

13. Huet M., Cubizolles M., Buhot A. Real time observation and automated measurement of red blood cells agglutination inside a passive microfluidic biochip containing embedded reagents // Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 93. PP. 110-117.
14. Malinin A. V. et al. Determination of blood types using a chirped photonic crystal fiber // Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VIII. 2011. Vol. 7898. P. 78981A.
15. Дубровский В.А., Медведева М.Ф. Акустооптический метод определения группы крови человека: сравнение применения анти-А и анти-В моноклональных антител и стандартных гемагглютинирующих сывороток // Саратовский научно-медицинский журнал. 2017. Т. 13. № 1. С. 022-028.
16. Doubrovski V.A., Medvedeva M.F., Torbin S.O. An acousto-optical method for registration of erythrocytes' agglutination reaction – Sera color influence on the resolving power // Optics and Spectroscopy. 2016. Vol. 120. № 1. PP. 58-64.
17. Аристов А.А., Носова Е.В., Солдатов А.Н. Применение метода фотометрии лежащих капель для задач клинической лабораторной диагностики // Медицинская техника. 2016. № 5. С. 19-22.
18. Aristov A.A., Nosova E.V. Method of evaluation of process of red blood cell sedimentation based on photometry of droplet samples // Journal of Medical and Biological Engineering and Computing. 2017. Vol. 55. PP. 621-630.
19. Aristov A.A., Evtushenko G.S., Ermolovich D.G. Micromethod of an estimate of erythrocyte sedimentation rate / Proc. SPIE. 2008. Vol. 7006. 10 p.

Александр Александрович Аристов,
канд. техн. наук, доцент,
Юлия Андреевна Розенбаум,
аспирант,
отделение электронной инженерии,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
г. Томск,
Геннадий Сергеевич Евтушенко,
д-р техн. наук, гл. научный сотрудник,
Государственный центр экспертизы
в сфере науки и инноваций,
ФГБНУ НИИ «Республиканский
исследовательский научно-консультативный
центр экспертизы Министерства науки
и высшего образования РФ,
г. Москва,
профессор,
отделение электронной инженерии,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»,
г. Томск,
e-mail: aristov@tpu.ru

В.Е. Курочкин, Д.А. Белов, Ю.В. Белов, А.Н. Зубик

Методика определения характерных параметров при плавлении ДНК в анализаторах нуклеиновых кислот

Аннотация

Современные методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и плавления молекулы ДНК реализуются на анализаторах нуклеиновых кислот. Предложено использовать особенности регистрации сигналов плавления анализаторами серии АНК с целью уменьшения погрешности определения основного характерного параметра анализа – температуры плавления ДНК T_m . Предложена методика определения ширины интервала плавления ΔT для использования в качестве дополнительного критерия специфичности полученного продукта ПЦР. Выполнена оценка погрешностей измерений: значения СКО величины T_m – не более 0,11 °C; величины ΔT – не более 0,06 °C.

Введение

Анализ на основе метода плавления молекул ДНК, реализующийся на анализаторах нуклеиновых кислот после проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), широко используется в том числе для детектирования модифицированных нуклеотидов, оценки специфичности проведения ПЦР и дискриминации аллелей с целью выявления мутаций ДНК. В Институте аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН, г. С.-Петербург) серийно выпускаются анализаторы нуклеиновых кислот серии АНК, обеспечивающие:

- качественное и количественное определение молекул ДНК методом ПЦР-РВ в 32, 48 или 64 пробирках одновременно;
- детектирование всех основных красителей и анализ до 5 компонентов в каждой пробирке одновременно;
- реализацию анализа методом плавления ДНК.

Анализаторы серии АНК успешно применяются при проведении клинических анализов, для санитарного и экологического контроля, а также в судебно-медицинской экспертизе [1]. Анализаторы допущены к обращению на территории РФ в качестве изделий медицинской техники.

В результате анализов методом плавления молекул ДНК получаются графики плавления продуктов амплификации, представляющие собой зависимость измеренной величины флуоресцентного отклика от температуры образца.

Существуют два режима получения графиков плавления ДНК [2]:

- 1) непрерывный режим, при котором значения флуоресцентного отклика регистрируются с минимально возможным шагом при постоянном изменении температуры образцов с постоянной скоростью;
- 2) пошаговый режим, при котором значения флуоресцентного отклика регистрируются в течение каждого температурного шага после достижения заданной температуры.

