

Метрологическое обеспечение амплификаторов полимеразной цепной реакции реального времени

Ю. А. КУДЕЯРОВ*, Е. В. КУЛЯБИНА*, А. В. МАРДАНОВ**, О. Н. МЕЛКОВА*,
М. В. СУХАЧЕВА**

* Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы,
Москва, Россия, e-mail: kudeyarov@vniims.ru

** Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Приведены методика и результаты испытаний для целей утверждения типа амплификаторов полимеразной цепной реакции реального времени.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, дезоксирибонуклеиновая кислота, праймеры, амплификаторы реального времени, калибровочная кривая.

The procedure and results of testing for approval of the type of real time PCR-amplification are presented.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), DNA, primers, real time amplifiers, calibration curve.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) стали широко применять в молекулярной биологии с 1980-х гг. в качестве экспериментального метода, используемого для увеличения малых концентраций определенных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в пробах. В настоящее время метод ПЦР является одним из самых распространенных методов в молекулярной биологии, применяемых в медицинской диагностике, криминалистике, установлении отцовства и др.

Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании в искусственных условиях (in vitro) определенного участка ДНК с использованием ферментов. В основе реакции лежит механизм, реализуемый в природе при внутриклеточном удвоении (репликации) молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразы. В отличие от репликации ДНК в живых организмах в искусственных условиях при помощи ПЦР амплифицируются (многократно копируются) относительно короткие участки ДНК. Так при обычной ПЦР длина копируемых участков ДНК составляет несколько тысяч пар оснований. С применением смеси различных полимераз в определенных условиях и добавок длина амплифицируемого фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов, в то время как, например, геном человека состоит примерно из 3 млрд. пар оснований.

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матричной ДНК и праймерами — короткими синтетическими олигонуклеотидами длиной 18—30 оснований. Олигонуклеотид — короткий фрагмент ДНК или РНК (рибонуклеиновой кислоты), используемый в качестве зонда или праймера, получаемый путем химического синтеза или расщеплением более длинных полинуклеотидов. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепочек двухцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

Процесс амплификации достаточно сложен и состоит из нескольких этапов. Рассмотрим этапы и особенности проведения этого процесса.

Первый этап — денатурация. При денатурации двухцепочечную молекулу ДНК (матрицу) нагревают до 94—96 °С (при использовании особенно термостабильной полимеразы до 98 °С) в течение 0,5—2 мин, чтобы цепочки ДНК разошлись. При таком нагревании разрушаются водородные связи между двумя цепочками ДНК, и в зоне реакции образуется смесь одноцепочечных молекул ДНК и праймеров.

Второй этап — отжиг. После расхождения цепочек молекул ДНК температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и ее выбирают равной их температуре плавления. За время отжига 30 с, полимеразы уже успевают синтезировать несколько сотен нуклеотидов, поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °С.

Последний этап — элонгация. В это время ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. У любой цепочки ДНК имеется естественная химическая ориентация, т. е. каждый нуклеотид связан со своими соседями в двух позициях: в местах присоединения фосфата (5-й атом углеродного цикла) и радикала ОН (там, где находится 3-й углерод). Поэтому можно говорить о 5-м (5'), либо 3-м (3') конце всей цепочки. Полимераза начинает синтез второй цепочки от 3' конца праймера, связавшегося с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепочку в направлении от 5' к 3'.

Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы *Taq* и *Pfu* наиболее активны при 72 °С. Время элонгации обусловлено типом ДНК-полимеразы и длиной амплифицируемого фрагмента. Время элонгации принимают равным одной минуте для каждой тысячи пар оснований. После окончания всех циклов проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия может длиться 7—10 мин.

