



Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени

М. И. Доронин, Д. В. Михалишин, А. В. Спрыгин, А. Мазлум, Т. В. Жбанова, К. Н. Груздев, Е. В. Чернышова
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в различных областях молекулярной биологии применяется основанная на флуоресцентной детекции количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, которая является передовой технологией генной диагностики. Практическая простота, а также сочетание высокой скорости, чувствительности и специфичности сделали возможным использование данного анализа для количественного определения нуклеиновых кислот. В статье представлены общие сведения и отражены рекомендуемые правила для разработки методик количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени. Материалы публикации нацелены на предоставление исследователям и рецензентам необходимых требований, которых следует придерживаться, чтобы обеспечить высокую точность, надежность и прозрачность экспериментов, правильную интерпретацию и повторяемость результатов анализа. Представлены современные подходы, которые позволяют получать надежные и достоверные результаты, проводимые разными операторами, в разное время и в разных лабораториях. Приведены основные требования, предъявляемые к применяемым реагентам, перечням нуклеотидных последовательностей и методам проведения валидационного анализа. В целом в представленной публикации отражена информация для достижения трех конечных целей работы: предоставить авторам широкий арсенал инструментов и требований для разработки методик на основе количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени; дать возможность рецензентам и редакторам оценивать качество представленных материалов статей и методических рекомендаций/указаний в соответствии с требуемыми критериями; получать однородные, сопоставимые и надежные результаты исследований, выполненных с помощью данного метода.

Ключевые слова: обзор, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, обратная транскрипция, требования к тест-системам, валидация, олигонуклеотидные праймеры и зонды, эффективность реакции амплификации

Благодарности: Данная работа выполнена за счет средств гранта Министерства образования и науки России в рамках реализации задач Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. по соглашению № 075-15-2021-1054.

Для цитирования: Доронин М. И., Михалишин Д. В., Спрыгин А. В., Мазлум А., Жбанова Т. В., Груздев К. Н., Чернышова Е. В. Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 197–207. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Доронин Максим Игоревич, доктор биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура, ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: doronin@arriah.ru.

Current approaches to development of real-time qPCR test-kits

M. I. Doronin, D. V. Mikhailishin, A. V. Sprygin, A. Mazloun, T. V. Zhanova, K. N. Gruzdev, E. V. Chernyshova
FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Currently fluorescent quantitative real-time polymerase chain reaction, which is a cutting-edge technology in genetic diagnosis, is used in different areas of molecular biology. Practical advantage of simplicity as well as combination of high speed, sensitivity and specificity made it possible to use this analysis for nucleic acid quantitation. The paper presents general information and recommended rules for the development of real-time qPCR. The publication is aimed to acquaint the researchers and reviewers with necessary requirements to be followed in order to ensure high accuracy, reliability and transparency of the experiments, correct interpretation and repeatability of the test results. Current approaches are described that allow obtaining reliable and consistent results by different operators, at different times and in different laboratories. Basic requirements for reagents used, nucleotide sequences and validation methods are given. In general, the publication gives the information needed to achieve three ultimate goals: to provide the authors with a broad range of tools and requirements for the development of real-time qPCR based-techniques; to give the possibility to the reviewers and editors of assessing the quality of articles and guidelines/instructions in accordance with the required criteria; to obtain consistent and reliable results of tests performed using this method.

Keywords: review, real-time polymerase chain reaction, reverse transcription, requirements for test-kits, validation, oligonucleotide primers and probes, performance of amplification reaction

Acknowledgements: This work was supported by the grant of the Ministry of Education and Science of Russia within the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027 under Agreement No. 075-15-2021-1054.

For citation: Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Sprygin A. V., Mazloum A., Zhanova T. V., Gruzdev K. N., Chernyshova E. V. Current approaches to development of real-time qPCR test-kits. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 197–207. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Maksim I. Doronin, Doctor of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В различных областях молекулярной биологии применяется основанная на флуоресцентной детекции количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ, qPCR), которая является передовой технологией генной диагностики [1–3]. Практическая простота, а также сочетание высокой скорости, чувствительности и специфичности сделали возможным применение данного анализа для количественного определения нуклеиновых кислот [4–6]. В последние годы было разработано множество диагностических тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ, включая системы для определения титра инфекционной активности возбудителей заболеваний, иммуногенных компонентов, содержащих геном возбудителя, идентификации трансгенов в генетически модифицированных пищевых продуктах, оценки риска рецидива рака и др. [4–15].

В настоящее время отсутствует единое представление относительно того, как наилучшим образом проводить разработку методик количественной ПЦР для осуществления экспериментов с последующим анализом данных. Проблема усугубляется отсутствием четко выверенных требований для этих разработок, что мешает исследователю критически оценить качество получаемых результатов [16–18]. Так, при разработке тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ некоторые авторы допускают ряд технических ошибок, часть из которых представлена в таблице 1.

Следовательно, существует реальная опасность искажения получаемых данных с применением методик количественной ПЦР-РВ [19, 20]. Кроме того, при разработке тест-систем часто опускается информация о сборе и обработке образцов, качестве и целостности РНК, деталях постановки реакции обратной транскрипции, эффективности ПЦР и параметрах анализа, а нормализация количественных данных для образцов обычно проводится по отдельным эталонным генам без надлежащего обоснования [21]. О проблеме стандартизации разработки методик количественной ПЦР-РВ заявлено во многих научных публикациях [19–23], следовательно, данная задача является актуальной в настоящее время.

Существует ряд научных работ, в частности руководство по разработке методик количественной ПЦР-РВ, в которых отражены основные требования к разработкам таких методик [24–26].

ПЦР-технологии в настоящее время в целом направлены на достижение исследовательских и диагностических целей [23]. При проведении научных исследований анализ обычно характеризуется низкой пропускной способностью и разнообразием типов образцов [25]. Основные параметры, которые необходимо учитывать, относятся к аналитической чувствительности и специфичности анализа [20, 26].

При использовании ПЦР для решения диагностических задач обычно анализируется ограниченное число целевых объектов, при этом требуется наличие высокопроизводительных протоколов, ориентированных только на несколько типов образцов [22]. Характеристика теста включает сведения об аналитической чувствительности и специфичности, то есть как часто анализ дает положительный результат при наличии мишени и как часто он является отрицательным при условии отсутствия целевого участка нуклеиновой кислоты [19, 24]. Кроме того, требуется проводить исследования точности, повторяемости и воспроизводимости анализа (табл. 2).

Целью данной работы является предоставление исследователям и рецензентам общих современных требований, которых следует придерживаться при разработке методик на основе количественной ПЦР-РВ, чтобы обеспечить высокую точность и надежность, прозрачность экспериментов, правильную интерпретацию и повторяемость результатов анализа.

