
**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

УДК 543.426; 543.9

© Д. А. Белов, А. С. Альдекеева, Ю. В. Белов, И. Г. Киселев

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗБРОСА ТЕМПЕРАТУР
ПО ЛУНКАМ АНАЛИЗАТОРОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

В работе предложена усовершенствованная методика определения разброса температур по лункам на основе нелинейной аппроксимации сигмоидальной функцией (СФ) сигналов флуоресценции при плавлении ДНК. Используются флуоресцентные зонды с высокой температурной зависимостью (порядка $15\% K^{-1}$). Результаты представлены в табличном и графическом виде. Показано, что температура плавления ДНК во всех пробирках и их среднее значение соответствуют абсолютной шкале температуры в градусах Цельсия. Получены следующие результаты: разброс температур не более ± 0.2 °С, среднее значение температур плавления ДНК всех пробирок равно $T_{mc} = 80.82$ °С. Максимальное отклонение температуры по 6 группам по 16 пробирок (4×4) от среднего значения составляет 0.15 °С и не превосходит предельно допустимых значений ± 0.2 °С. Предложено использовать полученные результаты для выравнивания каналов управления элементов Пельтье, настройки, калибровки и проверки тепловых параметров анализаторов нуклеиновых кислот.

Кл. сл.: ПЦР в реальном времени, методика плавления ДНК, сигмоидальная функция

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в пробе. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет провести качественный и количественный анализ пробы. Дополнительная информация может быть получена после проведения ПЦР за счет применения метода плавления ДНК, который основан на зависимости температуры плавления ДНК от состава и длины фрагмента [1, 2]. Описанные методы выполняются на анализаторах нуклеиновых кислот [3]. Основными тепловыми параметрами анализаторов являются: погрешность установки среднего значения температуры в лунках с пробирками и разброс температур по лункам. Для измерения этих параметров существуют различные контактные и бесконтактные методы.

Наиболее часто используемыми теплопреобразователями при измерениях контактным методом являются термометры сопротивления и термоэлектрические преобразователи (термопары) [4].

Технические характеристики средств контактного измерения регламентируются стандартами ГОСТ 6651-78 для термометров сопротивления и ГОСТ 3044-77 для термопар.

Контактный метод обладает существенными недостатками. Метод обладает инертностью, вызванной массивностью датчика. В случае если масса датчика сравнима с массой измеряемого объекта, измерения в принципе становятся неинформативными. Также не всегда можно обеспечить контакт датчика с измеряемой средой, особенно в закрытых реакторах. Для решения задачи измерения температурного поля объекта необходимо большое количество датчиков.

Упомянутых недостатков лишены бесконтактные методы измерения. Существуют методы, основанные на измерении теплового излучения исследуемого объекта с помощью пирометров, тепловизоров и инфракрасных матричных камер [5, 6]. Эти методы неприменимы в условиях отсутствия визуального доступа, а также для определения температуры прозрачных тел.

Известны такие методы, как магнито-резонансная (ЯМР) термометрия, СВЧ-радиотермометрия и акустотермометрия [7]. Эти методы имеют значения погрешностей ± 0.2 , ± 0.2 и ± 0.3 °С соответственно, но реализуются на дорогостоящих и громоздких приборах и применяются в основном для решения задач, в которых важно определить внутреннюю температуру объекта, а также пространственное распределение температур в объекте.

Также известны бесконтактные методы измерения температуры, основанные на применении флуоресцентных зондов, например флуоресцентных красителей родамина В (RhB)

или родамина 110 (Rh110) [8]. Эти методы позволяют определять температуру по зависимости уровня флуоресценции от температуры красителя и соответственно измеряемой среды. Погрешность измерений у этих методов составляет порядка ± 1.25 °C. Существует метод на основе индодикарбоцианинового флуоресцентного красителя Су5, в котором погрешность измерения температуры на точку составила ± 0.33 °C [9, 10]. Известны методы измерения температуры по флуоресцентному красителю сульфородамин-101 (SR101) в 2 диапазонах длин волны [11]. Такой метод позволяет добиться погрешности $\pm 0.78-0.93$ °C. При использовании метода измерения температуры по 2 флуоресцентным красителям RhB и SR101 достигается погрешность измерения $\pm 0.48-0.59$ °C [11].

