

УДК 543.426; 543.9

© Я. И. Алексеев, Ю. В. Белов, Д. А. Варламов, С. В. Коновалов,
В. Е. Курочкин, Н. Ф. Маракушин, А. И. Петров, А. О. Петряков,
Д. А. Румянцев, Е. Ю. Скоблилов, В. Н. Соколов, В. А. Фесенко, А. В. Чернышев

ПРИБОРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)

Разработаны анализаторы нуклеиновых кислот АНК-16 и АНК-32, в которых используется наблюдение сигналов флуоресценции в реальном масштабе времени в ходе полимеразной цепной реакции. Анализаторы снабжены реагентами и тест-системами и могут быть применены для выявления и количественного определения РНК и ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов к молекулярной диагностике различных болезней человека, животных и растений и к анализу различных биологических объектов является использование амплификационной технологии специфической детекции ДНК или РНК. В России на сегодняшний день практически в 100 % лабораторий, занимающихся лабораторной диагностикой, используется метод ПЦР. По нашим данным, около 80–90 % этих лабораторий используют электрофорез в агарозном геле в качестве метода для детекции продуктов амплификации. Это трудоемкий метод, обладающий множеством недостатков.

В рамках данной технологии наиболее современным методом детекции нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Одним из основных достоинств ПЦР-РВ является возможность получения информации о наличии, количестве и возможных изменениях в последовательности нуклеиновых кислот непосредственно в ходе реакции, что существенно упрощает, укорачивает и удешевляет ПЦР-анализ. Кроме того, количественные измерения, проводимые с помощью ПЦР-РВ, отличаются рекордно низким коэффициентом вариации и наиболее широкий линейный диапазон, что позволяет рассматривать данный метод (среди любых альтернативных) в качестве приоритетного метода определения концентрации ДНК/РНК в исследуемых пробах.

Для реализации условий полимеразной цепной реакции анализируемые образцы смешиваются в пробирках с реакционной смесью, в состав которой входят:

- праймеры — искусственно синтезированные

олигонуклеотиды, которые обеспечивают специфичность реакции;

- ДНК-полимераза — термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК;
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, используемых ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;
- интеркалирующий краситель или специфические зонды;
- буфер — смесь катионов и анионов, обеспечивающих оптимальные условия для реакции.

Для ПЦР-РВ используются одноразовые полипропиленовые пробирки с герметичными крышками, таким образом, снижается риск контаминации помещений. Пробирки устанавливаются в термостат, работающий в циклическом температурном режиме. При нагревании пробирок до 95 °С молекулы анализируемых образцов ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени и ограничивают искомый фрагмент. При температуре порядка 60 °С ДНК-полимераза достраивает вторую цепь ДНК с 3'-конца праймера.

При малой концентрации анализируемых образцов температурный цикл амплификации повторяется до 50 раз. Реактивы обеспечивают избирательность полимеразной цепной реакции и позволяют выделить искомую ДНК на фоне других. При каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК. Концентрация исходных специфических фрагментов ДНК увеличивается приблизительно как 2^N , где N — количество циклов.



Рис. 1. Анализатор АНК

В основе используемого нами метода ПЦР-РВ лежит наблюдение сигналов флуоресценции в ходе реакции. Увеличение сигналов происходит благодаря использованию специфического для данной ДНК зонда, который, подобно праймеру, в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК. В ходе синтеза комплементарной цепи благодаря 5'-3'-нуклеазной активности ДНК-полимеразы зонд расщепляется. Он содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце — гаситель флуоресценции. После расщепления происходит разобщение красителя и гасителя, что приводит по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

По изменению сигнала флуоресценции можно проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла — величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать об-

разцы между собой. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше значение порогового цикла. При использовании многоцветного флуориметра можно использовать до четырех красителей и обнаружить до четырех разных специфических фрагментов ДНК в каждой пробирке одновременно. Например, для обнаружения и определения процентного содержания генетически модифицированной (ГМ) сои Roundup Ready™ используются две независимые реакции в одной пробирке. Первая реакция позволяет обнаружить присутствие ДНК гена лектина, который присутствует как в ГМ, так и в обычной сое. Вторая реакция позволяет обнаружить присутствие в геноме сои генетической модификации. Наличие положительной динамики для обеих реакций говорит о наличии ГМ сои, а сравнение значений порогового цикла позволяет определить процентное содержание ГМ в общем количестве ДНК сои. Каждая реакция имеет свой флуоресцентный краситель. Для обнаружения лектина сои используется зонд, меченный R6G, а для ГМ — зонд, меченный ROX.

