

УДК 543.426; 543.9

© Ю. В. Белов, А. И. Петров, В. В. Лавров, В. Е. Курочкин

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

В статье выполнен практический анализ погрешностей количественных измерений методом ПЦР-РВ при различных методах расчета порогового цикла. Результаты ПЦР испытательных образцов получены на анализаторах нуклеиновых кислот АНК-32 и АНК-64, разработанных в ИАП РАН. Выявлены вклады различных составляющих погрешностей при измерениях. Даны рекомендации по оптимизации количественных измерений.

Кл. сл.: ПЦР в реальном времени, ДНК, пороговый цикл, количественные измерения

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) является наиболее современным методом детекции нуклеиновых кислот. В основе метода ПЦР-РВ лежит наблюдение интенсивности сигналов флуоресценции в ходе реакции. Полученные данные используются для расчета значения порогового цикла C_t — величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать образцы между собой. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше значение порогового цикла. Количественные измерения, проводимые с помощью ПЦР-РВ, отличает рекордно низкий коэффициент вариации и наиболее широкий линейный диапазон, что позволяет рассматривать данный метод в качестве приоритетного метода определения концентрации ДНК/РНК в исследуемых пробах. Однако до сих пор количественные измерения нуклеиновых кислот не имеют метрологического обеспечения. Поэтому серийные приборы аттестуются по косвенным параметрам: проверяется погрешность установки температуры и чувствительность. В настоящей статье на примере анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32 и АНК-64, которые серийно выпускаются ИАП РАН и для которых разработано новое программное обеспечение, выполнен экспериментальный анализ погрешностей количественных измерений.

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ РАСЧЕТА ЗНАЧЕНИЯ ПОРОГОВОГО ЦИКЛА

Накопление продуктов ПЦР и рост интенсивности сигналов флуоресценции в ходе реакции можно разделить на три фазы:

– экспоненциальную фазу, при которой, если предположить максимальную эффективность реакции, наблюдается удвоение продукта при каждом цикле;

– линейную фазу, при которой эффективность реакции снижается; но наблюдается максимальный рост интенсивности сигналов флуоресценции;

– фазу насыщения (плато), при которой реакция прекращается, затем продукты PCR начинают постепенно разлагаться.

Поскольку график интенсивности сигналов флуоресценции носит ступенчатый характер (1 точка за цикл), то для повышения точности расчетов порогового цикла необходимо использовать аппроксимацию. Поэтому методы расчета значения порогового цикла предлагается разделить на две основные группы:

1) методы кусочно-линейной аппроксимации по двум точкам;

2) методы аппроксимации по нескольким точкам.

Примером метода первой группы может служить метод порога [1]. Обычно порог выбирается пользователем на экспоненциальной фазе роста, например на уровне от 3 до 5 % от максимального значения флуоресценции, до этого уровня график роста флуоресценции в логарифмическом масштабе линеен. Значение на горизонтальной оси графика, при котором флуоресценция совпадает с порогом, называется пороговым циклом C_t [2].

Примером метода второй группы может служить метод кинетической модели на базе монотонной нелинейной S-образной функции класса сигмоид [3].

