

УДК 621.57

© А. В. Чернышев, О. В. Белова

РАЗРАБОТКА ОБОБЩЕННОЙ СТРУКТУРНОЙ СХЕМЫ И КОНЦЕПТУАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАСЧЕТА АМПЛИФИКАТОРОВ ДНК

В статье представлены основные положения построения обобщенной структурной схемы амплификаторов ДНК, их классификация и концептуальная модель расчета. Обобщенная структурная схема является результатом проведенного обзора существующих конструктивных схем устройств данного типа и основой для разработки классификации амплификаторов ДНК. Представленная классификация позволяет синтезировать новые типы структурных схем устройств в зависимости от предъявляемых в каждом конкретном случае требований к амплификатору ДНК. Концептуальная модель необходима для создания частных математических моделей расчета конкретных типов амплификаторов ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

В 1983 г. Кэрри Б. Мюллисом был открыт процесс ПЦР (Polymerase Chain Reaction, PCR). ПЦР — это циклически повторяющаяся термическая обработка ДНК (денатурация, гибридизация праймеров и ферментативная достройка), в результате которой происходит квазиэкспоненциальное накопление копий определенного фрагмента исходной двухцепочечной ДНК [1]. Реализация температурного протокола для термической обработки ДНК осуществляется на программируемых устройствах нагрева/охлаждения, называемых амплификаторами ДНК. Амплификатор ДНК состоит из теплового блока и микропроцессорной системы управления. В России первые образцы амплификаторов были созданы еще в конце восьмидесятых годов прошлого века. В связи с постоянным совершенствованием технологии и методов ПЦР существует необходимость создания новых и более эффективных амплификаторов ДНК [2].

КЛАССИФИКАЦИЯ АМПЛИФИКАТОРОВ ДНК

На основе накопленного опыта по созданию, разработке и производству амплификаторов ДНК выявлены классификационные признаки основных элементов конструктивных схем тепловых блоков. Объект нагрева/охлаждения, которым в данном случае является реакционная смесь, находится в тепловом взаимодействии с носителем. Под термином "носитель" понимается тип лабораторных емкостей, в которых непосредственно помещается реакционная смесь и проводится ПЦР. В свою очередь носитель находится в тепловом взаимодействии с рабочим телом и внешней средой.

К рабочему телу (среде, в которой размещаются носители) тепло подводится от преобразователя энергии. В случае выделения тепла в рабочем теле, что возможно при его размещении в непосредственном контакте с преобразователями энергии, тепло подводится от (отводится к) преобразователя энергии внутри системы. В ряде вариантов исполнения подобных устройств преобразователь энергии для охлаждения находится в тепловом взаимодействии с теплообменным устройством. От теплообменного устройства тепло отводится во внешнюю среду потоком теплоносителя. Расход теплоносителя обеспечивается внешним побудителем расхода.

Таким образом, элементами теплового блока амплификатора ДНК являются:

- носитель;
- рабочее тело;
- преобразователь энергии;
- теплообменное устройство;
- теплоноситель;
- побудитель расхода.

Применяемые носители

Самый распространенный тип носителей для ПЦР — пластиковые микропробирки различной емкости (рис. 1, а); планшеты, представляющие собой тонкостенную пластиковую пластину, отформованную в виде соединенных микропробирок (рис. 1, б), и капилляры — тонкостенные стеклянные или пластиковые трубки (рис. 1, в). В отдельных случаях применяются плоские носители, например предметные стекла (*in situ*) и биочипы™. Особой чертой капилляров является то, что в них наиболее эффективное соотношение поверхности теплообмена и объема реакционной смеси.

