

УДК 543.426; 543.9

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

ДВУХКОМПОНЕНТНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПЦР-АНАЛИЗ

Рассмотрены методические особенности и предложен способ моделирования двухкомпонентного ПЦР-анализа. Выполнено сравнение трех способов определения порогового цикла при двухкомпонентных ПЦР-анализах. Определены зависимости погрешностей измерения от разности пороговых циклов измерительного и соседнего каналов. Показано преимущество аппроксимации двухкомпонентного сигнала предложенной нами ранее усовершенствованной моделью на основе сигмоидальной функции с 6 параметрами.

Кл. сл.: ПЦР в реальном времени, ДНК, пороговый цикл, сигмоидальная функция

ВВЕДЕНИЕ

При разработке анализаторов нуклеиновых кислот на основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени актуальны проблемы уменьшения погрешностей количественных анализов ДНК.

В работе [1] был выполнен практический анализ погрешностей количественных измерений при различных способах расчета порогового цикла. Выявлены вклады различных составляющих погрешностей при количественных измерениях. В статьях [2–4] выполнено моделирование сигналов ПЦР, проведено сравнение эффективности различных способов фильтрации шумов и аппроксимации сигналов, а также предложен способ устранения влияния дрейфа нулевой линии на результаты измерений.

В данной работе рассмотрены особенности сигналов флуоресценции при двухкомпонентном ПЦР-анализе и выполнено их моделирование. Определены зависимости погрешностей измерения от разности пороговых циклов измерительного и соседнего каналов. Выполнено сравнение трех способов определения порогового цикла.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДВУХКОМПОНЕНТНОГО ПЦР-АНАЛИЗА

В основе метода ПЦР в реальном времени лежит наблюдение интенсивности сигналов флуоресценции в ходе реакции. Эти сигналы используются для расчета значения C_t порогового цикла — величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать образцы между собой. Многокомпонентный ПЦР-анализ применяется с целью обеспечения одновременного выполнения двух и более типов анализа в одной пробирке и позволяет снизить затраты на проведение ПЦР [5].

Двухкомпонентный ПЦР-анализ используется для относительного определения количества фрагментов ДНК, когда один набор (праймер / зонд) используется для амплификации исследуемого фрагмента ДНК, а другой набор (праймер / зонд) — для амплификации другого исследуемого фрагмента ДНК или внутреннего контроля в одной пробирке.

В современных приборах для ПЦР в реальном времени предусмотрены варианты детекции сигналов флуоресценции нескольких красителей одновременно [5, 6]. Для этого приборы заранее настраиваются на детекцию сигнала при максимальной флуоресценции каждого красителя. Каналы обычно называют по названию красителя, максимум которого они детектируют.

Самые распространенные варианты многокомпонентного ПЦР: два канала — FAM и HEX; три канала — FAM, HEX и Cy5; четыре канала — FAM, HEX, ROX и Cy5.

Каналы выбираются таким образом, чтобы детектировать сигнал основного красителя и уменьшить мешающие сигналы других красителей, спектральные характеристики которых значительно различаются. Например, при количественном определении генетически модифицированных организмов (ГМО) используется двухкомпонентный ПЦР-анализ, когда одновременно проводятся две независимые реакции в одной пробирке [7].

Одна реакция позволяет обнаружить ДНК анализируемого растения (соя, кукуруза и т. п.), при этом используется зонд, меченный красителем R6G. Другая реакция позволяет обнаружить по следовательность, специфичную для конкретной линии генетически модифицированного растения. Для этого используется зонд, меченный красителем FAM или ROX.

При проведении двухкомпонентного анализа концентрация праймеров в реакционной смеси

должна быть ограничена, чтобы исключить возможность конкурентной ПЦР, которая может изменить величину порогового цикла фрагмента ДНК с меньшей концентрацией. В методическом руководстве [5] приведен пример влияния изменения концентраций праймеров двухкомпонентного анализа на величину порогового цикла C_t . Обозначенная область концентраций праймеров, при которых величина C_t изменяется незначительно (в приведенном примере диапазон изменения $C_t = 25.5-26$), соответствует диапазону концентраций праймеров (50–90) нМ. Для обеспечения регистрируемых сигналов на достаточно высоком уровне рекомендуется также оптимизировать уровни концентрации зондов.

