

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК

На правах рукописи



Белов Дмитрий Анатольевич

НОВЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И
МЕТОДИКИ ОБРАБОТКИ СИГНАЛОВ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ
АМПЛИФИКАТОРОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Специальность 1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Киселев Игорь Георгиевич

Санкт-Петербург 2022

Оглавление

Введение.....	5
Актуальность темы	5
1 Аналитический обзор современного состояния и тенденций развития детектирующих амплификаторов, определение цели и постановка задач исследования.....	12
1.1 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	12
1.1.1 Основы полимеразной цепной реакции	12
1.1.2 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	16
1.1.3 Приборная реализация ПЦР-РВ.....	17
1.2 Метод плавления ДНК.....	25
1.2.1 Основы метода плавления ДНК.....	25
1.2.2 Метод плавления ДНК высокого разрешения.....	30
1.2.3 Обработка результатов анализов	37
1.2.4 Ограничения метода плавления высокого разрешения.....	39
1.3 Методы измерения тепловых параметров амплификаторов	41
1.4 Основные результаты главы 1	43
2. Совершенствование приборной базы детектирующих амплификаторов.	45
2.1 Разработка технических решений, направленных на измерение и выравнивание неоднородности температурного поля теплового блока амплификатора	45
2.1.1 Измерение неоднородности температурного поля.....	45
2.1.2 Компенсация неоднородности температурного поля теплового блока	47

2.2	Разработка технических решений, направленных на увеличение скорости изменения температуры анализируемых образцов	52
2.2.1	Увеличение скорости изменения температуры в режиме охлаждения	52
2.2.2	Компенсация неоднородности температурного поля теплового блока	55
2.2.3	Рекуперативная термогидравлическая система.....	56
2.2.4	Рекуперативная термогидравлическая система с воздушным компрессором	59
2.2.5	Сравнение и выбор конструкций термогидравлической системы	61
2.3	Основные результаты главы 2	62
3	Исследование рабочих процессов в тепловом блоке амплификатора с термогидравлической системой.....	64
3.1	Математическое моделирование рабочих процессов	64
3.1.1	Расчетная область	64
3.1.2	Математическая модель.....	65
3.1.3	Определение коэффициентов теплоотдачи	67
3.2	Исследования рабочих процессов численными методами	71
3.2.1	Метод решения задачи	71
3.2.2	Реализация численных методов	72
3.2.3	Результаты расчета численными методами	74
3.3	Экспериментальные исследования.....	81
3.3.1	Разработка экспериментального стенда.....	81
3.3.2	Оценка эффективности теплового блока с термогидравлической системой в режиме охлаждения	84

3.3.3	Оценка эффективности теплового блока с термогидравлической системой в режиме термостатирования.....	86
3.3.4	Экспериментальный стенд с гидрораспределителем	90
3.3.5	Сравнение расчетных и экспериментальных данных.....	92
3.4	Основные результаты главы 3	92
4	Обработка сигналов плавления ДНК	95
4.1	Методика обработки графиков плавления на основе усовершенствованной сигмоидальной функции	95
4.2	Методика обработки графиков плавления на основе производной усовершенствованной сигмоидальной функции	100
4.3	Методика обработки графиков плавления на основе усовершенствованной функции Гаусса	101
4.4	Методика обработки графиков плавления на основе полиномиальной функции	102
4.5	Адекватность разработанных моделей	109
4.6	Оценка погрешности определения температуры плавления ДНК при использовании предложенных методик	109
4.7	Разработка экспериментальной версии программного обеспечения метода плавления ДНК высокого разрешения.....	113
4.8	Анализ погрешностей определения температуры плавления ДНК.	116
4.9	Основные результаты главы 4	119
	Заключение	122
	Благодарности	126
	Список сокращений и условных обозначений.....	127
	Список литературы	129

Введение

Актуальность темы

В настоящее время в науке и медицине нашли широкое применение детектирующие амплификаторы нуклеиновых кислот (далее – амплификаторы), работающие на принципе накопления продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и регистрации сигналов флуоресценции образцов в реальном времени (ПЦР-РВ) [1]. ПЦР – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в пробе. Метод ПЦР-РВ позволяет провести качественный и количественный анализ пробы и является одним из основных методов исследования дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Этот метод давно стал рутинной лабораторной процедурой.

Ежегодно на рынке появляются новые модели амплификаторов, а их разработкой занимаются такие зарубежные фирмы, как Bio-Rad Laboratories (США), Thermo Fisher Scientific (США), Analytik Jena (Германия), Eppendorf (Германия), Qiagen (Германия), Tianlong (Китай), Bioer Technology (Китай) и др. Можно выделить двух отечественных разработчиков: Институт аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) и компания ООО "ДНК-Технология". Настоящая диссертация направлена на совершенствование амплификаторов серии АНК, которые созданы в ИАП РАН и серийно выпускаются, а также на разработку технических и методических решений для планируемых к разработке приборов. При всем многообразии практического применения амплификаторов основными направлениями улучшения их характеристик является уменьшение времени проведения анализов и разброса температур между анализируемыми образцами. Таким образом, актуальным является развитие приборной и методической базы амплификаторов.

Большинство современных амплификаторов выполняют анализы на основе метода плавления высокого разрешения (High Resolution Melting, HRM), способного определять характеристики фрагментов ДНК в соответствии с их поведением при изменении температуры. Метод HRM широко используются для

выявления однонуклеотидных полиморфизмов, оценки специфичности проведения ПЦР, в эпигенетических исследованиях и т. д. Под высоким разрешением понимают дискретность измерения температуры не более 0,1 К [2, 3], обеспечивающую допустимую для большинства задач погрешность определения основного характерного параметра – температуры плавления T_m . Актуальным является разработка методик обработки экспериментальных данных при реализации плавления ДНК, позволяющих достичь критериев высокого разрешения при использовании амплификаторов серии АНК и сократить время проведения анализа.

Цель работы

Цель работы - совершенствование приборной и методической базы детектирующих амплификаторов нуклеиновых кислот серии АНК.

Для достижения указанной цели в работе поставлены и решены следующие задачи.

1 Разработать новые технические решения, направленные на увеличение скорости нагрева/охлаждения анализируемых проб и компенсацию неоднородности температурного поля элементов амплификатора.

2 Сформулировать математическую модель процессов теплопереноса, протекающих в элементах амплификатора с новыми техническими решениями, и применить численные методы решения уравнений модели для оценки влияния параметров новых технических решений на скорости нагрева/охлаждения пробы.

3 Создать экспериментальный стенд и выполнить исследование процессов теплопереноса в тепловом блоке стенда.

4 Разработать методики обработки экспериментальных данных амплификаторов при реализации плавления ДНК, позволяющие достичь критериев высокого разрешения и сократить время проведения анализа.

Научная новизна

1 Представлены варианты реализации термогидравлической системы, обеспечивающие повышение производительности амплификатора при реализации анализов методом ПЦР-РВ за счет сокращения длительности анализа до 30 % и уменьшение разброса температур по лункам держателя пробирок при термостатировании проб до 5 раз.

2 Разработан способ компенсации неоднородности температурного поля элементов амплификатора, основанный на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье и формировании поправок температур проб при повторных анализах по выявленным различиям температур плавления образцов в массиве пробирок.

3 Впервые выполнена оценка влияния параметров термогидравлической системы на характеристики амплификатора. Расчет динамики тепловых процессов численными методами при термоциклировании пробы в тепловом блоке амплификатора сведен к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности пробы λ_{eq} и переменным коэффициентом теплоотдачи α_c между поверхностями каналов держателя пробирок и протекающей при различных скоростях и температурах жидкости.

4 Новые методики обработки сигналов плавления ДНК, основанные на их аппроксимации непрерывными функциями, а именно усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией оптимальной степени, позволяют:

- достичь критериев высокого разрешения путем уменьшения погрешности вычисления температуры плавления ДНК до 0,1 К;

- повысить производительность амплификатора при реализации анализов методом плавления ДНК за счет сокращения длительности анализа до 6 раз путем уменьшения рабочего диапазона температур и увеличения шага дискретизации сигнала.

Практическая значимость

1 Предложенная термогидравлическая система позволяет увеличить производительность амплификаторов до 25 % за счет сокращения времени анализа, а также снизить коэффициент нагрузки элементов Пельтье и, таким образом, повысить их надежность.

2 Разработанная корректирующая система в составе амплификатора позволяет уменьшить неоднородность температурного поля держателя пробирок, что способствует реализации анализа методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также обнаружению небольших различий в температуре плавления (0,1-0,3 К) при анализе методом HRM, требуемому в задачах генотипирования образцов с близкими профилями плавления.

3 Разработанная конструкция гидрораспределителя термогидравлической системы позволяет выровнять гидравлические сопротивления в каналах держателя пробирок, упростить конструкцию и уменьшить габариты термогидравлической системы.

4 Предложенные новые методики обработки сигналов плавления ДНК обеспечивают сокращение времени анализа до 6 раз, достижение критериев высокого разрешения и автоматизацию процесса обработки результатов анализа. На основе предложенной методики разработана экспериментальная версия программного обеспечения для серийно выпускаемых амплификаторов АНК-32, АНК-48, АНК-64 и экспериментального образца АНК-96.

Положения, выносимые на защиту

1 Термогидравлическая система, обеспечивающая протекание жидкости заданной температуры и ее удаление в каналах держателя пробирок теплового блока амплификатора, позволяет уменьшить длительность теплового цикла ПЦР-РВ на величину до 39 секунд за счет увеличения средних скоростей нагрева/охлаждения проб, тем самым, сократить длительность анализа на величину до 25 %.

2 Предложенные варианты реализации термогидравлической системы обеспечивают тепловые процессы в элементах амплификаторов одновременно с элементами Пельтье и позволяют уменьшить разброс температур различных проб на величину до 5 раз по сравнению с амплификаторами без использования системы.

3 Математическая модель адекватно описывает процессы теплопереноса в тепловом блоке амплификатора, т. к. результаты ее применения согласуются с результатами экспериментальных исследований, максимальное отклонение теоретических результатов от экспериментальных по средней скорости охлаждения держателя пробирок при различных скоростях протекания жидкости составляет 8,4 %.

