3N раствором соляной кислоты);
- во всех случаях постановки ПЦР необходимо применять положительный и отрицательный контроли;
- смена верхней одежды и головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза;
- поверхности рабочих столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом;

Соблюдение указанных рекомендаций позволит исключить возможность контаминации и получения ложноположительных результатов.

6 Порядок выполнения исследования

Вещество, которое проверяется на биологическую активность, смешивают с реплицируемым объектом — ДНК или РНК возбуди-

теля инфекционного заболевания. После этого проводят репликацию методом ПЦР и определяют наличие либо отсутствие продукта репликации электрофорезом.

Если в агарозном геле отсутствует полоса желтого цвета, это свидетельствует об отсутствии продукта репликации ДНК, что означает наличие биологической активности испытуемого вещества.

Появление в агарозном геле полосы желтого цвета свидетельствует о наличии репликата и, следовательно, об отсутствии биологической активности исследуемого вещества.

Пример.

В пробирку помещают 2,5 мкл прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и наслаивают 10 мкл расплавленного воска с тем, чтобы он полностью покрыв раствор. На поверхность застывшего воска наносят 10 мкл ПЦР-буфера с Taq-полимеразой, а поверх реакционной смеси — 20 мкл минерального масла для предотвращения испарения и сохранения исходного объема раствора. На масло наносят 5 мкл 2-(акридин-9-илимино)-N-{5[2-акридин-9-иламино)-3-метилбутириламино]пентил-3-метил-бутирамида и 5 мкл положительного контроля (тотальной ДНК вируса простого герпеса 1 типа, выделенной из штамма Л2 методом фенольной экстракции и осаждения этиловым спиртом).

После введения ДНК возбудителя образуется стойкая трехфазная система. Пробирку со смесью устанавливают в термостат и нагревают до +65°C, при этом воск расплавляется и поднимается вверх, а верхняя и нижняя фазы перемешиваются. После этого производят амплификацию — многократное умножение количества копий специфического участка ДНК, катализируемое ферментом термостабильной ДНК-полимеразой. Амплификацию производят в следующем режиме:

- 95°C — 4 мин, 1 цикл
 - 95°C — 1 мин
 - 67°C — 1 мин
 - 72°C — 1 мин
 - 72°C — 2 мин, 1 цикл.
- } 30 циклов

После амплификации образец охлаждают до +4°C и сохраняют при данной температуре.

7 Учет результатов реакции

Наличие или отсутствие амплифицированного фрагмента определяют путем электрофореза продуктов реакции.

Вначале готовят раствор рабочего буфера для электрофореза. В мерную колбу на 1000 мл вносят содержимое флакона с буфером для электрофореза (ТВЕ), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают до полного растворения осадка.

Затем готовят 1,5%-ный агарозный гель, помещают его в коническую колбу и прибавляют 15 мкл бромистого этидия. Расплав агарозы с этидием охлаждают до 50°C и заливают на платформу с гребенкой (толщина слоя – 4 мм). После застывания гребенку аккуратно удаляют, а платформу с гелем вносят в камеру для электрофореза и заливают в нее 800 мл буфера ТВЕ. Перед нанесением на гель 15 мкл продуктов амплификации смешивают с 5 мкл красителя (буфер с бромфеноловым синим). Электрофорез проводят 25 мин при 100 В и комнатной температуре.

После окончания электрофореза агарозный гель помещают на трансиллюминатор и определяют наличие амплифицированного фрагмента с помощью компьютерной программы «DNA Imager» (видеосистема для обработки результатов исследования).

В агарозном геле полоса желтого цвета не определяется, что свидетельствует об отсутствии репликата и, следовательно, о наличии биологической активности исследуемого вещества.

Полученные данные совпадают с результатами исследования противовирусной активности исследуемого вещества, изложенными в статье Lyakhov S.A., Suveyzdis Y.I., Litvinova L.A. et al. *Biological active acridine derivatives. Pt 4: Synthesis and viral activity of new bisacridines*//Pharmazie.- 2000.- Bd.55, №10.- P. 734–736.

В частности, в данной работе показано, что 2-(акридин-9-илимино)-N-{5[2-акридин-9-иламино)-3-метил-бутириламино] пентил-3-метил-бутирамид снижает инфекционный титр вируса до 1, в контроле он равен 6. Известно, что вещество считается активным, если инфекционный титр снижается больше, чем на 1,5–2 единицы.

Таким образом, полученные данные подтверждают наличие у 2-(акридин-9-илимино)-N-{5[2-акридин-9-иламино)-3-метил-бутириламино] пентил-3-метил-бутирамида биологической активности, а именно – противовирусной.

8 Преимущества полимеразной цепной реакции по сравнению с другими скрининговыми моделями

Основные преимущества рассматриваемой модели по сравнению с любыми другими очевидны:

- метод ПЦР *in vitro* представляет собой идеальную модель, в котором мишень (нуклеиновая кислота инфекционного агента) и нуклеотропный препарат заведомо оказываются в тесном контакте, и их взаимодействие не осложнено взаимодействием препарата с другими потенциальными мишенями;
- положительным моментом является также отсутствие необходимости в работе с активным инфекционным материалом, что значительно смягчает санитарно-гигиенические требования, предъявляемые к лабораторным исследованиям;
- при реализации скрининга в этой модели отпадает необходимость в стерилизации вспомогательных материалов и инструментов;
- кроме этого, метод ПЦР хорошо отработан методически и обеспечен соответствующим оборудованием, комплектами качественных реактивов, праймеров и т. п.
- немаловажными преимуществами являются сокращение сроков исследования и учета результатов за счет автоматизации и компьютеризации, а также ее экономичности, особенно, по сравнению с моделями на животных и клеточными культурами.

Литература

1. Адашкевич В.П. Заболевания, передаваемые половым путем. – Витебск: Изд-во Витебского мед. ин-та, 1997. – 310 с.

2. Щербо С.Н., Макаров В.Б. ПЦР-диагностика заболеваний, передаваемых половым путем//Клин. лабор. диагностика. – 1998. – №2. – С. 21–24.

3. Бажора Ю.І., Ніколаєвський В.В., Лебедюк М.М. Молекулярні методи лабораторної діагностики інфекцій, що передаються статевим шляхом//Одеський мед. журн. – 2001. – №5. – С. 22–30.

4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы/Под ред. С.Херрингтона и Дж.Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

5. Гомберг М.К., Соловьев А.М. Иммунологические подходы к лечению больных хронической персистирующей хламидийной инфекцией//ЗППП. – 1996. – №4. – С. 32–37.

6. Метод полимеразной цепной реакции в лабораторной диагностике заболеваний, передающихся половым путем. Метод. рекомендации/Ю.И.Бажора, Г.И.Лобановский, М.Н.Лебедюк и др. – Одесса, 1999. – 12 с.

Подписано в печать 23.12.2004
Формат 30×42 1/8, бумага офсетная.
Тираж 100 экз. Зак. № СФ-134
Усл. печ. листов 4

Издательский дом «Авиценна»