Таблица 1
Возможные технические ошибки при разработке методики количественной ПЦР-РВ и их негативные последствия

Table 1
Possible technical errors that affect real-time qPCR assay performance and their negative consequences

№ п/п	Возможные технические ошибки	Негативные последствия
1	Неправильное хранение образцов, погрешности в процессе пробоподготовки и плохое качество нуклеиновых кислот	Существенные вариации результатов
2	Выбор недостаточно подходящих олигонуклеотидных праймеров и зондов для реакции	Неэффективная и меньшая производительность анализа
3	Неправильно проведенный статистический анализ	Получаемые результаты могут ввести в заблуждение

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ТЕРМИНОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЕТОДИК НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

В соответствии с предложениями, которые содержатся на ресурсе Real-time PCR Data Markup Language (RDML)¹ [27], требуется внести некоторые коррективы в употребление общепринятых терминов, применяемых при разработке методик на основе ПЦР, в частности:

– зонды TaqMan следует называть зондами для гидролиза;

– употребление термина «FRET-зонд» (флуоресцентный резонансный перенос энергии), относящегося к общему механизму, в котором излучение/тушение зависит от взаимодействия между состояниями электронного возбуждения двух молекул флуоресцентного красителя;

– зонды типа Light Cyler следует называть зондами двойной гибридизации [25];

– номенклатура, описывающая цикл ПЦР, который используется для количественного определения содержания нуклеиновых кислот, противоречива, а именно: в литературе используются понятия «пороговый цикл» (C_t – cycle threshold), «верхний максимум графиков второй производной» (C_p – crossing point) и «точка отсчета» (TOP – take-off point). Для унифицирования терминов многими авторами используется понятие «цикл количественной оценки» (C_q – quantification cycle) [28, 29].

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАЗЛИЧНЫМ ЭТАПАМ АНАЛИЗА

Отбор образцов биологического материала и их хранение. Отбор образцов представляет собой важный источник экспериментальной изменчивости, поскольку РНК легко повреждается. По данным P. Micke et al. [30], свежий биологический материал можно хранить на льду без существенного влияния на качество и содержание РНК, однако этот подход нельзя применять повсеместно. В ПЦР-протоколах важно подробно указывать всю историю получения и транспортировки биоматериала [31].

Экстрагирование нуклеиновых кислот. Экстракция нуклеиновых кислот также является серьезным этапом манипуляций в комплексе операций, входящих в состав общей методики на основе количественной ПЦР-РВ [32, 33]. Эффективность экстракции определяется степенью гомогенизации и типом образца (гомогенат тканей, культуральная суспензия, слюна, кровь и др.), плотностью мишени, физиологическим статусом (например, здоровый, злокачественный или некротический), генетической сложностью и количеством обработанной биомассы [27, 34–36].

Требуется предоставлять подробную информацию о способе экстракции нуклеиновых кислот и методах, используемых для измерения концентрации нуклеиновых кислот и оценки их качества. Такие детали особенно важны для РНК, выделенной из свежемороженого биоматериала, поскольку различия в процедурах подготовки тканей оказывают существенное влияние как на концентрацию РНК, так и на их качество [37–39].

¹ Real-time PCR Data Markup Language. Режим доступа: <https://rdml.org>.

Таблица 2
Параметры, предъявляемые для валидации методик на основе количественной ПЦР-РВ

Table 2
Parameters required for the validation of real-time qPCR-based methods

Область исследований	Характеристика анализа	Основные параметры валидационной оценки
Научные испытания	1. Низкая пропускная способность 2. Множество различных типов образцов	1. Аналитическая чувствительность 2. Аналитическая специфичность
Диагностические исследования	1. Анализ ограниченного числа целевых объектов 2. Наличие высокопроизводительных протоколов, ориентированных только на несколько типов образцов	1. Аналитическая чувствительность 2. Аналитическая специфичность 3. Точность 4. Повторяемость 5. Воспроизводимость

Контроль качества экстрактов РНК

Количественное определение РНК в экстрактах.

Количественное определение РНК в элюатах важно для проведения корректного анализа нуклеиновых кислот на этапе реакций обратной транскрипции и амплификации.

Существует несколько групп методов количественного анализа РНК в получаемых элюатах, а именно:

1) спектрофотометрический анализ с применением различных спектрофотометров;

2) микрофлюидный анализ, например, с помощью биоанализаторов компаний Agilent Technologies, Inc. (США), Bio-Rad Laboratories, Inc. (США) и др.;

3) капиллярный гель-электрофорез, например, с использованием автоматической станции QIAxcel компании Qiagen (Германия) и др.;

4) флуоресцентная детекция (Ambion, RiboGreen, Thermo Fisher Scientific, Inc., США, и др.) [14, 23, 40].

Следует отметить, что молекулы РНК заметно деградируют *in vivo* из-за естественной регуляции мРНК в ответ на различные влияния факторов окружающей среды [41, 42]. Так, даже высококачественные элюаты РНК могут демонстрировать дифференциальную деградацию отдельных молекул, что исследователю сложно контролировать.

Процедура определения степени чистоты элюата РНК.

Для определения степени чистоты полученных элюатов проводят спектральное исследование экстрактов. Измерения спектральной поглощающей способности образцов осуществляют при длине волны 205–325 нм и температуре 20–22 °С. В экстрактах РНК оценивают содержание остатков фосфолипидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата, карболовой кислоты, полипептидов и крупных взвешенных частиц, определяя значения оптической плотности (OD – optical density) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Наибольшая адсорбция для РНК должна отмечаться при длине волны, равной 260 нм [40]. Элюат РНК считают свободным от примесей белка и карболовой кислоты, если OD_{260}/OD_{280} (коэффициент экстинкции R_1) находится в пределах 1,8–2,2 и оптимально составляет примерно 2,0. Более низкие значения R_1 указывают на наличие ДНК, белка и остатков фенольных соединений в экстракте. Более высокие значения коэффициента R_1 свидетельствуют о деградации РНК и наличии

свободных рибонуклеотидов. Экстракт молекул РНК считают свободным от полисахаридов, если отношение OD_{260}/OD_{235} (коэффициент экстинкции R_2) приближено к значению 2,000 [40, 43, 44]. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие R_2 снижается на 0,002. Значения коэффициента R_2 больше 2,000 могут указывать на деградацию молекул РНК. Отсутствие взвешенных частиц в экстракте подтверждается, если оптическая плотность при длине волны 320 нм приближена к нулевому значению.

Важно проводить анализ степени загрязнения элюата РНК геномной ДНК, а также зафиксировать в протоколе исследования пороговые критерии отсека для допустимых количеств такого загрязнения. Требуется отражать информацию о том, был ли экстракт РНК обработан ДНКазой, а также зафиксировать результаты сравнения циклов количественной оценки (C_q), полученных с положительным контролем и контролем без осуществления реакции обратной транскрипции для каждой нуклеиновой кислоты – мишени [20].

Определение целостности РНК в элюате. Для оценки целостности РНК и отсутствия контаминации ДНК проводят горизонтальный гель-электрофорез денатурированной РНК, по итогам которого детектируют четко различимый бэнд молекул нуклеиновой кислоты без наличия выраженных посторонних полинуклеотидных фрагментов [45]. Электрофорез проводят в тонком 0,5%-м геле агарозы, приготовленном на основе агарозы Е, 1× электродного буфера, свободного от РНКаз, в градиенте напряженности 1–2 В/см геля в течение 45 мин. Для индикации РНК после электрофореза гель окрашивают раствором красителя с концентрацией бромистого этидия 0,4 мкг/мл в 25 мМ трис-НСl (рН 9,0) в течение 50–60 мин. Детекцию РНК-бэндов проводят в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [45, 46].

