

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-223

## ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР

### PECULIARITIES OF PLASMID DNA MEASUREMENT BY DIGITAL DROPLET PCR

Э. Р. Валиахметова, Д. С. Копеин, П. Ф. Снитко, Н. А. Литвинова

*Отдел молекулярной диагностики, Дирекция фармацевтического анализа  
АО «Генериум», пос. Вольгинский*

E. R. Valiakhmetova, D. S. Kopein, P. F. Snitko, N. A. Litvinova

*Department of Molecular Diagnostics, Directorate of Pharmaceutical Analysis  
Generium, JSC, Volginsky*

✉ e.valiakhmetova@generium.ru

#### Аннотация

Система цифровой капельной ПЦР с каждым годом становится более востребованной в области молекулярной диагностики за счет того, что с помощью цкПЦР возможно проводить абсолютное количественное определение целевых нуклеиновых кислот, присутствующих в образце. Но цкПЦР имеет ряд нюансов во время измерения разных типов молекул ДНК, один из нюансов описан в данной работе.

#### Abstract

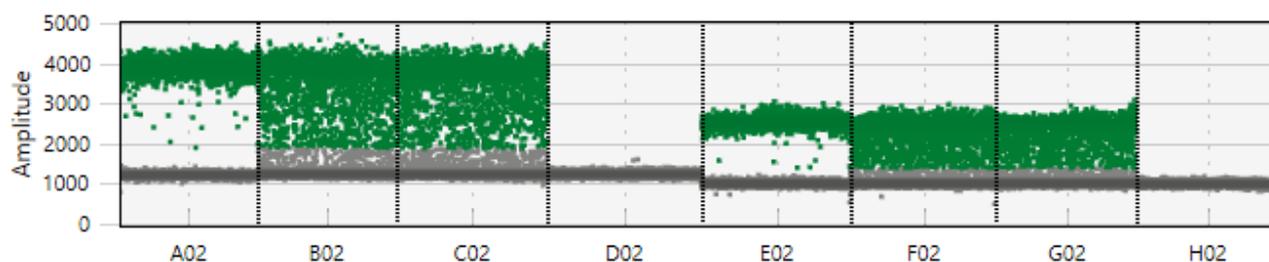
Every year, the digital droplet PCR system becomes in demand in the field of molecular diagnostics due to the fact that using ddPCR it is possible to carry out an absolute quantitative determination of the target nucleic acids present in the sample. But ddPCR has a number of nuances during the measurement of different types of DNA molecules, one of the nuances is described in this thesis.

Цифровая капельная ПЦР (цкПЦР) — это третье поколение технологий ПЦР для наиболее чувствительных и высокопроизводительных молекулярно-биологических исследований. С помощью цкПЦР возможно провести точную (до 1 копии на 100 000) количественную оценку того или иного участка ДНК или РНК в образце. При этом нет необходимости в использовании стандартных образцов и построении калибровочных кривых.

Принцип метода цкПЦР состоит в разделении реакции на десятки тысяч капель размером в нанолитр с помощью микрофлюидной технологии, проводимой в генераторе капель специализированного масла. Далее полученную эмульсию подвергают амплификации (денатурация — отжиг — элонгация) при таких же условиях, как и в стандартных протоколах ПЦР, с единственным отличием, что амплификация происходит индивидуально в каждой полученной после генерации капле. Считывание флуоресценции каждой капли происходит в специальном проточном флуориметре. По амплитуде флуоресценции капель определяют наличие или отсутствие в каплях амплификации. При высокой амплитуде флуоресценции капля считается положительной, т. е. содержит как минимум 1 молекулу определяемой ДНК. Количество капель с положительным сигналом (высокой амплитудой флуоресценции) и отрицательным сигналом (низкой амплитудой флуоресценции) делят на кластеры и подсчитывают для каждого образца, и далее согласно распределению Пуассона рассчитывают концентрацию ДНК-мишени в виде числа молекул в микролитре. В цкПЦР определение количества ДНК-мишени проводят не относительно, используя калибровочную кривую, а прямым подсчетом капель с наличием или отсутствием в них ДНК-мишени. Это существенно увеличивает стабильность и точность системы и, что более важно, для цкПЦР пропадает необходимость в использовании калибраторов или стандартов.

Одним из важных критериев правильного протекания цкПЦР является отсутствие так называемого *эффекта дождя*, который состоит в том, что флуоресценция некоторых капель находится в диапазоне между положительными и отрицательными каплями, из-за чего падает чувствительность измерения, и это затрудняет точное определение концентрации молекул в микролитре. При измерении плазмидной ДНК отсутствия *эффекта дождя* можно добиться разными методами, например с помощью линеаризации кольцевой плазмидной ДНК [1].

На рисунке показано различие между кольцевой формой плазмидной ДНК и линеаризованной. В лунках с кольцевой молекулой плазмидной ДНК четко виден *эффект дождя*. Результаты были проанализированы с помощью ПО QuantaSoft™ Analysis Pro (AP).



Гистограммы флюоресценции капель при определении молекул плазмидной ДНК. Лунки A02, E02 — образцы с линеаризованной плазмидной ДНК, лунки B02, C02, F02, G02 — образцы с кольцевой формой плазмидной ДНК, лунки D02, H02 — реакционная смесь без матрицы

На гистограммах флюоресценции (см. рисунок) в лунках B02, C02, F02, G02, где использовали кольцевую форму плазмид, присутствует *эффект дождя* — в этих лунках около 30 % капель имеют промежуточную флюоресценцию. В лунках A02, E02, где использована линеаризованная плазида, этот эффект минимален. Кроме того, при расчетах наблюдается занижение концентрации в образцах с кольцевой плазмидой в 1,8 раза. Это свидетельствует о том, что часть положительных капель с низкой флюоресценцией (менее 3000 для лунок B02, C02) не определяются как положительные и не вносят вклад в значение конечной концентрации.

#### Литература

1. Huggett J. F., Foy C. A., Benes V. et al. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments // *Clinical Chemistry*. 2013. Vol. 59 (6). P. 892–902.