Непрерывный режим обеспечивает значительную экономию времени, так как для обеспечения высокого разрешения, позволяющего различать однонуклеотидные замены фрагментов ДНК, и уменьшения погрешности измерения значения T_m шаг изменения температуры не должен превышать 0,1 °C. При этом увеличивается разброс температур между пробирками и наблюдается различие температуры пробирок и датчика температуры, что пагубно сказывается на качестве результатов анализа. Наиболее сильно этот недостаток выражен при реа-

лизации теплового режима элементами Пельтье [2], применяемыми в большинстве анализаторов. В нашей статье [3] приведена методика, реализованная в программе «ANK Melting», при использовании которой при шаге изменения температуры 0,5 °C высокое разрешение достигается путем аппроксимации графика плавления ДНК (ГП) непрерывной функцией.

Для анализаторов серии АНК при проведении анализа методом плавления рекомендован пошаговый режим детектирования. При этом на каждом температурном шаге 0,5 °C длительностью 30 с регистрируются 8 значений флуоресцентного отклика от каждой пробирки. В настоящей статье предложено использовать эти особенности регистрации сигналов плавления анализаторами серии АНК с целью обеспечения высокого разрешения и уменьшения погрешности определения температуры плавления ДНК при сохранении длительности анализа.

Характерным параметром графика плавления ДНК является температура плавления T_m , которая зависит от процентного содержания GC-пар нуклеотидов [4], длины фрагмента ДНК [5], [6] и концентрации ионов металлов в анализируемом растворе [7]–[9]. Температура плавления T_m соответствует точке перегиба графика плавления [10] и традиционно определяется как значение максимума ее производной по температуре.

График плавления можно охарактеризовать еще одним параметром – шириной интервала плавления ΔT , который, так же как и температура плавления T_m , зависит от состава фрагмента ДНК [10]. Максимальные значения ΔT соответствуют содержанию GC-пар нуклеотидов около 50 %, а минимальные – около 0 и 100 %.

Ширина интервала плавления ΔT определяется как расстояние по температурной шкале между пересечениями линий максимального и минимального уровней флуоресценции с касательной к точке перегиба графика плавления [11].

Для вычисления величины ширины интервала плавления ΔT известным способом необходимо выполнить нормализацию графика путем построения его в пределах от 0 до 1 по оси ординат (рис. 1).

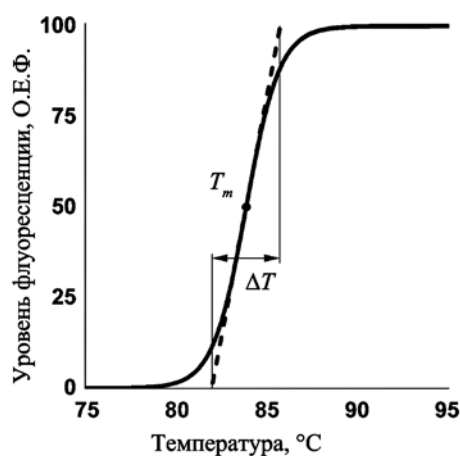


Рис. 1. Модельный график плавления (сплошная линия), график касательной (пунктирная линия) и характерные параметры графика плавления: температура плавления ДНК T_m и ширина интервала плавления ДНК ΔT

Известны способы, при которых значение ΔT определяется как разница между температурами, соответствующими 25 и 75 % от максимального уровня флуоресценции на нормированном графике, или как ширина нормированной производной по температуре на полувысоте [12]. Значение ΔT также может вычисляться на основе определения стандартного отклонения [13] или среднего абсолютного отклонения [14] от средней температуры.

Вычисление приведенными способами усложняется наклоном и сдвигом по вертикали базовой линии реального графика плавления, что объясняется в том числе температурной зависимостью фоновой флуоресценции [15].

Целью работы является повышение точности определения температуры плавления ДНК T_m и разработка упрощенной

методики определения значения ширины интервала плавления ДНК ΔT без компенсации базовой линии и нормировки графика плавления.

Материалы и методы

Исходные данные получены на анализаторе АНК-32 в результате выполнения трехкратных анализов трех образцов онкомаркера цитокератина (СК-19) при четырехкратном повторении по методике плавления в диапазоне температур 70...95 °C с шагом 0,5 °C и длительностью выдержки каждого значения температуры 30 с. Образцы имеют различное содержание GC-пар нуклеотидов, равное 55,7, 58,8 и 58,2 %, при длине фрагментов L_p , равной 131, 209 и 309 пар нуклеотидов (п.н.). Для получения образцов проводили ПЦР с исходной концентрацией ДНК-мишени 10^6 копий/мкл. В реакционную смесь «ПЦР-Микс» с красителем «SYBR Green I» (ООО «СИНТОЛ», г. Москва) добавляли специально разработанные праймеры (ООО «ДНК-Синтез», г. Москва). Амплификацию проводили в стандартных пробирках (0,2 мл) при следующем тепловом режиме: прогрев 5 мин при 95 °C, затем 50 циклов ПЦР с температурой 60 °C в течение 50 с и 95 °C в течение 20 с.

