

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

16 июля 2009 г.

Регистрационный № 008-0208

**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЬНЫХ  
ВАРИАНТОВ HELICOBACTER PYLORI С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный  
медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Е.В. Воропаев, канд. биол. наук О.Ю. Баранов, д-р  
мед. наук, проф. С.В. Жаворонок, д-р мед. наук, проф. С.И. Пиманов, канд.  
мед. наук, доц. Е.В. Макаренко, д-р биол. наук В.Е. Падутов, А.В. Воропаева

Гомель 2009

В последнее десятилетие молекулярно-генетические методы находят все более широкое применение в клинической диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний, задачей которых является как можно более раннее выявление заболевания, а также мониторинг проводимой терапии. Особое значение эти методы приобретают в случае трудно культивируемых, медленно растущих, некультивируемых микроорганизмов, а также случаев заболеваний, связанных с генетическими нарушениями. Открытие инфекции *Helicobacter pylori* и подтверждение ее роли в развитии заболеваний желудочно-кишечного тракта послужило мощным толчком к дальнейшему исследованию этого микроорганизма. С 1994 г. *Helicobacter pylori* является безусловным и единственным из бактериальных патогенов канцерогеном по классификации Международного агентства по изучению рака. В 2005 г. европейская рабочая группа EHPSG — «Консенсус Маастрихт-3» приняла всесторонние и обобщающие подходы к анализу взаимоотношений между инфекцией *Helicobacter pylori* и такими заболеваниями, как функциональная диспепсия, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, НПВП-гастропатия, а также современным подходам к диагностике инфекции и проведению эрадикационной терапии. Согласно полученным данным риск развития эрозий и язв желудка и двенадцатиперстной кишки у *Helicobacter pylori*-положительных больных выше, чем у *Helicobacter pylori*-отрицательных. Тяжесть клинического течения геликобактериоза во многом зависит от степени патогенности штаммов *Helicobacter pylori*. Это в свою очередь определяется наличием и особенностями цитотоксических генов. Для диагностики патологических состояний, связанных с *Helicobacter pylori*, используется целый набор методов, включающий в себя быстрый уреазный тест, иммуноферментный анализ, морфологические и молекулярно-генетические методы, одним из вариантов которых является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Открытая в середине 80-х гг., полимеразная цепная реакция способна увеличить количество копий исходной пробы ДНК в миллионы раз в течение нескольких часов. 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 из которого является так называемый термоциклер (амплификатор) или программируемый термостат, обеспечивающий температурный и временной контроль стадий полимеразной цепной реакции в ходе амплификации, или многократного копирования ДНК в условиях *in vitro*. ПЦР-диагностика обладает рядом преимуществ:

1. Высокой специфичностью, которая обусловлена подбором праймеров, комплементарных уникальной нуклеотидной последовательности тестируемых микроорганизмов, вирусов и т. д.

2. Адекватной чувствительностью, позволяющей диагностировать не только острые, но и латентные инфекции в клинически значимом титре (возможно выявление даже единичных бактерий или вирусов).

3. Универсальностью для выявления различных инфекционных агентов.
4. Возможностью идентификации возбудителя в течение 3–4 ч.
5. Важной отличительной особенностью ПЦР-диагностики является относительно низкая стоимость оборудования и тест-систем для проведения анализа, которые сочетаются с универсальностью метода.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Лабораторное оборудование, применяемое в ПЦР-диагностике, должно позволять проводить все необходимые этапы работы с ДНК, начиная с ее выделения из биологического материала, дальнейшую амплификацию и детекцию продуктов амплификации методом электрофореза.

Ниже в таблице приведен оптимальный вариант набора оборудования для организации ПЦР-лаборатории.

Таблица

Оптимальный набор оборудования для организации ПЦР-лаборатории

<b>Оборудование для пробоподготовки</b>	<b>Количество</b>
Высокоскоростная микроцентрифуга с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл до 10 000–12 000×g	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до -10 °С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл, 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
Насос с колбой-ловушкой	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не менее -16 °С	1
Центрифуга лабораторная медицинская	1
Спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК	1
<b>Оборудование для амплификации</b>	<b>Количество</b>
Амплификатор ДНК	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл (2 шт.); 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до -10 °С	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее -16 °С	1

Оборудование для регистрации результатов амплификации	Количество
Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального электрофореза	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 мкл; 5–50 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл)	1
УФ-трансиллюминатор	1
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее -16 °С	1

Следует учесть, что при проведении исследований методом ПЦР необходимым является наличие расходных материалов, таких как резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл, ПЦР-пробирки, стеклянные пестики, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др. Желательно наличие основного набора реагентов для работы по оригинальным методикам и для приготовления собственных растворов, реакционных смесей и т.д.

Агароза — компонент агарозного геля, ацетат аммония,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  — выделение ДНК, борная кислота,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — компонент электрофоретического буфера, бромид этидия,  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$  — окраска ДНК, бромфеноловый синий — электрофоретический маркер, глицерин,  $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$  — широкий спектр применения, термостабильная ДНК-полимераза — компонент ПЦР-смеси, изопропанол,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$  — выделение ДНК, лаурилсульфат натрия,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SNa}$  — выделение ДНК, маркер молекулярной массы — электрофоретический маркер, дНТФ (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ) — компонент ПЦР-смеси, праймеры — компонент ПЦР-смеси, соляная кислота,  $\text{HCl}$  — широкий спектр применения, трис,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  — компонент большинства буферных растворов, уксусная кислота,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  — широкий спектр применения, хлорид калия,  $\text{KCl}$  — компонент ПЦР-смеси, хлорид магния,  $\text{MgCl}_2$  — компонент ПЦР смеси, хлорид натрия,  $\text{NaCl}$  — выделение ДНК, хлороформ  $\text{CHCl}_3$  — выделение ДНК, ЭДТА,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — широкий спектр применения, этиловый спирт  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  — осаждение ДНК.

### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Показаниями к определению генотипов и аллельных вариантов *Helicobacter pylori* являются: обследование больных с хроническими воспалительными заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки.

Методика ПЦР, предложенная в разработанной нами инструкции, является наиболее совершенным лабораторным методом, позволяющим выявлять цитотоксические генотипы и аллельные варианты патогенных штаммов *Helicobacter pylori*, что является необходимым в прогнозе течения

гастродуоденальной патологии. Она может быть применена в медицинских и научных учреждениях.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

Материалом для выделения ДНК *Helicobacter pylori* является содержимое зубодесневых карманов, биоптаты слизистой оболочки желудка, кал, чистые культуры *Helicobacter pylori*.

Наиболее часто в ПЦР-лабораториях нашей республики выделение ДНК для выявления *Helicobacter pylori* проводят с помощью коммерческих наборов производства ЦНИИЭ МЗ РФ и НПФ «Литех» (Россия). Несомненно, использование данных наборов удобно в работе с небольшим количеством выделенной ДНК, при проведении 1–5 исследований. Для генотипирования *Helicobacter pylori* оптимально использовать методы, дающие возможность получения большого количества ДНК, которое позволит провести значительное количество исследований из одного образца. На наш взгляд, наиболее оптимальным методом выделения ДНК из биоптатов желудка является SDS метод, который позволяет получить достаточное количество высококачественных препаратов суммарной ДНК для проведения последующей реакции амплификации. Ниже приводим протокол по данному методу выделения ДНК из биоптатов желудка.

### **Выделение суммарной ДНК из биоптатов SDS-методом**

**Экстракция.** Образец, массой 5–10 мг, поместить в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 200 мМ р-р трис; 250 мМ р-р хлорида натрия; 25 мМ р-р трилона Б; 0,5% лаурилсульфат натрия (рН буфера довести HCl до значения 8,1) и перемешать на вортексе. После этого пробирку поместить в твердотельный термостат и инкубировать в течение 30 мин при 65 °С.

**Очистка гомогенатов.** После экстракции в пробирку добавить 350 мкл охлажденного 5М кислого р-ра ацетата натрия (рН 5,0). Содержимое перемешать и инкубировать в твердотельном термостате (Т = 0 °С) в течение 20 мин. После инкубации гомогенаты центрифугировать при 12 000×g (Т = 4 °С) в течение 10 мин. По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 650 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и смешать с 650 мкл хлороформа и центрифугировать при 12 000×g (Т = 4 °С) в течение 10 мин.

**Осаждение ДНК.** По окончании центрифугирования пипеткой отобрать 600 мкл супернатанта, перенести в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавить 600 мкл изопропанола. Содержимое пробирки перемешать и инкубировать при

температуре  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин. Далее произвести центрифугирование при  $12\ 000\times g$  ( $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в течение 15 мин.

**Очистка препарата ДНК.** Супернатант слить, а полученный осадок ДНК промыть 1000 мкл 65% этанола, охлажденного до температуры  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . После промывания содержимое пробирки центрифугировать при  $12\ 000\times g$  ( $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в течение 10 мин. Процедуру промывки повторить 2–3 раза для удаления из осадка остатков трилона Б, ацетата натрия и изопропанола.

**Лиофилизация препарата ДНК.** После промывки этанолом открыть крышки и просушить осадок ДНК в течение 30–40 мин ( $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) до полного испарения этанола.

**Растворение препарата ДНК.** Высушенный осадок растворить в 30 мкл бидистиллированной и деионизированной воды при  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранить при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  для последующего анализа.

После выделения ДНК необходимо определить ее количество спектрофотометрическим методом. В настоящее время наиболее оптимальным фотометром для определения количества ДНК является безкюветный вариант спектрофотометра, позволяющий проводить определение концентрации ДНК в 1 мкл в течение 10 с.

Для проведения ПЦР оптимальное количество геномной ДНК, вносимого в реакцию смесь, должно составлять от 20 до 50 нг.

Далее проводится выявление ДНК *Helicobacter pylori*, для чего можно использовать, например, коммерческую ПЦР-тест-систему производства ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ «АмплиСенс-100-R» для амплификации участка ДНК длиной 520 пар нуклеотидов 16S-рибосомального гена *Helicobacter pylori*. После получения положительного результата проводится дальнейшее выявление аллельных вариантов и генотипов *Helicobacter pylori*.

В разделах «амплификация» и «электрофорез» представлены теоретические основы формирования ПЦР-смесей, проведения ПЦР и интерпретации результатов.

### **Амплификация**

При проведении амплификации основными компонентами реакционной (ПЦР) смеси являются: ПЦР-буфер (Трис-НСl, КСl,  $\text{MgCl}_2$ ), смесь нуклеотидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ), праймеры (олигонуклеотиды), термостабильная ДНК-полимераза, препарат анализируемой ДНК. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в полимеразной цепной реакции, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации.

**Трис-НСl** — определяет рН реакционной смеси, создает буферную емкость. Активность ДНК-полимеразы зависит от рН среды, поэтому значение водородного показателя напрямую влияет на ход полимеразной цепной реакции. Обычно значение рН находится в пределах 8–9,5. Высокое значение рН берется из-за того, что при повышении температуры рН Трис-НСl буфера падает (температурный коэффициент  $\sim -0,031\text{ ед. рН}/^{\circ}\text{C}$ ) и при  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  составляет  $\sim 7,5$ .

