

УДК 57.088.1

DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-3-13-20

ПАРАМЕТРЫ ПРАЙМЕРОВ, КОРРЕЛИРУЮЩИЕ С КОЭФФИЦИЕНТОМ ДЕТЕРМИНАЦИИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Л.А. Богданов, Д.К. Шишкова, М.Ю. Синицкий, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновы́й бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Проведен корреляционный анализ параметров праймеров и эффективности и коэффициента детерминации кПЦР на двух независимых массивах экспериментальных данных.
- При соблюдении основных правил разработки праймеров их параметры не влияют на эффективность и коэффициент детерминации кПЦР.

Цель	Выявить, существует ли корреляция между параметрами праймеров, эффективностью и коэффициентом детерминации количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).
Материалы и методы	Выделение РНК производили из первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии с последующим синтезом одноцепочечной комплементарной ДНК при помощи обратной транскрипции. Методом кПЦР с детекцией результата в режиме реального времени (флуоресцентный краситель SYBR Green I) определяли экспрессию следующих генов: <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , <i>IL12A</i> , <i>IL23A</i> , <i>PECAM1</i> , <i>VWF</i> , <i>KDR</i> , <i>FAPA</i> , <i>ACTA2</i> , <i>SMTN</i> , <i>VIM</i> , <i>COL4A1</i> , <i>MMP2</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>ZEB1</i> , <i>SCARF1</i> , <i>CD36</i> , <i>LDLR</i> , <i>VLDLR</i> , <i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>SELE</i> , <i>SELP</i> , <i>CDH5</i> , <i>IL1R1</i> , <i>IL1R2</i> , <i>TNFRSF1A</i> , <i>TNFRSF1B</i> , <i>NOS3</i> , <i>PXDN</i> . Праймеры разработаны в программе Primer-BLAST. Корреляционный анализ по Спирмену выполнен в программе GraphPad Prism.
Результаты	Коэффициент детерминации коррелировал с количественной оценкой качества праймеров, разработанных в программе Beacon Designer, температурой плавления ампликона и содержанием гуанина – цитозина в обратном праймере. Эффективность кПЦР, напротив, не коррелировала с количественной оценкой качества созданных в Beacon Designer праймеров, но коррелировала с длиной, а также процентным содержанием GC в обратных праймерах. Все указанные коэффициенты корреляции находились в диапазоне от 0,4 до 0,5 либо от -0,4 до -0,5, отражая корреляционную связь средней силы. В то же время остальные параметры (как для пар, так и отдельно прямого и обратного праймеров) не влияли на эффективность и коэффициент детерминации кПЦР.
Заключение	При соблюдении основных правил разработки праймеров их параметры не влияют на эффективность и коэффициент детерминации кПЦР.
Ключевые слова	кПЦР • Ампликон • Дизайн праймеров • Эффективность кПЦР • Коэффициент детерминации

Поступила в редакцию: 10.04.2020; поступила после доработки: 07.05.2020; принята к печати: 30.05.2020

PRIMER PARAMETERS DEFINING EFFICIENCY AND COEFFICIENT OF DETERMINATION IN QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

L.A. Bogdanov, D.K. Shishkova, M.Yu. Sinitsky, A.G. Kutikhin

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6, Sosonoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- We performed a correlation analysis between primer parameters and qPCR efficiency/coefficient

Для корреспонденции: Лев Александрович Богданов, bogdanovleone@gmail.com; адрес: Сосновы́й бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Leo A. Bogdanov, e-mail: bogdanovleone@gmail.com; address: 6, Sosonoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

of determination in two independent samples from *in vitro* functional experiments.

- Primer parameters do not define qPCR efficiency and coefficient of determination significantly if primers are designed according to the optimised PRIMER-BLAST settings.