При обработке в программе *ANK Melting* для определения значения T_m используются исходные данные, содержащие средние значения 8 измерений за 30 с при каждом шаге изменения температуры (1 точка на графике плавления при каждом шаге).

Для обработки данных предложена новая методика плавления высокого разрешения *Melting NA*. В этой методике используются исходные данные, которые содержат результаты 8 измерений интенсивности флуоресценции за 30 с на каждом шаге изменения температуры, равном 0,5 °C (8 точек на каждом шаге). Методика *Melting NA* может быть реализована в программе MATLAB или в среде Excel, при этом последовательно выполняются операции интерполяции, фильтрации и двойного дифференцирования ГП.

При интерполяции принимается новый шаг температурной шкалы: $0,5 / 8 = 0,0625$ °C. При начальной температуре T_0 всем точкам температурной шкалы будут присваиваться значения по формуле (1):

$$T_j = T_0 + 0,0625(j - 1), \quad (1)$$

где начальная температура в качестве примера $T_0 = 70$ °C; значение j – порядковый номер точки.

Фильтрация предложено выполнять по формуле (2):

$$s_j = \frac{1}{9} \cdot \sum_{i=j-4}^{i=j+4} s_i. \quad (2)$$

Величина температуры T_m соответствует наибольшему абсолютному значению первой производной ГП по температуре.

Дифференцирование предложено выполнять по формуле (3). При этом не наблюдается сдвиг графиков производных ГП по отношению к исходному ГП, а также увеличиваются частота дискретизации и отношение сигнала к шуму:

$$V_j = s_{j+8} - s_{j-8}, \quad (3)$$

где V_j – результат дифференцирования для j -й точки нового графика; s_{j+8} и s_{j-8} – данные для точек с порядковыми номерами $(j + 8)$ и $(j - 8)$ исходного ГП соответственно.

Величину ΔT по методике *Melting NA* предлагается определять как интервал температур между точками графика, соответствующими минимальному и максимальному значениям второй производной ГП по температуре. Эту величину можно условно обозначить ΔT_a , поскольку она соответствует той части графика плавления ДНК, на которой наблюдается наиболее активный ее рост.

Для определения значений W второй производной ГП по температуре дифференцирование предложено выполнять по аналогии с формулой (3):

$$W_j = V_{j+8} - V_{j-8}. \quad (4)$$

Результаты

Выполнено сравнение результатов применения программы «ANK Melting» (табл. 1) и методики *Melting NA* (табл. 2). В таблицах приведены значения T_m трех образцов – каждый в четырех пробирках. Вычислены средние значения температур T_m и их среднеквадратичные отклонения (СКО) – $T_{m\text{ ср.}}$ и RMS соответственно.

Таблица 1

Результаты вычислений значений T_m в программе «ANK Melting»

L_p , п. н.	T_{m1} , °C	T_{m2} , °C	T_{m3} , °C	T_{m4} , °C	$T_{m\text{ ср.}}$, °C	RMS
131	87,28	87,49	87,12	87,41	87,32	0,16
209	90,15	90,23	90,24	90,27	90,22	0,05
309	90,67	90,49	90,80	90,74	90,68	0,13

Таблица 2

Результаты вычислений значений T_m с применением методики *Melting NA*

L_p , п. н.	T_{m1} , °C	T_{m2} , °C	T_{m3} , °C	T_{m4} , °C	$T_{m\text{ ср.}}$, °C	RMS
131	87,69	87,69	87,69	87,63	87,68	0,03
209	90,5	90,5	90,38	90,5	90,47	0,06
309	90,81	90,69	90,94	90,88	90,83	0,11

Максимальное значение СКО с применением программы «ANK Melting» составляет 0,16 °C, с применением методики *Melting NA* – 0,11 °C.

В табл. 3 приведены значения ΔT_a 3-х образцов, каждый образец в 4-х пробирках, полученные с применением методики *Melting NA*. Вычислены средние значения $\Delta T_{a\text{ ср.}}$ и СКО RMS . В программе «ANK Melting» значения ΔT не определяются.

Таблица 3

Результаты вычислений значений ΔT_a с применением методики *Melting NA*

L_p , п. н.	ΔT_{a1} , °C	ΔT_{a2} , °C	ΔT_{a3} , °C	ΔT_{a4} , °C	$\Delta T_{a\text{ ср.}}$, °C	RMS , °C
131	1,56	1,56	1,56	1,62	1,58	0,03
209	1,50	1,50	1,63	1,50	1,53	0,06
309	1,57	1,62	1,62	1,56	1,59	0,03

По сравнению с известным способом для вычисления значения ΔT не требуется определять минимальное и максимальное значения ГП для нормализации графика, что позволяет уменьшить пределы изменения температуры, исключить ручные операции и сократить длительность анализа.