4 Разработанные методики обработки сигналов плавления ДНК, основанные на аппроксимации графиков плавления, полученных на амплификаторах АНК-32, непрерывными функциями, позволяют определять температуру плавления ДНК с погрешностью, не превышающей 0,1 К, при шаге дискретизации сигнала более 0,2 К.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях.

1 Первая российская конференция «Физика – наукам о жизни», Санкт-Петербург, ФТИ им. Иоффе, 2016 г.

2 Научная конференция с международным участием «Неделя науки СПбПУ», Санкт-Петербург, ФГАОУ ВО СПбПУ, 19-24 ноября 2018 г.

3 Международная конференция «Физика. СПб», ФТИ им. Иоффе, 22-24 октября 2019 г.

4 Международная научная конференция «FarEastCon», Владивосток, ДВФУ, 2020 г.

5 Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии», Москва, 2020 г.

6 VIII Международная молодежная научная конференция «Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2021», Екатеринбург, 17-21 мая 2021 г.

7 Международная конференция «Физика.СПб», Санкт-Петербург, ФТИ им. А. Ф. Иоффе, 18–22 октября 2021 г.

Реализация результатов работы и внедрение

Теоретические и практические результаты диссертационной работы получены и использованы при выполнении прикладных научных исследований и экспериментальных разработок ИАП РАН по темам:

- ПНИЭР «Разработка высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований», идентификатор RFMEFI60714X0095 (2014 - 2016 годы);

- НИР «Научно-методическое обеспечение разработок аналитических систем для нанобиотехнологии и диагностики социально значимых заболеваний и особо опасных инфекций на основе генетических, иммунных и физико-химических методов», рег. № АААА-А19-119060790031-1 (2016 – 2018 годы);

- НИР «Теоретические и экспериментальные исследования по созданию приборов выявления маркеров начальных стадий развития патологий органов и систем человека на базе электрофизиологии сверхвысокого разрешения и современных геномных технологий», рег. № АААА-А19-116041310008-3 (2019 – 2021 годы);

- НИР «Новые подходы к разработке аналитических систем на основе генетических, физико-химических и иммунных методов исследования», рег. № АААА-А19-119061190078-9 (2019 – 2021 годы).

По результатам диссертационной работы получено 3 патента на изобретение РФ и зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в постановке цели и задач исследований, анализе литературных источников по теме диссертации,

проведении патентных исследований, формулировании математической модели, разработки и испытании экспериментального стенда, организации и проведении численных и экспериментальных исследований, обработке и анализе результатов исследований, разработке методик обработки данных и реализации их на различных языках программирования, подготовке научных публикаций и заявок на изобретения по тематике исследований, представлении результатов работы на конференциях, а также в оформлении отчетов по темам НИР. Основные результаты, представленные в диссертации, получены автором лично.

Публикации

Основные научные результаты опубликованы в 14 печатных трудах [4-17], из которых 9 входят в перечень журналов ВАК, 5 публикаций — в международные реферативные базы данных и систему цитирования Scopus. По результатам работы получено 3 патента на изобретения [18-20] и зарегистрирована 1 программа для ЭВМ [21].

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы из 148 наименований. Текст диссертации изложен на 144 страницах, содержит 41 рисунок и 18 таблиц.

1 Аналитический обзор современного состояния и тенденций развития детектирующих амплификаторов, определение цели и постановка задач исследования

Детектирующие амплификаторы являются одними из наиболее распространенных в мире генетических анализаторов [22]. Они обеспечивают реализацию двух популярных методов анализа: полимеразной цепной реакции в реальном времени и метода плавления ДНК высокого разрешения.

1.1 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

1.1.1 Основы полимеразной цепной реакции

Известно, что генетическая информация закодирована в ДНК в виде двух полимерных цепей, соединенных водородными связями. Цепи образуют двойную спираль, содержащую азотистые основания – нуклеотиды: аденин (А), гуанин (G), тимин (Т) и цитозин (С). Согласно правилу комплементарности нуклеотиды А и G первой цепи связаны соответственно с нуклеотидами Т и С второй цепи [23].

Одним из наиболее популярных методов анализа ДНК является ПЦР, который позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций исследуемых фрагментов ДНК в пробе. ПЦР основана на способности фермента ДНК-полимеразы синтезировать новую цепь ДНК, комплементарную цепи исследуемого фрагмента ДНК. С помощью метода ПЦР амплифицируются довольно короткие участки ДНК – обычно не более 1000 пар нуклеотидов (п. н.). При создании специальных условий, длина ПЦР-фрагмента может достигать нескольких десятков тысяч п. н. Для сравнения, геном человека составляет около 2,8 млрд. п. н. [24].

Проведению анализа предшествует стадия пробоподготовки, включающая лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций и получение раствора ДНК, свободного от ингибиторов и готового для дальнейшей амплификации [25].

Значительная часть исследуемых образцов представляет собой фрагменты рибонуклеиновой кислоты (РНК). Для проведения реакции ПЦР, фрагменты РНК

сначала преобразуют в комплементарную ДНК (кДНК) с помощью обратной транскрипции, затем кДНК используется в качестве матрицы для реакции ПЦР [26].

Цикл ПЦР состоит из следующих стадий (Рисунок 1.1) [27].

1) Денатурация (плавление) двухцепочечной ДНК

Двойная спираль ДНК расплетается при нагреве до 367-369 К за счёт разрушения водородных связей между двумя цепочками молекулы ДНК. Обычно время термостатирования – 30-60 секунд. В настоящее время стадии денатурации предшествует так называемый «горячий старт» (от англ. «hotstart»), при котором реакционная смесь предварительно прогревается в течение 2-6 минут и с последующим добавлением в пробу фермента (полимераза). Делается это для уменьшения количества неспецифических (побочных) продуктов реакции и увеличения чувствительности системы.

2) Отжиг праймеров

Отжиг – связывание праймеров с матричной ДНК. Поскольку полимераза может добавлять нуклеотид только к уже существующей 3'-ОН-группе, для начала синтеза ей необходимы два праймера – это короткие последовательности нуклеотидов (чаще 18-20 [28]), комплементарные концевым участкам исследуемых фрагментов ДНК.

После стадии денатурации температуру реакционной смеси понижают до температуры, зависящей от состава праймеров и составляющей 323-338 К. Критерием выбора является температура плавления T_m - температура, при которой праймер присоединяется к половине возможных участков матричной ДНК. Время проведения отжига – 20-60 секунд. Выбор завышенной температуры отжига приводит к плохому связыванию праймеров, заниженной температуры отжига – к появлению неспецифических продуктов.

3) Синтез новых цепей ДНК (элонгация цепи)

В течение этой стадии происходит достраивание цепей ДНК согласно принципу комплементарности, начиная от участков уже присоединённых праймеров. Материалом для этого служат дезоксирибонуклеозидтрифосфаты:

дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ, dATP), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ, dGTP), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ, dCTP) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ, dTTP). Температура протекания реакции зависит от полимеразы, используемой в реакции, и обычно составляет 343-345 К. Время синтеза варьируется в зависимости не только от полимеразы, но и от длины достраиваемого участка.

Зачастую вторая и третья стадии объединяются, температурный цикл состоит из двух значений температур. Это становится возможным при значениях температуры отжига праймеров выше 333 К [1] и близких значениях температур отжига и элонгации [29]. Продолжительность стадии отжига увеличивается, однако время проведения анализа уменьшается. Кроме того, завышенная температура отжига праймеров обеспечивает большую специфичность ПЦР [30].

В первом цикле ПЦР каждая из вновь синтезированных цепей имеет значительно большую длину, чем расстояние от 3'-ОН группы ее праймера до концевой нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Такие цепи называют «длинными матрицами». Во втором цикле двухцепочечную ДНК, состоящую из исходной и вновь синтезированных цепей, опять подвергают денатурации, а затем отжигают с праймерами. Во время синтеза в этом цикле вновь синтезируются «длинные матрицы», а также некоторое количество цепей с праймером на одном конце и с последовательностью, комплементарной второму праймеру на другом («короткие матрицы»). В последующих циклах «коротких матриц» становится все больше, и к 30-му циклу их число может превышать количество исходных цепей в 10^6 раз [31].

Количество «длинных матриц» также растет, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент. Рост требуемого продукта в геометрической прогрессии ограничен количеством реагентов, присутствием ингибиторов и образованием побочных продуктов.

