

---

**PCR – AN INTERDISCIPLINARY SCIENTIFIC METHOD INCLUDED IN THE  
EDUCATIONAL PROGRAM IN BIOLOGY AND CHEMISTRY FOR FOREIGN  
STUDENTS OF SPECIALIZED PREPARATORY LANGUAGE COURSE**

**Vesselin Alexandrov**

Medical University of Plovdiv, Bulgaria, [acionix@gmail.com](mailto:acionix@gmail.com)

**Detelina Mileva**

Medical University of Plovdiv, Bulgaria, [detelina\\_mileva@abv.bg](mailto:detelina_mileva@abv.bg)

**Abstract:** Multidisciplinary approach in the education of students in a Language Preparatory Course and students in Medicine, Dental Medicine and Pharmacy at Medical University of Plovdiv is widely represented. The development of recent technologies and scientific methods and especially their application in the diagnostic of different diseases are included as a part of educational programs during the education.

Each of newly developed scientific techniques or methods includes different disciplines as Physics, Chemistry, Biology, etc. and this is quite normal. Including of different scientific fields in the development of some scientific method usually increases the interest of the students.

The main subject of this article is the biotechnological scientific method „Polymerase Chain Reaction (PCR)“, which is introduced in the educational programs in Biology and Chemistry for foreign students in Language Preparatory Course at Medical University of Plovdiv. The aim is to give students more clarity on how the development of science and technology contributes to the accurate diagnosis of various diseases and the determination of the right treatment.

The educational program in the Preparatory Course is specialized because Bulgarian and vocabulary of the students are not on a high level and they do not know enough terms to apply them in speaking. In the present study we are trying to give different ideas how to introduce the new terminology step by step. These new terms usually are difficult for the students and this could lead to loss of interest. Therefore it is necessary to find the way to explain the terms in order new knowledge to be consolidated. The new terms are introduced in an appropriate way as they are accompanied with different drawings, schemes and tables illustrating the processes and helping an easier utilizing of the new matter.

Various additional approaches are being taken to assimilate and validate the new knowledge: developing of their own presentations by the students about a particular method or technology and presenting them to the class; conducting seminars with preliminary preparation for discussing a research approach; visits to the scientific laboratories of the University and acquaintance with the equipment demonstrated by highly qualified teachers and researchers in the respective Departments; students who wish to do experimental work may be enrolled in special scientific courses arranged by the Departments of Biology and Chemistry.

**Keywords:** PCR, education of students from Language Preparatory Course, Biology, Chemistry, Biochemistry

**ПОЛИМЕРАЗНА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЯ (PCR) – ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРЕН  
НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ МЕТОД, ВКЛЮЧЕН В ОБУЧЕНИЕТО ПО  
БИОЛОГИЯ И ПО ХИМИЯ НА ЧУЖДЕСТРАННИ СТУДЕНТИ ОТ  
СПЕЦИАЛИЗИРАН ПОДГОТВИТЕЛЕН ЕЗИКОВ КУРС**

**Веселин Александров**

Медицински университет Пловдив, България, [acionix@gmail.com](mailto:acionix@gmail.com)

**Детелина Милева**

Медицински университет Пловдив, България, [detelina\\_mileva@abv.bg](mailto:detelina_mileva@abv.bg)

**Резюме:** Мултидисциплинарният подход при обучението на студенти в езиков подготвителен курс и студенти по медицина, дентална медицина и фармация в Медицински университет Пловдив е широко застъпен в учебния процес. Развитието на съвременните технологии и изследователски методи и по-специално приложението им при диагностицирането на различни болестни състояния е включено като част от учебните програми при обучението на студентите. Във всеки един от новоразработваните научно-изследователски методи са застъпени различни дисциплини като физика, химия, биология и др. и това е

напълно естествено. Включването на различни области от науката при разработването на даден научно-изследователски метод обикновено засилва интереса на студентите към него.

