

болезнью 34,0% (95%ДИ: 22,2–47,9). У здоровых добровольцев распространенность экзотоксигенных штаммов *S. epidermidis* составила 4,3% (95%ДИ: 0,8–16,0). Таким образом, проведенное выборочное скрининговое исследование показало, что встречаемость экзотоксигенных штаммов среди *S. epidermidis* на коже больных атопическим дерматитом — в 6 раз, а при ожоговой болезни — в 8 раз выше чем, у здоровых добровольцев ($p < 0,05$).

РАЗРАБОТКА ДИЗАЙНА БИОЧИПА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ МРНК РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

**О.В. Уткин, Д.И. Князев, Л.А. Солнцев, Е.Н. Филатова,
Н.А. Сахарнов, В.Д. Старикова, Н.Б. Преснякова,
Е.В. Анисенкова**

*ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора*

Герпесвирусная инфекция (ГВИ) сопровождается изменениями функционального состояния иммунцитов, важными регуляторами которых являются «рецепторы смерти», участвующие в инициации программируемой гибели клетки (ПГК). У человека идентифицировано 6 рецепторов смерти (TNFR1, Fas, DR3–6), характеризующихся высоким полиморфизмом мРНК в результате альтернативного сплайсинга, что имеет функциональные последствия, связанные с модуляцией сигнальных событий ПГК. Герпесвирусы используют ряд способов ухода из-под иммунного контроля, в том числе влияющих на регуляцию альтернативного сплайсинга рецепторов смерти и инициацию ПГК. Таким образом, изучение профиля экспрессии сплайсированных вариантов мРНК рецепторов смерти является значимым в аспекте изучения молекулярных механизмов ПГК, как части иммунного ответа, при разных нозологических формах ГВИ.

Одним из перспективных подходов, позволяющих проводить многопараметрический анализ показателей, является технология биологических микрочипов. Особенностью разрабатываемых биочипов является синхронная дифференциальная полуквантитативная детекция пула мРНК рецепторов смерти. Для конструирования биочипов применялась технология, базирующаяся на фосфорамитидном синтезе дискриминирующих ДНК-зондов с последующей электрохимической детекцией результатов (V3 Synthesizer Custom Array, США).

Дизайн биочипа включал подбор оптимальных последовательностей дискриминирующих зондов для гибридизации мРНК, полученной от здоровых волонтеров и пациентов с ГВИ. Критериями отбора зондов явились длина (от 24 до 30 н.о.), t гибридизации (59–61°C), содержание GC (30–60%), отсутствие гомоповторов протяженностью более 3 н.о., отсутствие шпилек и димеров, а также уникальность участков мРНК для каждого сплайсированного варианта рецепторов смерти. В дальнейшем проводилась детализация локализации зондов и введение зондов внутренних стандартов, комплементарных участкам референтных генов, обладающих стабильной экспрессией вне зависимости от функционального состояния клеток. В итоге разработан дизайн биочипа для полуко-

личественной оценки всех известных в настоящее время сплайсированных вариантов мРНК шести рецепторов смерти человека.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

А.А. Федоров¹, Д.Г. Сочивко², А.Л. Буляница¹

*¹ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

²ЗАО «Синтол», Москва

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) является сегодня основным молекулярно-генетическим методом, используемым для качественного и количественного анализа специфических последовательностей нуклеиновых кислот. Ведущие мировые фирмы-производители оборудования и тест-систем для ПЦР-РВ, а также многие группы исследователей в университетах, занимаются исследованиями различных теоретических аспектов ПЦР, целью которых является совершенствование аналитических характеристик метода, алгоритмов и программных средств приборов ПЦР-РВ анализа. Институт аналитического приборостроения РАН, ведя разработку приборов и оборудования для генетического анализа, в том числе ПЦР-РВ, также участвует в данных исследованиях.

В рамках теории случайных ветвящихся процессов с дискретным временем была разработана имитационная модель ПЦР-РВ. Модель учитывает случайный фактор в процессе отбора пробы из образца и стохастическую природу ключевого процесса — репликации нуклеиновой кислоты. Предложенная модель позволяет анализировать влияние различных параметров реакции на поведение кинетических кривых ПЦР, исследовать статистику результатов на больших выборках и оценивать влияние стохастических эффектов на результаты реакции. Показано, что при наличии в пробе 100 молекул и более вклад случайных составляющих в общую погрешность анализа практически не выявляется даже при очень низкой эффективности реакции, и данные концентрации можно оценивать с приемлемой для практики точностью при однократном измерении.

Проанализирован случай малых количеств нуклеиновых кислот в образцах. С помощью моделирования показано, что стохастическая природа реакции не препятствует точному определению даже единичных молекул в пробах. При этом погрешность анализа единичных молекул определяется не стохастической природой репликации, а случайной вариацией при отборе пробы.

Предложен алгоритм статистической интерпретации результатов количественного ПЦР-РВ анализа образца, на основе исследований серии дублирующих проб данного образца. Исследован случай получения отрицательных результатов анализа в одной либо нескольких пробах серии, имеющий важное значение при анализе особо опасных объектов. Показано, например, что при отборе 50-й части исходного образца и четырехкратном достижении отрицательного результата можно лишь утверждать, что с вероятностью 90% число частиц в исходном объеме не превосходит 28, при этом математическое ожидание числа молекул в образце составляет 12.