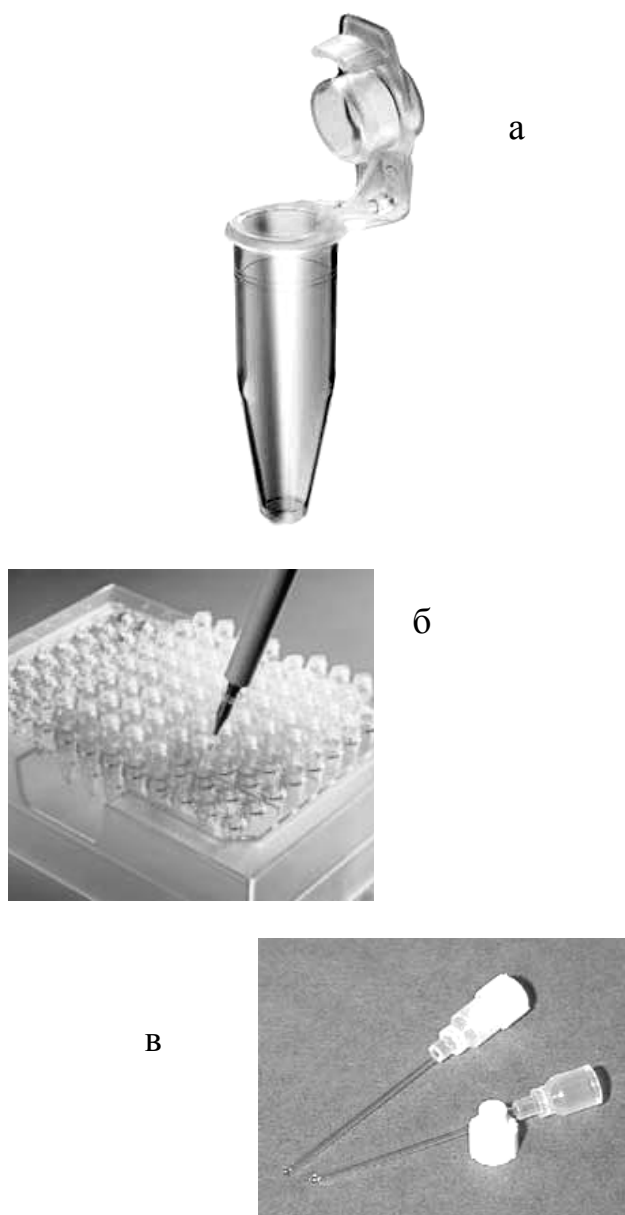


Рис. 1. Применяемые "носители": а — индивидуальная пробирка для ПЦР; б — ПЦР-планшет; в — ПЦР-капилляр

Рабочее тело

Первоначально разработчики амплификатов ДНК шли по пути создания конструкций, в которых тепло к пробиркам подводилось от жидкости (воды). В конструкциях данного типа (рис. 2) достигался наилучший тепловой контакт между рабочим телом и носителем. Однако недостатки, присущие данной схеме (проблемы с испарением воды, образованием накипи, обеспечением герметичности), не позволили широко ее использовать.

Воздух в качестве рабочей среды применялся в связи с достаточной простотой конструктивной схемы устройств. Но широкое распространение устройств, выполненных по данной схеме, было ограничено низкой точностью поддержания температуры и сложностью с обеспечением однородности теплового поля (рис. 3). В последнее время вернулись к использованию воздуха в качестве рабочей тела, т. к. появилась необходимость создания амплификаторов ДНК со скоростями нагрева и охлаждения реакционной смеси, близкими к 8 К/с, и, кроме того, появились методики проведения ПЦР, обеспечивающие достаточно устойчивые результаты при неоднородности температурного поля в пределах ± 0.5 К. Анализ данной конструктивной схемы амплификаторов ДНК показал возможность их широкого применения, особенно при проведении исследований при хорошо отработанных методиках и диагностических наборах. Подобные устройства могут быть созданы и в мобильном исполнении для работы в полевых условиях. Использование же их при проведении научных и диагностических исследований, требующих высокой точности (± 0.15 К) поддержания температуры реакционной смеси, ограничено.

