

# **Описание взаимодействия интеркаляционного красителя и ДНК в рамках модели равновесного приближения**

*ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН*

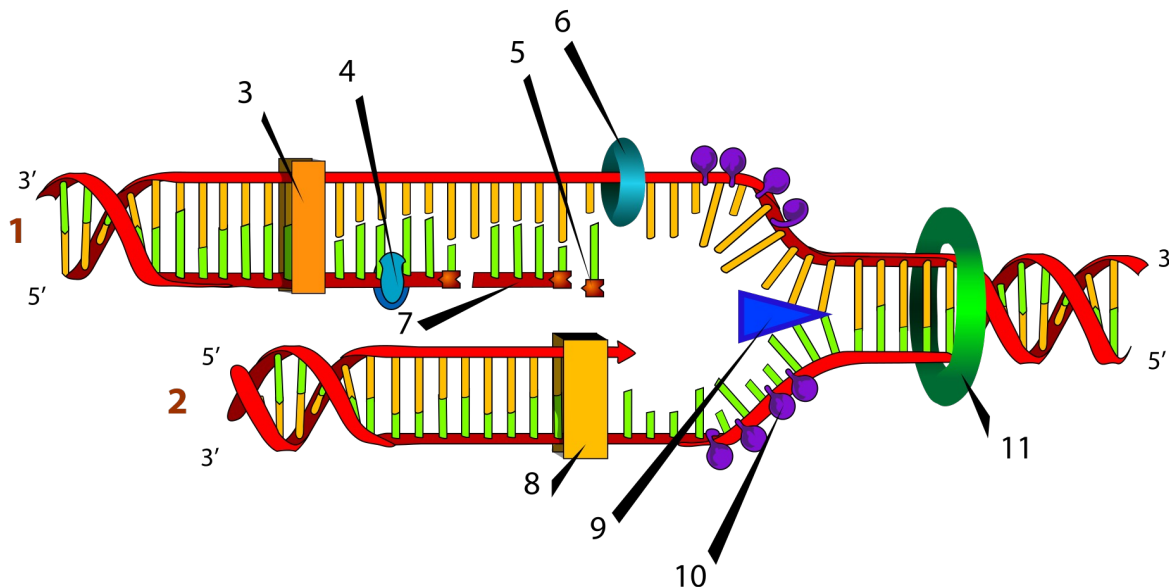
*ЗАО «Синтол»*

*А.А. Фёдоров, Д.Р. Ибрагимов*

# Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

– биохимический метод, позволяющий получить большое количество копий интересующего фрагмента ДНК. ПЦР используется для качественного и количественного анализа ДНК во многих областях биомедицинских исследований, в лабораторной диагностике инфекций, медико-генетическом анализе, в криминалистике и т.д.

**Репликация ДНК** — процесс создания двух дочерних молекул ДНК на основе родительской молекулы ДНК. С помощью специальных ферментов двойная спираль материнской ДНК расплетается на две нити, на каждой образовавшейся нити достраивается вторая нить, образуя две идентичных дочерних молекулы ДНК, которые затем скручиваются в отдельные спирали.