Недостатком бесконтактных методов, основанных на применении этих флуоресцентных зондов, является отсутствие абсолютной шкалы температур, относительно низкая температурная зависимость (не более $2.3\% \text{ K}^{-1}$), а также нежелательная зависимость от условий проведения эксперимента для каждой пробирки. Поэтому такие методы применимы предпочтительно для оценки скорости переходных тепловых процессов, а не для определения разброса температур по лункам анализатора нуклеиновых кислот.

Ранее была разработана методика для определения разброса температур по лункам на основе линейной аппроксимации сигналов флуоресценции с применением флуоресцентных зондов, входящих в состав реакционной смеси РС "АМТЕтест" (FAM-ROX) производства ЗАО "Синтол" (г. Москва) [12, Раздел 10: Методика поверки]. Для флуоресцентного красителя ROX использовался шаблон с регистрацией сигналов флуоресценции при температурах 30, 79.5, 80.5, 81.5 и 85 °C, выдержка на каждой температуре до 160 с. Усредненные сигналы на температурах 30 и 85 °C использовались при нормировании сигналов флуоресценции соответственно по фону и по максимуму. Усредненные сигналы при температурах 79.5, 80.5 и 81.5 °C использовались для определения величины изменения сигналов флуоресценции при изменении температуры на 1 °C и последующего определения разброса температур по лункам. Преимуществом этой методики можно считать высокую температурную зависимость (порядка $15\% \text{ K}^{-1}$) и сравнительно небольшое время регистрации сигналов (порядка 15 мин).

Недостатком этой методики можно считать отсутствие шкалы абсолютной температуры лунок.

В статье приведена усовершенствованная методика определения разброса температур по лункам на основе аппроксимации сигмоидальной функцией сигналов плавления ДНК. Преимуществом предлагаемой методики является определение абсолютной температуры в каждой лунке анализатора нуклеиновых кислот при сохранении высокой температурной зависимости.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗБРОСА ТЕМПЕРАТУР ПО ЛУНКАМ НА ОСНОВЕ АППРОКСИМАЦИИ СИГМОИДАЛЬНОЙ ФУНКЦИЕЙ СИГНАЛОВ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

В настоящее время в ИАП РАН разработан экспериментальный образец анализатора АНК-96 (96 образцов). Для анализатора АНК-96 требуется обеспечить погрешность установки среднего значения температуры в лунках с пробирками и разброс температур по лункам соответственно ± 0.5 и ± 0.2 °C. Аналогичные параметры имеет лучшие иностранные анализаторы, например 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne Plus фирмы "Life Technologies" [13] и др.

Предлагается использовать температуру плавления ДНК T_m при использовании одинаковых образцов в качестве критерия оценки разброса температур по лункам.

Ранее в статье [14] была предложена методика определения величины температуры плавления ДНК T_m , основанная на усовершенствованной модели сигналов кривой плавления ДНК и способа аппроксимации ее с помощью сигмоидальной функции, выраженной в виде формулы:

$$F_c = F_m / (1 + \exp((T_{m,calc} - T) / k)) + f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2, \quad (1)$$

где F_c — относительная величина интенсивности флуоресценции при температуре образца T (°C); F_m — относительная интенсивность (размах) участка плавления; $T_{m,calc}$ — дробное значение температуры плавления (°C); k — коэффициент, который определяется наклоном кривой; слагаемые $f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2$ учитывают смещение, а также линейную и квадратичную зависимости нулевой линии от температуры.

Недостатком методики является несоответствие точки перегиба графика и соответственно значения температуры плавления со значением $T_{m,calc}$ из формулы (1). Несоответствие значений объясняется влиянием коэффициентов f_1 и f_2 на форму аппроксимирующей кривой.