Предмет на тази публикация е биотехнологичния изследователски метод „Полимеразна верижна реакция (PCR)“, който се въвежда в програмите по биология и по химия на чуждестранните студенти от Подготвителния курс при Медицински университет Пловдив. Целта е студентите да придобият повече яснота как развитието на науката и технологиите допринасят за точната диагностика на различни болести и определянето на правилното лечение.

Обучението в подготвителния курс се характеризира с това, че студентите нямат богат терминологичен запас, а лексиката им не е на достатъчно високо ниво. В настоящата разработка ние се опитваме да дадем различни идеи как постепенно да се въвежда новата терминология, която обикновено затруднява студентите и едновременно с това да не се изгуби техният интерес, за да могат да се затвърдят новите знания. Термините се въвеждат на достъпно ниво като са придружени с разнообразни схеми, илюстриращи процесите и помагачи по-лесното усвояване на материала.

За усвояване и утвърждаване на новите знания се предприемат и различни допълнителни подходи: разработване на презентации от студентите за определен метод или технология и представянето им пред групата (класа); провеждане на семинари с предварителна подготовка за дискутирането на даден научно изследователски подход; посещения в научните лаборатории на университета и запознаване с апаратурата, демонстрирана от висококвалифицирани преподаватели и изследователи в съответните катедри; студенти, които желаят експериментална дейност, могат да бъдат включени в специални кръжоци към катедрите по биология и химия.

**Ключови думи:** полимеразна верижна реакция, обучение на чуждестранни студенти от подготвителен курс, биология, биохимия, химия

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

Непрекъснатото и бързо развитие на технологиите и практическото им приложение в различни области допринася за прогреса на човешката цивилизация, правейки живота на хората по-лесен и по-приятен. Технологиите, прилагани в областта на медицината помагат за нейния напредък. Благодарение на тях се извършват хирургически операции, немислими допреди няколко години, диагностицирането става по-лесно, по-бързо и по-точно, прилагат се нови методи за лечение, нови по-ефикасни медикаменти, разработват се протези, импланти и др. Наред с теоретичния материал в програмите по биология и по химия за чуждестранни студенти от Подготвителния курс на ДЕСО са застъпени различни методи и технологии с медицинско приложение, които дават възможност за диагностика на различни заболявания и помагат за определянето на правилно лечение на пациентите. По този начин студентите получават нови знания и разбират огромното значение на тези иновативни технологии за медицината. Те обогатяват речника си с нови термини, което им помага да усвояват по-лесно учебния материал, когато изучават тези технологии в детайли на по-късен етап по време на тяхното обучение в горните курсове. Такъв иновативен метод е Полимеразната верижна реакция (PCR). Той е разработен от Kary Banks Mullis през 1983 г. За откритието си десет години по-късно през 1993 г, американският биохимик получава Нобеловата награда за химия заедно с Michael Smith. През годините са разработени много различни варианти и модификации на PCR, съобразно с естеството на приложението, например: qPCR или RT (real time) PCR, RT (reverse transcription) PCR, multiplex PCR, asymmetric PCR, hot-start PCR, touchdown PCR, nested PCR, Assembly PCR, colony PCR...

## 2. ИЗЛОЖЕНИЕ

Темата за PCR се включва в програмата по биология и химия след като студентите са преминали уроците за нуклеинови киселини и репликация. Това е необходимо, защото репликацията е заложена в основата на метода. На студентите се обяснява, че това е изкуствена *in vitro* репликация. Разяснява се огромното значение на иновационната технология. Например след разработването на PCR метода в New York Times излиза материал, в който се отбелязва, че откритието е изключително и заема централно място в съвременната биохимия и молекулярната биология, като ги разделя виртуално на две епохи: преди PCR и след PCR.

