
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

УДК 543.426; 543.9

© Д. А. Белов, Н. А. Корнева, А. С. Альдекеева, Ю. В. Белов, И. Г. Киселев

**ПОВЫШЕНИЕ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК**

В статье предложена усовершенствованная модель сигналов кривой плавления ДНК и методика оптимизации ее параметров на основе одного из наиболее эффективных способов обработки сигналов — способа аппроксимации с помощью сигмоидальной функции (СФ). Основным результатом применения СФ является определение величины температуры плавления ДНК T_m . При использовании предлагаемой методики аппроксимируется непосредственно кривая плавления, построение производной кривой плавления не требуется. Результаты применения СФ представлены в графическом виде. Показана возможность полной автоматизации вычислений для определения температуры плавления ДНК.

Кл. сл.: ПЦР в реальном времени, температура плавления ДНК, сигмоидальная функция

ВВЕДЕНИЕ

Основной целью применения генетических анализаторов на основе метода ПЦР в реальном времени является качественный и количественный анализ ДНК, в результате которых обнаруживается искомым фрагмент ДНК и определяется его количество.

Основные особенности ПЦР заключаются в высокой избирательности и чувствительности, достигающей единиц целевых молекул ДНК. Основным метрологическим параметром ПЦР в реальном времени является величина порогового цикла C_t . При количественных анализах на основе C_t возможно определение относительных количеств молекул ДНК, например при анализах генетически модифицированных продуктов, или абсолютных количеств путем сравнения с известными калибровочными образцами.

Дополнительная информация может быть получена при использовании методики плавления ДНК. Эффект плавления ДНК (DNA melting) — процесс перехода регулярной двойной спирали линейной молекулы ДНК в клубкообразное состояние под действием температуры [1, 2].

Анализ кривых плавления в основном используется для определения температуры плавления T_m продуктов амплификации с применением интеркалирующих красителей, праймеров и зондов. В реактивы ПЦР-реакции, ориентированной на целевую последовательность, добавляют минимум два олигонуклеотидных праймера. Праймеры следует подбирать таким образом, чтобы они имели близкие температуры плавления T_m . Если T_m прайме-

ров отличаются, амплификация будет менее эффективной или может вовсе не сработать.

При использовании кривых плавления в системах с ДНК-зондами (Taq-man assay, molecular beacons) можно различить точечные мутации, расположенные внутри областей связывания ДНК-матрицы и зонда. Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления зонда и к изменениям графика кривой плавления [3].

Зависимость температуры плавления ДНК от состава объясняется ее энергетическим состоянием: в паре гуанин—цитозин (G-C) три водородные связи, в паре аденин—тимин (A-T) только две. Поэтому чем больше G-C в ДНК, тем более она "тугоплавка" [4].

Кривая плавления получается путем наблюдения интенсивности флуоресценции продуктов ПЦР при изменении температуры с шагом 0.5 или 1 °C. При вторичной обработке определяется температура плавления T_m , которая зависит от длины и состава фрагмента ДНК.

В многочисленных литературных источниках [5–8] приведены формулы для вычисления температуры плавления T_m праймеров и продуктов амплификации, в которых в явном виде выражена зависимость T_m от длины фрагмента и процентного содержания суммы нуклеотидов С и G. Например, можно применить для вычисления T_m заимствованную из статьи [5] формулу (1):

$$T_m = 81.5 + 16.6 \lg [K^+] + 0.41 [G + C] \% - 675 / L_p, \quad (1)$$

где $[K^+]$ — концентрация ионов калия, моль;

$[G + C] \%$ — количество G и C в продукте ПЦР, %; L_p — длина продукта, число пар нуклеотидов.

Из этой формулы следует, что изменение содержания суммы нуклеотидов C и G на 1 % вызывает изменение температуры плавления T_m на 0.41 °C. Поэтому естественно желание исследователей уменьшить погрешность измерения величины T_m .

В настоящей статье рассмотрены основные причины погрешностей измерения T_m и предложен способ их уменьшения.

СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ И ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

При ПЦР-анализах динамическая кривая зависимости интенсивности флуоресценции от температурных циклов имеет S-образную форму и содержит три участка: участок экспоненциального роста, на котором наблюдается удвоение продукта при каждом цикле; участок максимального роста интенсивности сигналов флуоресценции и участок насыщения (плато), на котором реакция прекращается.

При вторичной обработке используются следующие основные методы расчета: кусочно-линейная аппроксимация по двум точкам и аппроксимация по нескольким точкам. Примером метода первой группы может служить метод порога (отсюда название параметра "пороговый цикл"). Примером аппроксимации по нескольким точкам может служить моделирование на базе монотонной нелинейной S-образной функции класса сигмоид. В статьях [9, 10] показано, что при использовании аппроксимации сигналов флуоресценции сигмоидальной функцией обеспечивается снижение погрешностей измерения порогового цикла.