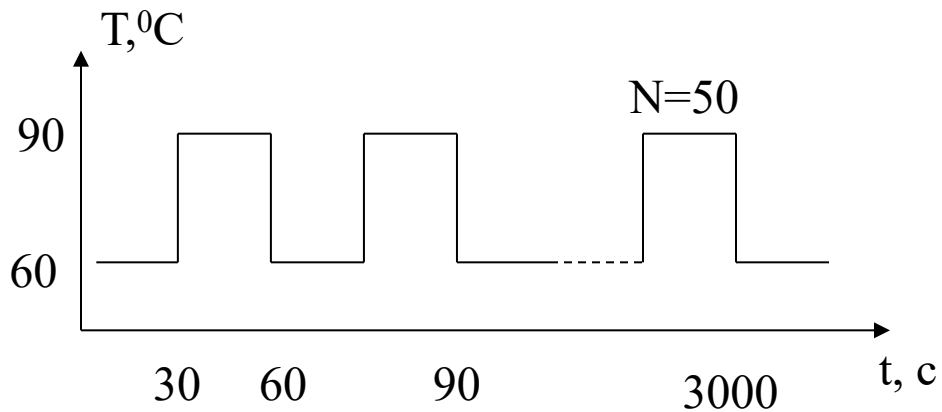
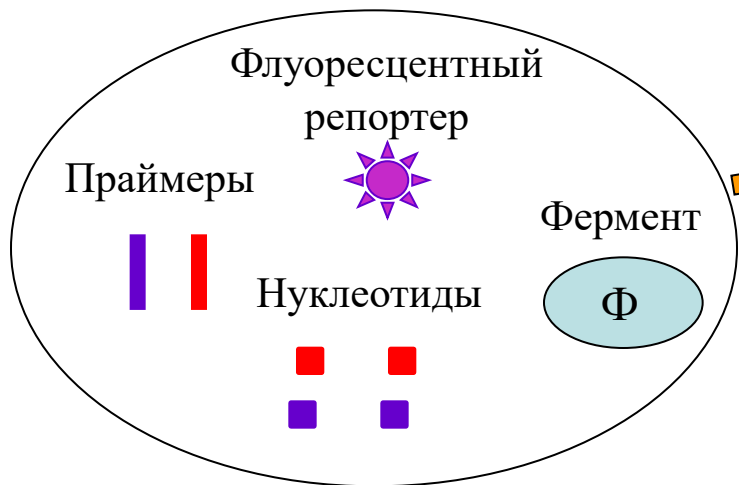


Схематическое изображение процесса репликации, цифрами отмечены: (1) запаздывающая нить, (2) лидирующая нить, (3) [ДНК-полимераза](#) ( $Pol\alpha$ ), (4) [ДНК-лигаза](#), (5) [РНК-праймер](#), (6) [праймаза](#), (7) [фрагмент Оказаки](#), (8) [ДНК-полимераза](#) ( $Pol\delta$ ), (9) [хеликаза](#), (10) [белки, связывающие одноцепочечную ДНК](#), (11) [топоизомераза](#)

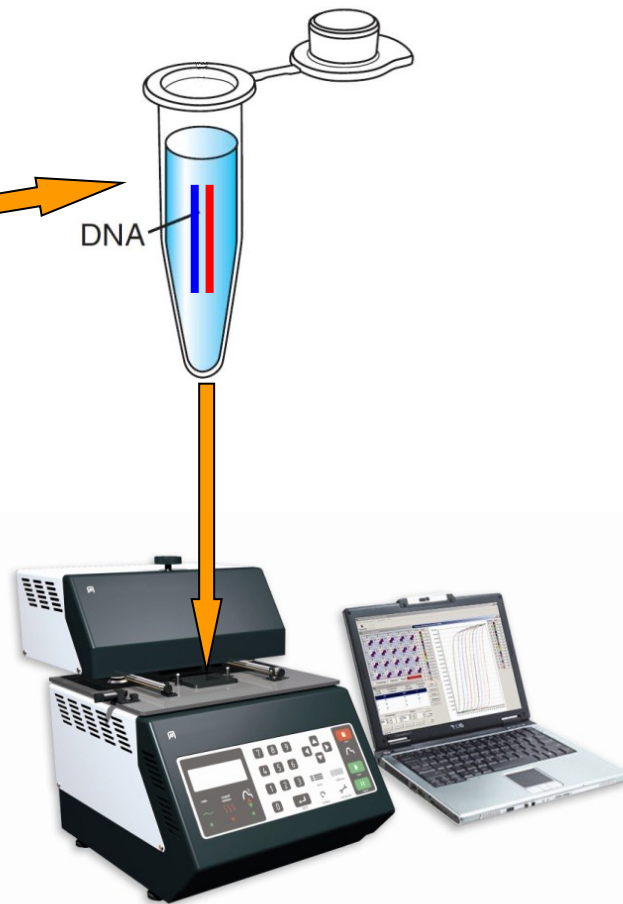
Источник: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Репликация\\_ДНК](https://ru.wikipedia.org/wiki/Репликация_ДНК)

