

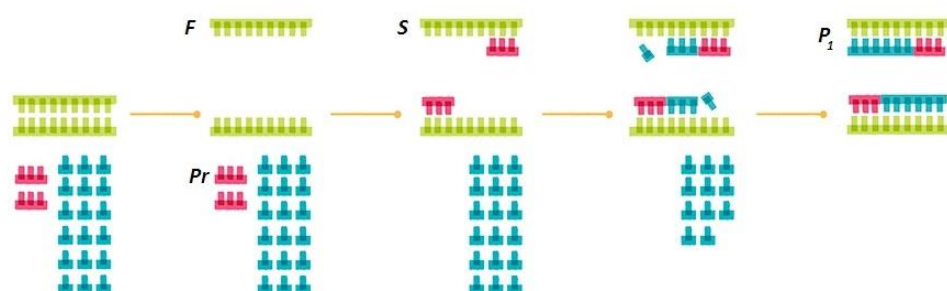
# ОЦЕНКА КОНСТАНТ ГИБРИДИЗАЦИИ ДНК ПО МОДЕЛИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ИНТЕРКАЛЯЦИОННЫМ КРАСИТЕЛЕМ

Федоров Алексей Александрович

f\_aa@mail.ru +79213148172

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук  
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д.31-33, лит.А. тел.: (812) 3630719, факс: (812) 3630720

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) является ключевым молекулярно-генетическим методом, применяемым для решения широкого круга научных и практических задач количественного анализа специфических последовательностей ДНК. Несмотря на более чем тридцатилетнюю историю использования метода ПЦР-РВ в настоящее время нет ни одной модели, позволяющей описать процесс количественно. В то же время, появление подобного аппарата позволило бы не только существенно упростить разработку ПЦР-РВ оборудования, но и решать принципиально новые задачи.



С точки зрения химической кинетики ПЦР представляет собой многостадийную многокомпонентную ферментативную реакцию, в которой происходит копирование исходной цепи ДНК (F) ферментом ДНК-полимеразой с места посадки праймера (Pr), определяющего специфичность реакции. В ходе реакции образуется промежуточный комплекс (S) из одноцепочечной ДНК (F) и праймера (Pr) из которого впоследствии образуется целевой продукт – двойная цепь ДНК (P<sub>1</sub>). Параллельно возможен процесс объединения исходных одноцепочечных молекул ДНК (F) с образованием исходной двойной цепи (P<sub>2</sub>). Связывание молекул интеркаляционного красителя (IC) с двойными цепями ДНК позволяет детектировать результат реакции.

## Модель ПЦР

Первичные реакции	$F + Pr \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} S, F + F \xrightarrow{k_2} P_2,$
Вторичные реакции	$F + S \xrightarrow{k_2} P_2 + Pr, S + S \xrightarrow{k_2} P_2 + Pr + Pr$
Реакции синтеза продукта	$S \xrightarrow{k_m} P_1$
Реакции связывания интеркаляционного красителя	$IC_{free} + P_1 \xrightarrow{k_{IC}} IC_{bound}, IC_{free} + P_2 \xrightarrow{k_{IC}} I_{bound}$

Одним из ключевых моментов моделирования ПЦР с помощью математического аппарата ферментативной кинетики является вопрос о значениях константах скорости гибридизации праймеров с одноцепочечными ДНК-мишенями  $k_1$ , а также скорости гибридизации комплементарных одноцепочечных фрагментов исходной ДНК-мишени  $k_2$ .

Значение констант гибридизации определяется целым рядом факторов. Согласно данным литературы значения констант гибридизации лежит в диапазоне  $10^5 - 10^7$  М/с [2,3].

Экспериментальные данные ПЦР для проверки модели были получены с помощью набора для ПЦР Амплитуб-РВ (АО Синтол) и прибора АНК-48 (ИАП РАН).

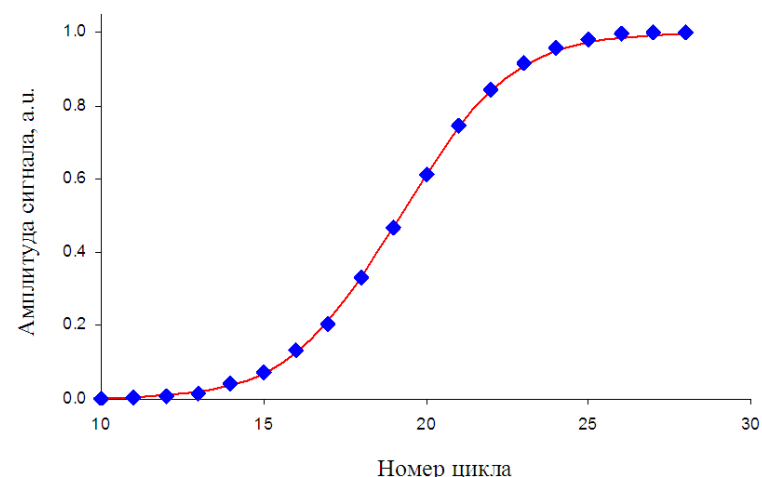


Рисунок 1 Экспериментальная ПЦР-РВ кривая (красная линия) и модельная (синие ромбы). Концентрация плазмид –  $10^6$  копий на реакцию, праймера – 1 мкл на реакцию. Реакционный объем – 25 мкл.

Максимальную точность аппроксимации экспериментальных кривых модельными удалось получить при  $k_1=5 \cdot 10^5$  М/с и  $k_2 = 3 \cdot 10^6$  М/с (рис.1), что хорошо согласуется с данными литературы о связи константы скорости ассоциации с длиной фрагментов ДНК. Важным результатом, полученным с помощью модели, является демонстрация того, что кривые накопления ДНК и сигнала связанного интеркаляционного красителя не совпадают и не могут быть получены простым линейным пересчетом.

### Список литературы:

1. Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю. ПЦР "в реальном времени". Москва: Лаборатория знаний, 2021.
2. Vanjur L., Carzaniga T., Casiraghi L., Chiari M., Zanchetta G., Buscaglia M. // Biophys. J. 2020. V. 119. № 5. P. 989–1001.
3. Gao Y., Wolf L.K., Georgiadis R.M. // Nucleic Acids Research. 2006. V. 11. № 1. P. 3370–3377.