

УДК 57.088.1

ИЗУЧЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ НАНОФОР 05

Бочарова Д.В., Меркурьев А.В., Белов Д.А., Лавров Г.С., Курочкин В.Е.

*Институт аналитического приборостроения РАН
Санкт-Петербург, Российская Федерация*

Аннотация. Проведена экспериментальная оценка аналитической чувствительности измерения сигналов флуоресценции при использовании генетического анализатора «Нанофор 05». Эта оценка была осуществлена для шести различных спектральных диапазонов, которые соответствуют флуоресценции наиболее часто используемых в генетических исследованиях красителей. Полученные данные будут весьма полезными для исследователей, занимающихся планированием экспериментов, в которых необходимо одновременно выявлять несколько мишеней с разной концентрацией в анализируемом образце. Эта информация может значительно облегчить и улучшить процесс генетического анализа исследуемых образцов.

Ключевые слова: генетический анализатор, Нанофор 05, секвенатор, чувствительность, молекулярная биология.

STUDYING THE ANALYTICAL SENSITIVITY OF FLUORESCENCE INTENSITY MEASUREMENT IN THE GENETIC ANALYZER NANOPHORE 05

Bocharova D.V., Merkuriev A.V., Belov D.A., Lavrov G.S., Kurochkin V.E.

*Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences
Saint-Petersburg, Russian Federation*

Abstract. An experimental assessment of the analytical sensitivity of fluorescence signal measurements was conducted for the genetic analyzer "Nanophore 05". This assessment was carried out for six spectral ranges corresponding to the fluorescence of the most commonly used dyes in genetic research. The obtained data can be valuable for researchers planning experiments in which it is necessary to simultaneously detect multiple targets with varying concentrations in the analyzed sample. This information can significantly facilitate and enhance the process of genetic analysis of the studied samples.

Key words: genetic analyzer, Nanophore 05, sequencer, sensitivity, molecular biology.

Адрес для переписки: Бочарова Д.В. ул. Ивана Черных, 31–33, лит. А., Санкт-Петербург, 198095, Российская Федерация, e-mail: souldarydary@gmail.com

Секвенирование ДНК является «золотым» стандартом в молекулярно-генетических исследованиях. Для анализа нуклеотидной последовательности широко используется секвенирование по методу Сенгера. Этот метод по-прежнему обеспечивает высочайшую точность прочтения среди всех существующих методов секвенирования [1]. Используемые в исследованиях генетические анализаторы позволяют не только обнаруживать мутации и определять длину повторов фрагментов ДНК, но также проводить их относительную количественную оценку.

Примером такого прибора является Генетический анализатор «Нанофор 05» [2]. Устройство осуществляет разделение флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза с использованием лазерной индуцированной флуоресценции для детекции сигнала. Для учета и нормализации интенсивности свечения флуоресценции используется специальный раствор коротких фрагментов ДНК, меченных красителями. Этот раствор не только используется для калибровки прибора (спектральная калибровка), но и применяется во время фрагментного анализа в данном исследовании. Для одновременного выявления мишеней нуклеиновых кислот необходимо использовать большее

число одновременно детектируемых спектрально разделенных флуоресцентных красителей, каждый из которых измеряется в индивидуальном спектральном диапазоне.

Одними из важнейших аналитических характеристик метода являются аналитическая чувствительность измерения сигнала флуоресценции и динамический интервал измерений сигнала флуоресценции в каждом спектральном диапазоне. Аналитическая чувствительность метода капиллярного гель-электрофореза определяет минимальное количество (концентрацию) обнаруживаемого флуоресцентно меченного фрагмента ДНК в анализируемом образце. Динамический диапазон измерений представляет собой диапазон значений сигнала флуоресценции от минимально до максимально детектируемых значений сигналов флуоресценции [3].

Знание аналитической чувствительности генетического анализатора имеет высокую значимость при планировании экспериментов, где необходимо исследовать образцы с очень небольшим исходным количеством ДНК, которое даже после амплификации с помощью полимеразной цепной реакции целевых фрагментов позволяет получить интенсивности сигнала флуоресценции близкие к сигналу шумов базовой линии.

Знание динамического диапазона измерений представляет собой важную характеристику генетического анализатора. Это становится критически важным, когда исследуемые образцы представляют собой сложные смеси фрагментов ДНК с значительно различающимися относительными количествами фрагментов различных длин. В таких ситуациях наилучшие результаты исследования достигаются при использовании генетических анализаторов, обеспечивающих максимально широкий динамический диапазон измерений сигнала флуоресценции в каждом спектральном канале.