Имея целый ряд преимуществ, метод ПЦР-РВ тем не менее не внедрен в России в полной мере. Первые попытки как зарубежных, так и отечественных компаний, направленные на продажу оборудования для ПЦР-РВ, сталкиваются в настоящее время с определенными трудностями, связанными в первую очередь с крайне высокими ценами на импортные приборы, практически полным отсутствием на российском рынке импортной реagentной базы, а также отсутствием клинической апробации для недавно появившихся отечественных тест-систем и оборудования для ПЦР-РВ.

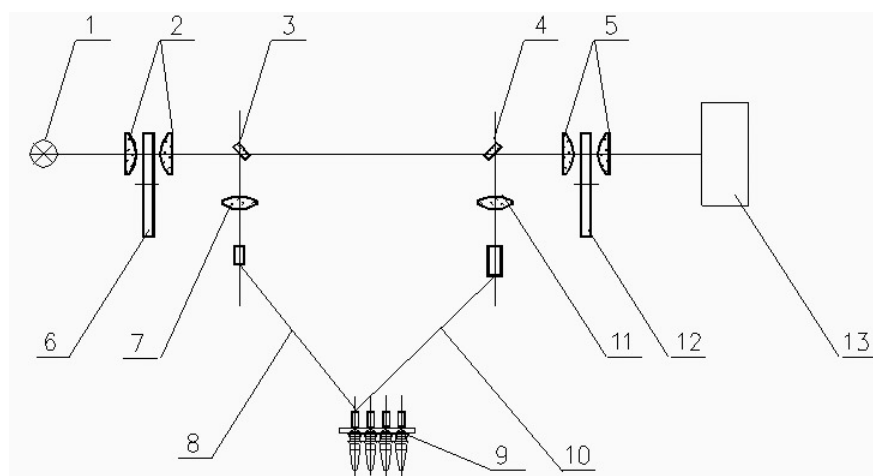


Рис. 2. Упрощенная оптическая схема анализатора АНК.

1 — источник излучения; 2 и 5 — двухлинзовые конденсоры; 3 и 4 — вращающиеся зеркала; 6 и 12 — сменные интерференционные светофильтры; 7 и 11 — линзы; 8 и 10 — световодные жгуты; 9 — пробирки; 13 — приемник излучения

ОПИСАНИЕ ПРИБОРОВ

Созданы анализаторы нуклеиновых кислот АНК-16 и АНК-32, позволяющие выполнить одновременно генетический анализ 16 и 32 образцов; производится разработка более производительного прибора АНК-96 (анализ 96 образцов одновременно), не уступающего по характеристикам и производительности лучшим мировым аналогам.

Анализаторы АНК-16 и АНК-32, внешний вид которых показан на рис. 1, имеют следующие компоненты.

- Нижний блок — амплификатор [1–4] — выполняет функцию прецизионного циклического термостата и обеспечивает возможность экспоненциального увеличения количества продуктов амплификации при наличии в образце искомой ДНК (РНК) (разработчик — МГТУ им. Н.Э. Баумана).

- Верхний блок — оптический [5–7] — измеряет сигнал флуоресценции образцов. В этой оптимизированной конструкции для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновых кислот применена оригинальная оптическая система (рис. 2), содержащая источник излучения 1 (галогеновая лампа) и приемник излучения 13 (фотоэлектронный умножитель). Между линзами конденсоров 2 и 5 установлены сменные интерференционные светофильтры возбуждения 6 и эмиссии 12. Для передачи света возбуждения от источника и излучений флуоресценции из пробирок 9, расположенных в амплификаторе, используются световодные жгуты 8 и 10. Переключение световых пучков между световодами обеспечивается с помощью вращающихся зеркал 3 и 4 и линз 7 и 11. Световодные жгуты выполнены в виде оптических волокон с коаксиально расположенными центральной частью для возбуждения реакционной смеси в пробирках и периферийной частью для сбора флуоресценции.