**KCl** — определяет протекание процессов денатурации и отжига. Концентрация хлорида калия в ПЦР смеси свыше 50 мМ ингибирует ДНК-полимеразу.

**MgCl<sub>2</sub>** — поскольку ДНК-полимераза является Mg<sup>2+</sup>-зависимым ферментом, то концентрация ионов магния влияет на активность фермента (Mg<sup>2+</sup> образует комплексы с НТФ — именно эти комплексы являются субстратом для полимеразы). Высокая концентрация приводит к увеличению неспецифической амплификации, а низкая ведет к ингибированию реакции, оптимум (для различных полимераз) находится в области 0,5–5 мМ. Кроме того, концентрация солей магния влияет на протекание процессов денатурации и отжига — повышение концентрации Mg<sup>2+</sup> вызывает повышение температуры плавления ДНК (т. е. температуры, при которой 50% двухцепочечных нитей ДНК разъединяются на одноцепочечные).

**НТФ** — нуклеотидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нуклеиновых кислот. Для предотвращения цепной терминации рекомендуется равноколичественное соотношение всех четырех нуклеотидтрифосфатов. Низкая концентрация данных компонентов реакционной смеси (10–20 мМ) увеличивает вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК. Диапазон используемых концентраций — 50–500 мМ.

**Праймеры** — олигонуклеотиды, являющиеся затравкой для начала синтеза полинуклеотидной цепи.

Используемый диапазон концентраций: 0,1–0,6 мМ. Оптимальная концентрация праймеров подбирается эмпирически. Иногда при длительном хранении при 4 °С или после большого количества замораживаний-оттаиваний праймеры образуют вторичные структуры — димеры, снижающие эффективность протекания ПЦР. Устранение данной проблемы сводится к инкубации на водяной бане (Т = 95 °С) в течение 3 мин с последующим резким охлаждением до 0 °С. Наиболее оптимальным является использование праймеров с разницей температур плавления (Т<sub>м</sub>) не более 2–4 °С. Область отжига праймеров должна находиться вне зон мутаций, делеций или инсерций в пределах видовой или иной, взятой в качестве критерия при выборе праймеров, специфичности. При попадании на такую зону отжига праймеров происходить не будет, и как следствие — ложноотрицательный результат.

**Термостабильная ДНК-полимераза** — термостабильный фермент; при использовании малого количества ДНК-полимеразы наблюдается уменьшение синтеза конечного продукта, прямо пропорциональное размеру фрагментов. Избыток полимеразы в 2–4 раза приводит к появлению диффузных спектров, а в 4–16 раз — низкомолекулярных неспецифичных спектров. Диапазон используемых концентраций — 0,5–1,5 единиц активности в пересчете на 25 мкл ПЦР смеси. Примесь в рекомбинантных полимеразах ДНК бактерий вызывает появление неспецифичных ампликонов. Точность синтеза зависит от концентрации Mg<sup>2+</sup>, НТФ, рН. В

среднем частота ошибок, например, у *Taq*-полимеразы, чуть ниже, чем 1 замена на 100–300 п.н.

**Препараты ДНК** — количество и качество препарата ДНК (матрицы) непосредственно влияет на ход и параметры полимеразной цепной реакции. Избыточное количество образца ДНК ингибирует ПЦР. Диапазон используемых концентраций: геномная ДНК — 10–500 нг, бактерий — 1–10 нг, плазмидная ДНК — 0,2–5 нг.

Спектрофотометрический анализ позволяет измерить концентрацию ДНК и оценить чистоту полученных препаратов. Однако он не позволяет выявить степень деградации молекул в препарате. Для проведения такого анализа используют электрофоретический анализ полученных препаратов ДНК.

Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо установление значений этих показателей с помощью спектрофотометра. Для определения количества ДНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Оптическая плотность  $OD = 1 A$  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. Если препарат содержит примесь белка, то  $OD_{260}/OD_{280}$  меньше указанного выше значения, и необходимо провести дополнительную очистку препарата. Кроме того, проводят дополнительное измерение препаратов при 320 нм. В чистых препаратах значение  $OD_{320}$  должно стремиться к нулю.

Примеси различных веществ, находящихся в препарате ДНК, могут также уменьшать эффективность протекания ПЦР: ацетат натрия, хлорид натрия, Трилон Б, изопропанол, этанол, гепарин, фенол, мочевины, гемоглобин и др.

Кроме основных компонентов ПЦР смеси, используют ряд дополнительных веществ, улучшающих качественные и количественные показатели ПЦР: ацетамид (5%) — увеличение растворимости основных компонентов; бетаин (натриевая соль) (0,8–1,6 М) — стабилизация ДНК-полимеразы, понижение температуры плавления ДНК, выравнивание температуры плавления АТ- и GC-насыщенных регионов; альбумин бычий (10–100 мкг/мл) — стабилизация ДНК-полимеразы; диметилсульфоксид (1–10%) — повышение растворимости основных компонентов; формамид (2–10%) — увеличение специфичности отжига в GC-насыщенных регионах; глицерин (15–20%) — увеличение термостабильности фермента, понижение температуры денатурации образца ДНК; сульфат аммония (15–30 мМ) — снижение температуры денатурации и отжига.