Для проведения ПЦР требуется определенный набор реактивов [1], состоящий из: двух праймеров, комплементарных

тарных противоположным концам разных цепочек требуемого фрагмента ДНК; термостабильной ДНК-полимеразы — фермента, катализирующего реакцию полимеризации ДНК и сохраняющего активность при высокой температуре длительное время; дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (*dATP*, *dGTP*, *dCTP*, *dTTP*) и ионов Mg^{2+} , необходимых для работы полимеразы; буферного раствора, обеспечивающего необходимые условия реакции — *pH*, ионную силу раствора и др.; ДНК — матрицы, содержащей участок, требующий амплификации.

Проводят ПЦР в специальных приборах — амплификаторах (термоциклерах), обеспечивающих периодическое охлаждение и нагревание пробирок с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы амплификации, а также осуществлять последующее хранение амплифицированных молекул при 4 °С.

Большинство амплификаторов не являются средствами измерений и объектами метрологического обеспечения (МО). Исключение составляют амплификаторы, проводящие ПЦР в реальном времени. Такие приборы в техническом отношении представляют обычный амплификатор ДНК дополнительно оборудованный флуоресцентным детектором (ФЭУ — фотоэлектронным умножителем, фотодиодом, ПЗС-матрицей), позволяющим проводить измерения концентрации молекул ДНК в реакционном объеме непосредственно в ходе реакции. Такие устройства получили название детектирующих амплификаторов. Внешний вид этих приборов и их блок-схемы представлены в [1].

Амплификаторы реального времени (АРВ) используют для наблюдения за изменением концентрации конкретного ПЦР-продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют флуоресцентно-меченые праймеры для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления.

Из принципа действия АРВ следует, что существует несколько физических величин, определяющих работу амплификатора: температура, диапазон излучения флуоресценции, интенсивность ее потока, чувствительность детектора излучения, концентрация реактивов. На выходе АРВ проявляется всего одна измеряемая величина — концентрация молекул ДНК, погрешность измерения которой определяет метрологические свойства амплификатора. Эта величина и должна быть объектом (МО) АРВ. Концентрация в термоциклерах определяется при помощи калибровочной кривой, представляющей функциональную зависимость числа пороговых циклов от логарифма начальной концентрации молекул ДНК.

Основные принципы МО биотехнологий сформулированы в [2–4]. Важный элемент такого обеспечения — испытания средств измерений для целей утверждения типа. При испытаниях, помимо экспериментального определения метрологических характеристик средств измерений (диапазона, погрешностей измерений, межкалибровочного (межповерочного) интервала) разрабатывают и апробируют методику калибровки (поверки).

В статье изложена методология и приведены результаты испытаний для целей утверждения типа измерительных модулей CFX96 в составе термоциклеров C1000 Touch для амплификации нуклеиновых кислот производства фирмы «BIO-RAD Laboratories, Inc.» (США). Важность испытаний, проведенных сотрудниками ВНИИМС и Центра «Биоинже-

нерия» РАН, обусловлена тем, что результаты измерений, полученные с применением указанных модулей, имеют серьезное медицинское и социальное значение. Амплификаторы реального времени попадают в сферу государственного регулирования в области обеспечения единства измерений и должны быть внесены в Государственный реестр средств измерений. Методология испытаний полезна для разработчиков, производителей, пользователей и испытателей АРВ, а также для представителей контролирующих органов. Эту методологию можно применить при испытаниях амплификаторов разных типов, при условии, что их принцип действия позволяет построить и использовать калибровочные кривые.

Для рассмотрения вопросов о методологии испытаний, экспериментального определения и смысла калибровочных кривых будем опираться на формулу [1]:

$$I_n = \alpha N_0 E^n, \quad (1)$$

где I_n — интенсивность флуоресценции на n -м цикле реакции; α — коэффициент пропорциональности между светимостью и числом молекул, т. е. $I_n = \alpha N$; N_0 — количество амплифицируемых молекул ДНК в начале реакции (на первом цикле); E — эффективность ПЦР.