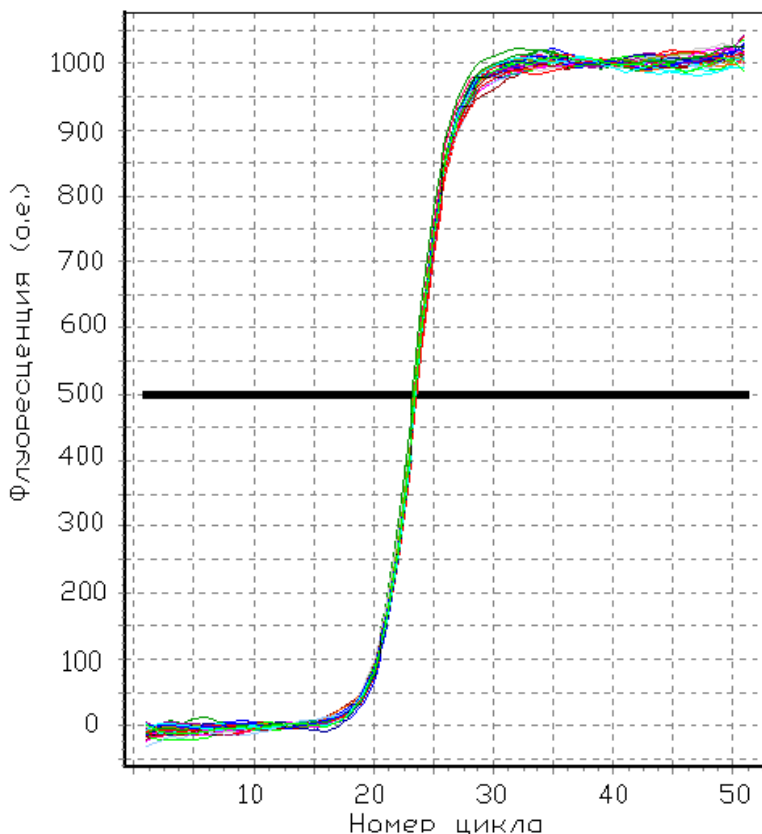


Рис. 1. Графики зависимости флуоресценции от номера температурного цикла. Значения порогового цикла C_T при пороге 500 о.е. приблизительно равны 23.5

ПОЛУЧЕНИЕ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ ДЛЯ РАСЧЕТА ПОРОГОВОГО ЦИКЛА

Для количественного определения пороговых циклов с помощью анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32 и АНК-64 была проведена ПЦР в реальном времени экспериментальных образцов (ЗАО "Синтол", Москва) [4, 5]. ПЦР в реальном времени проводилась в пробирках 0.2 мл, содержащих 23 мкл реакционной смеси и 2 мкл очищенной ДНК. Состав реакционной смеси был описан нами ранее [6]. ПЦР в реальном времени проводилась при следующем термальном профиле: прогрев при 95 °С в течение 300 с, затем следовало 50 циклов денатурации при 95 °С в течение 25 с и отжига при 60 °С в течение 20 с.

В качестве примера результата эксперимента на рис. 1 приведены графики зависимости флуоресценции ксантенового красителя карбоксифлуоресцеина (FAM) от номера температурного цикла для одинаковых экспериментальных образцов (31 шт.) с условным номером "100604" после выполнения операций сглаживания, привязки к нулю и к максимуму на уровне 1000 относительных единиц (о.е.).

ПОГРЕШНОСТИ РАСЧЕТА ПОРОГОВОГО ЦИКЛА

Программное обеспечение анализаторов АНК позволяет рассчитать пороговые циклы методом порога, методом с использованием точки перегиба, методом на базе S-образной функции, а также методом аппроксимации по всем точкам графика.

Сравнение погрешностей пороговых циклов, рассчитанных разными методами, было выполнено при анализе результатов ПЦР двух серий образцов с условными номерами "100604" и "141514" (количество образцов 31 и 32 шт.). Исходные данные были получены соответственно на анализаторах АНК-32 и АНК-64 при нижней температуре цикла 60 °С и верхней температуре цикла 95 °С.

Оценка погрешности измерения выполнялась путем расчета значений стандартного отклонения s пороговых циклов. Стандартное отклонение s связано с более известным среднеквадратическим отклонением σ и вычисляется по формуле

$$s = \sqrt{\frac{n}{n-1}} \sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2},$$

где x_i — значение порогового цикла в i -й пробирке; \bar{x} — среднее арифметическое значение пороговых циклов; n — общее количество пробирок. Известно, что вероятность попадания случайной величины в диапазон $\pm\sigma$ равна 68.2 %. При большом количестве пробирок стандартное и среднеквадратическое отклонения практически совпадают.

В табл. 1 приведены погрешности пороговых циклов s образцов, вычисленных разными методами. Погрешности пороговых циклов в табл. 1

и последующих таблицах вычислены как отношение к одному циклу; например, $s = 0.08$ соответствует 8 % от 1 цикла.