Анализ элюата ДНК. Степень деградации ДНК важно определять в судебно-медицинской практике, поскольку негативные условия окружающей среды на месте преступления могут привести к ухудшению качества нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что молекулы ДНК более стабильны и менее подвержены разрушениям, чем РНК. По этой причине проведение анализа степени чистоты и целостности ДНК проводят значительно реже. При этом и для элюатов ДНК сохраняется общее правило – регулярно использовать разведения нуклеиновых кислот, чтобы продемонстрировать, что наблюдаемое снижение значения цикла количественной оценки или числа копий согласуется с ожидаемым результатом [47].

Требования к реакции обратной транскрипции. При работе с элюатами РНК для последующего проведения количественной ПЦР-РВ требуется осуществлять реакцию обратной транскрипции, которая может вносить существенные изменения в проводимый анализ [48, 49]. Исходя из этого, в протоколе анализа необходимо подробно отражать следующую информацию:

- компонентный состав реактивов;
- температурно-временной режим реакции обратной транскрипции;
- количество РНК в собранном элюате;
- разработка дизайна праймеров;
- тип фермента;
- объем реакции.

Рекомендуется этап обратной транскрипции выполнять сразу для 2–3 экземпляров исследуемого элюата,

при этом общая концентрация РНК в них должна быть одинаковой [49].

Требования к количественной реакции амплификации в режиме реального времени. Для разработки методики на основе количественной ПЦР-РВ автор должен владеть следующим набором информации:

- идентификационные номера исследуемых участков генов или полных геномов в базе данных (например, GenBank, WIPO Sequence или др.);
- расположение экзонов в РНК для каждого олигонуклеотидного праймера и зонда;
- последовательности нуклеотидов и концентрации каждого олигонуклеотида, положения применяемых в зонде красителей и/или модифицированных структур;
- публикация последовательностей праймеров и зондов (поскольку эффективность реакции амплификации во многом зависит от используемых олигонуклеотидов);
- название, свойства и концентрация полимеразы;
- количество матрицы (ДНК или кДНК) в каждой реакции;
- концентрация катионов Mg^{2+} ;
- точный химический состав буферного раствора (минеральные соли, дополнительные присадки, концентрация ионов водорода);
- общий объем компонентов для одной реакции;
- свидетельство о проверке прибора для проведения ПЦР;
- данные по временным и температурным режимам термоциклирования;
- сведения о степени прозрачности пластиковой посуды для проведения ПЦР и материалу, из которого она изготавливается (поскольку разные пластмассы демонстрируют существенные различия в отражении флуоресценции и чувствительности) [50, 51].

Требования к расчету олигонуклеотидных праймеров и зондов. Структура нуклеиновой кислоты – мишени (например, стволовой и петлевой вторичной РНК) оказывает существенное влияние на эффективность реакции обратной транскрипции и ПЦР [52]. Следовательно, положения праймеров, зондов и ПЦР-ампликонов должны учитывать сворачивание матриц РНК.

Для разработки методик на основе количественной ПЦР-РВ полезно применять такие инструменты для определения специфичности олигонуклеотидов *in silico*, как BLAST² и др. Любая заметная гомология с псевдогенами или другими мишенями должна быть задокументирована и представлена в виде выровненных последовательностей.

Важным требованием является подтверждение специфичности прямыми экспериментальными данными (например, результатами электрофореза, профилем плавления, секвенированием цепочек ДНК, размером ампликона или расщеплением с помощью рестриктаз) [53, 54].

Важной характеристикой праймеров является их размер, от которого зависит специфичность реакции. Как правило, длина праймеров находится в диапазоне от 17 до 35 н. о., но могут быть исключения (допустима большая длина). Длина нуклеотидной цепи влияет на температуру плавления. Температура плавления

² Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

(гибридизации, диссоциации, T_m – temperature melting) – температура, при которой $1/2$ молекул олигонуклеотидов находится в гибридном состоянии с матрицей, а половина – в одонитевом свободном состоянии. T_m определяется прочностью водородных связей между нуклеотидами праймера и той молекулы ДНК, с которой он гибридизуется. Существуют различные подходы к определению данного показателя. Преимущественно температуру плавления определяют как точку перегиба на графике гибридизации, что соответствует максимальной точке на графике первой производной. Реже за температуру диссоциации праймеров принимают именно такую, при которой достигнута половина от максимального уровня флуоресцентного сигнала [17, 54–56]. Нужно заметить, что существуют расчетное и истинное значение температуры плавления. Первое получают с применением ряда формул, и это значение является теоретическим, второе – в процессе проведения молекулярно-биологического исследования опытным путем. На практике для решения этой задачи пользуются различными формулами или ресурсами биоинформатики [57, 58].

Термодинамические расчеты с учетом базовой энергии выполняют, как описано K. J. Breslauer et al. [59], но с использованием значений, опубликованных N. Sugimoto et al. [60]. Термодинамические свойства РНК взяты из работы T. Xia et al. [61]. Расчеты температуры плавления основаны на термодинамической зависимости между энтропией, энтальпией, свободной энергией и температурой: $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, где ΔH – энтальпия; ΔG – энергия Гиббса; T – абсолютная температура (K); ΔS – энтропия.

Изменение энтропии (порядок или мера случайности олигонуклеотида) и энтальпии (тепло, выделяемое или поглощаемое олигонуклеотидом) вычисляются непосредственно путем суммирования значений для пар нуклеотидов, полученных N. Sugimoto et al. [60]. Связь между свободной энергией и концентрацией реагентов и продуктов в состоянии равновесия определяется выражением:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right),$$

где R – универсальная газовая постоянная (8,31 [Дж/моль × K]); T – абсолютная температура (K); \ln – натуральный логарифм; $[\text{DNA} \times \text{primer}]$ – концентрация связанного комплекса ДНК × праймер; $[\text{DNA}]$ – концентрация несвязанной целевой последовательности ДНК; $[\text{primer}]$ – концентрация несвязанного праймера.

Подставив ΔG , получаем:

$$\Delta H = T\Delta S + RT \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right).$$

Абсолютную температуру выражают с помощью следующего уравнения:

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left(\frac{[\text{DNA} \times \text{primer}]}{[\text{DNA}] [\text{primer}]} \right)}.$$

Предполагая, что концентрации ДНК и комплекса ДНК × праймер равны (концентрация праймера превышает целевую ДНК, а точка плавления находится там, где концентрации связанной и несвязанной ДНК находятся в равновесии), уравнение упрощается. Эмпирически определено, что существует изменение

свободной энергии на 5 ккал (по N. Sugimoto et al. [60]) во время перехода от одноцепочечной К-форме ДНК. Это представляет собой энергию инициирования спирали. Учитывая также поправки на концентрацию соли, получают уравнение:

$$T = \frac{\Delta H - 3,4 \frac{\text{kcal}}{\text{K mole}}}{\Delta S + R \ln \left(\frac{1}{[\text{primer}]} \right)} + 16,6 \log_{10}([\text{Na}^+]),$$

где T – абсолютная температура (K); ΔH – энтальпия; kcal – энергия; mole – количество вещества; ΔS – энтропия; R – универсальная газовая постоянная (8,31 [Дж/моль × K]); \ln – натуральный логарифм; $[\text{primer}]$ – концентрация несвязанного праймера; \log_{10} – десятичный логарифм (lg); $[\text{Na}^+]$ – концентрация катионов натрия.

