



REGIONAL OFFICE FOR

**World Health
Organization**

Europe

Обробка «сирих» даних ПЛР

Лора Чернишова,
Лабораторний офіцер
Бюро ВОЗ в Україні,
chernyshoval@who.int

Серія вебінарів «Обробка даних ПЛР»

01

Вебінар 1 – базові поняття. Масштабування, логарифмування, зведення ПЛР-кривих на єдину базову лінію, побудова порогової лінії.

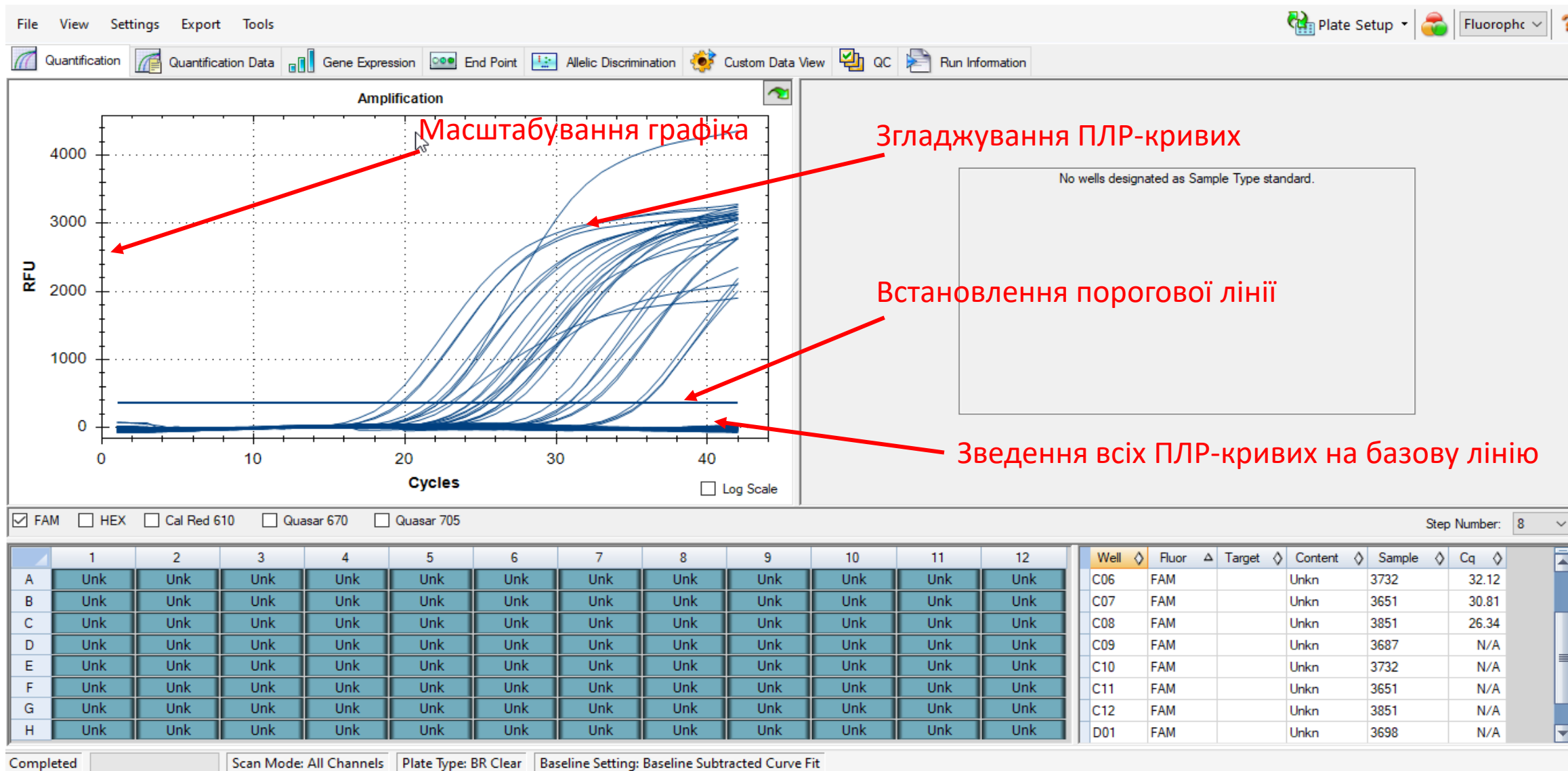
02

Вебінар 2 – лінійна апроксимація, математичні моделі обробки ПЛР-кривих. Буде багато примітивної алгебри і теорії ПЛР.

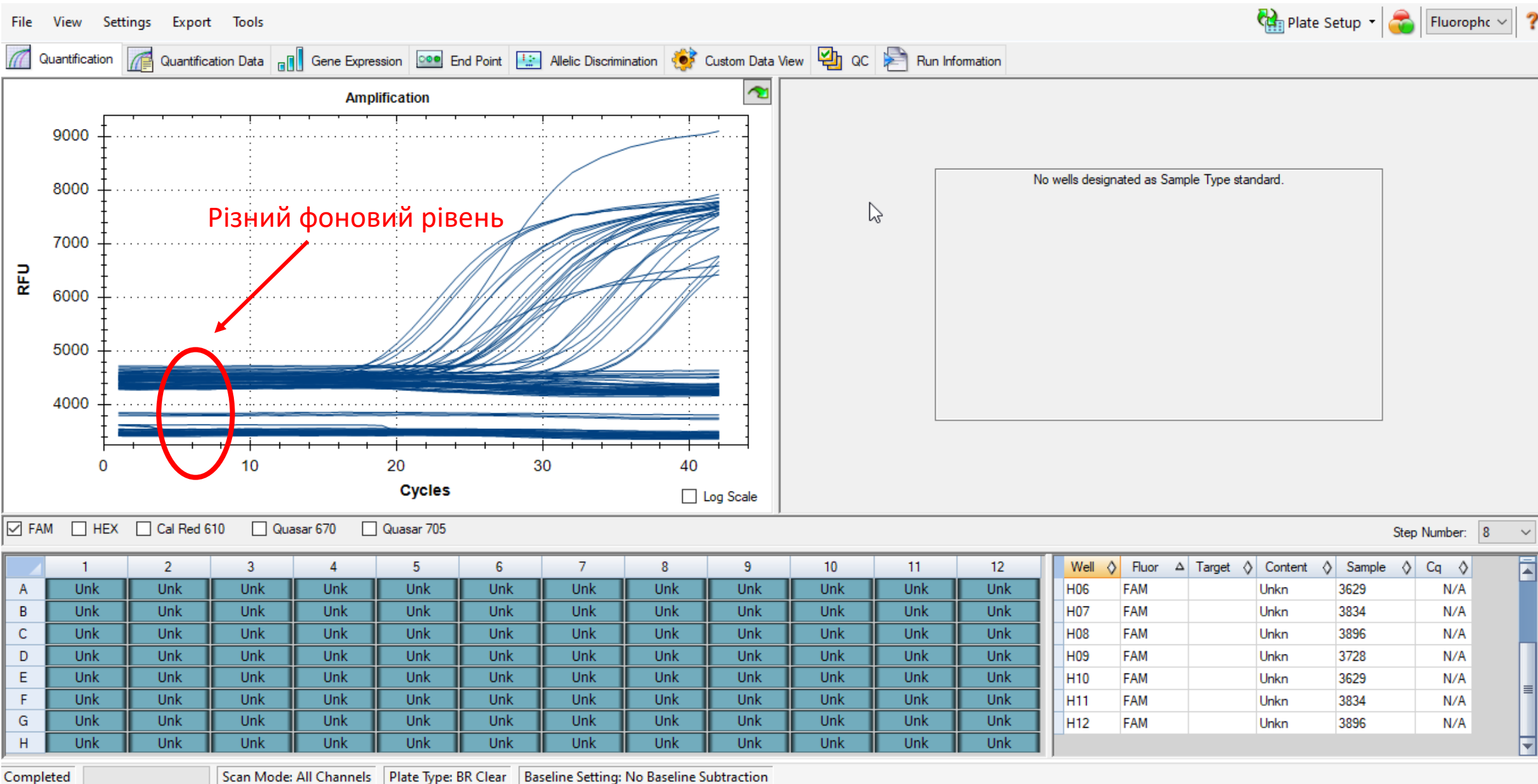
03

Вебінар 3. Помилки програмного забезпечення ампліфікатора при обробці даних. Можливості оператора при роботі з приладами відкритого типу. Суцільна практика

