

14.09

Модель генерации флуоресцентного сигнала интеркаляционного красителя в ходе полимеразной цепной реакции

© А.А. Федоров,¹ Д.Г. Сочивко,² Д.А. Варламов²

¹ Институт аналитического приборостроения РАН,
190103 Санкт-Петербург, Россия

² ЗАО „Синтол“,
127550 Москва, Россия
e-mail: f_aa@mail.ru

Поступило в Редакцию 19 декабря 2019 г.

В окончательной редакции 25 февраля 2020 г.

Принято к публикации 3 марта 2020 г.

В настоящее время предложен ряд моделей полимеразной цепной реакции, имеющих своей целью получение точных количественных оценок результатов реакции. В таких моделях обычно отождествляют кинетику продукта реакции и используемого флуоресцентного репортера. Предложена модель полимеразной цепной реакции, результаты которой регистрируют с помощью интеркаляционного красителя. Анализ результатов моделирования демонстрирует заметные различия между кинетикой продукта реакции и флуоресцентным сигналом связанного интеркалятора.

Ключевые слова: модель полимеразной цепной реакции, кинетическая кривая, интеркалирующий краситель.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49693.422-19

Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является ключевым молекулярно-генетическим методом, применяемым для решения широкого круга научных и практических задач выявления и количественного анализа специфических последовательностей ДНК. В основе метода лежит амплификация целевого фрагмента ДНК, т.е. многократное циклическое копирование определенного участка ДНК, выделяемого с помощью фланкирующих одноцепочечных олигонуклеотидов — праймеров. На каждом цикле реакции происходит удвоение количества амплифицируемых фрагментов.

Первоначально ПЦР не использовали как количественный метод. Длительное время учет результатов ПЦР проводили по окончании реакции с помощью гелеэлектрофореза, анализируя наличие фрагментов заданной длины. Позднее было предложено усовершенствовать технологию ПЦР за счет регистрации продуктов реакции непосредственно в процессе ее проведения, в результате чего появился метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ; real-time PCR) [1].

В работе [1] было продемонстрировано, что постановка ПЦР в присутствии известного интеркалирующего красителя ДНК, бромистого этидия, позволяет проследить накопление копий амплифицируемого фрагмента на каждом цикле. Это позволяет построить кинетическую кривую процесса [2], имеющую сигмоидный характер с начальным фоновым участком, участком экспоненциального роста, переходящим в фазу насыщения. Чем больше исходных фрагментов вносят в реакцию, тем раньше ее кинетическая кривая отрывается от фонового уровня,

при этом разница в 1 цикл реакции соответствует 2-кратной разнице в начальной концентрации фрагмента. Для количественного анализа обычно применяют контрольные образцы с известной концентрацией целевого фрагмента ДНК, относительно которых вычисляют концентрацию исследуемых образцов.

Интеркаляция — обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами. Интеркалирующие красители (ИК) это группа флуоресцентных органических соединений, способных к нековалентному связыванию с одно- и/или двуцепочечной ДНК, при этом связывание с ДНК приводит к значительному усилению флуоресценции. В настоящее время широко применяется краситель SYBR Green I с длиной волны эмиссии 520 nm, флуоресценция которого возрастает более чем в 100 раз в результате связывания с двуцепочечной ДНК. Данный краситель часто применяют для детекции продуктов в ходе ПЦР-РВ. В высоких концентрациях SYBR Green I ингибирует ДНК-полимеразу, в результате снижается эффективность амплификации.

Основным недостатком использования ИК для ПЦР-РВ является способность связываться с любой двуцепочечной ДНК, появляющейся в реакционной смеси, в результате чего флуоресцентный сигнал может генерироваться как целевым продуктом ПЦР, так и неспецифическими продуктами побочных реакций. Поэтому для получения корректных результатов обычно дополнительно подтверждают наличие целевого продукта амплификации с помощью температурной денатурации („плавления“) ампликонов. В связи с возможностью ошибочных результатов ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями, несмотря на дешевизну и удобство, в

практической ДНК-диагностике используют с осторожностью.

Альтернативным способом детекции продуктов ПЦР-РВ является использование специфических одноцепочечных олигонуклеотидов, комплементарных анализируемой ДНК-мишени, называемых гибридизационными зондами. На концах зонда ковалентно присоединены молекулы флуоресцентного красителя и тушителя флуоресценции, в результате чего в растворе зонд флуоресцирует слабо. В процессе работы ДНК-полимеразы зонд, связавшийся с амплифицируемым фрагментом, расщепляется за счет экзонуклеазной активности фермента, тушитель и краситель высвобождаются, и флуоресценция красителя многократно возрастает. Поскольку последовательность зонда может связаться только с целевым фрагментом, специфичность детекции продуктов ПЦР-РВ становится практически абсолютной.

