

УДК 547.963.32: 621.3.082.63

© О. А. Леонтьева, А. И. Петров

ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕПЛОВЫХ РЕЖИМОВ РАБОТЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР, НАПРАВЛЕННЫЕ НА УЛУЧШЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИБОРОВ АНК-16/32

Рассмотрены тепловые режимы работы прибора АНК-16/32 (анализатора нуклеиновых кислот). Исследована зависимость напряжения, подаваемого на элемент Пельтье, и скорости проведения ПЦР-РВ. Произведен анализ разности температур планшета и реакционной смеси.

ВВЕДЕНИЕ

В 1983 г. сотрудник фирмы "Cetus" *Kary Mullis* предложил метод, ставший в дальнейшем известным как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод ПЦР стал одним из крупнейших методологических открытий в современной молекулярной биологии. Применяемый при анализе ДНК, он позволяет сегодня решать такие научно-исследовательские и диагностические задачи, как диагностика социально значимых заболеваний, например гепатитов В и С, туберкулеза, СПИД; анализ онкологических и генетических заболеваний; генотипирование (в медицине используется, например, для определения антибиотико-резистентных штаммов); в криминалистике — идентификация личности; в сельском хозяйстве — селекция ценных пород животных и сортов растений; идентификация генных мутаций; мониторинг экспрессии генов при разработке новых лекарственных средств и многие другие.

К разработке оборудования для проведения ПЦР приступили практически одновременно с разработкой самого метода. За два десятилетия в промышленно развитых странах создано много вариантов устройств для реализации ПЦР — амплификаторов ДНК. Наша статья посвящена оптимизации параметров рабочих процессов анализатора нуклеиновых кислот (АНК-16, АНК-32).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Анализаторы нуклеиновых кислот АНК-16 и АНК-32 (рис. 1) — одни из первых отечественных амплификаторов ДНК для количественного анализа в реальном времени. В состав приборов входят блоки тепловой и оптический. Тепловой блок амплификатора обеспечивает экспоненциальное увеличение продукта ПЦР-реакции. Оптический блок



Рис. 1. Внешний вид прибора АНК-32

обеспечивает возбуждение и детекцию сигнала флуоресценции реакционной смеси, находящейся в пробирке. Изменение сигнала флуоресценции позволяет проследить кинетику ПЦР, рассчитать исходное количество ДНК и сравнить образцы между собой.

Четырехцветное измерение сигнала флуоресценции дает возможность наблюдать четыре независимых реакции в одном образце одновременно.

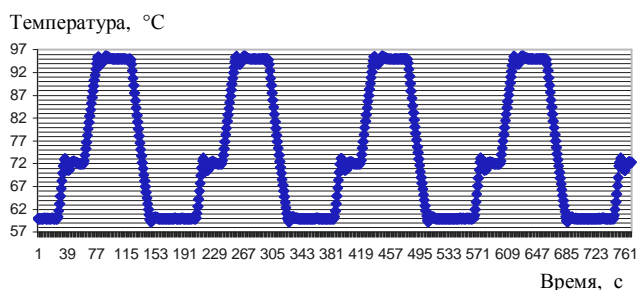


Рис. 2. Классическая циклограмма

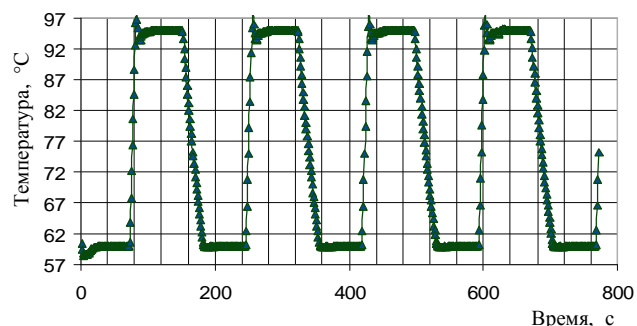


Рис. 3. Циклический двухэтапный режим работы

Количество ячеек для образцов — 16/32 (0.2 мл). Типовая скорость нагрева—охлаждения 1.2–1.5 °C/с. Классическая циклограмма показана на рис. 2. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов.