Одним из вариантов устранения этого недостатка является определение температуры

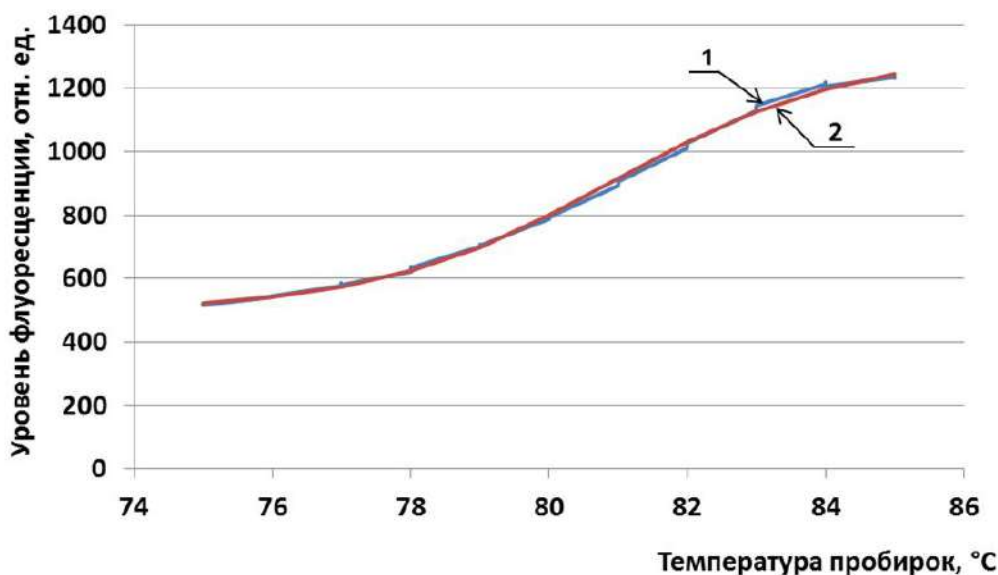


Рис. 1. Кривая плавления реакционной смеси.
1 — ступенчатая кривая (измеренные данные); 2 — аппроксимирующая СФ с оптимизированными параметрами (гладкая кривая)

Табл. 1. Оптимизация параметров СФ

N	$T, ^\circ\text{C}$	F	F_c	$D = F_c - F$	D^2	$S = \text{СУММА}$
1	75	517	521.93	4.93	24.36	4466.15
2	76	546	541.01	-4.98	24.87	—
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
11	85	1234	1244.48	10.48	110.01	—

Табл. 2. Оптимизированные параметры СФ

Параметры СФ	Значения СФ
T_m	80.92
F_m	818.92
k	-1.72
f_0	1315.11

плавления T_m по значению максимума производной F_c по температуре. При этом значение T_m будет однозначно совпадать с точкой перегиба графика функции F_c . Данный вариант требует дополнительных вычислений и является более трудоемким.

В предлагаемой методике исключены коэффициенты f_1 и f_2 из формулы (2). При этом упрощенная функция F_u будет с достаточной степенью точности описывать исходные данные при условии уменьшения диапазона значений температур, что положительно скажется на времени проведения анализа. При этом полученное значение T_m будет соответствовать точке перегиба СФ.

Усовершенствованная модель кривой плавления на базе упрощенной нелинейной

сигмоидальной функции примет вид:

$$F_u = F_m / (1 + \exp((T_m - T) / k)) + f_0. \quad (2)$$

Исходные (сырые) данные кривой плавления ДНК от 8 пробирок были получены путем регистрации сигналов флуоресценции красителя ROX реакционной смеси РС "АМТетест" (FAM-ROX) при ступенчатом изменении температуры в диапазоне 75–85 °C с шагом 1 °C и с выдержкой на каждой ступени 30 с. Время регистрации сигналов — порядка 10 мин.

График исходных данных кривой плавления реакционной смеси одной из пробирок в качестве образца приведен на рис. 1 (кривая 1).

Оптимизированные параметры СФ определяются с помощью электронной таблицы Excel. В первом столбце табл. 1 приведены номера

