



Так вот ты какой... горячий старт

Сразу хотим обратить Ваше внимание, что предлагаемая статья не является научной публикацией, а представляет собой обобщение нашего опыта по работе с полимеразными и подбору условий для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Как и любой опыт, наш опыт является субъективным. Но все же мы надеемся, что наши наблюдения и следующие за ними выводы могут оказаться Вам полезными.

Несколько слов о ПЦР

При кажущейся внешней простоте, ПЦР является сложной многокомпонентной и многофакторной системой со всеми вытекающими отсюда последствиями. Рассмотрим основные компоненты ПЦР и факторы, которые оказывают влияние на результативность процесса:

Компоненты/факторы	Степень влияния	Комментарии
Вода	низкая	Любая вода начиная от самого обычного дистиллята может быть использована для проведения ПЦР. Основная проблема связана с возможными микробиологическими загрязнениями (проростами разного рода), которые иногда не сразу становятся заметными.
Реакционный буфер	средняя	Состав буферов, в большинстве случаев, незначительно влияет на результативность ПЦР. Должны быть соблюдены основные требования к буферу: поддержание pH, ионы щелочных металлов. pH буфера часто играет существенную роль. Обычно, большинство ферментов хорошо работают в буферах с pH 8-9.5.
ионы Mg ²⁺	высокая	Правильно подобранная концентрация ионов Mg ²⁺ фактически определяет эффективность и результативность ПЦР. Титрование магния - первое, с чего необходимо начинать отработку метода для конкретной ПЦР. При изменении любого компонента реакционной системы (новая партия праймеров, новая партия трифосфатов, новый фермент, новый прибор, новые условия реакции) необходимо заново проводить титрование.
Минеральное масло	низкая	Если для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе реакции применяется минеральное масло, следует проверить новую партию масла на наличие ингибирующих компонентов. Редко, но ингибирование за счет примесей в масле встречается.
Трифосфаты	средняя	Проблемы с трифосфатами имеют несколько причин: - разрушение трифосфата (как правило, до дифосфата); - разная концентрация индивидуальных трифосфатов; - посторонние ингибирующие примеси. Проблемы с трифосфатами случаются не очень часто и проявляются в увеличении количества неспецифического продукта, а также в снижении выхода конечного продукта или полного его отсутствия.
Праймеры	высокая	Правильно подобранный праймер решает все! Существует огромное количество публикаций и рекомендаций. Основные наши рекомендации: - праймер должен быть по возможности коротким; - быть равномерным по G/C:A/T составу; - не иметь на 3'-конце G/C богатого участка.
Матрица	высокая	Важно как количество, так и качество матрицы. Притом, недостаток матрицы в реакционной смеси редко является проблемой, а избыток приводит к наработке большого количества неспецифических продуктов. Качество матрицы часто определяется источником, из которого данная матрица выделяется. Некоторые характерные для конкретного источника компоненты могут ингибировать ПЦР.
Фермент	высокая	Все ферменты разные! Все ферменты проявляют себя по разному в разных амплификационных системах. Предугадать, какой фермент где и как себя поведет - невозможно. Хотя и есть некоторые предпосылки, которые позволяют делать отдельные прогнозы, мы рекомендуем - подбирайте исходя из результатов предварительного теста. И титруйте!
Добавочные компоненты (DMSO, DMF, бетаин, глицерин и др.)	от низкой до средней	Возможностей улучшить то, что плохо работает, всегда много. Наши рекомендации - оставьте применение добавочных компонентов на самый-самый крайний случай. Обязательно посоветуйтесь с кем-нибудь, кто применял подобные добавки. Если человек сам не применял, а только слышал, не верьте такому совету - вы только зря потратите время и усилия.
Температура отжига	высокая	Как и в случае с магнием, температура отжига должна подбираться экспериментально. Никаких теоретических расчетов! Каждый прибор, каждая пара праймеров, каждое изменение в компоненте реакционной смеси требует подбора температуры отжига.
Амплификатор	средняя	Каждый амплификатор имеет свой алгоритм набора температуры, скорость перехода температуры, мощность нагрева. На каждом приборе требуется подбор температурных и временных условий под конкретную систему амплификации. Возможно, потребуется изменение в количестве магния или других компонентов.

