

**ПЛР-ДІАГНОСТИКА: ПРИНЦИПИ, ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ**

*Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, або PCR) – експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК у біологічному матеріалі. Молекулярно-генетичні дослідження сьогодні виконують на основі ПЛР-досліджень. У статті подано сучасні дані щодо принципу даного методу та основних етапів проведення ПЛР-досліджень. Наведено головні вимоги, які висувають до структури та роботи в ПЛР-лабораторії. Показано основні сфери застосування ПЛР у медицині.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: полімеразна ланцюгова реакція, лабораторія, медицина.

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, Polymerase chain reaction, PCR) розробив у 1983 році американський біохімік Кері Мюлліс. Відкриття ПЛР стало однією з найбільш визначних подій у галузі молекулярної біології за останні 30 років. За це відкриття вчений у 1993 році був удостоєний Нобелівської премії в галузі хімії [8].

Поява методу ПЛР була зумовлена значними попередніми досягненнями в галузі молекулярної генетики, насамперед розшифровкою нуклеотидної послідовності геномів ряду мікроорганізмів. ПЛР стала також можливою завдяки відкриттю унікального ферменту Таq-ДНК-полімерази, що міститься в бактеріях, які живуть у гейзерах. Особливість цього виду ферменту полягає в її винятковій термостійкості (витримує нагрівання до температури кипіння без втрати активності) й високій робочій температурі (оптимум роботи – 72 °С). Цікаво, що перша публікація про метод ПЛР з'явилася в листопаді 1985 року в журналі "Science" і мала назву Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. *Science* 1985 Dec 20; 230 (4732): 1350-4 [7, 16].

Точність, простота виконання, високі показники чутливості й специфічності принесли цьому методу заслужену популярність. За короткий час ПЛР-аналіз швидко вийшов з науково-дослідних лабораторій у сферу практичного клінічного використання.

На сьогодні існує декілька модифікацій ПЛР, розробляють нові ампліфікаційні технології, © О. М. Олещук, А. Є. Мудра, Н. Б. Зозуляк, 2014.

основані на клонуванні як ДНК, так і РНК-фрагментів. З подібних методів, апробованих на клінічному матеріалі, можна назвати лігазну ланцюгову реакцію (ЛЛР, LCR), NASBA (Nucleic Acids Sequence-Based Amplification), метод з використанням QВ-реплікази. В останніх двох методах реакція здійснюється в ізотермічному режимі, й для її проведення не потрібно ампліфікаційного обладнання [10, 12, 15, 17, 18].

**Принцип методу ПЛР.**

Метод ПЛР ґрунтується на виявленні у матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) різноманітних біооб'єктів, їх вибіркового синтезу до концентрації, за якої їх легко детектувати, і подальшому визначенні продуктів реакції ампліфікації – ампліконів [1].

ДНК – унікальний носій генетичної інформації у всіх існуючих на Землі організмів, за винятком РНК-вмісних вірусів [2].

Унікальна властивість ДНК полягає в її здатності подвоюватися після розплітання спіралі та розходження ниток ДНК. Подвоєння ДНК (реплікація) здійснюється (за принципом комплементарності) ензимом – ДНК-полімеразою. Для того, щоб ензим розпочав свою роботу, потрібна наявність початкового дволанцюгового фрагмента ДНК. Такий фрагмент утворюється за взаємодії короткого одноланцюгового фрагмента ДНК – праймера з комплементарною ділянкою відповідного ланцюга батьківської ДНК. Реплікація відбувається на двох нитках ДНК, але нарощуються вони в протилежних напрямках. У результаті реплікації з однієї дволанцюгової молекули ДНК утворюється дві дволанцюгові, кожна з яких містить один ланцюг від материнської молекули ДНК та другий, дочірній, – новосинтезований. Цикл

реплікації ДНК включає три основні стадії: 1) розплетання спіралі ДНК і розходження ланцюгів (денатурацію); 2) приєднання праймерів; 3) добудову дочірнього ланцюга ДНК. У ПЛР вказані процеси здійснюються в пробірці у циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається зміною температури інкубованої суміші [1, 5–7].