Константа корректировки концентрации соли не требуется, поскольку параметры определяются при 1 M NaCl, а lg 1 равен нулю. Исходя из термодинамических расчетов, отжиг происходит при значении водородного показателя, равного 7,0. Расчеты T_m основываются на том, что последовательности не являются симметричными. Для получения оптимальной T олигонуклеотидная последовательность должна иметь длину не менее 8 оснований. Точность расчета снижается после 20–25 нуклеотидов, поскольку уравнения и параметры определены с олигонуклеотидами в диапазоне размеров 14–25 нуклеотидов. Концентрация одновалентных катионов (Na^+ или K^+) должна быть от 0,01 до 1,00 M. Расчет температуры плавления олигонуклеотидов также можно проводить с применением программ биоинформатики, в частности ресурса Primer3Plus³ [50].

Если теоретически определенная температура плавления будет существенно отличаться от истинной, это не критично, поскольку для тест-системы более важна температура отжига (T_a – temperature annealing) и соотношение T_m олигонуклеотидов между собой и их соответствие данной температуре в программе термоджиклера. Исходя из этого, исследователи тестируют несколько условий проведения реакции амплификации, а именно температуры отжига праймеров, подбирая оптимальную [15, 48, 50].

Для теоретического определения температуры гибридизации применяют множество различных алгоритмов, но ни один из них не дает 100%-й уверенности в получении истинного значения. Рекомендуемая температура плавления олигонуклеотидов находится в диапазоне 55–75 °C. Температуры гибридизации прямого и обратного праймеров должны отличаться не более чем на 5 °C. Следует отметить, что чем больше G+C-содержание и длина олигонуклеотида, тем выше T_m [22].

Транскрипты большинства генов многоклеточных организмов альтернативно сплайсируются, и эти варианты сплайсинга определяют альтернативные изоформы белка. Известно, что существуют различия в паттернах сплайсинга в разных тканях или на разных стадиях развития. Следовательно, для одного экзона может быть обнаружено несколько вариантов сплайсинга, в то время как олигонуклеотидные праймеры, охватывающие интрон, могут быть более избирательными и вообще пропускать некоторые варианты сплайсинга [45].

³ Primer3Plus. Режим доступа: <https://www.primer3plus.com>.

Исходя из этих сведений, при разработке методик на основе количественной ПЦР-РВ требуется придерживаться следующих правил (и исключений) при определении генов-мишеней для мРНК:

1) использование количественной ПЦР-РВ, нацеленной на 1–2 экзона мРНК, больше недостаточно для описания уровня экспрессии конкретного гена;

2) информация о последовательности олигонуклеотидов должна предоставляться вместе с оценкой их специфичности по отношению к известным вариантам сплайсинга и позициям однонуклеотидного полиморфизма [54]. Для наборов праймеров, выбранных из базы данных RTprimerDB [56], это легко сделать, обратившись к веб-сервису⁴, где содержится вся соответствующая информация. Не рекомендуется предоставлять результаты, которые были подтверждены только *in silico*;

3) следует помнить, что обнаружение присутствия мРНК не дает никакой информации о том, будет ли эта мРНК транслироваться в белок и будет ли вообще транслироваться в функциональный белок [36].

Требования к контролям и калибраторам количественной ПЦР-РВ. Кроме контроля на этапах выделения нуклеиновой кислоты и реакции обратной транскрипции для разработки методик количественного анализа требуются еще и дополнительные средства контроля и/или калибраторы количественного определения [27, 36].

Внутренний отрицательный контроль. Рекомендуется применять внутренний контрольный образец (ВКО, NTS – no template control), который позволяет обнаруживать загрязнение реакционной смеси, а также образование неспецифических продуктов реакции амплификации, в частности димеров праймеров [48].

Использование ВКО основано на возможности проведения в одной реакционной смеси нескольких практически независимых реакций амплификации для ДНК-фрагментов разной длины (мультиплексная ПЦР) [62, 63]. Так, например, для контроля эффективности реакции амплификации можно использовать одновременное протекание двух ПЦР в одной пробирке. В одной из таких реакций происходит накопление целевого фрагмента ДНК (или кДНК), а в другой амплифицируется специально добавленная в реакцию ДНК (обычно это фрагмент плазмидной ДНК). С помощью ВКО, добавляемого в образец перед этапом выделения нуклеиновой кислоты, можно проконтролировать эффективность всех этапов анализа.

В случае ПЦР с обратной транскрипцией рекомендуется использовать ВКО – это специально сконструированный препарат РНК, добавляемый к каждому анализируемому образцу на этапе пробоподготовки биоматериала (экзогенный внутренний контроль), который проходит все этапы полимеразной цепной реакции. На этапе детекции ПЦР для ВКО позволяет судить о качестве результата при проведении реакции амплификации в целом. Его добавляют непосредственно перед выделением нуклеиновой кислоты. Если при ПЦР-анализе получают сигнал от ВКО, это свидетельствует о том, что результат реакции можно учитывать, в обратном случае результат ПЦР будет недействительным [2, 52].

Внутренний контрольный образец должен быть включен для каждой серии исследований образцов

с установлением условий для оценки результата реакции. Например, загрязнение можно игнорировать при значении цикла количественной оценки, равном 40 для ВКО, если C_q для самой низкой концентрации равен 35 [9].

Для получения оптимальных результатов ПЦР рекомендуется использовать отдельные рабочие зоны для приготовления реакционной смеси, добавления матрицы и проведения реакции [17].

Положительный контроль на этапе ПЦР в виде нуклеиновых кислот, выделенных из экспериментальных образцов, необходим для мониторинга изменения результатов анализа с течением времени и когда калибровочные кривые не получают при каждой постановке реакции.

Калибраторами количественного определения могут быть следующие материалы:

- очищенные молекулы-мишени (синтетические олигонуклеотиды РНК или ДНК, охватывающие полный ПЦР-ампликон);
- конструкции плазмидной ДНК;
- кДНК, клонированная в плазмиды;
- РНК, транскрибируемая *in vitro*;
- эталонные пулы РНК;
- РНК или ДНК из биологических образцов или общепризнанные биологические стандарты.

Разведения суспензий положительных контролей следует проводить до определенных предельных концентраций. Последовательные разведения заданной матрицы могут быть приготовлены в виде исходных растворов, которые выдерживают несколько циклов замораживания-оттаивания. Свежую порцию следует готовить при обнаружении сдвига цикла количественной оценки на 0,5–1,0. В качестве альтернативы растворы для калибровочных кривых можно хранить не более одной недели при температуре $(2 \pm 1) ^\circ\text{C}$ [12].

Для диагностических анализов на основе количественной ПЦР-РВ необходимо применять независимый проверенный калибратор, если таковой имеется, который находится в пределах линейного интервала анализа.