Пластик	низкая	Качество пробирок для проведения реакции - коварная штука. Пластик может отличаться по толщине стенки - влияет на скорость прогрева и, как результат, на специфичность и эффективность ПЦР. Наиболее опасна ситуация, когда пластик содержит остатки мономеров. Это очень высокие реакционные химические соединения, которые, в зависимости от вида полимера, могут связывать компоненты реакционной смеси, либо выделяться в раствор в ходе реакции и ингибировать процесс.
---------	--------	--

Правильно ориентироваться в выборе оптимальных условий для проведения ПЦР поможет накопленный опыт и информация, которую можно найти в многочисленных рекомендациях на сайтах компаний-производителей продукции для молекулярной биологии и диагностических систем. Информация, полученная от непосредственного производителя всегда более точна, конкретна и правильна, чем советы, которые могут быть даны со стороны.

Причины использования горячего старта

Несмотря на широкие возможности модификации условий ПЦР, всегда найдутся неучтенные причины, которые приводят к невозможности получения удовлетворительного результата.

Часто встречающаяся проблема - образование праймер-димеров и, как результат, снижение количества нарабатываемого специфического продукта и чувствительности метода. Более сложно устранимые проблемы - неспецифический отжиг праймеров. В таких случаях увидеть продукт часто вообще не удается. Причина этих проблем - еще на стадии подготовки реакционной смеси при комнатной температуре отдельные участки праймеров неспецифически отжигаются на фрагментах матрицы или друг на друге с последующей элонгацией ферментом и образованием неспецифических "ложных" матриц.

Хотя считается, что Taq полимеразы работают при температуре 62-72 °С, на самом деле при комнатной температуре активность фермента тоже достаточно высокая, что способствует появлению неспецифических продуктов еще до того, как пробирка с реакционной смесью будет помещена в амплификатор для проведения ПЦР.

Принимая во внимание такую возможность возникновения проблемы, многие исследователи, а следом за ними и производители продукции для молекулярной биологии, стали разрабатывать методы, которые позволяют предотвратить до-ПЦР образование неспецифических продуктов.

Самый простой и очевидный способ предлагал внесение фермента в уже нагретую до температуры полной денатурации ДНК (94 °С) реакционную смесь. Позже на стадии денатурации пробовали вносить трифосфаты, магний, праймеры.

Таким образом, внесение компонента, без которого невозможна элонгация цепи, осуществляемого на стадии денатурации (нагрева), стали называть "горячим стартом" (hot start).

К сожалению, становятся известными в основном удачные результаты использования таких подходов. Результаты экспериментов, которые не дали привели к решению проблемы, как правило, не публикуют. Преобладание статей, где результат оказался положительным и послужило причиной считать "горячий старт" панацеей от всех проблем, связанных с ПЦР.

Как работает "горячий старт"

Как уже отмечалось выше, основная причина, с которой должен бороться "горячий старт", неспецифический отжиг праймеров и наработка неспецифического продукта на первых стадиях ПЦР.

Что же происходит, если полимеразы (или другой ключевой компонент реакционной системы) вносятся, когда ДНК и праймеры находятся в денатурированном состоянии?

А происходит то, что праймеры не могут отжечься на матрице, наработка какого-либо продукта не происходит. Далее температура начинает снижаться к температуре отжига. Как только возникает ситуация, когда праймер имеет термодинамическую возможность отжечься на матрице, отжиг совершается и начинается наработка продукта. Связь праймера с матрицей определяются следующими факторами:

- температурой

температура определяет термодинамическое перемещение компонентов реакционной смеси, включая праймеры и матрицу, и определяет, какое усилие требуется праймеру для удержания на матрице. При более высокой температуре шанс отжечься на матрице имеет праймер только с очень высокой степенью гомологии.

- концентрацией ионов магния

ионы магния, связываясь посредством ионных сил с основаниями, создают заряд определенной силы, влияющий на прочность удержания праймера на матрице. Чем выше концентрация ионов магния, тем выше стабильность образования праймер:матрица, чем ниже концентрация ионов магния, тем ниже стабильность отжига, тем больше шансов для отжига праймера с высокой степенью гомологии.

- составом праймера

G/C:A/T состав праймера определяет прочность связи праймера с матрицей. Праймер с высоким G/C может связаться и удерживаться на матрице за счет высокой энергии связи между G:C парами. Шанс получить неспецифический отжиг катастрофически возрастает.

На связь праймера с матрицей могут влиять также и другие факторы - количество фермента, общее количество белка или других компонентов, диметилформамид - но эти факторы не оказывают столь существенного влияния по сравнению с теми, которые мы перечислили выше.

Способы реализации метода "горячего старта"

Подходы, связанные с тем, чтобы воспрепятствовать образованию неспецифических продуктов на начальной стадии процесса, не всегда связаны со стадией денатурации. Однако, термин "горячий старт" в широком смысле характеризует собой подход, при котором тем или иным способом удается снизить образование неспецифического продукта. Хотя более правильно, на наш взгляд, применять термин "эффект горячего старта".