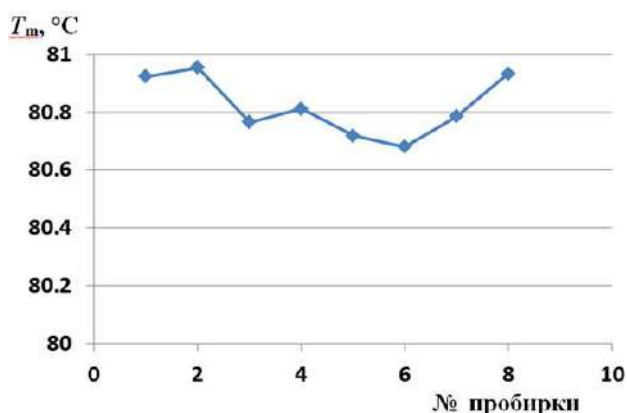


Рис. 2. Графики T_m для 8 пробирок в одном ряду теплового блока

отсчетов N во времени, во втором столбце — значения температуры T (от 75 до 85 °С). В третьем и четвертом столбцах приведены относительные значения интенсивности флуоресценции F пробы и значения интенсивности флуоресценции F_c модели СФ. В следующих столбцах табл. 1 приведены разность $D = F_c - F$, квадрат разности D^2 и сумма квадратов разности S .

Нахождение параметров СФ выполняется в программе Excel средством анализа *Поиск решения* из меню *Данные*, при этом достигается минимальное значение величины S путем изменения параметров СФ. График сигмоидальной функции первой пробирки в качестве образца приведен на рис. 1 (кривая 2). Параметры СФ для этой пробирки приведены в табл. 2, при этом температура плавления $T_{m1} = 80.92$ °С.

Основными результатами применения СФ являются определенные величины температуры плавления T_m . Графики, отражающие величины T_m для 8 пробирок в одном ряду теплового блока, приведены на рис. 2.

Температура плавления ДНК всех пробирок и их среднее значение соответствуют абсолютной шкале температуры в °С. Разброс температур — не более ± 0.2 °С. Среднее значение температур плавления ДНК 16 пробирок равно $T_{mc} = 80.82$ °С.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что полученные температуры плавления ДНК в пробирках могут быть использованы при настройке, калибровке и проверке тепловых параметров анализаторов нуклеиновых кислот при их серийном выпуске.

Разброс температур соседних лунок во многом зависит от случайных погрешностей при измерении сигналов флуоресценции. Поэтому в качестве критерия для оценки разброса

температур по лункам предлагается принять более достоверные результаты усреднения в пределах 6 групп по 16 пробирок (4×4).

Максимальное отклонение температуры по 6 группам от среднего значения составляет 0.15 °С и не превосходит предельно допустимых значений ± 0.2 °С.

Особенностью анализатора АНК-96 является использование в тепловом блоке 6 элементов Пельтье, при этом каждый элемент имеет отдельный канал управления. Предварительная настройка была выполнена путем использования цифрового датчика температуры. Полученные результаты были использованы на завершающем этапе настройки анализатора АНК-96 и других анализаторов нуклеиновых кислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена усовершенствованная методика определения разброса температур на основе метода плавления ДНК. При этом использован способ аппроксимации кривой плавления ДНК с помощью сигмоидальной функции. Показано, что температуры плавления ДНК во всех пробирках и их среднее значение соответствуют абсолютной шкале температуры в °С. Полученные результаты (разброс температур не более ± 0.2 °С, среднее значение температур плавления ДНК во всех пробирках, равно $T_{mc} = 80.82$ °С) можно принять в качестве контрольных параметров при настройке, калибровке и проверке тепловых параметров анализаторов нуклеиновых кислот.

Разброс температур соседних лунок во многом зависит от случайных погрешностей при измерении сигналов флуоресценции, поэтому в качестве критерия для оценки разброса температур по лункам предлагается принять более достоверные результаты усреднения в пределах 6 групп по 16 пробирок каждая (4×4). Максимальное отклонение температуры по 6 группам от среднего значения составляет 0.15 °С и не превосходит предельно допустимых значений ± 0.2 °С.

Полученные результаты использовались для настройки анализаторов нуклеиновых кислот.