В результате проведенных нами исследований по генотипированию *Helicobacter pylori* был подобран состав реакционной стандартной ПЦР-смеси на 1 анализ, состоящий из следующих компонентов:

10-кратный ПЦР-буфер (100 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 500 мМ КСl;  
25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Твин 20) — 2,5 мкл  
Смесь нуклеотидов дНТФ 10 мМ — 0,5 мкл  
Праймер прямой 10 мкМ — 1 мкл  
Праймер обратный 10 мкМ — 1 мкл  
Вода деионизированная – 18,8 мкл  
*Taq*-полимераза (5 ед./мкл) — 0,2 мкл  
Образец ДНК (20-40 нг) — 1 мкл

Алгоритм программы ПЦР следующий:

**1 этап** (1 цикл)

Первичная длительная денатурация препарата ДНК

**2 этап** (30–35 циклов)

Быстрая денатурация препарата ДНК

Отжиг праймеров

Элонгация

**3 этап** (1 цикл) Длительная элонгация. Охлаждение реакционной смеси

Каждый элемент этапа — денатурация, отжиг, элонгация — имеет индивидуальные температурные и временные характеристики. Параметры температуры и времени протекания этапов для каждого из генов представлены в приложении.

**Денатурация.** В ходе данного элемента полимеразной цепной реакции происходит расщепление двухцепочечной молекулы ДНК на две одноцепочечные. Температурные параметры денатурации находятся в области 90–95 °С, но в случае ДНК-образца с большим содержанием гуанина и цитозина, температура должна быть увеличена до 98 °С. Температура денатурации должна быть достаточной для полной денатурации — расщепления нитей ДНК и избежания «внезапного охлаждения» или быстрого отжига, однако, термостабильная ДНК-полимераза менее устойчива при высоких температурах. Таким образом, подбор оптимальных температурных параметров денатурации для соотношения праймер/образец (препарат ДНК) является важным условием при проведении амплификации. Если температура денатурации на первом этапе выше 95 °С, ряд авторов рекомендует добавлять ДНК-полимеразу в реакционную смесь после первичной денатурации. Время данного элемента этапа в ходе ПЦР должно быть достаточным для полной денатурации ДНК, но в то же время не оказывать существенного влияния при данной температуре на стабильность ДНК-полимеразы.

**Отжиг.** Температура отжига ( $T_a$ ) — один из важнейших параметров полимеразной цепной реакции. Температура отжига для каждого конкретного праймера подбирается индивидуально (Rychlik et al., 1990). Она зависит от длины и нуклеотидного состава праймера. Обычно она ниже на 2–4 °С значения  $T_m$  (температуры плавления) праймера. Если температура отжига системы ниже оптимальной, то число неспецифичных амплифицированных фрагментов возрастает и, наоборот, более высокая

температура уменьшает количество амплифицированных продуктов. При этом концентрация специфичных ампликонов может резко снижаться вплоть до ингибирования ПЦР. Увеличение времени отжига также приводит к увеличению количества неспецифических ампликонов.

**Элонгация.** Обычно каждый вид термостабильной ДНК-полимеразы имеет индивидуальный температурный оптимум активности. Скорость синтеза ферментом комплементарной нити ДНК также является величиной специфичной для каждой полимеразы (в среднем она составляет 30–60 нуклеотидов в 1 с, или 1–2 тыс. оснований в 1 мин), поэтому время элонгации подбирается в зависимости от типа ДНК-полимеразы и длины амплифицируемого региона.

Структура подобранных нами праймеров и программ амплификации для определения генотипов и аллельных вариантов *Helicobacter pylori* даны в приложении. Время амплификации составляет не более 2-х ч.

### **Электрофорез**

Разделение нуклеиновых кислот основано на том, что смесь их макромолекул в определенных средах под действием электрического поля делится на ряд фракций в зависимости от размера фрагмента и конформационной структуры (кольцевая форма, линейная и др.). С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности. Следует отметить, что наиболее распространенным методом является гель-электрофорез, т. е. фракционирование в специальных гелевых пластинах или блоках. В качестве поддерживающих носителей наиболее часто применяют агарозу и полиакриламид.

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах. Для агарозных гелей чаще применяются горизонтальные камеры.

Для приготовления агарозного геля агарозу растворяют в электрофоретическом буфере (обычно Трис-ЭДТА-боратный или Трис-ЭДТА-ацетатный) путем нагревания смеси. Затем горячий раствор заливают в специальную кювету. После полимеризации гель помещается в камеру. С помощью пластмассовых гребенок в геле выдавливают лунки. Далее отсеки камеры наполняют электрофоретическим буфером, так чтобы слой буфера над гелем составил 5–7 мл. В лунки геля с помощью пипетки вводят образцы, смешанные с буфером для загрузки, камеру плотно закрывают, подсоединяют электроды и подключают к универсальному источнику питания. Напряжение, сила тока и время электрофореза подбирают эмпирически.

После электрофоретического фракционирования гель кладут в кювету, где и производят окрашивание. Для флюоресцирующего окрашивания используют раствор этидиумбромиды (после окраски гель просматривают под ультрафиолетовым светом).

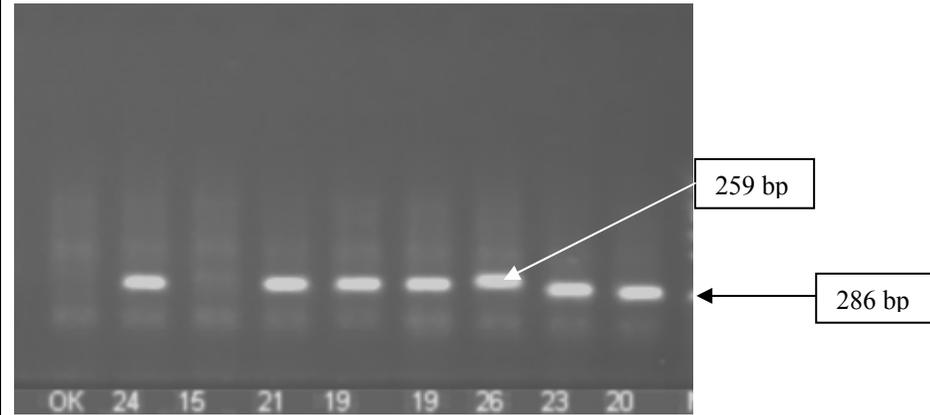
Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см. Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов в пробе и их размеров. Если лунка будет переполнена (в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК), то полоса окажется расплывчатой, и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов. При анализе простого набора молекул ДНК вносят 0,2–0,5 мкг ДНК.