Aim	To find the correlation between the primer parameters, efficiency, and coefficient of determination (R^2) in quantitative polymerase chain reaction (qPCR) conditions.
Methods	Upon RNA isolation from primary human coronary artery endothelial cells, we performed reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) utilising SYBR Green chemistry to measure the expression of the following genes: <i>IL1B</i> , <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , <i>IL12A</i> , <i>IL23A</i> , <i>PECAM1</i> , <i>VWF</i> , <i>KDR</i> , <i>FAPA</i> , <i>ACTA2</i> , <i>SMTN</i> , <i>VIM</i> , <i>COL4A1</i> , <i>MMP2</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>ZEB1</i> , <i>SCARF1</i> , <i>CD36</i> , <i>LDLR</i> , <i>VLDLR</i> , <i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>SELE</i> , <i>SELP</i> , <i>CDH5</i> , <i>IL1R1</i> , <i>IL1R2</i> , <i>TNFRSF1A</i> , <i>TNFRSF1B</i> , <i>NOS3</i> , <i>PXDN</i> . Primers were designed employing Primer-BLAST software using optimised settings. For the correlation analysis, Spearman's rank correlation coefficient was applied (GraphPad Prism).
Results	Coefficient of determination correlated with the primer pair rating by Beacon Designer, amplicon melting temperature, and GC content in the reverse primer. Reaction efficiency did not correlate with the Beacon Designer rating, yet being associated with length and GC content of the reverse primer. Abovementioned correlation coefficients ranged from 0.4 to 0.5 or from -0.4 to -0.5 indicative of moderate positive or negative correlation. Other parameters did not affect reaction efficiency and coefficient of determination.
Conclusion	Primer parameters do not define qPCR efficiency and coefficient of determination significantly if primers are designed according to the optimised PRIMER-BLAST settings.
Keywords	qPCR • Amplicon • Primer design • Efficiency • Coefficient of determination

Received: 10.04.2020; received in revised form: 07.05.2020; accepted: 30.05.2020

Список сокращений

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота	Е – эффективность
кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция	GC – гуанин и цитозин
	R^2 – коэффициент детерминации

Введение

Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) – это молекулярный метод, который используют в биомедицине [1, 2] и активно применяют для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний, стратификации риска развития неинфекционных заболеваний, а также нужд криминалистики [3–7]. Данный метод является «золотым стандартом» при анализе генной экспрессии, однако имеет многочисленные технические нюансы в выполнении [8–10].

Стандартной процедурой для максимизации специфичности праймеров и выхода продукта при кПЦР является оптимизация дизайна праймеров [5, 6, 10]. Неправильно или неоптимально сконструированные праймеры могут образовывать димеры или шпильки, гибридизоваться только в узком диапазоне температур и выдавать неспецифичные продукты амплификации [9, 11, 12]. Кроме того, такие праймеры крайне чувствительны к незначительным изменениям условий амплификации, что приводит к снижению специфичности и эффектив-

ности кПЦР и потере времени, израсходованного на оптимизацию протокола [9]. Дополнительную сложность оптимизации протокола при кПЦР придает то, что производители мастер-миксов используют разные концентрации Mg^{2+} и компоненты буферных растворов, поэтому применение одной пары праймеров с разными мастер-миксами с большей долей вероятности приведет к различным результатам [9, 13]. Эффективность кПЦР отражает качество разработанных праймеров и оптимизации протокола, и при правильно созданных праймерах показатель должен составлять 90–105% [9, 13].

На первый взгляд может показаться, что удобнее использовать коммерческие праймеры. Как правило, такие праймеры проверены производителем, а протокол – заранее оптимизирован. Однако данные праймеры характеризуются высокой стоимостью и длительным сроком доставки. Наиболее распространенными программами для самостоятельного конструирования праймеров, находящимися в бесплатном или ограниченно свободном доступе, являются Primer3Plus, Primer-BLAST, PrimerQuest

и Beacon Designer [7, 9, 14, 15]. Также доступны программы для контроля качества разработанных праймеров, включая их склонность к образованию димеров и шпилек (например, PCR Primer Stats и Multiple Primer Analyzer) [7, 9, 11, 14].

Цель исследования – оценить, какие параметры праймеров внутри оптимизированных настроек разработки и в какой степени влияют на эффективность и линейность кПЦР.

Материалы и методы

Рибонуклеиновую кислоту для использованных в данном исследовании массивов данных выделяли из коммерческой линии первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии, поврежденных в ходе эксперимента магний-фосфатными и кальций-фосфатными бионами (время экспозиции для первого массива данных составило 4 ч, для второго – 24 ч). При помощи обратной транскрипции синтезировали одноцепочечную комплементарную дезоксирибонуклеиновую кислоту (кДНК) согласно протоколу набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США).