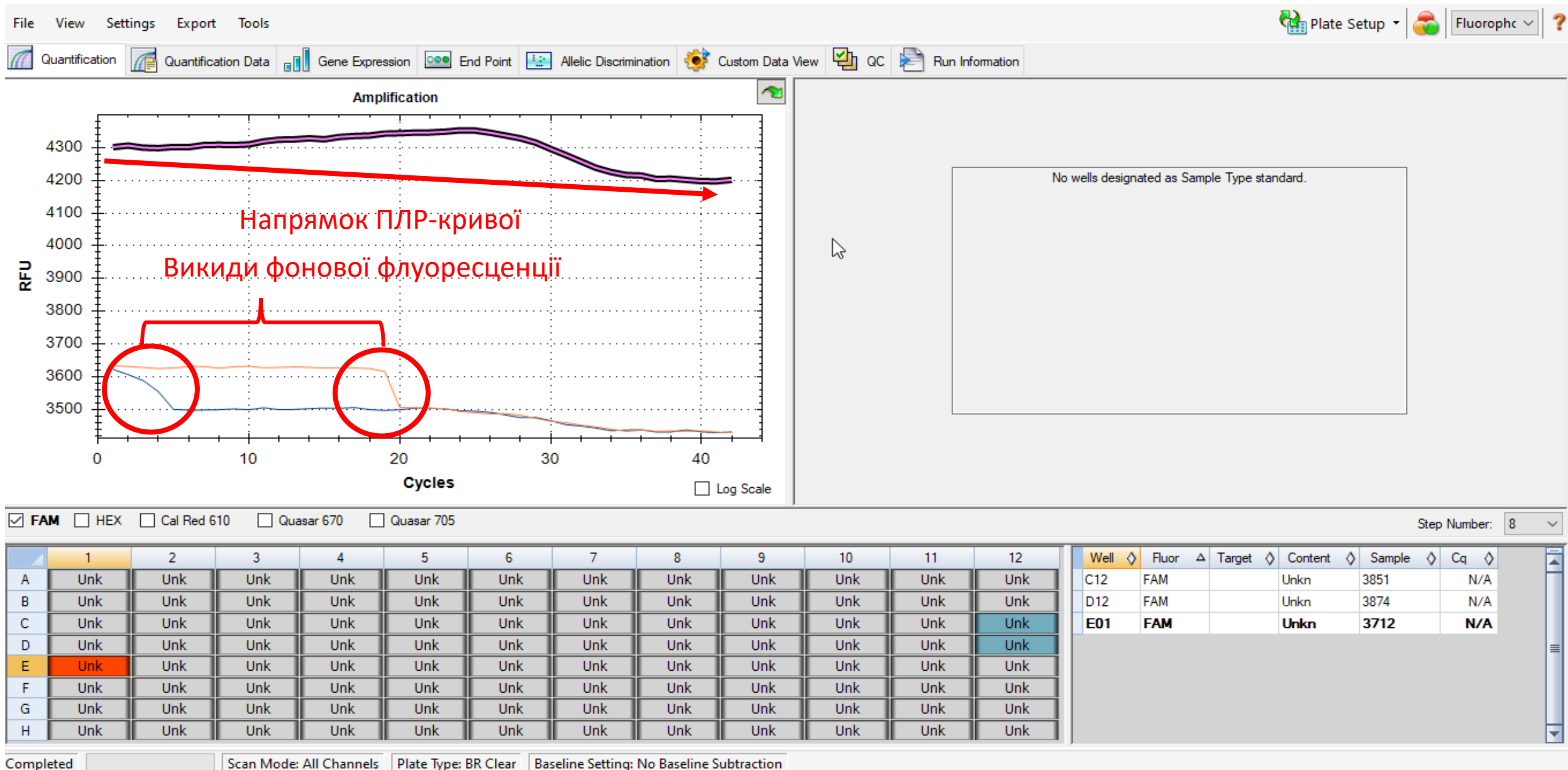
Первинно-оброблені дані



«Сирі» дані ПЛР



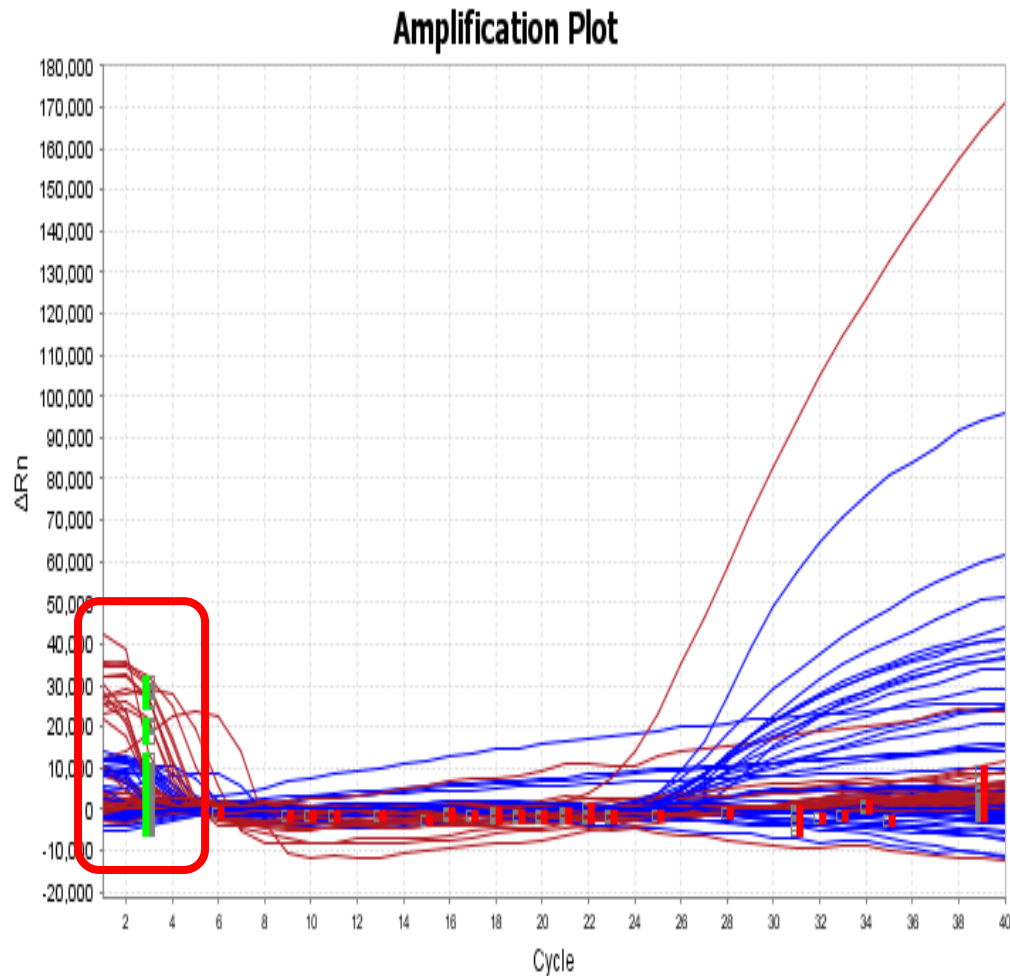
«Сирі» дані ПЛР



«Сирі» ПЛР-дані

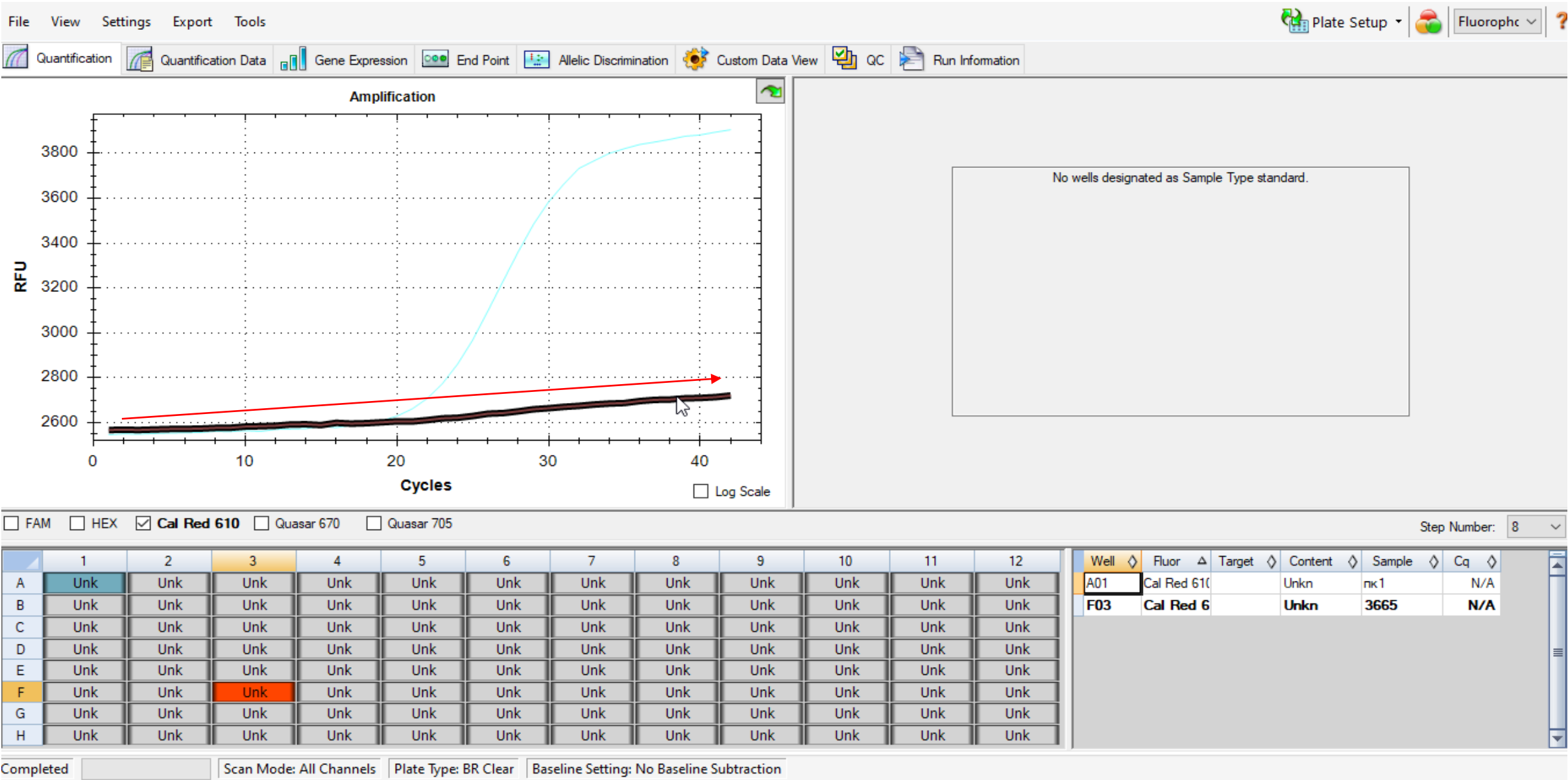
«Хвіст» на початкових циклах ПЛР:

- Є фоновим шумом, що виникає із-зі фонових змін флуорофорів на ранній циклах ампліфікації. Деякі алгоритми обробки кривих згладжують «хвости».
- Пухирці повітря в реакційній суміші.
- Надлишок незадіяних олігонуклеотидів в негативних зразках, утворення праймер-димерів (в ПКЗ зазвичай хвости відсутні)
- Інгібітори в біологічних зразках

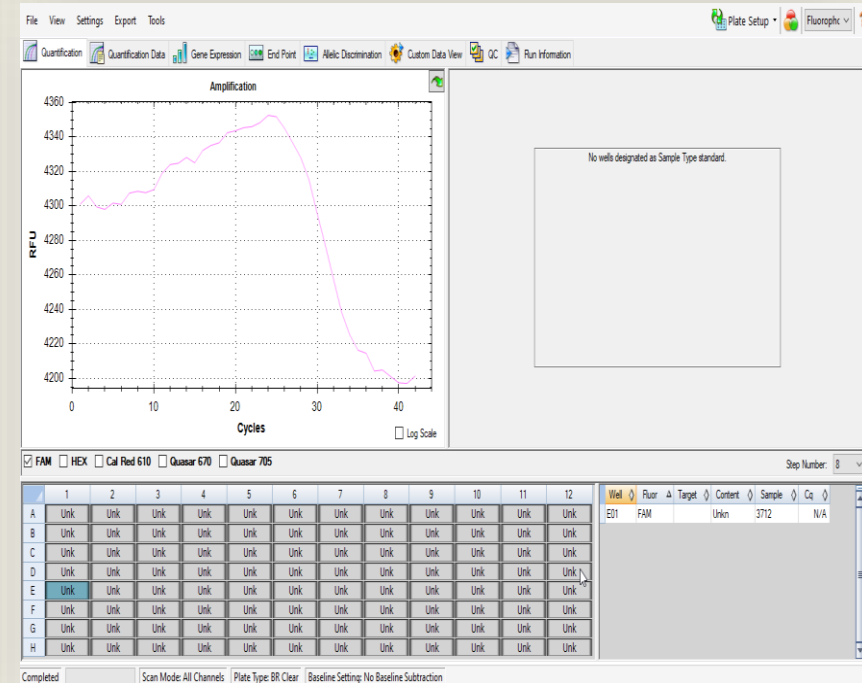
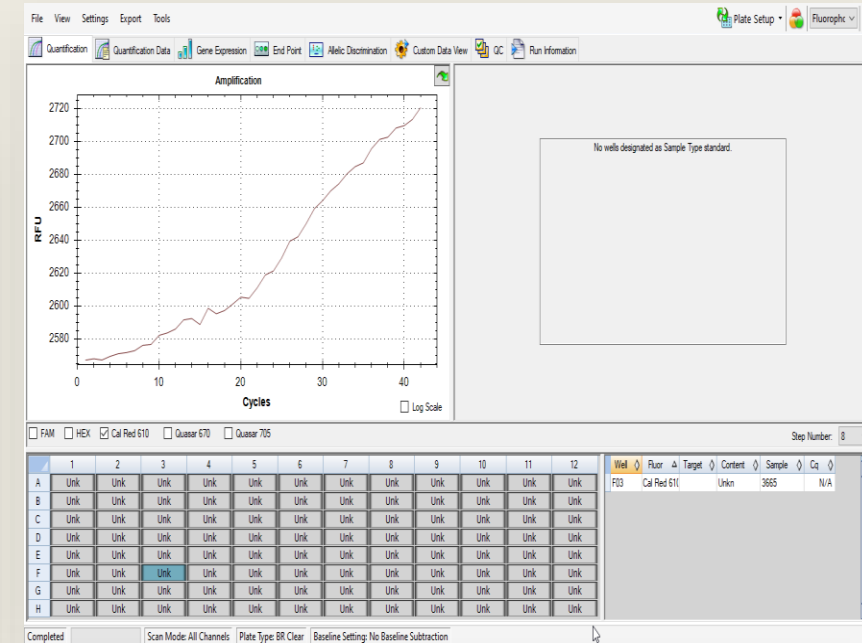
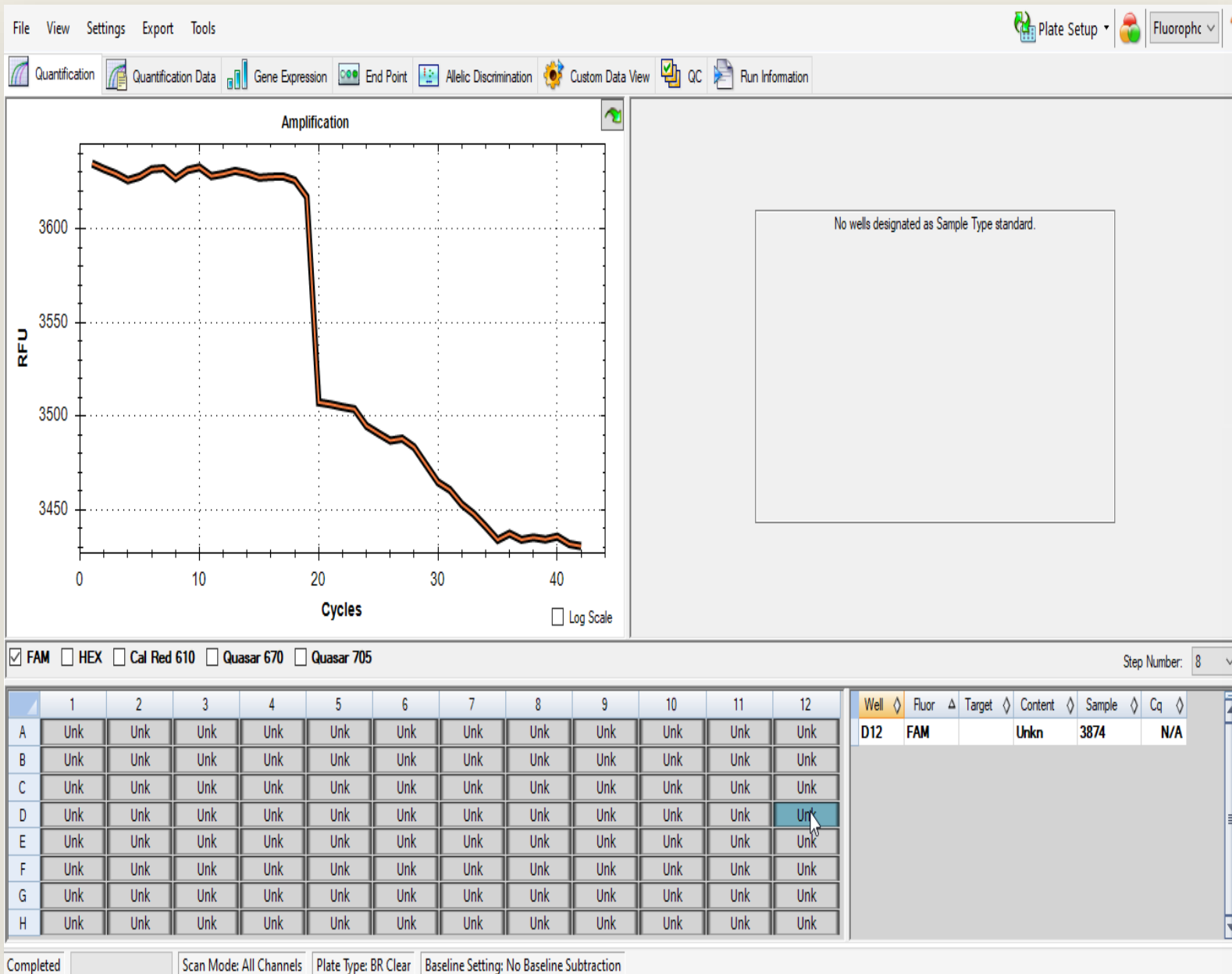