Наибольшее распространение получили схемы амплификаторов ДНК, в которых в качестве рабочего тела используется твердое тело. Амплификаторы ДНК данного типа эффективнее других совмещаются с электронными системами управления, обеспечивающими требуемые законы управления. Основной проблемой является обеспечение теплового контакта между микропробирками или планшетами и ячейками детали, в которых они установлены (рис. 4). С этой целью разработаны специальные конструкции тонкостенных микропробирок. Тепловой контакт обеспечивается плотным прилеганием внешней поверхности микропробирки, имеющей довольно сложный профиль, к внутренней поверхности ячейки.

Способ подвода/отвода тепла

Используются три основных варианта подвода/отвода энергии от преобразователя энергии к рабочему телу:

- подвод/отвод тепла к рабочему телу / от рабочего тела;
- замещение рабочего тела;
- комбинированная схема.

В первом случае преобразование энергии в тепло происходит непосредственно в рабочем теле, находящемся в тепловом контакте с носителем.

Во втором варианте в состав амплификатора ДНК входят устройства, в которых заранее происходит нагрев рабочего тела до заданных температур. Для обеспечения требуемого температурного протокола в этом случае необходимо либо пере-

местить микропробирки с реакционной смесью из одного блока в другой, в котором поддерживается другая температура (твердотельная схема), либо произвести замещение рабочего тела с одной температурой на новую порцию с другой температу-

рой (жидкостная или пневматическая схемы, рис. 2). В устройствах с комбинированной схемой нагрев рабочего тела обеспечивается подводом тепла, а охлаждение — отводом за счет замещения рабочего тела (жидкость или воздух).

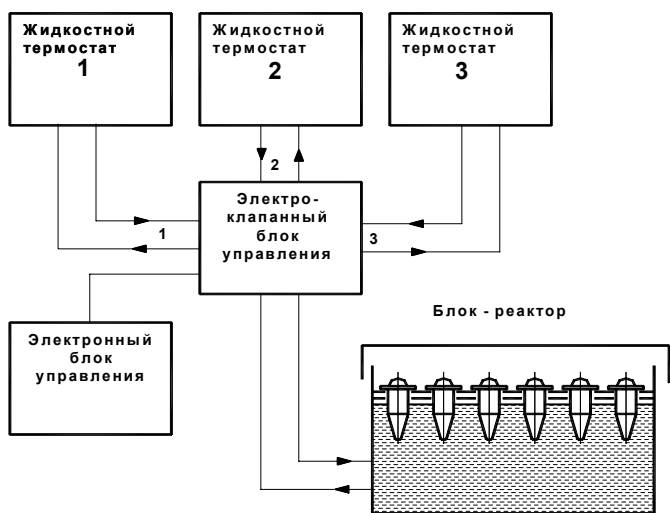


Рис. 2. Принципиальная схема жидкостного амплификатора ДНК

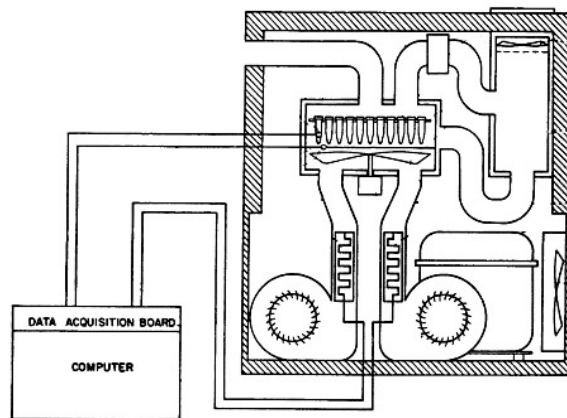


Рис. 3. Принципиальная схема пневматического амплификатора ДНК (воспроизведено из патента USA 5123477, 02.05.89)