1) *Денатурация*. На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92–95 °C, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

2) *Отжиг*. На втором этапе праймеры (искусственно синтезированные олигонуклеотиды) комплементарно присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название "отжиг" (по англ. "annealing"). Отжиг проходит при температуре 50–60 °C. Подбор праймеров осуществляется таким образом, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были комплементарны противоположным цепям ДНК. Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина — цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит. После отжига праймеров Taq-полимеразы (термостабильный фермент) начинает комплементарное достраивание второй цепи ДНК.

3) *Элонгация* (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы (72–75 °C), во время чего осуществляется ферментативное удлинение праймеров и построение таким образом новых комплементарных цепей ДНК.

Часто, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию (рис. 3). Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, накапливаются в геометрической прогрессии

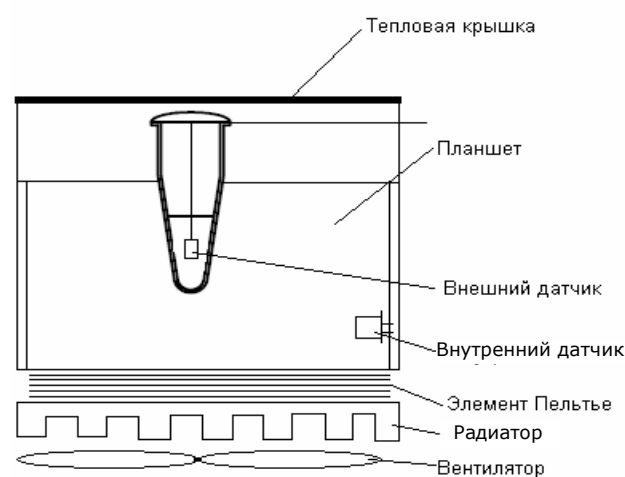


Рис. 4. Схема исследуемой системы

и начинают доминировать среди продуктов амплификации.

На приборе АНК-16 (АНК-32) в среднем время анализа составляет 1 ч 40 мин (40 циклов). На один цикл затрачивается 110 с, а именно: на переходные процессы нагрев—охлаждение и охлаждение—нагрев необходимо в сумме около 40 с, плюс 20 с — время нахождения "на полке" 95 °C и 50 с — время нахождения "на полке" 60 °C. Сокращение времени переходного процесса дает возможность проведения большего количества ПЦР-реакций за период рабочего дня.

Рассмотрим упрощенную модель теплового блока АНК-16 (рис. 4). Расчетная область модели включает:

- планшет для пробирок (рис. 5), выполненный из алюминиевого сплава;
- температурный датчик (внутренний датчик температуры);
- элемент Пельтье;

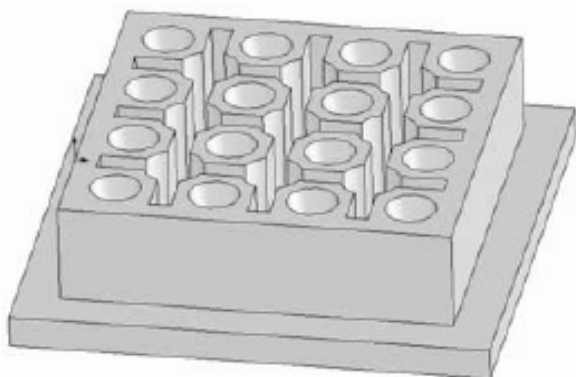


Рис. 5. Планшет для пробирок

- радиатор;
- вентилятор.

Элемент Пельтье является источником тепловой энергии при реализации температурного протокола. Термостатируемый объем ограничен тепловой крышкой, выполненной из алюминиевого сплава. В приборах АНК-16/32 температура тепловой крышки устанавливается 104 / 106 °С соответственно. Параметры работы элемента Пельтье — 16 В, 6 А.