Если красители, например FAM и VIC [8, 9], флуоресцируют в близких диапазонах, прибор будет считывать спектральные компоненты этих красителей в пропорциях, которые определяются перекрытием спектров флуоресценции красителей и избирательностью оптических фильтров. При этом наблюдается заметное (до 10 %) прохождение мешающих сигналов от соседних оптических каналов.

ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОЙ ОБРАБОТКИ СИГНАЛОВ ДВУХКОМПОНЕНТНОГО ПЦР-АНАЛИЗА

Для оценки влияния сигналов соседних каналов на погрешности измерения пороговых циклов

предлагается использовать модель сигналов ПЦР в реальном времени, реализованную на основе сигмоидальной (S-образной) функции (СФ). В работе [4] показано, что модель СФ наилучшим способом аппроксимирует реальные сигналы ПЦР. Предложенная авторами усовершенствованная модель для обработки сигналов позволяет практически полностью устранить влияние шумов и других дестабилизирующих факторов (дрейфа нулевой линии детектора).

Можно предположить, что такая модель уменьшит погрешности измерения параметров ПЦР при одновременном использовании двух красителей. Для построения модельных сигналов СФ в двух каналах использованы аналитическая форма и методика расчета, приведенные в статьях [3, 4]:

$$F = F_m / (1 + \exp((C_0 - C) / k)) + f_0 + f_1 \cdot C + f_2 \cdot C^2, \tag{1}$$

где F — интенсивность флуоресценции, измеряется в относительных единицах флуоресценции (о. е.); F_m — максимальное изменение интенсивности флуоресценции в конце реакции; C — порядковый номер цикла амплификации; C_0 — дробный номер цикла, при котором интенсивность флуоресценции достигает половины значения F_m ; k — коэффициент, который определяется наклоном кривой; f_0 — смещение нулевой линии (фон детектора).

Электронная таблица параметров моделей СФ

Номер ячейки	Номер цикла	A	B	C	D
4	–	$C_0 =$	23.5	13.5	23.38
5	–	$F_m =$	1000	100	987.85
6	–	$k =$	1.39	1.39	1.43
7	–	$f_0 =$	0	0	-32.78
8	–	$f_1 =$	0	0	7.60
9	–	$f_2 =$	0	0	-0.10
10	–	$S_k =$	0	0	6551.06
11...60	1...50	$F_{1...F_{50}}$

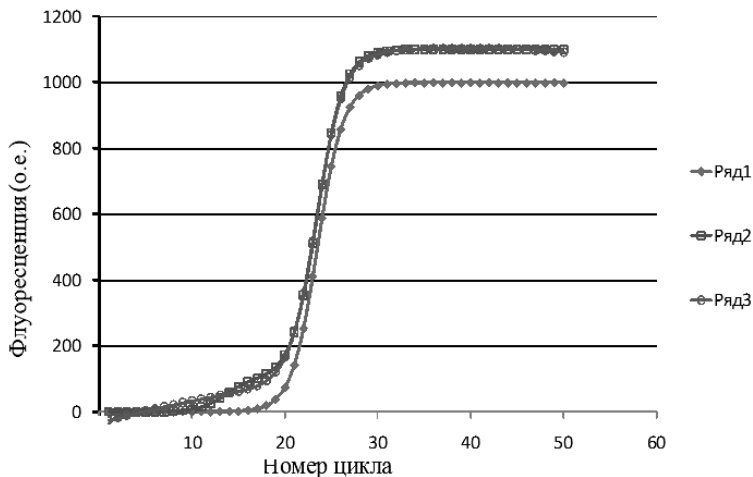


Рис. 1. Зависимости модельных сигналов флуоресценции от номера температурного цикла с параметрами, приведенными в таблице. Ряд 1 — модельный сигнал с параметрами в столбце В. Ряд 2 — сумма модельных сигналов с параметрами в столбцах В и С. Ряд 3 — сигнал СФ с оптимизированными параметрами в столбце D

Традиционное выражение модели СФ [10] дополнено нами еще двумя слагаемыми

$$f_1 \cdot C + f_2 \cdot C^2.$$

Коэффициент f_1 определяется линейным дрейфом нулевой линии, а коэффициент f_2 учитывает квадратичную составляющую дрейфа нулевой линии. В статье [3] было показано, что дробный цикл C_0 можно принять в качестве величины порогового цикла C_i реального сигнала ПЦР.