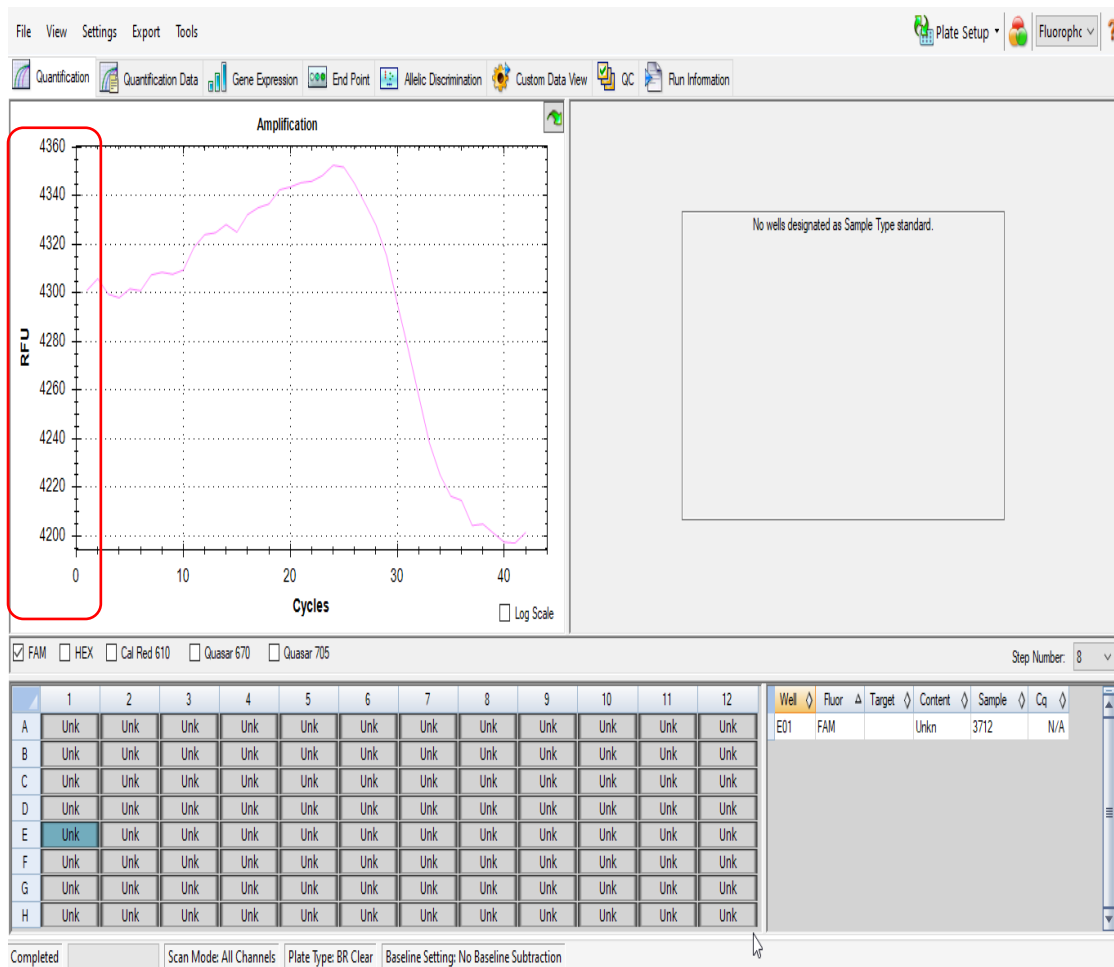
Крок	Температура	Тривалість циклу	Детекція флуоресценції	Кількість циклів
Зворотня транскрипція	50*С	30 хв		1
Інактивація ферментів ЗС, «гарячий старт» (активація полімерази)	95*С	1 хв		1
ПЛР циклювання №1	95*С	15 сек		5
	50*С	45 сек		
	72*С	5 сек		
ПЛР циклювання №2	95*С	15 сек	📷	35
	50*С	45 сек		
	72*С	5 сек		

