

Равновесная модель связывания интеркалирующего красителя SYBR Green I в ходе амплификации ДНК

© Д.Р. Ибрагимов¹, А.А. Федоров¹, Д.А. Варламов²

¹ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

E-mail: danil_ib@mail.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2025 г.

В окончательной редакции 1 июля 2025 г.

Принято к публикации 7 июля 2025 г.

Предложена модель полимеразной цепной реакции, в которой флуоресцентный сигнал формируется интеркалирующим красителем SYBR Green I. Модель амплификации ДНК описывает кинетику реакций, протекающих на стадиях отжига и элонгации. Интенсивность флуоресцентного сигнала в модели определяется количеством связанного красителя, которое в свою очередь рассчитывается с помощью константы диссоциации равновесной реакции взаимодействия красителя с двухцепочечными ДНК. Модель продемонстрировала высокую точность аппроксимации экспериментальных данных, а также способность предсказывать исходное количество молекул ДНК в анализируемой пробе.

Ключевые слова: модель ПЦР-РВ, краситель SYBR Green I, методы Рунге–Кутты, метод Нелдера–Мида.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.24.61748.8073

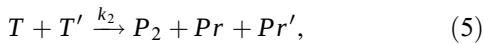
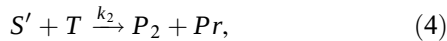
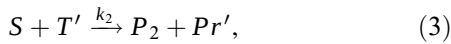
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — ключевой метод молекулярной биологии, применяемый для качественного и количественного анализа нуклеиновых кислот. В основе ПЦР лежит амплификация специфических участков ДНК в ходе повторяющихся температурных циклов. Его разновидность, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяет определять концентрации целевой ДНК с помощью графика сигнала флуоресцентного репортера, связанного с накоплением копий ДНК. Определение точки достижения флуоресцентным сигналом задаваемого порогового уровня C_T и построение калибровочной зависимости $C_T/\lg N_0$ для образцов с известной концентрацией N_0 позволяют оценить концентрацию в исследуемом образце [1]. Однако точность метода зависит от разницы эффективности амплификации стандарта и образца. Для реальных образцов эффективность реакции определяется многими факторами: разбросами температурных режимов, ошибками пипетирования, присутствием примесей-ингибиторов и целым рядом других [2]. По этим причинам для повышения точности количественной оценки необходим математический аппарат, позволяющий оценить и правильно учесть эффективность реакции для каждого образца [3]. Для решения данной задачи в настоящее время предложен целый ряд математических моделей, которые можно разделить на аппроксимационные и кинетические. Аппроксимационные модели не учитывают природу реакции и предлагают различные математические функции для аппроксимации экспериментальных данных с целью более точного определения характеристик реакции и концентрации ДНК в образце. Среди данных моделей наиболее широко применяются четырех- и пятипараметрические сигмоидальные функции [4,5]. Кинетические модели в отличие от аппроксимационных описывают внутренние процессы ПЦР с помощью кинетических

и равновесных уравнений реакций, однако в настоящее время фактически отсутствуют модели, способные адекватно аппроксимировать экспериментальные кривые ПЦР-РВ. Преимуществом кинетического подхода к моделированию ПЦР является описание фактических событий в реакционной смеси, что позволяет учесть в модели различные процессы и факторы, которые могут повысить точность описания модели. Наиболее упрощенная модель игнорирует вклад праймеров на стадии отжига [6], а потому описывает ПЦР со значительной погрешностью [7]. Более подробные модели учитывают образование димера праймеров [8,9], эффективность денатурации двухцепочечной ДНК [8], присоединение нуклеотидов на стадии элонгации [9,10], температурный режим [10], а также действие фермента ДНК-полимеразы с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен [8] или подробного описания кинетики ее взаимодействия с продуктами реакции [9,10].