В силу различных механизмов работы гибридизационных зондов и ИК, кинетические кривые ПЦР-РВ, полученные с их помощью, будут различаться. Это различие необходимо учитывать при разработке математических методов анализа ПЦР-РВ, а также математических моделей реакции.

Предложенные в опубликованных работах модели ПЦР позволяют генерировать кинетические кривые ПЦР-РВ как функции накопления копий целевого фрагмента ДНК. При оценке работы моделей обычно сопоставляют такие кривые с экспериментальными данными. Однако представление об эквивалентности экспериментальных и теоретических кривых представляется нам не совсем обоснованным, тем более что для получения экспериментальных кривых используются как гибридизационные зонды [3], так и ИК, в основном SYBR Green [4–7]. В случае, когда фактор флуоресцентной детекции оговаривается, авторы используют простую линейную зависимость для взаимного пересчета этих величин [6,7].

Ранее нами была предложена модель ПЦР-РВ, в которой флуоресцентный сигнал генерировался гибридизационным зондом [8]. Модель показала различие кривых продукта ПЦР и флуоресцентного сигнала, а также позволила с высокой точностью аппроксимировать экспериментальные кинетические кривые ПЦР-РВ.

В настоящей работе представлена модель ПЦР-РВ, в которой для генерации флуоресцентного сигнала использован интеркалирующий краситель. Предлагаемая модель учитывает основные компоненты и стадии процесса ПЦР, происходящие в течение одного цикла ПЦР.

1. Модель формирования флуоресцентного сигнала интеркалирующего красителя

На первой стадии каждого цикла ПЦР реакционная смесь нагревается до 95°C, в результате чего происходит

денатурация двухцепочной ДНК ($F \parallel F'$) на две комплементарные одноцепочные молекулы — F и F' . Далее смесь охлаждается, наступает стадия отжига, на которой специфические к 5'-концевому участку каждой из цепей праймеры Pr и Pr' имеют возможность гибридизоваться с цепями F и F' . Фермент ДНК-полимераза связывается с комплексом праймера и цепи. Далее наступает черед стадии элонгации, на которой фермент начинает достраивать новую, комплементарную цепь, используя нуклеотиды реакционной смеси. В случае успешного завершения синтеза одноцепочная молекула ДНК (F или F') превращается в двухцепочную молекулу — копию исходной ($F \parallel F'$).

Две исходные цепи F и F' могут соединиться обратно в исходную двойную цепь, даже если с одной из них или с обеими успели связаться праймеры, но элонгация еще не началась. Данная реакция принимается за необратимую, поскольку при типичной температуре элонгации диссоциация таких комплексов практически не происходит. Интеркалирующий краситель (I), связываясь со всеми двойными цепями, присутствующими в реакции, начинает генерировать сигнал, интенсивность которого предполагается пропорциональной количеству связанного ИК. Далее смесь опять нагревают для денатурации ДНК в реакционной смеси, и начинается следующий цикл.

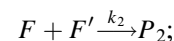
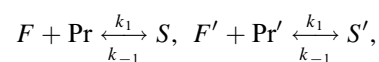
Введем следующие обозначения промежуточных комплексов данной реакции: S и S' — комплексы фрагмента ДНК и соответствующего праймера ($S = F + Pr$, $S' = F' + Pr'$); I — молекула ИК.

Все промежуточные комплексы в случае неучастия в синтезе комплементарной цепи диссоциируют при нагревании на исходные компоненты. Для продуктов реакции введем такие обозначения: P_1 и P'_1 — продукт — двойная цепь, полученная синтезом и не внесшая вклад во флуоресцентный отклик системы; P_2 — двойная цепь, полученная гибридизацией одиночных.

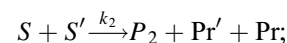
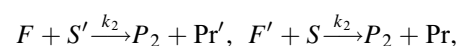
С точки зрения результата ПЦР, все перечисленные продукты не различаются между собой, поскольку являются просто двойными цепями $F \parallel F'$.

С помощью принятых обозначений схему реакций описанного процесса можно представить так:

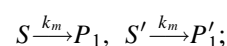
первичные реакции



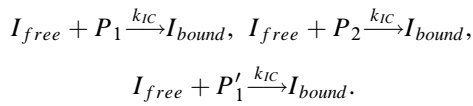
вторичные реакции



реакции синтеза продукта



реакции связывания ИК



Константа скорости ферментативного синтеза цепей k_M может быть представлена в виде $k_M = V_{max}/K_M$, где $V_{max} = 1 \cdot 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, а $K_M = 2 \cdot 10^{-9} \text{ М}$ [9,10].