Для проведення ПЛР необхідно мати: 1) два синтетичних олігонуклеотидних праймери (довжиною приблизно по 20 нуклеотидів), які комплементарні до ділянок ДНК із протилежних ланцюгів, що фланкують послідовність – мішень (праймери обмежують фрагмент ДНК, який буде мільйони разів скопійований ферментом Таq-ДНК-полімеразою, що приєднується до 3'-кінців праймерів для добудови їх заданої довжини (в декілька сотень пар основ)); 2) ДНК-мішень; 3) термостабільну ДНК-полімеразу, яка не втрачає активності при температурі 95 °С; 4) чотири дезоксирибонуклеотиди; 5) буферну систему для ефективної роботи ДНК-полімери, що обов'язково містить іони магнію.

Розробка праймерів для ПЛР є однією з найвідповідальніших ланок у проведенні діагностики. Потрібно підібрати такий фрагмент молекули ДНК, який би відрізнявся генетичною консервативністю і був би присутній тільки в досліджуваному гені. При цьому довжина такого фрагмента повинна становити 15–30 нуклеотидів. Виконати таку роботу допомагають спеціальні комп'ютерні програми, що використовують інформацію про нуклеотидну послідовність відомих мікроорганізмів або генів людини. Отримати цю інформацію можна з міжнародних комп'ютерних банків даних (Gen bank, EMBL) через мережу "Інтернет". Синтез праймера по заданій послідовності нуклеотидів не є технічно складним і здійснюється в автоматичних синтезаторах [7].

З основних етапів проведення ПЛР обов'язково слід виділити три: 1) підготовку проби біоматеріалу, тобто виділення ДНК або РНК; 2) власне полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР-ампліфікацію); 3) детекцію продукту ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти) [4, 8].

Підготовка проб (виділення ДНК і РНК із біологічного матеріалу). Зразки біооб'єкта спеціально обробляють для перебігу лізису клітин, видалення білкових, полісахаридних і ліпідних компонентів. Для цього використовують різні методи, в тому числі сорбентний, за яким відбувається сорбція ДНК (РНК) на сорбенті після лізису клітин, багатократної відмивки нуклеїнових кислот (НК) і наступної елюції ДНК (РНК) буферним розчином та ін. У результаті такої

обробки отримують розчин, який містить ДНК (РНК) досліджуваного об'єкта. Комплект для виділення ДНК (РНК) вибирають залежно від виду біооб'єкта. Детально методики виділення ДНК (РНК) із біооб'єктів описані в інструкціях, які додає виробник до комплекту реагентів для виділення НК. Отриманий розчин ДНК можна зберігати протягом тижня за температури 2–8 °С та до року за температури -60 °С. Не підлягає зберіганню розчин очищеної РНК. Його необхідно відразу ж використовувати у дослідженнях. Проби можна зберігати тільки у вигляді отриманих за допомогою зворотної транскрипції розчинів комплементарної ДНК (кДНК) [7, 8].

#### **Вимоги до ПЛР-лабораторії.**

Вимоги до організації праці в ПЛР-лабораторіях узагальнені та сформульовані у нормативних документах і методичних вказівках [4, 6, 9, 12]. В останніх визначаються принципи організації лабораторії та етапи виконання аналізу з використанням ПЛР: відбір проб, первинна обробка, зберігання, умови перевезення, знезараження біоматеріалу, виділення нуклеїнових кислот, проведення зворотної транскрипції і/або ампліфікації, облік і реєстрація результатів дослідження біоматеріалу.

Методичними вказівками регламентуються дії персоналу лабораторій при виконанні досліджень за допомогою методів ампліфікації НК, які проводять з використанням зареєстрованих у встановленому порядку комплектів реагентів та обладнання.

ПЛР – високотехнологічний метод, що вимагає дотримання найсуворіших правил оснащення лабораторії. Досить сказати, що в приміщенні повинен бути встановлений фільтр біологічної очистки зі ступенем 99,9 %, оскільки в повітрі постійно присутній неймовірний коктейль із фрагментів ДНК усіляких живих організмів, і в процесі підготовки до проведення реакції зразок може бути забруднений з навколишнього середовища. Це є, напевно, однією з найсерйозніших проблем при проведенні ПЛР-діагностики – можливість контамінації. Потрапляння в реакційну пробірку слідів позитивної ДНК (специфічних продуктів ампліфікації ДНК – амплікон; ДНК-стандарту, використовуюваного як позитивний контроль; позитивної ДНК клінічного зразка) приводить до ампліфікації в процесі ПЛР специфічного фрагмента ДНК і, як наслідок, до появи хибнопозитивних результатів.

