კვადრუპლექს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია 30-40 °C ტემპერატურულ შუალედში

თამარ გულუა

სამაგისტრო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე ფიზიკის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

ფიზიკისა და ასტრონომიის სამაგისტრო პროგრამა

(ბიოფიზიკა)

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: დავით გვარჯალაძე, დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2019

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სამაგისტრო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

თამარ გულუა

10.06.2019

აბსტრაქტი

პათოგენური მიკროორგანიზმების აღმოსაჩენად, დნმ-ის ამპლიფიკაციისათვის გამოიყენება (RT-PCR) ანუ რეალური დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია. თუმცა მის ფართო გამოყენებას ხელს უშლის ტემპერატურული ციკლი და სპეციალური ხელსაწყოების გამოყენება. დღესდღეობით გამოყენებული დიაგნოსტიკური მეთოდები რომლებიც PCR-ზეა დაფუძვნებული ძვირადღრებულია და და მხოლოდ ცენტრალურ კლინიკებშია ხელმისაწვდომი. ამ მეთოდის ეფექტური გამოყენებისათვის აუცილებელია მოხდეს ისეთი სისტემების შექმნა, სადაც შესაძლებელი იქნება ნუკლეინის მჟავების ამპლიფიკაცია და ინტეგრირება ნიმუშის მომზადებისა და პათოგენების დეტექციისა. ამასთანავე ეს პროცესი არ უნდა იყოს ძვირი. QPA (კვადრუპლეკს-პრაიმერული ამპლიფიკაცია) დნმ-ის ამპლიფიკაციის ეფექტურ და მარტივი დეტექციის მეთოდს წარმოადგენს. ეს მეთოდი დაფუძვნებულია GGGTGGGTGGGTGGG (G3T) დნმ-კვადრუპლექსზე, რომელსაც სპეციფკური კათიონების თანაობისას მაღალი თემრული სტაბილურობა გააჩნიათ. QPA იყენებს G3T-ის G -ბოლო ჩამოშორებულ ვერსიას, რომელსაც აქვს უნარი დნმ-პოლიმერაზას ელონგაციის შემდგომ დაიკეცოს მონომოლეკულურ კვადრუპლექსად, იგივე ტემპერატურაზე. კვადრუპლექსის დეტექციისთვის გამოყენებული იქნა G3T თანმიმდევრობა ფლურესცენციული მოლეკულით მეოთხე პოზიციაში, რომელიც იწყებს ნათებას კვადრუპლექსის ფორმირებისას. ამდენად შესაძლებელი ხდება მისი რაოდენობრივი განსაზღვრა ზედმეტი მოლეკულების გარეშე.

იმისთვის რომ განგვეხორციელებინა QPA 30-40°C ტემპერატურულ შუალედში, შევისწავლეთ ოპტიკური (UV/Vis სპექტროსკოპია და ფლურესცენციული სპექტროსკოპია) და თერმოდინამიკური თვისებები G3T თანმიმდევრობისა, რომლებიც შეიცავდნენ თანმიმდევრობის მოდიფიკაციებს. კვლევების შედეგები აჩვენებს, რომ შესაძლებელია იზოთერმული QPA შესრულდეს ოპტიმალური სიჩქარით 30-40 °C ტემპერატურულ შუალედში. QPA აქვს უნარი გამოყენებულ იქნას მარტივი და იაფი დიაგნოსტიკური (Point of care (POC)) მეთოდის შემუშავებაში, ხოლო მისი განხორციელება 30-40 °C ტემპერატურულ შუალედში, დამატებით

მოსახერხებელს გახდის მის გამოყენებას მოლეკულურ დიაგნოსტიკაში.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: დნმ-კვადრუპლექსი, G3T, QPA, RT-PCR, დნმ-ის ამპლიფიკაცია, ფლურესცენცია.

Abstract

For detecting pathogens nowadays is commonly used RT-PCR (real-time polymerase chain reaction). But the reason that prevents using it widely is the temperature cycling and specific tools. Diagnostic methods based on PCR are available only in central clinics due to its high costs. For its effective use it is necessary to make such a system where DNA amplification, preparing sample and detecting pathogens will be integrated. Such method is based on G3T DNA quadruplex, which has got high thermal stability when exists specific cations. QPA employs truncated G3T sequences as primers, which upon polymerase elongation, self-dissociate from the binding site and allow the next round of priming without thermal unfolding of amplicons. Fluorescent nucleotide analogs, when incorporated into these primers, emit light upon quadruplex formation and permit simple, specific, and sensitive quantification without the attachment of probe molecules.

For using QPA at 30-40°C temperature interval we studied optical and thermodynamic abilities of G3T sequence and its modifications. (UV/Vis –spectroscopy and fluorescence spectroscopy).

Our results shows that it is possible to make isothermal QPA reaction at 30-40°C temperature interval with high optimal rate. QPA has got the grate potential to be used in point of care diagnostic method and such temperature interval makes it more useful.

Keywords: QPA, G3T, DNA quadruplexes; DNA amplification, RT-PCR, fluorescence.

მადლობა

მადლობას ვუხდი ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიოფიზიკის ინსტიტუტის თანამშრომლებს თანადგომისათვის; მადლობა ჩემს სამეცნიერო ხელძღვანელეს დავით გვარჯალაძეს გაწეული დახმარებისათვის; მადლობა პროფ. ნუნუ მეტრეველს და პროფ. ბესიკ კანკიას (აშშ, ოჰაიოს სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიისა და ბიოქიმიის დეპარტამენტი). მადლობა შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს (გრანტი YS2017-102), რომელთა დაფინანსებით შესრულდა სამაგისტრო ნაშრომის მნიშვნელოვანი ნაწილი.