Отрицательный контроль на этапе ПЦР. Кроме положительного контроля на этапе реакции амплификации непременно требуется использовать отрицательный контроль, в качестве которого наиболее часто применяют деионизированную воду, неконтаминированную посторонними нуклеиновыми кислотами, ферментами, микроорганизмами [35].

Контроли на этапе выделения нуклеиновой кислоты. Рекомендуется использовать положительный и отрицательный контроли экстракции нуклеиновой кислоты, которые применяют на этапе выделения РНК/ДНК [55].

Эффективность проводимого анализа. При разработке методики на основе количественной ПЦР-РВ необходимо определять следующие рабочие характеристики анализа: эффективность реакции амплификации, линейный динамический диапазон, предел обнаружений и точность.

Эффективность реакции амплификации. Надежность и точность результатов количественной ПЦР-РВ напрямую зависят от степени эффективности реакции амплификации, которая особенно важна при представлении данных о концентрациях мРНК для генов-мишеней по сравнению с концентрациями референсных генов.

⁴ RTprimerDB. Режим доступа: <http://www.rtpimerdb.org>.

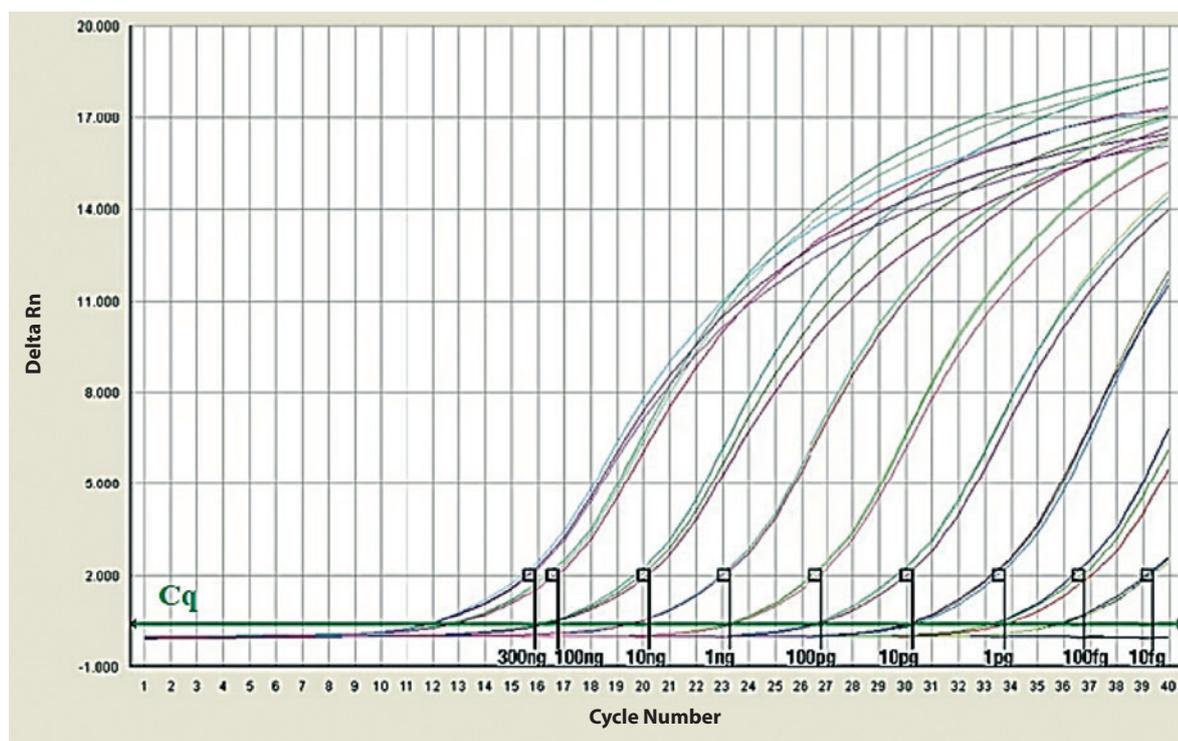


Рис. Кривые накопления флуоресцентного сигнала при анализе суспензий кДНК вируса ящура с концентрациями аналита от 10 фг до 300 нг/мл

Fig. Fluorescence accumulation curves obtained by testing of FMDV cDNA suspensions at analyte concentrations within 10 fg to 300 ng/mL

Детекция значений C_q ($\Delta\Delta C_q$) является одним из наиболее известных способов определения различий в концентрациях аналита между образцами, который основан на нормализации с помощью одного эталонного гена. Вычисляется разница в значениях циклов количественной оценки (ΔC_q) между геном-мишенью и геном-эталонном, и C_q различных образцов сравниваются непосредственно. Два гена должны быть амплифицированы с сопоставимой эффективностью, чтобы это сравнение было точным [21, 43]. На рисунке в качестве примера отражены кривые накопления флуоресцентного сигнала для суспензий кДНК вируса ящура с разными концентрациями аналита (от 10 фг до 300 нг/мл).

Эффективность реакции амплификации должна быть установлена с помощью графиков, поскольку такая калибровка обеспечивает простое, быстрое и воспроизводимое определение среднего значения эффективности ПЦР, аналитической чувствительности и надежности анализа. Эффективность реакции амплификации определяют по угловому коэффициенту логарифмически линейной части калибровочной кривой, пользуясь формулой: $E = 10^{-1/k} - 1$, где k – угловой коэффициент (slope) графика зависимости двух величин: логарифма начальной концентрации матрицы (независимая переменная), нанесенного на график по оси абсцисс, и значения C_q (зависимая переменная), расположенного на оси ординат.

Значение E , равное 1,00 (или 100%), указывает на то, что количество продукта удваивается с каждым циклом (теоретически).

Полученные результаты исследования, а также значение углового коэффициента требуется внести в протоколы количественной ПЦР-РВ. Различия в эффективности реакции амплификации приводят

к получению калибровочных кривых с разным углом наклона. Как следствие, различия между значениями циклов количественной оценки целевых и референтных данных не будут оставаться постоянными, поскольку количества в контрольных образцах варьируют, и расчеты относительных концентраций будут неточными и приводящими к искаженным результатам [12, 35, 54].

Следует обратить внимание на то, что при значениях циклов количественной оценки, приближенных к 40, высока вероятность низкой эффективности либо содержание аналита имеет значения ниже аналитической чувствительности [36].

Динамический диапазон определений аналита с помощью количественной ПЦР-РВ. При разработке методики необходимо описать динамический диапазон количественного анализа – промежуток значений содержания аналита в исследуемых образцах, в котором реакция амплификации является линейной [39]. Динамический диапазон должен охватывать не менее трех порядков величины. Линейный интервал калибровочной кривой должен указывать интервал для количественного определения целевых нуклеиновых кислот [14].

Учитывая, что нижние пределы количественного определения обычно плохо выявляют, следует определять изменения количественных показателей при самой низкой концентрации. Должны быть указаны коэффициенты корреляции (значения r^2), и по всему линейному динамическому диапазону должны предоставляться 95%-е доверительные интервалы [64].

