

Перевод на русский язык:

Телеграм: <https://t.me/ekaterinasugak>

Веб-сайт: <https://www.ekaterinasugak.com/homepage>

Оригинал статьи на английском:

<https://criticalcheck.wordpress.com/2022/05/08/pcr-and-real-time-rt-pcr-under-critical-review/>



ПЦР И RT-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ - КРИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.

8 МАЯ 2022 | ТАМ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) описывается как метод многократного "увеличения" (копирования) определенных последовательностей ДНК с помощью фермента ПЦР и искусственных нуклеотидов. Первоначально она была разработана для создания достаточного количества фрагментов ДНК в исследовательских целях, но позже стала инструментом для криминалистики, секвенирования ДНК и диагностики генетических заболеваний.

Большинство из нас слышали о ПЦР во время пандемии Ковид-19, когда полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ПЦР в реальном времени) стала золотым стандартом для выявления вируса Sars-Cov-2, вируса, который был связан с болезнью Ковид-19.

Для обнаружения Sars-Cov-2 были выбраны определенные короткие последовательности вируса. При проведении RT-PCR в реальном времени выделяется сигнал флуоресцентного красителя, если эти последовательности присутствуют в образце, эти сигналы регистрируются "[системой ПЦР в реальном времени](#)".

Существует множество статей, критикующих ПЦР как «неподходящий инструмент для диагностики вирусной инфекции», но в действительности сама ПЦР никогда не подвергалась критическому анализу. В этой статье мы рассмотрим ПЦР, RT-PCR в реальном времени, ингредиенты и оборудование, используемые для их проведения.

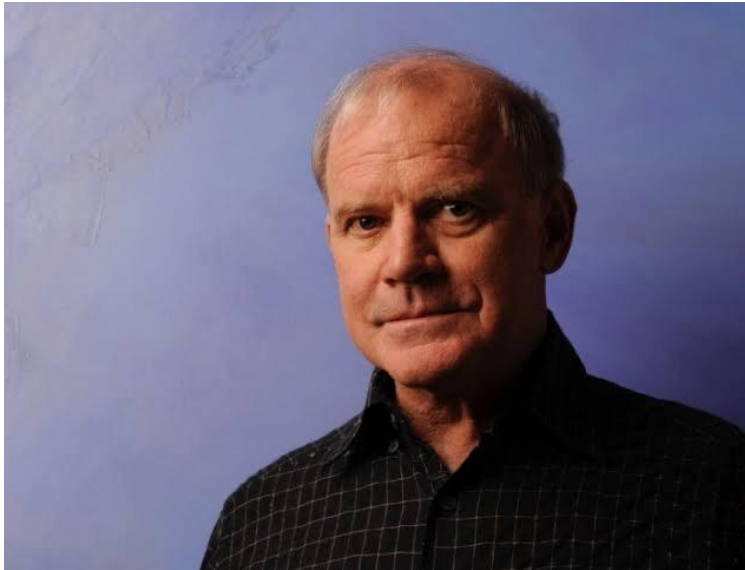
ТЕРМИНОЛОГИЯ

Я постараюсь ограничить использование научных терминов, но буду использовать некоторые из приведенных ниже терминов, чтобы избежать длинных и сложных предложений.

- Амплификация ДНК: искусственное увеличение определенного фрагмента/последовательности ДНК
- ПЦР: Полимеразная цепная реакция, метод, широко используемый для амплификации (копирования/множения) определенного участка/последовательности ДНК.
- RT-PCR: ПЦР с обратной транскрипцией (RT), метод, который используется, когда образец состоит из РНК. RT - это процедура, которая превращает РНК в ДНК путем получения комплементарной нити (кДНК), которая будет соответствовать нити РНК.
- Цикл ПЦР: один цикл ПЦР состоит из трех этапов - денатурации, отжига и элонгации. Во время этих этапов ДНК расщепляется и копируется.
- Нуклеобазы (азотистые основания): компонент пары оснований, аденин (А), гуанин (G), тимин (Т), цитозин (С).
- Нуклеотид: структурная единица ДНК/РНК, т.е. одна нуклеобазы и ее основа.
- Олигонуклеотиды: короткие нити синтетических нуклеотидов
- dNTPs (дезоксирибоза нуклеозидтрифосфаты): синтетические нуклеотиды
- Полимераза: фермент, который используется для искусственного синтеза ДНК
- Праймеры ДНК: короткие нити синтетических нуклеотидов, которые используются полимеразой при инициации амплификации ДНК
- Зонды: Олигонуклеотиды, окрашенные флуоресцентными красителями
- Шаблонная ДНК/РНК: одна нить ДНК или РНК.
- Преципитат/гранулы: твердое вещество в пробирке
- Супернатант: жидкое вещество в пробирке
- Мокрота: слюна, мокрота и/или слизь, полученная из верхней части дыхательных путей.
- БАЛФ: жидкость бронхоальвеолярного лаважа, собранная из легких.
- Термоциклер (он же термоциклер, ПЦР-машина, амплификатор ДНК): машина, используемая для ПЦР.
- Центрифугирование: энергичное вращение, осуществляемое центрифужной машиной.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

Краткая история ПЦР



[Кэри Муллису](#) принадлежит заслуга изобретения ПЦР, за которое он получил [Нобелевскую премию](#) по химии в 1993 году. По словам Муллиса, идея о ПЦР возникла у него во время вождения автомобиля, а для создания концепции процедуры ПЦР он использовал рекреационные наркотики, в частности ЛСД. К. Муллис, [Х. Эрлих](#), Р. К. Сайки и их команда, работающая в корпорации Cetus, разработали процедуру ПЦР. Процедура ПЦР была запатентована, а позже патент был продан компании Abbott Pharmaceuticals. Существует несколько судебных споров по поводу ПЦР и фермента Таq-полимеразы, в результате чего эти патенты не были возобновлены.