Разработку праймеров для определения экспрессии генов (*IL1B*, *IL6*, *CXCL8*, *IL12A*, *IL23A*, *PECAM1*, *VWF*, *KDR*, *FAPA*, *ACTA2*, *SMTN*, *VIM*, *COL4A1*, *MMP2*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *SCARF1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*, *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *CDH5*, *IL1R1*, *IL1R2*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *NOS3* и *PXDN*) осуществляли в программе Primer-BLAST (National Institutes of Health, США). При разработке праймеров использовали следующие параметры: длина ампликона – от 100 до 200 пар оснований, температура плавления праймеров – от 59 до 70 °С с различием между праймерами не более 3 °С, включение интрона с длиной не менее 200 пар оснований – обязательно, длина праймера – от 18 до 22 нуклеотидов, содержание гуанина (G) и цитозина (C) в праймерах – от 40 до 60%, максимальная длина повтора одного и того же нуклеотида подряд – 4, максимальное содержание GC на 3'-конце – не более 3 (60%), максимальная комплементарность праймеров – не более 5 условных единиц. Остальные параметры разработки праймеров соответствовали настройкам по умолчанию. Проверяли сконструированные праймеры в программах PCR Primer Stats (Sequence Manipulation Suite, Канада) и Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools, США).

Синтез праймеров осуществляло ЗАО «Евроген» (Россия). Готовили реакционную смесь общим объемом 10 мкл, содержащую 5 мкл мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нмоль/л прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. Реакцию проводили в стандартном 96-луночном оптическом планшете, содержащем помимо 26 анализируемых образцов 5 стандартов с двукратным разведением

и отрицательным контролем (реакционная смесь без кДНК). Амплификацию выполняли в течение 45 циклов с использованием следующих настроек: денатурация – 15 секунд при 95 °С, отжиг – 15 секунд при 62,4–70,4 °С (в зависимости от температуры плавления праймеров), элонгация – 1 мин при 72 °С. Использованные в эксперименте последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Для оценки связи коэффициента детерминации и эффективности кПЦР с параметрами праймеров использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Корреляционный анализ проводили в программе GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, США).

Результаты

По результатам анализа генной экспрессии эндотелиальных клеток, инкубированных с бионами в течение 4 ч, для большинства исследованных генов (исключая *IL23A*, *PECAM1*, *FAPA* и *IL1R2*) получены значения коэффициента детерминации (R^2) и эффективности (E) (табл. 2). кПЦР считалась успешной при значениях R^2 от 0,98 до 1 (с округлением до сотых долей единицы) и E от 85 до 105%. Большинство реакций оказались успешными, однако для следующих генов выявлены низкие значения: *VCAM1* ($R^2 = 0,969$, E = 68,3), *SMTN* ($R^2 = 0,984$, E = 72,4), *SNAI2* ($R^2 = 0,986$, E = 71,9), *TWIST1* ($R^2 = 0,996$, E = 73,0), *CD36* ($R^2 = 1$, E = 76,7). Все показатели R^2 , за исключением 0,969 для гена *VCAM1*, находились в диапазоне приемлемых значений. Результаты корреляционного анализа первого массива данных показали обратную корреляцию между значением R^2 и количественной оценкой в программе Beacon Designer ($r = -0,36$), обратную корреляцию E и длины обратного праймера ($r = -0,43$), а также прямую корреляционную зависимость между E и содержанием GC в обратном праймере ($r = 0,41$). Связи между R^2 и E не наблюдали.

При анализе второго массива данных (табл. 3) получены приемлемые значения R^2 и E для всех генов кроме *CXCL8* ($R^2 = 0,931$, E = 72,3), *MMP2* ($R^2 = 0,986$, E = 84,5), *SNAI1* ($R^2 = 0,993$, E = 84,6), *TWIST1* ($R^2 = 0,996$, E = 68,2), *VLDLR* ($R^2 = 0,99$, E = 69,9), *IL1R2* ($R^2 = 0,988$, E = 79,1) и *TNFRSF1B* ($R^2 = 0,970$, E = 96,9). Отмечены прямая корреляция R^2 и количественной оценки в программе Beacon Designer ($r = 0,40$), обратные корреляции с длиной ампликона ($r = -0,45$) и содержанием GC в обратном праймере ($r = -0,43$).