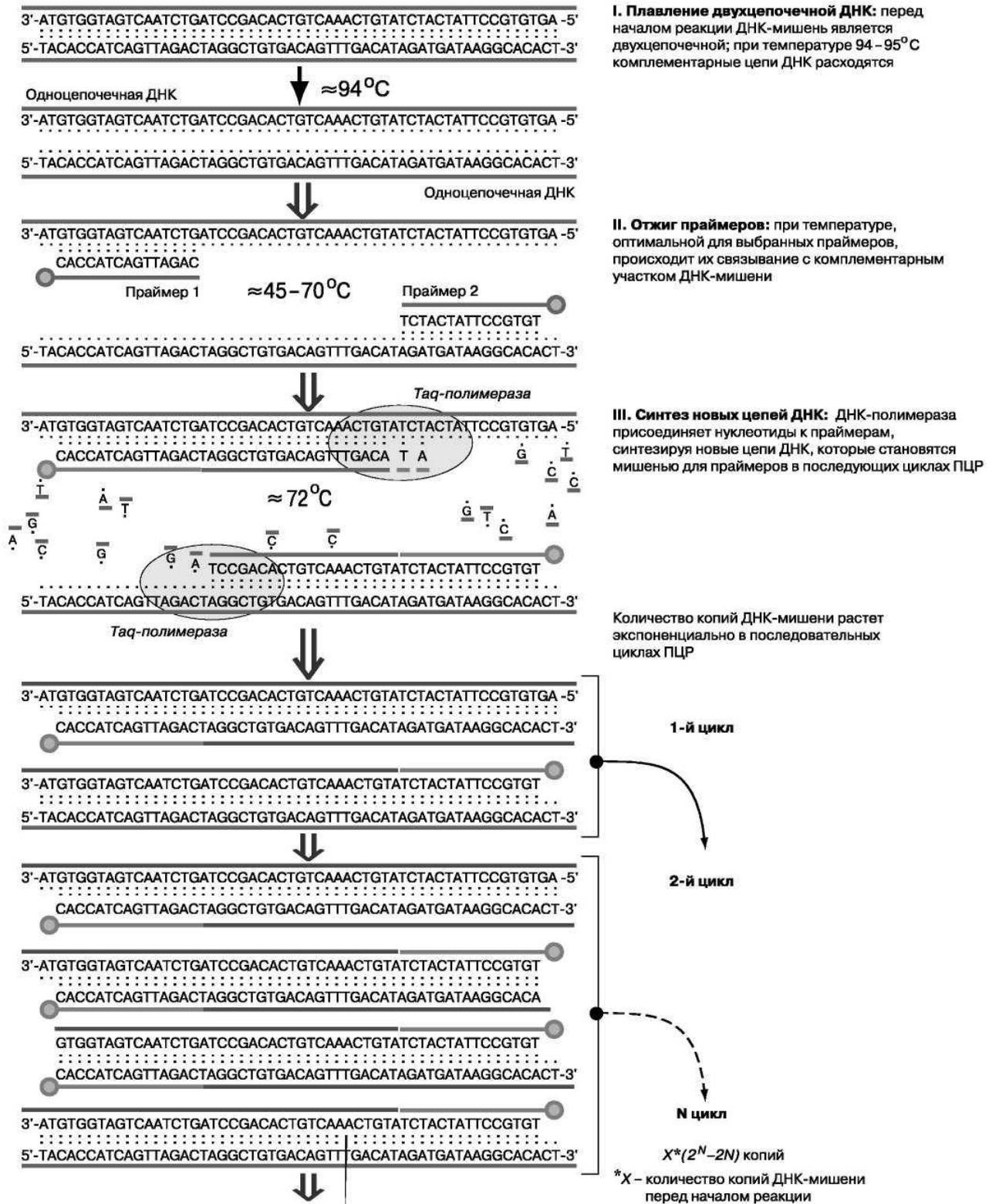


Рисунок 1.1 - Механизм полимеразной цепной реакции: основные этапы цикла ПЦР и процесс многократного копирования ДНК-мишени в ходе последовательно сменяющихся циклов [27]

Время проведения анализа во многих прикладных задачах играет решающую роль и напрямую зависит от продолжительности этапов термостатирования и термоциклирования. Продолжительность термостатирования обусловлена протеканием химических реакций. Длительность термоциклирования зависит от скорости нагревания и охлаждения и может быть сокращена путем разработки и внедрения в состав амплификаторов новых технических решений.

1.1.2 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

В первые годы появления метода ПЦР была решена задача качественного обнаружения искомых фрагментов последовательностей нуклеиновых кислот путем проведения анализа результатов реакции с помощью гель-электрофореза. Однако этот метод зачастую демонстрировал ложноположительные результаты, кроме того, для решения множества задач требовалось определение начального количества искомых фрагментов ДНК.

Метод ПЦР с флуоресцентной регистрацией накопления ДНК, также известный как метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), основан на сравнении графиков зависимости интенсивности флуоресценции пробы от номера цикла у различных образцов и позволяет проводить качественный и количественный анализ пробы и избирательно регистрировать амплификацию определенных фрагментов ДНК, повышая достоверность исследования. Метод обеспечивает более высокую чувствительность и позволяет различать количество генов в более широком динамическом диапазоне, чем при ПЦР [32]. Применение метода ПЦР-РВ более эффективно с точки зрения предотвращения перекрестного загрязнения (контаминации), поскольку после амплификации не требуется никаких дополнительных манипуляций с образцами [33].

При анализах методом ПЦР-РВ графики зависимости интенсивности флуоресценции от температурных циклов имеют S-образную форму. Количественный анализ основан на сравнении характерных точек графиков ПЦР-

РВ, таких как значение C_q , являющееся дробным значением точки перегиба графиков. Традиционно значение C_q определяют путем нахождения максимума второй производной по температуре с предварительной обработкой фильтром «плавающего среднего» или фильтром Савицкого-Голая [1]. В работах [34-36] показано, что при использовании аппроксимации сигналов флуоресценции сигмоидальной функцией обеспечивается снижение погрешностей измерения значений C_q .

Метод ПЦР-РВ особенно актуален при анализе исходно малого количества генетического материала, при работе с особо опасными патогенами или трудно культивируемыми микроорганизмами, для анализа генетических мутаций или синтеза заданных фрагментов ДНК [30]. На основе метода были созданы современные технологии секвенирования (определения последовательности нуклеотидов в ДНК).

По версии агентства *Market research future* рынок ПЦР-РВ достигнет объема 8,4 млрд долл. США к 2027 году с совокупным среднегодовым темпом роста (compound annual growth rate, CAGR) 8,39 %. Объем рынка ПЦР, включающий методы ПЦР-РВ и цифровой ПЦР, был оценен *Verified Market Research* в 4,47 млрд долл. США в 2019 году и, по прогнозам, достигнет 8,26 млрд долл. США к 2027 году, при этом значение CAGR с 2020 по 2027 год составит 8,6 %. Ввиду широкого использования в фундаментальных исследованиях и интенсивно расширяющегося диагностического рынка развитие метода ПЦР-РВ сопровождается разработкой новых реагентов и приборов для ее проведения [37].

1.1.3 Приборная реализация ПЦР-РВ

С момента изобретения ПЦР-РВ началось бурное развитие приборной базы для выполнения анализа: первый детектирующий амплификатор запатентован американской фирмой Applied в 1997 году [38], а в настоящее время количество моделей серийно выпускаемых приборов превышает несколько десятков, при этом, ежегодно на рынке появляются новые модели. Наиболее популярные в России амплификаторы приведены в Таблице 1.1. Технические характеристики

приборов получены с официальных сайтов компаний-производителей. В таблице присутствуют две российские компании: ИАП РАН и ООО «ДНК-Технология».

Амплификаторы осуществляют термоциклирование и термостатирование исследуемых образцов по заданной программе с возбуждением и регистрацией флуоресцентного отклика красителей на заданных длинах волн и состоят из 2 основных блоков: теплового и оптического.

Оптический блок у амплификаторов различается. Для передачи световых потоков используется геометрическая оптика (линзы, зеркала) и/или оптоволокно. В одних приборах для возбуждения флуоресцентных красителей используется лазерный источник света, в других применяются галогеновые лампы накаливания или наборы светодиодов. Регистрация свечения реализуется с помощью детектора: фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), ПЗС-матриц или фотодиодов. Детектор считывает все оптические данные одновременно или последовательно проводит измерение для каждого образца.

Ряд амплификаторов, таких как прибор AriaMx Real-time PCR System компании Agilent Technologies (США), содержат сменные оптические модули, рассчитанные на различные длины волн возбуждения и детектирования.

Оптический блок амплификатора АНК-32 (ИАП РАН) состоит из источника излучения 1 и приемника излучения 13 (Рисунок 1.2). Между линзами конденсоров 2 и 5 установлены сменные интерференционные светофильтры возбуждения 6 и эмиссии 12.

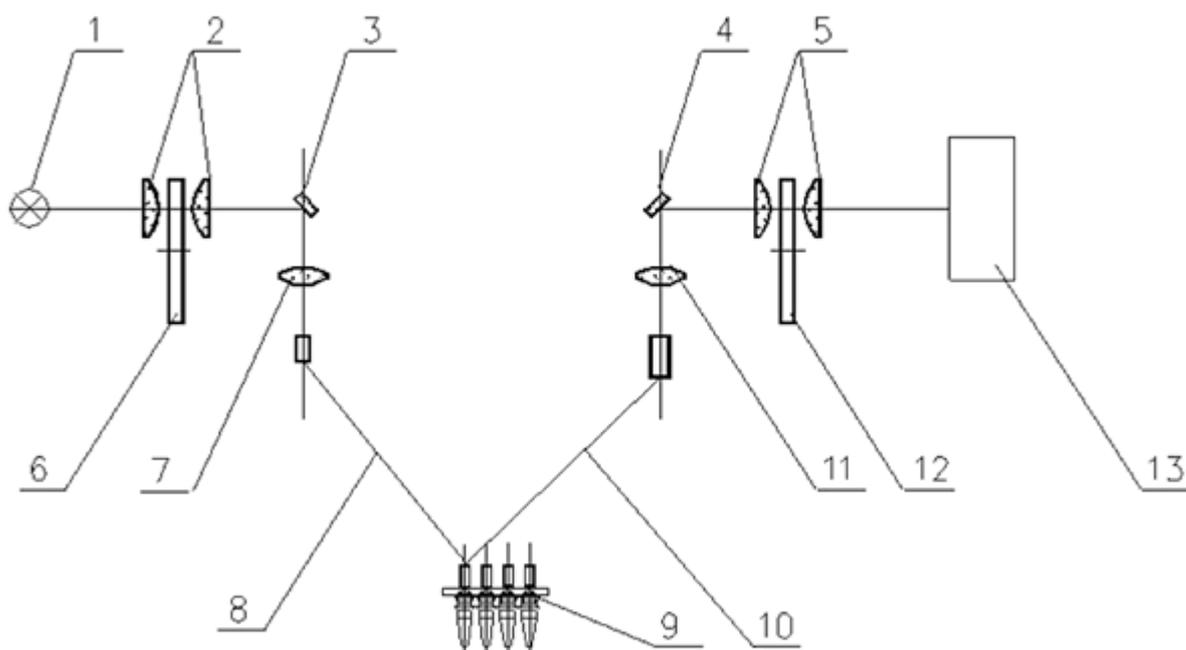


Рисунок 1.2 - Упрощенная оптическая схема амплификатора АНК-32 [39]

Для передачи света возбуждения от источника 1 и детектируемых излучений флуоресцентного отклика от пробирок 9, расположенных в тепловом блоке амплификатора, используются световодные жгуты 8 и 10. Световодные жгуты выполнены в виде оптических волокон с коаксиально расположенными центральной частью для возбуждения реакционной смеси в пробирках и периферийной частью для сбора флуоресценции. Переключение световых пучков между волокнами жгутов обеспечивается с помощью вращающихся зеркал 3 и 4 и линз 7 и 11.