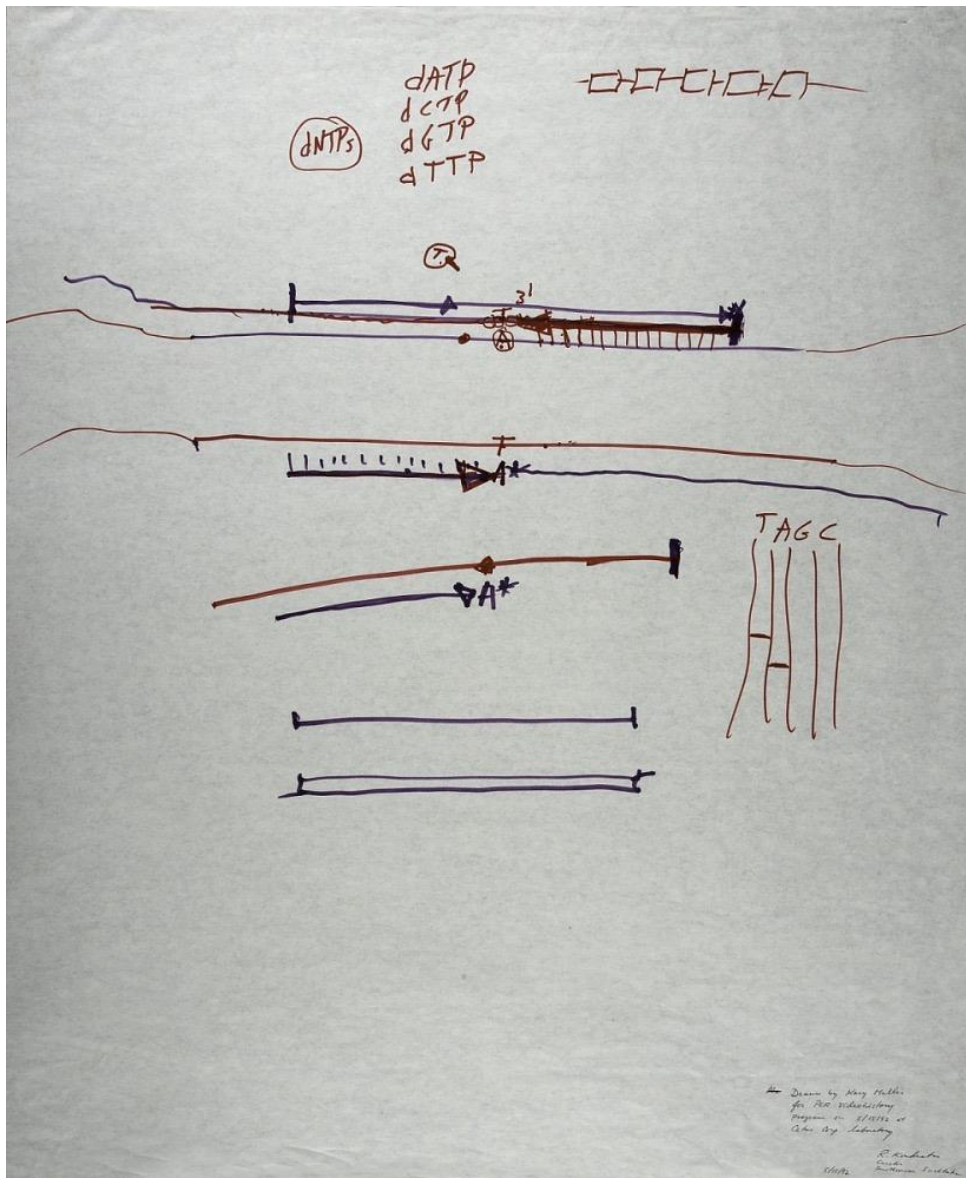
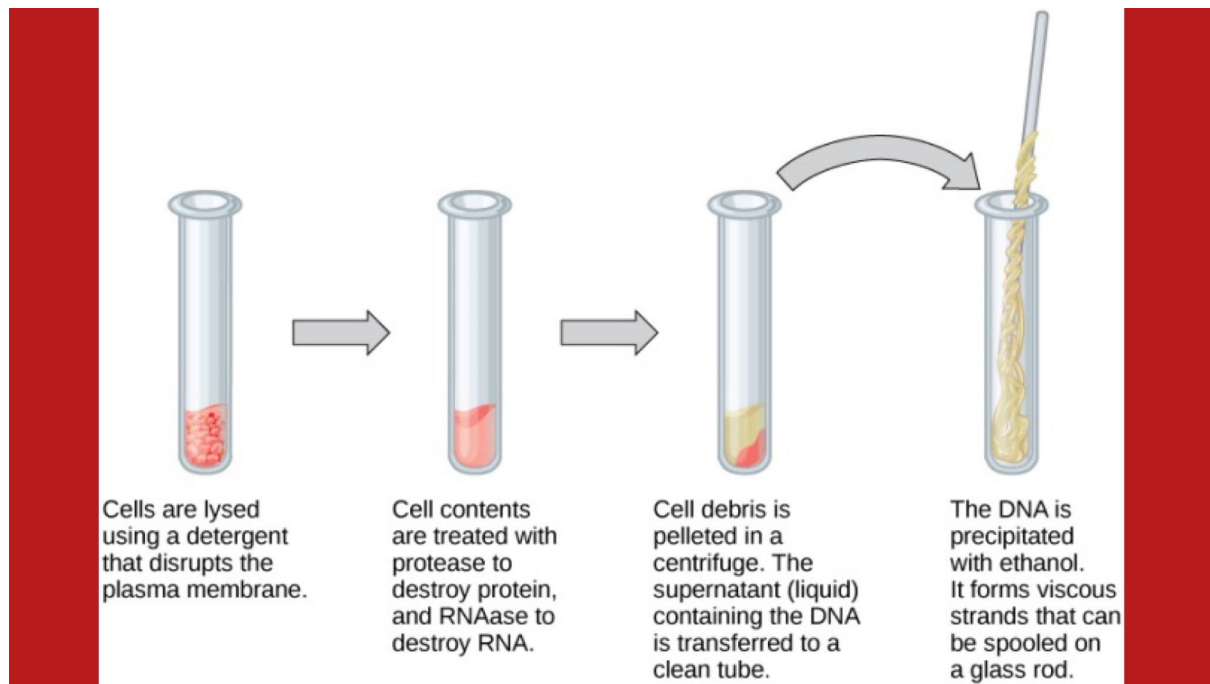


Рисунок ПЦР Кэри Муллиса.

Как работает ПЦР

Современная процедура ПЦР довольно проста, для ее проведения даже не нужно быть молекулярным биологом или химиком. Все, что вам нужно, - это образец, содержащий ДНК, множество химических реактивов, компоненты синтетической ДНК и термоциклер, причем все перечисленное продается исключительно биотехнологическими компаниями, такими как Thermo Fisher и Agilent Technologies. Все, что вам нужно сделать, это выделить ДНК в соответствии с инструкциями к набору для выделения ДНК, смешать ее с химикатами для ПЦР, поместить в термоциклер, задать программу (температуру и количество циклов для повторения) и вуаля, через час или два у вас есть больше ДНК для изучения и работы с ней.

Выделение ДНК



Выделение/экстракция ДНК

Перед проведением ПЦР, ДНК необходимо извлечь из остального вещества. С тех пор как [Фридрих Мишер](#) впервые выделил ДНК, в методологии выделения мало что изменилось, кроме появления специального оборудования, тепла и тонн наборов для выделения ДНК на рынке. Каждый набор и оборудование предлагают свои собственные протоколы использования.

[Экстракция ДНК](#) (она же выделение ДНК, очистка ДНК) состоит из четырех этапов:

Лизис клетки (т.е. разрушение клетки): вещество, содержащее ДНК, смешивается с синтетическими ферментами, например, РНКазой и протеазой, а также с коктейлем подщелачивающих и кислотных химикатов, который называется "буфер". Скорее всего, раствор будет перемешан вихревым методом, а затем инкубирован при температуре от теплой до высокой. Затем раствор центрифугируют (энергично вращают), чтобы разделить вещество на "супернатант" (жидкую часть) и "пеллет" (твердое вещество, которое останется на дне пробирки). В зависимости от протокола набора, ДНК будет находиться в супернатанте или в грануле, ненужные вещества будут отброшены, а сохранившиеся вещества могут быть смешаны с буферами и центрифугированы еще несколько раз, окончательная ДНК будет находиться в супернатанте.

"Осаждение" (ДНК из раствора): к веществу, полученному на предыдущем этапе, добавляют синтетический спирт, новый раствор инкубируют и центрифугируют. На этот раз ДНК окажется в поддоне, супернатант будет отброшен, а ДНК, оставшуюся в пробирке, оставят сушиться на воздухе.

"Промывка" (ДНК): для удаления оставшихся остатков клеток добавляется химический спирт (снова), раствор еще раз центрифугируется, надосадочная жидкость отбрасывается, а полученный поддон считается выделенной ДНК.