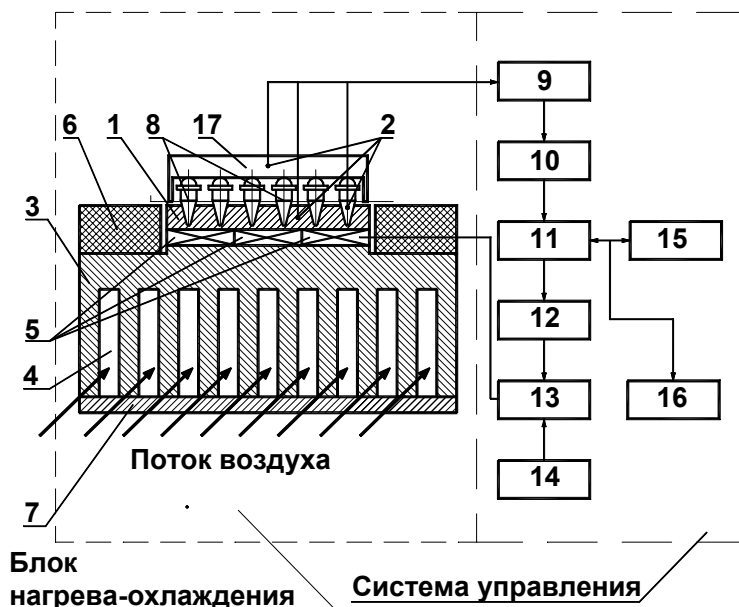


Рис. 4. Принципиальная схема теплового блока твердотельного амплификатора ДНК на основе термоэлектрических преобразователей энергии.

1 — пластина-держатель (рабочее тело); 2 — датчики температуры; 3 — радиатор (теплообменное устройство); 4 — воздушные каналы; 5 — термоэлектрические модули (преобразователи энергии); 6 — теплоизоляция; 7 — ограничитель потока воздуха; 8 — микропробирки (носители); 9 — предварительный усилитель; 10 — АЦП; 11 — микропроцессорное устройство; 12 — ЦАП; 13 — усилитель тока; 14 — источник тока; 15 — устройство ввода-вывода информации; 16 — внешняя ЭВМ; 17 — нагреваемая крышка

Способ преобразования энергии

Используются три основных способа преобразования энергии в тепло, необходимое для нагрева рабочего тела: нагрев за счет эффекта Джоуля, нагрев за счет термоэлектрических эффектов и нагрев излучением.

Преобразование электрической энергии в тепло за счет эффекта Джоуля — простой и широко распространенный способ. Устройства, в которых реализуется данный способ, отличаются простой конструкции, достаточно низкой стоимостью и простотой эксплуатации.