В настоящее время существует большое количество методов "горячего старта".

Метод	Эффективность горячего старта	Комментарии
Внесение компонентов на стадии денатурации (фермент, dNTP, магний)	от средней до высокой	Компоненты могут вноситься как непосредственно в разогретую смесь, так и способом разделительных барьеров (масла или парафины, которые плавятся при нагреве, позволяя компонентам смешаться только на стадии денатурации). Основной недостаток этого метода - дополнительные манипуляции.
Изоляция отдельных компонентов реакционной смеси внутри самой смеси	высокая	Большинство этих методов использует чувствительные к нагреванию материалы (капсулы из воска или агарозы, содержащие фермент или магний, высвобождающиеся при нагревании) или другие способы связать один из компонентов реакционной смеси, постепенно высвобождая его в ходе реакции. Недостаток этого метода - дополнительные манипуляции.
Использование антител или олигонуклеотидных последовательностей (аптамеры) для блокирования активности полимеразы	от низкой до средней	Удобный метод. Основной его недостаток - температура денатурации комплекса "блокировки" полимеразы часто составляет 45-55 °С, что не всегда мешает полимеразе успеть наработать неспецифические продукты. Другим недостатком, в случае с использованием антител, является возможность контаминации ДНК, оставшейся после очистки антител.
Химическая модификация полимеразы	высокая	Очень эффективный метод. Удобно использовать. Недостатки: - активность фермента уменьшается с течением времени; - как правило, требуется использование специального буфера, не всегда оптимального для применяемой системы; - резульативная активность полимеразы на практике оказывается ниже аналогичной не-модифицированной полимеразы, как результат, увеличение количества циклов; - эффективная для коротких (до 500 п.н.) фрагментов, полимеразы может быть неэффективна для получения более длинных фрагментов (свыше 500 п.н.).
Защищенный на 3'-конце праймеры	не знаем	Новый метод. Идея заключается в использовании на 3'-конце праймера термостабильную защиту, препятствующую элонгации и которая разрушается на стадии денатурации.

Остается выбрать метод, который выглядит наиболее привлекательным.

И вот теперь необходимо ответить на самый главный вопрос: "удастся ли применяя выбранный метод решить проблему или улучшить результат в данном конкретном случае?"

Почему "горячий старт" не всегда помогает

Аmplификационные системы, в которых отчетливо виден эффект горячего старта, составляют, по нашему опыту, не более 5 процентов от всех случаев, а может и меньше.

Существуют несколько "общепризнанных" систем, на которых все, кто хочет продемонстрировать эффект горячего старта, может это сделать. Чаще всего это системы амплификации гена активатора плазминогена (t-PA, tissue plasminogen activator) человека и система амплификации генов вируса иммунодефицита человека (HIV-1) в присутствии человеческой клеточной ДНК.

У всех этих систем много общего. Мы рассмотрим две системы, пожалуй, наиболее показательные в плане демонстрации применения "горячего старта" и тех выводов, которые можно из этого сделать.

Аmplификация гена человеческого активатора тканевого плазминогена (*human tissue plasminogen activator gene - t-PA*)

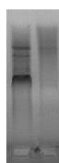


Рис. 1. ПЦР t-PA гена

дорожка 1 - ПЦР с ручным горячим стартом (фермент вносили в пробирку на стадии денатурации)
дорожка 2 - стандартная ПЦР

Условия реакции: 40 циклов, 94 °С - 30 секунд, 68 °С - 30 секунд.

Праймеры: 34-мерные

1 2

Как видно из результатов амплификации, ожидаемый продукт, хотя и в присутствии более легких неспецифических полос, нарабатывается только при внесении полимеразы в горячую смесь (дорожка 1). На дорожке 2 специфических продуктов не наблюдается.

Чтобы прояснить ситуацию, мы проанализировали применяемые праймеры с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), чтобы проверить, имеют ли данные праймеры потенциальные места отжига за пределами интересующего нас гена. Результат показал, что от 20 до 60% праймера имеют гомологичные последовательности на разных участках других хромосом.