Вычисления модельных сигналов СФ выполнялись с помощью электронной таблицы Excel (см. таблицу).

1. В ячейках В11:В60 вычислялась интенсивность флуоресценции F исходной однокомпонентной модели СФ по формуле (1) с параметрами, приведенными в ячейках В4:В9, как зависимость от номера цикла C (рис. 1, ряд 1).

2. В ячейках С11:С60 вычислялась однокомпонентная модель СФ с параметрами, расположенными в ячейках С4:С9.

3. В ячейках D11:D60 вычислялась модель СФ с первоначальными параметрами в ячейках D4:D9, аналогичными параметрам в ячейках В4:В7.

В ячейках E11:E60 вычислялась сумма однокомпонентных модельных сигналов с интенсивностями 1000 и 100 о.е. при заданных величинах C_0 , равных 23.5 и 13.5. Эта сумма принята в качестве модельного сигнала двухкомпонентного ПЦР-анализа, при этом модельный сигнал 100 о.е. является аналогом 10 % помехи от соседнего спектрального канала.

Сигналы ошибки получались в ячейках F1:F60 в результате вычитания модельного двухкомпонентного сигнала в ячейках E11:E60 из модельного сигнала D11:D60. Значение величины S_k вычислялось в ячейке D10 как сумма квадратов сигналов ошибки.

Оптимизированные параметры сигмоидальной функции в ячейках D4:D9 получены в результате аппроксимации двухкомпонентного сигнала однокомпонентным сигналом в столбце D путем достижения условий минимального значения величины S_k по методу наименьших квадратов ошибки при использовании опции "Поиск решения" из меню "Данные". Для этого выполнялись следующие действия: "Установить целевую ячейку D10", "Равной минимальному значению", "Изменяя ячейки D4:D9" и "Выполнить".

На рис. 1 приведены графики модельных сигналов. Оптимизированный сигнал СФ с параметрами в столбце D хорошо совпадает с суммой модельных сигналов с параметрами в столбцах В и С. Видно, что помеха из соседнего светового канала аппроксимируется наклоном нулевой линии, при этом коэффициенты f_1 и f_2 в таблице (столбец D) не равны нулю.

Разность между оптимизированной величиной порогового цикла C_0 в столбце D и исходной величиной в столбце В является погрешностью измерения, которая возникает за счет влияния 10 % помехи от сигналов соседнего светового канала (столбец С). Оказалось, что эта погрешность сильно зависит от разности величин C_0 измерительного сигнала в столбце В и сигнала помехи в столбце С.

На рис. 2 приведены результаты вычисления пороговых циклов C_0 измерительного канала при действии помехи в виде 10 % сигналов соседнего светового канала. Помеха из соседнего светового канала вызывает погрешность измерения порогового цикла измерительного канала (отличие от номинального значения 23.5). Можно отметить, что графики имеют три области погрешности измерения в зависимости от величин C_0 соседнего светового канала.

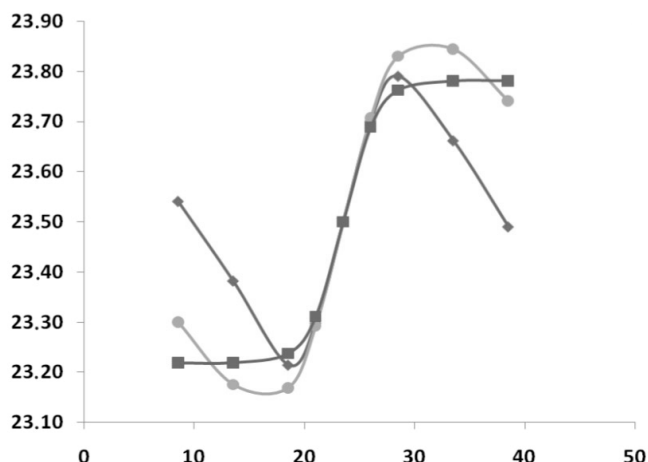


Рис. 2. Зависимость порогового цикла C_0 измерительного канала при действии помехи в виде 10 % сигналов соседнего светового канала. По ординате — величины C_0 измерительного канала. По абсциссе — величины C_0 соседнего канала.