Таблица 1.1 – Технические характеристики приборов для проведения ПЦР в реальном времени

Наименование амплификатора, наименование компании-изготовителя	Количество образцов	Тип пробирок	Объем пробирки, мл	Скорость нагревания / охлаждения, К/с	Однородность температуры по блоку, К	Точность поддержания температуры, К	Способ нагрева/охлаждения	Источник возбуждения флуоресценции	Способ детекции сигнала	Количество каналов детектирования
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
7500 Fast Real-time PCR System, Thermo Fisher Scientific	96	стандартные; для быстрой ПЦР - специальные	0,2	2,5 / 2,5	±0,5	±0,2 5	элементы Пельтье	галогеновая лампа накаливани я	CCD-камера	5
StepOne Plus, Thermo Fisher Scientific	96	специальные	0,1	2,2 / 2.2	±0,5	±0,2 5	элементы Пельтье	синий светодиод	фотодиоды	4
Rotor-Gene Q 6plex, Qiagen	36; 72	Стандартные; специальные	0,2; 0,1	15,0 / 20,0	±0,02	±0,5	воздушный термостат	шесть LED	шесть фотодиодов	6
CFX 96, Bio-Rad Laboratories	96	стандартные	0,2	5,0 / 3,3	±0,4	±0,2	элементы Пельтье	шесть LED	шесть фотодиодов	5
Stratagene MX3005P, Agilent Technologies	96	специальные	0,2	2,5 / 2,5	±0,2	н/д	элементы Пельтье	галогеновая лампа накаливани я	ФЭУ	5

Наименование амплификатора, наименование компании-изготовителя	Количество образцов	Тип пробирок	Объем пробирки, мл	Скорость нагрева / охлаждения, К/с	Однородность температуры по блоку, К	Точность поддержания температуры, К	Способ нагрева/охлаждения	Источник возбуждения флуоресценции	Способ детекции сигнала	Количество каналов детектирования
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
The LightCyclerR 480-II, Roche Holding	96	стандартные	0,2	4,4 / 2,2	±0,2	±0,2	элементы Пельтье	белый светодиод	CCD-камера	4
MIC, Bio Molecular Systems	48	специальные	0,1	4,0 / 3,0	±0,05	±0,2 5	нагрев за счет магнитной индукции, воздушное охлаждение	белый светодиод	CCD-камера	4
AriaMx Real-Time PCR System	96	стандартные	0,2	6,0/3,0	н/д	±0,2	элементы Пельтье	LED	кремниевые фотодиоды	8
АНК-32, ИАП РАН	32	стандартные	0,2	5,0 / 3,5	±0,15	±0,1	элементы Пельтье	белый светодиод	ФЭУ	5 (8)
АНК-48, ИАП РАН	48	стандартные	0,2	5,0 / 3,5	±0,15	±0,1	элементы Пельтье	белый светодиод	ФЭУ	5 (8)
ДТпрайм, ДНК-технология	96; 384	стандартные	0,2; 0,045	3,3 / 2,1	±0,15	±0,2	элементы Пельтье	светодиоды	CCD-камера	4 (5)

Конструкция теплового блока у амплификаторов может кардинально различаться в зависимости от подходов к обеспечению термоциклирования. На это влияют, в частности, используемые емкости с анализируемыми пробами, которые могут представлять собой пробирки, как правило, полипропиленовые, объемом 0,2 мл, капилляры или планшеты для микротитрования. Для подвода теплоты чаще всего используются твердотельные металлические термоблоки из сплавов алюминия или серебра. В некоторых приборах существует возможность замены в базовом модуле реакционных блоков в зависимости от стоящих перед экспериментаторами задач. Например, вместо термоблока на 96 пробирок может быть смонтирован 384-луночный термоблок, вместо полипропиленовых пробирок - стеклянные капилляры.

В первых приборах ПЦР нагрев осуществлялся с помощью резистивных нагревателей, а охлаждение - проточной водой. Известны технические решения, направленные на обеспечение однородности температурного поля, за счет создания теплового блока с матрицей резистивных нагревателей и регулирования мощности каждого из них по показаниям множества соответствующих термодатчиков [40].

В приборе Robocycler американской фирмы Agilent's Stratagene осуществлялось механическое, с помощью манипулятора, перемещение реакционных планшетов между четырьмя металлическими блоками, поддерживающими свою температуру.

Абсолютное большинство современных амплификаторов обеспечивает тепловые режимы элементами Пельтье (Таблица 1.1). Скорости смены температур у таких приборов обычно варьируют от 1 до 5 К / сек. Амплификаторы Biometra TAdvanced от компании Analytik Jena (Германия) обеспечивают скорость нагрева проб до 7,0 К / с за счет дорогостоящего держателя пробирок, выполненного из серебра. В амплификаторе LightCycler® 480, выпускаемом фирмой Roche, используется специальный слой Therma-Base, позволяющий быстро передавать теплоту путем испарения и конденсации, а также серебряный держатель пробирок. Максимальная скорость нагрева образцов составляет 4,4 К / с,

охлаждения - 2,2 К / с [41]. Разработанные в ИАП РАН и серийно-выпускаемые приборы серии АНК имеют термоэлектрический способ обеспечения термоциклирования и превосходят по основным характеристикам амплификаторы других фирм с таким же способом обеспечения. Результаты экспериментальной апробации приборов также сравнимы с конкурентами [42].

Амплификатор Mic qPCR Cycler от компании Bio Molecular Systems (Австралия) за счет индуктивного нагрева пробирок [43], помещенных во вращающийся блок, обеспечивает отличные показатели по температурной точности $\pm 0,25$ К и равномерности $\pm 0,05$ К. Для прибора требуется использование нестандартных пробирок 0,1 мл в стрипах по 4 шт., что увеличивает стоимость эксплуатации. Масса прибора на 48 пробирок не превышает 2,1 кг.

Возможность создания в термоблоке градиента температур, имеющаяся у некоторых моделей, упрощает экспериментальный подбор оптимальных температур отжига праймеров [44].

Альтернативой детектирующим амплификаторам с твердотельным термоблоком и элементами Пельтье служат приборы с конвективным способом обеспечения тепловых режимов, где происходит смена жидкой или газообразной среды в полый реакционной камере.

Известен патент [45], в котором предлагается омывать потоками жидкого или газообразного теплоносителя непосредственно пробирки с образцами, помещенными в полый держателе.

Фирмой The Perkin-Elmer Corporation запатентовано устройство [46], в котором нагрев и охлаждение проб происходит за счет подачи струй воды необходимой температуры на пробирки. При этом каждая пробирка омывается одной струей. Отмечено, что за счет большой скорости струи воды достигается высокое значение коэффициента теплоотдачи от поверхности воды к пробирке.

Фирма AVgene выпускала модель H2OBIT, в которой тепловые циклы обеспечивались за счет попеременного помещения планшета с пробирками между 3 бассейнами с водой различной температуры. Скорость изменения температуры проб превышала аналогичный показатель у других термоциклеров, обеспечивался

анализ до 1534 пробирок одновременно, но масса прибора составляла около 700 кг [44].

При использовании воздуха в качестве теплоносителя скорости смены температур достигают 15 К / с. Однако при этом возникают некоторые трудности, связанные с установкой и поддержанием температуры, а также увеличением габаритов прибора и существенным усложнением его конструкции. Для охлаждения приборов необходима низкая температура окружающей среды, использование приборов в экстремальных условиях, например, в жарких странах затруднительно.

Большинство приведенных в Таблице 1.1 амплификаторов имеют максимальные скорости нагрева 2,5-5 К / с, охлаждения – 2,1-4,6 К / с, прибор Rotor-Gene Q брелх обеспечивает скорости до 20 К / с за счет конвективного способа реализации термоциклирования. Он же обеспечивает наилучшую равномерность температур между пробирками. Сравнение трех способов обеспечения тепловых режимов в современных приборах приведено в Таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Способы обеспечения термоциклирования

Способ обеспечения тепловых режимов	Скорость нагревания, К / с	Скорость охлаждения, К / с	Однородность температуры по блоку, К	Точность поддержания температуры, К
конвективный	15,0	20,0	±0,02	±0,5
термоэлектрический	1,6-4,5	1,6-3,5	±0,15-0,5	±0,1-0,25
индуктивный	4,0	3,0	±0,05	±0,25

Термоэлектрический способ применяется в большинстве современных приборов, но при всех преимуществах, обладает ограниченной теплопроизводительностью, особенно в режиме охлаждения. Количество теплоты, которое выделяет горячий спай, будет больше количества теплоты, которую поглощает холодный спай. Это объясняется эффектами двух типов: распространение тока по элементу Пельтье приводит к джоулевому нагреву, а по

проводникам, из которых состоит цепь, непрерывно идет теплота от горячего спая к холодному за счет теплопроводности [47]. Холодопроизводительность термоэлемента определяется из выражения [48]:

$$Q_{\max} = k_{EMF} \cdot T_c \cdot I - 0,5 \cdot I^2 \cdot R - \lambda_p \cdot (T_c - T_h), \quad (1.1)$$

где k_{EMF} – коэффициент дифференциальной термоЭДС, зависящей от физических свойств материала и его температуры; I – сила тока, А; R – электрическое сопротивление ветвей термоэлемента, Ом; λ_p – коэффициент теплопроводности элемента Пельтье, Вт/(м·К); T_h – температура горячего спая, К; T_c – температура холодного спая, К.

Охлаждающая способность на единицу массы и объема ограничена и составляет до 150 Вт/г и до 100 Вт/см³ соответственно [49] при равной температуре горячего T_h и холодного T_c спая.

Для ряда прикладных задач длительность анализа играет решающую роль, поэтому актуальным является увеличение производительности амплификаторов путем повышения скорости нагрева и охлаждения образцов.