В качестве флуоресцентных репортеров для детекции продуктов ПЦР используются либо интеркалирующие красители (ИК), либо гибридационные зонды. Красители, например SYBR Green I и EvaGreen, встраиваются между парами нуклеотидов, тем самым увеличивая квантовый выход флуоресценции на несколько порядков. Гибридационные зонды содержат в своей структуре краситель и гаситель флуоресценции, которые в результате гибридизации зонда и последующего ферментативного расщепления разобщаются в пространстве, что позволяет детектировать сигнал красителя. В силу различия физических механизмов работы кривые ПЦР-РВ, полученные с помощью ИК и зондов, различаются. Существующие кинетические модели игнорируют это, предполагая линейную зависимость между флуоресценцией и количеством накопленной ДНК [6–9]. Такое упрощение необоснованно, так как из-за различий сигналов

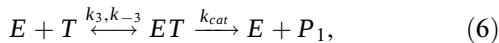
между методами возникают расхождения теоретических и экспериментальных данных, что подтверждается различием кривых флуоресценции ИК и зондов [11]. Таким образом, для построения адекватной модели ПЦР-РВ необходим способ пересчета количества ДНК в интенсивность флуоресценции с учетом метода детекции.

В настоящей работе предложена модель ПЦР-РВ, учитывающая связывание молекул ИК с накопленной двухцепочечной ДНК. Количество связанного ИК определяет интенсивность детектируемого флуоресцентного сигнала. В предлагаемой модели рассматриваются реакции, происходящие на стадии отжига. Эффективность денатурации, в ходе которой происходит „плавление“ двухцепочечной ДНК на две комплементарные одноцепочечные ДНК (оцДНК) S и S' , предполагается равной 100 %. На стадии отжига происходит гибридизация образовавшихся на стадии денатурации оцДНК со специфичными праймерами, обозначаемыми Pr и Pr' . Образовавшиеся в результате комплексы матрица–праймер обозначим T и T' . Помимо этого образовавшиеся на этапе денатурации оцДНК могут обратно гибридизоваться друг с другом, вытеснив праймеры. Данный продукт так называемой реакции обратной гибридизации обозначим P_2 . Гибридизация считается необратимой, а образование димера праймеров не учитывается. В рамках данных представлений этап отжига можно описать следующими реакциями:



где k_1 — константа скорости образования комплекса праймера и оцДНК, k_2 — константа скорости гибридизации.

Достраивание ферментом ДНК-полимеразы E комплементарного фрагмента оцДНК, в результате которого образуется продукт — копия исходного фрагмента ДНК (P_1), рассматривается как одноэтапный процесс. Данный этап можно описать следующей реакцией:



где k_3 , k_{-3} — константы скорости прямой и обратной реакции образования фермент-субстратного комплекса, k_{cat} — константа ферментативного синтеза.

Поскольку реакция (6) является ферментативной, для описания стадии элонгации с некоторыми допущениями можно применить модель ферментативного синтеза Михаэлиса–Ментен

$$\frac{dP_1}{dt} = \frac{V_m C_T}{K_M + C_T}, \quad (7)$$

где $V_m = k_{cat} C_E$ — максимальная скорость реакции, $K_M = (k_{-3} + k_{cat})/k_3$ — константа Михаэлиса, равная

концентрации субстрата (комплекс оцДНК и праймера), при которой скорость реакции составляет половину от максимальной.

Для описания кинетики реакций (1)–(5) применяется закон действующих масс. Будем считать, что процессы, происходящие на двух комплементарных цепях, симметричны, т.е. соответствующие параметры реакций для обеих цепей равны. Данное допущение для модельной системы означает, что концентрации комплементарных одноцепочечных фрагментов совпадают, что позволяет упростить систему. Тогда с учетом уравнения (7) как для штрихованных, так и для нештрихованных компонентов реакции можно получить следующую систему дифференциальных уравнений:

$$\frac{dC_S^i}{dt} = -k_1 C_S^i C_{Pr}^i - k_2 (C_S^i)^2 - k_2 C_T^i C_S^i, \quad (8)$$