Диаметры центральной части световода d_1 и периферийной части d_2 были выбраны из соотношения $d_1 / d_2 = 1/3$.

Условия апертурного согласования центральной части световода с количеством реакционной смеси в пробирке 10 были определены по формуле $\alpha = 2 \arctg(d / 2l)$, где α — угол светового пучка на выходе из центральной части световода; d — диаметр поверхности реакционной смеси в пробирке; l — расстояние от торца центральной части световода до реакционной смеси в пробирке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

- При испытаниях анализаторов АНК было определено, что изменение количества продуктов амплификации в реакционной смеси пропорцио-

нально изменению сигнала в ходе амплификации. Ниже приведены последние результаты, подтверждающие высокие технические характеристики анализаторов АНК и их эксплуатационные возможности.

- Анализаторы АНК позволяют идентифицировать незначительные различия в исходном количестве ДНК (на рис. 3 показаны кривые амплификации для 5 и 10 тысяч копий).

- Широкий динамический диапазон определения количества ДНК — от единичных до $5 \cdot 10^9$ копий (рис. 4).

- Высокая точность и воспроизводимость результатов анализов показаны на рис. 5. Разброс значений пороговых циклов для 32 одинаковых образцов составляет 0.11 единиц пороговых циклов.

- Четырехцветное измерение сигнала флуоресценции обеспечивает возможность постановки мультиплексной ПЦР. Например, нами проводились три одновременные независимые реакции в одном образце, при этом была использована тест-система для обнаружения ДНК *M. tuberculosis*.

Количественный анализ выполняется методом сравнения с использованием калибровочных образцов с известной концентрацией специфических фрагментов ДНК. В частности, количественное определение ГМО растительного происхождения основано на расчете отношения количества ДНК определенной линии ГМ растения к общему количеству ДНК анализируемого растения, выраженного в процентах. Для построения калибровочной прямой используется разность значений пороговых циклов двух реакций. На рис. 6 показан график, полученный в результате автоматического расчета на основании экспериментальных данных от калибровочных образцов. В верхнем углу рисунка приведено аналитическое выражение калибровочной прямой. С помощью калибровочной прямой рассчитывается процентное содержание ДНК ГМО в анализируемых образцах [8]. На графике рис. 6 разности значений пороговых циклов двух реакций, равной 6, соответствует величина $\lg(\text{ГМИ} [\%]) = 0$ и содержание ГМО, равное 1 %.

Для анализаторов разработано программное обеспечение, которое рассчитано на работу в среде Windows NT, 95/98, 2000 и XP и позволяет проводить автоматический анализ одновременно всех образцов по четырем длинам волн возбуждения флуоресценции, автоматически обрабатывать и анализировать результаты, создавать, сохранять и архивировать протоколы исследования в заданном виде.

Анализаторы могут быть применены для выявления и количественного определения РНК и ДНК с использованием реагентов и тест-систем (разработчик — ЗАО "СИНТОЛ"), более дешевых, чем тест-системы других производителей. Для этих целей разработаны:

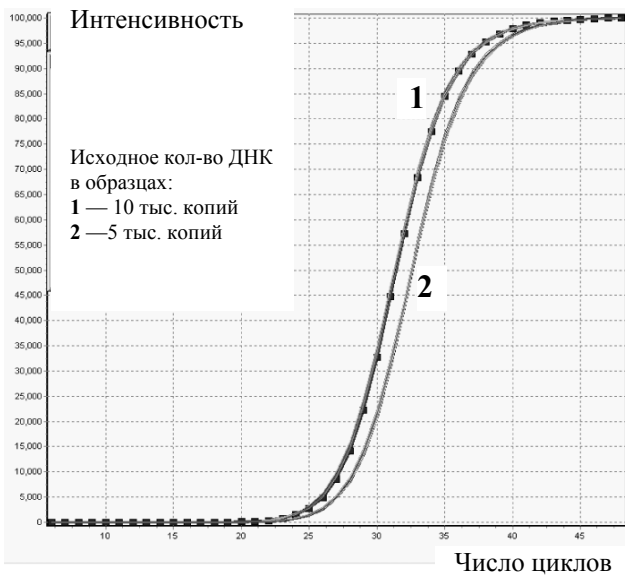


Рис. 3. Кинетические кривые амплификации фрагмента ДНК гена иммуноглобулина G человека