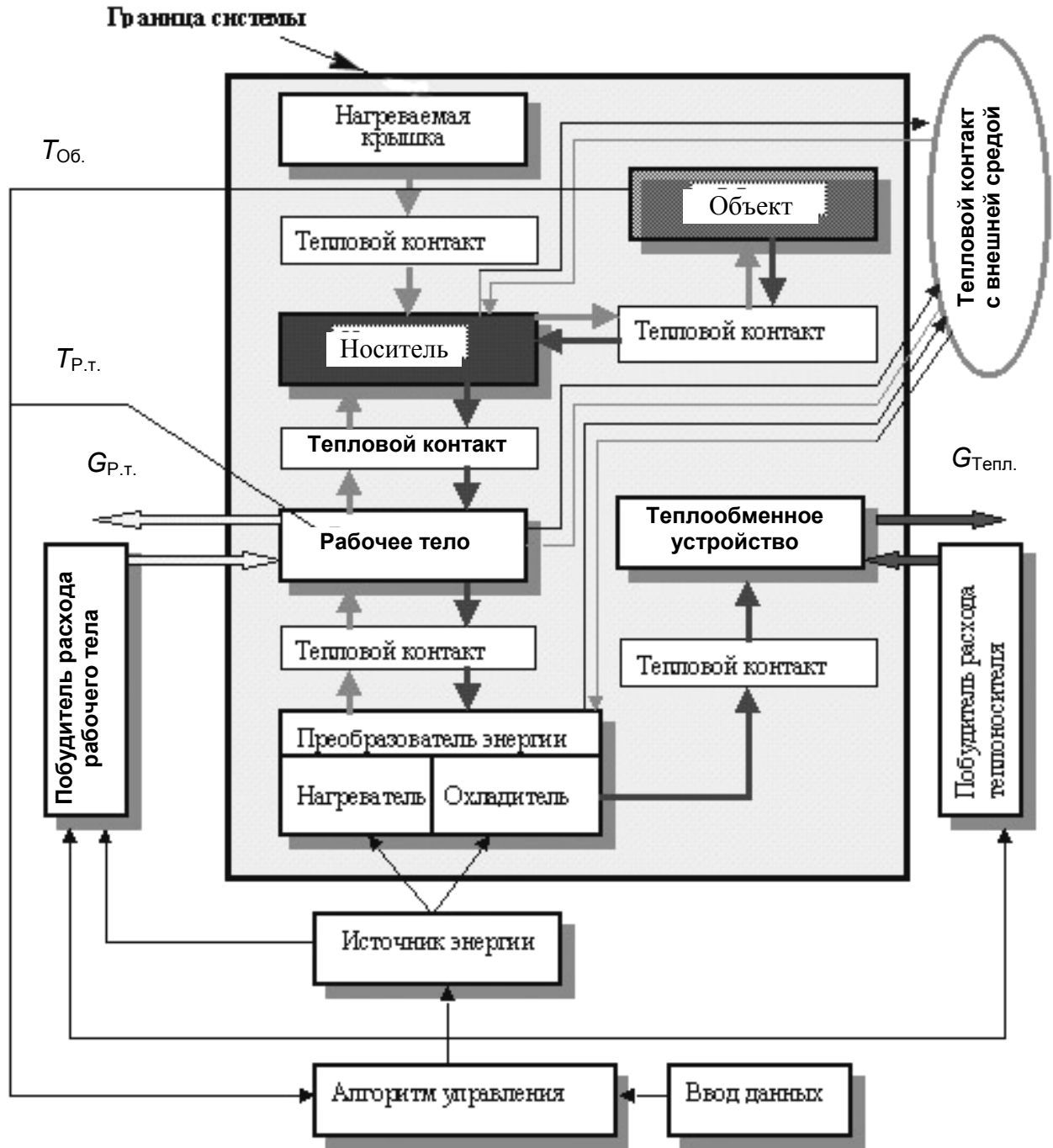


Рис. 5. Обобщенная структурная схема амплификаторов ДНК

Для охлаждения образцов реакционной смеси в таких конструкциях должны применяться дополнительные устройства. Для этих целей применяются машинные способы получения холода или отвод тепла потоком воздуха или жидкости. В случае использования машинного способа получения холода возможна не только реализация универсального температурного протокола ПЦР, но и последующее охлаждение образцов до температуры 273...277 К. При отводе тепла потоком воздуха или жидкости с температурой окружающей среды нижняя температура ограничена.

Широкое распространение в амплификаторах ДНК получил способ преобразования электрической энергии, основанный на термоэлектрических эффектах. Данные устройства обладают такими преимуществами, как простота конструкции, низкая стоимость, отсутствие подвижных частей, хорошая совместимость с электронными системами управления и, самое главное, возможность использования преобразователя энергии как для нагрева, так и для охлаждения рабочей среды, поскольку направление передачи тепла в данном виде преобразователей зависит от полярности включения источника тока.

Способ нагрева рабочего тела тепловым излучением в настоящее время широкого применения не нашел.

Результаты проведенного обзора и анализа конструктивных схем позволили разработать общую классификацию амплификаторов ДНК, а выявленные классификационные признаки могут быть использованы при синтезе новых конструктивных решений тепловых блоков, основанных на различных физических принципах действия.