$$\frac{dC_{Pr}^i}{dt} = -k_1 C_S^i C_{Pr}^i + k_2 (C_T^i)^2 + k_2 C_T^i C_S^i, \quad (9)$$

$$\frac{dC_T^i}{dt} = k_1 C_S^i C_{Pr}^i - k_2 (C_T^i)^2 - k_2 C_T^i C_S^i - \frac{V_m C_T^i}{K_M + C_T^i}, \quad (10)$$

$$\frac{dC_{P_2}^i}{dt} = k_2 (C_S^i)^2 + 2k_2 C_T^i C_S^i + k_2 (C_T^i)^2, \quad (11)$$

$$\frac{dC_{P_1}^i}{dt} = \frac{V_m C_T^i}{K_M + C_T^i}, \quad (12)$$

где i — номер цикла амплификации.

Решая данную систему на каждом цикле ПЦР, можно получить всю кривую амплификации ДНК. Начальные условия на первом цикле соответствуют исходным концентрациям оцДНК $C_S^0(0)$ и праймеров $C_{Pr}^0(0)$. Для последующих циклов начальная концентрация оцДНК увеличивается на количество полученного продукта в конце предыдущего цикла, тем самым обеспечивая рост сигнала в течение амплификации:

$$C_S^i(0) = C_S^{i-1}(0) + C_{P_1}^{i-1}(\tau) + C_{P_2}^{i-1}(\tau), \quad (13)$$

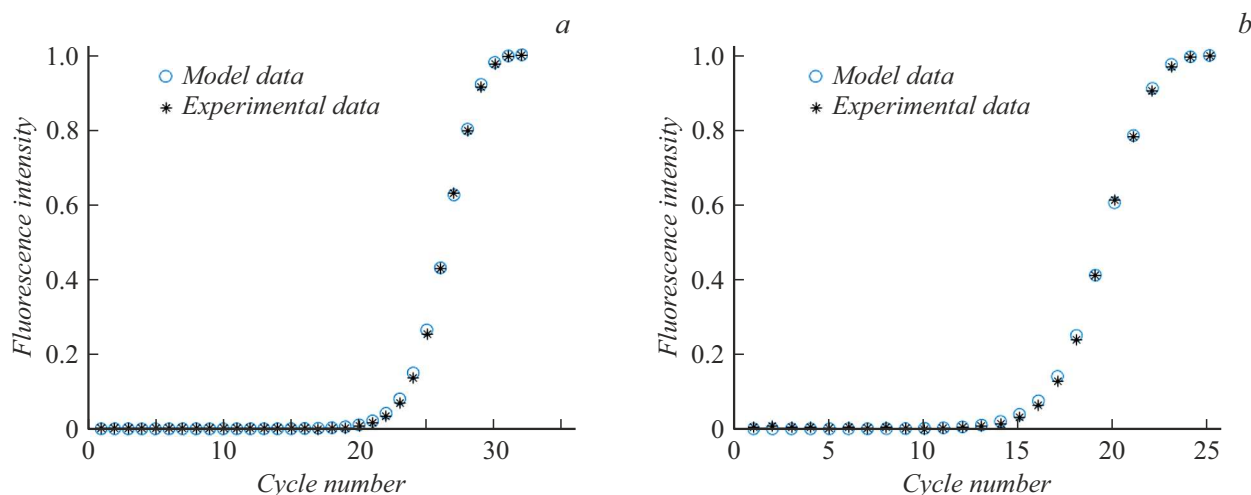
где τ — длительность этапов отжига и элонгации.

Начальная концентрация праймера для следующего цикла равняется количеству оставшегося праймера в конце предыдущего

$$C_{Pr}^i(0) = C_{Pr}^{i-1}(\tau). \quad (14)$$

Начальные концентрации других компонентов равняются нулю для всех циклов.

