

**МЕТОДИКА ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ
С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SYBRGREEN I**

Кузнецова А.А.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону,
e-mail: anna.kuz-2011@yandex.ru

В настоящее время наиболее популярной среди всех молекулярно-диагностических методик, используемых для детекции, становится ПЦР с учетом результатов в реальном времени. Это объясняется высокой чувствительностью, специфичностью реакции, оперативностью получения ответа, отсутствием возможности загрязнения ампликонами и возможностью проводить количественное определение исследуемой ДНК в пробе.

Типы ПЦР в реальном времени различаются по способам генерации репортерной флуоресценции. Существует два основных направления, которые используются в настоящее время:

1. Применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК (SYBR Green).
2. Использование меченых флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку PCR-продукта (TaqMan, Molecular Beacons и LightCycler) [1, 4-11].

При внесении в реакционную смесь SybrGreen I происходит внедрение этого красителя в двуцепочечную ДНК, амплифицируемую в процессе реакции, что позволяет учитывать возникающее при этом внедрение флуоресцентное свечение. Чем больше ДНК синтезируется в реакции, тем более интенсивный сигнал детектируется прибором.

Из всех перечисленных методик самой простой, доступной для любых лабораторий, имеющих соответствующую приборную базу, и экономически выгодной является методика с использованием интеркалирующих красителей.

Но, не смотря на то, что использование SYBR Green I чрезвычайно удобно и экономически выгодно, этот метод обладает рядом недостатков:

1. Высокие требования к специфичности реакции – любая двуцепочечная ДНК будет генерировать репортерную флуоресценцию.
2. Невозможность работать больше, чем с одной ПЦР-реакцией в одной реакционной смеси.
3. Меньшая точность при малых количествах субстрата.

Влияние неспецифических продуктов реакции на уровень детекции флуоресцентного свечения контролировали с помощью проверки специфичности при электрофоретическом разделении продуктов амплификации. Использование праймеров vlm12 показало, что в ПЦР с ДНК возбудителя чумы не образуются неспецифические фрагменты ДНК [12, 3]. При неизвестной пробе постановка контрольного электрофореза должна происходить всегда.

Данная методика предназначена только для одной ПЦР – реакции в реакционной смеси, поэтому нет необходимости учитывать второй недостаток.

По поводу третьего недостатка можно сказать, что тестирование диагностической системы показало, что точность определения количества микробных клеток падает при их концентрации ниже 10000 мкл в мл, однако, удачно, с нашей точки зрения, подобранные условия реакции позволяют и при концентрации ниже этих значений уверенно определять ориентировочное количество микробных клеток на амплификаторе «ДТ322» с возможностью автоматического программирования (ДНК Технология, Россия).

Методика выполнения полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителей *Yersinia pestis* в ПЦР с учетом результатов в реальном времени и с использованием SYBRGreen I и праймеров vlm12 состоит из трех этапов:

Первый – выделение ДНК из исследуемых проб [2]. Вторым этапом идет подготовка контрольной панели ДНК (Калибровочная панель изготавливалась из разведений содержащих 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 мк/мл двухсуточной культуры штамма *Y.pestis* EV76(НИИЭГ). Каждую пробу после выделения ДНК разводили 50 мкл ТЕ буфера и в реакцию вносили по 5 мкл материала. Таким образом, в пробирках, в которых проходила реакция, ориентировочно содержалось эквивалентное количество ДНК из $3 \cdot 10^7$, $3 \cdot 10^5$, 3000, 300, 30, 3 мк соответственно).

Третий этап собственно постановка ПЦР. Реакцию с выделенной ДНК проводят, руководствуясь стандартным протоколом. ПЦР с учетом результатов в реальном времени проводили в режиме автоматической амплификации на приборе ДТ-322 «ДНК-технология» (Москва), используя комплекты реагентов для ПЦР-PB (ОАО «Синтол», Москва). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Дополнительными компонентами служили: для ПЦР-PB SYBRGreen I – интеркалирующий краситель в концентрации 9 мкг/мкл.

Полученные результаты оцениваются как положительные при наличии сигнала, регистрируемого прибором по каналу регистрации длины волны 520 nm и сравнения уровня этого сигнала с сигналом от положительной и отрицательной пробы. Расчет ориентировочного значения примерной концентраций ДНК в пробе проводится с помощью сравнения кривых флуоресценции пробы и панели, контрольных образцов. Контроль специфичности ПЦР реакции проводится методом электрофоретического разделения полученных в тесте амплификатов. При наличии неспецифических фрагментов ДНК в пробе, отличающихся по молекулярной массе от специфического фрагмента – 390 п.н. результаты ПЦР невозможно считать корректными.