Кривая плавления зондов имеет подобную форму, на среднем участке наблюдается максимальное изменение интенсивности флуоресценции. Рост интенсивности флуоресценции при плавлении зондов вызывается эффектом уменьшения влияния гасителя на флуоресцентный краситель. Кривая плавления образцов с неспецифическими красителями имеет обратную зависимость, при этом наблюдается значительный дрейф нулевой линии, который обусловлен температурными свойствами красителей.

Можно назвать следующие основные причины погрешностей измерения величины T_m : погрешность дискретизации, шумы и дрейф нулевой линии.

Традиционно вычисление величины T_m обеспечивается путем дифференцирования и анализа производной кривой плавления. Однако

при дифференцировании кривой плавления сигнал уменьшается, а шумы возрастают.

Поскольку кривая плавления носит ступенчатый характер (1 точка на дискретную единицу температуры, например 0.5 или 1 °C), то для повышения точности расчетов далее рассматривается возможность определения температуры плавления ДНК путем аппроксимации кривой плавления сигмоидальной функцией. В отличие от традиционной методики вычисления величины T_m при аппроксимации сигмоидальной функцией дифференцирования кривой плавления не требуется.

Преимущества аппроксимации сигмоидальной функцией можно объяснить ее способностью значительно уменьшить влияние на погрешность измерения дискретизации входных данных, шумов и дрейфа нулевой линии.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ФОРМА СИГМОИДАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ

Усовершенствованную модель кривой плавления на базе нелинейной сигмоидальной функции (СФ) предлагается выразить в виде формулы (2), приведенной в работе [11]:

$$F_c = F_m / (1 + \exp((T_m - T) / k)) + f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2, \quad (2)$$

где F_c — относительная величина интенсивности флуоресценции при температуре образца T (°C); F_m — относительная интенсивность (размах) участка плавления; T_m — дробное значение температуры плавления (°C); k — коэффициент, который определяется наклоном кривой; слагаемые

$$f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2$$

учитывают смещение, а также линейную и квадратичную зависимости нулевой линии от температуры.

МЕТОДИКА ПОСТРОЕНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ ПАРАМЕТРОВ СФ КРИВОЙ ПЛАВЛЕНИЯ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

Исходные (сырые) данные кривой плавления получены на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32, который серийно выпускается в Институте аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН). Использовались образцы мРНК NAR-22, приготовленные по методике, описанной в работе [12].

Полный фрагмент NAR-22 приведен в базе данных нуклеотидных последовательностей [13].

Ограниченный фрагмент NAR-22 длиной 1209 нуклеотидов получен согласно протоколу ПЦР-РВ с обратной транскрипцией [14] с помощью следующих праймеров и зонда:

Табл. 1. Оптимизация параметров СФ

$T, ^\circ\text{C}$	F	F_c	D_c	S
61	894.23	880.67	183.91	704.99
62	889.36	880.33	81.52	—
63	884.51	882.67	3.41	—
64	879.68	877.67	4.05	—
65	874.86	874.00	0.74	—
...	...	...	...	...
...	...	...	...	...
86	670.99	670.33	0.43	—
87	666.56	661.33	27.29	—
88	662.14	659.33	7.89	—
89	657.74	651.00	45.47	—
90	653.36	645.67	59.23	—

Табл. 2. Результаты вычисления параметров СФ

Пробы	Параметры СФ	Значения
1	T_{m1}	74.50
	F_m	141.88
	k	1.22
	f_0	1507.75
	f_1	-7.44
	f_2	0.009
2	T_{m2}	74.44
1, 2	$T_{m1} - T_{m2}$	0.06

В табл. 2 приведены оптимизированные значения параметров СФ для одинаковых проб в двух смежных пробирках 1 и 2.

Основными результатами применения СФ являются определенные величины температуры плавления $T_{m1} = 74.50$ и $T_{m2} = 74.44$ °C. С целью сравнения полученных результатов в последней строке таблицы вычислены значения разности температур плавления $T_{m1} - T_{m2} = 0.06$ °C. Разность температур плавления можно объяснить градиентом температур держателя соседних пробирок.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОГРАММЫ MATLAB

Предложенная методика СФ реализована также путем использования программы MATLAB.

СФ задается на языке пакета в виде формулы (3):

$$f = @(x,u) (-x(2)./(1+\exp((x(1)-u)./x(3)))) + x(4) + x(5)*u + x(6)*u.^2, \quad (3)$$

где $x(1)$, ..., $x(6)$ соответствуют параметрам T_m , F_m , k , f_0 , f_1 и f_2 в формуле (2).