По итогам корреляционного анализа первого и второго массивов данных выявлено, что вышеперечисленные зависимости находились в диапазоне от 0,4 до 0,5 либо от -0,4 до -0,5, тем самым отражая корреляционную связь средней силы. Некоторые параметры коррелировали с E или R^2 , однако ни один из показателей не верифицирован на обоих массивах данных.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в эксперименте
Table 1. Primer sequences for the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

№	Ген и идентификационный номер последовательности мРНК по базе данных RefSeq / Gene and RefSeq mRNA sequence number	Последовательности праймеров / Primer sequences	Температура плавления, °C / Melting temperature, °C
1	<i>IL1B</i> (NM_000576.2)	П (F): 5'-TGGCTTATTACAGTGGCAATG-3' О (R): 5'-GTGGTGGTCCGAGATTCG-3'	64
2	<i>IL6</i> (NM_000600.4)	П (F): 5'-GGCACTGGCAGAAAAACAACC-3' О (R): 5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'	62,9
3	<i>CXCL8</i> (NM_000584.3)	П (F): 5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3' О (R): 5'-AGTTCTTAGCACTCCTTGGC-3'	64,5
4	<i>IL23A</i> (NM_016584.2)	П (F): 5'-CTCAGGGACAACAGTCAGTTC-3' О (R): 5'-ACAGGGCTATCAGGGAGCA-3'	66,8
5	<i>PECAM1</i> (NM_000442.4)	П (F): 5'-AAGGAACAGGAGGGAGAGTATTA-3' О (R): 5'-GTATTTGCTTCTGGGGACACT-3'	64,8
6	<i>VWF</i> (NM_000552.4)	П (F): 5'-CCTTGACCTCGGACCCTATG-3' О (R): 5'-GATGCCCGTTCACACCACT-3'	66,8
7	<i>KDR</i> (NM_002253.3)	П (F): 5'-TGCCTACCTCACCTGTTC-3' О (R): 5'-GGCTCTTCGCTTACTGTTC-3'	63
8	<i>FAPA</i> (NM_004460.4)	П (F): 5'-TCAACTGTGATGGCAAGAGCA-3' О (R): 5'TAGGAAGTGGGTCATGTGGGT-3'	67
9	<i>ACTA2</i> (NM_001613.3)	П (F): 5'-GTGTTGCCCTGAAGAGCAT-3' О (R): 5'-GCTGGGACATTGAAAGTCTCA-3'	64,5
10	<i>SMTN</i> (NM_006932.4)	П (F): 5'-GGGATCGTGTCCACAAGTCA-3' О (R): 5'-GCTACTCCTCGTGTCTCCT-3'	65,8
11	<i>VIM</i> (NM_003380.4)	П (F): 5'-CGCCAGATGCGTAAAATGG-3' О (R): 5'-ACCAGAGGGAGTGAATCCAGA-3'	66,4
12	<i>MMP2</i> (NM_004530.5)	П (F): 5'-CCGTGTTGCCATCTGTTT-3' О (R): 5'-AGGTTCTCTGTGTTTACTTTGGA-3'	66,6
13	<i>SNAI1</i> (NM_005985.3)	П (F): 5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3' О (R): 5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'	67,1
14	<i>SNAI2</i> (NM_003068.4)	П (F): 5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3' О (R): 5'-CTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'	65,4
15	<i>TWIST1</i> (NM_000474.3)	П (F): 5'-GTCCGCAGTCTACGAGGAG-3' О (R): 5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'	66,8
16	<i>ZEB1</i> (NM_030751.5)	П (F): 5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3' О (R): 5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTGT-3'	64,8
17	<i>SCARF1</i> (NM_003693.3)	П (F): 5'-CCGATCAGACCTCAAGGACAG-3' О (R): 5'-CCCAGGGTAGCTTGTGGGA-3'	67,7
18	<i>CD36</i> (NM_000072.3)	П (F): 5'-GGCTGTGACCGAACTGTG-3' О (R): 5'-AGGCTCCAACCTGGCATTAGAA-3'	65,4
19	<i>LDLR</i> (NM_000527.4)	П (F): 5'-ACGGCGTCTCTCCTATGACA-3' О (R): 5'-CCCTTGGTATCCGCAACAGA-3'	66,2
20	<i>VLDLR</i> (NM_003383.4)	П (F): 5'-AGAAAAGCCAAATGTGAACCCCT-3' О (R): 5'-CACTGCCGTCAACACAGTCT-3'	66,8
21	<i>VCAM1</i> (NM_001078.3)	П (F): 5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3' О (R): 5'-ACATTATATACTCCCGCATCCTC-3'	66,5
22	<i>ICAM1</i> (NM_000201.2)	П (F): 5'-TTGGCATAGAGACCCCGTT-3' О (R): 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'	66,4
23	<i>SELE</i> (NM_000450.2)	П (F): 5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3' О (R): 5'-ACCTCACCAAACCCTTCG-3'	63,5
24	<i>SELP</i> (NM_003005.3)	П (F): 5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3' О (R): 5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3'	66,1
25	<i>CDH5</i> (NM_001795.4)	П (F): 5'-AAGCGTGAGTCGCAAGAATG-3' О (R): 5'-TCTCCAGGTTTTCGCCAGTG-3'	66,6
26	<i>IL1R1</i> (NM_000877.3)	П (F): 5'-GGCTGAAAAGCATAGAGGGAAC-3' О (R): 5'-CTGGGCTCACAAATCACAGG-3'	64,6
27	<i>IL1R2</i> (NM_004633.3)	П (F): 5'-TGGCACCTACGTCTGCACTACT-3' О (R): 5'-TTGCGGGTATGAGATGAACG-3'	64,3
28	<i>TNFRSF1A</i> (NM_001065.3)	П (F): 5'-CCAGGAGAAAACAGAACACCGT-3' О (R): 5'-AAACCAATGAAGAGGAGGGATAA-3'	63,4
29	<i>TNFRSF1B</i> (NM_001066.2)	П (F): 5'-GTCCACACGATCCCAACAC-3' О (R): 5'-CACACCCACAATCAGTCCAA-3'	64,4
30	<i>NOS3</i> (NM_000603.4)	П (F): 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3' О (R): 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'	69,9
31	<i>PXDN</i> (NM_012293.2)	П (F): 5'-AGCCAGCCATCCTTGGAAC-3' О (R): 5'-TTCCGGGCCACACACTCATA-3'	67,7