«Сирі» ПЛР дані

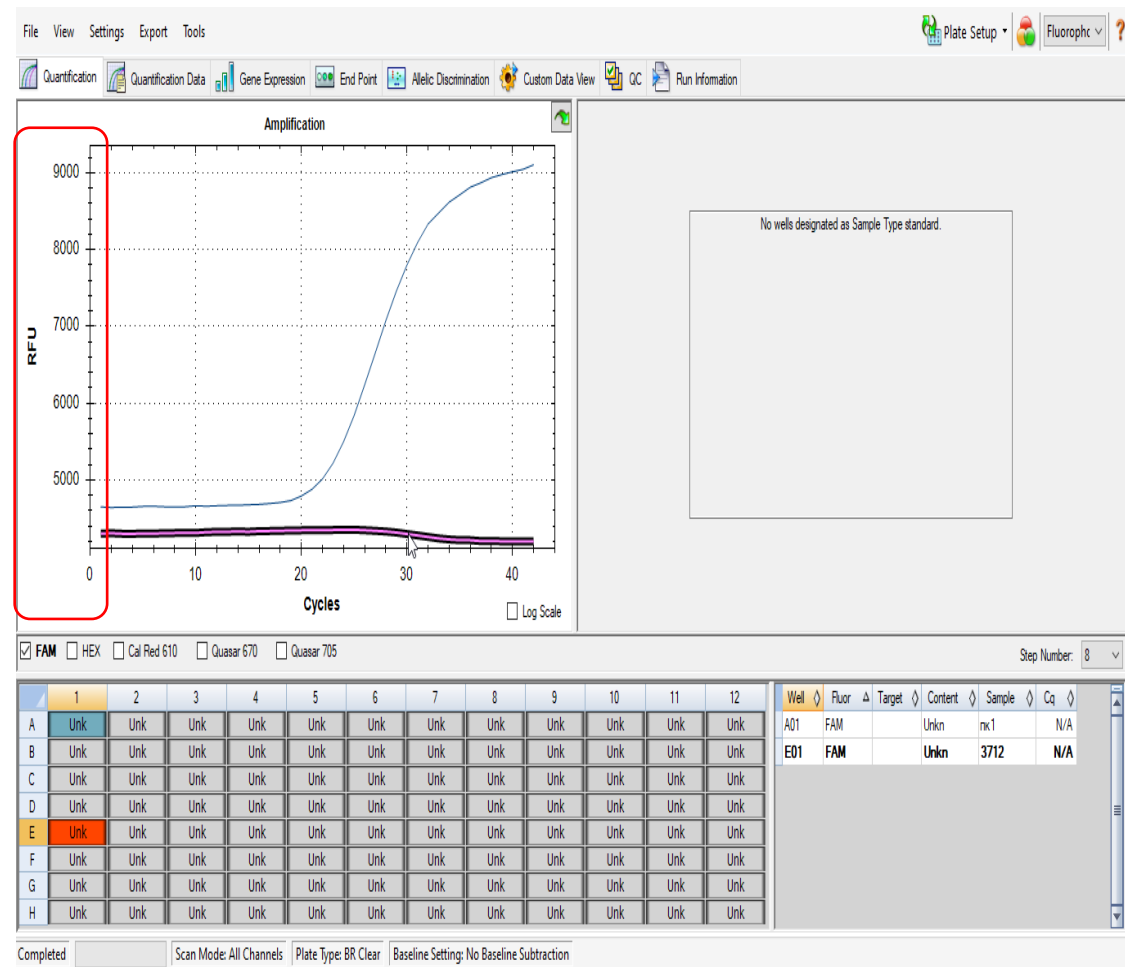


«Сирі» ПЛР-дані



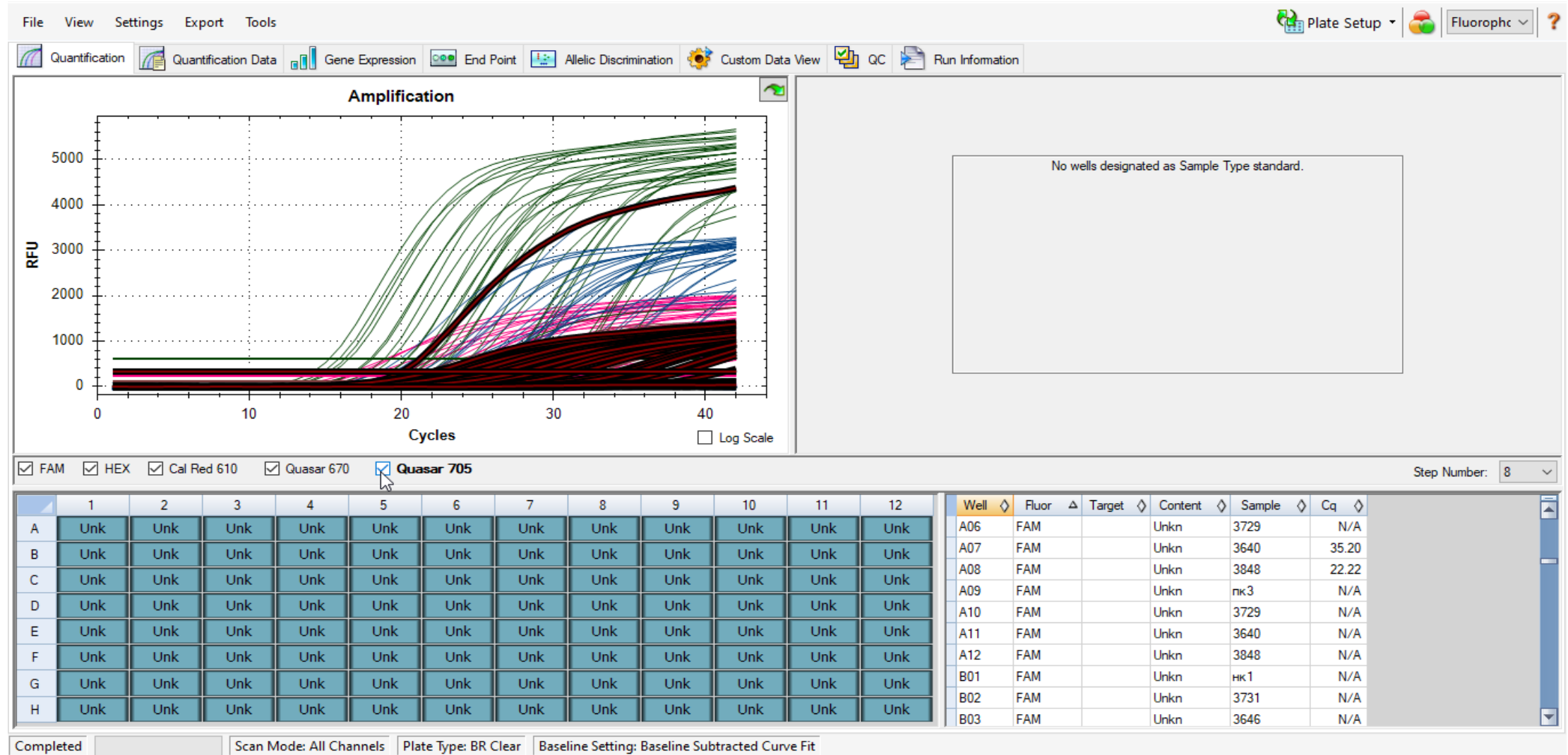


Без масштабування



Масштабування відносно позитивного зразка

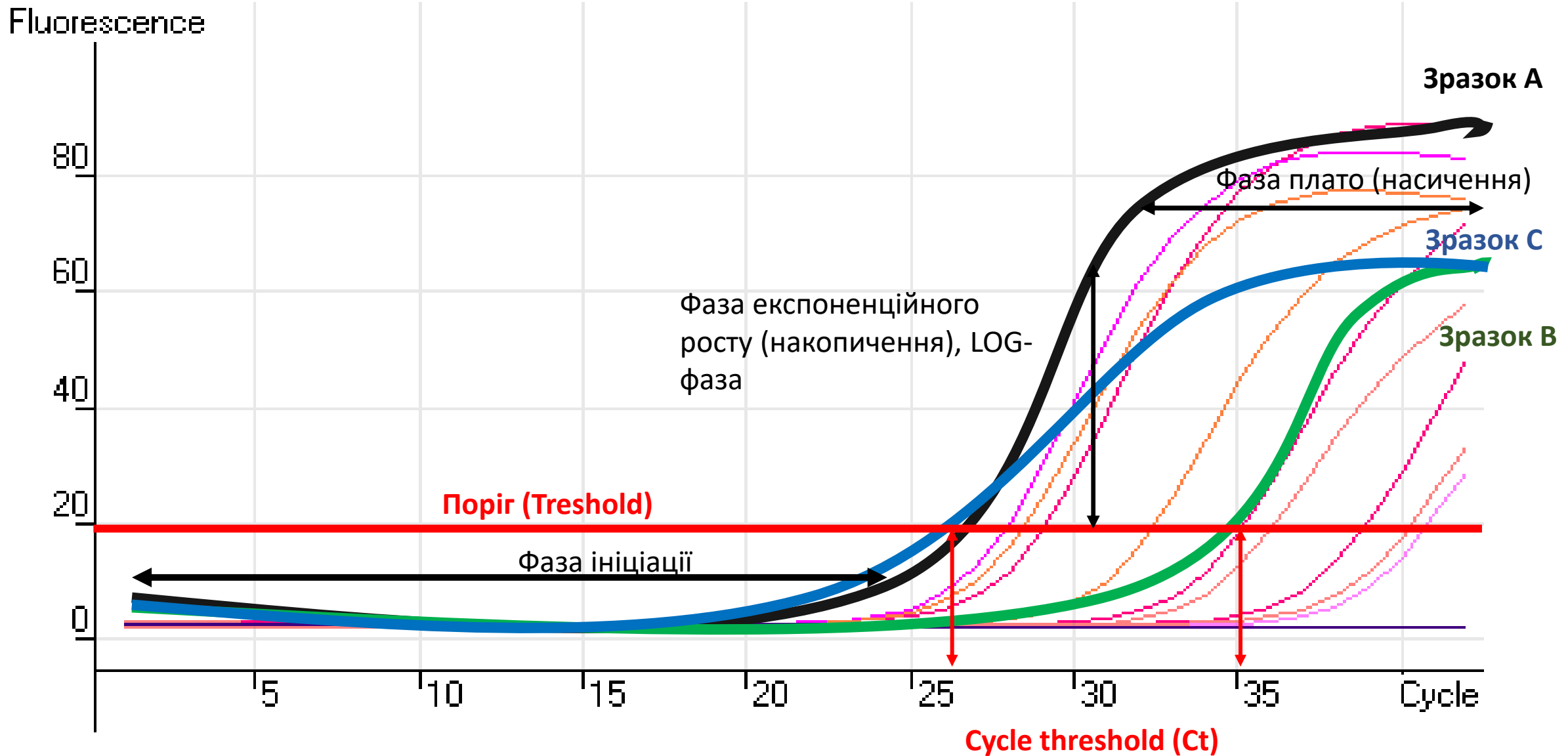
Масштабування по каналах детекції



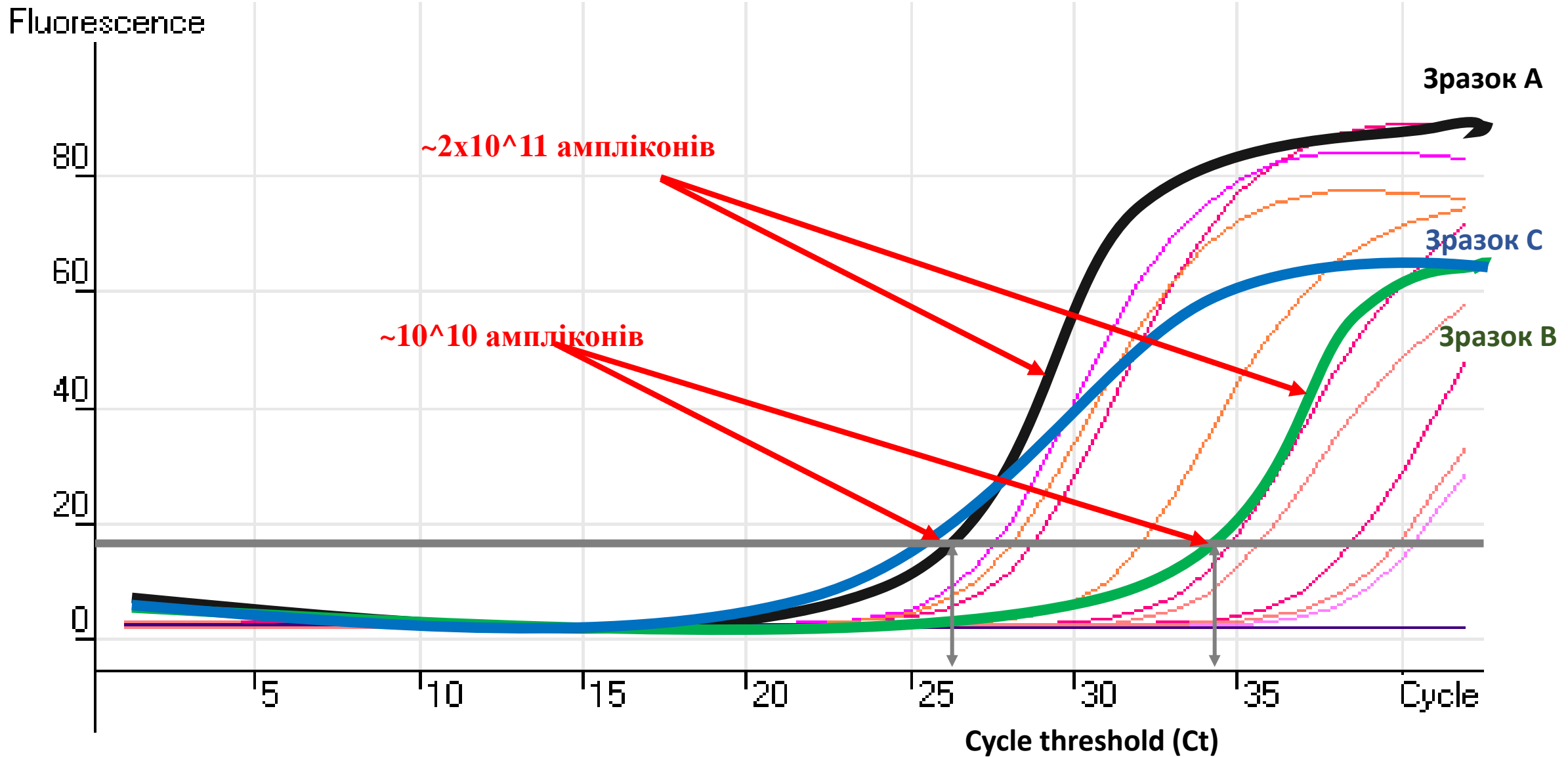
Первинний процесинг ПЛР-даних

- Масштабування
- Логарифмування

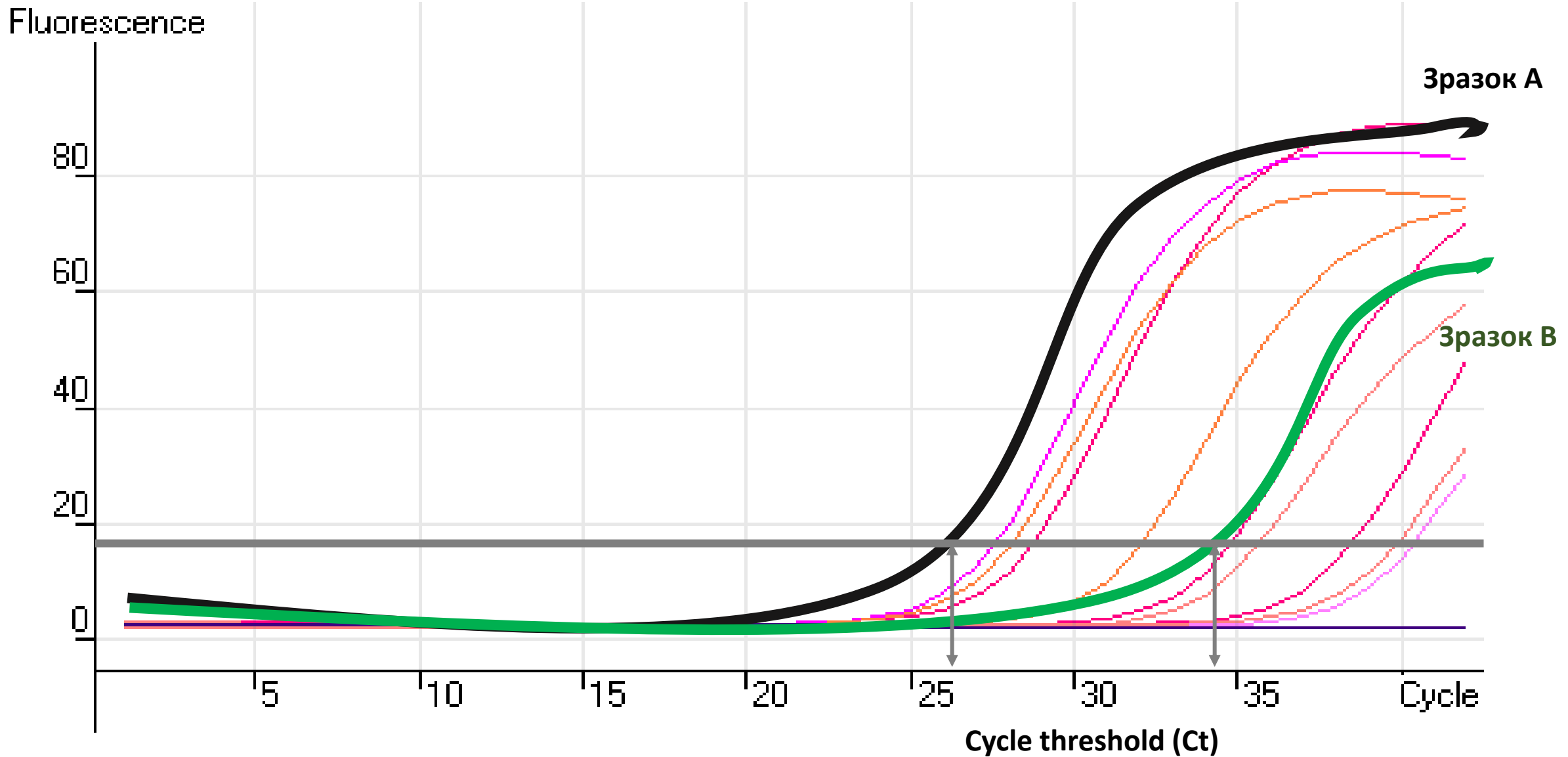
Кінетика ПЛР



Кінетика ПЛР



Кінетика ПЛР



Ефективність ПЛР

- Проста модель ПЛР – подвоєння ампліфікаційного продукту на кожному циклі ПЛР

$$N_n = N_0 \times 2^n$$

Де N_n кількість ампліконів на циклі n

N_0 - вихідна кількість молекул ДНК збудника

n – номер цикла ампліфікації

2 – коефіцієнт ефективності реакції (подвоєння ампліфікаційного продукту)

Ефективність ПЛР

- Позначимо ефективність ПЛР літерою E

$$N_n = N_0 \times E^n$$

$$\text{де } 1 < E < 2$$

Ефективність ПЛР – це число, що показує, в скільки разів за один цикл ампліфікації змінюється кількість ампліконів.