Предел обнаружения (LOD – limit of detection) – это минимальное содержание аналита в пробе, которое может быть выявлено с приемлемым уровнем

достоверности. Следовательно, LOD определяется как самая низкая концентрация, при которой обнаруживается 95% положительных проб. Таким образом, в группе повторов исследования проб, содержащих аналит в концентрациях, равных LOD, должно наблюдаться не более 5% реакций с отсутствием результата. Количественные ПЦР-РВ с низким содержанием копий стохастически ограничены, и предел обнаружения, равный трем копиям, в ПЦР невозможен. Однако, если проводится несколько реакций, точное количественное определение более низких концентраций может быть получено с помощью цифровой ПЦР [18, 22].

Наименьшее количество аналита находят по формуле: $LOD = 3,3 \times S_b/k$, где S_b – стандартное отклонение детектируемого сигнала, которое соответствует стандартному отклонению свободного члена (b); k – тангенс угла наклона [65, 66]. Свободный член находят при анализе определенного количества модельных образцов с известными значениями концентрации аналита.

Предел количественного определения (ПКО). Минимальное значение концентрации аналита, определенное с соответствующей правильностью и прецизионностью валидируемой методики, рассчитывают с применением формулы: $ПКО = 10 \times S_b/k$ [66]. Полученное значение ПКО подтверждают прямым экспериментом при исследовании определенного количества модельных образцов с концентрациями аналита, близкими к найденному значению ПКО. Анализ проводят как минимум в пяти повторениях. Результаты исследования считают достоверными при $p < 0,05$ [66–69].

Линейность. Существование линейной зависимости двух показателей в пределах диапазона применения методики проверяют в ходе эксперимента, детектируя показатель для количества проб, равного ≥ 30 , с различными концентрациями аналита с не менее тремя повторениями. Полученные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием регрессионной модели $y = k \times x + b$, где k – угловой коэффициент; b – свободный член. Достоверность результатов анализа подтверждают, вычисляя коэффициент корреляции (r^2), который по модулю должен быть $\geq 0,99$ [69].

Правильность. Для определения правильности проводят анализ проб с известными значениями аналита, осуществляя постановку количественного варианта ПЦР. Данные предоставляют в виде уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными с помощью количественной ПЦР (y) и эталонными (x) значениями аналита: $y = k \times x + b$. Для полученной функции проверяют гипотезы о равенстве тангенса угла наклона (k) единице и равенстве свободного члена (b) нулю. При доказательстве верности указанных гипотез со степенью надежности, равной 0,05, использование валидируемой методики дает свободные от ошибки результаты [64].

Прецизионность. Для оценки прецизионности разрабатываемых тест-систем на основе количественной ПЦР-РВ в условиях сходимости и воспроизводимости требуется рассчитывать абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) определяют как разность между максимальным и минимальным значениями цикла количественной оценки: $R = Cq_{\max} - Cq_{\min}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находят с помощью

формулы $d_i = |Cq_i - Cq_{cp}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывают как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений: $d_{cp} = \sum |d_i| / N$, где d_i – индивидуальные линейные отклонения циклов количественной оценки; N – объем совокупности. Оценку дисперсии (δ^2) показателей осуществляют с применением формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации Cq рассчитывают среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь математической моделью $\delta = \sqrt{\delta^2}$ [64–66, 70].

Определение относительных показателей вариации. Коэффициент осцилляции (V_R) вычисляют по формуле: $V_R = R / C_{tcp} \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_v) рассчитывают с применением математической модели $C_v = d_{cp} / C_{tcp} \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений C_p определяют коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = \delta / C_{tcp} \times 100$ [17]. Метод считают надежным при $C_\delta < 2\%$ в условиях сходимости и при $C_\delta < 3\%$ в условиях воспроизводимости [64–67].

Определение статистических показателей тест-системы. Основными статистическими показателями тест-систем являются: диагностическая чувствительность (DSe), диагностическая специфичность (DSp), k-критерий (индекс каппа Коэна), прогностичность положительного результата (PPV), прогностичность отрицательного результата (NPV). Для их установления требуются следующие данные по результатам исследования: a – истинно положительные образцы; b – ложноотрицательные образцы; c – ложноположительные образцы; d – истинно отрицательные образцы.

Диагностические чувствительность и специфичность определяют по формулам: $DSe = a / (a + b)$ и $DSp = d / (c + d)$ – и выражают в процентах.

Индекс каппа Коэна (k-критерий) используется для измерения степени согласованности между любыми двумя методами. Данный параметр находят по расчетной формуле: $k = (Pr(a) - Pr(e)) / (1 - Pr(e))$, где Pr(a) – относительное наблюдаемое согласие; Pr(e) – гипотетическая вероятность случайного согласия.

Вероятность положительного результата реакции при исследовании истинно положительных проб находят по формуле: $PPV = (DSe \times prevalence) / ((DSe \times prevalence) + (1 - DSp) \times (1 - prevalence))$, где prevalence – показатель превалентности, распространенности (число событий, в данном варианте – случаев выявления положительных проб из истинно положительных в определенный момент). Данный показатель должен стремиться к 100%.

Вероятность отрицательного результата реакции при исследовании истинно отрицательных проб рассчитывают по формуле: $NPV = DSp \times (1 - prevalence) / ((1 - DSe) \times prevalence + DSp \times (1 - prevalence))$. Данный показатель должен стремиться к 100% [64–68, 70].

ТРЕБОВАНИЯ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР-РВ

Общие требования. Анализ данных включает в себя изучение исходных данных, оценку их качества и надежности, а также формирование отчетных результатов [2, 71]. При разработке количественной ПЦР в режиме реального времени в протоколе необходимо указывать актуальную информацию:

- методы анализа данных и оценки достоверности;
- спецификацию программного обеспечения;
- методы выявления выбросов;

– статистические и валидационные методы, используемые для оценки отклонений (например, 95%-й доверительный интервал), и представление соответствующих концентраций или значений C_q для анализа прецизионности в условиях сходимости и воспроизводимости [67, 70].

Нормализация данных количественной ПЦР-РВ.

Нормализация является важным этапом анализа точности количественной ПЦР, поскольку этот процесс контролирует изменения на этапах выделения нуклеиновой кислоты, реакции обратной транскрипции и эффективности амплификации, что позволяет сравнивать концентрации мРНК в разных анализируемых образцах.

Важным инструментом для проведения нормализации данных количественной ПЦР-РВ является использование эталонных генов в качестве внутреннего контроля. Нормализация включает в себя представление данных об отношении концентраций мРНК интересующих генов к концентрациям эталонных генов. мРНК эталонных генов должны быть стабильно экспрессированы, и их содержание должно демонстрировать высокую корреляцию с общим количеством нуклеиновой кислоты данного типа, присутствующей в образцах.

Следует отметить, что нормализация по одному эталонному гену неприемлема, если исследователи не предоставят для рецензентов четких доказательств, подтверждающих его инвариантную экспрессию в описанных экспериментальных условиях [25]. Оптимальное количество и выбор эталонных генов должны быть определены экспериментально. Подробно данный процесс описан в публикациях J. Vandesompele et al. [72], C. L. Andersen et al. [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа публикаций и международных протоколов были представлены общие требования и отражены рекомендуемые правила разработки методик на основе количественного ПЦР-анализа в режиме реального времени, соблюдение которых позволит рецензентам полноценно охарактеризовать проведенное исследование, а другим исследователям – воспроизвести его.