Вторым недостатком термоэлектрического способа является сравнительно большой разброс температур по держателю пробирок.

В настоящее время в ИАП РАН ведется разработка амплификатора серии АНК на 96 проб. Одной из целей диссертации является создание новых технических решений, направленных на улучшение технических характеристик амплификаторов: увеличение скорости изменения температуры проб и компенсация неравномерности температур пробирок.

1.2 Метод плавления ДНК

1.2.1 Основы метода плавления ДНК

Физический процесс плавления молекулы ДНК возникает при изменении ее температуры и связан с процессом перехода состояний «спираль – клубок». Термодинамическая теория перехода ДНК «спираль – клубок» основана на учете разности свободных энергий спирального и клубкообразного состояний [50].

Процесс плавления сопровождается значительным изменением физических свойств исследуемого раствора ДНК, позволяющим проводить анализ: поглощение в ультрафиолетовой части спектра (260 нм) возрастает на 30-40 % [51], а вязкость раствора снижается приблизительно в 12 раз [52].

Современный метод плавления молекулы ДНК реализуется на детектирующих амплификаторах после проведения ПЦР с применением флуоресцентных красителей, интенсивность которых изменяется более чем в 100 раз [53]. Графики плавления (ГП) продуктов амплификации, полученные в результате анализа, представляют собой зависимость величины интенсивности флуоресценции от температуры образца (Рисунок 1.3) и специфичны для конкретного ПЦР-фрагмента.

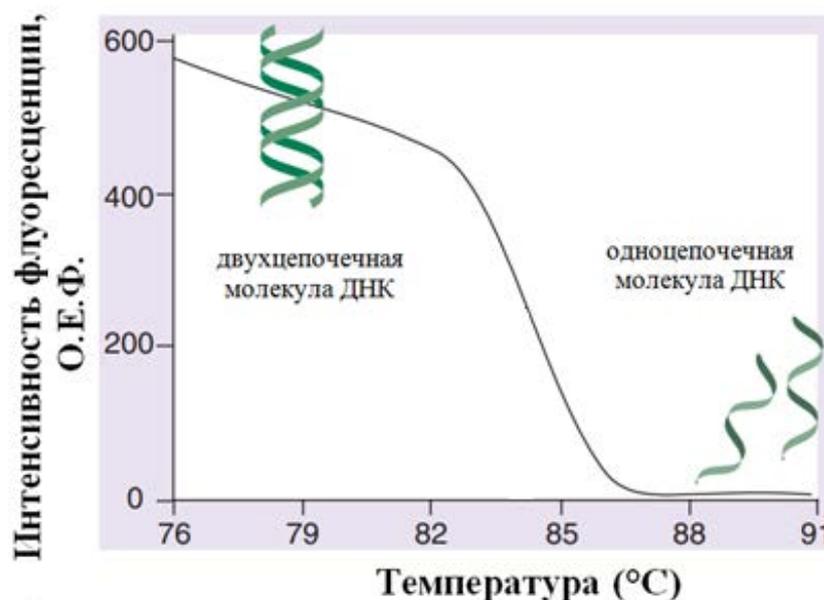


Рисунок 1.3 – График плавления ДНК [53]

На Рисунке 1.4 приведен нормированный график плавления ДНК. Участки графика плавления представляют собой переход от фазы предплавления I (двойная спираль ДНК) через фазу плавления II к базальной интенсивности флуоресценции фазы постплавления III (одиночная спираль ДНК). Интенсивность флуоресценции на фазах постплавления и предплавления в реальных данных непостоянны, в частности, вследствие зависимости интенсивности флуоресценции красителя от температуры.

При вторичной обработке график плавления, как правило, нормируется, выполняется компенсация наклона базовой линии и определяется температура плавления ДНК T_m , как точка перегиба этого графика. Значение температуры T_m соответствует энергетическому состоянию, при котором половина молекул ДНК находится в спиральном, а другая половина – в клубкообразном состоянии [51].

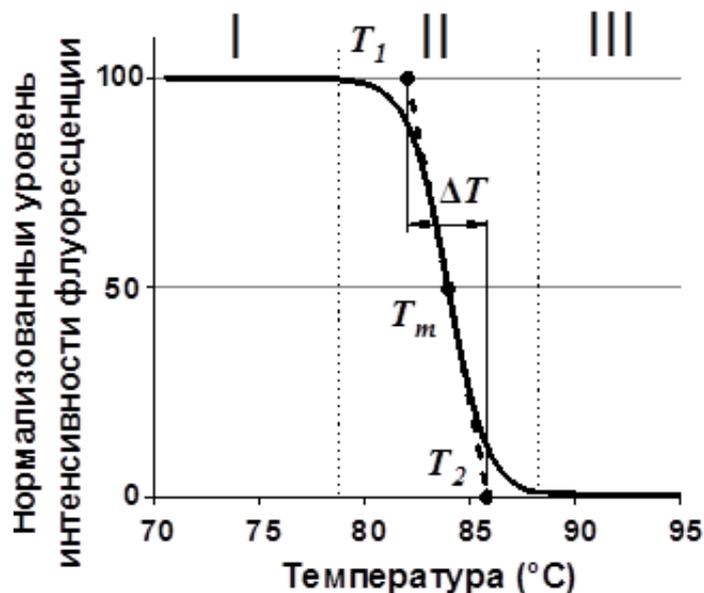


Рисунок 1.4 – Нормализованный график плавления (сплошная линия), касательная к точке перегиба (пунктирная линия) и характерные параметры графика плавления: температура плавления ДНК T_m и ширина интервала плавления ДНК ΔT

Температура плавления T_m зависит от состава фрагмента ДНК, это объясняется энергетическим состоянием ДНК: в паре нуклеотидов G-C имеются три водородные связи, в паре A-T – только две. Поэтому чем больше пар G-C в ДНК, тем более она "тугоплавка" [54]. В 1962 году на основе анализа нескольких десятков образцов [55] была выявлена линейная зависимость между температурой T_m и содержанием GC-пар нуклеотидов $[G + C]$:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \cdot [G + C], \quad (1.2)$$

где $[G + C]$ — содержание нуклеотидов G и C в продукте ПЦР, %.

В этой и следующих моделях константы имеют единицы измерения, обеспечивающие единство размерности всех слагаемых в этих моделях.

На значение температуры T_m оказывают влияние и другие факторы, например, температура плавления фрагмента ДНК обратно пропорционально зависит от длины этого фрагмента [56, 57] и является линейной функцией логарифма концентрации ионов металлов $[K^+]$ и $[Na^+]$ в анализируемом растворе [58, 59]. Эти факторы учтены в следующей модели [60]:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \cdot \lg[K^+] + 0,41 \cdot [G + C] - 675 / L_p, \quad (1.3)$$

где $[K^+]$ — концентрация ионов калия, моль; L_p — длина фрагмента ДНК, пар нуклеотидов (п. н).

Из этой формулы следует, что изменение содержания суммы нуклеотидов С и G на 1 процент вызывает изменение температуры плавления T_m на 0,41 К.

Известна программа *Tm_Tool* [61] для расчета температуры плавления ДНК. В описании программы представлено следующее уравнение для последовательностей ДНК длиннее, чем 50 п. н., при *pH* раствора от 5 до 9:

$$T_m = 81,5 + 41 \cdot \frac{y \cdot G + z \cdot C}{w \cdot A + x \cdot T + y \cdot G + z \cdot C} - \frac{500}{w \cdot A + x \cdot T + y \cdot G + z \cdot C} + 16,6 \cdot \log_{10}([Na^+]) - 0,62F, \quad (1.4)$$

где yG , zC , wA и xT — количество соответствующих нуклеотидов; $[Na^+]$ — концентрация в растворе ионов натрия, моль/л; F — процентная концентрация формамида, %. Видно, что увеличение концентрации формамида линейно снижает температуру [62].

Известны также программы, позволяющие не только вычислять температуру плавления, но и прогнозировать графики плавления: *uMeltSM* [63].

Температура плавления зависит также от *pH* среды, значительно снижаясь при значениях *pH* ниже 5 и выше 9, что связано с эффектами протонирования и депротонирования азотистых оснований в кислой и щелочной средах [64]. Существенно на значение T_m влияет тип и концентрация флуоресцентного красителя. Так, изменение температуры плавления может достигать $(0,7 \pm 0,1)$ К при использовании красителя SYTO-64 и $(10 \pm 0,02)$ К при использовании

красителя SYBR Green I [65]. Зависимость интенсивности флуоресценции свободного красителя от температуры [66] также может влиять на значение температуры T_m .

Зависимость температуры T_m от некоторых из описанных выше факторов является линейной только при неизменных других факторах. Например, концентрация формамида может изменять температуру T_m в диапазоне $2,4 \div 2,9$ °C / моль в зависимости от содержания GC-пар нуклеотидов $[G + C]$ [62]. Такая зависимость значительно усложняет процесс вычисления температуры плавления ДНК.

Известна математическая термодинамическая модель ближайшего соседа [67], предсказывающая температуру плавления (T_m) цепи ДНК на основе кумулятивных стандартных энтальпий (ΔH^o) и стандартных энтропий (ΔS^o) соседних пар нуклеотидов, а также общую концентрацию фрагмента ДНК (C_t):

$$T_m = \frac{\sum_{i=1}^{i=n-1} \Delta H^o}{\sum_{i=1}^{i=n-1} \Delta S^o + \ln\left(\frac{C_t}{4}\right)} - 273,15. \quad (1.3)$$

Вычисленная ошибка предсказания у модели составила $\pm 1,2$ К [68].

График плавления можно охарактеризовать еще одним параметром - шириной интервала плавления ΔT . Ширина интервала плавления ΔT , так же как и температура плавления T_m , зависит от состава фрагмента ДНК [50]. Максимальные значения ΔT соответствуют содержанию GC-пар нуклеотидов около 50 %, а минимальные – около 0 % и 100 %.