Важным вопросом является описание работы ИК. Особенностью работы ИК является, во-первых, отсутствие определенного места связывания с ДНК (краситель связывается с любым участком двойной цепи). Во-вторых, поскольку молекула ИК существенно меньше, чем ДНК, и участок связывания по размеру соответствует примерно 5 нуклеотидам, очевидно, что на одну ДНК может сесть более одной молекулы ИК. Учитывая, что общая длина выделяемого праймерами и синтезируемого в ходе ПЦР фрагмента ДНК составляет около 100–150 нуклеотидов, теоретический предел связывания ИК к ДНК составляет 30 к 1. Исходя из этих фактов, будем рассматривать k_{IC} не как параметр, а как функцию, для которой введем следующее уравнение, описывающее превращение свободного ИК I_{free} в связанный I_{bound} .

$$k_{IC} = \begin{cases} 0, & I_{bound} > \Omega(P_1 + P_2 + P'_1) \\ k_1 \cdot \left(1 - \frac{I_{bound}}{\Omega(P_1 + P_2 + P'_1)}\right), & I_{bound} \leq \Omega(P_1 + P_2 + P'_1) \end{cases}, \quad (1)$$

где Ω — максимальное соотношение количества связанного ИК и двойных цепей. Поскольку данный параметр заранее неизвестен, его значение представляется целесообразным подобрать на этапе сравнения модельных ПЦР-РВ кривых с экспериментальными.

Будем считать, что процессы синтеза ДНК на обеих комплементарных цепях полностью идентичны, т.е. все концентрации комплементарных одноцепочечных фрагментов, все соответствующие константы ассоциации и диссоциации совпадают. С точки зрения модельной системы это означает возможность замены концентраций, содержащих штрихованные компоненты, на соответствующие нештрихованные: $C_F(t)$ на $C_{F'}(t)$, $C_S(t)$ на $C_{S'}(t)$ и т.д. В этом случае система модельных уравнений может быть несколько упрощена и представлена в виде

$$\begin{aligned} \frac{dC_F}{dt} &= -k_1 C_F C_{Pr} + k_{-1} C_S - k_2 C_F C_F - k_2 C_S C_F, \\ \frac{dC_{Pr}}{dt} &= -k_1 C_F C_{Pr} + k_{-1} C_S + k_2 C_S C_F + k_2 C_S C_S, \\ \frac{dC_S}{dt} &= k_1 C_F C_{Pr} - k_{-1} C_S - k_2 C_S C_F - k_2 C_S C_S - k_M C_S, \\ \frac{dC_{P_2}}{dt} &= k_2 C_F C_F + 2k_2 C_S C_F + k_2 C_S C_S, \\ \frac{dC_{P_1}}{dt} &= k_M C_S, \\ \frac{dC_I}{dt} &= k_{IC} (C_{P_2} + 2 \cdot C_{P_1}) (C_I^0 - C_I), \end{aligned} \quad (2)$$

где C_A — концентрация компонента A , C_I^0 — общая концентрация ИК.

Реализация предложенной модели была выполнена в виде программы на языке C++. Система (2) решалась численно методом Рунге–Кутты 4-го порядка. Программа позволяла повторять модельные вычисления заданное количество раз, имитируя необходимое количество последовательных циклов реакции. Для первого цикла ПЦР задавали начальную концентрацию цепей $C_F(0)$, праймеров $C_{Pr}(0)$, ИК $C_I(0)$ и длительность этапа синтеза ДНК T .

В конце цикла определялась концентрация синтезированных ДНК $C_{P_1}(T)$. Для следующего цикла количество исходной ДНК увеличивалось на величину $C_{P_1}(T)$, на эту же величину уменьшалась начальная концентрация праймера для следующего цикла. В ходе этапа элонгации свободный ИК превращался в связанный по формуле (1). Количество связанного ИК на момент окончания цикла давало точку модельной кривой ПЦР-РВ. По окончании цикла весь связанный ИК снова переходил в свободную форму, т.е. количество ИК не менялось в течение модельного эксперимента.