В наших исследованиях использовались два типа датчиков температуры — внешний и внутренний. Внешний датчик температуры размещался в пробирке объемом 0.2 мл (фирма "Axugen", PCR-0.2D-C), в которой находилось 25 мкл вазелинового масла. Внутренний температурный датчик изначально установлен в приборе АНК. Типы датчиков: внутренний — AD590JF; внешний — HEL700-U-1-A фирмы HONEYWELL, 1 кОм, 1.65 × 1.27 мм.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Режим измерений

Анализатор нуклеиновых кислот (АНК-16) работал в циклическом режиме. Время нахождения "на полке" 60–95 °С составляло 60 секунд (рис. 6). Использование двухэтапного ПЦР и выбор температур соответствовал стандартным значениям при проведении полимеразной цепной реакции на наборах ЗАО "Синтол".

Напряжение на элементе Пельтье с помощью внешнего регулируемого блока питания марки "Mastech NY3020" изменяли в интервале от 10 до 31 В при токе до 20 А.

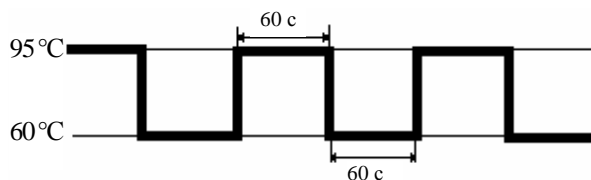


Рис. 6. Циклический режим работы прибора

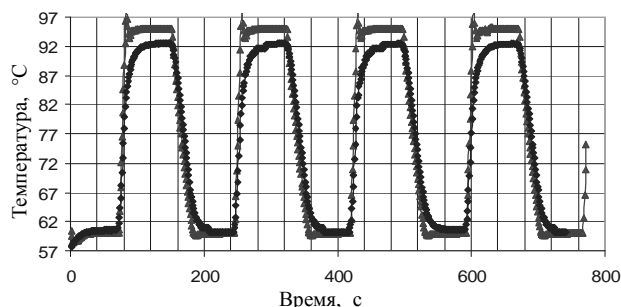


Рис. 7. График зависимости температуры от времени (напряжение 29 В).

- ▲— показания внешнего датчика;
- ◆— показания внутреннего датчика

Данные, полученные датчиками, обрабатывались с помощью персональной ЭВМ. Для каждого датчика была получена зависимость температуры от времени с шагом по времени в одну секунду. После обработки полученных данных получили семейство графиков вида рис. 7. Проанализируем полученные данные.

Анализ результатов

Скорость

По полученным данным рассчитали скорость нагрева (60–95 °С) и охлаждения (95–60 °С) по обоим датчикам, выбрав интервал на линейном участке графика (в переходном процессе); разницу между конечными точками интервала делим на количество точек в нем.

На графике рис. 8 видно, что при увеличении подводимого к системе напряжения линейно ускоряется процесс нагрева. В тоже время иная ситуация с охлаждением: увеличение напряжения не приводит к увеличению скорости охлаждения.

Рассмотрим процесс переноса тепла в нашей системе. Процессы в элементе Пельтье основаны на том, что носители заряда (электроны или дырки), пройдя через спай, попадают в область с меньшей энергией, передают избыток энергии кристаллической решетке, в результате чего вбли-

зи контакта происходит выделение теплоты Пельтье ($Q_{\text{П}} > 0$) и температура контакта повышается. При этом на другом спае носители, переходя в область с большей энергией, заимствуют недостающую энергию от решетки; происходит поглощение теплоты Пельтье ($Q_{\text{П}} < 0$) и понижение температуры. Таким образом, в зависимости от направления тока выделяется или поглощается некоторое количество тепла $Q_{\text{П}}$, пропорциональное прошедшему через контакт заряду (1):

$$Q_{\text{П}} = \Pi \cdot I \cdot t, \quad (1)$$

где Π — коэффициент Пельтье, зависящий от природы материалов элемента; I — сила тока; t — время.

При прохождении тока в цепи происходит выделение джоулева тепла:

$$Q_{\text{Джоуль}} = I^2 \cdot R_{\text{Пельтье}}, \quad (2)$$

где $R_{\text{Пельтье}}$ — омическое сопротивление элемента Пельтье.