У процесі роботи можуть зустрітися два види контамінації:

1) перехресна контамінація від проби до проби (в процесі обробки клінічних зразків або

при розкрапуванні реакційної суміші), яка призводить до появи спорадичних хибнопозитивних результатів;

2) контамінація продуктами ампліфікації (амплікону), що має найбільше значення, оскільки в процесі ПЛР амплікони накопичуються у величезній кількості та є ідеальними продуктами для реампліфікації.

Контамінація залишковою мінімальною кількістю амплікону посуду, автоматичних піпеток і лабораторного обладнання, поверхні лабораторних столів або навіть поверхні шкіри співробітників лабораторії призводить до появи систематичних хибнопозитивних результатів.

Необхідно територіально розділити різні стадії проведення аналізу, розміщуючи їх в окремих приміщеннях, таких, як:

1. Пре-ПЛР-приміщення, де проводять обробку клінічних зразків, виділяють ДНК, готують реакційну суміш для ПЛР і ставлять ПЛР (при наявності умов два останні етапи рекомендується також проводити в додатковому окремому приміщенні). У цих приміщеннях забороняється виконувати всі інші види робіт.

2. Пост-ПЛР-приміщення, де проводять детекцію продуктів ампліфікації. В цьому приміщенні допускається використовувати інші методи детекції. Бажано кімнату детекції продуктів ампліфікації розташувати якнайдалі від пре-ПЛР-приміщень.

Робочі приміщення повинні бути оснащені ультрафіолетовими лампами з максимумом випромінювання в межах 260 нм (типу ДБ-60) з розрахунку 2,5 Вт на 1 м<sup>3</sup>. Лампи потрібно розташувати так, щоб прямому опроміненню піддавалися поверхні робочих столів, обладнання та матеріали, з якими має контакт оператор під час проведення ПЛР-аналізу. Опромінення необхідно проводити протягом 1 год до початку роботи і протягом 1 год після її закінчення.

Роботу потрібно виконувати в лабораторному одязі, який необхідно змінювати при переході з одного приміщення в інше, і в одноразових рукавичках. Одяг з різних приміщень слід обробляти окремо. Бажано, щоб на різних етапах проведення ПЛР-аналізу працювали різні співробітники.

Слід використовувати окремі набори дозаторів, пластикового та скляного посуду, лабораторного обладнання, халатів і рукавичок, призначених для різних стадій аналізу, які не можна переносити з одного приміщення в інше. Обладнання, матеріали та інвентар у кожній кімнаті повинні мати відповідне маркування.

Всі етапи роботи необхідно проводити тільки з використанням одноразових витратних матеріалів: наконечників для автоматичних піпеток, пробірок, рукавичок і т. д. Обов'язково потрібно міняти наконечники при переході від проби до проби. Бажано використовувати наконечники з фільтром – аерозольним бар'єром для запобігання потраплянню мікрокрапель розчину в піпетку. Використані пробірки і наконечники треба скидати у спеціальні контейнери або посудину, що містять дезінфекційний розчин [6, 7, 9, 18].

### **Оснащення ПЛР-діагностичної лабораторії.**

#### *Приміщення для підготовки проб:*

1. Окремий стіл або настільний бокс із бактерицидною лампою.
2. Холодильник на 2–8 °С із морозильною камерою.
3. Термостат для пробірок типу “Еппендорф” на 1,5 мл на 25–100 °С.
4. Мікроцентрифуга для пробірок типу “Еппендорф” до 16 тис. г.
5. Струшувач для пробірок типу “Еппендорф” (центрифуга / вортекс).
6. Вакуумний насос із колбою-пасткою для відсмоктування надосадової рідини.
7. Ампліфікатор.
8. Окремі набори автоматичних піпеток змінного об'єму для виділення ДНК і приготування реакційної суміші.
9. Штативи для мікропробірок, автоматичних піпеток і наконечників до автоматичних піпеток.
10. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму (бажано з аерозольним бар'єром).
11. Одноразові поліпропіленові мікропробірки типу “Еппендорф” на 1,5 мл.
12. Одноразові поліпропіленові мікропробірки для ПЛР на 0,2 або 0,5 мл залежно від моделі ампліфікатора.
13. Одноразові гумові рукавички.
14. Окремий халат.

#### *Пост-ПЛР-приміщення:*

1. Окремий стіл.
2. Камера для горизонтального електрофорезу.
3. Джерело постійного струму для електрофорезу.
4. Ультрафіолетовий транслюмінатор для перегляду гелів.
5. Ваги з точністю зважування до 10 мг.
6. Посуд: мірні циліндри на 50 мл, 1 л; колба на 200 мл з термостійкого скла.
7. Електроплита або мікрохвильова піч для плавлення агарози.

8. Окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму.

9. Штативи для мікропробірок, автоматичних піпеток і наконечників до автоматичних піпеток.

10. Одноразові наконечники для піпеток змінного об'єму.

11. Одноразові гумові рукавички.

12. Окремий халат.

Окрім того, в ПЛР-лабораторії необхідно мати сушильну шафу, дистильовану воду, етиловий спирт, соляну і сірчану кислоти, біхромат калію для приготування хромової суміші, пергідроль, хлорамін, посуд для дезінфекційних розчинів.

За умов досліджень з використанням ампліфікації нуклеїнових кислот обов'язкове забезпечення потоковості руху матеріалу, проб НК, продуктів ампліфікації. Робота в лабораторії повинна бути організована тільки в одному напрямку від пре-ПЛР-приміщень до пост-ПЛР-приміщень [3].

У ПЛР-лабораторіях, які використовують з діагностичною метою, здійснюють регулярний внутрішньолабораторний контроль якості досліджень з періодичністю, яка залежить від обсягу роботи і визначена керівником лабораторії, але не менше одного разу на квартал.

Лабораторія повинна брати участь, у встановленому порядку, в заходах (програмах) щодо зовнішньої оцінки якості лабораторних досліджень за конкретними нозологічними формами не менше одного разу на рік.

Внутрішньолабораторний і зовнішній контроль якості лабораторних досліджень здійснюють шляхом аналізу шифрованих атестованих контрольних панелей, які містять позитивні й негативні проби. Під час внутрішньолабораторного контролю якості використовують атестовані на наявність аналізу (його кількості) панелі виробників комерційних наборів [3, 6, 7, 9, 18].

### **Сфери застосування ПЛР у медицині.**

#### *1. Діагностика інфекційних захворювань.*

ПЛР використовують для діагностики ВІЛ, вірусних гепатитів, герпетичної інфекції, цитомегаловірусу, вірусу Епштейна–Барр, папіломавірусної інфекції, хламідіозної, мікоплазмової і гелікобактерної інфекцій та ін. Основними перевагами ПЛР як методу діагностики інфекційних захворювань є його висока специфічність і чутливість, пряме визначення наявності збудника, висока швидкість отримання результату, можливість діагностики не тільки гострих, а й латентних інфекцій.

Застосування ПЛР для діагностики туберкульозу дозволяє в короткі терміни (до 48 год) виявити мікобактерії в будь-якому біологічному

матеріалі. Аналітична чутливість комерційних тест-систем дозволяє ідентифікувати поодинокі колонії (до 10 клітин). Це особливо важливо, тому що мікобактерії повільно ростуть при культивуванні на поживних середовищах [1, 11, 14].

#### *2. Онкологічні захворювання.*

ПЛР є найбільш прийнятним способом точно і швидко визначати аномальну ДНК. Висока чутливість методу дає змогу визначати аномальну ДНК у мізерно малій кількості, що дозволяє виявляти неопластичні клітини на доклінічній стадії пухлинного процесу. Основні напрямки використання ПЛР при онкологічній патології включають: ДНК-діагностику спадкових форм раку; ДНК-діагностику спорадичних форм раку; визначення мікрометастазів; ДНК-діагностику біологічних канцерогенів (HPV 16-го і 18-го типів, HBV і HCV, ретровіруси тощо); доклінічну діагностику пухлин (визначення протой антионкогенів); прогноз захворювання, успішності призначеної терапії, ефективність проведеного лікування на основі діагностики функціональної активності онкогенів; дослідження "архівних" біоптатів із встановленим клініко-гістологічним діагнозом [7, 12, 18].

#### *3. Трансплантологія.*

Сучасна трансплантаційна хірургія не можлива без використання методу ПЛР, який гарантовано показує ступінь тотожності гомотрансплантатів за антигенами головного комплексу гістосумісності (HLA) класів I і II, відповідальних за реакцію відторгнення. Застосовуючи ПЛР для зіставлення генетичної сумісності донора і реципієнта, результати дослідження можна отримати в максимально короткий час [7].