В идеальном случае количество амплифицированных молекул после первого цикла реакции должно удваиваться, т. е. их число с увеличением циклов реакции должно расти в геометрической прогрессии со знаменателем, равным 2. В действительности рост числа фрагментов молекулы ДНК происходит не в геометрической прогрессии, и это учитывается введением параметра E , показывающего, во сколько раз за один цикл реакции увеличится число фрагментов молекулы ДНК. В большинстве случаев $1 < E < 2$.

Прологарифмируем (1):

$$\lg I_n = \lg \alpha + \lg N_0 + n \lg E. \quad (2)$$

Пороговому значению числа молекул N_p , заданному программно, и пороговой флуоресценции I_p , соответствует пороговое значение числа циклов C_p , когда сигнал флуоресценции равен порогу (фону). Для порога формула (2) принимает вид

$$\lg I_t = \lg \alpha + \lg N_0 + C_t \lg E. \quad (3)$$

Перепишем (3) в виде

$$C_t = a - b \lg N_0, \quad (4)$$

где

$$a = (\lg I_t - \lg \alpha) / \lg E,$$

$$b = 1 / \lg E. \quad (5)$$

На графике (рис. 1) зависимости сигнала флуоресценции I от числа циклов амплификации (кривая накопления продуктов реакции) изображены три стадии реакции: инициации (базовый уровень сигнала), экспоненциальная (накопление продукта) и стадия насыщения, когда график по разным причинам выходит на насыщение («плато»).

Отметим, что для рабочего экспоненциального (линейного) участка данной зависимости коэффициенты линейной зависимости (4) остаются постоянными в предположении, что константа α для разных начальных концентраций молекул также не меняется. Это означает, что если в качестве матричной ДНК использовать ДНК стандартного образца (СО), то для его начальной концентрации N_{0r} можно записать

$$y = a - bx, \quad (6)$$

где $y = C_{tr}$ — значение порогового цикла для начальной концентрации СО; $x = \lg N_{0r}$.

Формула (6) представляет математическое выражение калибровочной кривой. Таким образом, калибровочная кривая является линейной только в рабочем диапазоне концентраций, соответствующем экспоненциальной (накопительной) стадии полимеразной реакции. При числе циклов за пределами этой стадии линейность калибровочной кривой нарушается, и она перестает представлять интерес для получения количественной информации.

При экспериментальном определении калибровочной кривой для разных начальных концентраций СО находится последовательность значений пороговых циклов C_{tr} . Кривые накопления продуктов реакции в зависимости от начальных концентраций — источник информации для построения калибровочных кривых (см. рис. 1). Изображенное семейство кривых — распечатка с дисплея измерительного модуля СГХ 96 термоциклера С1000 Touch [5]. Она сопровождается распечаткой таблиц, являющихся протоколом испытаний (не приводятся из-за большого объема), используемых для необходимых количественных оценок, в частности, для определения зависимости значений пороговых циклов C_{tr} от $\lg N_{0r}$. Эта зависимость (калибровочная кривая) в рабочем диапазоне концентраций будет линейной. Ее параметры определяют методом наименьших квадратов при помощи встроенной программы ПЦР — амплификатора.

Формула (5) позволяет по измерению тангенса угла наклона калибровочной кривой к оси абсцисс оценивать в сделанных выше предположениях эффективность ПЦР.

Такова в общих чертах методология построения калибровочной кривой АРВ, используемая при его испытаниях для целей утверждения типа как для измерения неизвестной концентрации, так и для определения погрешностей измерений этой концентрации.

Для прослеживаемости результатов измерений концентрации молекул ДНК и построения калибровочной кривой использовали разработанный Центром «Биоинженерия» РАН совместно с ВНИИМС государственный стандартный образец (ГСО 9931—2011) фрагмента плазмиды рUC18 длиной 271 нуклеотид с массовой концентрацией ДНК в 49 нг/мкл и границами относительной погрешности $\pm 11,0\%$ при доверительной вероятности $P = 0,95$ [3].