# Прибор ПЦР-РВ = термоциклер + флуориметрический детектор

## Необходимые компоненты ПЦР

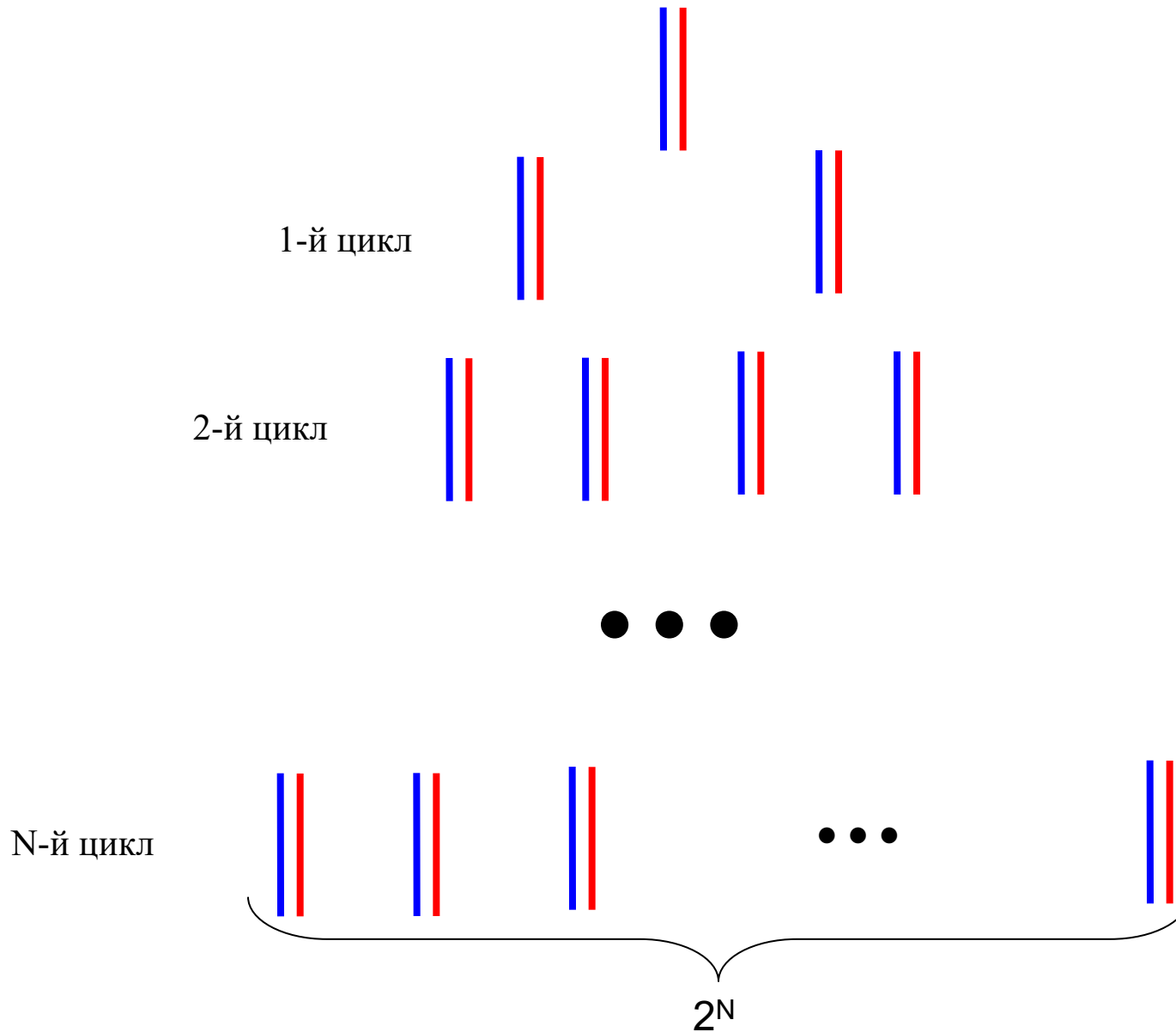


Режим термоциклирования

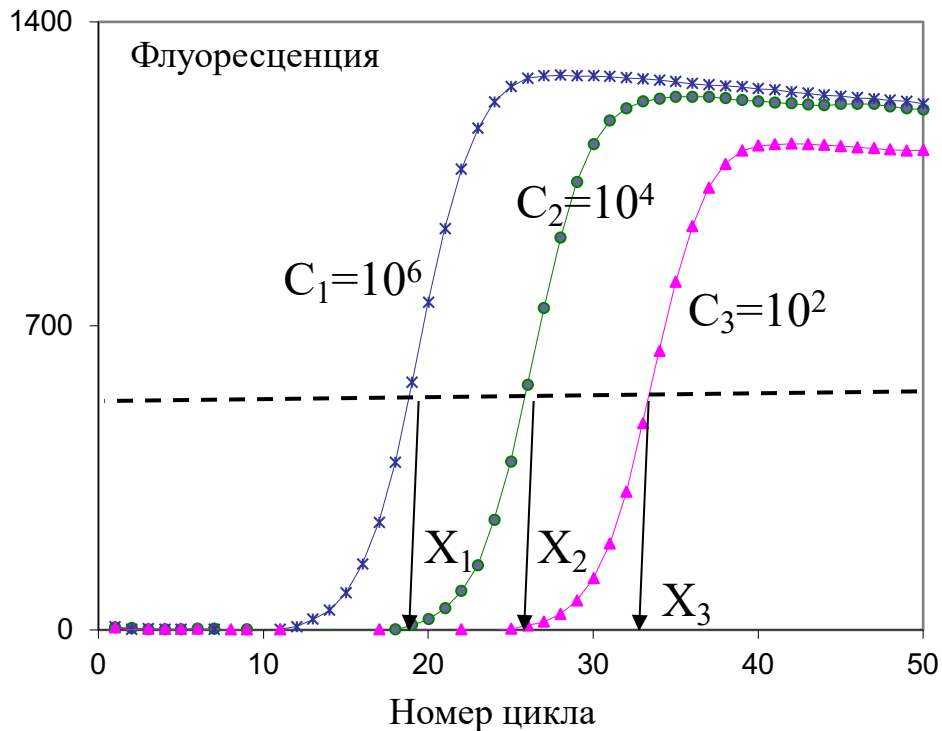


Прибор ПЦР-РВ  
АНК-32 (ИАП РАН)

# В ходе ПЦР происходит копирование (амплификация) фрагмента