Примечание: мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.
Note: mRNA – messenger ribonucleic acid.

Обсуждение

Несмотря на то что в некоторых случаях получены значимые корреляции, ни одна из них не валидирована на обоих массивах данных. Таким образом, подтверждения, что диапазон какого-либо из параметров существенно влияет на эффективность или линейность кПЦР внутри оптимизированных настроек разработки, не обнаружено. Вероятно, это связано с тем, что для подавляющего большинства генов каждая разработанная пара праймеров была подобрана с учетом всех рекомендаций по дизайну, а отклонение от рекомендуемых параметров

наблюдалось только в случае невозможности разработать праймеры в рамках заданных параметров.

Согласно данным зарубежной литературы, соотношение GC в праймерах должно быть около 50%, в действительности при конструировании праймеров этот показатель варьирует от 40 до 60% [14]. Некоторые авторы утверждают, что оптимальная температура плавления праймеров составляет 59–68 °С, тогда как другие заявляют о предпочтительном диапазоне 60–65 °С [1]. В данной работе температура плавления праймеров находилась в диапазоне от 59 до 65 °С.

Таблица 2. Результаты, полученные во время кПЦР-анализа первого массива данных (экспозиция первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека бионами в течение 4 ч)

Table 2. Results of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the first sample (exposure of primary human coronary artery endothelial cells to bions for 4 hours)