Испытания проводили на базе лаборатории Центра «Биоинженерия» РАН по программе, разработанной специалистами ВНИИМС совместно с сотрудниками Центра. Результаты испытаний представлены соответствующими протоколами. На основании этих протоколов подготовлена документация для выдачи измерительным модулям СГХ96 термоциклеров С1000 Touch свидетельства об утверждении типа и для их внесения в Государственный реестр средств измерений.

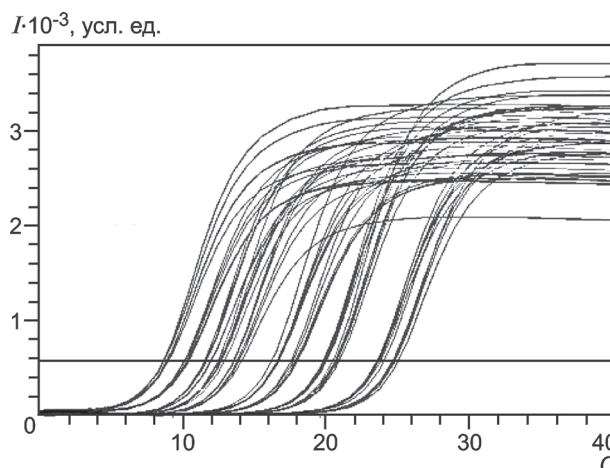


Рис. 1. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции I от числа циклов C проведения ПЦР, полученная на реальном приборе при разных значениях начальной концентрации образца

Перед началом испытаний подготовили реакционную смесь, включающую компоненты для проведения реакции амплификации. Все компоненты реакционной смеси смешивали в одной пробирке, после чего разливали по 20 мкл в 96-луночные плашки. Затем в лунки добавляли ДНК в объеме 5 мкл. Для испытаний взяли десять разведений СО с известной молярной концентрацией и один анализируемый образец. Для отрицательного контроля в лунки вместо ДНК-матрицы добавляли такой же объем деионизированной воды. Все измерения пятикратно повторяли. Для приготовления анализируемого образца с концентрацией n_x СО был разведен до концентрации, находящейся в рабочем диапазоне значений. Компоненты реакционной смеси представлены в таблице.

Компонент	Объем на 1 пробирку (реакцию), мкл
2-х SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix	12,5
Праймер F (20 пкмоль/мкл)	0,25
Праймер R (20 пкмоль/мкл)	0,25
Деионизованная вода	до 25
Образец ДНК	5

При закладке планшета использовали следующие компоненты: приготовленные разведения СО с известной молярной концентрацией; анализируемый образец, массовая концентрация которого предварительно была измерена при помощи системы капиллярного электрофореза G1600A; отрицательный контроль.

Для отрицательного контроля применяли реакционную смесь, в которую вместо ДНК-матрицы добавляли такой же объем деионизированной воды.

Определение рабочего диапазона измерений проводилось при помощи калибровочной кривой, построенной программным модулем амплификатора по результатам проведения ПЦР разведений СО. Калибровочная кривая, снятая

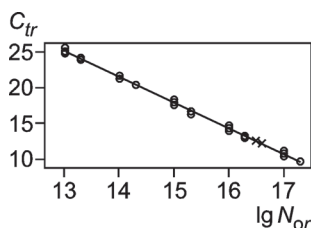


Рис. 2. Калибровочная кривая измерительных модулей CFX96 в составе термоциклеров C1000 Touch для амплификации нуклеиновых кислот

с использованием стандартного образца ГСО 9931—2011, представлена на рис. 2, при этом число циклов, отвечающих неизвестной концентрации n_x , помечено крестиком. На графике по оси ординат откладывали количество пороговых циклов C_{tr} с которых начиналась накопительная стадия ПЦР, а по оси абсцисс — логарифм значений десяти рабочих концентраций СО.