Значения ΔT_a могут служить критерием специфичности полученного продукта реакции самостоятельно или после преобразования их в значения ΔT путем введения поправочного коэффициента.

Заключение

Разработана методика плавления высокого разрешения *Melting NA*, предназначенная для определения температуры плавления ДНК T_m и ширины интервала плавления ΔT . По этой методике на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32 проведен анализ методом плавления трех известных образцов ДНК (каждый образец – в 4-х пробирках). Оценка погрешностей измерений позволяет сделать следующий вывод: анализатор нуклеиновых кислот АНК-32 совместно с методикой *Melting NA* обеспечивает погрешности измерений порядка 0,1 °C, что соответствует требованиям методики плавления ДНК высокого разрешения.

В дальнейшем планируется продолжить совершенствование методики плавления ДНК *Melting NA*, в частности с целью детектирования модифицированных нуклеотидов и выявления мутаций ДНК, а также полной автоматизации обработки данных.

Однако уже сейчас методика имеет практическую ценность при использовании образцов ДНК для положительного контроля, оценки специфичности проведения ПЦР и подтверждения чистоты продукта после амплификации исследуемых образцов.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания № 075-01073-20-00 Министерства науки и высшего образования РФ.

Список литературы:

1. Nikolenko D.A., Munister V.D., Zolkin A.L., Khvatov I.L., Karapetyan A.A. Analysis of modern computer diagnostic and measurement methods in medicine // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. Vol. 1889. № 5. P. 052005.
2. Herrmann M.G., Durtschi J.D., Wittwer C.T., Voelkerding K.V. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping // Clin. Chem. 2007. Vol. 53. № 8. PP. 1-3.
3. Белов Д.А., Белов Ю.В., Широкоград А.Л. Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 28. № 2. С. 11-19.
4. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // J. Mol. Biol. 1962. Vol. 5. № 1. PP. 109-118.
5. Porschke D. Cooperative non-enzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix-coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids // Biopolymers. 1971. Vol. 10. PP. 1989-2013.
6. Blake R.D. Cooperative lengths of DNA during melting // Biopolymers. 1987. Vol. 26. PP. 1063-1074.
7. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. PP. 3746-3750.
8. Owczarzy R., You Y., Moreira B.G., Manthey J.A., Huang L. et al. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: Improved predictions of melting temperatures // Biochemistry. 2004. Vol. 43. PP. 3537-3554.
9. Календарь Р.Н., Сиволоп Ю.М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // Биополимеры и клетка. 1995. Т. 11. № 3-4. С. 55-65.
10. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. Переход спираль-клубок в ДНК // Успехи физических наук. 1971. Т. 105. № 11. С. 479-519.
11. Lazurkin Y.S., Frank-Kamenetskii M.D., Trifonov E.N. Perspectives report: Melting of DNA: Its study and application as a research method // Biopolymers. 1970. № 9. PP. 1253-1306.
12. Marky L.A., Breslauer K.J. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves // Biopolymers. 1987. № 2. PP. 1601-1620.
13. Rupprecht A., Piskur J., Schultz J., Nordenskiöld L., Song Z., Lahajnar G. Mechanochemical study of conformational transitions and melting of Li-, Na-, K-, and CsDNA fibers in ethanol-water solutions // Biopolymers. 1994. № 34. PP. 897-920.
14. Lando D.Y., Fridman A.S., Chang C.-L., Grigoryan I.E., Galyuk E.N., Murashko O.N., Chen C.-C., Hu C.-K. Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves // Anal. Biochem. 2015. № 479. PP. 28-36.
15. Сочивко Д.Г., Варламов Д.А., Федоров А.А., Курочкин В.Е. Метод бесконтактного измерения температуры в реакторах полимеразной цепной реакции // Письма в ЖТФ. 2016. Т. 42. Вып. 7. С. 53-58.

Владимир Ефимович Курочкин,
д-р техн. наук, профессор, директор,

Дмитрий Анатольевич Белов,

мл. научный сотрудник,

Юрий Васильевич Белов,

канд. физ.-мат. наук, ведущ. научный сотрудник,

Александра Николаевна Зубик,

канд. техн. наук, научный сотрудник,

Институт аналитического приборостроения РАН,

г. С.-Петербург, e-mail: belov.da@list.ru