Мы проверили несколько методов "горячего старта" (химически модифицированные Taq полимеразы разных компаний, включая нашу HotTaq полимеразу, Taq полимеразу с антителами, наша система HotStart Key, ручной "горячий старт") и оказалось: получить требуемый продукт удалось в случаях применения ручного горячего старта и с несколько худшим результатом при помощи HotStart Key. Ни один из вариантов полимераз (химически модифицированных и с антителами) не позволил получить ожидаемый продукт. Как можно объяснить такие, вроде бы, странные результаты? Но при более внимательном анализе проблемы объяснение может быть следующим:

- в ситуации, когда фермент вносят на стадии денатурации при последующем снижении температуры, у праймеров есть короткий промежуток времени, когда возможны условия для эффективного специфического отжига. В этот короткий промежуток времени внесенная полимеразу успевает наработать достаточное количество продукта для последующей специфической амплификации;
- в ситуации, когда фермент уже находится в реакционной смеси, еще до достижения стадии денатурации, полимеразу успевает наработать некоторое количество неспецифического продукта, который, учитывая высокую неспецифичность праймеров, успешно конкурирует за отжиг на протяжении всей последующей амплификации;
- при использовании полимераз с антителами ситуация подобна только что описанной стандартной амплификацией, так как денатурация комплекса антитела с полимеразой происходит значительно раньше, чем происходит полная денатурация ДНК;
- при использовании химически модифицированных полимераз отсутствие результата можно объяснить недостаточной присутствующей активностью полимераз именно на первом цикле, когда есть практически единственный шанс для реализации преимущества специфического продукта над неспецифическим.

Как поступить в подобной ситуации и какой метод горячего старта избрать для решения проблемы?

Даже если исходить из того, что праймеры есть данность и их нельзя модифицировать, заказав более короткие и специфичные, проблему можно решить.

Для начала нужно *более точно подобрать температуру отжига* (уже на этой стадии нам удалось получить нужный продукт без использования каких-либо методов "горячего старта").

Протитровать конечную концентрацию магния от 0.5 mM до 2.5 mM с шагом в 0.25 mM.

И только после этих процедур переходить к поискам методов "горячего старта".

В подобном случае мы бы рекомендовали применять либо ручной "горячий старт", либо метод с разделением парафином или маслами. Можно также применить метод HotStar Key.

Применение всех других методов вряд ли будет эффективным.

Теперь рассмотрим другой пример.

Амплификация генов вируса иммунодефицита человека (HIV-1) клонированных в плазмидном векторе в присутствии человеческой клеточной ДНК

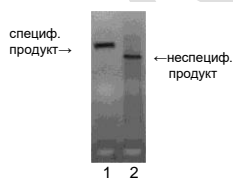


Рис. 2. ПЦР gag гена вируса HIV-1

дорожка 1 - ПЦР химически модифицированной полимеразой (HotTaq полимеразы компании *Силекс*)
дорожка 2 - ПЦР обычной полимеразой (Taq полимеразы компании *Силекс*)
Условия реакции: 40 циклов, 94 °C - 30 секунд, 42 °C - 30 секунд, 72 °C - 30 секунд.
Праймеры: 28-мерные

Как и в предыдущем случае при использовании в ПЦР обычной полимеразы специфический продукт не образуется. Выполнив анализ праймеров мы увидели повторение уже рассмотренной ситуации - большие районы праймера имеют потенциальные места отжига на человеческой ДНК.

Проверим, как поведут себя на этой системе различные методы "горячего старта".

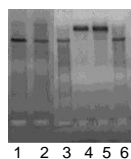


Рис. 2. ПЦР gag гена вируса HIV-1 с использованием различных методов

дорожка 1 - полимеразы с антителами компании X
дорожка 2 - химически модифицированная полимеразы компании Y
дорожка 3 - ручной горячий старт (фермент вносили на стадии денатурации) (Taq полимеразы компании *Силекс*)
дорожка 4 - метод HotStart Key (Taq полимеразы компании *Силекс*)
дорожка 5 - химически модифицированная полимеразы (HotTaq полимеразы компании *Силекс*)
дорожка 6 - стандартный ПЦР с обычной полимеразой (Taq полимеразы компании *Силекс*)

Почему не работает ручной "горячий старт" и почему работают не все химически модифицированные полимеразы и полимеразы с антителами?

Ситуация похожа на амплификацию с геном t-PA, но имеет небольшое отличие - если в случае с t-PA важно поймать момент специфического отжига и успеть использовать активность фермента для наработки специфического продукта, то в данном случае из-за низкой температуры отжига праймер успешно отжигается как на специфической матрице, так и на других участках.

И в данном случае большое количество активности полимеразы используется не по назначению - на производство продуктов, полученных за счет неспецифического связывания праймеров. Этим же эффектом избыточной активности объясняется неудача при использовании полимеразы с антителами.