Все детектирующие амплификаторы имеют техническую возможность по завершении амплификации провести плавление ДНК, в том числе, для подтверждения наработки целевых продуктов, при известной температуре плавления целевого ампликона. Однако некоторые модели, в частности, Rotor-Gene Q и Rotor-Gene 6000 (Qiagen, США), LightCycler® 480 (Roche, Швейцария), Applied Biosystems® 7500 и 7900 (Thermo Fisher Scientific, США), позволяют выявить более тонкие различия в температурах плавления между различными продуктами с целью обнаружения, например, однонуклеотидного полиморфизма.

Принцип действия таких амплификаторов основан на методе плавления ДНК высокого разрешения (high resolution melting, HRM).

1.2.2 Метод плавления ДНК высокого разрешения

Метод плавления высокого разрешения является методом анализа ДНК, который был разработан в 2002 году благодаря совместным усилиям ученых (University of Utah, США) и представителей промышленности (Idaho Technology, США) [69, 70]. Метод приобрел популярность благодаря простоте, скорости и универсальности: для быстрой детекции мутаций [71, 72], для сопоставления последовательностей и генотипирования мутлиплексов - анализов, которые традиционно требовали обработки продуктов ПЦР электрофорезом или другими способами. По данным агентства Verified Market Research размер мирового рынка HRM достигнет 337,7 млн долларов США к 2028 году с 276,2 млн долларов США в 2020 году, компания Market Research Engine прогнозирует рост рынка до 391 млн долларов США к 2025 году.

Анализ методом HRM проводится после завершения ПЦР-РВ путем регистрации и последующего анализа изменения интенсивности флуоресценции красителей, величина которого изменяется во время изменения температуры с шагом не менее 0,2 К [73]. HRM способен определить различия в последовательностях ДНК по их составу, длине, содержанию GC-нуклеотидов, комплементарности цепи [70] и уровню метилирования.

Метод HRM является неразрушающим методом, таким образом, можно проводить последующий анализ образца с помощью других методов, таких как гель-электрофорез или секвенирование ДНК. Использование метода для решения практических задач многократно доказывало свою эффективность. Метод HRM признан надежным и чувствительным методом в задачах генотипирования, например, гриппа А(Н1N1)pdm09 [74] или патогенных бактерий [75].

Данный метод является общепринятым методом для дискриминации аллелей с целью выявления мутации ДНК, т.к. он удобен и высокоизбирателен для анализа полиморфизма по отдельному нуклеотиду (SNP).

Аmplифицированный образец ДНК, содержащий изначально две аллели, может иметь SNP трех видов:

- «дикий тип», когда ни один из аллелей не содержит мутации;
- «гетерозигота», когда тот или иной аллель содержит мутацию;
- «гомозигота», когда оба аллеля содержат мутацию.

Наличие таких мутаций способно привести к изменению температуры плавления и к изменениям формы графика плавления. Мутации, наблюдаемые у устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, приводят к температурным отклонениям в диапазоне от (0,1 до 1,4 К) [76]. Можно выделить четыре класса единичных нуклеотидных замен с различным сдвигом T_m (Таблица 1.3) [77-81].

Таблица 1.3 - Классы единичных точечных мутаций [77, 81]

Класс единичной точечной мутации (SNP)	Тип замены	Сдвиг температуры плавления T_m , К	Частота возникновения в человеческом ДНК, %
I	C/T и G/A	<0,5	66,2
II	C/A и G/T	<0,5	17,6
III	C/G	0,2 - 0,5	8,8
IV	A/T	<0,2	7,4

Для достоверного определения наличия IV класса единичной точечной мутации необходимо, чтобы погрешность определения температуры плавления была менее 0,2 К.

Метод HRM применяется в эпигенетических исследованиях для определения статуса метилирования фрагментов ДНК. Впервые применение метода плавления ДНК для выявления различий метилированного ДНК от неметилированного было предложено в 2001 году [82]. Использование HRM для определения уровня метилирования впервые упоминается в 2007 году и называется методом MS-HRM (methylation-sensitive high resolution melting, метод плавления высокого разрешения, чувствительного к метилированию) [83]. Метод позволяет выявлять предрасположенность к онкологическим заболеваниям [84], устанавливать биологический возраст человека [85], выявлять различия ДНК

однойцевых близнецов, определять различные особенности эукариотов (например, пол птиц [86]) и т.д. Определение статуса метилирования ДНК конкретной последовательности основано на различиях профилей плавления ее ПЦР-ампликона. Обработка бисульфитом, предшествующая ПЦР-амплификации, создает различие в нуклеотидной последовательности, соответствующее наличию или отсутствию метильных групп. В связи с этим неметилированный цитозин окислительно дезаминируется до урацила (читается как тимин во время ПЦР), тогда как метилированный цитозин остается цитозином, что приводит к заметным различиям кривых плавления.

В статье [87] предлагается использовать короткие олигонуклеотиды в качестве меток, а при декодировании применять HRM.

Метод имеет высокие чувствительность и специфичность: при выявлении множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МЛУ МБТ) чувствительность составляет 80–98,6 % [88], специфичность – 83,3–100 % [77], что определяет HRM как надежный, быстрый, простой, точный и доступный метод. На основании анализа 34 исследований [89] чувствительность метода составила 97,5 % (95 % доверительный интервал (ДИ): 96,8–98,5). Стоит отметить, что ни один из молекулярных методов анализа не имеет 100 % чувствительность и специфичность [77].

Появлению метода предшествовало изобретение новых флуоресцентных красителей третьего поколения. Как демонстрирует Рисунок 1.5, чувствительность анализа с новыми красителями, такими как LCGreen PLUS, Roshe HRM, SYTO 9, многократно превзошла чувствительность с их предшественниками [90].

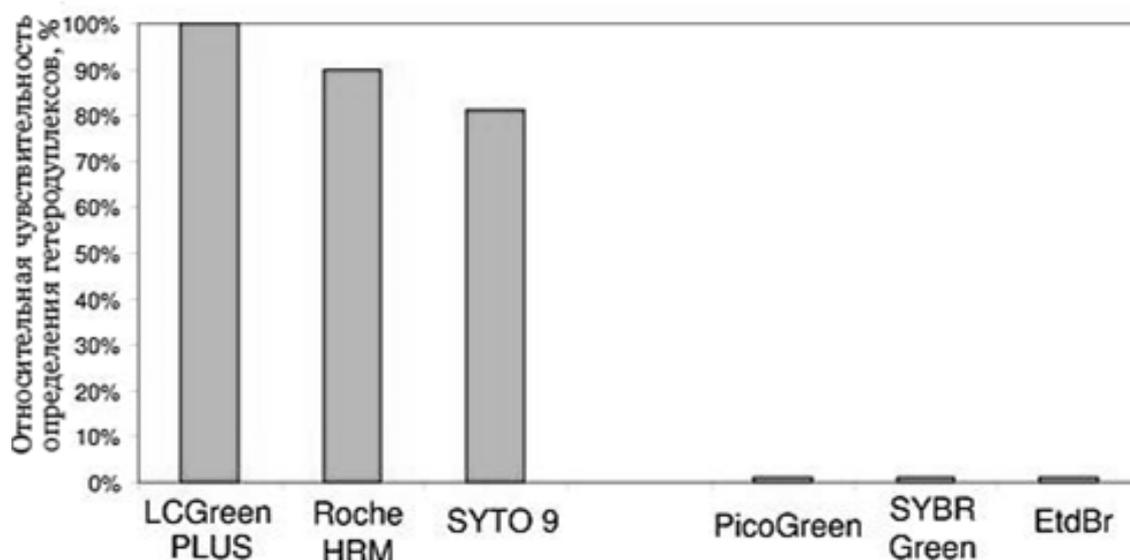


Рисунок 1.5 – Сравнение относительной чувствительности определения гетеродуплексов с различными красителями [90]

На основе анализа 23 различных красителей, для проведения анализа графиков плавления высокого разрешения рекомендуют использовать насыщающие красители EvaGreen [91], LCGreen PLUS и SYTO9 [92]. По результатам сравнения 12 красителей, в том числе, LCGreen PLUS и SYTO9 [93] наиболее эффективными для HRM и в наименьшей степени ингибирующими реакцию ПЦР оказались красители SYTO16 и SYTO13. Ряд исследований [94-96], напротив, показал, что более доступный краситель прошлого поколения SYBR Green не уступает красителям нового поколения, однако такие результаты были получены только на амплификаторе Rotor-Gene 6000.

Существует два режима изменения температуры проб при получении графиков плавления ДНК [97]:

- непрерывный режим, при котором значения интенсивности флуоресценции регистрируются с минимально возможным шагом при постоянном изменении температуры образцов с постоянной скоростью;
- пошаговый режим, при котором значения интенсивности флуоресценции регистрируются в течение каждого температурного шага после достижения заданной температуры.

Непрерывный режим обеспечивает значительную экономию времени, т.к. для обеспечения высокого разрешения, позволяющего различать однонуклеотидные замены фрагментов ДНК, и уменьшения погрешности измерения значения T_m шаг изменения температуры не должен превышать 0,1 °К. При этом увеличивается разброс температур между пробирками, и наблюдается различие температуры пробирок и датчика температуры, что пагубно сказывается на качестве результатов анализа. Наиболее сильно этот недостаток выражен при реализации теплового режима элементами Пельтье [97], применяемыми в большинстве амплификаторов.

В Таблице 1.4 приведено сравнение результатов анализов методом HRM на амплификаторах с различными режимами [97]. Большинство амплификаторов реализуют непрерывный режим изменения температуры проб, скорость изменения температуры у них варьируется от 0,03 до 0,11 К/с. Наименьшими значениями СКО определения температуры плавления обладают амплификаторами с конвективными способами обеспечения тепловых режимов анализа. В большей степени это связано с равномерностью температурного поля, обеспечиваемого такими амплификаторами (Таблица 1.1). Наиболее популярные в решении задач HRM амплификаторы (ABI, LightScanner, LightCycler) обеспечивают СКО около 0,1 К. Такая погрешность позволяет выявить большинство полиморфизмов, например, в [98] описан тест для выявления полиморфизма гена HER2 с использованием анализа методом плавления, доверительный интервал определения температуры плавления для аллелей GG и AA составил $85 \pm 0,14$ К и $82,5 \pm 0,23$ К, погрешность нахождения температуры плавления порядка 0,1 К обеспечит достоверное разделение образцов. Для достижения критериев высокого разрешения амплификаторы серии АНК должны реализовывать анализы методом плавления с погрешностью не более 0,1 К.