ДНК, определяемого подобранными праймерами

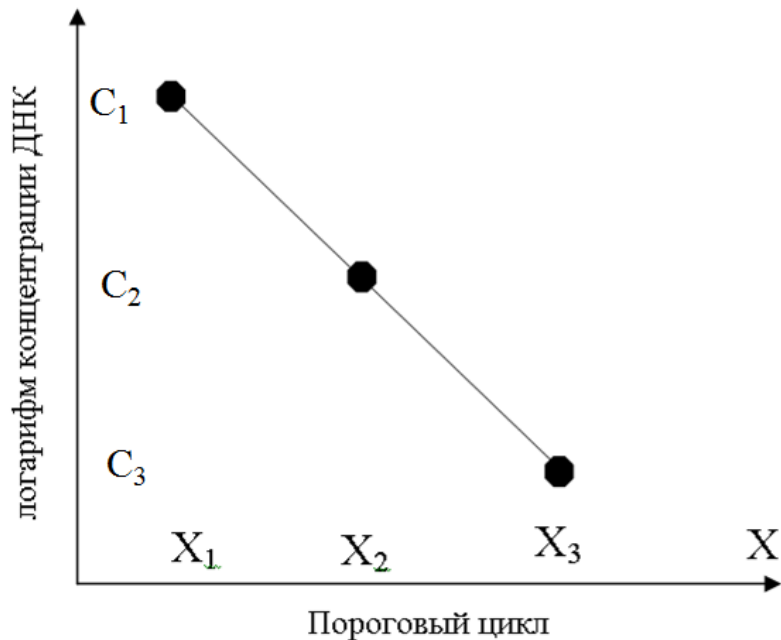


# Характерные флуоресцентные «кривые» ПЦР-РВ



$C_i$  – количество анализируемой ДНК в пробирке  $i$

Калибровочная кривая,  
используемая для  
определения концентраций  
ДНК в анализируемых  
пробах



