

© ХЬЮГЕТ ДЖ., ВЕЙЛ А., 2014

УДК 616-074/-078:577.27

Хьюгет Дж.*, Вейл А.

ЦИФРОВАЯ ПЦР КАК НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ И ЕЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВКЛАД В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ДИАГНОСТИКУ

Molecular and Cell Biology, LGC Ltd., Teddington, UK [Clinical Chemistry. 2013; 59(12): 1691-3]

Новейшее использование ПЦР – цифровая ПЦР [dPCR, цПЦР] – на протяжении двух десятилетий участвует в развитии химии ферментов и разработке тестов, придавая им замечательную прецизионность и правильность. ПЦР достигается путем выполнения предельного разведения ДНК в последовательность индивидуальных реакций ПЦР [или их фракций]. Предельное разведение, предшествующее разделению в реакциях нанопотоочной и эмульсионной химии, основывается на случайном распределении структур ДНК и том факте, что статистика Пуассона может быть использована для измерения количеств ДНК, присутствующих в данной пропорции в положительных подразделах. И более того, этот метод работает: результаты, полученные с помощью этой технологии, имеют линейный характер и метод способен обнаруживать и количественно оценивать мельчайшие количества структур ДНК [1, 2].

Все эти результаты достижимы без калибровочной кривой, необходимой почти во всех других молекулярных методах точного измерения ДНК. По сравнению с количественной ПЦР в реальном времени [qPCR, кПЦР], цПЦР характеризуется как более прецизионная [3], лучше обнаруживающая редкие генетические варианты [4] и менее чувствительная к влиянию ингибиторов [5, 6]. Признание этих преимуществ естественно ведет к предположениям о потенциале цПЦР для молекулярной диагностики.

В журнале *Clinical Chemistry* представлены сообщения о двух исследованиях, которые демонстрируют уникальное клиническое применение цПЦР для измерения циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот. V. Taly и соавт. [7] провели исследование применения цПЦР для изучения обнаружения в плазме крови больных раком редких мутаций внеклеточных ДНК, сочетающихся с опухолями. J. Beck и соавт. [8] сообщили, что во внеклеточных ДНК больных после трансплантации содержатся поддающиеся обнаружению количества ДНК из пересаженных органов и что мониторингирование таких ДНК может служить суррогатным маркером повреждения и отторжения трансплантата. Эти статьи демонстрируют 2 аспекта клинического применения цПЦР, а именно обнаружения редких мутаций и подсчета нуклеиновых кислот.

Обнаружение редких мутаций, при которых полиморфизм одиночных нуклеотидов присутствует среди преобладающего содержания последовательностей дикого типа, было предметом публикации, которая ввела термин “цифровая ПЦР” [9]. Ограничение цПЦР для измерения полиморфизмов одиночных нуклеотидов

состоит в том, что праймеры/пробы обычно также обнаруживают последовательности дикого типа [которые обычно не представляют интереса], хотя и со значительно меньшей эффективностью. Ограничение может вести к проблеме со специфичностью в случае преобладания последовательностей дикого типа, тем самым ограничивая и чувствительность метода. B. Volgelstein и K. Kinzler [9] продемонстрировали, что процесс ограничения разведения облегчает уменьшение отношения последовательностей дикого типа к мутантным последовательностям в каждой ПЦР, что приводит к улучшению чувствительности метода. V. Taly и соавт. [7] оценивали, действительно ли цПЦР может измерять ключевые мутации, присутствующие в солидных опухолях, исследуя внеклеточные ДНК, происходящие из опухоли. Мутации в таких генах, как KRAS [гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстена], способны предсказывать реакцию на лечение, тогда как обычные методы генотипирования требуют инвазивной биопсии опухоли. Следовательно, способность провести такое исследование в крови весьма желательна. V. Taly и соавт. [7] разработали метод для измерения семи мутаций в двух реакциях, в которых применена уникальная способность некоторых инструментов цПЦР к мультиплексному исследованию с использованием различных концентраций одного и того же флюорофора. Применение этого подхода мультиплексирования, который был предварительно иллюстрирован с экстрагируемой ДНК [10], к обычным клиническим образцам открывает возможность скрининга многих мест в простом формате.