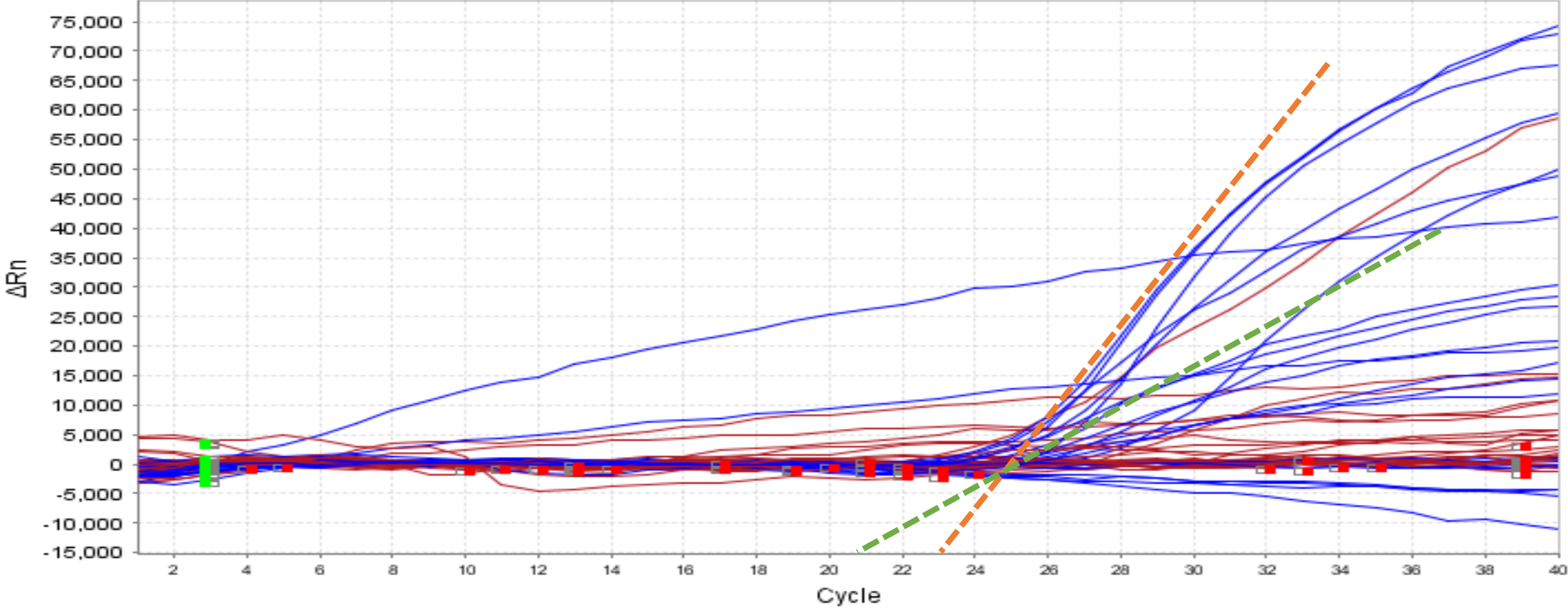
- Варіант 2 – для вираження ефективності реакції у відсотках (або в долях від 1)

$$N_n = N_0 \times (1 + E)^n$$

$$\text{де } 0 < E < 1$$

Лінійна шкала

Amplification Plot



■ Target 2 ■ Target 1

Логарифмування даних ПЛР

- Оскільки ампліфікатор «бачить» не молекули ДНК, а флуоресцентний сигнал, інтенсивність якого залежить від концентрації ДНК в пробірці, необхідно знати, як пов'язана кількість молекул ДНК і інтенсивність флуоресценції.
- Якщо сигнал флуоресценції пропорційний кількості молекул ДНК в пробірці, то можна описати ПЛР формулою:

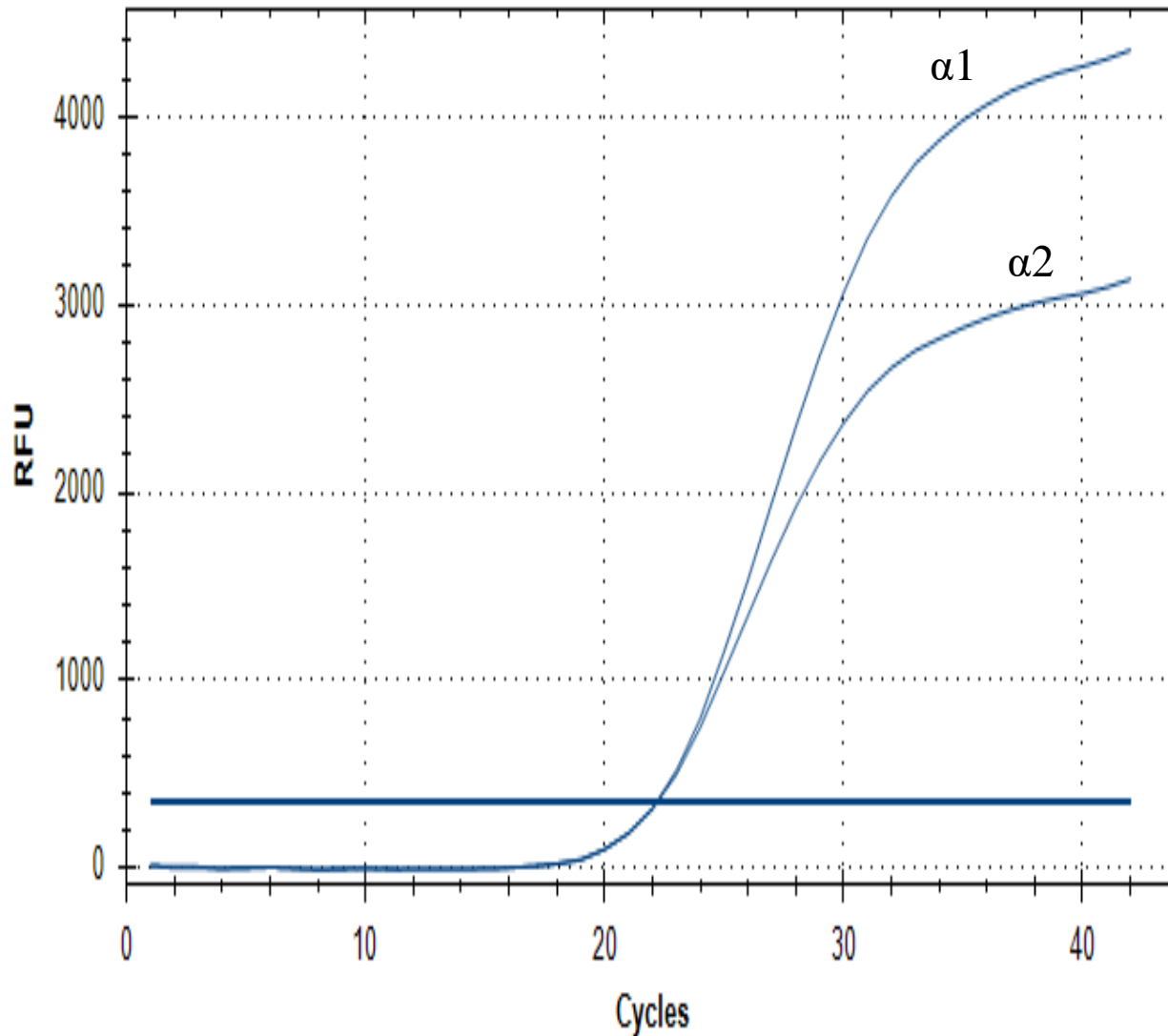
$$F = \alpha \times N$$

Де F – сигнал флуоресценції

α – коефіцієнт пропорційності

N – кількість молекул ДНК

Amplification



Коефіцієнт α

- відрізняється для різних постановок і навіть для різних пробірок в межах однієї постановки
- Залежить від налаштувань приладу, а також від нерівномірності оптичної частини ампліфікатора
- Залежить від характеристик та оптичних властивостей реакційної пробірки (прозорість, однорідність товщини стінок, фонові флуоресценції тощо)
- Точності рознесення реагентів по пробірках
- Типу барвників (інтеркалюючі барвники, флуоресцентні зонди, мічені праймери тощо)
- Випадкових факторів (пил, тальк рукавичок, позначення маркером тощо)
- Наявності флуоресцентних домішок в зразках

Логарифмування даних ПЛР

Логарифм – показник ступеня

$$10 \times 10 = 100$$

$$10 = 10^1 = 1 \lg$$

$$100 = 10^2 = 2 \lg$$

$$10 \times 10 = 10^{1+1} = 10^2 = 2 \lg$$

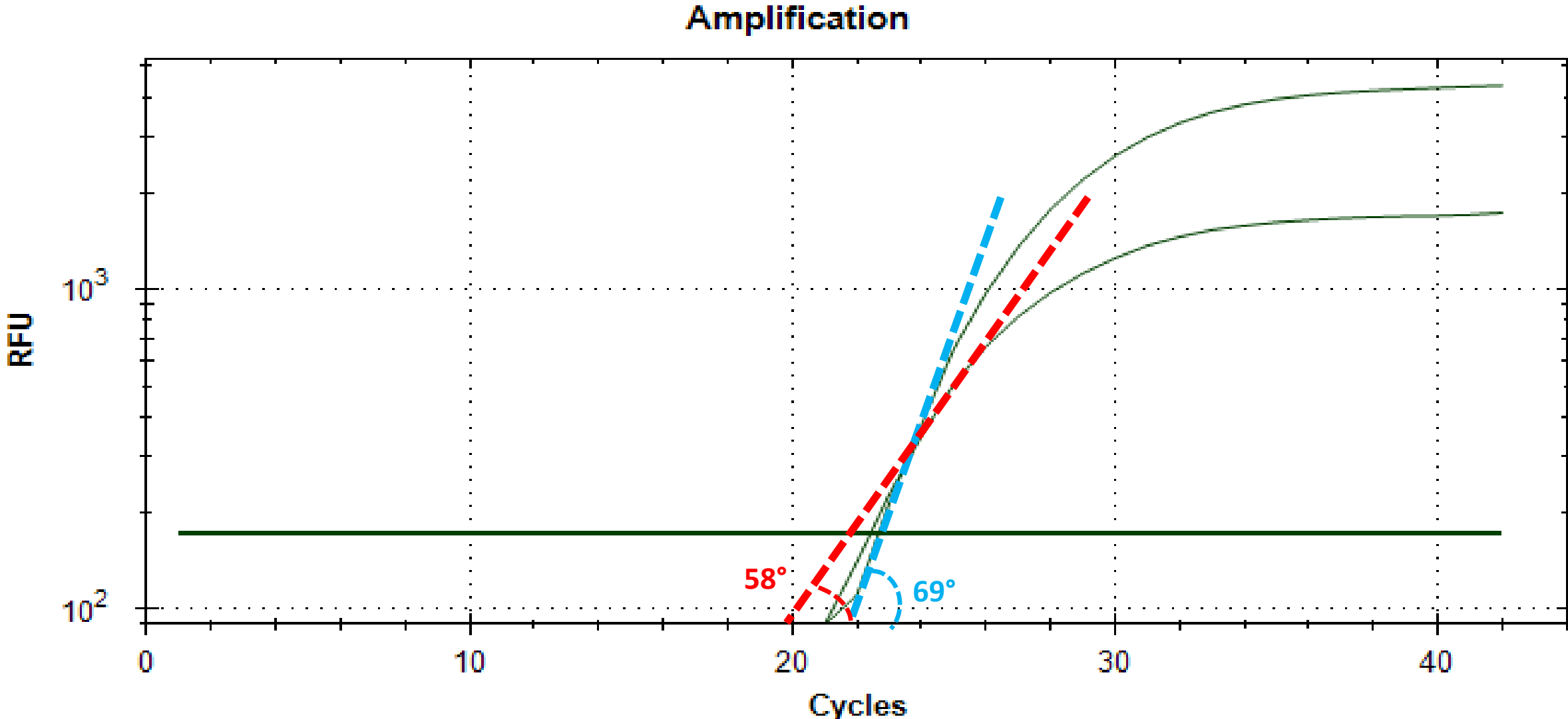
- Якщо ми додамо параметр ефективності в попередню формулу, то отримаємо

$$F_n = \alpha \times N_0 \times E^n$$

- А при логарифмуванні ПЛР-шкали формула буде мати такий вид:

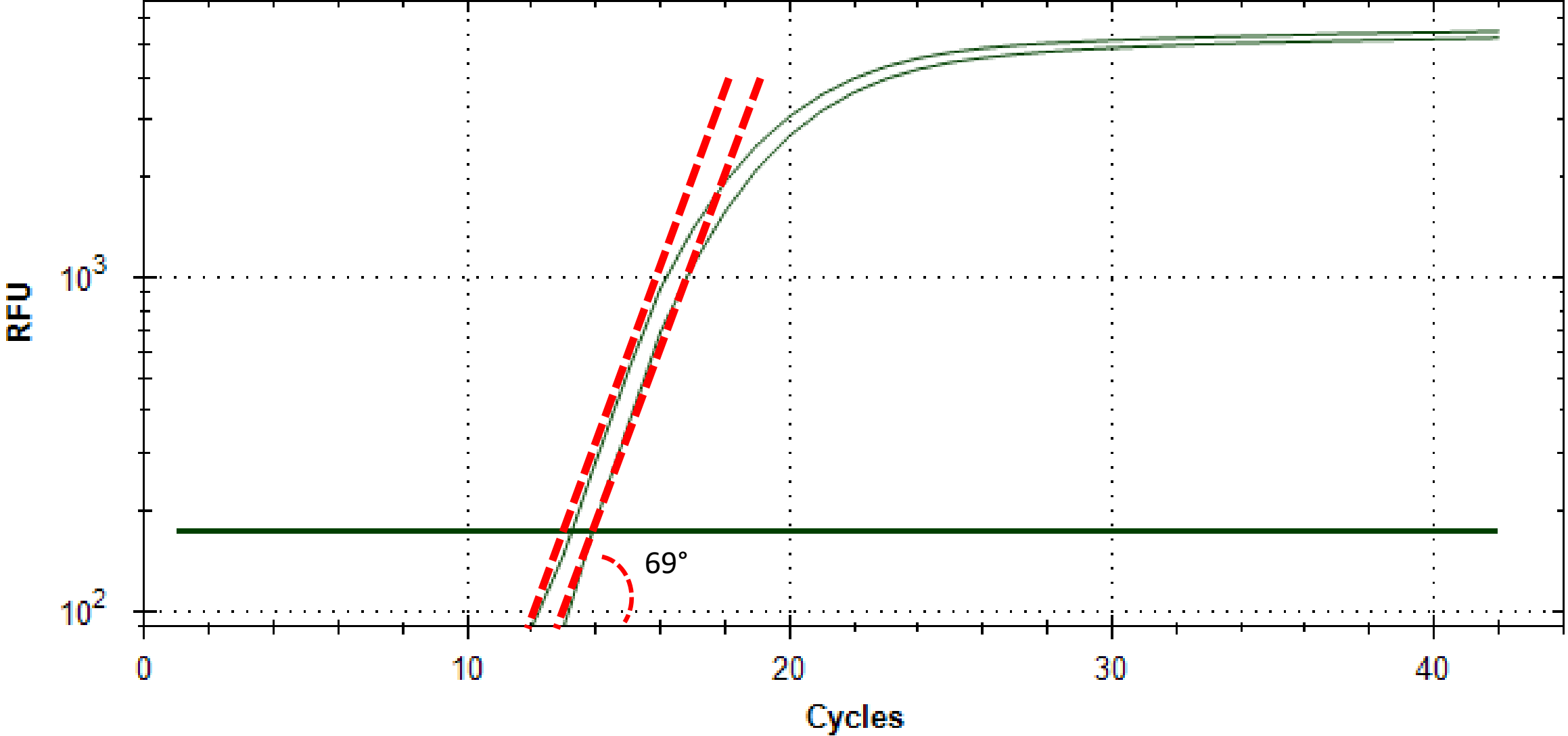
$$\text{Log } F_n = \log \alpha + \log N_0 + n \times \log E$$

Логарифмічна шкала



Логарифмічна шкала

Amplification



Первинний процесинг ПЛР-даних

- Масштабування
- Логарифмування
- Віднімання «фону» та зведення ПЛР-кривих на єдину «базову» лінію

Віднімання фонові складові

- Інтенсивність флуоресценції, що фіксує ампліфікатор протягом реакції ПЛР, можна описати формулою:

$$F_n = \alpha \times N_0 \times E^n$$

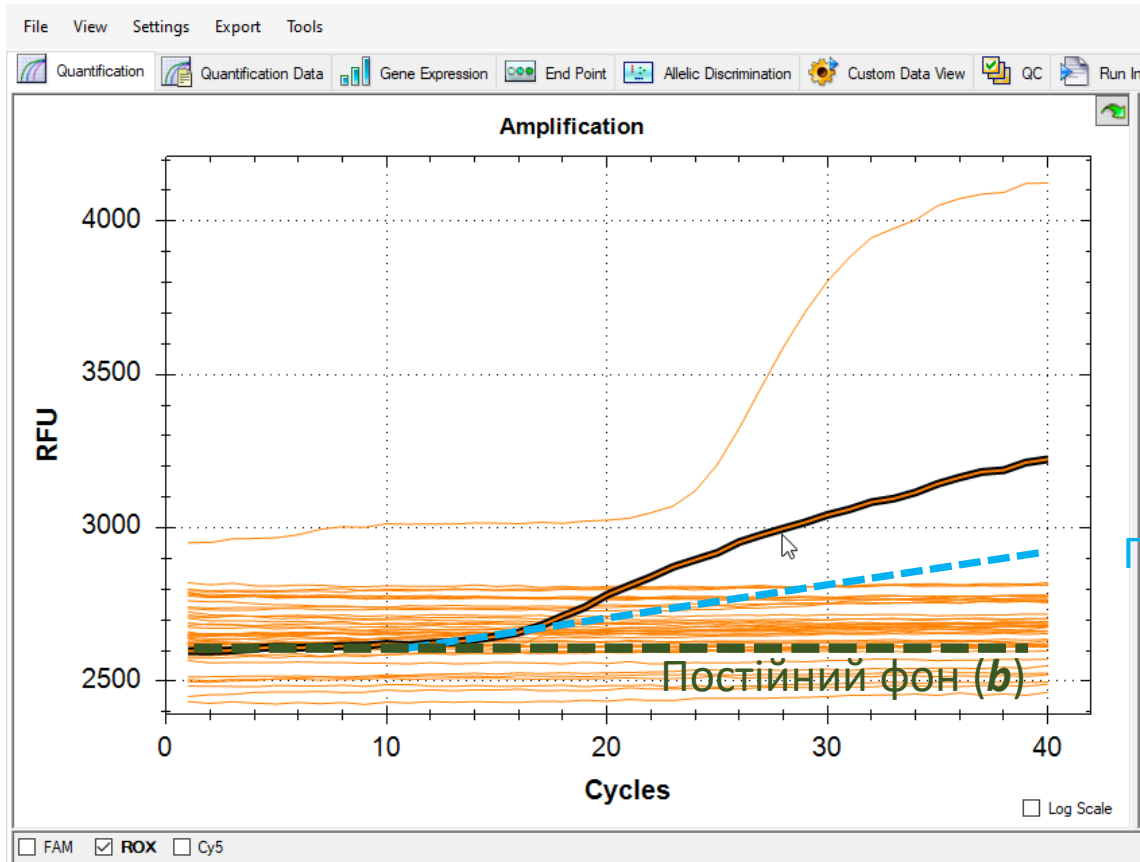
Проте ця формула не враховує фонову флуоресценцію зразка. Фон має дві складові:

- Постійна (***b***)
- Змінна (***k* × *n***), яка є функцією від номеру циклу ампліфікації

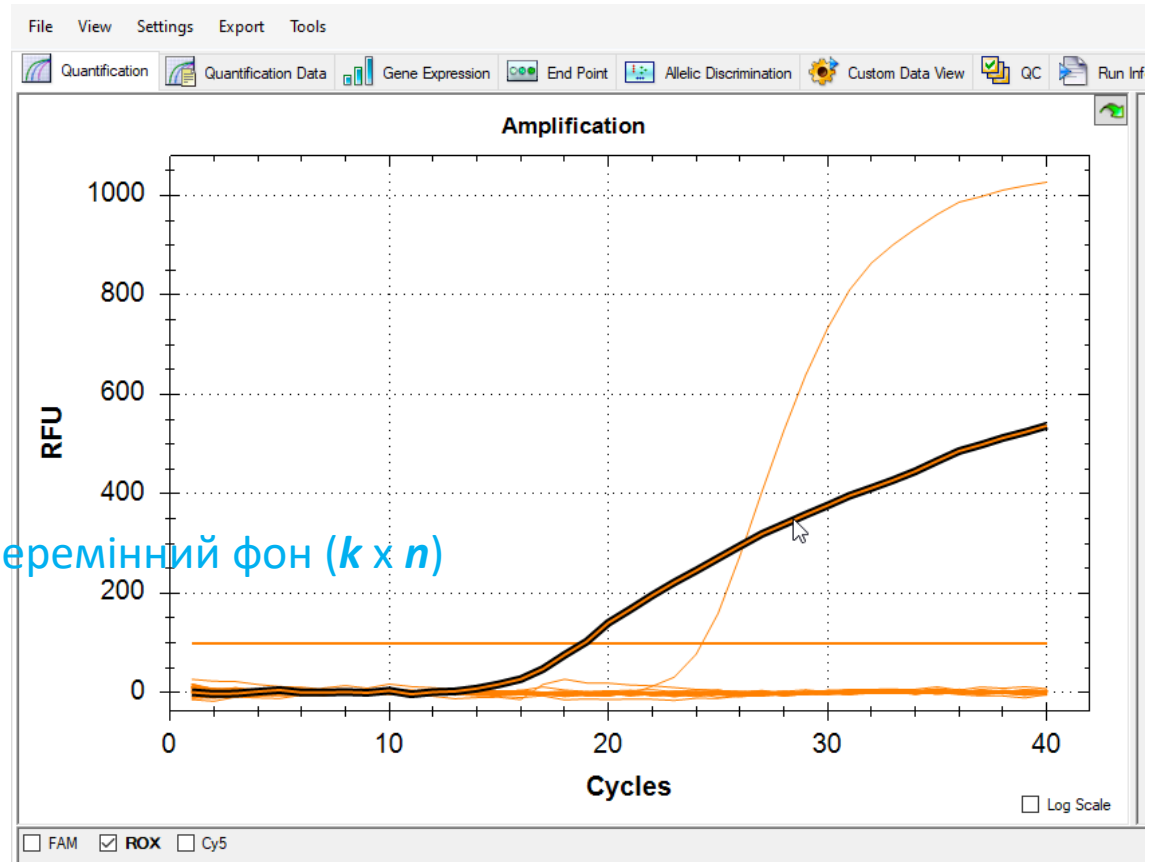
Т.ч., формула, що враховує фонову складову, виглядає так:

$$F_n = \alpha \times N_0 \times E^n + b + kn$$

«Сирі» дані



Оброблені дані



Віднімання фонові складові

Джерела фонової флуоресценції

- Постійний фон:
 - Залишкове світіння флуорофора
 - Різниця в прозорості пробірок
 - Пил
 - Фоновий шум ампліфікатора
- Змінний фон
 - Щільність прилягання пробірки до лунки термоблоку
 - Неспецифічна деградація флуоресцентних зондів протягом ампліфікації тощо

Бруд в лунках ампліфікатора

Four screenshots of a software interface for microscope image processing, showing different filter settings for a grid of circular features.