# Факторы, влияющие на результаты ПЦР:

- Качество пробирок
- Равномерность температурных условий разных пробирок
- Примеси в анализируемых пробах
- Погрешности дозирования компонентов реакции
- Длина праймера
- Чистота матричной ДНК
- Низкие концентрации матричной ДНК
- Чистота и последовательность праймера
- Температура отжига реакции ПЦР
- Концентрация  $Mg^{2+}$
- Добавки, такие как диметилсульфоксид (ДМСО)
- ...

Clinical Chemistry 67:6  
829-842 (2021)

Review

## Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting

Jan M. Ruijter,<sup>a</sup> Rebecca J. Barnewall,<sup>b,c</sup> Ian B. Marsh,<sup>d</sup> Andrew N. Szentirmay,<sup>a</sup> Jane C. Quinn,<sup>b,c</sup> Robin van Houdt,<sup>f</sup> Quinn D. Gunst,<sup>a</sup> and Maurice J.B. van den Hoff<sup>a,\*</sup>

**BACKGROUND:** Quantitative PCR (qPCR) aims to measure the DNA or RNA concentration in diagnostic and biological samples based on the quantification cycle ( $C_q$ ) value observed in the amplification curves. Results of qPCR experiments are regularly calculated as if all assays are 100% efficient or reported as just  $C_q$ ,  $\Delta C_q$ , or  $\Delta\Delta C_q$  values.

**CONTENTS:** When the reaction shows specific amplification, it should be deemed to be positive, regardless of the observed  $C_q$ . Because the  $C_q$  is highly dependent on amplification efficiency that can vary among targets and samples, accurate calculation of the target quantity and relative gene expression requires that the actual amplification efficiency be taken into account in the analysis and reports. PCR efficiency is frequently derived from standard curves, but this approach is affected by dilution errors and hampered by properties of the standard and the diluent. These factors affect accurate quantification of clinical and biological samples used in diagnostic applications and collected in challenging conditions. PCR efficiencies determined from individual amplification curves avoid these confounders. To obtain unbiased efficiency-corrected results, we recommend absolute quantification with a single undiluted calibrator with a known target concentration and efficiency values derived from the amplification curves of the calibrator and the unknown samples.

Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines checklist should be extended to require the methods that were used (1) to determine the PCR efficiency and (2) to calculate the reported target quantity and relative gene expression value.

### Introduction

Amplification of DNA in PCR can be monitored in real time with fluorescent DNA-binding dyes or sequence-specific probes (1, 2). The term “real-time PCR” was originally introduced and is still used in PCR-based microbial diagnostics (3). To avoid confusion about the abbreviation RT, it is recommended to use the terms *qPCR* for quantitative real-time PCR measuring DNA and *RT-qPCR* for measuring RNA levels after reverse transcription (4). In this review, qPCR is used to describe PCR experiments or diagnostic assays regardless of the input nucleic acid.

Although several studies provide information on how to design (5), standardize (6, 7), and report qPCR experiments (4), they fail to adequately address the impact of differences in PCR efficiency among assays, standards, and samples. Most qPCR reports provide only quantification cycle ( $C_q$ ) values as the result of a PCR measurement and ignore the PCR efficiency of

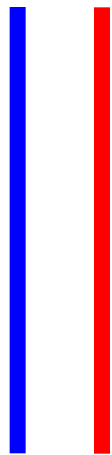
# Модель ПЦР

## Исходные компоненты

Двойная  
цепь ДНК

Одиночные  
цепи ДНК

Праймеры  
к F и F'



P<sub>1</sub>

F F'

Pr

P<sub>2</sub>

Pr'

## Промежуточные продукты

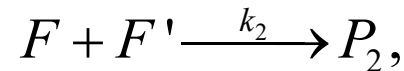
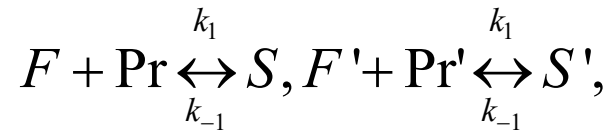


