

УДК 57.088; 543.9

© А. А. Евстапов, А. Л. Буляница, Г. Е. Рудницкая, Т. А. Лукашенко,  
А. Н. Тупик, А. И. Цымбалов, Н. А. Есикова, Я. С. Посмитная

## ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ κДНК ОНКОМАРКЕРОВ СК-19 МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА МИКРОФЛЮИДНОМ ЧИПЕ

Продемонстрирована принципиальная возможность реализации полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на микрофлюидном устройстве. Актуальной задачей является экспрессная оценка качества проводимой ПЦР. В работе показана возможность решения этой задачи при электрофоретическом анализе продуктов ПЦР на микрофлюидном чипе. В качестве объекта исследования выбран онкомаркер цитокератин-19 (СК-19). Предложены способы обработки электрофоретического информативного сигнала и сделаны выводы, касающиеся качества ПЦР и особенностей проведения электрофореза на микрофлюидном чипе. Обсуждаются перспективные задачи, решение которых может основываться на результатах проведенных исследований.

*Кл. сл.:* полимеразная цепная реакция в реальном времени, электрофоретический анализ, цитокератин, микрофлюидный чип, информативный сигнал

### ВВЕДЕНИЕ

В 2011 г. на совещании экспертов ВОЗ обсуждались приоритетные меры по сокращению смертности от онкологических заболеваний, а именно широкомасштабное внедрение скрининговых программ для выявления предраковых нарушений или онкологических заболеваний на ранней стадии развития [1].

По данным Госкомстата в Российской Федерации в последние годы наблюдается рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) среди женщин. Так, в 2010 г. число пациентов с впервые установленным диагнозом РМЖ составило 57 200 (74.9 на 100 тыс. женского населения), а это — 20 % от общего числа женщин с впервые выявленным злокачественным образованием в том году [2]. Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в списке заболеваний, вызывающих ежегодную смертность от онкологических заболеваний среди женщин. Основной причиной летальных исходов у больных РМЖ является развитие рецидивов и отдаленных метастазов, ежегодно выявляемых в 30–40 % наблюдений. Ситуация осложняется тем, что среди вновь заболевших в 45 % наблюдений опухоль диагностируют на стадиях, когда радикальное лечение уже невозможно [3]. Вышеупомянутое определяет актуальность создания, развития и применения в клинической практике высокочувствительных методов диагностики онкологических заболеваний, позволяющих осуществить своевременное выявление первичного

заболевания, контроль минимального остаточного заболевания, а также проводить постпрофилактику — регулярные скрининги после окончания лечения. Одним из методов диагностики РМЖ является оценка содержания в периферической крови больных транскриптов цитокератина-19 (СК-19), одного из онкомаркеров, который считают специфичным для эпителиальных клеток. СК-19 экспрессируется в большинстве случаев заболевания РМЖ [4] и активно используется в исследованиях в данной области [5, 6].

Применение микрофлюидных устройств в приборостроении позволяет создавать приборы для анализа биологических проб, отличающиеся высокой скоростью определения искомого компонента, низким расходом реагентов, малыми габаритами и т. д., что является основой для создания эффективных систем для скрининга и диагностики онкологических заболеваний.

Постановка ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на микрофлюидных устройствах была осуществлена в лаборатории "Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем" Института аналитического приборостроения (ИАП РАН). Особенности реализации и основные результаты описаны ранее в работах [7, 8].

Однако по-прежнему актуальной остается оценка качества проведения ПЦР, т. к. одними из важных аналитических характеристик метода являются его чувствительность и специфичность. Известно, что аналитическая чувствительность

ПЦР-РВ составляет 10–100 клеток в пробе. В случае классической ПЦР чувствительность метода значительно ниже и лимитируется чувствительностью красителя. Например, использование красителя GelStar позволяет определять 20 пг двухцепочечной ДНК или 3 нг РНК [9]. Проведенная в зарубежных исследовательских центрах оценка диагностической чувствительности, т. е. доли пациентов с данным заболеванием, дающих истинно положительные результаты анализа, показала, что ПЦР обладает чувствительностью от 90 до 100 %. В частности, в работе [10] авторы приводят результаты, где ПЦР-РВ продемонстрировала чувствительность 90 %.

Специфичность определяется процентом здоровых людей, имеющих истинно отрицательные результаты анализа. Метод ПЦР обладает высочайшей специфичностью, что объясняется достаточностью определения только уникального фрагмента нуклеотидной последовательности и исключает перекрестные реакции антигенов. Кроме того, специфичность зависит от качества синтезированных праймеров и зондов.