В центральной области (23.5 ± 5) единиц температурного цикла графики сигналов флуоресценции двух каналов частично или полностью совпадают, при этом погрешность измерения увеличивается при увеличении расстройки. Максимальная погрешность измерения — порядка ± 0.3 ед. пороговых циклов — наблюдается при разности ± 5 ед. температурных циклов.

В левой и правой областях графиков при разности более ± 5 ед. пороговых циклов графики при разных способах определения величин C_0 сильно различаются. Погрешность измерения при использовании для обработки сигналов с помощью усовершенствованной модели СФ (ряд 1) меньше, чем при использовании традиционной модели (ряд 2) СФ и метода порога на уровне 50 % (ряд 3) максимального значения суммарного сигнала флуоресценции.

На основании дополнительных расчетов были получены следующие результаты.

– При выборе порога на более низком уровне максимальная погрешность измерения увеличивается. Например, при пороге на уровне 25 % от максимального значения суммарного сигнала флуоресценции максимальная погрешность увеличивается в 1.5 раза.

– При уменьшении величины флуоресценции помехи погрешность измерения пропорционально уменьшается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен способ моделирования сигналов двухкомпонентного ПЦР-анализа.

Выполнено сравнение трех способов определения порогового цикла при двухкомпонентных ПЦР-анализах.

Определены зависимости погрешностей изме-

рения от разности пороговых циклов измерительного и соседнего каналов.

Показано преимущество аппроксимации двухкомпонентного сигнала предложенной нами ранее усовершенствованной моделью на основе сигмоидальной функции с 6 параметрами.

Результаты приведенных расчетов могут быть применены пользователями при выборе оптимального способа определения порогового цикла при работе на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32, который серийно выпускается в ИАП РАН [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 1. С. 44–49.
2. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е. Изучение влияния шумов детектора на погрешности количественных анализов нуклеиновых кислот на приборах ПЦР-РВ // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 2. С. 27–33.
3. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е. Оптимизация параметров сигмоидальной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 3. С. 130–134.
4. Белов Ю.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Исследование погрешностей моделирования сигмоидальной функцией сигналов полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 4. С. 28–34.
5. Приборы для проведения ПЦР с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени (real time PCR). Applied Biosystems 7900HT Real Time PCR System и др. Общее методическое руководство. URL: (http://spt.by/images/stories/AB_info/7300_7500_Chemistry_guide_rus.pdf).

6. Справочная информация ООО "ДНК-Синтез". Красители для ПЦР в реальном времени. URL: (<http://www.oligos.ru/spravka-krasiteli-tushiteli.html>).
7. Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в продуктах питания и пищевом сырье тест-системами производства ЗАО "Синтол". Методические рекомендации МР № 02.008 - 06. Москва. 2006 г.
8. *Вэйгхардт Ф.* Количественный ПЦР-анализ для детекции ГМО. Сессия 10. Всемирная Организация Здравоохранения. Европейское Региональное Бюро. URL: (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/docs-manual-RUS.htm>).
9. Главный государственный санитарный врач Российской Федерации. Постановление от 30 ноября 2007 года № 80. О надзоре за оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО. Приложение 2. МУК 4.2.2304-07 "Методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов растительного происхождения". Количественный анализ методом ПЦР в реальном времени.
10. *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>).
11. *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.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург*

Контакты: *Белов Юрий Васильевич,*
bel3838@mail.ru

Материал поступил в редакцию 14.08.2012

TWO-COMPONENT QUANTITATIVE PCR ANALYSIS

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

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg

The methodical peculiarities were considered and a method of modeling of two-component PCR analysis was proposed. A comparison of three ways of threshold cycle determination at two-component PCR analyses was performed. The dependencies of measurement errors on account of the threshold cycles difference of measuring and neighboring channels were determined. The advantage of two-component signal approximation offered by us in earlier improved model on the base of sigmoid function with 6 parameters is shown.

Keywords: real-time PCR, DNA, threshold cycle, sigmoid function