ПОСТРОЕНИЕ ОБОБЩЕННОЙ СТРУКТУРНОЙ СХЕМЫ И КОНЦЕПТУАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Список обозначений

c — теплоемкость среды, Вт/(кг·К);
 \mathbf{F}_g — вектор силы тяжести, Н;
 \mathbf{n} — вектор нормали к поверхности границы;
 p — давление, Па;
 S_{k-l}, S_{l-k} — взаимодействующие поверхности компонентов расчетной области;
 S_T — мощность объемных источников, Вт/м³;
 t — время, с;
 T — температура, К;
 T_f — температура жидкости, К;
 \mathbf{u} — вектор скорости, м/с;
 α_f — коэффициент теплоотдачи, Вт/(м²·К);

$$[\lambda] = \begin{bmatrix} \lambda_{xx} & \lambda_{xy} & \lambda_{xz} \\ \lambda_{yx} & \lambda_{yy} & \lambda_{yz} \\ \lambda_{zx} & \lambda_{zy} & \lambda_{zz} \end{bmatrix} \text{ — коэффициент тепло-}$$

проводности, Вт/(м·К);

μ — динамическая вязкость, Па·с;

ρ — плотность, кг/м³.

Анализ выявленных квалификационных признаков и условное графическое представление изложенного выше материала позволяют предложить обобщенную структурную схему амплификаторов ДНК, охватывающую практически все возможные варианты выполнения рассматриваемого типа оборудования (рис. 5). Обобщенная структурная схема является основой для разработки концептуальной модели расчета амплификатора ДНК, которая позволяет упростить процесс разработки частной математической модели для численного исследования конкретного типа амплификатора ДНК.

Построение концептуальной модели расчета амплификаторов ДНК основано на системе нестационарных уравнений в дифференциальной постановке, описывающих тепловое состояние теплового блока амплификатора ДНК, а также граничных, начальных и конечных условий [3, 4].

Система уравнений концептуальной модели, на основе которой могут быть сформированы частные математические модели различных вариантов амплификаторов ДНК, представлена в табл. 1. Тепловое взаимодействие между элементами концептуальной модели в каждом конкретном случае описывается вариантами граничных условий, представленных в табл. 2.

Для замыкания системы уравнений математической модели необходимо определить начальные условия в момент времени $t = 0$ для всех компонентов обобщенной структурной схемы:

$$T = T(t, x, y, z), \quad p = p(t, x, y, z), \\ \rho = \rho(t, x, y, z), \quad \mathbf{u} = \mathbf{u}(t, x, y, z).$$

Конечные условия расчета могут быть заданы различными вариантами:

- значение температуры какой-либо точки (области) достигло заданного значения $T_{кон} = T_{зад}$;
- время расчета равно заданному $t_{кон} = t_{зад}$;
- значение какой-либо другой характеристики достигло заданного значения $X_{кон} = X_{зад}$.

С использованием обобщенной структурной схемы и концептуальной модели были разработаны математические модели пневматического, гидравлического и твердотельных амплификаторов ДНК, а на их основе разработаны методики расчета и численного исследования амплификаторов ДНК.

Результаты проведенных исследований легли в основу создания семейства современных амплификаторов ДНК, различающихся по типам рабочих

тел, производительности и предназначенных для применения в качестве носителей — микропроби- рок, планшетов и биочипов™ [5, 6].

Табл. 1. Концептуальная модель расчета

Компонент расчетной области	Уравнение энергии	Уравнение движения	Уравнение неразрывности
ПЦР-объект (реакционная смесь)	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[(\rho c) \cdot \mathbf{u} \cdot T - [\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = S_r$	$\rho \frac{d\mathbf{u}}{dt} = \rho \mathbf{F}_g - \text{grad } p + \mu \text{div}(\text{grad } \mathbf{u})$	$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \mathbf{u}) = 0$
Носитель	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[-[\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = 0$	—	—
Рабочее тело (твердое тело)	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[-[\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = 0$	—	—
Рабочее тело (газ, жидкость)	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[(\rho c) \cdot \mathbf{u} \cdot T - [\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = 0$	$\rho \frac{d\mathbf{u}}{dt} = \rho \mathbf{F}_g - \text{grad } p + \mu \text{div}(\text{grad } \mathbf{u})$	$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \mathbf{u}) = 0$
Преобразователь энергии	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[-[\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = S_r$	—	—
Теплообменное устройство	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[-[\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = 0$	—	—
Теплоноситель	$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \text{div}[(\rho c) \cdot \mathbf{u} \cdot T - [\lambda] \cdot \text{grad}(T)] = 0$	$\rho \frac{d\mathbf{u}}{dt} = \rho \mathbf{F}_g - \text{grad } p + \mu \text{div}(\text{grad } \mathbf{u})$	$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho \mathbf{u}) = 0$