Также присутствует и явление Томсона, которое заключается в том, что если вдоль проводника, по которому течет ток, существует перепад температур, то в дополнение к теплоте Джоуля будет выделяться или поглощаться некоторое количество теплоты, пропорциональное прошедшему заряду

$$Q_{\text{T}} = \tau (T_1 - T_0) \cdot I \cdot t. \quad (3)$$

Коэффициент Томсона τ зависит от природы материала.

На радиаторе, обдуваемом вентилятором, происходит рассеяние тепла $Q_{\text{рассеяния}}$, величина которого зависит от площади радиатора и производительности вентилятора. Процессы переноса тепла в нашей системе можно описать уравнениями (4) при нагреве

$$Q = Q_{\text{П}} + Q_{\text{Джоуль}} + Q_{\text{T}} - Q_{\text{рассеяния}} \quad (4)$$

и (5) — при охлаждении

$$Q = Q_{\text{П}} - Q_{\text{Джоуль}} + Q_{\text{T}} + Q_{\text{рассеяния}}. \quad (5)$$

Когда $Q_{\text{Джоуль}}$ становится сравнимо по величине с $Q_{\text{П}}$ и Q_{T} , скорость охлаждения начинает зависеть только от $Q_{\text{рассеяния}}$ и не зависит от работы элемента Пельтье.

Снижение скорости охлаждения происходит из-за того, что при увеличении подводимой мощности увеличивается рост потерь в самом элементе Пельтье, что согласуется с моделью процессов, происходящих в нем.

При нагревании $Q_{\text{рассеяния}}$ практически не зависит от процессов в элементе Пельтье, и мы получаем рост эффективности нагрева с увеличением тока через элемент Пельтье.

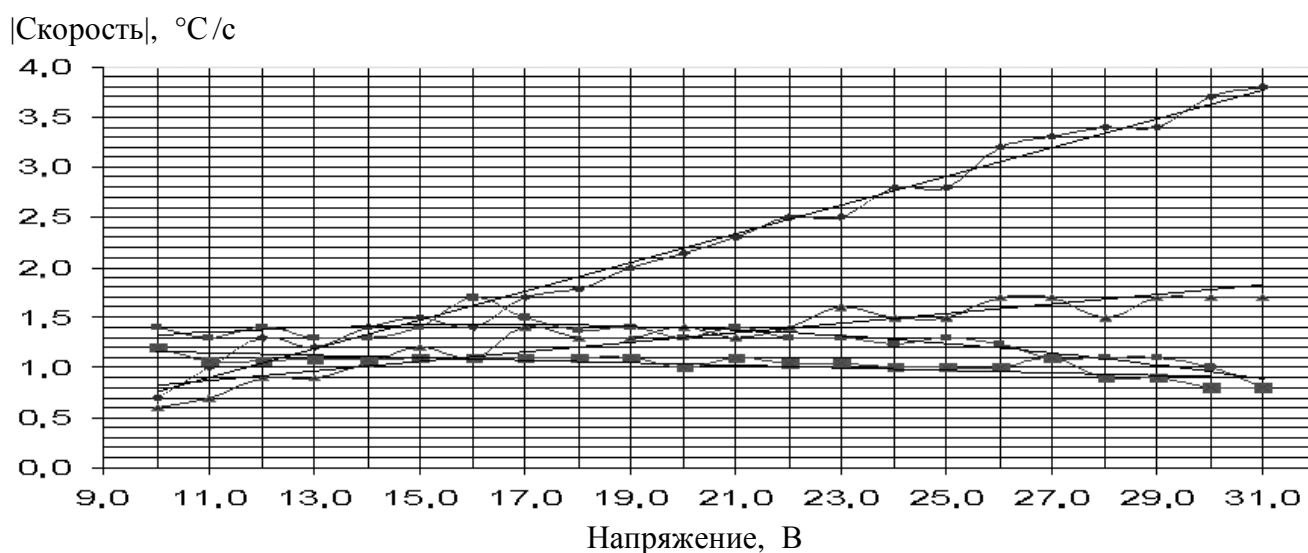


Рис. 8. График зависимости скорости нагрева—охлаждения от напряжения на элементе Пельтье.