Список литературы

1. Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Осина Н.А. // Мол диагностика. – М., 2010. – Т. 1, Раздел 6. – С. 395-397;
2. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности: методические указания. – М., 2003. – МУ 1.3.1794-03.
3. Трухачёв А.Л., Иванова В.С., Арсеньева Т.Е. и др. // Клинич. лабораторная диагностика. – М., 2008. – №12. – С. 49-52.
4. Amoako K.K., Goji N., Macmillan T. et al. // J Food Prot. – 2010 Jan. – №73(1). – P. 18-25.
5. Gabitzsch E.S., Vera-Tudela R., Eisen R.J. et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2008. – №79(1). – P. 99-101.
6. He J., Kraft A.J., Fan J., Van Dyke M. et al. // Viruses. – 2009. – №1. – P. 441-459; doi:10.3390/v1030441.
7. Li W., Hai R., Yu D.Z. et al. // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 2005.
8. Matero P., Pasanen T., Laukkanen R. et al. // APMIS. – 2009 Jan. – №117(1). – P. 34-44.
9. Qu S., Shi Q., Zhou L., Guo Z. et al. // PLoS ONE, www.plosone.org March 2010. – Vol. 4, Issue 3. – e629.
10. Riehm J.M., Rahalison L., Scholz H.C. et al. // Mol Cell Probes. – 2011 Feb. – №25(1). – P. 8-12. Epub 2010 Oct 8.
11. Tran T-N-N., Signoli M., Fozzati L. et al. // PLoS ONE, www.plosone.org March 2011. – Vol. 6, Issue 3. – e16735.
12. Trukhachev A.L., Morozova I.V., Arsenjeva T.E. и др. // Medical corps. – 2009. – Vol. 4. – P. 29-30 Abstracts Medical Biodefense Conference 2009, Munich, Germany.

**РЕГРЕССИОННЫЕ МОДЕЛИ ПРОДУКЦИИ
ОЗЕРНОГО ФИТОПЛАНКОНА**

Кузьмина А.И.

Государственная полярная академия, Санкт-Петербург,
e-mail: Anna.kuzmina.spb@gmail.com

Одной из важнейших характеристик озерных экосистем (как и любых других) является первичная продукция. Существенную роль в образовании пер-

вичной продукции в озерах играют одноклеточные водоросли – фитопланктон. Продукция фитопланктона определяется гидробиологами в процессе натуральных экспериментов на озере, после чего на основе собранного материала делаются попытки формализовать зависимость первичной продукции от абиотических факторов – в первую очередь от концентрации биогенных элементов, особенно – общего фосфора. Для выявления взаимосвязи между этими переменными чаще всего используются регрессионные модели (Трифонов, 1989; Peters, 1989; Hakanson, Bouillon, 2001, 2002).

Целью моей работы является построение подобных регрессионных моделей с привлечением нескольких лимнологических параметров. Зависимой переменной является первичная продукция (PP), предикторами были выбраны общий фосфор и некоторые морфометрические характеристики озер.

В качестве исходных данных были использованы результаты исследования разнотипных озер Карельского перешейка и Восточной Латвии, проведенного в 1976-1984 гг. Институтом озерадения РАН (Особенности формирования..., 1984; Трансформация органического и биогенных веществ..., 1989).

Регрессионный анализ проводился с использованием пакета MS Excel (Вуколов, 2008).

Рассматривается два варианта проведения анализа:

- С разделением озер на две подгруппы по географическому признаку и анализ обобщенной группы озер.
- С использованием одной (общий фосфор, **Ptot**) или нескольких независимых переменных – средняя

(**Hsr**) и максимальная глубина (**Hmax**), площадь озера (**S**) и содержание фосфора (**Ptot**).

Для интерпретации полученных данных необходимо четыре показателя:

♦ **R-квадрат (R^2)** – характеризует степень точности описания моделью процесса. Если $R^2 > 0,95$, говорят о высокой точности аппроксимации (модель хорошо описывает явление). Если R^2 лежит в диапазоне от 0,7 до 0,95, говорят об удовлетворительной аппроксимации (модель в целом адекватна описываемому явлению). Если $R^2 < 0,6$, принято считать, что точность аппроксимации недостаточна.

♦ **Уровень значимости критерия Фишера (Значимость F)** – оценивается качество модели, ее достоверность (значение значимости F должно быть меньше 0,05).

♦ **Значения коэффициентов модели.** В строке Y-пересечение – свободный член, в строках соответствующих переменных – значения коэффициентов при этих переменных.

♦ **P-значимость** – достоверность отличия соответствующих коэффициентов от нуля. В случае, когда $p > 0,05$ – коэффициент считается нулевым. Это означает, что соответствующая независимая переменная практически не влияет на зависимую переменную и коэффициент может быть убран из уравнения.