Последовательность действий при испытаниях (рекомендована производителем реактивов):

- шаг № 1 (денатурация) при 95 °С в течение 30 с;
- шаг № 2 (отжиг) при 95 °С в течение 5 с;
- шаг № 3 (элонгация) при 60 °С в течение 20 с;
- переход на шаг № 2, состоящий из 35—40 повторов.

Испытания проводили четыре раза, что отражено в четырех протоколах испытаний, о которых говорилось выше. Для определения метрологических характеристик использовали результаты измерений с наибольшими значениями среднеквадратического отклонения. Оказалось, что рабочий диапазон измерений находится в пределах 10^{13} — 10^{17} молекул в мкл раствора.

Границы погрешности измерения молярной концентрации вычисляли по стандартной процедуре, предусмотренной в [6]. Учитывали, что основной вклад в неисключенную систематическую погрешность вносит погрешность измерения концентрации СО, составляющая $\pm 11\%$ при доверительной вероятности $P = 0,95$. Исходная массовая концентрация СО — 49 нг/мкл. Пересчет массовой концентрации (нг/мкл) в концентрацию, измеряемую числом молекул в мкл раствора, осуществляли по формуле

$$N = C N_A / (X M) \cdot 10^6, \quad (7)$$

где $C = 49 \cdot 10^{-9}$ г/мкл — массовая концентрация СО; $N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ моль $^{-1}$ — число Авогадро; $X = 271$ нуклеотид — длина СО; $M = 660$ г/моль — средняя молярная масса.

При проведении измерений исходный СО был разведен до концентрации 7 нг/мкл, что соответствует $2,5 \cdot 10^{18}$ молекул в мкл раствора. Для анализа был взят образец с концентрацией $4 \cdot 10^{16}$ молекул в мкл раствора. Концентрация ана-

лизируемого образца, полученная при помощи калибровочной кривой, на основании проведенных четырех независимых измерений, оказалась равной $3,91 \cdot 10^{16}$ числу молекул в мкл раствора, а относительная погрешность ее измерения $\pm 34\%$.

Таким образом, в результате испытаний с целью утверждения типа измерительных модулей CFX96 в составе термоциклеров C1000 Touch для амплификации нуклеиновых кислот были определены их метрологические характеристики и показана возможность использования для измерения концентрации молекул ДНК. Этими испытаниями разработка системы МО для АРВ не исчерпывается. Для полноты системы необходима разработка и аттестация соответствующей методики измерений, желательно референтной, одной из основных задач которой станет уменьшение погрешности используемых СО в результате улучшения технологии их приготовления, так и за счет совершенствования методики определения их метрологических характеристик.

Л и т е р а т у р а

1. **Рибриков Д. В. и др.** ПЦР «в реальном времени». 2-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009.
2. **Голубев С. С. и др.** Метрологическое обеспечение систем быстрой медицинской диагностики // Метрология. 2012. № 10. С. 5—13.
3. **Голубев С. С. и др.** Выбор эталона для определения нуклеотидных последовательностей молекул ДНК // Измерительная техника. 2011. № 12. С. 45—47; **Golubev S. S. e. a.** Selection of a reference sequence for the determination of nucleotide sequences in DNA molecules // Measurement Techniques. 2011. V. 54. N. 12. P.1408—1411.
4. **Голубев С. С. и др.** Метрологическое обеспечение секвенирования молекул ДНК // Измерительная техника. 2012. № 3. С. 64—72; **Golubev S.S. e. a.** Metrological support for DNA sequencing // Measurement Techniques. 2012. V. 55. N. 12. P. 345—350.
5. **BIO-RAD** [Офици. сайт]. <http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/cfx96-touch-real-time-pcr-detection-system> (дата обращения 10.07.2013 г.).
6. **ГОСТ Р 8.736—2011.** ГСИ. Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения.

Дата принятия 13.10.2012 г.