Если принять максимально возможную эффективность $E = 2$ (изменение концентрации фрагментов ДНК за 1 цикл), то при погрешности цикла $s = 0.08$ можно определить погрешность вычисления концентрации ДНК следующим способом:

$$\Delta = 2^{0.08} - 2^0 = 0.057, \text{ или } 5.7 \%$$

Табл. 1. Погрешности пороговых циклов s образцов, вычисленных разными методами

№ образца / температура наблюдения	Метод порога, 50 о.е.	Метод порога, 500 о.е.	S-образная функция	Точка перегиба, 500 о.е.	Аппроксимация по всем точкам
100604 / 60 °C	0.139	0.080	0.079	0.076	0.093
100604 / 95 °C	0.321	0.066	0.065	0.092	0.120
141514 / 60 °C	0.432	0.088	0.063	0.096	0.108
141514 / 95 °C	0.282	0.067	0.064	0.087	0.095

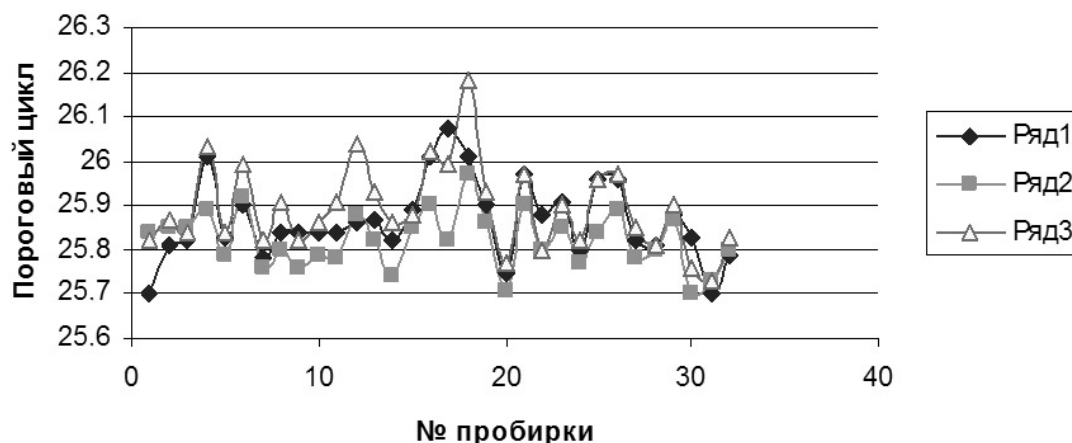


Рис. 2. Значения пороговых циклов образцов.

Ряд1 — метод порога на уровне 500, ряд2 — метод на базе S-образной функции, ряд3 — метод точки перегиба на уровне 500

Сравнивая полученные данные, можно сделать вывод, что погрешности пороговых циклов, вычисленных методом на базе S-образной функции, а также методами порога и точки перегиба на уровне 500 о.е., имеют наименьшие значения. Метод аппроксимации по всем точкам и метод порога на уровне 50 о.е. имеют заметно большие погрешности. Такие результаты можно объяснить влиянием шумов и нестабильности нулевой линии при измерении флуоресценции от каждой пробирки (влияние шумов минимально вблизи точки перегиба, где график имеет максимальный наклон).

На рис. 2 показаны значения пороговых циклов образцов "141514", вычисленных разными методами. Для наглядности точки графиков соединены линиями. У некоторых образцов изменения пороговых циклов частично совпадают, поэтому такие изменения можно объяснить разбросом свойств реакционной смеси в разных пробирках и нерав-

номерностью теплового поля термостата анализатора.

Влияние случайных величин на результаты вычислений уменьшается, если усреднить исходные величины пороговых циклов для каждого образца (средняя арифметическая величина — полусумма), полученные при нижней температуре цикла 60 °С и при верхней температуре цикла 95 °С. Такие результаты приведены в табл. 2.

Если предположить, что разброс пороговых циклов вызван случайными причинами, то можно предложить исключать из расчета стандартного отклонения самые крайние значения (максимальные и минимальные), считая их случайными выбросами. При этом стандартное отклонение уменьшается примерно на 10 % (для образца "141514" и температуре наблюдения 60 °С при методе порога 500 о.е. $s = 0.077$, при S-образной функции $s = 0.055$).