При реализации пошагового режима изменения температуры проб у ряда амплификаторов был выбран температурный шаг 0,1 К, это привело к значительным продолжительностям анализа более 65 минут. Актуальным является разработка методик, позволяющих достичь критериев высокого

разрешения при увеличении температурного шага и, соответственно, сокращения длительности анализа.

Таблица 1.4 – Сравнение характеристик амплификаторов в режиме HRM [97]

Название прибора	Структура теплового блока	Режим изменения температуры проб	Количество точек, К ⁻¹	Скорость плавления, К/с	Время проведения анализа, мин	СКО T_m , К
Краситель LCGreen Plus						
ABI: 7000	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	3,1	0,022	27,0	0,117
ABI: 7300	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	2,7	0,036	16,0	0,263
Bio-Rad: iCycler	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	пошаговый	10	0,009	65,0	0,173
Cepheid: SmartCycler	Стекланный капилляр, элементы Пельтье / воздух	непрерывный	10	0,100	5,8	0,065
Corbett: Rotor-Gene 3000	72 пробирки, конвективное термоциклирование воздухом	пошаговый	10	0,008	73,0	0,045
Corbett: Rotor-Gene 6500HRM	72 пробирки, конвективное термоциклирование воздухом	пошаговый	10	0,006	97,0	0,020
Eppendorf: Mastercycler RealPlex4S	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	10	0,012	49,0	0,226
Idaho Technology: HR-1	Стекланный капилляр 1,55 мм, элементы Пельтье	непрерывный	200	0,100	5,8	0,018
Idaho Technology: LightScanner (384)	твердотельный держатель на 384 пробы, элементы Пельтье	непрерывный	12	0,105	6,0	0,096

Название прибора	Структура теплового блока	Режим изменения температуры проб	Количество точек, К ⁻¹	Скорость плавления, К/с	Время проведения анализа, мин	СКО T_m , К
Idaho Technology: LightScanner (96)	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	14	0,100	5,8	0,092
Roche: LightCycler 1.2	32 стеклянных капилляра 1,55 мм, конвективное термоциклирование воздухом	непрерывный	5,2	0,100	5,9	0,045
Roche: LightCycler 2.0	32 стеклянных капилляра 1,55 мм, конвективное термоциклирование воздухом	непрерывный	4,1	0,100	6,5	0,047
Roche: LightCycler 480 (384)	твердотельный держатель на 384 пробы, элементы Пельтье	непрерывный	10	0,090	7,3	0,160
Roche: LightCycler 480 (96)	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	10	0,110	6,3	0,144
Краситель SYBR Green I-						
ABI: 7900HT	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	4,2	0,014	42,0	0,274
Stratagene: Mx3005p	твердотельный держатель на 96 пробирок, элементы Пельтье	непрерывный	1,9	0,030	19,0	0,139
		пошаговый	10	0,009	65,0	0,159

Для амплификаторов серии АНК при проведении анализа методом плавления рекомендован пошаговый режим детектирования. При этом на каждом температурном шаге 0,5 К длительностью 30 секунд регистрируются 8 значений интенсивности флуоресценции от каждой пробирки. Для реализации требований метода HRM необходимо снижение шага как минимум до 0,2 К. При уменьшении

шага значительно увеличивается время анализа, поскольку до получения отсчета интенсивности флуоресценции красителя при каждом шаге необходимо добиться точного установления температуры. При этом сокращается только погрешность дискретизации.

Актуальным является разработка технических решений, направленных на увеличение однородности температурного поля теплового блока усилителя, и методик обработки графиков плавления, позволяющих достичь стандартов метода плавления высокого разрешения при температурном шаге более 0,2 К за счет уменьшения погрешности вычисления температуры плавления ДНК.

1.2.3 Обработка результатов анализов

Традиционно вычисление величины T_m обеспечивается путем реализации операции численного дифференцирования по температуре и определения температуры, соответствующего максимальному значению полученного графика.

Известна программа ANK Shell, в которой для вычисления величины T_m последовательно выполняются операции вычитания постоянной составляющей фона, нормализации графиков, фильтрации и дифференцирования по температуре. Для выполнения первых двух операций необходимо вручную выбрать диапазоны для определения минимальных и максимальных уровней интенсивности флуоресценции. После проведения дифференцирования выполняется определение максимального значения флуоресценции, которому соответствует значение T_m . Дискретность определения значения T_m соответствует шагу изменения температуры.

Компаниями-производителями усилителей разработано специальное программное обеспечение (Таблица 1.5, информация в таблице получена с официальных сайтов компаний-производителей). Большинство программ обрабатывает данные, записанные в определенном формате, и не обеспечивают обработку графиков плавления с усилителями серии АНК. Алгоритмы обработки в этих программах являются закрытыми и лишь частично освещены в

литературе [99]. Известно, что все они требуют предварительной ручной операции нормализации ГП.

Таблица 1.5 - Основные характеристики программного обеспечения для HRM

Параметр	Rotor-Gene ScreenClust HRM Software	Precision Melt Analysis™	High Resolution Melt Software v3.0.1	AriaMx HRM qPCR Software
Определение значения T_m	да	да	да	да
Определение значения ΔT	н/д	нет	нет	нет
Поддержка различных приборов и форматов	нет	нет	да	н/д
Стоимость, руб.	н/д	от 300 тыс.	от 150 тыс.	от 50 тыс.
Производитель	Qiagen, США	Bio-Rad Laboratories, Inc., США	Applied Biosystem, США	Agilent Technologies, США

Для выявления различий в графиках плавления в программе ScreenClust [99,100] используется метод главных компонент (МГК, principal component analysis, PCA) [101]. Известно о применении алгоритмов машинного обучения [102]. В статьях [69, 103, 104] после предварительной нормализации численное дифференцирование графиков плавления выполняли с помощью полиномов Савицкого-Голея второй степени в каждой точке [105], окно данных включало все точки в интервале 1 К. Площади пиков и значения T_m были получены с помощью нелинейной регрессии несколькими гауссианами методом наименьших квадратов.

В описанных программах не приведена информация об алгоритмах вычисления ширины интервала плавления ΔT . Традиционно величина ΔT определяется как расстояние по горизонтали между пересечениями линий максимального и минимального уровня флуоресценции с касательной к точке

перегиба графика плавления [106]. Подобный способ применяется для решения аналогичных задач в смежных областях, например, при плавлении молекулы липида в мембране [107].

Для вычисления величины ширины интервала плавления ΔT известным способом необходимо выполнить нормализацию графика путем построения его в пределах по вертикали от 0 до 1 (Рисунок 1.4).

Известны способы, при которых значение ΔT определяется как разница между температурами, соответствующими 25 и 75 % от максимального уровня флуоресценции на нормированном графике, или как ширина нормированной производной по температуре на полувысоте [108]. Значение ΔT также может вычисляться на основе определения стандартного отклонения [109] или среднего абсолютного отклонения [110] от средней температуры.

Вычисление приведенными способами усложняется наклоном и сдвигом по вертикали базовой линии реального графика плавления, что объясняется, в том числе, температурной зависимостью фоновой флуоресценции [66].

Актуальным является разработка новой методики, позволяющей пользователю достичь требований метода плавления высокого разрешения, сократить время проведения анализа за счет увеличения шага измерения при одновременном уменьшении диапазона температуры и вычислить значение ширины интервала плавления ΔT без определения базовой линии и нормировки графика плавления.

1.2.4 Ограничения метода плавления высокого разрешения

Метод HRM продемонстрировал свою высокую специфичность и чувствительность на практике, как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической диагностике, и по-прежнему намного дешевле, чем более комплексные молекулярные технологии, такие как секвенирование. Весь анализ проводится без дополнительных этапов обработки или разделения, что защищает от контаминации. Однако при проведении эксперимента следует помнить о некоторых ограничениях, которые могут быть неочевидны на первый взгляд.

А) Одной из малоизвестных проблем, влияющих на результаты анализа генотипов на основе HRM, является воспроизводимость дозирования. Решением проблемы может быть жесткий контроль ручных операций или применение автоматических приборов для пробоподготовки.

Б) Амплификаторы имеют высокую погрешность поддержания температуры анализируемых проб, зачастую превышающую 0,2 К, что недопустимо при определении абсолютного значения температуры плавления. Решением может являться применение немеченых олигонуклеотидов в качестве внутреннего контроля температуры [111].

В) Другая проблема связана с вариантами, которые нельзя различить с помощью метода HRM. Известно, что некоторые нуклеотидные изменения могут давать очень похожие графики плавления (Таблица 1.3), особенно при значительных длинах анализируемых фрагментов ДНК [112]. В этой ситуации рекомендуется смешивание образцов для создания гетеродуплексов, так как это увеличивает регистрируемую различия температур плавления.

Г) Наличие в анализируемом фрагменте ДНК более двух мутаций может привести к взаимной компенсации сдвигов температур плавления: при исследовании гена *Candida albicans* ERG11 [113] оказалось, что изучаемые образцы содержали два различных генетических варианта, то есть двойные гомозиготы по ближайшим полиморфизмам внутри одного и того же ампликона. Наличие обеих мутаций не приводило к существенному изменению формы графика плавления.

Процедура оптимизации после ПЦР [114] путем сокращения ампликона и изменения химического состава раствора способно значительно повысить чувствительность и стандартизировать эксперименты по плавлению ДНК, исключив влияние состава буфера на форму графика плавления. Однако данный подход предполагает проведение анализа в «открытой пробирке», что значительно усложняет и уменьшает производительность анализа и может привести к контаминации.

Расхождение графиков плавления может быть усилено до детектируемого уровня посредством уменьшения длины анализируемого ампликона, а также добавлением плазмидной ДНК известного генотипа к анализируемым образцам [25].