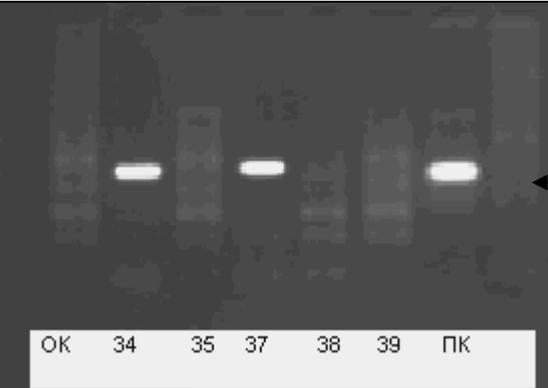
Для визуализации полученных результатов применяют любую стандартную видеосистему (трансиллюминатор с видеосистемой), для переноса изображения на компьютер используется различное программное обеспечение, позволяющее фиксировать полученные фотографические изображения гелей, например, можно использовать программу Vitran Photo, Image Master Elite, Quantity One или аналогичные.

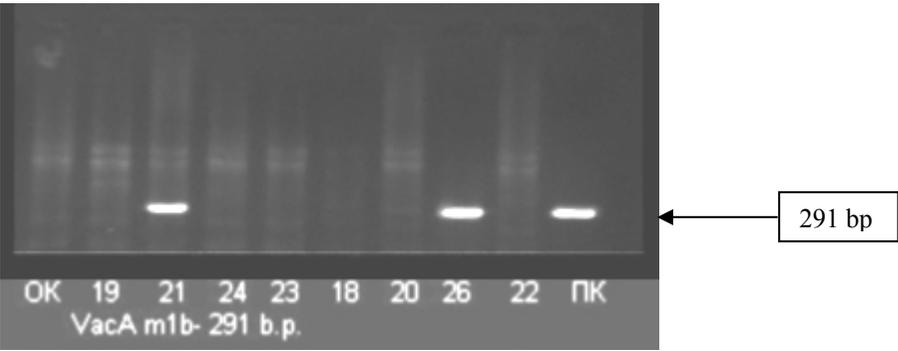
### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ПРИМЕНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Проведение ПЦР требует строгого соблюдения правил в организации работы ПЦР-лаборатории на всех этапах анализа. Отсутствие достаточного опыта использования амплификационных технологий и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, могут приводить к ошибкам, результатом которых может стать неверное — ложноотрицательное или ложноположительное заключение. С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Поскольку эти процедуры осуществляются вне ПЦР-лаборатории, большое внимание следует уделять обучению медицинского персонала, выполняющего забор проб, так как именно от него во многом зависит качество ПЦР-анализов. Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении безопасности работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности. Случаи тотальной контаминации выявляются без труда по появлению линии «положительной» ДНК во всех пробах, включая отрицательный контроль. Реагенты, загрязненные «положительной» ДНК, подлежат ликвидации. Повторная реакция ставится с новыми реагентами. Гораздо более сложно выявить случаи контаминации в отдельных пробах. Это можно сделать при выделении ДНК и постановке реакции в 2 или 3-х параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Эпизодические случаи появления линии «положительной» ДНК в отрицательном контроле свидетельствуют о возможности контаминации и в пробах.