Применение микрочиповых устройств для проведения ПЦР позволяет значительно сократить время анализа, уменьшить расход дорогостоящих реагентов и т. д. Однако при переходе к микро-размерным реакторам, в которых осуществляется ПЦР, предъявляются высокие требования к материалам и элементам конструкции микрочипа. Возникает необходимость контроля физико-химических свойств поверхности реакционных камер. Микрочиповые устройства также могут быть использованы для оперативного контроля и анализа полученных продуктов ПЦР, в частности для оценки качества проведения реакции амплификации. В этом случае перспективными являются микрофлюидные устройства для электрофоретических методов анализа. Таким образом, сочетание реакционной камеры для ПЦР и микроустрой-

ства для электрофореза амплифицированного продукта позволяет создать новую аналитическую микросистему для современных методов молекулярной диагностики. Интерпретация результатов ПЦР-РВ в большинстве случаев требует наличия тестовых объектов. В то же время последовательное проведение ПЦР-РВ и электрофореза может дать требуемую аналитическую информацию и обеспечить идентификацию объекта после соответствующего "обучения" системы при заданных режимах. При таком подходе для идентификации объекта достаточно определить время выхода и ширину аналитического пика. В данной работе представлены результаты а) постановки ПЦР-РВ по обнаружению СК-19 на приборе АНК-32 (ИАП РАН, Санкт-Петербург); б) постановки аналогичной реакции на микрочипе с реакционной камерой; в) исследования полученного продукта ПЦР на микрофлюидном чипе методом электрофореза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

### ПЦР в реальном времени

Образцы периферической крови (10 мл, в 3.8 % растворе натрия лимоннокислого 3-замещенного, цитрата натрия) пациентов с РМЖ были любезно предоставлены клиническими лабораториями Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все операции с кровью проводились в течение 72 ч после забора. Кровь хранилась при 4 °С.

РНК из образцов периферической крови выделяли набором ZR Whole-Blood RNA MiniPrep (Zymo Research) по протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим методом, отношение 260 / 280 нм для всех образцов составило 41.8. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с помощью фермента M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) по инструкции производителя [11]

**Табл. 1** Последовательности праймеров и зонда TaqMan (ООО ДНК-Синтез)

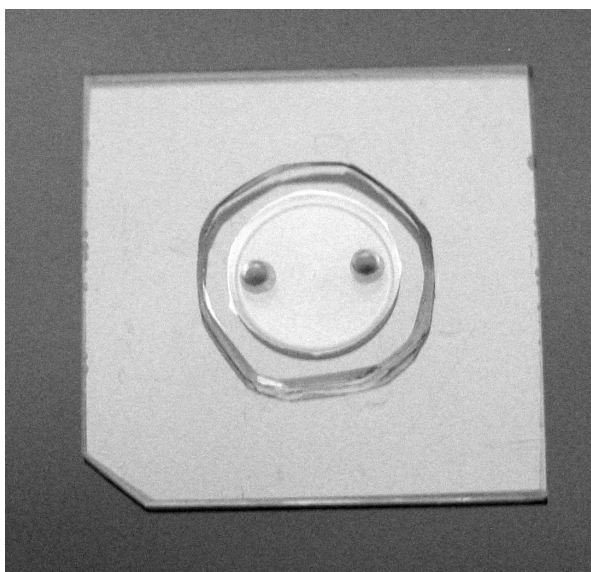
Наименование	5'-3' последовательность
Праймеры для фрагмента кДНК длиной 103 п. о.	
СК-19 for103	CCTGCGGGACAAGATTCTTG
СК-19 rev103	ATGACTTCCGAACCAAGTTTGAG
Праймеры для фрагмента кДНК длиной 210 п. о.	
СК-19 for210	CCTGCGGGACAAGATTCTTG
СК-19 rev210	GACCTGGAGATGCAGATCGAAG
Зонд	
Probe FAM	(FAM)-CCACCATTGAGAАCTCCAGGATTGTCC-(BHQ1)

Для приготовления реакционной смеси использовали стандартные наборы для ПЦР (№ М-428 по каталогу ЗАО СИНТОЛ, Москва), содержащие 2.5-кратную смесь для ПЦР (KCl, Трис-HCl (рН 8.8), MgCl<sub>2</sub>, дезоксинуклеозидтрифосфаты, Taq ДНК-полимераза, глицерол, Tween 20) и деионизированную воду. Основная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл 2.5-кратной реакционной смеси для ПЦР, по 2 мкл праймеров (финальная концентрация 0.4 мкМ) и зонда TaqMan (финальная концентрация 0.4 мкМ) и 7 мкл деионизированной воды.

В работе применяли два набора специфичных праймеров, позволяющих получить ПЦР-продукты длиной 103 или 210 пар оснований (далее п. о.). Праймеры и флуоресцентный зонд TaqMan были разработаны и синтезированы ООО ДНК-Синтез. Последовательности праймеров и зонда приведены в табл. 1.