Благодарность

Авторы выражают благодарность А.Л. Широкораду за разработку программного обеспечения анализатора АНК-96 и помощь при получении исходных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. Переход спираль—клубок в ДНК // Успехи физиче-

- ских наук. 1971. Т. 105, № 11. С. 479–519. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479.
2. ДНК плавление. URL: <http://humbio.ru/humbio/dnastructure/0002a247.htm>.
 3. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136. URL: <http://213.170.69.26/mag/2006/abst3.php#abst15>.
 4. Воробьев Д.В. Анализ и реализация методов измерения температуры // Теория и практика имитационного моделирования и создания тренажеров. Сборник статей Международной научно-практической конференции, г. Пенза, 14–15 декабря 2016 г. С. 42–47.
 5. Беленький А.М. Измерение температуры: теория, практика, эксперимент. Т. 2. Справочное издание в 3 томах. Москва: Теплотехник, 2007. 736 с.
 6. Битюков В.К., Петров В.А. Методы и средства бесконтактного контроля теплового состояния изделий. Учебное пособие. Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики (технический университет). М., 1999. 94 с.
 7. Жорина Л.В. Методы неинвазивного измерения внутренней температуры тела // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. Тамбов, 2017. Т. 22, вып. 2. С. 464–470. Doi: 10.20310/1810-0198-2017-22-2-464-470.
 8. Chamarthy P., Garimella S.V., Wereley S.T. Measurement of the temperature non-uniformity in a microchannel heat sink using microscale laser-induced fluorescence // International Journal of Heat and Mass Transfer. 2010. Vol. 53, no. 15-16. P. 3275–3283. Doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2010.02.052.
 9. Варламов Д.А., Герасимов М.А., Савина Ж.А., Сочивко Д.Г., Федоров А.А. Неинвазивный анализ тепловых процессов в реакторах приборов для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени // Материалы конференции "Информационно-технологический и телекоммуникационный кластер наукограда Черноголовка: продукция, партнерство и перспективы развития". Черноголовка, "Богородский печатник", 2015. С. 55–57.
 10. Сочивко Д.Г., Варламов Д.А., Федоров А.А., Курочкин В.Е. Метод бесконтактного измерения температуры в реакторах полимеразной цепной реакции // Письма в ЖТФ. 2016. Т. 42, вып. 7. С. 53–58.
 11. Natrajan V.K., Christensen K.T. Development of fluorescent thermometry methods for microfluidic systems // 14th Int Symp on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics. Lisbon, Portugal, 07–10 July, 2008.
 12. ИАП РАН. Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот "АНК". Руководство по эксплуатации ПКДН.941417.003 РЭ, 2013.
 13. Thermo Fisher Scientific: Real-Time PCR (qPCR). URL: <http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html>.
 14. Белов Д.А., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 2. С. 17–22. URL: <http://213.170.69.26/mag/2016/abst2.php#abst2>.

**Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург** (Белов Д.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В.)

**Петербургский государственный университет путей
сообщения Императора Александра I** (Белов Д.А., Киселев И.Г.)

**Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
г. Санкт-Петербург** (Альдекеева А.С.)

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич,
onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 16.10.2017

NUCLEIC ACIDS ANALYZER HOLES TEMPERATURE SPREAD DETERMINING METHOD

D. A. Belov^{1,2}, A. C. Aldekeeva^{1,3}, Yu. V. Belov¹, I. G. Kiselev²

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia*

²*Emperor Alexander I Saint-Petersburg State Transport University, Russia*

³*Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

The temperature determining methods application results based on fluorescence signals approximation for the ANK-96 analyzer are considered. An improved method for determining the temperature dispersion in the wells is proposed on the base of the fluorescence signals nonlinear approximation by sigmoidal function (SF). Fluorescent dyes with a high temperature dependence (about 15 % K⁻¹) are used. The results are presented in tabular and graphical form. It was shown that the melting temperature of the DNA of all the tubes and their average value correspond to the absolute temperature scale in °C. The deviation of temperatures is not more than ± 0.2 °C. The average value of the melting points of the DNA in all tubes is $T_{mc} = 80.82$ °C. The maximum temperature deviation in 6 groups of 16 tubes (4 × 4) from the average value is 0.15 °C and does not exceed the maximum allowable values ± 0.2 °C. It is suggested to use the method based on nonlinear approximation by sigmoid function (SF) in tuning, calibrating and verifying the thermal parameters of nucleic acid analyzers.