Представя се кратка информация за разнообразните приложения на техниката, събрани в таблица:

Област	Приложение	Медицина (вирусология, микробиология, микология, паразитология, имунология) клинична диагностика	
Генетика	Мутагенеза, мутации		
Биохимия	Метилиране	Вирусни заболявания	Хепатит, СПИН, херпес зостер, ротавирусен ентерит, варицела и др.
Молекулярна биология	Клониране, секвениране, генна експресия		
Криминалистика	Доказване на бащинство, разкриване на престъпления, идентифициране на хора	Бактериални заболявания	Гонококови инфекции, хламидии, Лаймска болест, туберкулоза и др.
Селско стопанство	GMO-тестове, детекция на патогени в храната, генотипиране на растения	Автоимунни и онкологични болести, скрининг за вродени генетични аномалии и др.	

За да стане ясно как се прилага технологията PCR се дават се кратки примери от последните научни публикации по темата: доказване на микро-РНК с паразитен произход (кучешка тения) в заразени пациенти; наличие на нуклеотидни полиморфизми (SNP), доказващи сърповидно-клетъчна анемия,  $\beta$ -таласемия, Алцхаймер, хепатит С вирусна цироза или SNP в toll-like receptors, водещи до прекъсване на бременност; идентифициране на щам *Escherichia coli*, причиняващ диария, *Trypanosoma cruzi* при болест на Шагас или рикетсии в кърлежи, причиняващи петниста треска; доказване на различни модификации на папилома вирус, причиняващи рак на матката; анализиране на бактериалния микробиом в червата на човека или влиянието на куркумина върху карцинома на черния дроб. Не се изисква научаване на тези факти, само се обръща внимание на изключителните възможности на метода за диагностика на различни заболявания.

Пояснява се, че е необходима съвсем малка част от проба от кръв или тъкан, която е достатъчна за провеждането на анализа. Единственото условие е в пробата да има генетичен материал (ДНК, РНК), чиято нуклеотидна последователност е известна.

След това се пристъпва към представяне на същността на метода, който дава възможност да копират определени сегменти от ДНК или РНК. Важно е да се отбележи, че PCR е *in vitro* метод – всички реакции, необходими за изследването се извършват в лаборатория извън тялото. За провеждането на анализа е необходим специален уред, наречен PCR апарат или термосайкълър. PCR апаратът е един прецизен термостат с микропроцесорен контрол. Той има възможност за изключително кратко време да увеличава или намалява температурата в термоблока по предварително зададена програма и да я поддържа с голяма точност и минимални температурни отклонения (до  $\pm 0.01^\circ\text{C}$ ).

Показват се снимки на апарата и схеми на конструкцията му.



По време на реакцията с помощта на ензим става размножаване (амплифициране) на предварително избрани сегменти от ДНК (таргетна ДНК) в пробата, които са ограничени от два праймера. След няколко часа чрез полимеразната реакция се получават милиони копия на определения ДНК сегмент, който може да се подложи на последващ анализ.

Съществен момент от урока е да се разбере как се извършва подготовката на пробата за анализ. За да се приложи PCR след като пробата е изолирана, е необходимо събирането на 5 важни компонента в една малка епруветка:

1. **ДНК от взетата проба** – тя служи като ДНК матрица, част от която се копира.
2. **Тaq-полимераза** – основният двигател на процеса. Ензимът, който е необходим за синтеза на новите копия на избрания за размножаване ДНК сегмент. Оптималната температура, при която „работи“ Тaq-полимеразата е 72 °С.
3. **Праймери** – това са къси изкуствено синтезирани нуклеотидни последователности. Най-често дължината им е между 20 и 40 нуклеотида. Те са комплементарни на двата участъка, ограничаващи избраната последователност, която ще се копира. Тук трябва да се обърне внимание, че за разлика от процеса на репликация в ядрата на клетките в организма, където праймерите са от РНК, при полимеразната верижна реакция те са къси ДНК последователности. Припомня се каква е ролята на праймерите при репликацията. Полимеразата се нуждае от праймер, за да започне синтеза при всеки нов цикъл на PCR-реакцията.
4. **Деоксирибонуклеотидтрифосфати дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ** – „тухлите“, които са необходими за изграждането на новите вериги върху ДНК матриците на принципа на комплементарността.
5. **Реакционен буфер** – осигурява подходящо рН на средата и необходимите йони за оптималното протичане на полимеразната реакция и за работата на ензима. Взависимост от спецификата на използваната Тaq-полимераза, съотношението на йоните може да се различава, както по количество, така и по качество. Понякога е необходимо към буфера да бъдат добавени допълнително говежди серумен албумин, желатин, различни детергенти и др.