#### *4. Судово-медична практика.*

За останні кілька років метод ПЛР став основним методом експертної оцінки. Для досліджень можна використовувати висушені плями крові, шматочки органічної тканини (наприклад кісткової), змиви з носоглотки, зскрібки зі слизової геніталій і, що найдивніше, фіксовані гістологічні препарати. Генетичні відмінності й збіги визначають, досліджуючи високополіморфні ділянки молекул нуклеїнових кислот, зокрема ділянки зі змінною кількістю коротких повторів (variable number of tandem repeats, VNTR). Аналіз алельних варіантів кількох поліморфних VNTR-локусів дозволяє простежити родинні зв'язки індивідуума або встановити причетність тієї чи іншої особи до злочину. На даний час у криміналістиці й судовій медицині метод ПЛР використовують для визначення батьківства; ідентифікації особистості невідомих трупів; доказу причетності особи до вчинення злочину [7, 18].

### 5. Клініка внутрішніх хвороб.

Розуміння молекулярних основ низки спадкових захворювань людини стало основою вивчення молекулярно-генетичних механізмів формування складних ознак, у тому числі полігенних і мультифакторіальних захворювань. До останніх відносять метаболічний синдром, який включає вісцеральне ожиріння, дисліпідемію, артеріальну гіпертензію, порушення вуглеводного обміну і цукровий діабет, бронхіальну астму, виразкову хворобу, алергічні захворювання та ін. [7, 13].

### 6. Персоналізована медицина (фармакогенетика).

ПЛР застосовують для встановлення безпечності лікарських засобів, причини розвитку побічних ефектів при використанні певних ліків чи відсутності їх ефективності в індивідуальних відмінностях, що детермінуються на генетичному рівні, дії або метаболізму ліків та їх похідних. Наприклад, в одного пацієнта певний вид цитохрому може бути більш активним, в іншого – менш. Для того, щоб визначити, який різновид цитохрому проявляється у пацієнта, перед застосуванням ліків проводять ПЛР-аналіз. За його результатами можна прогнозувати ефективність чи безпечність фармакотерапії. Такий аналіз називають попереднім генотипуванням (англ. prospective genotyping) [7, 8, 12, 18].

### 7. Використання методу ПЛР у наукових дослідженнях.

#### А. Ізоляція генетичного матеріалу.

ПЛР дозволяє легко ізолювати специфічні регіони послідовності ДНК з матеріалу цілого геному з наступним їх використанням в інших генетичних методах.

#### В. Секвенування ДНК.

ПЛР є невід'ємною складовою методу секвенування з використанням мічених флуоресцентною міткою або радіоактивним ізотопом дидезоксинуклеотидів, оскільки в ході полімеризації в ланцюг ДНК вбудовуються похідні нуклеотидів, мічені міткою. Приєднання дидезоксинуклеотиду до ланцюга, що синтезується, призводить до припинення синтезу, дозволяючи визначити положення специфічних нуклеотидів після розділення в гелі.

Клонування гена – це процес виділення гена і, в результаті генно-інженерних маніпу-

ляцій, отримання великої кількості продукту даного гена. ПЛР використовують для того, щоб ампліфікувати ген, який потім вбудовується у вектор – фрагмент ДНК, що переносить чужорідний ген у той самий чи інший організм, зручний для вирощування. Як вектори застосовують, наприклад, плазміди або вірусну ДНК. Вставку генів у чужорідний організм зазвичай використовують для отримання продукту цього гена – РНК або, найчастіше, білка. Таким чином, у промисловій кількості отримують багато білків для застосування в сільському господарстві, медицині та ін.

#### С. Визначення кількості ДНК.

Деякі види ПЛР (наприклад Real-time PCR) дозволяють визначати кількість ДНК у зразку. Що особливо важливо, метод можна використовувати для аналізу невеликої кількості зразка.

#### Д. Визначення експресії генів.

У клітинах кожен ген експресується через виробництво матричної, рибосомної або транспортної РНК; мРНК потім використовується для трансляції – синтезу певного білка. Кількість РНК у клітині для даного гена показує, наскільки ген зараз активний. Використовуючи зворотну транскрипцію для отримання ДНК, комплементарної мРНК (кДНК), а потім ПЛР для ампліфікації цих молекул, можна визначити рівень експресії гена [7, 10, 18].