Процесс образования комплекса ДНК и молекул ИК будем рассматривать в рамках равновесного приближения. Количество молекул ИК, связанного с конкретной ДНК, зависит в первую очередь от длины ДНК и соотношения концентраций краситель/ДНК, которое меняется в ходе ПЦР. Для упрощения будем считать, что количество связанного ИК можно оценить с помощью некоторой усредненной константы диссоциации равновесной реакции K_d , единой для всех циклов. В этом



Теоретические и экспериментальные графики ПЦР-РВ. *a* — стократно разведенный образец, *b* — неразведенный образец. Графики нормированы на максимальное значение.

случае концентрацию связанного ИК C_{PI} на i -м цикле ПЦР при известной концентрации ДНК и концентрации свободного красителя C_I можно определить исходя из выражения константы диссоциации равновесной реакции связывания красителя и ДНК

$$C_{PI}^i = \frac{(C_{P_1}^i(\tau) + C_{P_2}^i(\tau))C_I}{C_{P_1}^i(\tau) + C_{P_2}^i(\tau) + K_d}. \quad (15)$$

Система (8)–(12) решалась в среде MATLAB методами Рунге–Кутты четвертого и пятого порядков, оказавшимися оптимальными по точности и скорости. Константы V_m и K_M были оценены исходя из данных экспериментальных работ по кинетике Taq-полимеразы: K_M оценивалась как $\sim 1 \mu\text{M}$, а k_{cat} — как $\sim 32 \text{ s}^{-1}$ [12]. Зная значение k_{cat} и концентрацию фермента, можно оценить V_m . Подбор остальных констант реакции k_1 , k_2 и K_d осуществлялся методом Нелдера–Мида.

Экспериментальные графики ПЦР-РВ были получены с помощью синтетической ДНК длиной 97 нуклеотидов и тест-системы для ее количественного анализа ПЦР-РВ производства ООО „НПФ Синтол“. Концентрация модельной ДНК в тестовом растворе была определена с помощью цифровой ПЦР на приборе Sniper DQ24 и составляла приблизительно 8200 молекул ДНК в $1 \mu\text{l}$, в объеме, который отбирался для анализа. Последовательности прямого и обратного праймеров — $\text{CACAATTTACACAATGGCAAAGC}$ и $\text{CTGAACACACATTATTACTCCGAA}$ соответственно. Начальная концентрация каждого праймера $C_{Pr}(0) = 200 \text{ nM}$. Флуоресцентный краситель SYBR Green I использовался в количестве $0.07 \mu\text{l}$ раствора 100х, что приблизительно соответствует молярной концентрации, равной $0.28 \mu\text{M}$ [13]. Количество Taq-полимеразы в реакционной смеси составляло 5 единиц. Общий объем реакционной смеси $25 \mu\text{l}$. Кривые ПЦР-РВ были получены с помощью

амплификатора Bio-Rad CFX для исходного и стократно разведенного образцов в пяти повторах. Циклограмма ПЦР состояла из предварительной денатурации, 45 циклов нагрева до 95°C (15 s) и охлаждения до 62°C (30 s). Рост значений флуоресцентного сигнала для отрицательных контрольных образцов не наблюдался в течение всех 50 циклов реакции, что свидетельствовало об отсутствии неспецифических реакций, обусловленных димеризацией праймеров.

Результаты аппроксимации экспериментальных кривых ПЦР-РВ предлагаемой моделью приведены на рисунке. Представленные данные показывают, что предложенная модель достаточно точно аппроксимирует кривую накопления флуоресцентного сигнала интеркалирующего красителя как для высокой, так и для низкой концентраций ДНК в образце.