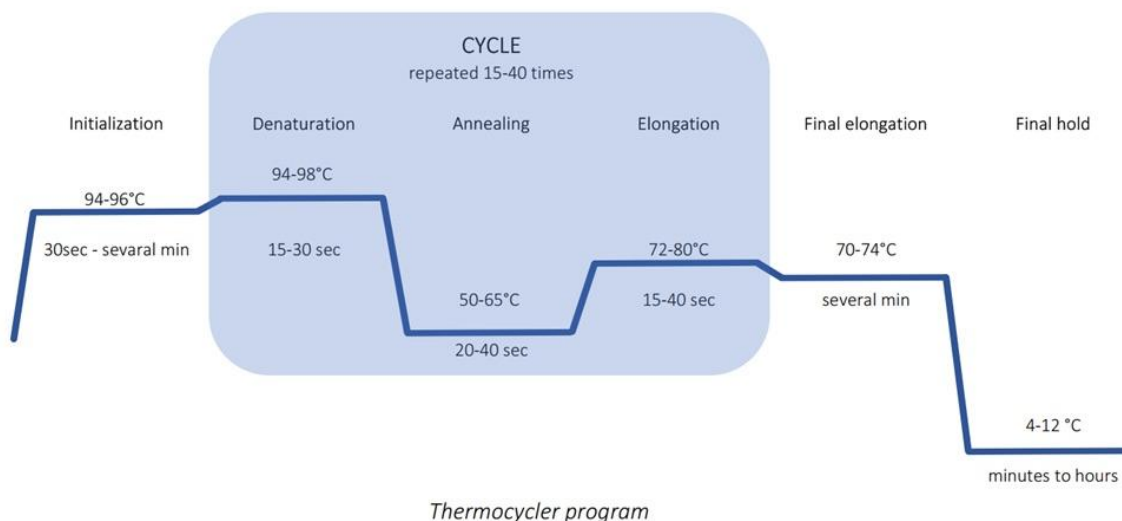
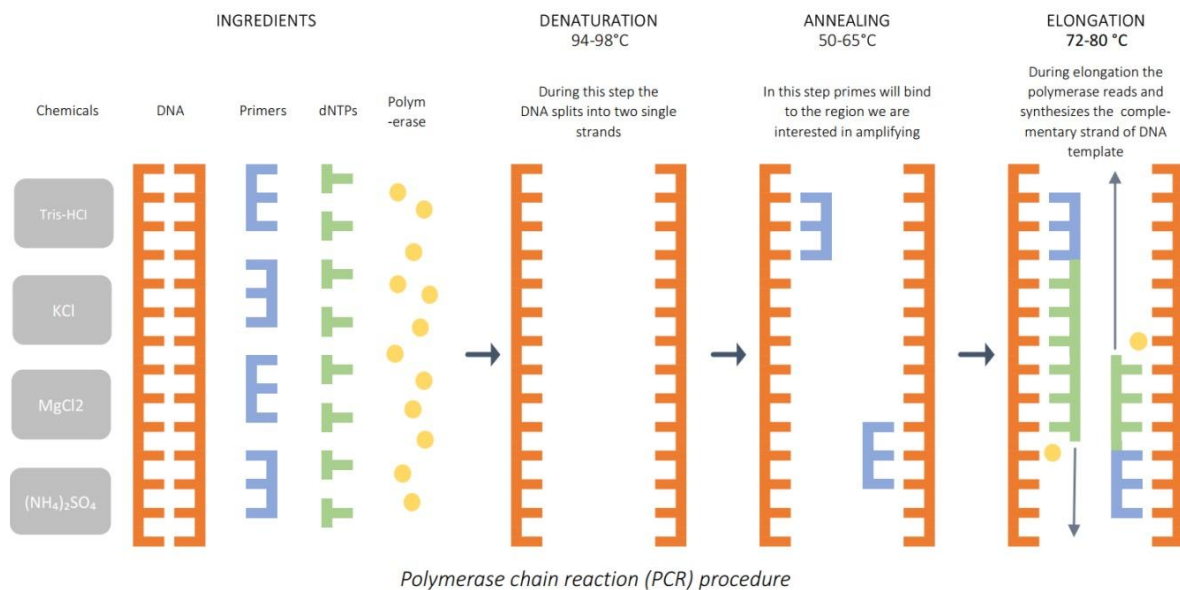
Ресуспензия (ДНК): выделенную ДНК смешивают с буфером или водой молекулярного класса, т.е. выделенная ДНК суспендируется в химическом растворе, буфере или сверхчистой воде, в зависимости от того, как долго ДНК будет храниться. Буфер стабилизирует ДНК и предотвращает ее деградацию.

Ингредиенты ПЦР

- **Выделенная ДНК:** В большинстве случаев ее выделяют из какой-либо жидкости организма (кровь, мокрота или BALF).
- **Вода**
- **Буферный раствор для ПЦР:** Типичный буфер содержит Tris-HCl (Трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорид) и KCl (хлорид калия). Эти химические вещества используются для поддержания постоянного значения pH ПЦР-коктейля (между 8,3-9pH), что обеспечивает стабильную среду для активности ДНК-полимеразы.
- **ДНК-полимераза:** фермент, синтезирующий нити ДНК. Наиболее известной и используемой является Taq-полимераза
- **MgCl₂** (хлорид магния): повышает активность полимеразы и, как следствие, усиливает амплификацию ДНК
- **(NH₄)₂SO₄** (сульфат аммония): играет ту же роль, что и MgCl₂.
- **Праймеры для ДНК:** [Праймеры](#) - это короткие одноцепочечные искусственные последовательности ДНК, которые присоединяются к определенному участку одной нити ДНК. Они указывают полимеразе начальную точку последовательности, в копировании которой заинтересованы ученые. Ученые могут приобрести заранее разработанные праймеры или заказать индивидуальные последовательности, в обоих случаях они могут быть приобретены только у биотехнологических корпораций.
- **dNTPs:** искусственные нуклеотиды, которые используются полимеразой в качестве строительных блоков для амплификации ДНК. dNTPs также продаются исключительно биотехнологическими корпорациями.

Указанные ингредиенты смешиваются и помещаются в термоциклерную машину. Термоциклер будет применять определенные температуры в течение определенного времени несколько раз ("циклы") для амплификации ДНК.

Этапы ПЦР



Процедура ПЦР состоит из следующих этапов:

- **Инициализация:** Смесь нагревается до 94-96°C от 30 секунд до нескольких минут. Этот шаг активирует ДНК-полимеразу и выполняется один раз, в начале процесса ПЦР.
- **Денатурация:** Смесь нагревают при 94-98°C в течение 15-30 секунд. Этот этап "денатурирует", т.е. расщепляет ДНК на две отдельные нити.
- **Отжиг:** На этапе отжига температура снижается до 50-65°C на 20-40 секунд. Эта температура позволяет праймерам и полимеразе связываться с интересующей нас областью амплификации. Обычно идеальная температура на несколько градусов ниже, чем "температура плавления" праймеров.
- **Элонгация/экстензия:** На этом этапе температура повышается до 72-80°C на 20-40 секунд. При этой температуре полимеразы активируются и начинают присоединять свободно плавающие dNTPs к одной нити ДНК. В результате образуются две новые части двойной нити ДНК. Продолжительность этого этапа

зависит от того, какой длины мы хотим получить копию ДНК. Обычно ДНК-полимераза может копировать 1 000 пар оснований в минуту.