Использованы следующие команды MATLAB:

$x0 = [74 \ 141 \ 1 \ 1500 \ -7 \ 0.009]$ — задаются приближительные значения параметров;

$x = \text{lsqcurvefit}(f, x0, s, V)$ — новые значения параметров. Здесь исходные данные s и V — значения температуры и интенсивности флуоресценции (ранее обозначенные как T и F);

$Vn = f(x, s)$ — новые значения данных;

$\text{plot}(s, V, 'ob')$ — печать исходных данных;

$\text{plot}(s, Vn, 'r')$ — печать новых данных;

$\text{legend}('Данные', 'Аппроксимация', 2)$ — надписи на графиках;

$ds = \text{sum}((V - Vn).^2)$ — сумма квадратов отклонений, может быть использована для сравнения качества оптимизации;

$\text{dlmwrite}('koaf.txt', x, ':')$ — сохранение новых параметров.

Команды программы MATLAB могут быть сохранены в виде М-файла, при этом расчет температуры плавления может выполняться в автоматическом режиме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена усовершенствованная модель аппроксимации кривой плавления ДНК и методика оптимизации ее параметров на основе одного из наиболее эффективных способов обработки сигналов — способа аппроксимации с помощью сигмоидальной функции (СФ).

Основным результатом применения СФ является определение величины температуры плавления ДНК T_m .

При использовании предлагаемой методики аппроксимируется непосредственно кривая плавления, построения производной от кривой плавления не требуется.

Результаты применения СФ представлены в графическом виде.

Показана возможность полной автоматизации вычислений для определения температуры плавления ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479.
2. ДНК плавление. URL: <http://humbio.ru/humbio/dnastructure/0002a247.htm>.
3. Диагностика. Новейшие технологии в генодиагностике. Полимеразная цепная реакция в реальном времени. URL: <http://menshealth.ua/article.php?id=genodiag&type=701>.
4. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Идентификация и исследование экспрессии генов Учебно-методическое пособие для вузов. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. URL: <http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/497/65497/36874>.
5. Календарь Р.Н., Сиволоп Ю.М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // Биополимеры и клетка. 1996. Т. 11, № 3-4. С. 55–65. URL: <http://www.biopolymers.org.ua/pdf/ru/11/3/055/biopolym.cell-1995-11-3-055-ru.pdf>.
6. Сиволоп Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика. 1994. Т. 28, № 6. С. 54–61. URL: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/zyt.pdf>.
7. Вычисление температуры плавления. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибритизация_ДНК.
8. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в "реальном времени". М.: БИОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с. URL: <http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremeni-rebrikov-d-v-samатов-g-a-trofimov-d-u-2009.html>.
9. 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>.
10. 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. URL: <http://213.170.69.26/mag/2011/full/Art4.pdf>.
11. 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. URL: <http://213.170.69.26/mag/2011/full3/Art15.pdf>.
12. Альдекеева А.С., Корнева Н.А., Руденко Е.Д., Ключева Н.З. Экспрессия мРНК NAP-22 в почках крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и нормотензивных крыс (линия WKY) в раннем постнатальном онтогенезе в условиях нормального поступления экзогенного кальция и его дефицита // Артериальная гипертензия. 2014. Т. 20, № 5. С. 401–405. URL: <http://htn.almazovcentre.ru/jour/article/view/73>.
13. Homo sapiens brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1), transcript variant 2, mRNA. ORIGIN. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001271606.
14. Protocol for mRNA amplification and target preparation. Based on Wang E. et al. // Nature Biotechnology. April, 2000. Last edited by Max Diehn, June, 2001. URL: http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/ampprotocol_3.html.

Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург (Белов Д.А., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В.)

Петербургский государственный университет путей сообщения (Белов Д.А., Киселев И.Г.)

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург (Альдекеева А.С.)

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич, onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 20.04.2016