По сравнению с одиночными реакциями мультиплексирование не только увеличивает число мишеней, измеряемых в одиночных реакциях [тем самым улучшая время исследования, стоимость и т.д.], но также уменьшает количество клинического материала, требуемого для проведения исследования множества однонуклеотидных полиморфизмов, путем измерения более одной мишени в одной реакции. Это свойство особенно важно при исследовании в плазме внеклеточных ДНК, когда при всех различиях присутствуют примерно 1000 геномных эквивалентов на 1 мл крови [11], и это позволяет в достаточной мере разводить пробу для анализа ДНК. J. Beck и соавт. [8] использовали альтернативный подход для подсчета внеклеточных ДНК в плазме при малом насыщении ими путем предварительной амплификации до применения цПЦР. Как и в исследовании V. Taly и соавт., J. Beck и соавт. также усилили способность цПЦР измерять микронные мутанты, и они использовали такие возможности цПЦР для измерения внеклеточных ДНК, происходящих

* Адрес для связи: LGC Limited, Queens Rd, Teddington

TW11 0LY, UK. Fax _44-020-89432767; e-mail: jim.huggett@lgc.co.uk.

Перевод статьи печатается в соответствии с договором между редакциями журналов “Clinical Chemistry” и “Клиническая лабораторная диагностика”.

из пересаженного органа, циркулирующих в кровотоке пациентов после трансплантации. Использование внеклеточных ДНК при исследовании подобных редких вариантов предполагает и другие возможности, включая неинвазивное пренатальное генотипирование [12, 13].

Как V. Taly и соавт., так и J. Weck и соавт. осуществляли количественное определение вариантов, которые они измеряли. J. Weck и соавт. показали, что повышенное содержание ДНК трансплантата сочетается с острым отторжением. V. Taly и соавт. полагают, что количественное определение внеклеточной ДНК, происходящей из опухоли, с помощью цПЦР может представлять механизм мониторинга эффективности лечения. Применение количественных молекулярных измерений для содействия ведению больных после трансплантации или лечению солидных опухолей подобно современному мониторингу вирусной нагрузки, способно революционизировать лечение больных.

Новые применения цПЦР способствуют более чем чувствительному обнаружению минорных мутаций. Способность цПЦР к количественной оценке уже применяется для мониторинга вирусной нагрузки [14] и измерения вариаций числа копий в статусе гена *HER2* [*ERBB2*, *v-erb-b2 avian* гомологе 2 вирусного онкогена эритробластной лейкемии] у больных раком молочной железы [15]. Превосходная точность, проявляемая цПЦР, позволяет использовать ее как более совершенный и дешевый метод для измерения анеуплоидии плода в крови матери [16] при синдроме Дауна. Из предшествующего опыта применения цПЦР вытекает, что она обладает большим потенциалом для очень чувствительных и прецизионных измерений, которые могут облегчить различные виды клинических анализов.

цПЦР также пригодна для абсолютного измерения ДНК. Не только в таких уникальных характеристиках среди молекулярных методов, она также значительно улучшает сравнимость экспериментальных данных. Эти свойства могут также способствовать применению этих подходов в сфере лечения больных, но при этом необходима осторожность. Диагностический потенциал этой технологии начинает проверяться, и для максимального внедрения цПЦР необходимы дополнительные, хорошо продуманные и прозрачные исследования, такие как проведенные V. Taly и соавт. и J. Weck и соавт.

Это стремление было поддержано публикацией руководства “Минимальная информация по проведению экспериментов с количественной цифровой ПЦР”. В этом руководстве изложены некоторые соображения относительно выполнения цПЦР и приведена некоторая ключевая информация, которая должна содержаться в таких публикациях [17].