В соответствии с современными подходами (в частности, с руководящими принципами MIQE – база контрольных списков разработанных методик количественной ПЦР⁵) при представлении материалов используют язык разметки данных количественной ПЦР в реальном времени (RDML), который является структурированным и универсальным стандартом результатов для обмена количественными данными реакции амплификации. Согласно данным принципам методика должна содержать достаточную информацию для повторного анализа данных и интерпретации результатов. Стандарт данных представляет собой сжатый текстовый файл в формате XML (расширяемый язык разметки), обеспечивающий прозрачный обмен аннотированными данными количественной ПЦР-РВ между программным обеспечением прибора и сторонними пакетами анализа данных, между коллегами и соавторами, а также между авторами, рецензентами, журналами и читателями.

⁵ MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Режим доступа: <http://rdml.org/miqe>.

В целом в представленной публикации отражена информация для достижения трех конечных целей работы:

1. Дать авторам широкий арсенал инструментов и требований для разработки методик на основе количественной ПЦР-РВ.
2. Позволить рецензентам и редакторам определять технические качества материалов с разработками разных методик на основе ПЦР в соответствии с установленными критериями.
3. Облегчить воспроизведение экспериментов, описанных в опубликованных исследованиях, которые следуют представленным выше требованиям, и получать однородные, сопоставимые и надежные результаты количественной ПЦР-РВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bernard P. S., Wittwer C. T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin. Chem.* 2002; 48 (8): 1178–1185. PMID: 12142370.
2. Burns M. J., Valdivia H., Harris N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 378 (6): 1616–1623. DOI: 10.1007/s00216-003-2441-9.
3. Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 2005; 34 (3): 597–601. DOI: 10.1677/jme.1.01755.
4. Bustin S. A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2005; 109 (4): 365–379. DOI: 10.1042/CS20050086.
5. Bustin S. A., Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 2004; 15 (3): 155–166. PMID: 15331581.
6. Damond F., Benard A., Ruelle J., Alabi A., Kupfer B., Gomes P., et al. Quality control assessment of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) viral load quantification assays: results from an international collaboration on HIV-2 infection in 2006. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46 (6): 2088–2091. DOI: 10.1128/JCM.00126-08.
7. Bustin S. A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 192–223. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.002.
8. Ferns R. B., Garson J. A. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for quantification of cell-free human immunodeficiency virus type 2 using a Brome Mosaic Virus internal control. *J. Virol. Methods.* 2006; 135 (1): 102–108. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.02.005.
9. Garson J. A., Grant P. R., Ayliffe U., Ferns R. B., Tedder R. S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J. Virol. Methods.* 2005; 126 (1–2): 207–213. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.03.001.
10. Garson J. A., Huggett J. F., Bustin S. A., Pfaffl M. W., Benes V., Vandesompele J., Shipley G. L. Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-W (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2009; 25 (3): 377–378. DOI: 10.1089/aid.2008.0270.
11. Huang T., Li L. T., Bernstam E. V., Jiang X. Confidence-based laboratory test reduction recommendation algorithm. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 2023; 23 (1):93. DOI: 10.1186/s12911-023-02187-3.
12. Shaw A., Reid S. M., Ebert K., Hutchings G., Ferris N., King D. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods.* 2007; 143 (1): 81–85. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.
13. Schmidt M. W., Houseman A., Ivanov A. R., Wolf D. A. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Syst. Biol.* 2007; 3:79. DOI: 10.1038/msb4100117.
14. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques.* 1997; 22 (1): 130–138. DOI: 10.2144/97221bi01.
15. Wittwer C. T., Kusakawa N. Real-time PCR. In: *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Ed. by D. H. Persing, F. C. Tenover, J. Versalovic, J. W. Tang, E. R. Unger, D. A. Relman, T. J. White. Washington: ASM Press; 2004; 71–84.
16. Bjornsson H. T., Albert T. J., Ladd-Acosta C. M., Green R. D., Rongione M. A., Middle C. M., et al. SNP-specific array-based allele-specific expression analysis. *Genome Res.* 2008; 18 (5): 771–779. DOI: 10.1101/gr.073254.107.
17. Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., et al. Minimum information about a microarray experiment