Keywords: real-time PCR, DNA melting analysis, sigmoid function

REFERENCES

1. Vedenov A.A., Dychne A.M., Frank-Kamenezkiy M.D. [Transition a spiral—a ball in DNA]. *Uspechi fizicheskich nauk* [Achievements of physical sciences], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479. (In Russ.).
2. *DNA melt*. (In Russ.). URL: <http://humbio.ru/humbio/dnastructure/0002a247.htm>.
3. Alekseev Ya.I., Belov Yu.V., Varlamov D.A. et al. [Devices for diagnostics of biological objects based on the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2006, vol. 16, no. 3, pp. 132–136. URL: <http://213.170.69.26/mag/2006/abst3.php#abst15>. (In Russ.).
4. Vorob'ev D.V. [Analysis and implementation of methods of temperature measurement]. *Teoriya i praktika imitacionnogo modelirovaniya i sozdaniya trenazherov* [Theory and practice of simulation modeling and creation of trainers], Sbornik statey Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferenzii, g. Penza, December 14–15, 2016, pp. 42–47. (In Russ.).
5. Belen'kiy A.M. *Izmerenie temperatury: teoriya, praktika, eksperiment. T. 2* [Temperature measurement: theory, practice, experiment. V. 2]. Spravochnoe izdanie v 3 tomach. Moscow, Teplotekhnika Publ., 2007. 736 p. (In Russ.).
6. Bituykov V.K., Petrov V.A. *Metody i sredstva beskontaktnogo kontrolya teplovogo sostoyaniya izdeliy. Uchebnoe posobie* [Methods and means of non-contact control of a thermal status of products. Manual]. Moskovskiy gosudarstvennyy institut radiotekhniki, elektroniki i avtomatiki (technicheskiy universitet), Moscow, 1999. 94 p. (In Russ.).
7. Zhorina L.V. [Methods of noninvasive measurement of internal body temperature]. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Estestvennye i technicheskie nauki* [Bulletin of the Tambov university. Series: Natural and technical science], Tambov, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 464–470. Doi: 10.20310/1810-0198-2017-22-2-464-470. (In Russ.).
8. Chamarthy P., Garimella S.V., Wereley S.T. Measurement of the temperature non-uniformity in a microchannel heat sink using microscale laser-induced fluorescence. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2010, vol. 53, no. 15–16, pp. 3275–3283. Doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2010.02.052.
9. Varlamov D.A., Gerasimov M.A., Savina Zh.A., Sochivko D.G., Fedorov A.A. [The noninvasive analysis of thermal processes in reactors of instruments for carrying out polymerase chain reaction in real time]. *Materialy konferenzii "Informacionno-technologicheskoy i telekommunikacionnoy klaster naukograda Chernogolovka: produkcziya, partnerstvo i perspektivy razvitiya"* [Conference materials "Information and technological and telecommunication cluster of the science city of Chernogolovka: production, partnership and perspectives of development"]. Chernogolovka, "Bogorodskiy pechatnik" Publ., 2015, pp. 55–57. (In Russ.).
10. Sochivko D.G., Varlamov D.A., Fedorov A.A., Kurochkin V.E. [Method of noncontact temperature measurement in reactors of polymerase chain reaction]. *Pis'ma v ZhTF* [Letters in ZhTF], 2016, vol. 42, no. 7, pp. 53–58. (In Russ.).
11. Natrajan V.K., Christensen K.T. Development of fluorescent thermometry methods for microfluidic systems. *14th Int Symp on Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics*. Lisbon, Portugal, 07–10 July, 2008.
12. IAI RAS. *Ustroystvo dlya obnaruzheniya specificheskoy posledovatel'nosti nukleinovykh kislot "ANK". Rukovodstvo po ekspluatatsii PKDN.941417.003 RE* [The device for detection of the specific sequence of nucleic acids of ANC. Operation manual PKDN.941417.003 RE], 2013. (In Russ.).

13. *Thermo Fisher Scientific: Real-Time PCR (qPCR)*.
URL: <http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html>.
14. Belov D.A., Korneva N.A., Al'dekeeva A.C., Belov Yu.V., Kiselev I.G. [Genetic analyzer resolution increasing at DNA melting temperature determination].

Nauchnoe Priborostroenie [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 17–22. (In Russ.). Doi: 10.18358/np-26-2-i1722.

Contacts: *Belov Dmitriy Anatol'evich*,
onoff_10@mail.ru

Article received in edition: 16.10.2017