S

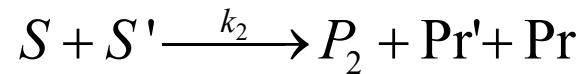
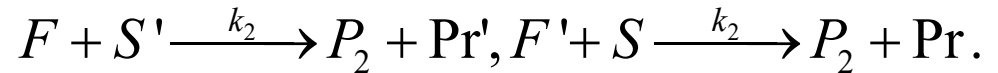


S'

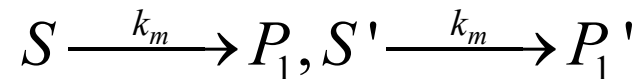
## Первичные реакции



## Вторичные реакции



## Реакции синтеза продукта



# Модель ПЦР

Кинетика компонентов реакции в течение одного цикла ПЦР:

$$\frac{dC_F}{dt} = -k_1 C_F C_{Pr} + k_{-1} C_S - k_2 C_F C_F - k_2 C_S C_F$$

$$\frac{dC_{Pr}}{dt} = -k_1 C_F C_{Pr} + k_{-1} C_S + k_2 C_S C_F + k_2 C_S C_S$$

$$\frac{dC_S}{dt} = k_1 C_F C_{Pr} - k_{-1} C_S - k_2 C_S C_F - k_2 C_S C_S - k_M C_S$$

$$\frac{dC_{P2}}{dt} = k_2 C_F C_F + 2k_2 C_S C_F + k_2 C_S C_S$$

$$\frac{dC_{P1}}{dt} = \frac{V_{max}}{K_M + C_S} C_S$$

$C_A$  – концентрация компонента А в момент времени t

$k_i$  – константа скорости реакции

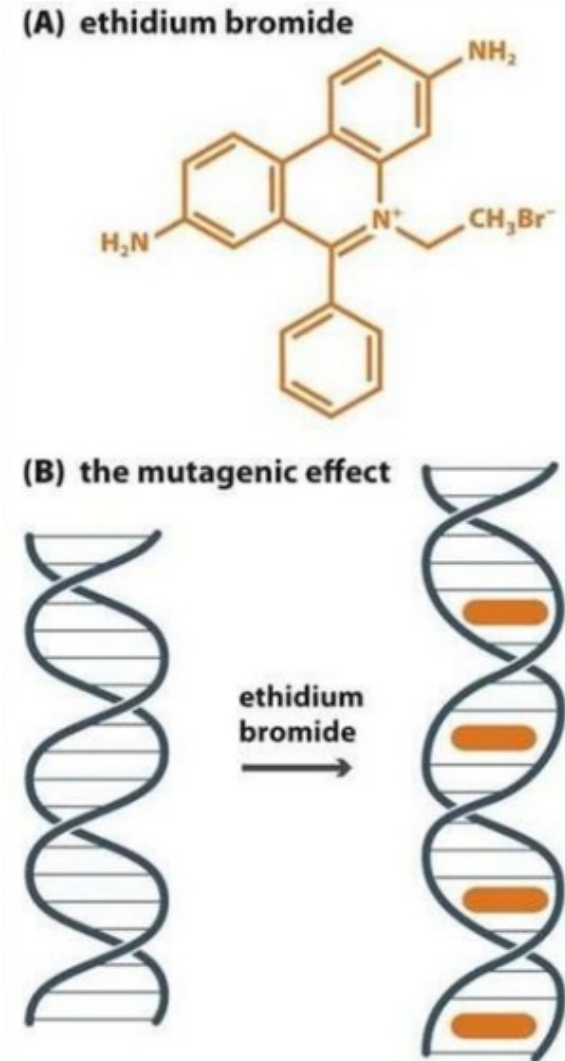
$V_{max}$ ,  $K_M$  – параметры реакции ферментативного синтеза



# «Проявка» результатов ПЦР-РВ с помощью интеркалирующих красителей (ИК)

Встраивание ИК в двухцепочечную ДНК приводит к увеличению флуоресценции ИК на несколько порядков.