- **Окончательная элонгация:** Необязательный, но рекомендуемый этап, на котором температура поддерживается на уровне 70-74°C в течение нескольких минут (обычно это та же температура, что и на этапе элонгации). Этот этап позволяет полимеразе закончить копирование нити, над которой она в данный момент работает.
- **Финальная выдержка:** после завершения заданной программы термоциклер сохраняет конечный результат при температуре, предотвращающей деградацию, 4-12°C.

Шаги со 2 по 4 представляют собой один цикл ПЦР, который повторяется 15-40 раз. Чем больше циклов выполняется, тем больше копий ДНК образуется, но после определенного количества циклов, т.е. более 40, праймеры и нуклеотиды могут закончиться, что приведет к проблемам с конечной ДНК в пробирке, кроме того, большое количество циклов снижает эффективность ПЦР из-за накопления побочных продуктов.

Критическое исследование ПЦР

- **ДНК:** Я уже обсуждала концепцию ДНК в моей предыдущей [статье](#), которую я настоятельно рекомендую прочитать, поскольку она поможет понять, чем может быть или не быть ДНК. Для тех, кто хочет продолжить эту статью и изучить ДНК на более позднем этапе, вот краткое резюме моих основных выводов:
 - В процессе выделения/экстракции ДНК интересующее вещество смешивается с химикатами и несколько раз центрифугируется, в конце в пробирке появляется осадок, который **предположительно** является ДНК. **Я лично описываю эту процедуру как "химическую промывку мертвых тканей", а не как выделение или экстракцию, потому что правильное выделение или экстракция - это когда мы отделяем интересующую нас материю от остальной материи без химикатов, отжима или термической обработки.**
 - Выделенную ДНК редко, почти никогда, не наблюдают под микроскопом.
 - Компоненты пар оснований, аденин (А), цитозин (С), гуанин (G) и тимин (Т): невидимы, но именно эти невидимые компоненты, предположительно, отличают человека от растений, деревьев, лягушек и т.д. Их количество, расположение и пары были постулированы на основе "правила Чаргаффа". В своей научной работе Эрвин Чаргафф выделил компоненты пары и пришел к выводу, что количество А похоже на Т, а количество С похоже на G. Чаргафф никогда не предлагал механизм образования пар на основе этих количеств.
 - Форма двойной спирали предполагается путем применения математических моделей на рентгеновских снимках ДНК. Математика - это форма языка, его количественная форма, математики не существует в природе; кроме того, применение математических формул на нескольких фотографиях почти невидимого предмета, может сказать очень мало о реальной форме и структуре этого предмета. Для математического определения структуры и формы ДНК были использованы только два рентгеновских снимка конкретной ДНК ("соль ДНК" тимуса теленка, она же NaDNA), с тех пор у нас есть только несколько фотографий ДНК из неизвестных источников и неизвестной методики

выделения. Форма ДНК была в значительной степени основана на гипотетической молекулярной структуре ДНК, а гипотетическая молекулярная структура была основана на гипотетической форме.

- Была постулирована всем известная роль ДНК, однако, у нас нет никаких реальных, задокументированных доказательств того, что ДНК копируется, транскрибируется в РНК, а РНК - в белок. Все предположения основаны на количественном исследовании образца до и после определенных процедур (химические промывки, центрифугирование, нагревание и кипячение). Микроскоп используется редко.
- ДНК-полимераза описана как фермент, который может выдерживать и работать при высоких температурах. Вот очень краткое резюме научных работ Mullis et al, в которых они экспериментировали с [E. coli](#) и [Taq-полимеразами](#).
- 1. "Изолированная" (т.е. химически обработанная) E. coli или Taq смешивается с ингредиентами, полученными от биотехнологических корпораций (dNTPs, буферы и т.д.). В статье, посвященной исследованию E. coli, они даже использовали соль бария, смолу Dowex 50 и фторид.
- 2. После центрифугирования, нагревания и охлаждения количество полученного осадка измеряется с помощью различных методов дробного осаждения (исследовательская работа по E. coli) и гель-электрофореза (исследовательская работа по Taq) для определения "молекулярного размера/веса" "ДНК".
- 3. **Нет фактического наблюдения за ферментативной активностью и превращением некоторого количества ДНК в большее количество ДНК.** Документирование определенных количеств побочных продуктов после смешивания химических веществ с мертвыми тканями или бактериями не доказывает, что существует фермент (полимераза), который присоединяется к праймерам и одноцепочечной ДНК (ssDNA) и каким-то волшебным образом соединяет свободно плавающие dNTPs с ssDNA при 72-80°C.
- 4. Ферменты известны тем, что переваривают и разлагают вещество, а не синтезируют.
- 5. **Контрольные эксперименты без полимеразы не проводились, как и без dNTPs или других химических веществ, чтобы установить влияние каждого компонента в химическом коктейле.**
 - Мы действительно не знаем, как синтезируются искусственные нуклеотиды (dNTPs), точные ингредиенты и методология не разглашаются, и они считаются коммерческой тайной. Единственный способ получить их - это купить у биотехнологических корпораций и верить, что мы получили то, за что заплатили, поскольку нет никакого способа проверить или подтвердить полученное содержимое. Очень интересно то, что при покупке всегда есть предупреждение: ["Только для исследовательского использования. Не для использования в диагностических процедурах"](#), т.е. если они используются для диагностики, никто не может подать судебный иск против биотехнологических корпораций в случае возникновения проблем с продуктом. Это положение применимо практически ко всем ингредиентам и инструментам, используемым для ПЦР всеми биотехнологическими корпорациями.
 - Праймеры также покупаются у биотехнологических корпораций. Разработка праймеров основана на ["цикле синтеза" олигонуклеотидов](#), эта процедура содержит несколько этапов и химические вещества, такие как ацетонитрил, 3% трихлоруксусная кислота в дихлорметане, аргон, N-метил имидазол, пиридин и

йод. Довольно неудобно, что для синтеза праймеров/олигонуклеотидов требуется так много этапов, химических веществ и растворителей, и все это без наблюдения под микроскопом и каких-то контрольных экспериментов.

Поскольку праймеры невидимы, мы получаем [пустую бутылку и лист гарантии качества](#), и, как и в случае с dNTPs, мы не можем проверить или подтвердить, что в полученной бутылке есть праймеры, и если в бутылке есть праймеры, то это те последовательности, которые мы заказали.