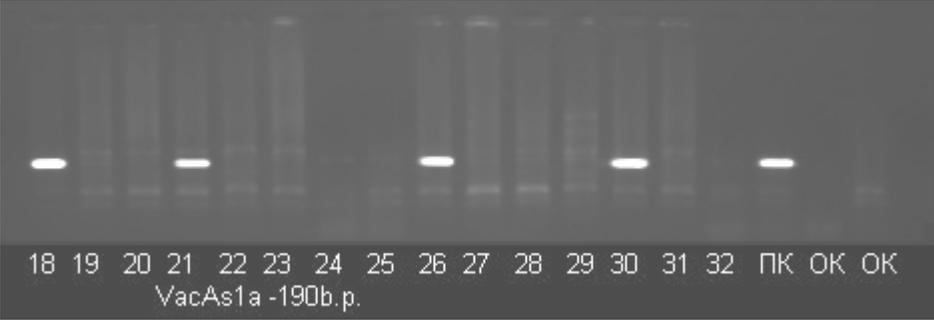
ПЦР анализ генов Helicobacter Pylori

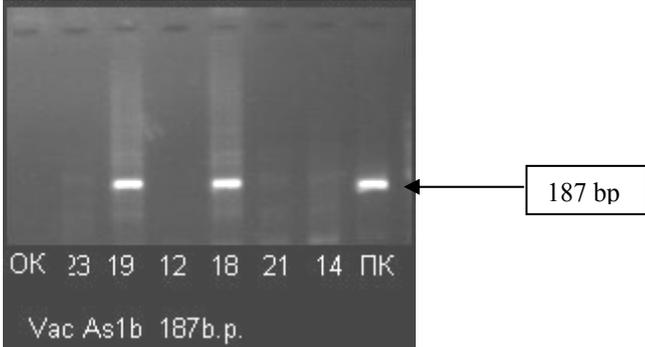
<p><b>Ген VacAs (s1 and s2)</b></p>																				
<p>Праймеры                      5'-ATGGAAATACAACAACACAC-3/                      5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'                      Размер искомого фрагмента для — VacAs1 259 п.н.                      Размер искомого фрагмента для — VacAs2 — 286 п.н.</p>	<p>19, 21, 24, 26 — ПОЗИТИВНЫЕ ПО VacAs1 ОБРАЗЦЫ                      20, 23 — ПОЗИТИВНЫЕ ПО VacAs2 ОБРАЗЦЫ                      15, ОК — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</p>																			
<p>Программа ПЦР:</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">95 °С</td> <td style="width: 30%;">3 мин</td> <td style="width: 40%;">1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95 °С</td> <td>30 с</td> <td>35 циклов</td> </tr> <tr> <td>55 °С</td> <td>30 с</td> <td></td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>30 с</td> <td></td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>2 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4 °С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	30 с	35 циклов	55 °С	30 с		72 °С	30 с		72 °С	2 мин	1 цикл	4 °С	хранение	
95 °С	3 мин	1 цикл																		
95 °С	30 с	35 циклов																		
55 °С	30 с																			
72 °С	30 с																			
72 °С	2 мин	1 цикл																		
4 °С	хранение																			

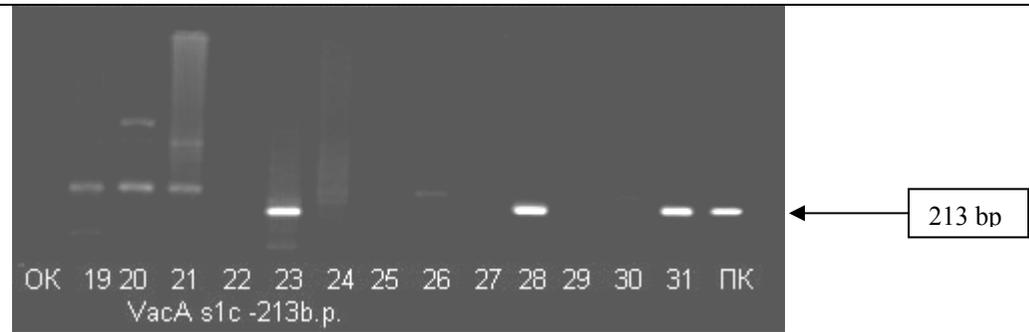
Ген VacAmla		
Праймеры 5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG -3' 5'-CCATTGGTACSTGTAGAAAC -3' Размер искомого фрагмента — 290 п.н.	ПК, 34, 37 — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ ОК, 35, 38, 39 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ	
Программа ПЦР:		
95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
55 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	

<p>Ген VacAm1b</p>																		
<p>Праймеры  5'-GGCCSSAATGCAGTCATGGAT -3'  5'-GCTGTTAGTGCСТАААГААГСАТ -  3'/Размер искомого фрагмента — 291 п.н.</p>	<p>21, 26, ПК — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ  ОК, 18, 19, 20, 22, 23, 24 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</p>																	
<p>Программа ПЦР:</p> <table border="0" data-bbox="224 1018 2089 1337"> <tr> <td>95 °С</td> <td>3 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95 °С</td> <td>30 с</td> <td rowspan="3">35 циклов</td> </tr> <tr> <td>57 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>2 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4 °С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	30 с	35 циклов	57 °С	30 с	72 °С	30 с	72 °С	2 мин	1 цикл	4 °С	хранение	
95 °С	3 мин	1 цикл																
95 °С	30 с	35 циклов																
57 °С	30 с																	
72 °С	30 с																	
72 °С	2 мин	1 цикл																
4 °С	хранение																	

<p>ГЕН VacAm2</p>																		
<p>Праймеры  5'- GGAGCCCCAGGAAAC ATTG-3'  5'- CATAACTAGCGCCTTGCAC-3'</p> <p>Размер искомого фрагмента — 352 п.н.</p>	<p>М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА  437, 413, 460, 427, 514, 526 — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ  538, 470, 516, 510, 446, 476, 482 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</p>																	
<p>Программа ПЦР:</p> <table border="0" data-bbox="235 970 1691 1279"> <tr> <td>95 °С</td> <td>3 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95 °С</td> <td>30 с</td> <td rowspan="3">35 циклов</td> </tr> <tr> <td>50 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>2 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4 °С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	30 с	35 циклов	50 °С	30 с	72 °С	30 с	72 °С	2 мин	1 цикл	4 °С	хранение	
95 °С	3 мин	1 цикл																
95 °С	30 с	35 циклов																
50 °С	30 с																	
72 °С	30 с																	
72 °С	2 мин	1 цикл																
4 °С	хранение																	

<p><b>Ген VacAs1a</b></p>																		
<p><b>Праймеры</b>  5' GTCAGCATCACACCGCAAC-3'  5' -ATGGAATACAACAACACAC-3'</p> <p>Размер искомого фрагмента - 190 п.н.</p>	<p>М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА  18, 21, 26, 30, ПК — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ  19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, ОК — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</p>																	
<p><b>Программа ПЦР:</b></p> <table border="0" data-bbox="224 1021 2016 1340"> <tr> <td>95<sup>0</sup>С</td> <td>3 минуты</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95<sup>0</sup>С</td> <td>30 секунд</td> <td rowspan="3">35 циклов</td> </tr> <tr> <td>50<sup>0</sup>С</td> <td>30 секунд</td> </tr> <tr> <td>72<sup>0</sup>С</td> <td>30 секунд</td> </tr> <tr> <td>72<sup>0</sup>С</td> <td>2 минуты</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4<sup>0</sup>С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 <sup>0</sup> С	3 минуты	1 цикл	95 <sup>0</sup> С	30 секунд	35 циклов	50 <sup>0</sup> С	30 секунд	72 <sup>0</sup> С	30 секунд	72 <sup>0</sup> С	2 минуты	1 цикл	4 <sup>0</sup> С	хранение	
95 <sup>0</sup> С	3 минуты	1 цикл																
95 <sup>0</sup> С	30 секунд	35 циклов																
50 <sup>0</sup> С	30 секунд																	
72 <sup>0</sup> С	30 секунд																	
72 <sup>0</sup> С	2 минуты	1 цикл																
4 <sup>0</sup> С	хранение																	