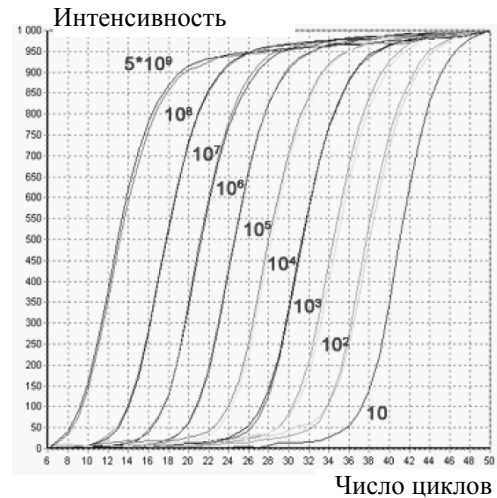


Рис. 4. Тест-система для обнаружения ДНК генетически модифицированных организмов (ГМО), (35S-промотор). Кривые помечены исходным кол-вом ДНК в образцах

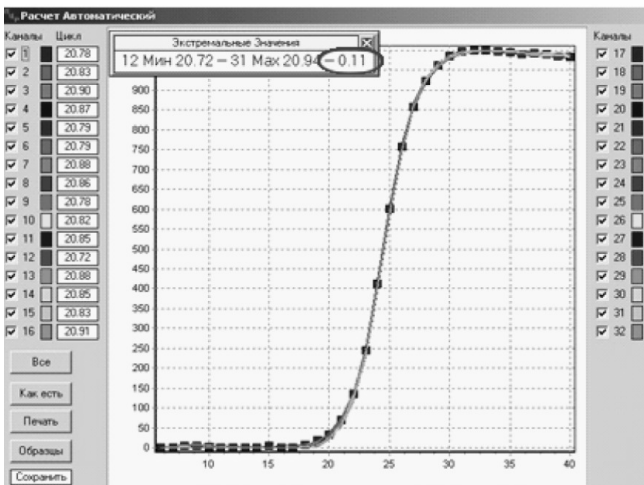


Рис. 5. Кинетические кривые амплификации 32 одинаковых образцов. Разброс результатов — 0.11

- ДНК и РНК — олигонуклеотиды и реактивы для их синтеза, флуоресцентные красители, модифицированные олигонуклеотиды, зонды и наборы реактивов для проведения ПЦР в реальном времени;
- адаптированные тест-системы молекулярной диагностики социально-значимых инфекционных болезней, например наборы реагентов для диагностики туберкулеза;
- тест-системы для анализа ГМО в пищевых продуктах и продовольственном сырье [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подтверждены высокие эксплуатационные и технические характеристики анализаторов АНК:

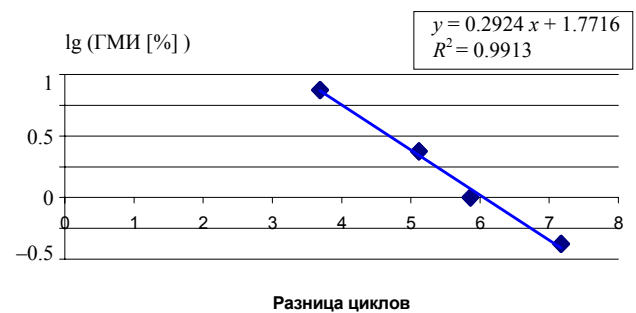


Рис. 6. Результат построения калибровочной прямой при определении процентного содержания генетически модифицированной сои

- количественное определение ДНК/РНК — от единичных до 10^9 копий;
- 4-цветная детекция красителей, возможность детектировать все основные красители — SYBR Green 1, FAM, R6G, HEX, JOE, ROX, TAMRA, Cy5 и др.;
- возможность сравнительного количественного анализа 4 различных ДНК в одной пробирке одновременно;
- высокая чувствительность по всем каналам детекции, позволяющая работать с очень малым количеством зонда (от 0.5 пмоль на реакцию);
- удобное программное обеспечение, современные алгоритмы расчета значений пороговых циклов

и широкий выбор вариантов анализа данных;

- экономия времени, снижение риска контаминации, упрощение организации ПЦР-лаборатории;
- стоимость существенно ниже импортных аналогов, т. к. приборы, программное обеспечение, реагенты и тест-системы отечественного производства.