- Почему праймеры присоединяются сами по себе, а dNTPs требуют фермента? Содержат ли праймеры какой-то "клеевой" ингредиент? Если это так, то почему бы не добавить этот "клей" к dNTPs (?), что устранит необходимость в полимеразе.
- Во время денатурации ПЦР-коктейль нагревается до 95°C. Тепло очень вредно для тканей, клеток и содержимого клеток. В то время как радиация, одна из форм тепла, по научному признанию, вызывает апоптоз и повреждение ДНК, в случае с ПЦР предполагается, что температура 95°C расщепляет ДНК на две части. Почему температура 95°C расщепляет ДНК на две нити, а не на различные фрагменты, например, одинарные или двойные фрагменты? Поскольку в молекулярной биологии не используется микроскоп, а ДНК крайне редко изучается под микроскопом, какие у нас есть доказательства того, что ДНК расщепляется на две нити при указанной температуре? Кто-то может возразить, что именно поэтому используются стабилизаторы (химикаты), но как именно щелочные/кислотные химикаты могут стабилизировать что-то при разрушительной температуре 95°C? Нагретые химикаты на самом деле могут нанести большой вред исследуемому веществу.
- На этапе отжига «безмозглые» синтетические праймеры прикрепляются к одиночным нитям ДНК при температуре 60°C. Этот шаг не имеет никакого смысла, если мы смешиваем мертвую ткань с синтетическим аналогом (искусственными нуклеотидами), которые могут совпадать, и это не значит, что они «прикрепляются», особенно в смеси, где химикаты составляют большую часть содержимого. Например, если вы положите большой и маленький кусок одной и той же ткани и несколько кислот в кастрюлю и нагреете ее до 60°C, эти куски не свяжутся и не станут снова одним целым, как и курица, разрезанная на куски, не соберется во время варки супа. Я знаю, что сравнения звучат довольно забавно, возможно, даже идиотски, но нет никаких фактических доказательств того, что праймеры прикрепляются к ДНК при 60°C, или что праймеры вообще что-то делают. Если температура отжига - это температура прикрепления, тогда почему расщепленные нити ДНК не прикрепляются друг к другу, ведь они идеально совпадают? Синтетические короткие нити ДНК присоединяются, а исходные нити ДНК - нет?
- Температура отжига должна быть на 5-7°C ниже, чем "температура плавления" праймеров. Температура плавления определяется как "температура, при которой 50% двухцепочечной ДНК (дсДНК) расщепляется на одноцепочечную ДНК (ssДНК)". Существует несколько методов расчета температуры отжига, причем каждый метод предлагает свою температуру. Эта температура в основном основана на нуклеобазах, а именно на гипотетической молекулярной структуре и температуре, "назначаемой" каждой нуклеобазе. В статье ["Феноменологическая модель для предсказания температуры плавления последовательностей ДНК"](#) содержится информация о многих допущениях,

сделанных при попытке рассчитать температуру плавления праймеров. Если температура не подходит, то праймеры, якобы, не прикрепляются. Теперь возникает важный вопрос: Какова связь между этими двумя данными? (1) Праймеры прикрепляются при температуре, при которой (2) 50% дсДНК превращается в ссДНК? Праймеры уже одноцепочечные, а дсДНК уже расщеплена на этапе денатурации.

- При температуре около 75°C полимеразы становятся активной и "амплифицирует" ДНК. Согласно описанию ПЦР, полимеразы распознают один из концов праймера и следующую недостающую пару оснований ДНК и каким-то волшебным образом подбирает плавающие вокруг синтетические dNTPs и размещает их в соответствии с "правилом Чаргаффа о расстановке оснований". Единственный способ, которым я могу представить этот шаг, - это вообразить полимеразу с тремя руками: одна держит одноцепочечную ДНК, другая - праймер, а третья рука подбирает свободно плавающие синтетические нуклеотиды, причем не просто любые, которые находятся рядом, а именно те, которые соответствуют [правилу Чаргаффа о азотистых соединениях](#). Полимераза знает направление репликации ДНК (от 3' к 5'), поэтому она прикрепляется к правому концу праймера, она также знает, откуда должна начаться репликация, потому что существует правило копирования ДНК - от 3' к 5' (еще одно неустановленное предположение). Она не движется назад, то есть от 5' к 3', и не присоединяется к другому концу праймера, она знает, она действует на основе установленных молекулярной биологией правил (которые никогда не наблюдались под микроскопом и не были подтверждены). Реальность такова, что у нас нет никаких доказательств того, что подобное происходит. Оригинальные исследовательские работы, выделяющие и описывающие роль и действие полимеразы, основаны на химической обработке вещества, нагревании, сравнении объемов различных продуктов до и после, а все выводы были основаны на статистическом анализе побочного продукта, полученного после этих шагов, например, увеличение радиоактивности или флуоресценции в конечном результате, значит, полимеразы синтезировали больше ДНК.
- А что насчет сценария, когда праймеры не прикрепляются, а полимеразы не копируют? Она копирует только в том случае, если праймеры прикреплены? Она настолько умна? Что произойдет, если ПЦР будет проводиться без праймеров? Проводили ли они такой эксперимент? И если да, то каков конечный результат?
- [Трис-НСI](#) образуется в результате реакции смешивания химических веществ, а именно синтетического спирта, полиоксиметилена (пластик на основе формальдегида), нитрометана (образуется при соединении пропана и азотной кислоты в газовой фазе при 350-450°C) и т.д. Эта смесь якобы поддерживает рН коктейля ПЦР на постоянном уровне. Мне неизвестно, чтобы что-то живое продолжало жить (например, ДНК, фермент полимеразы), когда его извлекают из источника питательных веществ и помещают в химический раствор. Судя по ингредиентам, Tris-HCl больше похож на консервирующий раствор, чем на стабилизатор, если это так, то как именно полимеразы (фермент, полученный из бактерий *E.coli* или *Thermus aquaticus*) работают в таком (нагретом) кислом растворе?

- MgCl₂ (хлорид магния) - это неорганическая соль, которая повышает кислотность смеси. Ничто живое, например, полимераза, не может "жить" или "работать" в такой химической среде, особенно при нагревании.
- Сульфат аммония "[потенциально опасен для людей и окружающей среды](#)", но для амплификации ДНК он вполне подходит.
- Давайте рассмотрим устройство термоциклера и его работу. Температура между каждым этапом в термоциклере меняется быстро, каждый этап цикла длится менее минуты, как именно химический коктейль охлаждается с 95°C до 60°C, а затем менее чем через минуту снова быстро поднимается до 72°C-80°C? Термоциклер работает на электричестве, представим, что это электрическая духовка, в ней используются металлические пластины для проведения тепла. Даже если термоциклеру удастся достаточно быстро регулировать температуру, содержащему в пробирках с образцами потребуются дополнительное время, чтобы адаптироваться и опуститься или подняться до температуры, необходимой для каждого конкретного этапа. Поскольку речь идет о секундах, я лично сомневаюсь, что содержимое пробирки успеет опуститься для стадии отжига, а затем подняться для стадии удлинения. Кроме того, насколько быстро электрическая печь или металлическая термопластина может реально изменить свою температуру (?), особенно понижая ее за секунды? Применяет ли она какой-то механизм охлаждения? Является ли она чем-то вроде духовки и морозильника в одном? Возможно ли иметь эти два в одном (?) в таком маленьком устройстве? Давайте рассмотрим [QIAmplifier 96](#), который обещает "быстрый протокол циклирования, до 45 минут для 30 циклов", и давайте используем самый короткий цикл из возможных:
 - 45 минут = 2 700 секунд
 - 30 коротких циклов = 1 500 секунд = (15сек + 20сек + 15сек) x 30
 - 1 200 секунд остается на регулировку температуры, 1 200/30 циклов = 40 секунд на каждый цикл.
 - Каждый цикл состоит из 3 шагов, что означает 13,3 секунды на каждый переход, на каждое изменение температуры.
 - Я сильно сомневаюсь, что необходимая температура может быть достигнута, особенно понижена в течение 13,3 секунды термоциклером и содержащим в пробирках с образцами или любым оборудованием, работающим с теплом.
 - Первоначально этапы цикла ПЦР выполнялись вручную, и ингредиенты каждого этапа добавлялись перед каждым шагом цикла. Теперь все ингредиенты добавляются заранее и все проходят через все температуры цикла несколько раз. Просто критическая мысль- нагревание этого ПЦР-коктейля не окажет разрушающего действия на некоторые, если не на все, ингредиенты? Например, серьезно, каждый раз во время денатурации мы получаем две идеальные одноцепочечные ДНК? Можно ли ожидать, что в этом горячем химическом супе образуется что-то новое?
 - Нет абсолютно никаких микроскопических исследований выделенной ДНК до и после химической обработки, после каждого изменения температуры и после каждого цикла ПЦР. Предполагается, что все сделано правильно, потому что если ученые проводят гель-электрофорез (о нем будет рассказано в другой статье) и появляется интенсивная флуоресценция, значит, они выделили большое количество и качество ДНК/РНК, независимо от того, что они не знают, что в итоге получилось в пробирке, поскольку (об этом уже говорилось