Если же активности полимеразы на первых циклах мало, как в случаях с HotTaq полимеразой и системой HotStart Key, и ее не достаточно на одномоментную наработку большого количества неспецифического продукта, наработанный специфический продукт за счет высокой специфичности к праймерам начинает доминировать. Что и приводит к амплификации с нужным результатом.

А как же химически модифицированный фермент (дорожка 2)?

Здесь нужно пару слов сказать о принципе химической модификации.

Для химической модификации используют принцип "сшивки" белковой молекулы при помощи ангидридов.

В результате сшивки (сшивка идет случайным образом, неспецифически, при этом часть молекул могут навсегда потерять активность) активный центр полимеразы становится недоступным для связывания с матрицей и осуществления полимеразной реакции. При нагревании в буфере происходит разрушение ангидрида и освобождение активного центра полимеразы. Механизмы такого разрушения могут быть разные и зависят от применяемого ангидрида. Именно применяемый ангидрид определяет "прочность" модификации полимеразы, разрушаясь быстрее или медленнее, придавая тем самым полимеразе разные свойства при использовании "горячего старта".

В данном случае, фермент на дорожке 2 имел так называемую "мягкую" степень модификации, что не позволило в данной системе амплификации получить ожидаемый продукт.

Решение данной ситуации с амплификацией gag гена на практике не представляет проблемы. Даже если исходить из того, что праймеры есть данность и их нельзя модифицировать (как и в предыдущем случае), достаточно *более точно подобрать температуру отжига* (это сразу решает проблему без использования каких-либо методов "горячего старта"). Если по каким-то причинам изменить температуру нельзя, можно *протитровать конечную концентрацию магния* от 0.5 мМ до 2.5 мМ с шагом в 0.25 мМ. В данном описанном случае (при данной температуре отжига и данных праймерах) это также приводило к решению проблемы без использования методов "горячего старта".

После этих процедур, если результат все еще остается неудовлетворительным, можно переходить к поискам методов "горячего старта".

В подобном случае мы бы рекомендовали применять химически модифицированные полимеразы с "жесткой" степенью модификации или метод HotStar Key.

После прочтения предыдущего раздела возникает закономерный вопрос:

Нужен ли "горячий старт"

Несмотря на наше, в целом, скептическое отношение к использованию "горячего старта", мы должны признать, что есть ситуации, когда применение такого подхода оправдано.

Итак, когда, по нашему мнению, "горячий старт" не стоит использовать:

1. когда используется амплификационная система с одной парой праймеров;
2. когда есть возможность выбора оптимальных праймеров и оптимальных условий.

Когда использование "горячего старта" оправдано:

1. когда используется амплификационная система с несколькими парами праймеров;
2. когда информации об объекте исследования недоступны;
3. когда нет времени и возможности для оптимизации условий.

Какой метод "горячего старта" выбирать

Как следует из приведенных примеров, разобранных выше, универсального метода "горячего старта" не существует (как и универсального растворителя). Метод выбирается исходя из конкретных условий реакции амплификации и получающихся результатов.

Обобщая наш опыт, можно сказать следующее:

если при ручном "горячем старте" (внесение фермента на стадии денатурации) проблема с неспецифической решается, то имеет смысл пробовать методы использующие принцип:

- внесения компонентов на стадии денатурации (вручную или с разделением парафином),

- использование антител или аптамеров,
- химически модифицированные полимеразы с "мягкой" модификацией,

если ручной "горячий старт" не помогает, скорее всего помогут:

- химически модифицированные полимеразы с "жесткой" модификацией,
- методы изоляции отдельных компонентов реакционной смеси внутри самой смеси (в том числе HotStart Key),
- защищенные на 3'-конце праймеры.

Использование методов "горячего старта" как универсального средства, ориентированное на превентивное улучшение результата, может обернуться получением ошибочных результатов и сильным разочарованием.

Выводы и рекомендации

1. Если при проведении ПЦР возникли проблемы неспецифики или отсутствия ожидаемого результата, попробуйте все возможные пути оптимизации. И только после всех попыток переходите к использованию методов "горячего старта".
2. Постарайтесь проанализировать проблему, чтобы сделать правильный выбор метода "горячего старта".
3. Консультируйтесь с представителями компаний-производителей, не пользуйтесь случайными советами.

*"Господи, дай мне спокойствие принять то, чего я не могу изменить,
дай мне мужество изменить то, что я могу изменить.*

И дай мне мудрость отличить одно от другого."

Молитва немецкого богослова
Карла Фридриха Этингера (1702- 1782).

Желаем успеха!