- ◆— скорость при нагревании (внутренний датчик),
- ▲— скорость при нагревании (внешний датчик),
- скорость при охлаждении (внутренний датчик),
- скорость при охлаждении (внешний датчик)

Эта информация дает возможность исследования тепловых режимов работы прибора АНК, а также произвести оценку датчиков. В среднем скорость нагревания планшета по внутреннему датчику равна $2.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$ ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$) при $U = 19\text{ В}$, при охлаждении — $1.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$ ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$) при $U = 12\text{ В}$; скорость нагревания реакционной смеси, по внешнему датчику, равна $13\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$ ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$), скорость охлаждения — $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$ ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{c}$).

Время установления

Введем понятие "время установления". Под временем установления $t_{уст}$ будем понимать время (в секундах) достижения заданной температуры планшета и реакционной смеси, что соответствует показаниям датчиков температуры.

Рассчитать время установления можно следующим образом. Выбираем передний фронт циклограммы (рис. 9, а). Момент времени, когда на-

чинаются изменения показаний обоих датчиков, принимаем за нулевое. Когда внутренний датчик достигает отметки $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), фиксируем время t_1 . Аналогично выбираем точку по внешнему датчику, получая время t_2 . Таким образом, время установления — это

$$t_{уст} = t_2 - t_1,$$

где t_1 — время нагревания планшета по внутреннему датчику (с), t_2 — время нагревания реакционной смеси по внешнему датчику (с).

Таким же способом можно рассчитать $t_{уст}$ для $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (рис. 9, б).

Рассчитав $t_{уст}$ при каждом напряжении, рассмотрим графики зависимости времени установления температуры в пробирке в зависимости от изменения напряжения (рис. 10, 11).

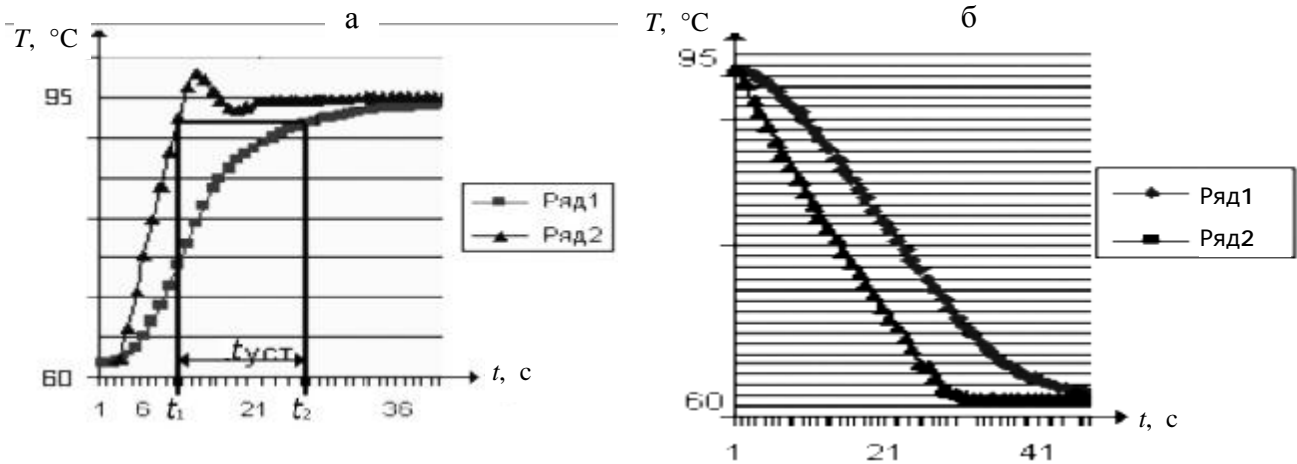


Рис. 9. Графики зависимости температуры от времени. Ряд1 — показания внешнего датчика, ряд2 — показания внутреннего датчика