ПЦР-РВ проводили на приборе АНК-32 в полипропиленовых пробирках (0.2 мл), содержащих 23 мкл реакционной смеси и 2 мкл ДНК-мишени. После прогрева при 95 °С в течение 300 с следовало 50 циклов термоциклирования при следующем температурном профиле: 30 с при 65 °С, 20 с при 70 °С и 20 с при 95 °С. Отрицательные контрольные образцы (реакционная смесь без ДНК-мишени) ставились при каждом запуске для определения возможной контаминации и предотвращения ложноположительных результатов.

ПЦР-РВ в микроформате проводили в чипах из полиметилметакрилата. Чип представляет собой



**Рис. 1.** Чип из полиметилметакрилата для проведения ПЦР-РВ

пластину толщиной 1 мм с круглой реакционной камерой диаметром 9 мм и глубиной 0.35 мм, герметично соединенную с другой полимерной пластиной ("крышкой") с входным и выходным отверстиями (рис. 1). После заполнения реакционной камеры смесью для ПЦР-РВ отверстия в "крышке" герметизировали минеральным маслом. ПЦР на чипе проводили на прототипе анализатора нуклеиновых кислот для чипов (АНК-4, ИАП РАН). Для полимерных чипов был выбран следующий температурный режим. На начальном этапе — прогрев при 95 °С в течение 300 с, затем 45 циклов с температурным профилем: 60 с при 60 °С, 20 с при 95 °С. Рост сигнала флуоресценции регистрировали в режиме реального времени.

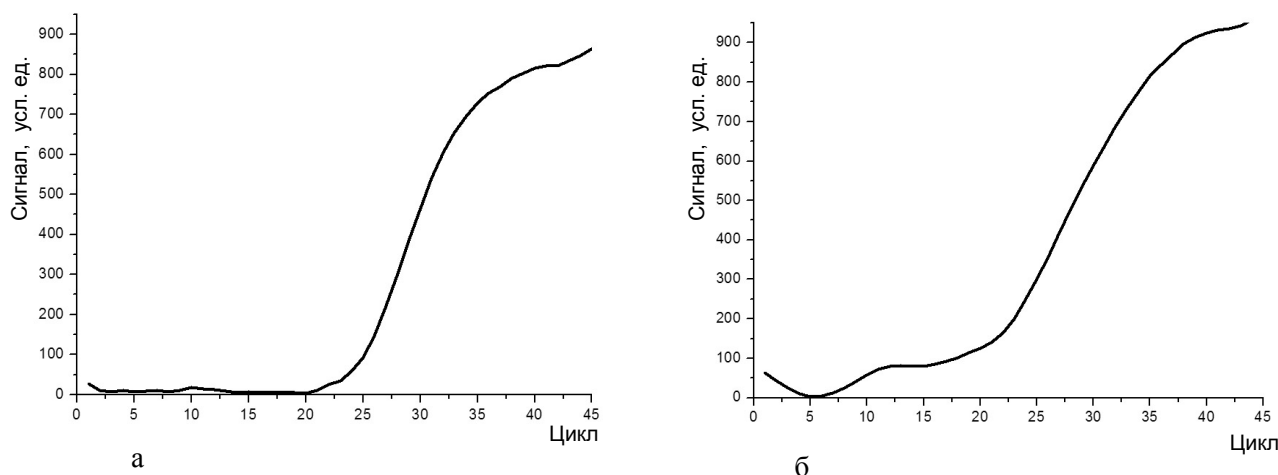
Результаты ПЦР-РВ для фрагмента 103 п. о., полученные на приборах АНК-32 в пробирке и АНК-4 на микрочипе, представлены на рис. 2 (а и б). Исходная концентрация мишени — 10<sup>6</sup> копий / мкл.

#### **Анализ продуктов ПЦР-РВ методом электрофореза на микрофлюидном чипе**

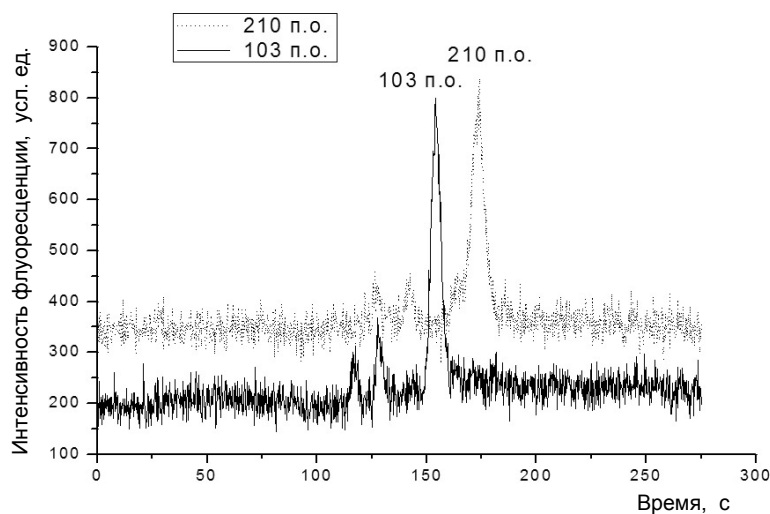
Традиционно при анализе продуктов ПЦР используют трудоемкий и длительный гель-электрофорез. В данной работе использован капиллярный электрофорез на микрофлюидном чипе.