много-много раз) молекулярные биологи не пользуются микроскопом. Кто-то может сказать мне, что ученые могут секвенировать конечный результат, чтобы подтвердить и изучить его, но машины для секвенирования и ингредиенты довольно дороги, не многие лаборатории могут их себе позволить, плюс ингредиенты и техника секвенирования также сомнительны, как выделение ДНК и процесс ПЦР.

- Когда кто-то ищет информацию о ПЦР, он/она получает анимационные картинки и видео о том, что происходит в пробирках с образцами, но реальность такова, что нет абсолютно никаких достоверных и визуальных доказательств того, что каждый этап происходит так, как показано в анимации, например, при 95°C ДНК расщепляется, при 60°C присоединяются праймеры, а при 75°C ДНК "копируется". Мы не знаем, расщепляется ли ДНК при 95°C, мы не знаем, присоединяются ли праймеры, и мы не знаем, присоединяет ли полимеразы dNTPs к нитям ДНК. Нет абсолютно никаких доказательств того, что какой-либо этап действительно происходит так, как описано.
- И последнее, но не менее важное: количество химических веществ, использованных для выделения ДНК и в процедуре ПЦР, не поддается пониманию, особенно если учесть, что праймеры и dNTPs также являются химическими веществами, поскольку они искусственно разработаны с использованием химических веществ. Количество некоторых (мертвых) тканей, которые нас интересуют, составляет менее 1% раствора, может быть, даже менее 0,1%. Почему-то мне кажется, что простое изучение ткани под микроскопом без всякой химической обработки и нагревания может сказать гораздо больше, чем все перечисленное.

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Как ПЦР используется для диагностики Sars-Cov-2

Для выявления вируса Sars-Cov-2 используется [модифицированная версия ПЦР - ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени \(ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени\)](#). Этот метод обнаружения вируса был первоначально разработан [Виктором М Корманом, Кристианом Дростеном и др.](#) и состоит из некоторых дополнительных ингредиентов, оборудования и этапов.

Дополнительными этапами RT-PCR в реальном времени являются:

Sars-Cov-2 заявлен как РНК-вирус (одноцепочечный), поскольку метод ПЦР был разработан на основе и для ДНК (двуцепочечный), РНК необходимо превратить в ДНК перед проведением ПЦР. Этот шаг, превращение РНК в ДНК (путем синтеза комплементарной нити РНК) называется обратной транскрипцией (RT).

"Реальное время" выполняется системой ПЦР, содержащей флуорометр. Когда ученые хотят определить, есть ли в образце определенная последовательность, они добавляют в него олигонуклеотиды (они же зонды), окрашенные флуоресценцией. Если эти зонды присоединяются к шаблону ДНК/РНК, то во время этапа элонгации будет испускаться флуоресцентный сигнал. Этот сигнал фиксируется камерой и записывается программным обеспечением ПЦР. Для обнаружения Sars-Cov-2

используются специально разработанные праймеры и зонды, которые основаны на коротких последовательностях генома Sars-Cov-2, размещенных в [Genbank](#) и [Gisaid](#).

Ингредиенты и оборудование для RT-PCR в реальном времени:

- Изолированная РНК
- **Буфер и химикаты** (те же, что и для обычной ПЦР): Tris-HCl, KCl, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄.
- **Обратная транскриптаза** (она же РНК-направленная ДНК-полимераза): фермент, превращающий РНК в ДНК. Она синтезирует комплементарную нить РНК (кДНК).
- **Случайные гексамерные праймеры**: эти праймеры используются для синтеза кДНК

Sars-Cov-2 Primers: олигонуклеотиды на основе генома Sars-Cov-2

- **ДНК-зонды** (они же TaqMan) для Sars-Cov-2: олигонуклеотиды на основе генома Sars-Cov-2, содержащие флуоресцентный краситель
- **ДНК-полимераза**
- **dNTPs** (искусственные нуклеотиды).
- **Система ПЦР в реальном времени**: система, объединяющая термоциклер, флуорометр и специально разработанное программное обеспечение. Система ПЦР в реальном времени не только копирует ДНК, но и регистрирует выделение флуоресцирующих сигналов при срабатывании зондов, окрашенных флуоресцентным красителем.

Выделение РНК

Как и в случае с обычной ПЦР, где необходимо выделить ДНК, перед проведением RT-PCR также необходимо выделить РНК. Этапы [выделения РНК Sars-Cov-2](#) совершенно аналогичны выделению ДНК. Мазок с собранной мокротой помещается в раствор реагента, РНК выделяется следующим образом:

- **Лизис клеток**: Буфер для лизиса, например, реактив [тризол](#) и [хлороформ](#) смешиваются с раствором, содержащим РНК. Смесь встряхивают или перемешивают вихревым методом и центрифугируют. Верхний слой (водный слой) раствора, содержащего РНК, переносят в новую пробирку.
- **Осаждение**: К раствору РНК добавляют синтетический спирт (этанол, изопропанол или изопропиловый спирт), смесь центрифугируют, а супернатант (жидкую часть раствора) отбрасывают. РНК будет находиться в гранулах, этот этап повторяется один-два раза.
- **Ресуспензия/элюирование**: Полученную РНК ресуспендируют в воде, синтетическом спирте или в буфере.

Этапы RT-PCR в реальном времени

- Выделенную РНК смешивают с ферментом обратной транскриптазы (RT) и искусственными нуклеотидами. Этот фермент синтезирует комплементарную нить ДНК (кДНК), которая будет соответствовать нити РНК.
- Шаг **денатурации** такой же, как и в обычной ПЦР, - нагревание смеси до 95°C.

- На этапе **отжига** праймеры и зонды sars-cov-2 прикрепляются к одноцепочечной ДНК (ssDNA), праймеры и зонды sars-cov-2 прикрепляются только в том случае, если РНК/кДНК содержит такие короткие последовательности.
- На стадии **расширения**, когда полимераза синтезирует новые нити, если полимераза достигает прикрепленного зонда, зонд испускает флуоресцентный сигнал (свет), который фиксируется камерой и записывается программным обеспечением.
- Программное обеспечение будет регистрировать сигналы зондов и их увеличение с каждым циклом.