Погрешность аппроксимации для каждой из десяти анализируемых кривых, оцененная как сумма квадратов разности между экспериментальными и модельными данными, составила менее 0.1%. Предсказанное моделью исходное количество ДНК не превышало 7% от среднего значения, оцененного с помощью цифровой ПЦР и равного 8200 молекул, для пяти стократно разведенных образцов. Для неразведенных образцов отклонение не превышало 15% от ожидаемого количества. Подобранные моделью значения констант k_1 , k_2 и K_d составляли $1.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $1.02 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ и $6.6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, что соответствует диапазону данных, представленному в литературе [10,14].

Таким образом, в настоящей работе впервые предложена рабочая модель ПЦР-РВ, в которой используется интеркалирующий краситель SYBR Green I для детекции продукта реакции. Модель показала высокую точность аппроксимации экспериментальных данных, в том числе способность оценки концентрации ДНК в исследуемом образце, что указывает на перспективность

предлагаемого подхода для моделирования ПЦР-РВ. В представленной модели не были учтены многие факторы, определяющие кинетику реакции, такие как длина ДНК, ее последовательность, образование димера праймеров, инактивация полимеразы, затухание красителя, эффективность денатурации и ряд других. Учет данных факторов в моделировании ПЦР-РВ является объектом дальнейших исследований.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (проект FFZM-2025-0002).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов, *ПЦР в реальном времени*, под ред. Д.В. Ребрикова, 11-е изд. (Лаборатория знаний, М., 2023), с. 114–118.
- [2] A. Ruiz-Villalba, J.M. Ruijter, M.J.B. van den Hoff, *Life*, **11** (6), 496 (2021). DOI: 10.3390/life11060496
- [3] J.M. Ruijter, R.J. Barnewall, I.B. Marsh, A.N. Szentirmay, J.C. Quinn, R. van Houdt, Q.D. Gunst, M.J.B. van den Hoff, *Clin. Chem.*, **67** (6), 829 (2021). DOI: 10.1093/clinchem/hvab052
- [4] R.G. Rutledge, *Nucl. Acids Res.*, **32** (22), e178 (2004). DOI: 10.1093/nar/gnh177
- [5] A.N. Spiess, C. Feig, C. Ritz, *BMC Bioinformatics*, **9**, 221 (2008). DOI: 10.1186/1471-2105-9-221
- [6] G.J. Boggy, P.J. Woolf, *PLoS One*, **5** (8), e12355 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0012355
- [7] G. Cobbs, *BMC Bioinformatics*, **13**, 203 (2012). DOI: 10.1186/1471-2105-13-203
- [8] J.L. Gevertz, S.M. Dunn, C.M. Roth, *Biotechnol. Bioeng.*, **92** (3), 346 (2005). DOI: 10.1002/bit.20617
- [9] S. Mehra, W.-S. Hu, *Biotechnol. Bioeng.*, **91** (7), 848 (2005). DOI: 10.1002/bit.20555
- [10] K. Marimuthu, C. Jing, R. Chakrabarti, *Biophys. J.*, **107** (7), 1731 (2014). DOI: 10.1016/j.bpj.2014.08.019
- [11] А.А. Федоров, Д.Г. Сочивко, Д.А. Варламов, *ЖТФ*, **90** (9), 1581 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090169 [A.A. Fedorov, D.G. Sochivko, D.A. Varlamov, *Tech. Phys.*, **65** (9), 1516 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090169].
- [12] W. Chen, B. Chen, X. Li, G. Xu, L. Yang, J. Wu, H. Yu, *FEBS J.*, **291** (13), 2876 (2024). DOI: 10.1111/febs.17091
- [13] F. Mao, W.Y. Leung, X. Xin, *BMC Biotechnol.*, **7**, 76 (2007). DOI: 10.1186/1472-6750-7-76
- [14] A.I. Dragan, R. Pavlovic, J.B. McGivney, J.R. Casas-Finet, E.S. Bishop, R.J. Strouse, M.A. Schenerman, C.D. Geddes, *J. Fluoresc.*, **22** (4), 1189 (2012). DOI: 10.1007/s10895-012-1059-8