Достоинствами являются простота и низкая стоимость данного способа проявки.



# Пересчет количества ДНК в интенсивность флуоресцентного сигнала ИК

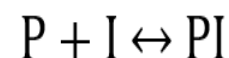
Модель связывания лиганда с субстратом

МакГи-фон-Хиппеля:

$$\frac{C_b}{C_{DNA}} = \frac{C_I - C_b}{K_d} \cdot \frac{\left(1 - n \cdot \frac{C_b}{C_{DNA}}\right)^n}{\left(1 - n \cdot \frac{C_b}{C_{DNA}} + \frac{C_b}{C_{DNA}}\right)^{n-1}}$$

- $C_I, C_b$  – концентрации всего и связанного ИК
- $C_{DNA}$  – концентрация ДНК
- $n$  - размер сайта связывания
- $K_d$  – константа диссоциации
- *Пересчет количества ДНК во флуоресцентный сигнал ИК по модели МакГи-фон-Хиппеля не дал адекватного соответствия экспериментальным данным.*

Пересчет на основе выражения для константы диссоциации бимолекулярной реакции:



– реакция связывания молекулы ИК с ДНК.

$$K_d = \frac{C_{DNA} \cdot C_f}{C_b}$$

– константа диссоциации для данной реакции ( $C_f$  – несвязанный ИК;  $C_f = C_I - C_b$ ).

- Тогда концентрация связанного ИК с учётом введенных для модели обозначений:

$$C_b = \frac{(C_{P_1} + C_{P_2}) \cdot C_I}{C_{P_1} + C_{P_2} + K_d}$$

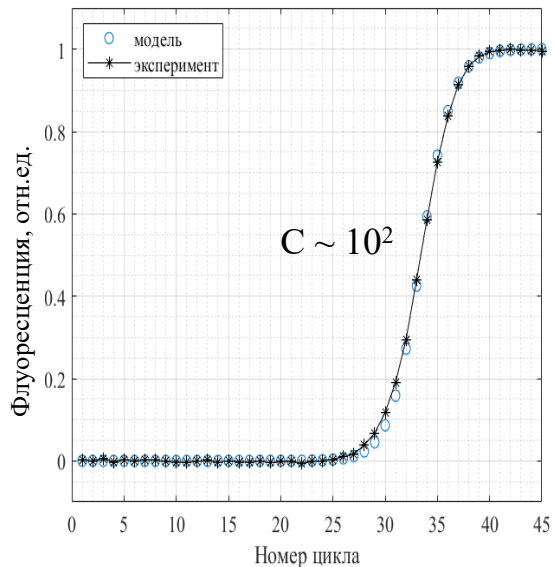
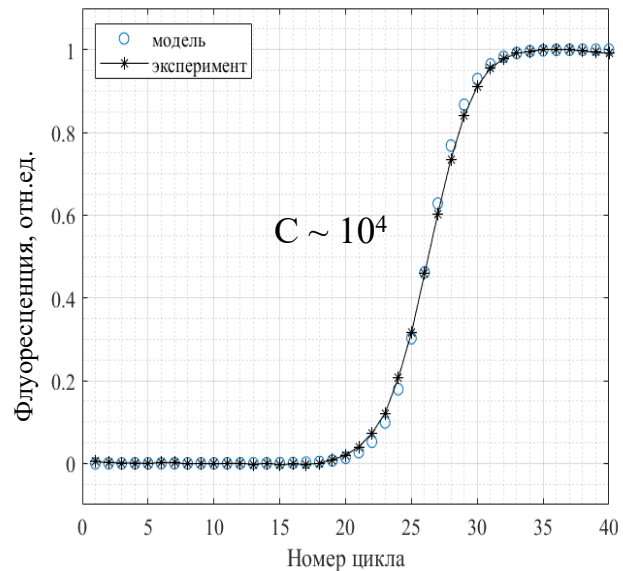
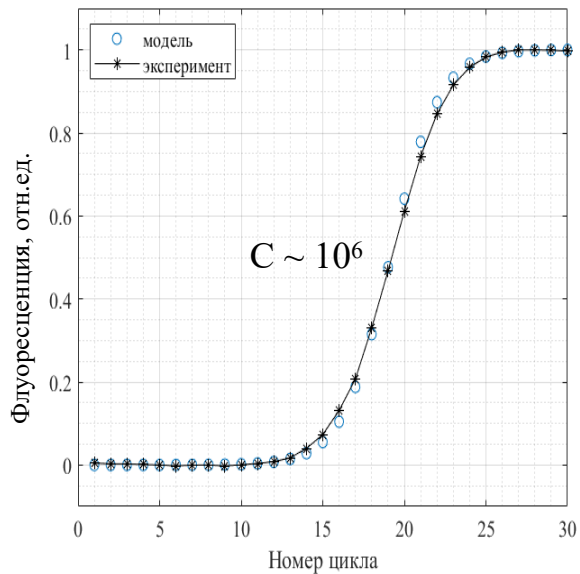
# МОДЕЛЬНАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЦР-РВ ТЕСТ-СИСТЕМА