За да се поддържа интереса по време на изложението е добре да се задават въпроси или да се дава любопитна информация, свързана с подготовката на пробите за анализ. Например „При колко градуса работи ДНК полимеразата в организма?“, „А при каква температура е активна Тaq-полимеразата?“ След кратка дискусия студентите се информират за бактериите *Thermophilus aquaticus*, от които е изолиран ензимът. Това са уникален тип прокариоти, живеещи в горещи извори с почти вряла вода. Ензимът Тaq-полимераза е термоустойчив и може да поддържа своята активност до 1 час при температура до 94 °С, което му позволява да „работи“ по време на целия процес PCR. Самата частица Тaq се образува от латинското име на бактериите.

За да сме сигурни, че всичко е извършено по правилния начин е необходимо да се обясни следното: наред с подготвените за размножаване проби, трябва да има отрицателна и положителна контролна проба. След протичането на реакцията в отрицателната контрола не трябва да има нищо, а в положителната трябва да има синтезирана таргетна ДНК. В противен случай нещо не е протекло, както трябва и резултатите не се считат за коректни.

Подготвените проби се поставят в термоблока на PCR машината. Настройва се програма за продължителността на отделните стъпки и броя на циклите. Дава се информация как протича полимеразната верижна реакция и главните етапи, през които преминава. В началото е необходимо разделянето на двойната верига на ДНК, което се нарича денатурация. За няколко минути при температура над 90°С се разкъсват водородните връзки между азотните бази на нуклеотидните двойки. Следващият етап е амплифицирането на избраната секвенция. Това става чрез циклично повтаряне на кратки интервали от време (цикли), при които апаратът поддържа точно определена температура. Всеки цикъл се състои от следните три стадия:

1. **Денатурация (denaturation)** или разделяне на двойната верига на ДНК. Взависимост от структурата на таргетната ДНК и от природата на Тaq-полимеразата температурата за денатуриране на ДНК най-често е между 90 и 95°С. Такава температура причинява пълно разделяне на двойната верига ДНК, след което се получават едноверижни ДНК матрици, подлежащи на последваща амплификация;

2. **Хибридация (annealing)** или прикрепване на праймерите към ДНК матриците. При температура около 50 или 60°С праймерите се прикрепват към комплементарните им участъци от едноверижната ДНК матрица. Много е важно тук да се обясни, че температурата за хибридацията е специфична за различните ДНК. Тя зависи от дължината на праймерите и от съотношението на нуклеотидните двойки. За оптимално протичане на реакцията е необходимо да се изчисли подходящата температура. Най-често използваната формула е:

$$T_m = (A+T).2+(G+C).4$$

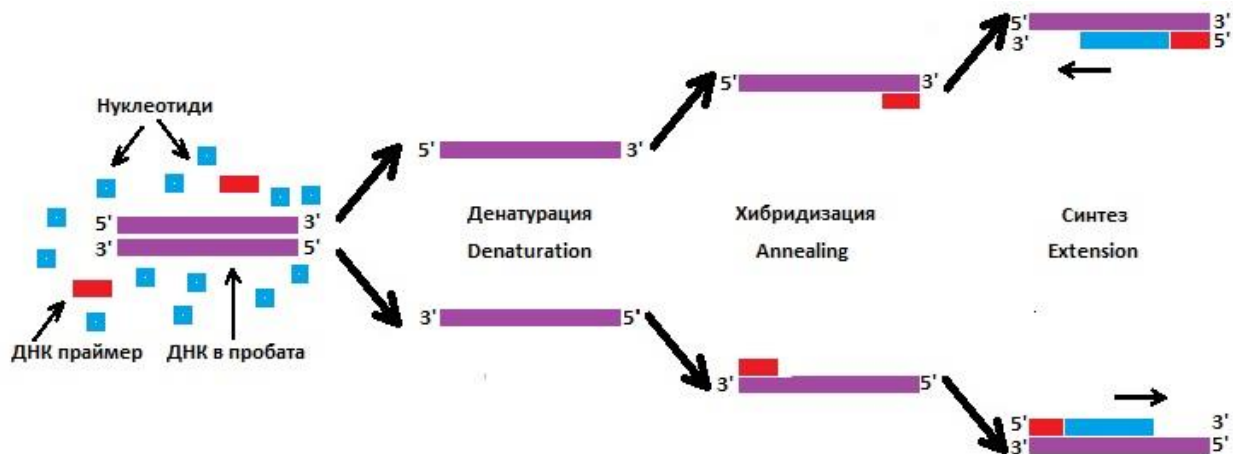
Отново трябва да се наблегне, че се копира част от ДНК, а не цялата ДНК, която е в пробата. Обикновено се набелязват специфични участъци характерни за определен вид. Ако в някои от пробите няма ДНК от този

вид, там няма да протече PCR. PCR ще копира специфичните ДНК последователности само в пробите, където присъства сегмента на търсения вид.

### 3. Синтез (extension, elongation)

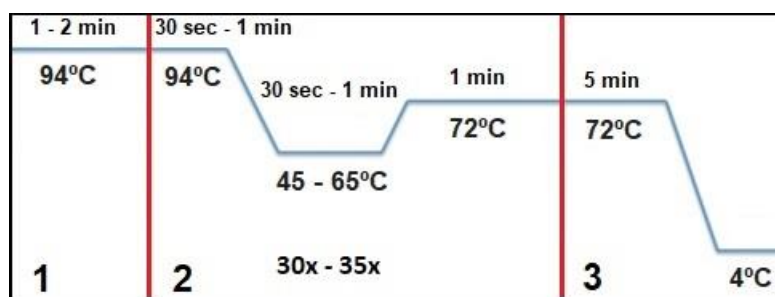
Двете разделени ДНК вериги с прикрепените върху тях праймери се използват от Таq-полимеразата за матрици и тя започва да реди нуклеотиди на принципа на комплементарността. Така в края на цикъла, се синтезират две нови копия на изходната ДНК последователност. Температурата през този етап зависи от спецификата на Таq-полимеразата. Най-често тя е 72°C и осигурява оптимални условия за действието на ензима, при които той е най-активен. След всеки цикъл процесът се повтаря и броят на копията се удвоява. След около 30-35 цикъла и няколко часа се образуват повече от милион копия на таргетната ДНК.

Трите стъпки се демонстрират със следната схема:



След последния цикъл температурата от 72°C се поддържа 5-10 минути, за да се завършат веригите, които не са били напълно елонгирани. В случай, че пробите ще бъдат подлагани на допълнителен анализ скоро, уредът ги съхранява при 4°C. Ако анализът ще е по-късно, тогава пробите трябва да се съхраняват при -20 °C във фризер.

За по-добро осмисляне на новия материал се представя графичното изображение на циклите.



Урокът завършва с показване на видеоклип за придобиване на по-реална представа за спецификата и същността на метода. В учебната програма са планирани посещения на научни лаборатории в университета, където има PCR апарати и има възможност студентите нагледно да придобият представа за метода след демонстрация на въвеждане на програма и стартиране на процеса. При желание на по-напредналите и заинтересовани студенти се осигурява участие в кръжоци за експериментална работа към катедрите по Химия и по Биология.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В края на урока студентите придобиват нови знания и усвояват спецификата на полимеразната верижна реакция. Те разбират за огромния принос към науката на този иновационен метод и колко важен е той за диагностицирането на различни заболявания и своевременното вземане на мерки за правилното им лечение. Интердисциплинарността на метода позволява по-доброто усвояване на новата материя и затвърдяването на