Табл. 2. Граничные условия

Взаимодействующие компоненты расчетной области		Для уравнений неразрывности и движения	Для уравнения энергии
Компонент <i>l</i>	Компонент <i>k</i>		
1	2	3	4
ПЦР-объект (реакционная смесь)	Носитель	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda]_l \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
Носитель	Рабочее тело (твердое тело)	—	$(-[\lambda]_l \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Рабочее тело (газ, жидкость)	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Внешняя среда	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad } T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$

Табл. 2 (продолжение)

1	2	3	4
Рабочее тело (твердое тело)	Носитель	—	$(-[\lambda]_l \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Преобразователь энергии	—	$(-[\lambda]_l \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Внешняя среда	—	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
Рабочее тело (газ, жидкость)	Носитель	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Преобразователь энергии	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Внешняя среда	—	—
Преобразователь энергии	Теплообменное устройство	—	$(-[\lambda]_l \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Внешняя среда	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
Теплообменное устройство	Преобразователь энергии	—	$(-[\lambda]_l \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = (-[\lambda]_k \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Теплоноситель	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
	Внешняя среда	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$
Теплоноситель	Теплообменное устройство	$\mathbf{u} = 0$	$(-[\lambda] \text{grad} T, \mathbf{n}) _{S_{l-k}} = \alpha_f (T - T_f) _{S_{k-l}}, k \neq l$

ВЫВОДЫ

Многообразие квалификационных признаков и соответственно вариантов исполнения свидетельствует не столько о разнообразии в процессах реализации полимеразной цепной реакции, а в основном об отсутствии общей методологии создания подобных устройств. Поэтому одной из целей являются обобщение накопленного в этой области опыта и разработка общей концепции создания амплификаторов ДНК. Созданные обобщенная структурная схема и концептуальная модель расчета амплификаторов ДНК являются основой для создания такой методологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вартапетян А.Б. Полимеразная цепная реакция // Молекулярная биология. 1991. Т. 25, вып. 4. С. 926—936.
2. Чернышев А.В., Друца В.Л. Проблемы создания оборудования для медицинской ПЦР-

диагностики // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. № 12. С. 18.

3. Чернышев А.В. Основы теории расчета электропневмомеханического оборудования для анализа ДНК // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 1. С. 53—65.
4. Чернышев А.В., Белова О.В. Метод решения сопряженной задачи конвективного теплообмена на примере термостатирующего устройства // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана: Серия Машиностроение. 1998. № 4. С. 77—87.
5. Чернышев А.В. и др. Разработка математической модели пневматической системы термостабилизации // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 1. С. 94—106.
6. Чернышев А.В., Полюнков А.В. Программируемый термостат. Патент РФ № 43871, 24.08.2004 // Бюл. 10.02.2005. № 4. 2 с.

МГТУ им. Н.Э. Баумана

Материал поступил в редакцию 11.04.2006.

DEVELOPMENT OF A GENERALIZED STRUCTURE AND A CONCEPTUAL DESIGN MODEL OF DNA AMPLIFIERS

A. V. Chernyshev, O. V. Belova

N.E. Bauman Moscow State Technical University

The paper presents general principles of building a generalized structure of DNA amplifiers, their classification and conceptual design model. The generalized structure was obtained based on reviewing the existing designs of this type of devices and was used for classification of DNA amplifiers. The proposed classification allows synthesis of new structural types of the devices depending on the specific requirements placed on the DNA amplifier. The conceptual model is necessary to build particular mathematical models for design of specific DNA amplifier types.