№	Ген и идентификационный номер последовательности мРНК по базе данных RefSeq / Gene and RefSeq mRNA sequence number	Коэффициент детерминации (R ²) / Coefficient of determination (R ²)	Эффективность / Efficiency
1	<i>IL1B</i> (NM_000576.2)	0,984	93,603
2	<i>IL6</i> (NM_000600.4)	0,997	106,898
3	<i>CXCL8</i> (NM_000584.3)	Не определялся / Not defined	
4	<i>IL23A</i> (NM_016584.2)		
5	<i>PECAMI</i> (NM_000442.4)		
6	<i>VWF</i> (NM_000552.4)	0,984	100,252
7	<i>KDR</i> (NM_002253.3)	0,996	90,771
8	<i>FAPA</i> (NM_004460.4)	Не определялся / Not defined	
9	<i>ACTA2</i> (NM_001613.3)	0,985	105,302
10	<i>SMTN</i> (NM_006932.4)	0,984	77,365
11	<i>VIM</i> (NM_003380.4)	0,99	100,471
12	<i>MMP2</i> (NM_004530.5)	0,993	86,453
13	<i>SNAI1</i> (NM_005985.3)	0,983	98,667
14	<i>SNAI2</i> (NM_003068.4)	0,986	71,914
15	<i>TWIST1</i> (NM_000474.3)	0,996	72,988
16	<i>ZEB1</i> (NM_030751.5)	0,992	109,365
17	<i>SCARF1</i> (NM_003693.3)	0,982	103,976
18	<i>CD36</i> (NM_000072.3)	1	76,687
19	<i>LDLR</i> (NM_000527.4)	0,992	92,278
20	<i>VLDLR</i> (NM_003383.4)	0,992	96,219
21	<i>VCAMI</i> (NM_001078.3)	0,969	68,283
22	<i>ICAMI</i> (NM_000201.2)	0,994	94,976
23	<i>SELE</i> (NM_000450.2)	0,982	104,156
24	<i>SELP</i> (NM_003005.3)	0,992	80,727
25	<i>CDH5</i> (NM_001795.4)	0,984	104,342
26	<i>IL1R1</i> (NM_000877.3)	0,998	101,936
27	<i>IL1R2</i> (NM_004633.3)	Не определялся / Not defined	
28	<i>TNFRSF1A</i> (NM_001065.3)	0,99	106,732
29	<i>TNFRSF1B</i> (NM_001066.2)	0,984	106,798
30	<i>NOS3</i> (NM_000603.4)	0,985	85,156
31	<i>PXDN</i> (NM_012293.2)	0,988	94,574

Примечание: мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.
Note: mRNA – messenger ribonucleic acid.

Также, по данным мировой литературы, оптимальный диапазон размера ампликона колеблется от 100 до 200 нуклеотидов [10, 14]. В данном эксперименте длина одного из ампликонов составила 422 нуклеотида (по причине невозможности конструирования специфического праймера для ампликона меньшей длины), однако показатели R^2 и E были удовлетворительными и составили 0,984 и 85,1 соответственно.

При конструировании праймеров стоит уделять должное внимание их проверке с помощью стандартных программ, таких как Beacon

Designer, PCR Primer Stats и Multiple Sequence Analyzer. Данные программы позволяют оценить качество праймеров, в частности вероятность образования шпилек и димеров; определить оптимальную температуру плавления; проверить длину праймеров и ампликона, отсутствие отклонения от рекомендуемого процентного содержания GC. В некоторых случаях при дизайне праймеров отсутствие димеров и шпилек имеет более важное значение в сравнении с такими параметрами, как содержание GC и рекомендуемая длина праймера или ампликона.

Таблица 3. Результаты, полученные во время кПЦР-анализа второго массива данных (экспозиция первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека бионами в течение 24 ч)

Table 3. Results of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the second sample (exposure of primary human coronary artery endothelial cells to bions for 24 hours)

№	Ген и идентификационный номер последовательности мРНК по базе данных RefSeq / Gene and RefSeq mRNA sequence number	Коэффициент детерминации (R^2) / Coefficient of determination (R^2)	Эффективность / Efficiency
1	<i>IL1B</i> (NM_000576.2)	0,997	107,422
2	<i>IL6</i> (NM_000600.4)	0,992	97,406
3	<i>CXCL8</i> (NM_000584.3)	0,931	72,297
4	<i>IL23A</i> (NM_016584.2)	0,989	89,617
5	<i>PECAMI</i> (NM_000442.4)	0,987	85,56
6	<i>VWF</i> (NM_000552.4)	0,996	107,88
7	<i>KDR</i> (NM_002253.3)	0,98	90,308
8	<i>FAPA</i> (NM_004460.4)	0,978	107,368
9	<i>ACTA2</i> (NM_001613.3)	0,988	107,327
10	<i>SMTN</i> (NM_006932.4)	0,999	96,724
11	<i>VIM</i> (NM_003380.4)	0,989	88,249
12	<i>MMP2</i> (NM_004530.5)	0,986	84,465
13	<i>SNAI1</i> (NM_005985.3)	0,993	84,599
14	<i>SNAI2</i> (NM_003068.4)	0,983	87,981
15	<i>TWIST1</i> (NM_000474.3)	0,996	68,188
16	<i>ZEB1</i> (NM_030751.5)	0,933	85,857
17	<i>SCARF1</i> (NM_003693.3)	0,997	97,848
18	<i>CD36</i> (NM_000072.3)	0,992	88,779
19	<i>LDLR</i> (NM_000527.4)	0,991	97,402
20	<i>VLDLR</i> (NM_003383.4)	0,99	69,926
21	<i>VCAMI</i> (NM_001078.3)	0,967	76,482
22	<i>ICAMI</i> (NM_000201.2)	0,993	107,375
23	<i>SELE</i> (NM_000450.2)	0,99	95,994
24	<i>SELP</i> (NM_003005.3)	0,989	94,008
25	<i>CDH5</i> (NM_001795.4)	0,996	91,622
26	<i>IL1R1</i> (NM_000877.3)	0,988	98,004
27	<i>IL1R2</i> (NM_004633.3)	0,988	79,115
28	<i>TNFRSF1A</i> (NM_001065.3)	0,995	87,9
29	<i>TNFRSF1B</i> (NM_001066.2)	0,97	96,901
30	<i>NOS3</i> (NM_000603.4)	0,992	90,406
31	<i>PXDN</i> (NM_012293.2)	0,987	91,478