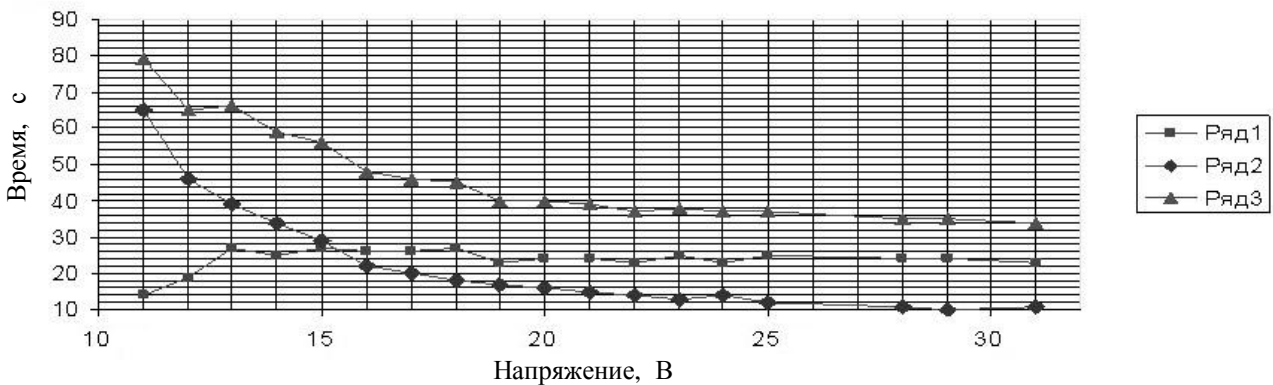


Рис. 10. График зависимости времени установления нагревания от напряжения. Ряд1 — время установления температуры $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) в реакционной смеси в зависимости от напряжения на элементе Пельтье; ряд2 — время нагревания планшета по внутреннему датчику от напряжения; ряд3 — время нагревания реакционной смеси по внешнему датчику от напряжения

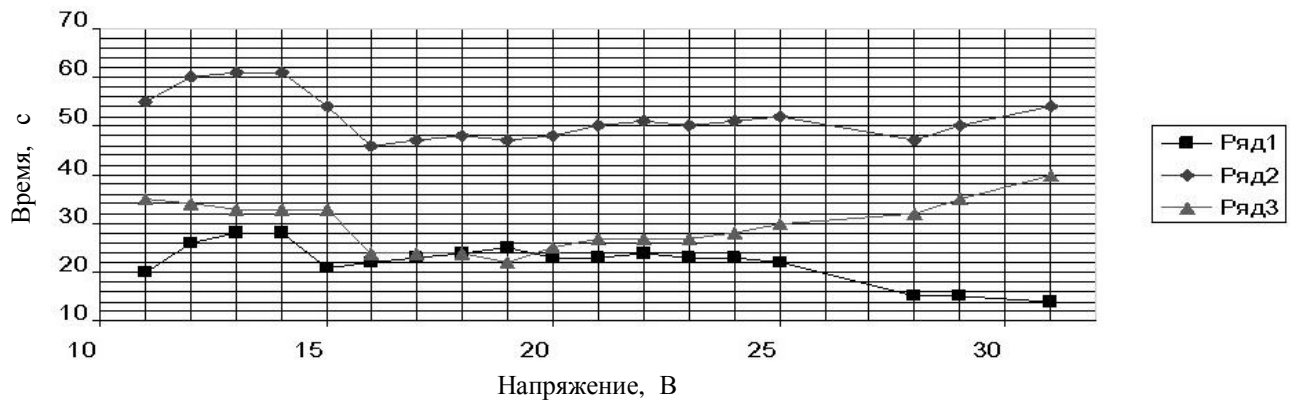


Рис. 11. График зависимости времени установления охлаждения от напряжения.

Ряд1 — время установления температуры $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) в реакционной смеси в зависимости от напряжения на элементе Пельтье; ряд2 — время охлаждения реакционной смеси (по внешнему датчику) от напряжения; ряд3 — время охлаждения планшета (по внутреннему датчику) от напряжения

Из графика рис. 10 видно, что при напряжении на элементе Пельтье 10 В время нагревания исследуемой системы составляет 65–80 с, при напряжении 30 В — время находится в диапазоне 10–40 с. Учитывая $t_{\text{уст}}$, делаем вывод, что увеличение подаваемого напряжения больше 19 В бессмысленно, т. к. увеличение мощности не дает выигрыша во времени.