Основная цель публикации этого руководства состояла в содействии улучшению воспроизводимости цПЦР, ключевого требования для применения в клинике любой технологии. Это очевидное патентное требование продиктовано реальностью, поскольку обычные молекулярные методы, применяемые на практике, страдают недостаточной сопоставимостью результатов. Популярность коммерческих наборов реагентов с присущими им компонентами означает, что исследователи часто не озабочены всеми деталями применяемых ими методов. Для методов кПЦР это обстоятельство обусловлено природой метрики продукта, циклом количественного определения [“Cq”, называемый также “Ct” и “Cp”]. Хотя это очень прецизионное и действенное количественное определение с широкими пределами динамики, трудности с калировкой цикла количественного определения

создают возможность смещения измерения. цПЦР не имеет таких проблем с калировкой, как кПЦР. Однако было бы неправильно утверждать, что цПЦР не нуждается в калировке. Рутинное клиническое количественное определение редких генетических вариантов является хорошим примером того, что калировочные контроли в подходящем формате весьма способствуют таким измерениям, тем самым облегчая межлабораторные сличения и соблюдение клинических руководств.

Хотя применение цПЦР в наибольшей мере способствует выполнению уникальных клинических исследований, эта новейшая технология может иметь более широкое применение в молекулярной диагностике, чем заполнение указанных выше ниш. Более простое средство достижения воспроизводимости может иметь важное значение в таких областях, как мониторинг вирусной нагрузки и сочетающиеся с опухолью транскрипты, например BCR-ABL. Будет ли цПЦР применена для приписывания лабораторных калибраторов с последующим использованием в кПЦР-анализе или начнет замещать саму кПЦР – станет видно в дальнейшем. Однако необходима разработка инструментов, которые облегчали бы анализ в отношении стоимости и продолжительности исследования, чтобы они были сопоставимы с этими показателями у кПЦР.

Расширение применения цПЦР происходит со временем, по мере того как рынок молекулярной диагностики продвигается вперед с чрезвычайной скоростью. С разработкой следующего поколения секвенирования, производимого конкурентно с развитием цПЦР, существует потенциал взаимного дополнения этих двух технологий. Возможно, справедливо утверждать, что передовые подходы к секвенированию в конечном счете заменят ПЦР, однако произойдет ли это в ближайший 5 лет или за 50 лет – трудно предсказать. Определенно известно, что цПЦР представляет собой метод, о котором многое известно и который может развиваться. Помимо того, что были представлены острые результаты V. Taly и соавт. и J. Weck и соавт. демонстрируют, что время побуждает раздвинуть пределы молекулярной диагностики и цПЦР может предложить гораздо большее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanders R., Huggett J.F., Bushell C.A., Cowen S., Scott D.J., Foy C.A. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *An. Chem.* 2011; 83: 6474-84.
2. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PLoS One* 2013;8: e75296.
3. Whale A.S., Huggett J.F., Cowen S., Speirs V., Shaw J., Ellison S. et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic. Acids. Res.* 2012; 40: e82.
4. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J. et al. High-throughput droplet *digital PCR* system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 2011; 83: 8604-10.
5. Hoshino T., Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 2012; 35: 390-5.
6. Dingle T., Sadlak R.H., Cook L., Jerome K.R. *Comparison of the tolerance of real-time quantitative PCR versus droplet digital PCR to inhibitors. Proceedings of the 29th Clinical Virology Symposium; 2013 Apr 26–May 1; Daytona Beach, FL.* http://pascv.ivdnews.net/public/show_abstract/1464 [Accessed October 2013].
7. Taly V., Pekin D., Benhaim L., Kotsopoulos S.K., Le Corre D., Li X. et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin. Chem.* 59: 1722-31.