Примечание: мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота.
Note: mRNA – messenger ribonucleic acid.

Заключение

При соблюдении основных правил разработки праймеров их параметры не влияют на эффективность и коэффициент детерминации кПЦР.

Конфликт интересов

Л.А. Богданов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Богданов Лев Александрович, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Шишкова Дарья Кирилловна, младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Синицкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

БЛА – вклад в дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШДК – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СМЮ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в дизайн исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Author Information Form

Bogdanov Leo A., junior researcher at the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-4124-2316

Shishkova Daria K., junior researcher at the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Sinitsky Maxim Yu., PhD, senior researcher at the Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Author Contribution Statement

BLA – contribution to the design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

ShDK – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SMYu – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*. 2013;35(10): 1541–1549. doi:10.1007/s10529-013-1249-8

2. SantaLucia J. Jr. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol Biol*. 2007;

402:3-34. doi: 10.1007/978-1-59745-528-2_1

3. Valones M.A., Guimarães R.L., Brandão L.A., de Souza P.R., de Albuquerque Tavares Carvalho A., Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Braz J Microbiol*. 2009; 40:1–11

4. Ando W., Kikuchi K., Uematsu T., Yokomori H., Takaki T., Sogabe M., Kohgo Y., Otori K., Ishikawa S., Okazaki I. Novel breast cancer screening: combined expression of miR-21 and MMP-1 in urinary exosomes detects 95% of breast cancer without metastasis. *Sci Rep.* 2019; 9(1):13595. doi: 10.1038/s41598-019-50084-5
5. Fretzayas A., Moustaki M., Liapi O., Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr.* 2012; 171(1):11-5. doi: 10.1007/s00431-011-1641-0
6. Liu Y., Guo Y., Jin X., Mei S., Xie T., Lan Q., Fang Y., Zhu B. Developmental validation study of a 24-plex Y-STR direct amplification system for forensic application. *Int J Legal Med.* 2019. doi: 10.1007/s00414-019-02220-z
7. Meienberg J., Bruggmann R., Oexle K., Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet.* 2016; 135(3):359-62. doi: 10.1007/s00439-015-1631-9.
8. Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:37. doi: 10.1186/1472-6750-6-37.
9. Bustin S., Huggett, J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification, Biomol Detect Quantif.* 2017; 14: 19–28. doi:10.1016/j.bdq.2017.11.001
10. Li K., Brownley A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 2010; 630:271-99. doi: 10.1007/978-1-60761-629-0_18
11. Robertson J.M., Walsh-Weller J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods*

- Mol. Biol.* 1998; 98:121–154. doi: 10.1385/0-89603-443-7: 121
12. Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2017; 6 (1): 92-101.
13. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J.J., Andrade M.J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.* 2015; 1275:31-56. doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3
14. Thornton B., Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ.* 2011;39(2):145-54. doi: 10.1002/bmb.20461
15. Picard-Meyer E., de Garam C., Peytavin, Schereffer J.L., Marchal C., Robardet E., Cliquet F. Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1. *BioMed Res. Int.* 2015; 2015:839518. doi: 10.1155/2015/839518
16. Alemayehu S., Feghali K.C., Cowden J., Komisar J., Ockenhouse C.F., Kamau E. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar. J.* 2013; 12:277. doi: 10.1186/1475-2875-12-277
17. Buzard G.S., Baker D., Wolcott M.J., Norwood D.A., Dauphin L.A. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness. *Forensic Sci. Int.* 2012; 223:292–297. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.10.003
18. D'haene B, Hellemans J. The importance of quality control during qPCR data analysis. *Int Drug Disc.* 2010; 18–24.