Микрофлюидный чип (МФЧ) представляет собой две стеклянные пластины, герметично соединенные между собой путем термического связывания (спекания) [12]. Одна из пластин (стекло К8 размером 60×15×2 мм) канализирована, т. е. имеет сеть вытравленных микроканалов и просверленных отверстий, а другая является защитной (стекло Ф1) и обеспечивает формирование закрытых каналов. Каналы получены методом фотолитографии и кислотного травления (ИАП РАН—ЗАО "Светлана-полупроводники", Санкт-Петербург). Средняя ширина каналов микрочипа 60 мкм, глубина 15 мкм, длина сепарационного канала 38 мм, общая длина канала (включая подводящие) 43 мм.

Экспериментальные исследования проводили на прототипе микрофлюидной аналитической системы (МФАС, изготовленной в ИАП РАН) [13], состоящей из аналитического блока, прецизионного программируемого высоковольтного источника и персонального компьютера, обеспечивающего функционирование системы. В аналитический блок входит детектор лазер-индуцированной флуоресценции (длина волны возбуждения 473 нм, мощность лазера 10 мВт, регистрируемый диапазон излучений 520–650 нм). Программно-управляемый высоковольтный источник имеет два независимых канала регулировки напряжения.



**Рис. 2.** Кинетические зависимости амплификации κДНК СК-19 (фрагмент 103 п. о.), полученные на приборах АНК-32 в пробирке (а) и АНК-4 на микрочипе (б)



**Рис. 3.** Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученные методом электрофореза на микрочипе.  
103 п. о. — сплошная линия и 210 п. о. — пунктирная линия

Для проведения капиллярного электрофореза проб, содержащих фрагменты ДНК, обычно используют ситовую матрицу в буферной системе. В качестве сепарационной ситовой матрицы был выбран 3% раствор полидиметилакриламида (молекулярная масса  $\sim 95000$ ) в 0.05 М трис-боратном буфере pH 8.3 с 2 мМ ЭДТА. Полидиметилакриламид (ПДМАА) способен подавлять электроосмотический поток и уменьшать взаимодействия аналит—стенка сепарационного канала чипа. Электрофорез проводили при 1300 В. Анализируемый объем пробы 800 пл. Результаты представлены на рис. 3. Время анализа 200 с.

## ОБРАБОТКА И АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### ПЦР-РВ

Следует отметить важную особенность формы сигнала (рис. 2): она хорошо удовлетворяет уравнению логистического роста, по крайней мере до стадии насыщения. В работах [14, 15] обсуждались две аппроксимирующие зависимости, адекватно описывающие динамику информативного сигнала.

Одной из форм модели информативного сигнала в приборах, реализующих ПЦР-РВ, является

$$X_n = \frac{X^*}{1 + (B - 1)a_0^{-n}}, \quad (1)$$

где  $B = X^* / X_0$ . Кроме того, используется и другая аппроксимирующая зависимость:

$$X_n = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + (n / n^*)^p}. \quad (2)$$

Интерпретация роли параметров моделей (1) и (2) и соотношения между ними также представлены в работе [15]. В обоих случаях  $X_n$  — величина сигнала на  $n$ -шаге измерения.  $X_0 = A_1$  — начальный сигнал;  $X^* = A_2$  — сигнал насыщения. Коэффициент  $a_0$  в (1) определяет средний прирост количества ДНК за 1 цикл. В (2):  $n^*$  — положение порогового цикла; отношение  $p / n^*$  равно  $\ln(a_0)$ ; временное положение точки перегиба кривых, определяемое, согласно (1), как  $n_1 = \ln(B - 1) / \ln(a_0)$ , в соответствии с (2) есть  $n_2 = n^* \cdot ((p - 1) / (p + 1))^{1/p}$ .

Модель (2) входит в математическое обеспечение пакета ORIGIN и является одной из встроенных аппроксимирующих нелинейных функций. Таким образом, с помощью заложенной в алгоритм итерационной процедуры поиска оптимальных параметров модели можно оценить среднюю эффективность ПЦР, а также найти пороговый цикл. По оценке порогового цикла на основе градуировочной зависимости можно определить исходную концентрацию продукта.

#### Результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК (103 и 210 пар оснований)

Вид электрофореграмм приведен на рис. 4. Отчетливо выделяются основной аналитический пик

в области 150–170 с (750–850 отсчеты) и два побочных пика существенно меньшей амплитуды.

Обработка информативного сигнала включает несколько этапов:

- оценка систематической составляющей сигнала (дрейфа базовой линии);
- моделирование формы пиков (основного и побочных) и интерпретация последних;
- оценивание неинформативных составляющих сигнала (шумов) и выявление его возможного закона (плотности распределения).

#### ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР

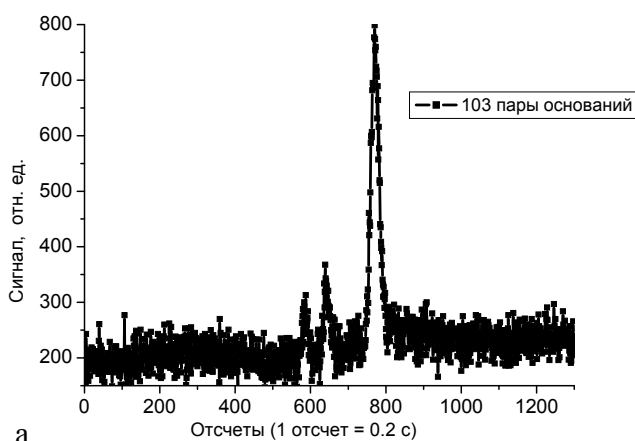
Обработка электрофореграмм базируется на традиционных алгоритмах:

а) регрессионный анализ на основе МНК, что позволяет получить уравнение дрейфа базовой линии;

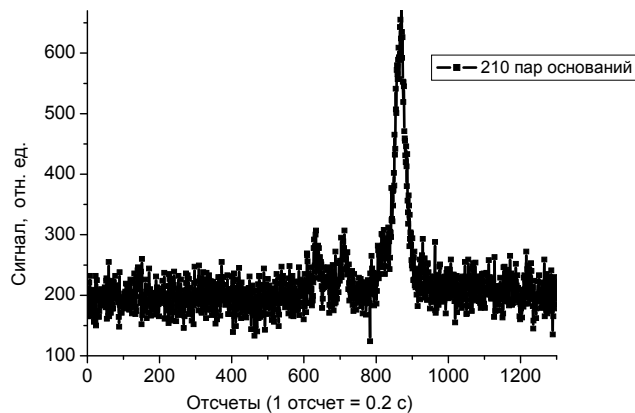
б) оценка интегральных характеристик (моментов распределения) и использование Хи-квадрат-критерия согласия Пирсона, что позволяет сформулировать гипотезу о законе распределения и вычислить вероятность принятия подобной гипотезы;

в) переход к логарифму информативного сигнала (после компенсации дрейфа базовой линии) и построение параболической аппроксимации позволяют описать пик гауссовой (нормальной) зависимость;

г) использование обобщенного критерия Стьюдента для оценки однородности выборки, а также



а



б

Рис. 4. Электрофореграммы продуктов ПЦР: 103 п. о. (а) и 210 п. о. (б)

оценка информационного расхождения Кульбака лежат в основе решения задачи разрешения пиков.

Аппроксимация базовой линии  $D[i]$  для электрофореграммы на рис. 4, а, линейным трендом дает следующее регрессионное уравнение:

$$D[i] = 194.815 \pm 1.333 + (0.03194 \pm 0.00161) \cdot i, \quad (3)$$

где  $i = 1, 2, \dots, 1380$  — номер отсчета.

При ширине пика не более 60 отсчетов подъем базовой линии в пределах пика составит около 2 единиц. Как будет показано далее, амплитуды побочных пиков составят 90–135 единиц, а амплитуды главных пиков превышают 360 единиц. Таким образом, дрейф базовой линии можно считать малым.

Исследование случайной составляющей сигнала предполагало анализ возможного закона его распределения. Из электрофореграммы (рис. 4, а) были исключены измерения, соответствующие отсчетам 500–900, т. к. в этом интервале были выявлены основной и два побочных пика. Тем самым осталось 975 измерений, с высокой вероятностью характеризующиеся наличием лишь систематической составляющей (дрейф базовой линии) и случайным сигналом. После компенсации дрейфа было проведено оценивание интегральных характеристик случайной составляющей. В результате получены следующие оценки: математическое

ожидание  $+ 0.025$  (столь небольшое отличие от нуля может объясняться округлением коэффициентов регрессионного уравнения), стандартное отклонение  $\sigma = 23.42$ , коэффициент асимметрии  $+ 0.083$  и коэффициент эксцесса  $3.01$ . Последние два показателя свидетельствуют о близости закона к нормальному распределению, которое является симметричным с коэффициентом эксцесса  $3$ .