Анализ гена Fc фрагмента IgG иммуноглобулинового рецептора IIIa человека (*FCGR3A*, GenBank NG\_009066.1)

Последовательности: прямой праймер Fc\_up  
CACATATTTACAGAATGGCAAAGG; обратный праймер Fc\_low  
CTGAAGACACATTTTACTCCCAA;

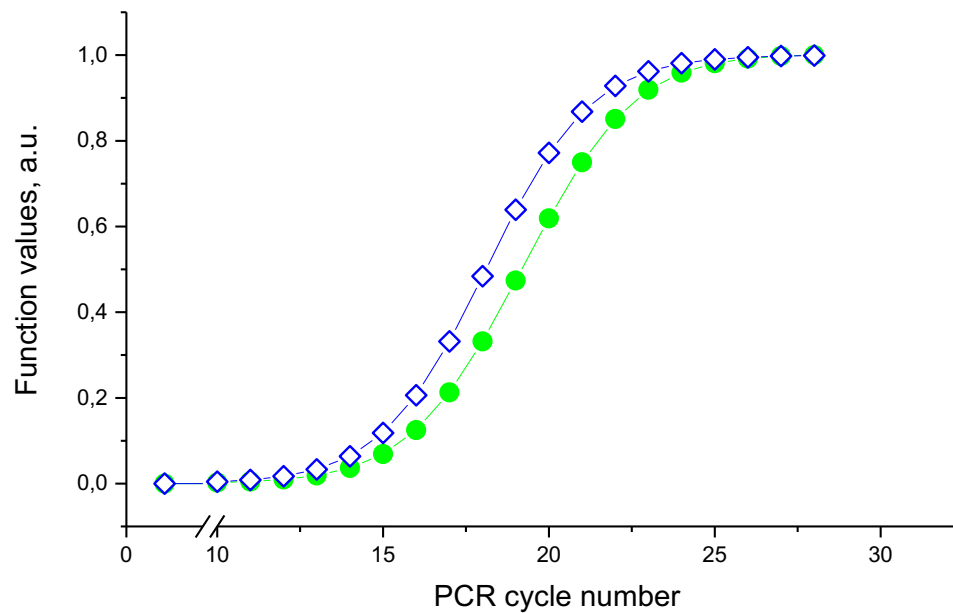
Концентрация праймеров  $C_{pr}(0) = 2 \cdot 10^{-7}$  М, фермента – 1 ед.  
Интеркаляционный краситель – SYBR Green I, 0.3 мкМ.

# Модельные и экспериментальные ПЦР-РВ кривые



Примерное количество ДНК в пробе	Отклонение от кривой флуоресцентного сигнала ИК, СКО	Рассчитанное моделью исходное количество молекул ДНК
$10^6$	0,00528	1303763
$10^4$	0,00518	9665
$10^2$	0,00418	65

# Результаты моделирования



Кинетика флуоресцентного сигнала ИК ( $\diamond$ ) и накопления копий ДНК ( $\bullet$ )

**СПАСИБО ЗА**

**ВНИМАНИЕ!**