Для калибровки прибора в данном исследовании использовался спектральный калибратор Syn6Dye. Этот калибратор представляет собой раствор, содержащий шесть фрагментов ДНК, меченых флуоресцентными красителями: Sy660, Sy630, TAMRA, FAM, ROX и R110.

Для анализа применялись капилляры, собранные в линейки, состоящие из восьми капилляров в каждой. Внутренний диаметр капилляров составлял 50 мкм, внешний – 192 мкм, а их длина – 36 см до оптического окна для коротких капилляров и 50 см до оптического окна для длинных. Флуоресцентное излучение разделяется на разные спектральные компоненты с использованием дифракционной решетки и регистрируется при помощи КМОП камеры. Поскольку различные флуоресцентные красители излучают свет на различных длинах волн при возбуждении лазером, прибор способен обнаруживать все фрагменты ДНК, включая те, которые имеют одинаковую длину, но различаются спектрально [4].

Сигналы флуоресценции оцифровываются и сохраняются в файле, совместимом с программным обеспечением для дальнейшего анализа данных. На электрофореграмме, используемой для визуализации сигналов, помимо основных пиков, соответствующих интересующим фрагментам, всегда наблюдается фоновый дрейф базовой линии, а также шум и артефакты разделения и регистрации, известные как «выбросы». Алгоритм, предназначенный для обнаружения пиков в сигналах, осуществляет оценку уровня шума, присутствующего в электрофореграмме, и на основе этой оценки вычисляет порог, который определяет, какие пики следует считать значимыми. Важно подчеркнуть, что значение порога обнаружения имеет критическое значение, поскольку оно автоматически определяется программным обеспечением и непосредственно влияет на процесс фильтрации пиков в ходе последующего анализа.

Алгоритм поиска пиков применяет высокие стандарты при фильтрации сигналов, исключая из рассмотрения те пики, которые обладают амплитудой и шириной, сравнимыми с ложными пиками. Этот подход существенно повышает качество экспериментальных данных и снижает требования к объему исходного ДНК-образца для анализа.

На рисунках 1 и 2 представлены графики, иллюстрирующие отношение сигнал/шум в процессе разделения раствора Syn6Dye при различных степенях разведения: от 128 000, до 125 с шагом разбавления в 4 раза. Предполагалось, что разведение в 128 000 раз не будет иметь выраженного порога обнаружения. Однако результаты экспериментов оказались неожиданными: отношение сигнал/шум превысило значение 20 как на коротких, так и на длинных капиллярных линейках, что в соответствии с ранее установленными стандартами является приемлемым порогом обнаружения [4].

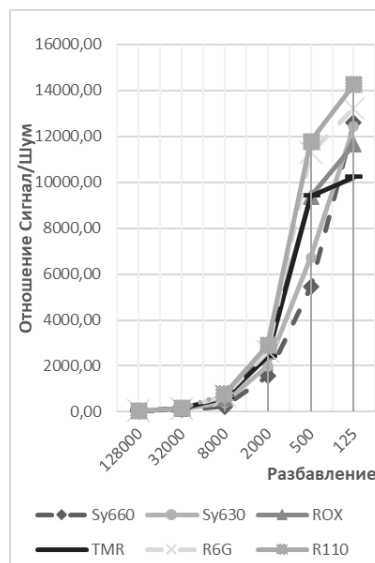


Рисунок 1 – Отношение сигнал/шум от разбавления на короткой линейке капилляров

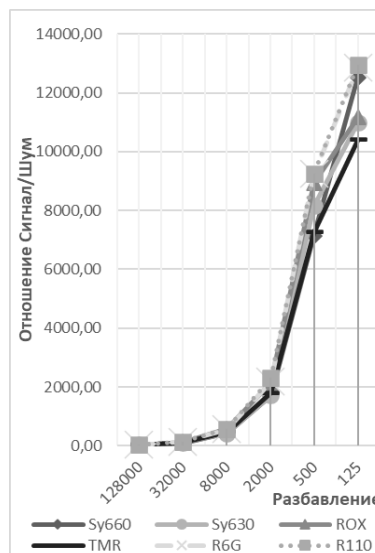


Рисунок 2 – Отношение сигнал/шум от разбавления на длинной линейке капилляров

Кроме того, ожидалось, что зависимость сигнал/шум будет проявлять линейное убывание с увеличением степени разведения, но результаты, полученные в ходе трехкратных повторений на

различных приборах Нанофор 05, указывают на нелинейный характер этой зависимости.