- (MIAME) – toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 2001; 29 (4): 365–371. DOI: 10.1038/ng1201-365.
18. Burns M., Valdivia H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 226: 1513–1524. DOI: 10.1007/s00217-007-0683-z.
19. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000; 25 (2): 169–193. DOI: 10.1677/jme.0.0250169.
20. Doma M. K., Parker R. RNA quality control in eukaryotes. *Cell.* 2007; 131 (4): 660–668. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.041.
21. Fleige S., Pfaffl M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 126–139. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
22. Burns M. J., Nixon G. J., Foy C. A., Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 2005; 5:31. DOI: 10.1186/1472-6750-5-31.
23. Bustin S. A. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005; 5 (4): 493–498. DOI: 10.1586/14737159.5.4.493.
24. Gingeras T. R. RNA reference materials for gene expression studies. Difficult first steps. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1289–1290. DOI: 10.1373/clinchem.2003.030072.
25. Hellems J., Mortier G., De Paepe A., Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007; 8 (2):R19. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
26. Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C., Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8:131. DOI: 10.1186/1471-2105-8-131.
27. Lefever S., Hellems J., Pattyn F., Przybylski D. R., Taylor C., Geurts R., et al. RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (7): 2065–2069. DOI: 10.1093/nar/gkp056.
28. Ellison S. L., English C. A., Burns M. J., Keer J. T. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:33. DOI: 10.1186/1472-6750-6-33.
29. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005; 6 (4): 279–284. DOI: 10.1038/sj.gene.6364190.
30. Micke P., Ohshima M., Tahmasebpoor S., Ren Z. P., Ostman A., Pontén F., Botling J. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab. Invest.* 2006; 86 (2): 202–211. DOI: 10.1038/labinvest.3700372.
31. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 2006; 27 (2–3): 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
32. Böhlenius H., Eriksson S., Parcy F., Nilsson O. Retraction. *Science.* 2007; 316:367. DOI: 10.1126/science.316.5823.367b.
33. Echeverri C. J., Beachy P. A., Baum B., Boutros M., Buchholz F., Chanda S. K., et al. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods.* 2006; 3 (10): 777–779. DOI: 10.1038/nmeth1006-777.
34. Landi D., Gemignani F., Naccarati A., Pardini B., Vodicka P., Vodickova L., et al. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2008; 29 (3): 579–584. DOI: 10.1093/carcin/bgm304.
35. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30 (6): 1292–1305. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292.
36. Mackay I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190–212. DOI: 10.1111/j.1198-743x.2004.00722.x.
37. Morrogh M., Olvera N., Bogomolnii F., Borgen P. I., King T. A. Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. *BioTechniques.* 2007; 43 (1): 41–42, 44, 46. DOI: 10.2144/000112497.
38. Nolan T., Hands R. E., Ogunkolade W., Bustin S. A. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal. Biochem.* 2006; 351 (2): 308–310. DOI: 10.1016/j.ab.2006.01.051.
39. Taylor C. F., Field D., Sansone S. A., Aerts J., Apweiler R., Ashburner M., et al. Promoting coherent minimum reporting guidelines for biological and biomedical investigations: the MIBBI project. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26 (8): 889–896. DOI: 10.1038/nbt.1411.
40. Joseph L. J. RNA reference materials for gene expression studies. RNA metrology: forecast calls for partial clearing. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1290–1292. DOI: 10.1373/clinchem.2004.032441.
41. Cronin M., Ghosh K., Sistare F., Quackenbush J., Vilker V., O'Connell C. Universal RNA reference materials for gene expression. *Clin. Chem.* 2004; 50 (8): 1464–1471. DOI: 10.1373/clinchem.2004.035675.
42. MSI Board Members; Sansone S. A., Fan T., Goodacre R., Griffin J. L., Hardy N. W., et al. The metabolomics standards initiative. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (8): 846–848. DOI: 10.1038/nbt0807-846b.
43. Gygi S. P., Rochon Y., Franza B. R., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19 (3): 1720–1730. DOI: 10.1128/MCB.19.3.1720.
44. Reiter M., Pfaffl M. W. Effects of plate position, plate type and sealing systems on real-time PCR results. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2008; 22 (3): 824–828. DOI: 10.1080/13102818.2008.10817561.
45. Ben-Dov C., Hartmann B., Lundgren J., Valcárcel J. Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* 2008; 283 (3): 1229–1233. DOI: 10.1074/jbc.R700033200.
46. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* 1992; 10 (4): 413–417. DOI: 10.1038/nbt0492-413.
47. Huggett J. F., Novak T., Garson J. A., Green C., Morris-Jones S. D., Miller R. F., Zumla A. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res. Notes.* 2008; 1:70. DOI: 10.1186/1756-0500-1-70.
48. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 2008; 3 (6): 1101–1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
49. Ståhlberg A., Håkansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin. Chem.* 2004; 50 (3): 509–515. DOI: 10.1373/clinchem.2003.026161.
50. Taylor C. F., Paton N. W., Lilley K. S., Binz P. A., Julian R. K. Jr., Jones A. R., et al. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat. Biotechnol.* 2007; 25 (8): 887–893. DOI: 10.1038/nbt1329.
51. Vogelstein B., Kinzler K. W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96 (16): 9236–9241. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9236.
52. Dube S., Qin J., Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One.* 2008; 3 (8):e2876. DOI: 10.1371/journal.pone.0002876.
53. Field D., Garrity G., Gray T., Morrison N., Selengut J., Sterk P., et al. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nat. Biotechnol.* 2008; 26 (5): 541–547. DOI: 10.1038/nbt1360.
54. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnol.* 1993; 11 (9): 1026–1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
55. Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (3): 1559–1582. DOI: 10.1038/nprot.2006.236.
56. Pattyn F., Speleman F., De Paepe A., Vandesompele J. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (1): 122–123. DOI: 10.1093/nar/gkg011.
57. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
58. Ramsden S. C., Daly S., Geilenkeuser W. J., Duncan G., Hermitte F., Marubini E., et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin. Chem.* 2006; 52 (8): 1584–1591. DOI: 10.1373/clinchem.2005.066019.
59. Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83 (11): 3746–3750. DOI: 10.1073/pnas.83.11.3746.
60. Sugimoto N., Nakano S., Katoh M., Matsumura A., Nakamura H., Ohmichi T., et al. Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry.* 1995; 34 (35): 11211–11216. DOI: 10.1021/bi00035a029.
61. Xia T., SantaLucia J. Jr., Burkard M. E., Kierzek R., Schroeder S. J., Jiao X., et al. Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry.* 1998; 37 (42): 14719–14735. DOI: 10.1021/bi9809425.
62. Elnifro E. M., Ashshi A. M., Cooper R. J., Klapper P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (4): 559–570. DOI: 10.1128/CMR.13.4.559.
63. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Gundry C. N., Elenitoba-Johnson K. S. Real-time multiplex PCR assays. *Methods.* 2001; 25 (4): 430–442. DOI: 10.1006/meth.2001.1265.
64. Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. 12-е изд. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008. 696 с.
Russia State Pharmacopoeia. Part 1. 12th ed. Moscow: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; 2008. 696 p. (in Russ.)
65. Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа; 1990. 351 с.
Lakin G. F. Biometrics. 4th ed., revised and supplemented. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. 351 p. (in Russ.)
66. Носырев П., Носырева М., Рассказова Т., Корнеева Н. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть I). *Ремедиум.* 2003; 10: 69–71. EDN: PLLZDJ.

Nosyrev P., Nosyрева M., Rasskazova T., Korneeva N. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika (chast' I) = Validation of analytical methods: theory and practice (Part I). *Remedium*. 2003; 10: 69–71. EDN: PLLZDJ. (in Russ.)

67. Swango K. L., Hudlow W. R., Timken M. D., Buoncristiani M. R. Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci. Int.* 2007; 170 (1): 35–45. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.09.002.

68. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris; 2018; Chapter 1.1.6. Режим доступа: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf (дата обращения: 20.01.2013).

69. OIE. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. Paris; 2008. 70 p.

70. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200029975>.

GOST R ISO 5725-1-2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1–6. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200029975>. (in Russ.)

71. Haney S. A. Increasing the robustness and validity of RNAi screens. *Pharmacogenomics*. 2007; 8 (8): 1037–1049. DOI: 10.2217/14622416.8.8.1037.

72. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paep A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3 (7): research0034.1–0034.11. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

73. Andersen C. L., Jensen J. L., Ørntoft T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64 (15): 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

Поступила в редакцию / Received 15.03.2023

Поступила после рецензирования / Revised 06.04.2023

Принята к публикации / Accepted 22.05.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, доктор биологических наук, заведующий сектором лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Михалишин Дмитрий Валерьевич, доктор ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Спрыгин Александр Владимирович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.

Мазлум Али, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Жбанова Татьяна Валентиновна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела образования и научной информации, ученый секретарь диссертационного совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9857-5915>, e-mail: zhananova@arriah.ru.

Груздев Константин Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

Чернышова Елена Владимировна, кандидат ветеринарных наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, e-mail: chernishova@arriah.ru.

Maksim I. Doronin, Doctor of Science (Biology), Head of Sector, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-4682-6559>, e-mail: doronin@arriah.ru.

Dmitry V. Mikhailishin, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-1718-1955>, e-mail: mihalishindv@arriah.ru.

Alexander V. Sprygin, Doctor of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru.

Ali Mazloun, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for African Swine Fever, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>, e-mail: mazlum@arriah.ru.

Tatyana V. Zhananova, Candidate of Science (Biology), Junior Researcher, Education and Scientific Support Department, Academic Secretary of Thesis Council, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9857-5915>, e-mail: zhananova@arriah.ru.

Konstantin N. Gruzdev, Doctor of Science (Biology), Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>, e-mail: gruzdev@arriah.ru.

Elena V. Chernyshova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, e-mail: chernishova@arriah.ru.