Анализаторы АНК-16 и АНК-32 были разработаны в результате выполнения НИОКР "Приборы для определения числа и последовательности нуклеиновых кислот" в рамках Государственного контракта № 40.032.11.13 от 1 апреля 2002 г. по заказу Минпромнауки России: раздел "Научное приборостроение" блока "Ориентированные фундаментальные исследования" федеральной целевой научно-технической программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники" на 2002–2006 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернышев А.В., Белова О.В. Метод решения сопряженной задачи конвективного теплообмена на примере термостатирующего устройства // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана, серия "Машиностроение". 1998. № 4. С. 77–87.
 2. Чернышев А.В. Основы теории расчета электропневмомеханического оборудования для анализа ДНК // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 1. С. 53–65.
 3. Чернышев А.В. Концептуальная модель расчета оборудования для проведения полимеразной цепной реакции // Сб. докладов V Научно-технической конференции "Медико-технические технологии на страже здоровья", 04–11 октября 2003 г., Шарм Эль Шейх, Египет.
 4. Чернышев А.В., Бакай Д.А. и др. Моделирование теплового состояния микропробирок с образцами в ходе полимеразной цепной реакции // Научное приборостроение. 2005. Т. 15, № 3. С. 54–62.
 5. Бурьлов Д.А. и др. Малогабаритный сенсорный анализатор // Журнал аналитической химии. 1997. Т. 52, № 5. С. 552–556.
 6. Курочкин В.Е. Тенденции развития аналитического приборостроения // Тезисы докладов 2-й Всероссийской конференции "Аналитические приборы", 27 июня–1 июля 2005 г., СПб., Россия. С. 3.
 7. Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е. и др. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе множества амплификаций нуклеиновой кислоты. Заявка на изобретение № 2005120518/13 (023192) от 23 июня 2005 г.
 8. Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье тест-системами производства ЗАО "Синтол". Методические рекомендации МР № 02.008 – 06. Москва, 2006 г.
- ЗАО "СИНТОЛ", Москва (Алексеев Я.И., Варламов Д.А.)*
Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Белов Ю.В., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О.)
Вирусологический центр Научно-исследовательского института микробиологии (ВЦ НИИМ) МО РФ, Сергейев Посад (Румянцев Д.А.)
Войсковая часть 34435 (Скоблilов Е.Ю., Фесенко В.А.)
ОАО "Научные приборы", Санкт-Петербург (Соколов В.Н.)
Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана (Чернышев А.В.)

Материал поступил в редакцию 18.07.2006.

DEVICES FOR DIAGNOSTICS OF BIOLOGICAL OBJECTS BASED ON THE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) METHOD

Ya. I. Alexeev¹, Yu. V. Belov², D. A. Varlamov¹, S. V. Konovalov², V. E. Kurochkin², N. F. Marakushin², A. I. Petrov², A. O. Petryakov², D. A. Rumyantsev³, E. Yu. Skoblilov⁴, V. N. Sokolov⁵, V. A. Fesenko⁴, A. V. Chernyshev⁶

¹ZAO SYNTOL, Moscow; ²Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg; ³Centre of Virusology, Research Institute of Microbiology (VC NIIM MO RF), Sergiev Posad; ⁴Military Unit 34435; ⁵OAO "Nauchnye Pribory", Saint-Petersburg; ⁶N.E. Bauman Moscow State Technical University

The paper presents ANK-16 and ANK-32 nucleic acid analyzers based on real-time observation of fluorescence signals during the polymerase chain reaction. The devices are supplied with reagents and test systems and can be used for detection and quantitative determination of RNA and DNA.