2. Результаты и выводы

Экспериментальные ПЦР-РВ кривые были получены с использованием тест-системы для ПЦР-РВ анализа гена Fc фрагмента IgG рецептора Ша человека (FCGR3A, GenBank NG_009066.1) производства ЗАО Синтол (г. Москва). Последовательность прямого праймера: CACATATTTACAGAATGGCAAAGG, обратного праймера: CTGAAGACACATTTTTACTCCCAA. Концентрация каждого праймера в реакционной смеси $C_{Pr}(0) = 200 \text{ нМ}$, фермента — 5 units, количество ДНК гена Fc в модельных образцах составляло 10^7 молекул ДНК на реакцию. В качестве ИК использовался SYBR GREEN I в концентрации 200 нМ. Объем реакционной смеси — 25 $\mu\text{л}$. Эксперимент был поставлен на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Параметры термоциклирования: предварительный нагрев до 95°C — 120 s, далее 50 циклов: 62°C — 30 s, 95°C — 15 s. Для модельных образцов было проведено пять дублирующих экспериментов и получено пять экспериментальных кривых ПЦР-РВ. Экспериментальные кривые хорошо воспроизводились, для нормированных на максимум ПЦР-РВ кривых дисперсия значений флуоресценции на каждом цикле не превышала 0.3%. На основании полученных данных была построена усредненная кривая ПЦР-РВ, которая и использовалась для сопоставления с результатами моделирования.

Результаты расчетов динамики интенсивности флуоресцентного сигнала по предложенной модели, а также соответствующая экспериментальная кривая ПЦР-РВ представлены на рис. 1. Видно, что модельная кривая хорошо аппроксимирует экспериментальную кривую ПЦР-РВ. Модель позволяет воспроизвести кинетику

начального участка роста кривой, что важно для практического использования модели при анализе результатов реакции.

На рис. 2 показано влияние параметра Ω на точность аппроксимации. Как видно, наибольшая точность аппроксимации соответствует параметру $\Omega = 1$, что соответствует начальным условиям реакции, поскольку концентрация ИК равна концентрации праймеров, и максимальное отношение связанного ИК к количеству двойных цепей равно единице.

На рис. 3 сопоставляются модельные кинетические кривые по флуоресцентному сигналу и накоплению копий ДНК. Как видно из представленных данных, кинетика этих кривых существенно различается: кривая флуоресцентного сигнала отстает от кривой накопления копий почти на 1 цикл. Если использовать аппрок-

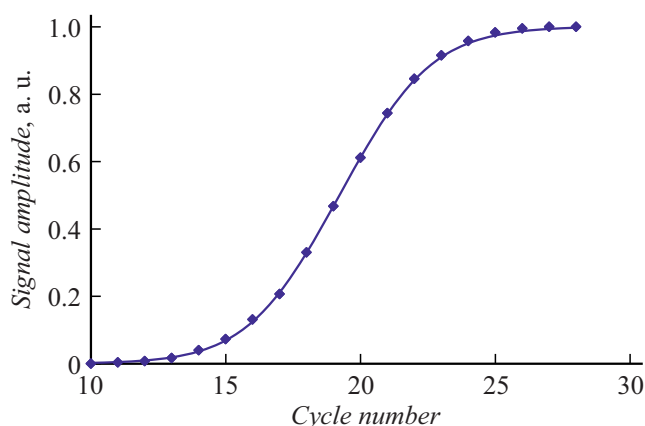


Рис. 1. Экспериментальная (сплошная линия) и модельная (ромбы) ПЦР-РВ кривые для 10^7 молекул ДНК в анализируемой пробе. Модельная кривая отражает количество связанного ИК на данном цикле реакции. Параметр $\Omega = 1$. По вертикальной оси отложены нормированные к максимуму значения функций.

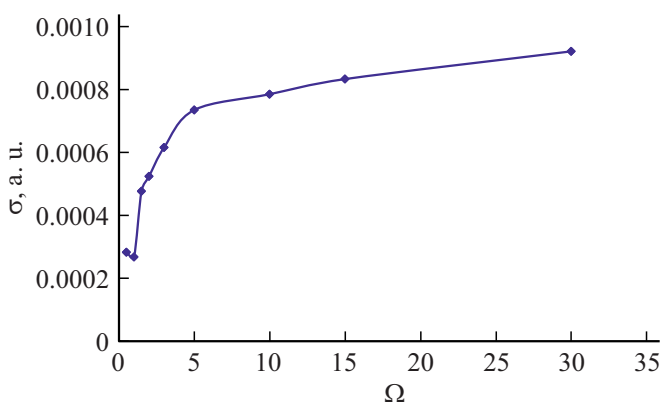


Рис. 2. Точность аппроксимации модельными кривыми ПЦР-РВ, соответствующими различным значениям параметра Ω , экспериментальной кривой для 10^7 молекул ДНК в пробе. В качестве параметра точности аппроксимации σ использована сумма разности квадратов значений модельной и экспериментальной ПЦР-РВ кривой.