При охлаждении (рис. 11) наиболее возможным видится уменьшение напряжения на элементе Пельтье до 14 В.

Разность температур

Разность температур в нашей системе — это разность в показаниях внешнего и внутреннего температурных датчиков, находящихся в приборе АНК, в фиксированный момент времени. Мы будем рассматривать два случая:

первый — когда внешний датчик достиг отметки $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$);

второй — когда внутренний датчик достиг отметки $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Первый случай будем экстраполировать, т. к. реального эксперимента система не выдержит. Для этого (рис. 12) температурным уровнем $T_2 \approx 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ выделяем начальный квазилинейный участок кривой ряд1 ($\approx 65\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$). Его проекция на кривую ряд2 дает соответствующий ему начальный участок на кривой ряд2 до соответственной точки с температурным уровнем T_1 . Когда планшет нагрет до заданной температуры T_2 ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)), то температура пробы в пробирке достигла $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (точка T_1). Линейно аппроксимируем выделенные начальные участки на обеих кривых и экстраполируем полученные прямые: для ряд2 — до пересечения с уровнем T_2 , для ряд1 — до точки-проекции полученного пересечения (с получением соответственного температурного уровня T_3). Когда температура

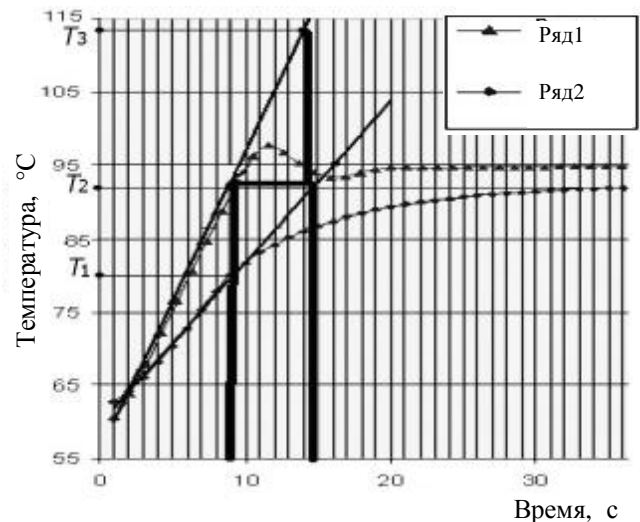


Рис. 12. График зависимости температуры от времени.

Ряд1 — показания внутреннего датчика; ряд2 — показания внешнего датчика

в пробирке достигнет T_2 , тогда прибор будет нагрет до температуры T_3 (около $115\text{ }^{\circ}\text{C}$). Повышение температуры до такой высокой отметки губительно для реакционной смеси.

Таким образом, речь идет о двух случаях разности температур: $T_1 - T_2$ и $T_2 - T_3$. Первый ($T_1 - T_2$) показывает разницу температур между планшетом и реакционной смесью в пробирке, когда планшет нагрелся до заданной температуры. Второй — скорее теоретический, для иллюстрации картины, которая возможна при установлении температуры в пробирке $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