Вместо критерия согласия Пирсона (Хи-квадрат) использованы две упрощенных экспресс-оценки: а) число (доля) точек, выходящих за пределы диапазона  $\pm 3\sigma$ , или  $\pm 70.27$ , и б) число (доля) точек, попавших в диапазон  $\pm \sigma$ .

Теоретически рассчитанное число точек, выходящих за диапазон  $\pm 3\sigma$ , есть  $2.7$  (в реальности —  $4$ ); доля точек, входящих в диапазон  $\pm \sigma$ , должна составлять  $68.26\%$ , или  $665.5$  точек (в реальности  $667$ ). Оба этих показателя подтверждают гипотезу о нормальном распределении случайной помехи с очень высокой вероятностью.

Применительно к более короткому фрагменту электрофореграммы рис. 4, а (отсчеты  $1-100$ ) проведено детальное исследование характеристик сигнала.

А) Компенсирован малозначимый дрейф базовой линии  $194.024 - 0.017i$ ,  $i = 1, \dots, 100$ , уравнение которого близко к (3). Оценка стандартного отклонения равна  $19.586$ , что также сопоставимо

Табл. 2. Характеристики аналитических пиков электрофореграмм

Пик	Выборка		Гауссова аппроксимация		Площадь	Амплитуда
	Ц. т.	$\sigma$	Ц. т.	$\sigma$		
Побочный 1 (рис. 4, а)	585.90	8.51	585.52	9.44	2939	127.00
Побочный 2 (рис. 4, а)	640.51	7.36	640.03	9.06	2882	134.68
Основной (рис. 4, а)	771.04	10.03	771.03	10.38	13288	512.00
Побочный 1 (рис. 4, б)	636.34	6.84	636.51	6.97	2086	119.32
Побочный 2 (рис. 4, б)	708.87	9.11	709.25	9.92	2238	90.00
Основной (рис. 4, б)	866.26	13.43	866.89	13.66	12722	364.89

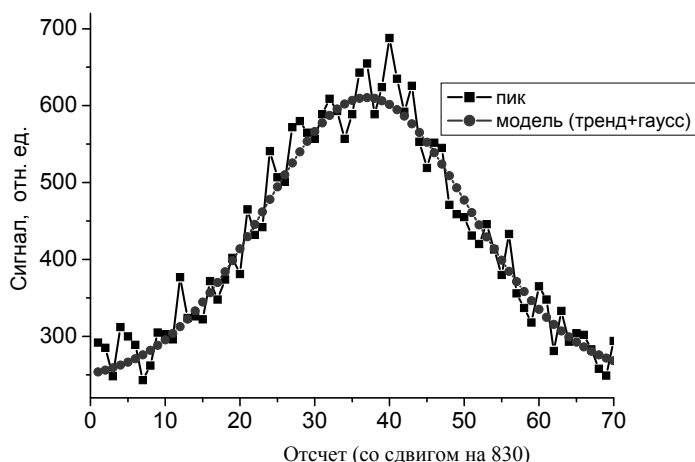


Рис. 5. Форма и аппроксимация основного пика 210 п. о. (фрагмент кривой рис. 4, б)

с предыдущими данными (23.423). Использование критерия Фишера позволяет сделать вывод о равенстве истинных дисперсий с доверительной вероятностью около 10 %.

Б) Анализ закона распределения случайной составляющей по критерию согласия Хи-квадрат (Пирсона) с 4 степенями свободы (7 интервалов гистограммы) показал вероятность принятия гипотезы о нормальном законе распределения около 65 %, что также является свидетельством очень высокой достоверности гипотезы

В) Проведено оценивание распределений экстремумов и фаз (серий) возрастания (убывания) в последовательности центрированных случайных величин. Эта задача классическая и ранее была решена в [16] (см. главу 45). В частности, теоретически обоснованное число экстремумов  $p$  имеет математическое ожидание и дисперсию, равные соответственно

$$M(p) = \frac{2(n-2)}{3} \text{ и } D(p) = \frac{16n-29}{90}.$$

Также в [16] приведены оценки математических ожиданий числа фаз роста (спада) длины  $d$  в последовательности  $n$  измерений, равные

$$N_d = \frac{2(n-d-2)(d^2+3d+1)}{(d+3)!}.$$

Исходя из объема выборки 100, было рассчитано теоретически обоснованное (ожидаемое) число серий заданной длины, а также общее число экстремумов. Серий длины  $d = 1$  имеется 44 (теор. 40.417), длины  $d = 2$  — 22 (теор. 17.6), длины  $d = 3$  — 2 (теор. 5.014), длины  $d = 4$  — 0 (теор. 1.082) и длины  $d = 5$  — 1 (теор. 0.189). Таким об-

разом, общее число серий (экстремумов) равно 69 (по теории: математическое ожидание 65.333, стандартное отклонение 4.178). Расхождение этих значений не превосходит стандартного отклонения, что позволяет признать его небольшим. Тем самым предположение о случайном симметричном характере элементов последовательности подтверждается.