Критический анализ RT-PCR в реальном времени

Все критические моменты, поднятые во время экспертизы ПЦР, актуальны для RT-PCR в реальном времени. Но RT-PCR в реальном времени вызывает несколько дополнительных вопросов:

- В то время как у нас есть несколько фотографий ДНК, сделанных с помощью электронного микроскопа (которые представляют собой не что иное, как скрученную нить неизвестного происхождения), у нас нет ни одной фотографии и доказательства существования РНК, ее формы, молекулярной структуры и функции.
- Раствор реагента, который используется при сборе образца, содержащего РНК, например, [азид натрия](#), является [высокотоксичным химическим веществом](#).
- Почему для синтеза комплементарной нити РНК используется обратная транскриптаза, а не Taq-полимераза? В чем точное различие между этими двумя ферментами?
- RT-PCR используется для РНК. В RT-PCR РНК "обратно транскрибируется" в ДНК (кДНК) с помощью фермента обратной транскриптазы. Это основано на теории, что ДНК транскрибируется в РНК, а РНК переводится в белки. У нас нет фактических доказательств этой теории, т.е. того, что эти процессы действительно происходят в наших клетках или что искусственно, редко наблюдаемая под микроскопом, нежная ДНК каким-то образом (с помощью фермента) производит одноцепочечную ДНК (РНК) и что эта одноцепочечная ДНК дает "инструкции" "рибосомам" о том, как синтезировать белки.
- По неизвестной причине лаборатории, проводящие тесты Sars-Cov-2 RT-PCR в реальном времени, не раскрывают количество проведенных циклов, единственное, что мы получаем, это положительный или отрицательный результат плюс праймеры и зонды, используемые для определения наличия/отсутствия вируса. Количество циклов очень важно, так как чем больше количество циклов, тем выше вероятность положительного или неубедительного результата. Я не понимаю, почему такая важная информация, влияющая на результат, не разглашается, тем более что мы платим за этот тест (напрямую или через наши налоги). Разве это не наше право знать, быть информированными обо всех аспектах того, как проводятся эти тесты?
- Тест Sars-Cov-2 RT-PCR, разработанный [Виктором М Корманом, Кристианом Дростеном и др.](#) имеет массу проблем, основными из которых являются:
 - Праймеры и зонды были разработаны на основе "последовательностей вирусов, связанных с ТОРС, доступных в GenBank 1 января 2020 года", потому

что официального релиза генома Sars-Cov-2 еще не было. По сути, RT-PCR был разработан на основе сгенерированного компьютером генома.

- Исследовательская работа была представлена 21 января 2020 года, прошла рецензирование и была опубликована менее чем за 24 часа (такого еще не случалось ранее); рецензия не была опубликована.
- Дростен является [редактором](#) журнала, в котором была опубликована их статья (euromsurveillance).
- TIB Molbiol, немецкая биотехнологическая компания, разработала набор для RT-PCR Sars-Cov-2 на основе протоколов Кормана-Дростена и начала рассылать их уже [10 января 2020 года](#), то есть до официального объявления ВОЗ о вирусе и [официального обнародования](#) последовательности.
- [Кроме того, несколько геномных последовательностей были опубликованы китайскими учеными в GISAID, GENBANK и Virological.org между 10 и 11 января](#), но мало что известно о том, как были получены эти геномы, т.е. методология выделения и секвенирования материала и используемое оборудование.
- Два автора исследовательских работ по RT-PCR - Ольферт Ландт, основатель TIB Molbiol, и Марко Кайзер, научный консультант Tib-Molbiol.
- Количество химических веществ и процедур в RT-PCR почти удвоено по сравнению с PCR, что заставляет задуматься, что именно оказывается в пробирке, кроме крошечного фрагмента жидкости организма, взвешенного в горячем химическом супе.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ МЫСЛИ И ВЫВОД

Как и в случае с выделением и функцией ДНК, я не убеждена, что то, что утверждается, действительно происходит во время ПЦР. Не используется микроскоп, не проводятся контрольные эксперименты, есть сомнительное оборудование и химикаты, тонны этапов и высокие температуры.

Лично я вижу необоснованное и недоказанное утверждение, что небольшое количество мертвой или дегенерированной материи (все, что извлекается из источника питательных веществ, мертво или находится в процессе разложения) при смешивании со многими окисляющими химикатами и коммерческими секретными "ингредиентами" и нагревании в течение значительного периода времени создаст множество копий "ДНК".

Как именно бактериальный фермент, выделенный из термальных источников, синтезирует материю? Бактерии переваривают, ферментируют и разлагают вещество, они являются естественными переработчиками. Этот бактериальный фермент (Taq или полимераза E.coli) был выделен с использованием тонн химикатов и тепла, как именно бактериальный фермент работает без бактерии, которая его производит? И как именно он присоединил синтетические нуклеотиды к синтетической сдДНК?

Реальность выглядит довольно просто, если руководствоваться здравым смыслом, когда мы используем тонны химикатов, тепло и центрифугирование, единственное, что мы получим, это токсичный суп, содержащий 0,0000001% мертвой материи (если мы верим, что ПЦР умножает что-то, тогда она может создать 1 073 741 824 копии только с одной ДНК за 30 циклов). Если бы мне нужно было сравнить ПЦР или процедуры

RT-PCR в реальном времени с чем-то, то это было бы подогревание пищи в микроволновой печи или в духовке. Представьте, что небольшое количество мяса с большим количеством химикатов и некоторой синтетической материей, которая рекламируется как синтетическое мясо, помещается в духовку на полчаса. Создаст ли этот процесс больше мяса (?), которое можно будет употреблять в пищу? Или в итоге мы получим высокотоксичную и непригодную для употребления смесь, возможно, даже опасную для печи и окружающей среды.

Другой аналогией может быть смешивание кусочков лего с химическим коктейлем, помещение смеси в духовку и ожидание, что лего соберется лего через час при температуре 95°C. Разве они не разрушатся? Разве они не разрушатся или не расплавятся? Разве все, что попадает под высокую температуру PCR, не должно разлагаться?

В действительности при высоких температурах не образуется ничего нового - ни при кипячении, ни при нагревании и т.д. Материя просто окисляется, а ингредиенты деградируют. Утверждение о том, что ДНК-полимераза синтезирует что-то, на самом деле может быть побочным продуктом окисления и деградации ингредиентов при тепловой обработке.

Я считаю, что нет необходимости углубляться в историю ПЦР. Тот, кто прочитает эти работы и, используя элементарную логику, поймет, что нет абсолютно никаких доказательств того, что ДНК-полимераза присоединяется к чему-либо или синтезирует что-либо, потому что использованные химикаты, методология извлечения и полученные выводы основаны на объемах жидкости до и после химической обработки, нагревания и центрифугирования. И снова абсолютно без участия микроскопа.

Если убрать все биохимические продукты и новейшее биотехнологическое оборудование, смогут ли молекулярные биологи проводить какие-либо свои эксперименты? Очевидно, что молекулярные биологи в значительной степени полагаются на биотехнологические корпорации, они не в состоянии генерировать собственные материалы/сырье и не могут проверить точность продуктов и эффективность оборудования. Эти факты заставляют меня поставить под сомнение власть и контроль, которые биотехнологические корпорации получили за последние десятилетия в области науки.

Как и в случае с выделением ДНК, ПЦР - это не что иное, как коктейль из химических веществ, нагреваемых в течение значительного времени.

Нас просят не подвергать сомнению открытия и процессы науки или молекулярной биологии, они "установлены", отмечены Нобелевскими премиями, нам говорят просто довериться анимированным изображениям и видео, которые нам предоставляют для объяснения того, что происходит в пробирке с образцом. Они называют это наукой; лично я бы назвала это культом. Культ, который разработал тонны ненужных терминов и процедур, что делает их "науку" недостижимой для обычного человека, в результате чего люди становятся более восприимчивыми к "доверию и следованию" ученым. Если человек снимет терминологический барьер и посмотрит на ингредиенты и процедуры как они есть, он поймет, что биохимия или молекулярная биология - это не более чем

измерение побочных продуктов, образующихся в результате химических реакций и тепла, побочных продуктов, которые мало что могут рассказать о жизни и особенно о здоровье.