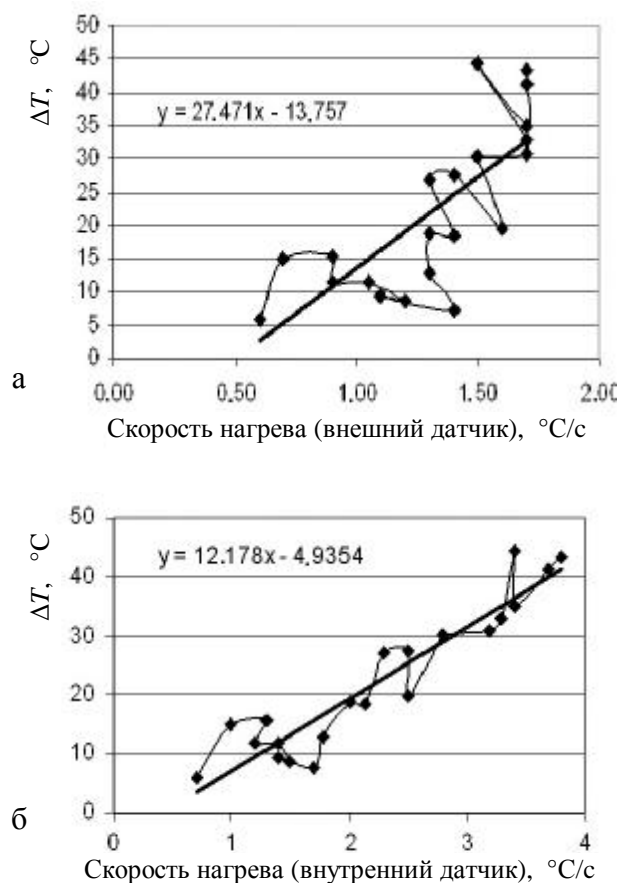


Рис. 13. Оценка разности температур ΔT в зависимости от скорости нагревания внешнего датчика (а) и внутреннего (б)

Оценив зависимость разности температур от скорости нагрева (рис. 13), делаем вывод: чем быстрее происходит нагрев пробирки, тем больше разность температур между планшетом и реакционной смесью. В нашем опыте она составляет $12.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 13).

Из-за наличия разности температур мы не можем гарантировать поддержание заданной температуры в реакционной смеси. Для уверенности в том, что заданная температура в пробирке установилась, необходимо после окончания нагревания ждать $t_{\text{уст}}$. Увеличение скорости нагревания приводит к увеличению разности температур, что в свою очередь требует большего времени установления заданной температуры в пробирке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили разобраться в механизме тепловых рабочих процессов прибора АНК, что позволило сформулировать ряд рекомендаций для оптимизации параметров прибора. В частности, рекомендованы параметры режимов питания элементов Пельтье в режиме нагрева—охлаждения: $U_{\text{нагр}} = 19\text{ В}$, $U_{\text{охл}} = 14\text{ В}$, что позволило увеличить скорость нагрева в 2 раза, а охлаждения в 1.2 раза. Общее время анализа при этом сократилось на 10–15 мин.

Было получено значение времени установления (равномерного прогрева реакционной смеси) для пробирок фирмы "Ахуген" с объемом реакционной смеси 25 мкл и рекомендовано значение задержки начала измерений в 12 с от момента времени прогрева планшета до заданной температуры.

Анализ разности температур планшета и реакционной смеси показал, что дальнейшее увеличение скорости нагрева более $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$ ($\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{с}$) приводит к большому значению разности температур (больше $10\text{ }^{\circ}\text{C}$) и, следовательно, к увеличению неоднородности температуры реакционной смеси, тем самым ухудшая качество проведения ПЦР-реакций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернышев А.В. Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики. Автореф. дис. ... д-ра техн. наук. М., 2006.
2. Иоффе А.Ф. Полупроводниковые элементы. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1960. 188 с. (С. 57–58).
3. Лемаренко М., Хоронжук Р. и др. Лабораторная работа по эффекту Пельтье. М.: СПбГУ, 2002. С. 8–9.
4. Воробьев А.А. ДНК-технология. Теоретические основы полимеразной цепной реакции. М.: Изд-во ООО "Медицинское информационное агентство", 2005. С. 15–17.
5. Чернышев А.В., Бакай Д.А., Курочкин В.Е., Соколов В.Н., Скоблилов Е.Ю. Моделирование теплового состояния микропробирок с образцами в ходе полимеразной цепной реакции // Научное приборостроение. 2005. Т. 15, № 3. С. 54–62.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 20.06.2007.

**INVESTIGATION OF PCR THERMAL CONDITIONS
AIMED AT IMPROVEMENT OF CHARACTERISTICS
OF DEVICES "ANK-16/32"**

O. A. Leonteva, A. I. Petrov

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The paper considers the NAA (Nuclear Acid Analyzer) thermal operating conditions. The dependence of voltage applied to the Peltie element and Real-Time PCR rate has been studied. The difference in temperatures of the tablet and reaction mix has been analyzed.