новите знания. Придобивайки първоначална представа за PCR, студентите изграждат своеобразна основа, която им помага за надграждането на знанията в по-горните курсове, където им предстои по-детайлизирано изучаване и практическо прилагане на технологиите.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Alizadeh Z, Mahami-Oskouei M, Spotin A, Kazemi T, Ahmadpour E, Cai P, Shanehbandi D, Shekari N, (2019), „Parasite-derived microRNAs in plasma as novel promising biomarkers for the early detection of hydatid cyst infection and post-surgery follow-up“, *Acta Trop.* 2019 Nov 1:105255. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105255.
- Bahia W, Soltani I, Haddad A, Radhouani A, Mahdhdhi A, Ferchichi S, Almawi WY, (2019), „Links between SNPs in *TLR-2* and *TLR-4* and idiopathic recurrent pregnancy loss.“, *Br J Biomed Sci.* 2019 Nov 4.
- Castillo-Rodríguez L, Ovalle-Bracho C, Díaz-Jiménez D, Sánchez-Vanegas G, Muvdi-Arenas S, Castañeda-Orjuela C, (2019), „Cost-effectiveness analysis of Mucosal Leishmaniasis diagnosis with PCR-based vs parasitological tests in Colombia.“, *PLoS One.* 2019 Nov 4;14(11):e0224351.
- Li JX, Jong-Yul R, Won-Li P, Piao W, Jin GJ, Wu ZG, Song ZH, Quan SH, Piao GM, Song H, Shin-Hyeong C, (2019), „Investigation and research on ticks carrying spotted fever group rickettsia in the border area of Tumen River Basin“, *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2019 Nov 6;53(11):1130-1135.
- Macchiaverna NP, Enriquez GF, Bua J, Fernández MP, Sartor PA, Gürtler RE, Cardinal MV.(2019), „Human infectiousness and parasite load in chronic patients seropositive for *Trypanosoma cruzi* in a rural area of the Argentine Chaco“, *Infect Genet Evol.* 2019 Nov 1:104062.
- Nejo YT, Olaleye DO, Odaibo GN, (2019), „Molecular characterisation of genital human papillomavirus among women in Southwestern, Nigeria“, *PLoS One.* 2019 Nov 4;14(11):e0224748.
- Raafat R. I, Eshra K.A, El-Sharaby R.M, Eissa R, Saied S.M, Amer I, El Sharawy S.(2019), „Apa1 (rs7975232) SNP in the vitamin D receptor is linked to hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus cirrhosis“, *Br J Biomed Sci.* 2019 Nov 4.
- Sambrook, J., Russell, W. D., (2001). „Molecular cloning: a laboratory manual“, 3rd. ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, c2001.
- Shahi SK, Zarei K, Guseva NV, Mangalam AK, (2019), „Microbiota Analysis Using Two-step PCR and Next-generation 16S rRNA Gene Sequencing“, *J Vis Exp.* 2019 Oct 15;(152).
- Shampo, M. A.; Kyle, R. A. (2002). "Kary B. Mullis – Nobel Laureate for procedure to replicate DNA". *Proceedings. Mayo Clinic.* 77 (7): 606.
- Wade, Nicholas (September 15, 1998), "Scientist at Work/Kary Mullis; After the 'Eureka', a Nobelist Drops Out", *The New York Times*
- Zhao Z, Malhotra A, Seng WY, (2019), „Curcumin Modulates Hepatocellular Carcinoma by Reducing UNC119 Expression“, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2019;38(3):195-203.
- Zhang J, Xu Y, Ling X, Zhou Y, Lin Z, Huang Z, Guan H, Xiao Y, Xu W, Kan B. (2019), “Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis”, *Mol Cell Probes.* 2019 Nov 1:101477. doi: 10.1016/j.mcp.2019.101477.