GENETIC ANALYZER RESOLUTION INCREASING AT DNA MELTING TEMPERATURE DETERMINATION

D. A. Belov^{1,2}, N. A. Korneva¹, A. S. Aldekeeva^{1,3}, Yu. V. Belov¹, I. G. Kiselev²

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

²*Petersburg State Transport University, Saint-Petersburg, Russia*

³*Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

The genetic analyzers resolution necessity explanation at DNA melting temperature determination is discussed in the article. Digitizing error, noise and baseline drift are the main factor of DNA melting temperature measurement error. In order to reduce the influence of these factors on the melting temperature T_m measurement error, DNA melting curve signals upgraded model and its parameters optimization methods based on the sigmoidal function (SF) approximating method are offered. The displacement and linear and quadratic dependences of the baseline on the temperature are taken into account in the above formula. The melting curve can be directly approximated by using of the proposed method as the construction of the derivative melting curve is not required. The initial data of the melting curve of the two mRNA samples NAP-22 obtained on the nucleic acid analyzer, which is commercially available at the Institute for Analytical Instrumentation of Russian Academy of Sciences (IAI RAS). The detailed procedure for the SF optimized parameters approximations method receiving is provided. The values of the melting temperatures of two identical samples are calculated. The difference in melting temperatures of these samples equaled to 0.06 °C can be explained by the adjacent holder tubes temperature gradient. DNA melting temperature measurement accuracy can be taken as the main parameter, which limits the genetic analyzers resolution. The initial data of the melting curve and the SF application results are presented in graphical form. The possibility of full calculation automatization to determine the DNA melting temperature is shown. A high resolution genetic analyzer at a certain temperature the DNA melting is shown.

Keywords: real-time PCR, DNA melting temperature, a sigmoid function

REFERENCES

1. Vedenov A.A., Dyhne A.M., Frank-Kameneckij M.D. [Transition a spiral—a ball in DNA]. *Uspekhi fizicheskikh nauk* [Achievements of physical sciences], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479 (In Russ.).
2. *DNK plavlenie* [DNA melting]. Baza znaniy po biologii cheloveka. Available at: <http://humbio.ru/humbio/dnastructure/0002a247.htm> (In Russ.).
3. *Diagnostika. Novejshie tekhnologii v genodiagnostike. Polimeraznaya cepnaya reakciya v real'nom vremeni* [Diagnostics. The latest technologies in a genodiagnostika. Polymerase chain reaction in real time]. Available at: <http://menshealth.ua/article.php?id=genodiag&type=701> (In Russ.).
4. Eprincev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. *Identifikaciya i issledovanie ehkspressii genov. Uchebno-metodicheskoe posobie dlya vuzov* [Identification and research of an expression of genes. An educational and methodical grant for higher education institutions]. Voronezh, Izdatel'sko-poligraficheskij centr Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2008. Available at: <http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/497/65497/36874> (In Russ.).
5. Kalendar' R.N., Sivolap Yu.M. [Polymerase chain reaction with any primers]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and cell], 1996, vol. 11, no. 3-4, pp. 55–65. Doi: 10.7124/bc.0003ED (In Russ.).
6. Sivolap Yu.M., Kalendar' R.N., Tchebotar' S.V. [Genetic polymorphism of cereals by means of PCR with any primers]. *Citologiya i genetika* [Cytology and genetics], 1994, vol. 28, no. 6, pp. 54–61. Available at: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/zyt.pdf> (In Russ.).
7. *Vychislenie temperatury plavleniya* [Calculation of temperature of melting]. Available at: https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибритизация_ДНК (In Russ.).
8. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. *PCR v "real'nom vremeni"* [PCR in "real time"]. Moscow, BINOM Publ., Laboratoriya znaniy, 2009. 223 p. Available at: <http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremeni-rebrikov-d-v-samatov-g-a-trofimov-d-u-2009.html> (In Russ.).
9. 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*. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/47>.
10. Belov Yu.V., Petrov A.I., Lavrov V.V., Kurochkin V.E. [Optimisation of RT-PCR nucleic acid quantitative analysis]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 1, pp. 44–49. Available at: <http://213.170.69.26/mag/2011/full/Art4.pdf> (In Russ.).
11. Belov Yu.V., Petrov A.I., Lavrov V.V., Kurochkin V.E.

- [Optimization of sigmoid function parameters in real-time PCR signals modeling]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 3, pp. 130–134. Available at: <http://213.170.69.26/mag/2011/full3/Art15.pdf> (In Russ.).
12. Al'dekeeve A.C., Korneva N.A., Rudenko E.D., Klyueva N.Z. [mRNA NAP-22 expression in kidneys of rats with spontaneous hypertension (SHR line) and holesmotenzivnykh of rats (WKY line) in early is fast-talnom ontogenesis in the conditions of normal intake of exogenous calcium and its deficiency]. *Arterial'naya gipertenziya* [Arterial hypertension], 2014, vol. 20, no. 5, pp. 401–405. Available at: <http://htn.almazovcentre.ru/jour/article/view/73> (In Russ.).
13. *Homo sapiens brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1), transcript variant 2, mRNA*. National Center for Biotechnology Information. ORIGIN. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001271606.
14. Protocol for mRNA amplification and target preparation. Based on Wang E. et. al. *Nature Biotechnology*, april, 2000. Last edited by Max Diehn, June, 2001. Available at: http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/ampprotocol_3.html.

Contacts: *Belov Dmitriy Anatol'evich*,
onoff_10@mail.ru

Article received in edition: 20.04.2016