Top Left: Filter 'Fam'
Coordinates: A1: X=103, Y=237; A12: X=663, Y=236; H1: X=101, Y=53; H12: X=659, Y=52.
Spot size: Rx=22, Ry=12.
Exposure: 2500 ms.

Top Right: Filter 'Hex'
Coordinates: A1: X=103, Y=237; A12: X=663, Y=236; H1: X=101, Y=53; H12: X=659, Y=52.
Spot size: Rx=22, Ry=12.
Exposure: 3000 ms.

Bottom Left: Filter 'Rox'
Coordinates: A1: X=103, Y=237; A12: X=663, Y=236; H1: X=101, Y=53; H12: X=659, Y=52.
Spot size: Rx=22, Ry=12.
Exposure: 2000 ms.

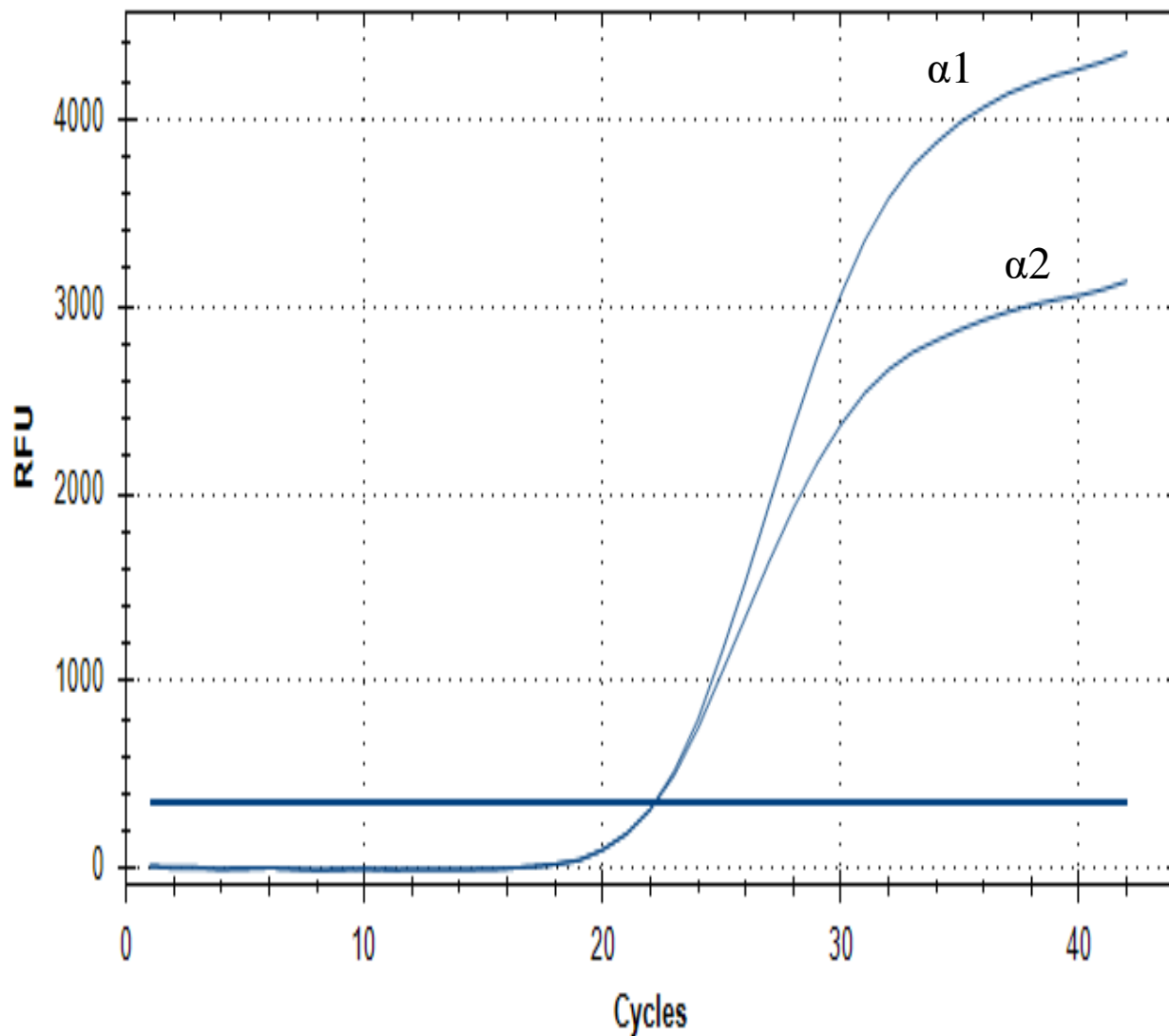
Bottom Right: Filter 'Cy5'
Coordinates: A1: X=103, Y=237; A12: X=663, Y=236; H1: X=101, Y=53; H12: X=659, Y=52.
Spot size: Rx=22, Ry=12.
Exposure: 2000 ms.

Each interface includes a main image area with a grid of circles, a settings panel with coordinate and spot size inputs, and a control panel with 'Ok', 'Отмена', and 'Возврат к начальным значениям' buttons.

Первинний процесинг ПЛР-даних

- Масштабування
- Логарифмування
- Віднімання «фону» та зведення ПЛР-кривих на єдину «базову» лінію
- Нормування коефіцієнтів α

Amplification



Коефіцієнт α

відрізняється для різних постановок і навіть для різних пробірок в межах однієї постановки

Залежить від налаштувань приладу, а також від нерівномірності оптичної частини ампліфікатора

Залежить від характеристик та оптичних властивостей реакційної пробірки (прозорість, однорідність товщини стінок, фонові флуоресценції тощо)

Залежить від точності рознесення реагентів по пробірках

Залежить від типу барвників (інтеркалюючі барвники, флуоресцентні зонди, мічені праймери тощо)

Залежить від випадкових факторів (пил, тальк рукавичок, позначення маркером тощо)

Залежить від наявності флуоресцентних домішок в зразках

Нормування коефіцієнтів α

- Вирівнювання (нормування) графіків по флуоресцентним реагентам в ПЛР-пробірках до початку ПЛР (напр., BioRad).
- Вирівнювання графіків по додатковому «нормувальному» барвнику (напр., Applied Biosystem)
- Вирівнювання графіків по рівню плато в кінці реакції (метод амплітудного нормування). Використовується багатьма виробниками ампліфікаторів. Шляхом множення на різні коефіцієнти рівень плато для всіх кривих доводять до єдиного значення. Дає хороші результати у випадку різного масштабу кривих при однаковій E і однаковій кінцевій концентрації ДНК в пробірці
- Вирівнювання графіків по кільком значенням флуоресценції, отриманим на різних температурах реакційної суміші (ΔT_F нормування). Оскільки при зміні температури більшість флуорофорів змінює ефективність флуоресценції, за величиною цих змін можна оцінити різницю в коефіцієнтах α («ДНК-технологія»)

Нормування за пасивним референсом

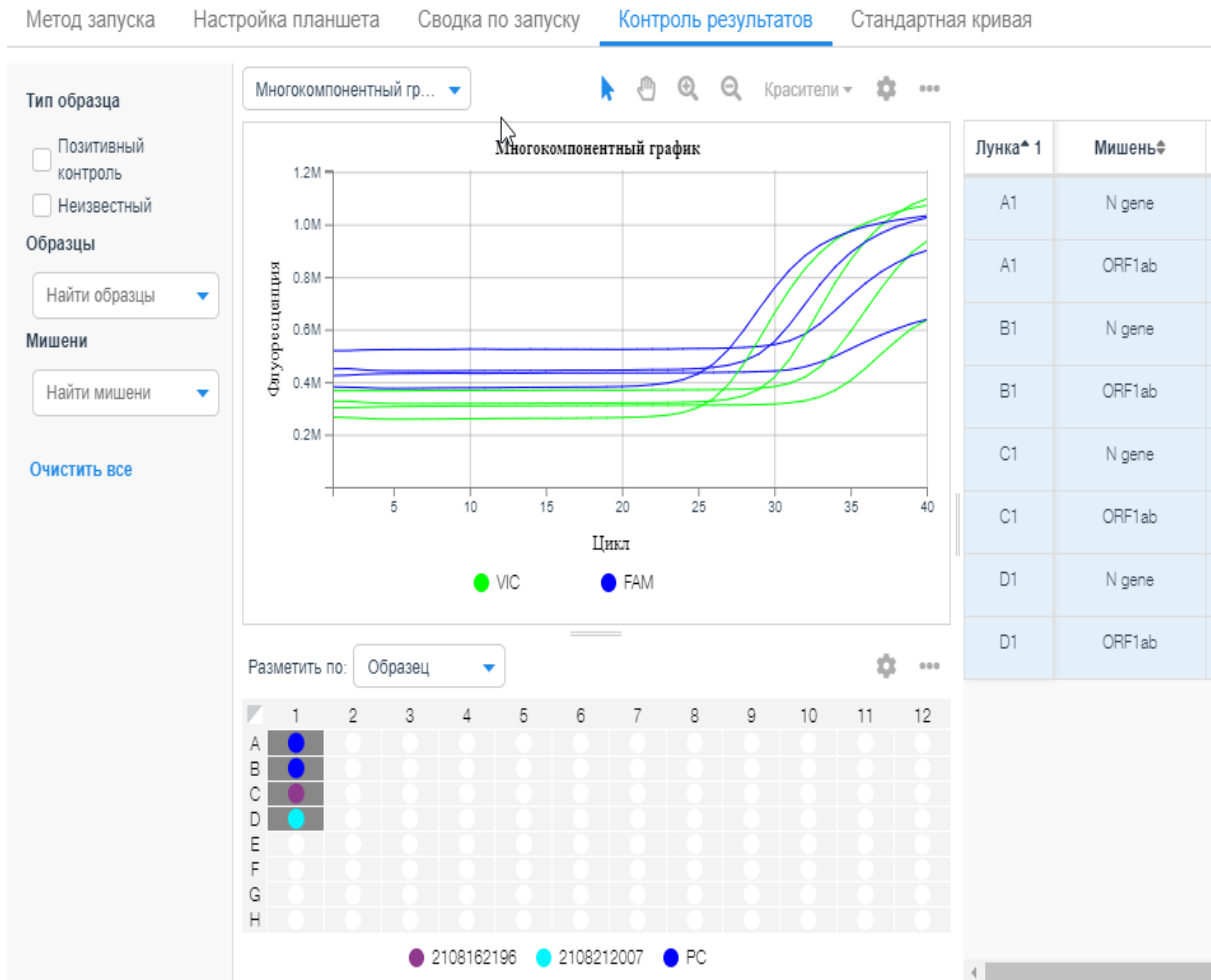
The screenshot shows a software interface for assigning targets and samples to a plate. The main window is titled "Assign Targets and Samples" and has a menu bar with "File", "Edit", "Analysis", "Tools", and "Help". Below the menu bar are tabs for "Properties", "Method", "Plate", "Run", "Results", and "Export".

The interface is divided into two main sections: "Quick Setup" and "Advanced Setup". The "Quick Setup" section has fields for "Sample", "Target", and "Well Comments". The "Advanced Setup" section has a "Plate Attributes" section with a "Passive Reference" field. A red box highlights the "Passive Reference" field, which shows a list of options: "NED" and "ROX". The "ROX" option is selected, and a mouse cursor is pointing at it.