Табл. 2. Результаты усреднения погрешностей исходных величин пороговых циклов для каждого образца (полусумма), полученных при нижней температуре цикла 60 °С и при верхней температуре цикла 95 °С

№ образца / температура наблюдения	Метод порога, 500 о.е.	S-образная функция	Точка перегиба, 500 о.е.	Метод порога, 500 о.е. (полусумма)	S-образная функция (полусумма)	Точка перегиба, 500 о.е. (полусумма)
100604 / 60 °С	0.080	0.079	0.076	0.066	0.066	0.074
100604 / 95 °С	0.066	0.065	0.092			
141514 / 60 °С	0.088	0.063	0.096	0.057	0.047	0.085
141514 / 95 °С	0.067	0.064	0.087			

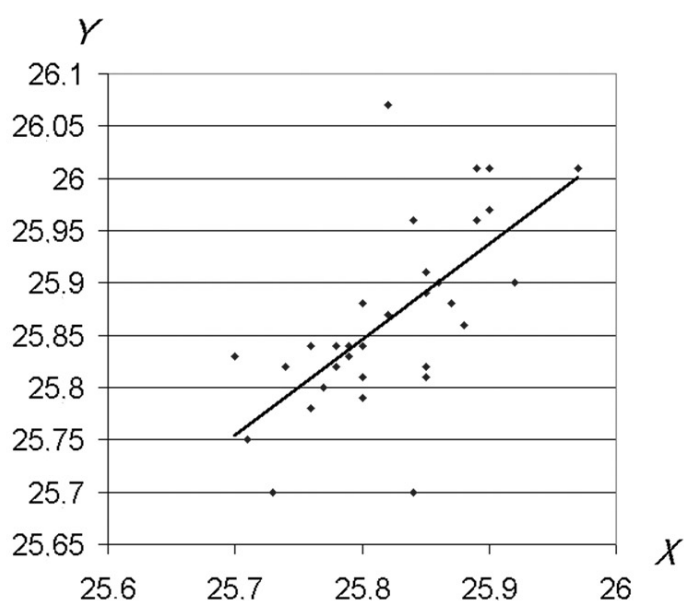


Рис. 3. Точечный график пороговых циклов с линией тренда

ОЦЕНКА РАЗБРОСА СВОЙСТВ РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ В РАЗНЫХ ПРОБИРКАХ

Погрешность за счет разброса свойств реакционной смеси в разных пробирках можно приблизительно оценить с помощью коэффициента корреляции R , который представляет собой меру линейной зависимости двух переменных величин.

На рис. 3 приведен точечный график пороговых циклов всех образцов "141514"; при этом координата X — значение порогового цикла, вычисленного методом на базе S-образной функции, а координата Y — значение порогового цикла, вычисленного методом порога на уровне 500 о.е. Добавлена линия тренда, найдены коэффициенты линейного уравнения регрессии $Y = AX + B = 0.918 X + 2.17$ и коэффициент корреляции $R = 0.658$. Принято считать, что при $R = 0.3-0.7$ между двумя переменными наблюдается средняя линейная связь [7].

На рис. 3 можно выделить два направления, которые можно представить как новую систему координат. Смещения значений пороговых циклов вдоль линии тренда определяется совпадающими, а смещения в ортогональном направлении — отличающимися вкладами в погрешность пороговых циклов. Видно, что основной массив точек вытянут в направлении линии тренда. На этом основании можно сделать вывод о том, что значительная часть погрешности не зависит от метода расчета пороговых циклов и определяется разбросом свойств реакционной смеси в разных пробирках. Этот вывод подтверждается результатами расчетов, приведенными в табл. 3.

В столбце 4 табл. 3 вычислены погрешности после усреднения исходных пороговых циклов каждой пробирки (полусумма), полученных методом порога 500 о.е. и методом S-образной функции. В столбце 5 табл. 3 вычислены погрешности после вычитания исходных пороговых циклов каждой пробирки (разность), полученных методом порога 500 о.е. и методом S-образной функции.