<p><b>Ген VacAs1b</b></p>																		
<p><b>Праймеры</b>  5' GTCAGCATCACACCGCAAC-3'  5' -ATGGAATACAACAACACAC-3'</p> <p>Размер искомого фрагмента — 187 п.н.</p>	<p>18, 19, ПК — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ  ОК, 12, 14, 21, 23 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</p>																	
<p><b>Программа ПЦР:</b></p> <table border="0" data-bbox="224 1021 2049 1332"> <tr> <td>95 °С</td> <td>3 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95 °С</td> <td>30 с</td> <td rowspan="3">35 циклов</td> </tr> <tr> <td>50 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>2 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4 °С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	30 с	35 циклов	50 °С	30 с	72 °С	30 с	72 °С	2 мин	1 цикл	4 °С	хранение	
95 °С	3 мин	1 цикл																
95 °С	30 с	35 циклов																
50 °С	30 с																	
72 °С	30 с																	
72 °С	2 мин	1 цикл																
4 °С	хранение																	
<p><b>Ген VacAs1c</b></p>																		



**Праймеры**

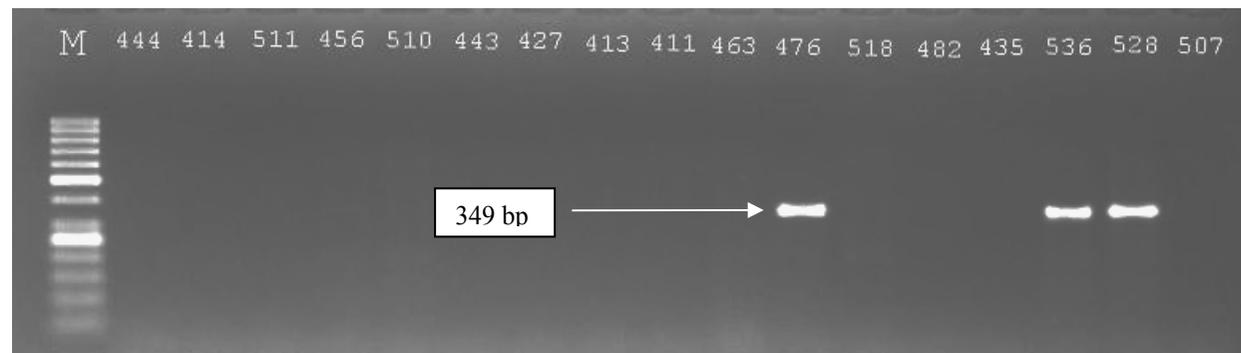
5' CTYGCTTTAGTRGGGYTA-3'  
 5' -ATGGAATACAACAACACAC-3'  
 Размер искомого фрагмента — 213 п.н.

23, 28, 31, ПК — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ  
 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

**Программа ПЦР:**

95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
50 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	

**Ген CagA**



**Праймеры**

5'-GATAACAGGCAAGCTTTTGAGGGA -3'

5'-CTGCAAAAGATTGTTTGGCAG A- 3'

Размер искомого фрагмента — 349 п.н.

М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА

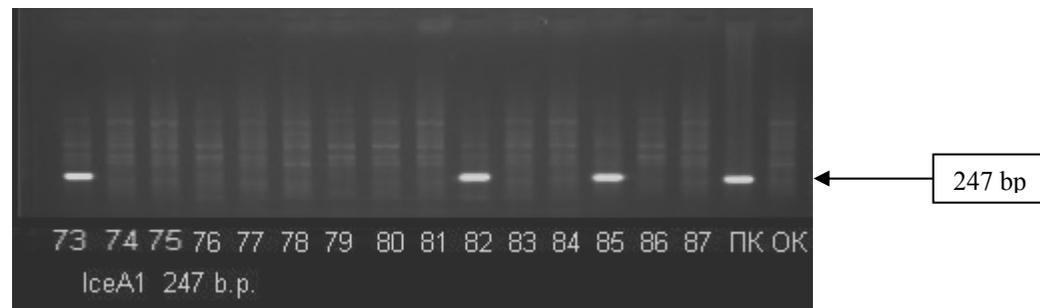
476, 528, 536 — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

411, 413, 414, 427, 435, 443, 444, 456, 463, 482, 507, 511, 518 — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

**Программа ПЦР:**

95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
55 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	

**Ген IceA1**



**Праймеры**

5'-GTGTTTTTAACSSAAAGTATC -3'

5'-СТАТАGССАСТУТСТТТGСА-3'

Размер искомого фрагмента — 247 п.н.