8. Beck J., Bierau S., Balzer S., Andag R., Kanzow P., Schmitz J. et al. Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin. Chem.* 59: 1732-41.
9. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 9236-41.
10. Zhong Q., Bhattacharya S., Kotsopoulos S., Olson J., Taly V., Griffiths A.D. et al. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab. Chip.* 2011; 11: 2167-74.
11. Chiu R.W., Poon L.L., Lau T.K., Leung T.N., Wong E.M., Lo Y.M. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2001; 47: 1607-13.
12. Lun F.M., Tsui N.B., Chan K.C., Leung T.Y., Lau T.K., Charoenkwan P. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 19920-5.
13. Barrett A.N., McDonnell T.C., Chan K.C., Chitty L.S. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin. Chem.* 2012; 58: 1026-32.
14. Hayden R.T., Gu Z., Ingersoll J., Abdul-Ali D., Shi L., Pounds S., Caliendo A.M. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51: 540-6.
15. Gevensleben H., Garcia-Murillas I., Graeser M.K., Schiavon G., Osin P., Parton M. et al. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19: 3276-84.
16. Evans M.I., Wright D.A., Pergament E., Cuckle H.S., Nicolaides K.H. Digital PCR for noninvasive detection of aneuploidy: power analysis equations for feasibility. *Fetal. Diagn. Ther.* 2012; 31: 244-7.
17. Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K., Garson J.A., Haynes R. et al. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin. Chem.* 2013; 59: 892-902.

Поступила 16.01.14
Received 16.01.14

© ПАТЕЛЬ Р., 2014

УДК 616-074:543.42.062:616-078

Патель Р.

MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ: ТРАНСФОРМАТИВНАЯ ПРОТЕОМИКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN; Patel Robin. MALDI-TOF-mass-spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem.* 2013; 59:2: 340-2.

Клинические микробиологические лаборатории в настоящее время действуют, используя смесь высоко- и низко-технологичных методик. Несмотря на огромные шаги вперед методов диагностики, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, клинические микробиологические лаборатории в значительной мере полагаются на культивирование бактерий и грибов для целей диагностики из-за обилия и разнообразия потенциально изолируемых организмов. Для выделения чистой культуры используют плотные (например, кровяной агар) или жидкие (например, бульон) питательные среды. Обнаружив рост (колонию), приступают к ее идентификации. Исторически идентификация рассматривалась как комплексная задача, ей посвящены многочисленные руководства. Традиционная (фенотипическая) идентификация бактерий и грибов включает морфологию, окраску и биохимические тесты (ручные или автоматизированные панели). Ручные биохимические тесты выполняются быстро, но они идентифицируют лишь ограниченное число типов организмов. Автоматизированные системы (VITEK®, bioMérieux; BD Phen ix™ Automated Microbiology System; MicroScan® Siemens Healthcare Diagnostics) идентифицируют более широкий круг организмов, однако требуют более длительного времени и дорогих расходных материалов. Пользователь часто должен а priori знать тип микроорганизма,

который исследуется (например, грамотрицательные палочки). Внедрение MALDI-TOF-масс-спектрометрии в работу клинических микробиологических лабораторий заметно изменило производственный процесс, позволяя точно, быстро и недорого идентифицировать бактерии и грибы. Применение в клинической микробиологии масс-спектрометрии и информационных технологий вводит новую методологию идентификации бактерий и грибов.

Использование MALDI-TOF-масс-спектрометрии в клинических микробиологических лабораториях можно объяснить этапами производственного процесса. Изолированную колонию, выросшую на плотной питательной среде, отбирают и помещают на определенное место на пластину MALDI-TOF-масс-спектрометра, которая может иметь определенное количество тестовых позиций (например, 24, 48, 96, 384). Микроорганизм, размещенный на пластине, покрывают небольшим количеством матрицы (например, 1-2 мкл α -циано-4-гидроксициннамовой кислоты, разведенной в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоты). Пластина высушивается (обычно в течение 5 мин или меньше). Идентификацию, контроль контаминации реагентами и исследования калибровочных стандартов производят в отдельных позициях пластины. Пластина помещается в камеру MALDI-TOF-масс-спектрометра. Процесс автоматизирован (после

Address correspondence to the author at: Mayo Clinic, 200 First St, SW, Rochester, MN 55905, Fax 507-284-4272, e-mail: patel.robin@mayo.edu

Перевод статьи публикуется в соответствии с соглашением между редколлегией журналов «Clinical Chemistry» и «Клиническая лабораторная диагностика».