Аппроксимация пиков (основного и двух побочных) для электрофореграмм, соответствующих рис. 4, осуществлялась в рамках гипотезы о гауссовой (нормальной) форме.

В табл. 2 приведены характеристики пиков (центр тяжести — "Ц. т." и стандартное отклонение  $\sigma$ ), рассчитанные по выборкам, а также оценки, соответствующие гауссовым аппроксимациям. Проводилась локальная компенсация дрейфа базовой линии: строилась линейная зависимость по точкам, находящимся на границах пика. Соответственно, площади и амплитуды пиков вычислялись относительно локальной, а не интегральной базовой линии.

Результаты, представленные в табл. 2 и на рис. 4 и 5, позволяют сделать два вывода:

- близость интегральных характеристик выборки отсчетов и гауссовой аппроксимации свидетельствуют о высокой вероятности нормальной (гауссовой) формы как основных, так и побочных пиков;

- малое расхождение центров тяжести 2-го побочного пика (рис. 4, а) и 1-го побочного пика (рис. 4, б) позволяют предположить, что это может быть пиком одного и того же компонента.

Далее будет исследована вероятность гипотезы о совпадении этих пиков.

Как отмечалось ранее, первый побочный пик

для 210 п. о. практически совпадает со вторым побочным пиком 103 п. о. В табл. 2 приведены их интегральные характеристики:  $m_1 = 637.34$ ,  $\sigma_1^2 = 46.833$  и  $m_2 = 640.03$ ,  $\sigma_2^2 = 82.10$  соответственно.

Первой мерой расхождения пиков может быть информационное расхождение Кульбака. Применительно к одномерным нормальным распределениям его величина есть

$$I(1:2) = \frac{(m_1 - m_2)^2}{2} \left( \frac{1}{\sigma_1^2} + \frac{1}{\sigma_2^2} \right) + \frac{1}{2} \left( \frac{\sigma_1}{\sigma_2} - \frac{\sigma_2}{\sigma_1} \right)^2.$$

Это расхождение равно 0.2462 нит (или 0.3555 бит), что соответствует расхождению математических ожиданий двух гауссовых кривых с единичной дисперсией на величину 0.496.

Второй из традиционных методов оценки однородности выборок основывается на обобщенном критерии Стьюдента. У нас объемы выборок составляют 28 и 33 отсчета. Нормированное расхождение

$$t = |m_1 - m_2| / \delta,$$

$$\delta = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

в данном случае составит 1.289. По таблицам функции Лапласа  $\Phi(1.289) \approx 0.9013$ . Согласно двухстороннему критерию Стьюдента, расхождение между математическими ожиданиями, превосходящее по абсолютной величине  $1.289 \delta$ , возможно с вероятностью  $2 \cdot (1 - 0.9013) \approx 0.20$ . Последнее свидетельствует о высокой вероятности однородности выборок (совпадении пиков).

Таким образом, с большой вероятностью, это — пики одного и того же компонента. Однако его идентификация является предметом дальнейших исследований. Одна из гипотез состоит в том, что этот пик отражает присутствие в реакционной смеси димеров праймеров. Также возможно, что он представляет собой сигнал флуоресцентного красителя.

Качество проводимой ПЦР-РВ на микрочипе можно оценить по количественному составу сформированной смеси компонентов. Отношение количества побочных и основной реакционных компонент характеризует специфичность проводимой реакции. Как известно, количество компонента можно оценить по площади соответствующего пика на электрофореграмме. Например, рассмотрим основной и первый побочный пики на рис. 4, а. Согласно данным табл. 2, отношение площадей 2939 / 13288. Однако компенсация дрейфа базовой линии была различна для обоих

пиков. После приведения обоих дрейфов к виду (3) выполняем пересчет площадей. Поправка к площади побочного пика будет отрицательной (-1169.02), а к площади основного пика — положительной (2971.05). Уточненные площади пиков относительно общего дрейфа базовой линии будут 1770 / 16259. Тем самым основной пик, а следовательно, и количество соответствующего компонента превосходит побочный примерно в 9.5 раз.

Оценка связи результатов количественного анализа реакционной смеси, в том числе при применении электрофореза на микрочипе, и такой характеристики ПЦР-РВ, как специфичность, требует более детального теоретического анализа и экспериментальной проверки, что может являться предметом дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность реализации ПЦР-РВ на микрофлюидном устройстве на примере актуального объекта анализа — онкомаркера цитокератин-19. Оценка качества проведения ПЦР-РВ возможна с помощью электрофоретического анализа продуктов реакции на микрофлюидном чипе. Анализ информативных электрофоретических сигналов при этом базируется на традиционных методах статистической обработки. В качестве моделей случайных (неинформативных) и информативных составляющих сигнала правомерно использование гауссовых (нормальных) распределений.