73, 82, 85, ПК — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

74–81, 83, 84, 86, 87, ОК — НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

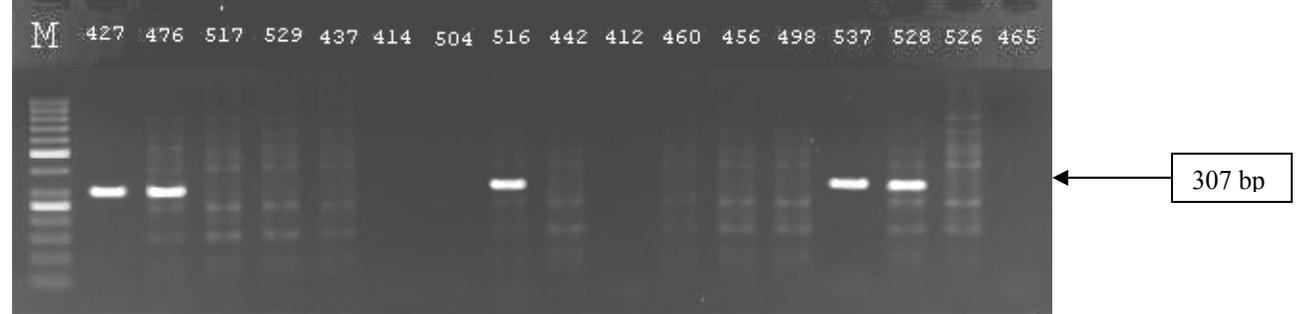
**Программа ПЦР:**

95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
43 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	

<p><b>Ген IceA2</b></p>																		
<p><b>Праймеры</b>  5'-GTTGGGTATATCACAATTTAT-3'  5'-TTRCCSTATTTTCTAGTAGGT -3'  Размер искомого фрагмента — 229–334 п.н.</p>	<p><b>М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА</b>  19, 22, 24, 25, 28, 31 — <b>ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</b>  20, 21, 23, ОК, 26, 27, 29, 30, 32, 33 — <b>НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ</b></p>																	
<p><b>Программа ПЦР:</b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">95 °С</td> <td style="width: 33%;">3 мин</td> <td style="width: 33%;">1 цикл</td> </tr> <tr> <td>95 °С</td> <td>30 с</td> <td rowspan="3">35 циклов</td> </tr> <tr> <td>46 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>30 с</td> </tr> <tr> <td>72 °С</td> <td>2 мин</td> <td>1 цикл</td> </tr> <tr> <td>4 °С</td> <td>хранение</td> <td></td> </tr> </table>			95 °С	3 мин	1 цикл	95 °С	30 с	35 циклов	46 °С	30 с	72 °С	30 с	72 °С	2 мин	1 цикл	4 °С	хранение	
95 °С	3 мин	1 цикл																
95 °С	30 с	35 циклов																
46 °С	30 с																	
72 °С	30 с																	
72 °С	2 мин	1 цикл																
4 °С	хранение																	



Ген Jhp0917



Праймеры

5' -TGGTTTCTACTGACAGAGCGC-3'

5' - AAC ACG CTG ACA GGA CAA TCT CCC-3'

Размер искомого фрагмента — 307 п.н.

М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА

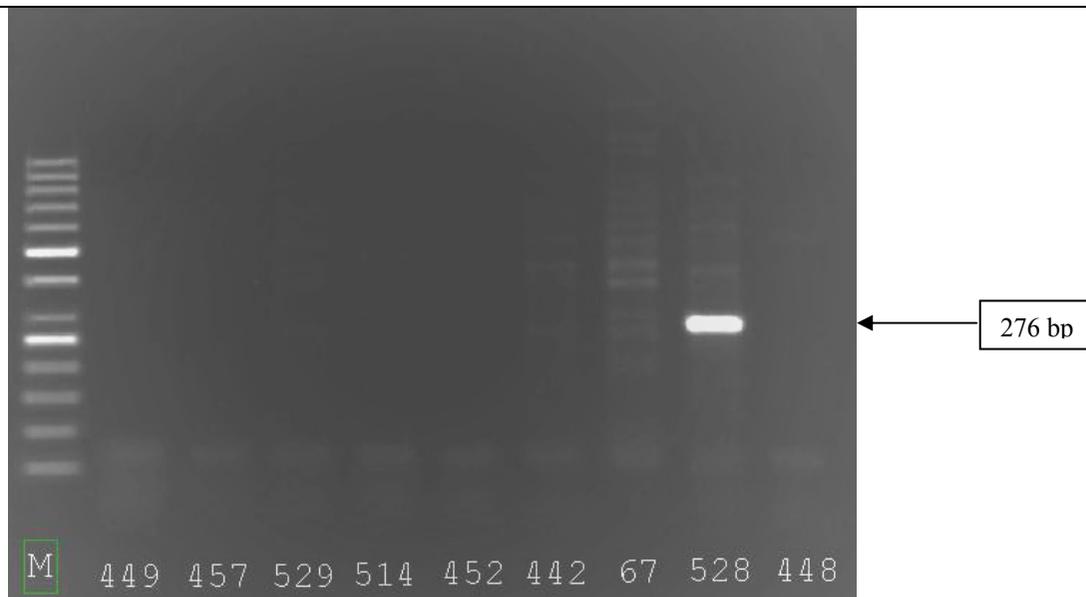
427, 476, 516, 528, 537 — ПОЗИТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

412, 414, 442, 456, 460, 465, 498, 504, 517, 526 —  
НЕГАТИВНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Программа ПЦР:

95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
46 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	

Ген Jhp0918



Праймеры

5' - ССТАТАТСГСТААСГСГСГСТС -3'

5' - ААГСТГААГСГТТТГТААСГ -3'

Размер искомого фрагмента — 276 п.н.

М — МАРКЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА

528 — ПОЗИТИВНЫЙ ОБРАЗЕЦ

67, 449, 442, 448, 452, 457, 514, 529 — НЕГАТИВНЫЕ  
ОБРАЗЦЫ

Программа ПЦР:

95 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
55 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	