**Перспективи ПЛР.** Впровадження ПЛР-діагностики показало, що розвиток медицини тісно пов'язаний з досягненнями фундаментальних наук. Основними завданнями сучасної медицини є встановлення причин виникнення і механізмів розвитку патологічного процесу, розробка адекватних методів діагностики, лікування та профілактики на молекулярному і клітинному рівнях. Удосконалення молекулярної діагностики здійснюється із застосуванням нових революційних технологій, оснований на полімеразній ланцюговій реакції і гібридизації. Створення потужної молекулярно-генетичної лабораторії в нашому університеті дозволить зробити значний крок у напрямку діагностики патогенів, спадкових захворювань, схильності до соціально значущих мультифакторіальних хвороб, онкологічних захворювань, для вивчення ефективності застосування лікарських засобів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. – Л. : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. – 277 с.
2. Глазко В. И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика : учеб. пособ. / В. И. Глазко, Г. В. Глазко ; Ин-т агроэкологии и биотехнологии УААН. – К. : КВИЦ, 2003. – 640 с.
3. Кудрявцева Л. В. Опыт модернизации клинико-диагностической лаборатории ФГБУ "Поликлиника № 1" Управления делами Президента Российской Федерации / Л. В. Кудрявцева // Лаб. служба. – 2012. – № 1. – С. 4–8.
4. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / за ред. В. В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 764 с.
5. Лопухов Л. В. Полимеразная цепная реакция в микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эльдейнштейн // Клини. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – 2, № 3. – С. 96–105.
6. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV группы патогенности : методические указания МУ 1.3.2569-09. – М. : Госсанэпиднадзор, 2009.
7. Романенко В. Н. Полимеразная цепная реакция: принципы, достижения, перспективы использования в диагностике инфекций / В. Н. Романенко, И. В. Свистунов, О. А. Лавриненко // Лаб. диагностика. – 1998. – № 4. – С. 45–51.
8. Стегній Б. Т. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська ; ред. Б. Т. Стегній, А. П. Герілович. – Х. : НТМТ, 2010. – 227 с.
9. 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.
10. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Review. / S. A. Bustin // J. Mol. Endocrinol. – 2000. – 25(2). – 169–193.
11. Developing Methodologies for the Use of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomiasis : Prepared under the Framework of an RCA Project with the Technical Support of the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture / IAEA-TECDOC-1559. – IAEA, 2007. – 294 p.
12. Edwards K. Real-time PCR: An essential guide / K. Edwards, J. Logan, N. Saunders. – Wymondham : Horizon Bioscience, 2004. – 346 p.
13. 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. – 230 (4732). – P. 1350–1354.
14. Kuzmak J. Wykrywanie prowirusowego DNA wirusa białaczki bydła metoda polymerase chain reaction (PCR) / J. Kuzmak, J. Gtundbolck, B. Kozaczynska // Medycyna Vet. – 1993. – 49. – P. 312–315.
15. Long PCR / D. Cheng, Sh.-Y. Chang, P. Gravitt, R. Reppas // Nature. – 1994. – 369. – P. 684–685.
16. Sambrook J. Molecular cloning / J. Sambrook, D. Russel. — N.Y. : Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2222 p.
17. Schmittgen T. D. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_t$  method / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // Nature Protocols. – 2008. – № 3. – P. 1101–1108.
18. Schmittgen T. D. Real-time quantitative PCR. / T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – № 25(4). – P. 383–385.

**А. М. Олещук, А. Е. Мудра, Н. Б. Зозуляк**

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## ПЦР-ДИАГНОСТИКА: ПРИНЦИПЫ, ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

### Резюме

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, или PCR) – экспериментальный метод молекулярной биологии, способ значительного увеличения малых концентраций желаемых фрагментов ДНК в биологическом материале. Молекулярно-генетические исследования сегодня выполняют на основе ПЦР-исследований. В статье представлены современные данные о принципе данного метода и основных этапах проведения ПЦР-исследований. Приведены главные требования, предъявляемые к структуре и работе в ПЦР-лаборатории. Показаны основные области применения ПЦР в медицине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полимеразная цепная реакция, лаборатория, медицина.

## **PCR DIAGNOSTICS: PRINCIPLES, ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS**

### **Summary**

*Polymerase chain reaction (PCR) is a simple experimental molecular biology technique that allows a specific stretch of DNA to be copied billions of times in a few hours. Carrying out molecular genetic studies are mainly based today on PCR. The article presents current data on the principle of the method and the main stages of PCR research. The basic requirements on the structure and operation of PCR - lab are imposed. The applicability of PCR in medicine is discussed.*

**KEY WORDS: polymerase chain reaction, laboratory, medicine.**

Отримано 14.07.14

**Адреса для листування:** О. М. Олещук, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.