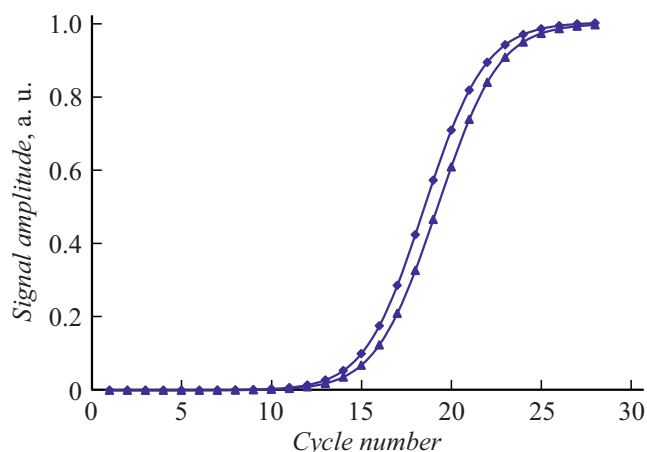


Рис. 3. Модельные кумулятивные кривые накопления копий исходной ДНК (ромбы) и связанного интеркаляционного красителя (треугольники) в ходе ПЦР-РВ. Функции нормированы на максимальные значения.

симацию флуоресцентного сигнала модельной кривой для анализа концентрации фрагментов в образце, то концентрация, полученная на основе модели, учитывающей только количество фрагментов, будет почти в два раза отличаться от реальной. В этой связи при аппроксимации экспериментальных данных, полученных с использованием ИК, следует применять специальную модель, отражающую динамику флуоресцентного сигнала ИК.

Представленные результаты демонстрируют высокую точность аппроксимации экспериментальных кривых ПЦР-РВ, что свидетельствует об адекватности предложенной модели. Важным результатом, полученным с помощью модели, является демонстрация того, что кривые накопления ДНК и сигнала связанного ИК не совпадают и не могут быть получены простым линейным пересчетом для всего диапазона ПЦР-РВ кривой. Следует отметить, что точность аппроксимации несколько ниже, чем для ранее опубликованной модели с зондом [8], что можно объяснить рядом не учтенных в модели эффектов, таких как кооперативность связывания ИК, ингибирование ИК самой реакции и „выгорание“ красителя.

Финансирование работы

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках Государственного задания 075-00780-19-02 по теме № 0074-2019-0013 Министерства науки и высшего образования РФ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Higuchi R., Dollinger G., Walsh S., Griffith R. // *Biotechnology* 1992. Vol. 10. P. 413–417.
- [2] Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. // *Biotechnology*. 1993. Vol. 11. P. 1026–1030.
- [3] Smith M.V., Miller C.R., Kohn M., Walker N.J., Portier C.J. // *BMC Bioinformatics*. 2007. Vol. 8. N 1. P. 409.
- [4] Jones M.E., Mayne G.C., Wang T., Watson D.I., Hussey D.J. // *BMC Bioinformatics*. 2014. Vol. 15. P. 372.
- [5] Lievens A., Van Aelst S., Van den Bulcke M., Goetghebeur E. // *PLoS One*. 2012. Vol. 11. P. e47112.
- [6] Rutledge R.G., Stewart D. // *PLoS One*. 2010. Vol. 3. P. e9731.
- [7] Liu W., Saint D.A. // *Anal. Biochem*. 2002. Vol. 302. P. 52–59.
- [8] Федоров А.А., Сочивко Д.Г., Варламов Д.А., Курочкин В.Е. // *ЖТФ*. 2018. Т. 88. Вып. 10. С. 1478–1481. [Fedorov A.A., Sochivko D.G., Varlamov D.A., Kurochkin V.E., Petrov R.V. // *Tech. Phys*. 2019. Vol. 63. P. 1430–1434.]
- [9] Сочивко Д.Г., Федоров А.А., Варламов Д.А., Курочкин В.Е., Петров Р.В. // *ДАН*. 2016. Т. 466. С. 109–113. [Sochivko D.G., Fedorov A.A., Varlamov D.A., Kurochkin V.E., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics* 2016. Vol. 466. P. 13–16.]
- [10] Сочивко Д.Г., Федоров А.А., Алексеев Я.И., Курочкин В.Е., Дубина М.В. // *ДАН*. 2017. Т. 472. С. 726–729. [Sochivko D.G., Fedorov A.A., Varlamov D.A., Kurochkin V.E., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 472. P. 77–80.]