Таким способом удается разделить вклады различных составляющих погрешностей при измерениях пороговых циклов. При близких значениях пороговых циклов, вычисленных разными методами, погрешность в основном определяется разбросом свойств реакционной смеси в разных пробирках (образцы "100604"), а при значительном различии пороговых циклов, вычисленных разными методами, уже заметны вклады погрешностей методов расчета пороговых циклов (образцы "141514").

Количественный анализ обычно выполнялся методом сравнения измерительных образцов и калибровочных образцов с известной концентрацией специфических фрагментов ДНК. Поэтому погрешности измерения пороговых циклов этих образцов должны суммироваться как случайные погрешности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена классификация методов расчета пороговых циклов по способам аппроксимации.

Приведены условия проведения ПЦР в реальном времени на анализаторах АНК-32 и АНК-64

Табл. 3. Разделение вкладов различных составляющих погрешностей при измерениях пороговых циклов

№ образца / температура наблюдения	Метод порога, 500 о.е.	S-образная функция	Метод порога, S-образная функция (полусумма)	Метод порога, S-образная функция (разность)
1	2	3	4	5
100604 / 60 °С	0.080	0.079	0.079	0.009
141514 / 60 °С	0.088	0.063	0.069	0.033

и выполнено экспериментальное сравнение погрешностей пороговых циклов путем вычисления стандартного отклонения. Показано, что погрешности расчета пороговых циклов, вычисленных методом на базе S-образной функции, а также методами порога и точки перегиба на уровне 500 о.е., имеют наименьшие значения.

Предложена методика оценки разброса свойств реакционной смеси в разных пробирках с помощью коэффициента корреляции и вычисления совпадающих и отличающихся вкладов в погрешности разных методов расчета пороговых циклов.

Показана возможность уменьшения погрешности вычисления пороговых циклов при использовании для каждого образца результатов, полученных при нижней температуре цикла 60 °С и при верхней температуре цикла 95 °С, путем исключения случайных выбросов, а также путем объединения результатов разных методов расчета.

Результаты приведенных экспериментов и расчетов подтверждают высокие технические характеристики анализаторов АНК-32 и АНК-64 и их программного обеспечения. Экспериментальное сравнение погрешностей выполнено при реальных малых объемах пробы (2мкл) и реактивов (23мкл).

Авторы выражают благодарность Антоновой О.С. за подготовку и проведение ПЦР-анализов и помощь при оформлении статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29, N 9. e45.
2. Hunt M. Real time PCR. URL: (<http://pathmicro>.

med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm).

3. Rutledge R.G., Stewart D. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. URL: (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/47>).
4. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // *Научное приборостроение.* 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136.
5. Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье тест-системами производства ЗАО "Синтол". Методические рекомендации МР № 02.008-06. Москва, 2006.
6. Антонова О.С., Корнева Н.А., Цыганков А.М., Белов Ю.В. и др. Оценка двух принципиальных подходов к разработке системы автоматизированного выделения нуклеиновых кислот // *Технологии живых систем.* 2010. Т. 7, № 3. С. 47–52.
7. Попов А. Excel: Практическое руководство. М.: ДЕСС КОМ, 2001. 302 с.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Контакты: Белов Юрий Васильевич,
Bel3838@mail.ru

Материал поступил в редакцию 5.08.2010.

OPTIMISATION OF RT-PCR NUCLEIC ACID QUANTITATIVE ANALYSIS

Yu. V. Belov, A. I. Petrov, V. V. Lavrov, V. E. Kurochkin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The practical analysis of quantitative measurement errors was realized by RT-PCR at various methods of threshold cycle calculation. The threshold cycle values were obtained on analyzers of nucleic acids АНК-32 and АНК-64, developed in St.-Petersburg Institute for Analytical Instrumentation RAS. Effects of various errors in threshold cycle measurements are discussed. Recommendations on optimization of quantitative measurements are given.

Keywords: real-time PCR, DNA, threshold cycle, quantitative analysis