REFERENCES

1. Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters.* 2013;35(10): 1541–1549. doi:10.1007/s10529-013-1249-8
2. SantaLucia J. Jr. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol Biol.* 2007; 402:3-34. doi: 10.1007/978-1-59745-528-2_1
3. Valones M.A., Guimarães R.L., Brandão L.A., de Souza P.R., de Albuquerque Tavares Carvalho A., Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Braz J Microbiol.* 2009; 40:1–11
4. Ando W., Kikuchi K., Uematsu T., Yokomori H., Takaki T., Sogabe M., Kohgo Y., Otori K., Ishikawa S., Okazaki I. Novel breast cancer screening: combined expression of miR-21 and MMP-1 in urinary exosomes detects 95% of breast cancer without metastasis. *Sci Rep.* 2019; 9(1):13595. doi: 10.1038/s41598-019-50084-5
5. Fretzayas A., Moustaki M., Liapi O., Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr.* 2012; 171(1):11-5. doi: 10.1007/s00431-011-1641-0
6. Liu Y., Guo Y., Jin X., Mei S., Xie T., Lan Q., Fang Y., Zhu B. Developmental validation study of a 24-plex Y-STR direct amplification system for forensic application. *Int J Legal Med.* 2019. doi: 10.1007/s00414-019-02220-z
7. Meienberg J., Bruggmann R., Oexle K., Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet.* 2016;135(3):359-62. doi: 10.1007/s00439-015-1631-9.
8. Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J., Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:37. doi: 10.1186/1472-6750-6-37.
9. Bustin S., Huggett, J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification, Biomol Detect Quantif.* 2017; 14: 19–28. doi:10.1016/j.bdq.2017.11.001

10. Li K., Brownley A. Primer design for RT-PCR. *Methods Mol Biol.* 2010; 630:271-99. doi: 10.1007/978-1-60761-629-0_18
11. Robertson J.M., Walsh-Weller J. An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods Mol. Biol.* 1998; 98:121–154. doi: 10.1385/0-89603-443-7: 121
12. Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V. The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2017; 6 (1): 92-101. (In Russian)
13. Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J.J., Andrade M.J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods Mol Biol.* 2015; 1275:31-56. doi: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3
14. Thornton B., Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ.* 2011;39(2):145-54. doi: 10.1002/bmb.20461
15. Picard-Meyer E., de Garam C., Peytavin, Schereffer J.L., Marchal C., Robardet E., Cliquet F. Cross-platform evaluation of commercial real-time SYBR green RT-PCR kits for sensitive and rapid detection of European bat Lyssavirus type 1. *BioMed Res. Int.* 2015; 2015:839518. doi: 10.1155/2015/839518
16. Alemayehu S., Feghali K.C., Cowden J., Komisar J., Ockenhouse C.F., Kamau E. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar. J.* 2013; 12:277. doi: 10.1186/1475-2875-12-277
17. Buzard G.S., Baker D., Wolcott M.J., Norwood D.A., Dauphin L.A. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness. *Forensic Sci. Int.* 2012; 223:292–297. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.10.003
18. D'haene B, Hellemans J. The importance of quality control during qPCR data analysis. *Int Drug Disc.* 2010; 18–24.

Для цитирования: Л.А. Богданов, Д.К. Шишкова, М.Ю. Синицкий, А.Г. Кутихин. Параметры праймеров, коррелирующие с коэффициентом детерминации и эффективностью количественной полимеразной цепной реакции. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2020; 9 (3): 13-20. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-3-13-20

To cite: L.A. Bogdanov, D.K. Shishkova, M.Yu. Siniitsky, A.G. Kutihin. Primer parameters defining efficiency and coefficient of determination in quantitative polymerase chain reaction. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020; 9 (3): 13-20. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-3-13-20