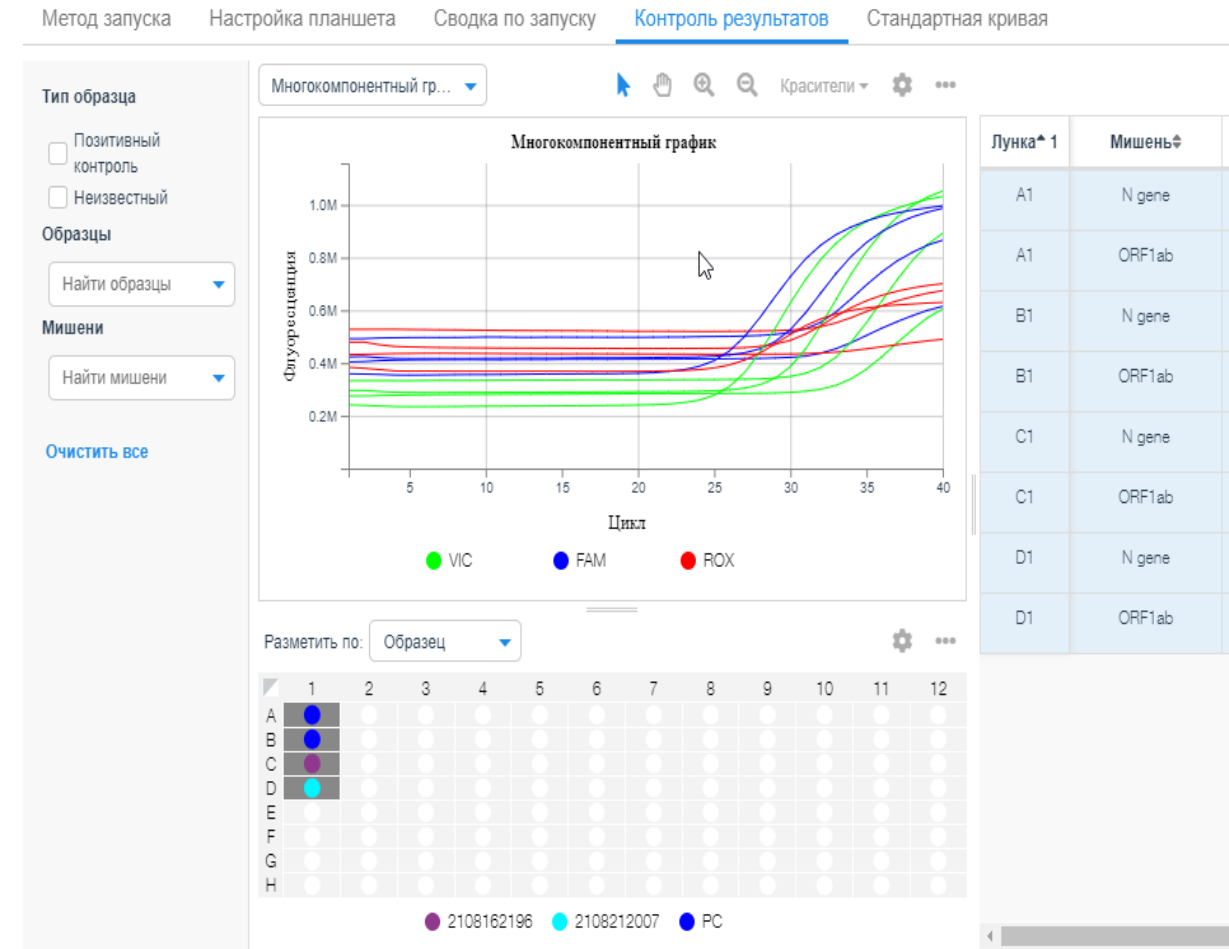
To the right of the "Quick Setup" and "Advanced Setup" sections is a "View" section with a "View" dropdown menu and a grid of wells. The grid has 12 columns (numbered 1-12) and 8 rows (labeled A-H). The first well (A1) is highlighted with a dashed box. Below the grid, it says "Wells: U 0 S 0 N 0" and "96 Empty".

At the bottom of the interface are "Previous" and "Next" buttons. The Windows taskbar at the bottom shows the "Home" button and a taskbar with a window titled "2023-03-24_04...x".

Нормування за пасивним референсом. Сирі дані

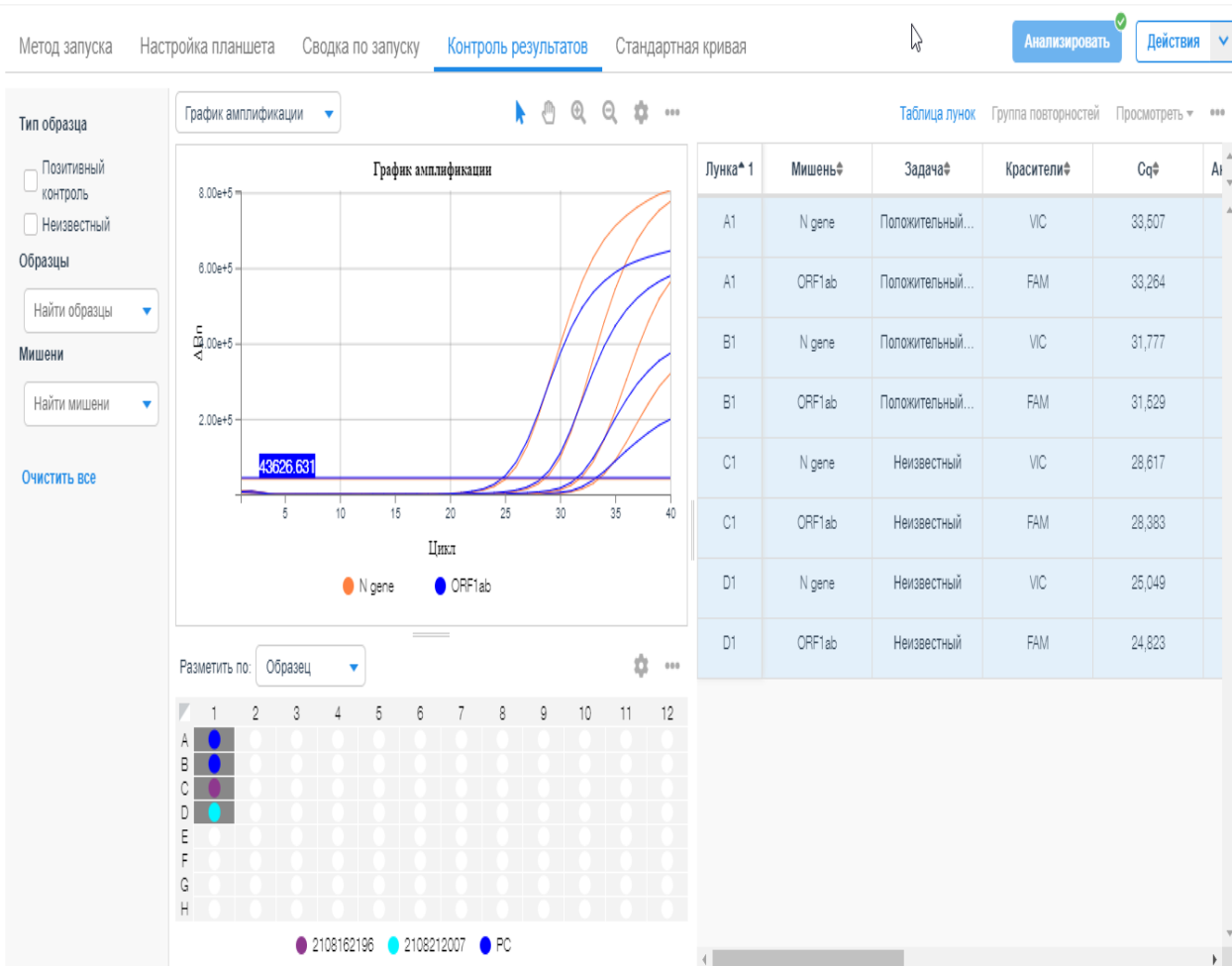


Без пассивного референсу

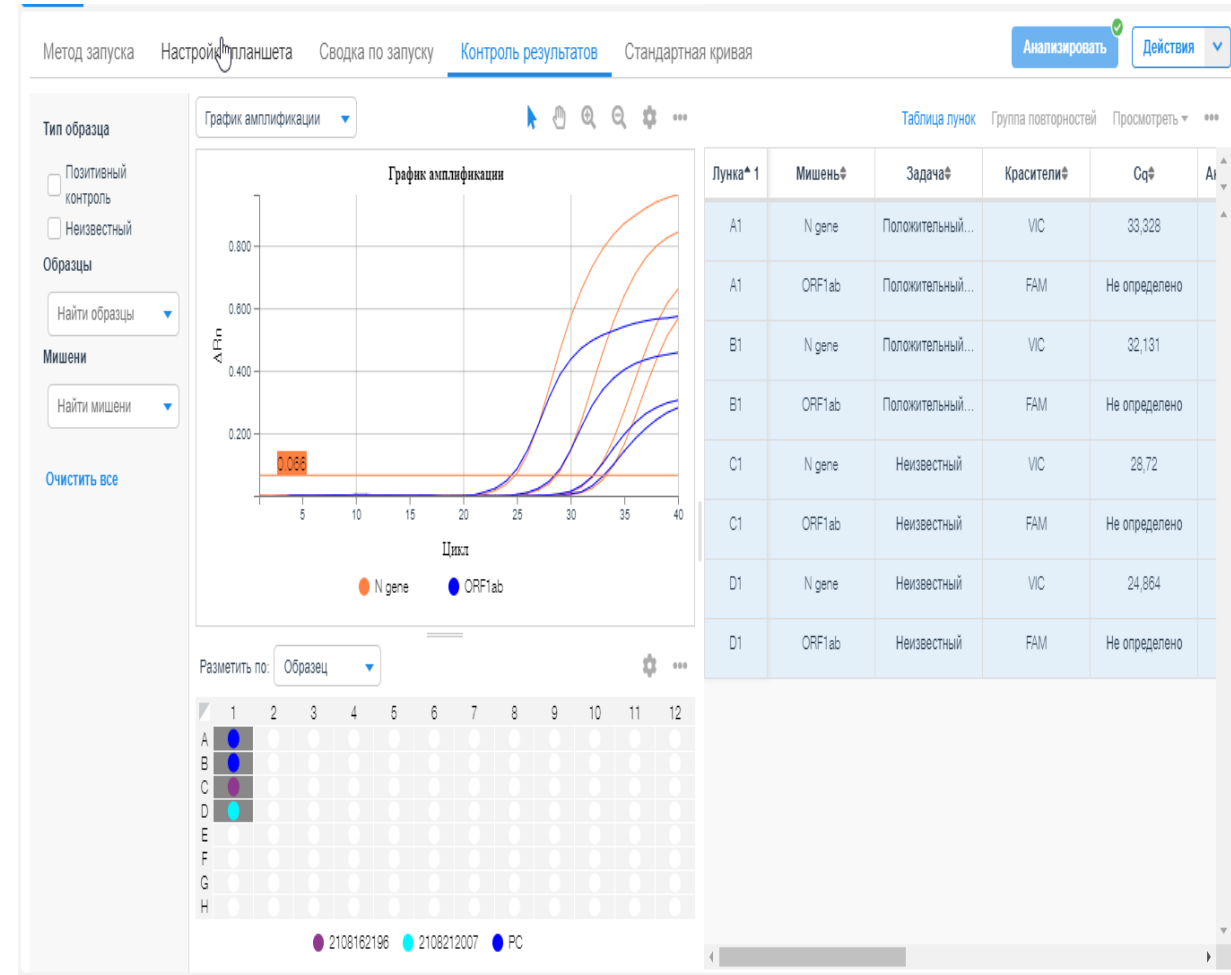


3 пассивним референсом

Нормування за пасивним референсом. Оброблені дані



Без пассивного референсу



3 пассивним референсом

Первинний процесинг ПЛР-даних

- Масштабування
- Логарифмування
- Віднімання «фону» та зведення ПЛР-кривих на єдину «базову» лінію
- Нормування коефіцієнтів α
- Лінійна апроксимація (згладжування ПЛР-кривих)
- Встановлення рівня порогової лінії (для порогового методу аналізу)

Резюме

- «Сирі» дані ПЛР підлягають автоматичній обробці програмним забезпеченням ампліфікатора. Алгоритми цієї обробки відрізняються для різних моделей приладів і не завжди найоптимальніші.
- Експертний перегляд сирих та первинно оброблених даних є обов'язковим. Не можна в сліпу довіряти алгоритмам
- У оператора є обмежені можливості корекції машинних алгоритмів – ними обов'язково потрібно користуватися

Дякую за увагу