На основе вышеизложенного можно сделать вывод, что невозможно вывести теоретические зависимости между отношением сигнал/шум и степенью разведения. Поэтому необходимо провести последовательный ряд экспериментов с разными степенями разбавления раствора SynbDye и провести статистический анализ данных, чтобы определить аналитическую чувствительность и динамический диапазон для прибора Нанофор 05.

Анализ статистических данных может оказать значительное воздействие на улучшение эффективности алгоритма автоматического обнаружения пиков. Усовершенствованный алгоритм, в свою очередь, будет способствовать повышению конкурентоспособности данного прибора на рынке по сравнению с аналогичными устройствами.

УДК 621.38

МИГРАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ЗАРЯДА ПОЛИЭТИЛЕНА ПОСЛЕ ДЕФОРМИРОВАНИЯ

Борбат М.С., Самарина А.В., Пантелеев К.В., Тьявловский А.К., Гусев О., Жарин А.Л.

*Белорусский национальный технический университет
Минск, Республика Беларусь*

Аннотация. В работе на примере полиэтилена высокого давления рассмотрены некоторые эффекты миграции (перераспределения) поверхностного электростатического потенциала в диэлектрическом материале под действием механических напряжений и при релаксации. В качестве метода и средств исследования изменения распределения поверхностного электростатического потенциала под действием механических напряжений использован сканирующий зарядочувствительный зонд в сканирующей модификации (аналог метода Scanning Kelvin Probe), разработанный и изготовленный в Белорусском национальном техническом университете. Последовательные сканирования поверхности зарядочувствительным зондом в процессе релаксации показывают изменения в распределении поверхностного электростатического потенциала, что дает представление о характере заряда и о кинетике, и направлении его миграции.

Ключевые слова: поверхность, диэлектрик, поверхностный электростатический заряд, миграция заряда, микропроцессорный зарядочувствительный зонд.

MIGRATION OF SURFACE ELECTROSTATIC CHARGE OF POLYETHYLENE AFTER DEFORMATION

Borbat M., Samarina A., Pantišalejeu K., Tyavlovsky A., Gusev O., Zharin A.

*Belarusian National Technical University
Minsk, Republic of Belarus*

Abstract. The paper examines some effects of migration (redistribution) of surface electrostatic potential in a dielectric material, using high-density polyethylene as an example, during elastic mechanical deformation and during the relaxation process. As a method and means for studying changes in the distribution of surface electrostatic potential under the influence of mechanical stress, a scanning charge-sensitive microprocessor probe (analogue of the Scanning Kelvin Probe), developed at the Belarusian National Technical University, was used. Successive scans of the surface with a charge-sensitive probe during relaxation show changes in the distribution of the surface electrostatic potential, which gives an idea of the nature of the charge and the kinetics and direction of migration.

Key words: surface, dielectric, surface electrostatic charge, charge migration, microprocessor charge-sensitive probe.

*Адрес для переписки: Пантелеев К.В., пр. Независимости, 65, г. Минск, 220113, Республика Беларусь
e-mail: k.pantišalejeu@bntu.by*

Избыточный заряд в твердых диэлектриках имеет тенденцию мигрировать как относительно материала объема и поверхности, так и в окружающую среду. В литературных источниках механизм миграции заряда практически исключительно рассматривается, как электрическая проводимость

Литература

1. Определение максимальной длины ДНК с точностью 99 % в полимере на основе линейного N,N-полидиметилакриламида методом капиллярного гель-электрофореза с лазер-индуцируемой флуоресценцией / Д.В. Бочарова [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т. 76, № 10. – С. 1–7.
2. Генетический анализатор Нанофор 05 в качестве средства измерений при секвенировании ДНК / А.А. Волков [и др.] // Измерительная техника. – 2021. – № 1. – С. 60–65.
3. Требования к качеству клинических лабораторных исследований : ГОСТ Р 53022.2-2008. – Введен РФ 01.01.2010. – М. : Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии, 2010. – 31 с.
4. Метод поиска пиков размерного стандарта при фрагментном анализе ДНК / И.В. Заруцкий [и др.] // Журнал технической физики. – 2018. – Т. 88, № 9. – С. 1407–1412.

через окружающие тела [1]. Однако, с использованием метода сканирующего зонда Кельвина (Scanning Kelvin Probe), проведенные исследования распределения поверхностного электростатического потенциала диэлектриков на примере полиэтилена, подвергнутых различного вида внешнему