Для возможности сравнения и дальнейшей работы полученные данные были объединены в единую таблицу (табл. 1).

Таблица 1

Регрессионные модели продукции озерного фитопланктона

		Карельский перешеек	Латгальская возвышенность	Обобщенная группа озер
Множественный коэф. корреляции R		0,96	0,58	0,57
Коэффициенты детерминации R^2		0,92	0,34	0,32
Значение F-критерия Фишера		26,14	3,67	5,11
Значимость F		5,71E-05	0,06	0,002
Коэффициент Модели/ Значимость	Y-пересечение	-14,12/0,27	54,60/0,26	33,82/0,32
	Площадь озера (S)	-6,98/0,0002	-173,38/0,03	-2,60/0,23
	Средняя глубина (Hsr)	-16,67/0,02	32,73/0,15	10,60/0,40
	Макс. глубина (Hmax)	9,02/0,002	-7,93/0,20	-1,51/0,72
	Общий фосфор (Ptot)	3867,90/0,00003	814,90/0,02	1047,84/0,0003

Когда данные обработаны и объединены в единую таблицу с ними можно работать и условно сравнивать. Начать следует с определения общего качества модели, ее достоверности и степени точности описания моделью процесса, как говорилось выше, достоверность определяется по уровню значимости критерия Фишера (в нашем случае для всех трех моделей $p < 0,05$ (строка Значимость F в табл. 1), из этого следует что модели достоверны), а точность описания по коэффициенту детерминации (R-квадрат в таблице регрессионная статистика при выводе результатов в Excel). Коэффициент детерминации в первом случае (Карельский перешеек) $R^2 = 0,96$, это говорит о высокой точности аппроксимации, в двух остальных случаях (Латгальская возвышенность и обобщенная группа озер) $R^2 < 0,6$ (0,58 и 0,57 соответственно) – модель требует улучшения. Для улучшения модели проведем регрессионный анализ убрав переменные, значимость которых превышает заданный уровень значимости ($p > 0,05$) (переменные

выделены цветом в табл. 1). Следует обратить внимание, что p-значение коэффициента «Y-пересечение» в данных случаях так же превышает установленный уровень, это говорит о том, что линия регрессии будет проходить через начало координат и это следует учесть при проведении повторного анализа. Данные регрессии по аналогии с первым случаем выделим в отдельную таблицу (табл. 2).

После удаления не влияющих переменных из модели значение коэффициента детерминации повысилось, $R^2 > 0,7$, а значит, улучшилась и степень соответствия построенной модели исходным данным.

Далее определяем значение коэффициентов модели (табл. 2 и 3): в строке Y-пересечение – свободный член, в строках соответствующих переменных коэффициенты при этих переменных. Для составления уравнения регрессии мы будем использовать коэффициенты значимости которых не превышает 0,05, т.к. они оказывают наибольшее влияние на зависимую переменную. Таким образом, получается 3 уравнения:

Группа озер	Уравнение
Карельский перешеек	$PP = 3599,26 * Ptot + 9,05 * Hmax - 17,65 * Hsr - 6,95 * S$
Латгальская возвышенность	$PP = 1681,39 * Ptot + 20,62 * S$
Обобщенная группа озер	$PP = 1777,58 * Ptot$

Таблица 2

Улучшенные регрессионные модели продукции озерного фитопланктона (без учета незначимых переменных)

		Карельский перешеек	Латгальская возвышенность	Обобщенная группа озер
Множественный коэф. корреляции		0,99	0,86	0,86
Коэффициенты детерминации		0,98	0,73	0,74
Значение F-критерия Фишера		116,37	43,31	131,98
Значимость F		9,65487E-08	0,006	4,12E-15
Коэффициент Модели/ Значимость	Y-пересечение	0	0	0
	Площадь озера (S)	-6,95/0,0002	20,62/0,77	-
	Средняя глубина (Hsr)	-17,65/0,0115	-	-
	Макс. глубина (Hmax)	9,05/0,0018	-	-
Общий фосфор (Ptot)		3599,26/0,00001	1681,39/7,93E-08	1777,58/3,02E-15

Задача прогнозирования сводится к решению уравнения регрессии $Y = a + \sum bx_i$, путем постановки полученных в результате расчетов коэффициентов. На основании известных значений независимых переменных можно произвести оценку неизвестных будущих значений зависимой переменной.

Было рассмотрено несколько вариантов:

- изучение влияния нескольких независимых переменных (в качестве независимых переменных использовались площадь, а так же средняя и максимальная глубина озера) на первичную продукцию
- использование в качестве основного фактора только общий фосфор (как наиболее влияющего на образование первичной продукции в случае с обобщенной группой озер и по величине коэффициентов).