*Исследования проводились в рамках Программы фундаментальных исследований президиума РАН № 9 "Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов", проект "Микрофлюидные чипы для анализа биомолекул методами электрофореза", и Федеральной целевой программы "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)" ФМБА, проект "Разработка приборно-аналитического комплекса для методов цифровой ПЦР" "Анализ-12".*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: (<http://www.euro.who.int/pubrequest>).
2. URL: (<http://www.gks.ru>).
3. Возный Э.К., Поддубная И.В., Константинова М.М. и др. Комбинация навельбина и доксорубина в химиотерапии первой линии распространенного рака молочной железы // Русский медицинский журнал. 2002. Т. 10, № 24. С. 1126–1131.
4. Bartek J., Bartkova J., Schneider J. et al. Expression of monoclonal antibody-defined epitopes of keratin 19 in human tumours and cultured cells // European Journal of Cancer & Clinical Oncology. 1986. V. 22, N 12.



- P. 1441–1452.
5. Aerts J., Wynendaele W., Paridaens R. et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood // *Annals of Oncology*. 2001. V. 12, N 1. P. 39–46.
  6. Stathopoulou A., Gizi A., Perraki M. et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the Lightcycler system // *Clinical Cancer Research*. 2003. V. 9, N 14. P. 5145–5151.
  7. Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тулик А.Н. и др. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик // *Научное приборостроение*. 2011. Т. 21, № 4. С. 5–21.
  8. Тулик А.Н., Курочкин В.Е., Евстратов А.А. и др. Стеклоквартовые чипы для ПЦР в геле // XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Волгоград, 25–30 сент. 2011). Сб. материалов. Т. 4. С. 294.
  9. Marcus J.S., Anderson W.F., Quake S.R. Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics // *Analytical Chemistry*. 2006. V. 78, N 3. P. 956–958.
  10. Natarajan G., Johnson Y.R., Zhang F. et al. Real-time polymerase chain reaction for the rapid detection of group B streptococcal colonization in neonates // *Pediatrics*. 2006. V. 118, N 1. P. 14–22.
  11. URL: (<http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/M-MLV%20Reverse%20Transcriptase%20Protocol.ashx>).
  12. Евстратов А.А., Лукашенко Т.А., Рудницкая Г.Е. и др. Микрофлюидные чипы из стеклянных материалов // *Научное приборостроение*. 2012. Т. 22, № 2. С. 27–43.
  13. Евстратов А.А., Рудницкая Г.Е., Петухова Н.А. Микрочиповые технологии в биологических исследованиях. Экспресс-анализ ДНК: сепарационные матрицы для разделения ДНК // *Научное приборостроение*. 2005. Т. 15, № 2. С. 27–40.
  14. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч.1. Оптимизация условий оценивания при наличии аддитивной случайной помехи // *Научное приборостроение*. 2009. Т. 19, № 3. С. 3–11.
  15. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч.2. Оценивание и компенсация систематической погрешности измерения. Сопоставление двух различных форм математической модели логистического роста // *Научное приборостроение*. 2009. Т. 19, № 3. С. 12–20.
  16. Кендалл М. Дж., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: Наука, 1976. 736 с.

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

Контакты: Евстратов Анатолий Александрович,  
an\_evs@mail.ru

Материал поступил в редакцию 11.10.2012

## THE ESTIMATE OF RESULTS OF THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION OF TUMOR MARKERS CYTOKERATIN-19 (CK-19) cDNA BY ELECTROPHORESIS METHOD IN MICROFLUIDIC CHIP

**A. A. Evstrapov, A. L. Bulyanitsa, G. E. Rudnitskaya, T. A. Lukashenko, A. N. Tupik,  
A. I. Tsymbalov, N. A. Esikova, Y. S. Posmitnaya**

*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*

In this paper the principal possibility of realization of the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in microfluidic device was demonstrated. The rapid evaluation of the carried out PCR quality is an relevant objective. The possibility of this task solution by the electrophoresis of PCR products in microfluidic chip was represented. As the object of studying the cDNA of tumor marker cytokeratin-19 (CK-19) was selected. The methods of data treatment for informative electrophoretic signals were proposed and the conclusions regarding the quality of the PCR and the peculiarities of electrophoresis carrying out in microfluidic chip were made. The results of our researches can be used for the solution some perspective tasks, which also discussed in this paper.

*Keywords:* real-time polymerase chain reaction, electrophoretic analysis, cytokeratin, microfluidic chip, informative signal