Кто-то может спросить, что же делает RT-PCR sars-cov-2 "положительным"? Я должна признаться, что не знаю. Я знаю только то, что Covid-19 (болезнь, которая предположительно связана с «вирусом» Sars-Cov-2) не содержит никаких новых или необычных симптомов, чтобы быть обозначенной как новая/новейшая болезнь. Covid-19 содержит все известные симптомы почти всех распространенных заболеваний; от симптомов обычной простуды и гриппа до пневмонии и гастроэнтерита, в последнее время к очень длинному списку симптомов Covid-19 добавляются свертываемость крови, головные боли и даже депрессия. Те, у кого положительный результат, будут лечиться по протоколам Covid-19, которые включают экспериментальную смесь лекарств и даже аппарат искусственной вентиляции легких. Те, у кого симптомы, но тест отрицательный, будут лечиться по старинке, т.е. лечение и/или лекарства будут назначаться в зависимости от симптомов. Кроме того, RT-PCR в реальном времени познакомил нас с новой концепцией - концепцией бессимптомного носительства вируса, который может привести к смерти другого человека. Это интересная концепция - быть носителем смертельного вируса, который не вызывает никаких симптомов у носителя, но при передаче может убить другого человека. Представьте, если бы такая концепция была представлена для обычного гриппа, ни один обычный человек не поверил бы в это и, возможно, начал бы сомневаться в медицинской/молекулярной науке. Как именно передается этот вирус? Как доказано, что даже если что-то передается, оно вызывает симптомы? Вызывает симптомы у одного человека, но не вызывает симптомов у другого? Если вирус обнаруживается у здорового человека и у больного, то, может быть, он не является причиной заболевания? Были ли [постулаты Коха](#) удовлетворены Сарс-Ков-2 (?) и для любого другого вируса? Выделение вирусов - такой же неестественный и нелепый процесс, как выделение ДНК и РНК, содержащий множество химических веществ и этапов (выделение вирусов и цитопатический эффект будут обсуждаться в одной из следующих статей).

Меня удивляет то, что ученые дошли до стадии [амплификации синтетической ДНК](#). Что именно они получают от копирования и изучения синтетической ДНК или РНК? Даже если эти последовательности созданы на основе какого-то человеческого или вирусного (сгенерированного компьютером) генома, что именно синтетические последовательности могут рассказать о людях, животных, болезнях, бактериях, вирусах, жизни в целом? Представьте себе, если ученые и медицинская промышленность дойдут до стадии объявления открытий и создания диагностических тестов, инструментов и оборудования на основе этих искусственных, совершенно нереальных "последовательностей".

Удивительно то, что ученые даже пытаются создать синтетические клетки и организмы на основе ДНК [последовательностей] с помощью ПЦР, и хотя у них практически ничего не получается, они оправдывают неудачу ограничением технологий, в частности, ограничениями процесса ПЦР и оборудования. Научное заблуждение достигло такой стадии, что они предлагают сделать ПЦР "методом репликации клеток", который они назвали "реакцией репликационного цикла (РЦР), где "...этот метод, как ожидается,

станет платформой для создания искусственных клеток со способностью реплицировать большую ДНК". Учитывая, что RCR является восстановленной системой репликации генома из *E. coli*, система будет применима для выяснения механизма репликации генома и деления микроорганизмов. Однако остается несколько технических проблем...". Если они верят в возможность создания синтетической жизни, тогда они должны верить, что мы не более чем кусок мяса, который жив и функционирует благодаря химическим реакциям. Являются ли мои мысли, наблюдения и чувства продуктами химических реакций? Нет ли здесь участия какой-то формы сознания? А как же все эти свидетельства о внетелесном опыте, а также об опыте, близком к смерти? Иллюзии? Ощущение того, что мы гораздо больше, чем физическое тело, - это иллюзия?

В настоящее время, когда вся "устоявшаяся" наука ежедневно влияет на нашу жизнь, особенно в последние два года, "думай сам" - это наш лучший и самый важный инструмент, которым мы обладаем, чтобы справиться с правительственными мерами Covid-19, основными направлениями науки, медицины, образования и здравоохранения.

Искренне,

Там.

PS: меня поразило не только количество используемых химикатов, но и количество одноразового пластика, например, пробирки, наконечники пипеток, перчатки, синтетический спирт и т.д. Это выглядит как довольно загрязняющая наука, как на химическом, так и на пластиковом уровне.

Исследовательская работа Кэри Маллис и др., в которой был использован метод ПЦР:

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- 1967, [Ферментативный синтез ДНК, XXIV. Синтез ДНК инфекционного фага φX174](#)
- 1971, Исследования по полинуклеотидам. XCVI. Восстановление репликации коротких синтетических ДНК, катализируемое ДНК-полимеразами DOI: [10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](#)
- 1976 Полимераза дезоксирибонуклеиновой кислоты из экстремального термофила *Thermus aquaticus* [PMC232952](#)

Исследовательская работа Кэри Маллис и др., устанавливающая метод PCR:

- 1982, Winkler ME, Mullis K, Barnett J, Stroynowski I, Yanofsky C. Терминация транскрипции в аттенуаторе триптофанового оперона снижается in vitro под действием олигомера, комплементарного сегменту лидерного транскрипта <https://www.pnas.org/content/79/7/2181>.
- 1985, Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (New York, N.Y.). 230: 1350-4. PMID [2999980](#) DOI: [10.1126/Science.2999980](#)

- 1986, Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology. 51: 263-73. PMID [3472723](#) DOI: [10.1101/Sqb.1986.051.01.032](#)
- 1986, Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Анализ ферментативно амплифицированной бета-глобиновой и HLA-DQ альфа ДНК с помощью аллель-специфических олигонуклеотидных зондов. Nature. 324: 163-6. PMID [3785382](#) DOI: [10.1038/324163A0](#)
- 1987, Mullis KB, Faloona FA. [21] Специфический синтез ДНК in vitro с помощью катализируемой полимеразой цепной реакции Methods in Enzymology. 155: 335-350. DOI: [10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](#)

Статьи:

- [История ПЦР](#)
- [Оценка производительности термоциклеров для ПЦР в условиях быстрого циклирования](#)
- [ПЦР - критический анализ](#)
- [Параметры циклирования ПЦР - шесть ключевых соображений для успеха](#)
- [Что такое ПЦР? - Руководство для начинающих](#)
- [ОБЗОРНЫЙ ОТЧЕТ ПО МЕТОДУ КОРМАНА-ДРОСТЕНА, ПОДГОТОВЛЕННЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫМ КОНСОРЦИУМОМ УЧЕНЫХ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИЗНИ \(ICSLs\)](#)
- [Многочисленные скандалы, связанные с ПЦР-тестом: Часть 1](#)
- [Многочисленные скандалы, связанные с тестом ПЦР: Часть 2](#)

Видео:

- [Что такое ПЦР? Полимеразная цепная реакция | miniPCR bio™](#)
- [Тест на коронавирус: RT-PCR в реальном времени - анимационное видео](#)
- [RT-PCR для диагностики COVID-19 \(бывший 2019-nCoV\)](#)