Для лучшей интерпретации полученных результатов воспользуемся графиками, соотношения данных натуральных измерений первичной продукции и модельных расчетов, представленными на рис. 1-3.

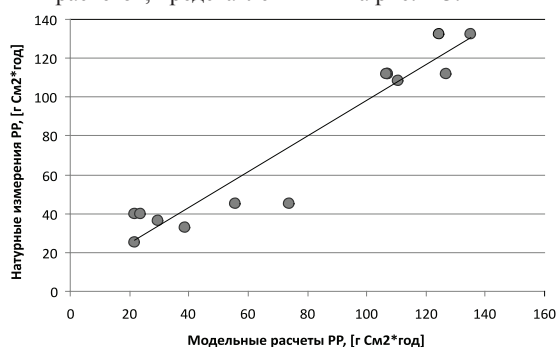


Рис. 1. Соотношение данных натуральных измерений первичной продукции и модельных расчетов (Карельский перешеек)

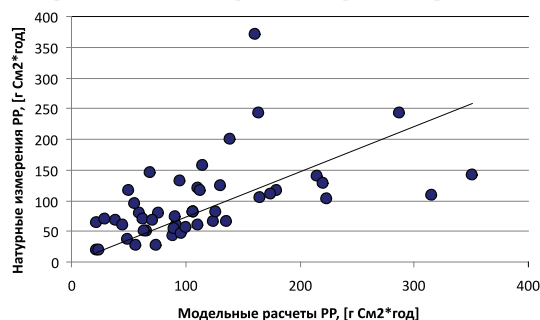


Рис. 2. Соотношение данных натуральных измерений первичной продукции и модельных расчетов (Латгальская возвышенность)

На графиках наглядно отражено соотношение исходных и рассчитанных данных. Самой хорошо «подогнанной» является регрессионная модель по Карельскому перешейку, в остальных моделях значительно отклонение от натуральных наблюдений, а значит, они требуют и дальнейшего улучшения.

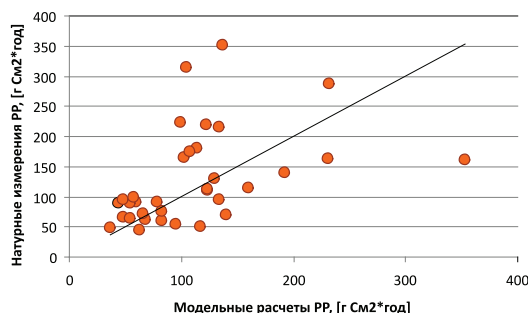


Рис. 3. Соотношение данных натуральных измерений первичной продукции и модельных расчетов (Обобщенная группа озер)

Выводы. Регрессионный анализ проведен по 20 озерам Карельского перешейка и Латгальской возвышенности, в ходе анализа была выявлена взаимосвязь между первичной продукцией и исследуемыми переменными.

Построенные модели описывают изучаемое явление с точностью от 30 до 95%, в случае если модель обладает высокой достоверностью – это означает правильность выбора фактора (или факторов) т.к. процент не объясненных вариаций, зависящих от других факторов невелик. В другом случае если преобладает число необъясненных вариации, это говорит о большом количестве посторонних, неучтенных факторов, которые вносят свой вклад в формирование первичной продукции водоема, но не находят отражения в построенной модели. Для улучшения качества построенных моделей следует внести в них дополнительные, ранее не учтенные переменные (к примеру, некоторые гидрохимические и гидрологические характеристики).

В нашем случае наиболее достоверной является модель по Карельскому перешейку, она наиболее точно описывает количественные связи между общим фосфором, морфометрическими характеристиками озер и образованием первичной продукции, в дальнейшем их можно использовать для получения оценок уровня продуктивности этих озер.

Список литературы

1. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA И EXCEL: учебное пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: Форум, 2008.
2. Трансформация органического и биогенных веществ при антропогенном эвтрофировании озер / отв.ред. В.Г. Драбкова, Е.А.Стравинская. – Л.: Наука, 1989. – 268 с.
3. Трифонова И.С. Содержание хлорофилла и скорость продуцирования органического вещества фитопланктоном в озерах с разным уровнем концентрации биогенных элементов // Трансформация органического и биогенных веществ при антропогенном эвтрофировании озер. – Л., 1989.
4. Hakanson L., Boulion V. V. Regularities in Primary Production, Secchi Depth and Fish Yield and a New System to Define Trophic and Humic state indices for Lake Ecosystems // Internat. Rev. Hydrobiol. – 2001. – №1. – 86 p.
5. Håkanson L., Boulion V.V. The Lake Foodweb – modelling predation and abiotic/biotic interactions // Leiden: Backhuys Publishers. – 2002.
6. Peters R. H. The role of prediction in limnology // Limnol. And Oceanogr. – 1986. – №35(5).