Достижение высокого разрешения при реализации метода плавления требует обеспечения равномерного температурного поля теплового блока амплификатора, т.к. различие температур плавления образцов будет пропорционально различию температур пробирок. Для измерения тепловых параметров амплификаторов применяют различные методы.

1.3 Методы измерения тепловых параметров амплификаторов

Основными тепловыми параметрами амплификаторов 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 при измерениях контактным методом используются термометры сопротивления и термоэлектрические преобразователи (термопары) [115]. Технические характеристики средств контактного измерения регламентируются стандартами ГОСТ 6651-78 для термометров сопротивления и ГОСТ 3044-77 для термопар.

Существенным недостатком контактных методов является инертность, вызванная массивностью датчика. 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 [116, 117]. Эти методы неприменимы в условиях отсутствия визуального доступа, а также для определения температуры прозрачных тел.

Известны такие методы, как термометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), СВЧ-радиотермометрия и акустотермометрия [118]. Эти методы имеют значения погрешностей $\pm 0,2$ К, $\pm 0,2$ К и $\pm 0,3$ К 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) [119]. Эти методы позволяют определять температуру по зависимости уровня флуоресценции от температуры красителя и, соответственно, измеряемой среды. Погрешность измерений у этих методов составляет порядка $\pm 1,25$ К. Существует метод на основе индодикарбоцианинового флуоресцентного красителя Cy5, в котором погрешность измерения температуры на точку составила $\pm 0,33$ К [120, 66]. Известны методы измерения температуры по флуоресцентному красителю Сульфородамин-101 (SR101) в 2 диапазонах длин волн [121]. Такой метод позволяет обеспечить погрешности $\pm 0,78$ – $0,93$ К. При использовании метода измерения температуры по 2 флуоресцентным красителям RhB и SR101 достигается погрешность измерения $\pm 0,48$ – $0,59$ К [121].

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 амплификатора.

Известна методика для определения разброса температур по лункам на основе линейной аппроксимации сигналов флуоресценции с применением

флуоресцентных зондов, входящих в состав реакционные смеси РС «АМТЕтест» (FAM-ROX), производства ЗАО «Синтол» (г. Москва) [122]. Для флуоресцентного красителя ROX используется шаблон с регистрацией сигналов флуоресценции при температурах 303; 346,5; 347,5; 348,5 и 358 К с выдержкой на каждой температуре до 160 секунд. Усредненные значения интенсивности флуоресценции при температурах 303 и 358 К используются при нормировании соответственно по фону и по максимуму. На основе величин интенсивности флуоресценции при температурах 346,5, 347,5 и 348,5 К определяется разброс температур по лункам. Преимуществом этой методики можно считать высокую температурную зависимость (порядка 15 % K^{-1}) и сравнительно короткое время регистрации сигналов (порядка 25 минут). Недостатком этой методики можно считать отсутствие шкалы абсолютной температуры лунок и высокую погрешность определения температур.

1.4 Основные результаты главы 1

Обзор и анализ литературных источников показали, что одними из наиболее популярных в практическом применении методов генетического анализа являются методы ПЦР-РВ и HRM, реализующиеся на детектирующих амплификаторах.

Длительность и достоверность результатов анализа методом ПЦР-РВ во многом зависят от его приборной реализации. Одним из основных направлений развития приборной базы ПЦР-РВ является совершенствование теплового блока амплификаторов с целью увеличения скорости нагрева/охлаждения анализируемых проб и уменьшения разброса температур между пробами. Последнее актуально и для метода плавления ДНК высокого разрешения. Высокое разрешение этого метода необходимо для достоверного определения малых различий температуры плавления T_m образцов: при замене одного нуклеотида различие T_m может составлять менее 0,2 К. Обеспечение допустимой погрешности при использовании известных методик предполагает уменьшение температурного шага до 0,1 К, однако при уменьшении шага значительно

увеличивается время анализа. Актуальной задачей является разработка методики обработки графиков плавления для достижения высокого разрешения при изменении температуры с шагом не менее 0,5 К.

Кроме температуры плавления график плавления характеризуется шириной интервала плавления ΔT . Актуальным является создание методики, позволяющей пользователю определять значение ширины интервала плавления ДНК ΔT без определения базовой линии и нормировки графика плавления.

На основании анализа литературных источников можно подтвердить актуальность проводимых в диссертационной работе исследований и выделить следующие тенденции развития и совершенствования детектирующих амплификаторов:

- повышение производительности амплификатора за счет увеличения скорости изменения температуры нагрева и охлаждения проб в циклическом режиме;

- уменьшение неоднородности температурного поля теплового блока;

- разработка методик обработки сигналов плавления ДНК, позволяющих достичь критериев высокого разрешения при уменьшении температурного диапазона и шаге дискретизации сигнала не менее 0,5 К.

2. Совершенствование приборной базы детектирующих амплификаторов

2.1 Разработка технических решений, направленных на измерение и выравнивание неоднородности температурного поля теплового блока амплификатора

2.1.1 Измерение неоднородности температурного поля

Реализация анализа методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также обнаружение небольших различий в температуре плавления при анализе методом HRM возможно только при обеспечении высокой равномерности температур анализируемых проб. Большинство современных детектирующих амплификаторов разрабатывается в виде блочных систем, использующих элементы Пельтье для прецизионного регулирования температуры. Ограничения, связанные с неравномерностью материалов, граничными условиями, различием в тепловой производительности элементов Пельтье и т.д., приводят к тому, что максимальный разброс температур между пробирками в тепловом блоке превышает 0,1 К (Таблица 1.1). Тенденция увеличения количества одновременно анализируемых в амплификаторе проб только усугубляет ситуацию.

Серийно выпускаемые в Институте аналитического приборостроения РАН амплификаторы АНК-32 [39] обеспечивают однородность температуры по блоку, не превышающую 0,15 К [122]. Тепловой блок в составе амплификатора реализует прецизионное изменение температуры образцов при анализе методом ПЦР-РВ в циклическом режиме, например, со значениями статических температур отжига и денатурации 333 и 368 К соответственно, и при плавлении ДНК в режиме пошагового изменения температуры образцов (например, с шагом 0,1 К).

В амплификаторах АНК-32 тепловой режим обеспечивается элементами Пельтье (Рисунок 2.1). Элементы имеют тепловой контакт с держателем пробирок с одной стороны и с радиатором, обдуваемым потоком воздуха от вентилятора с другой стороны. Пробирки с анализируемыми образцами, помещенные в лунки держателя пробирок, сверху прижимаются тепловой крышкой, предотвращающей

образование конденсата на стенках пробирок за счет нагрева, как правило, до 378 К. Тепловая крышка имеет сквозные отверстия, соответствующие каждой пробирке и обеспечивающие прохождение оптических лучей возбуждения и детектируемого флуоресцентного отклика.

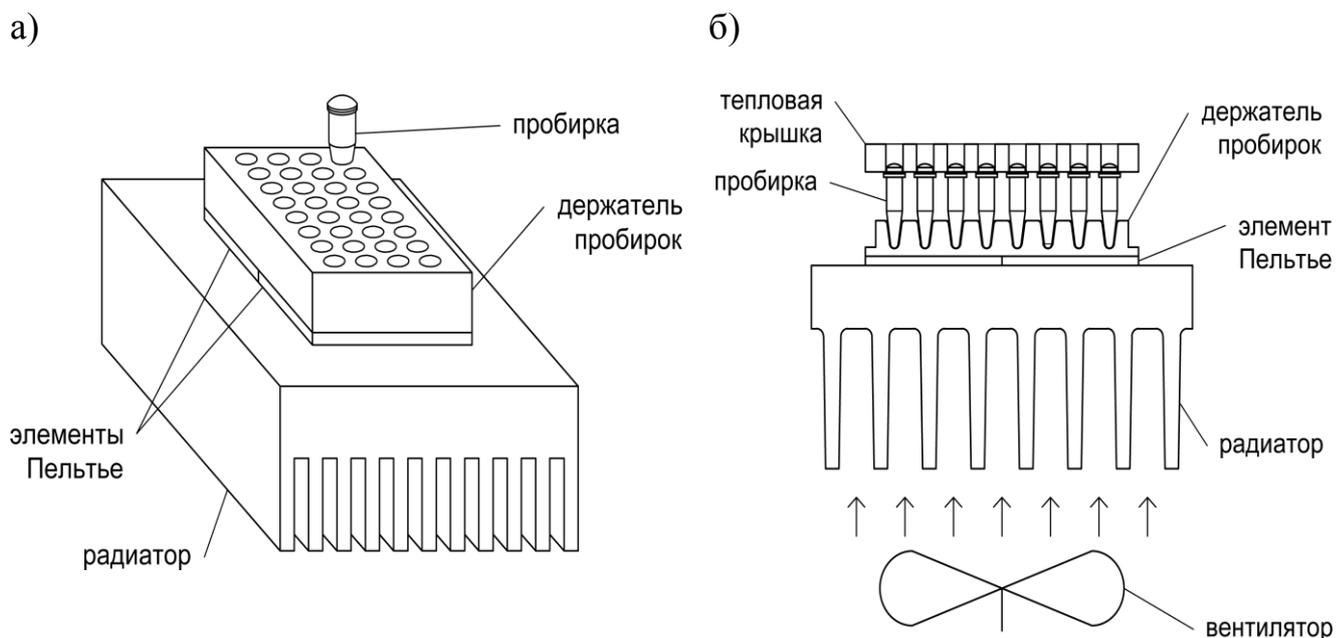


Рисунок 2.1 – Схематическое изображение теплового блока в изометрической проекции (а) и в поперечном разрезе (б)

Для измерения неоднородности держателя пробирок могут быть применены бесконтактные датчики в виде пробирок для ПЦР, содержащие гасимые флуоресцентные зонды. Интенсивность излучения таких зондов изменяется при изменении температуры. Температура плавления T_m зонда соответствует максимальному значению отрицательной производной графика плавления по температуре. Пример графика плавления образцов с флуоресцентными зондами производства ООО «Синтол», полученного на амплификаторе АНК-32 с шагом измерения 0,5 К, и его отрицательная производная по температуре приведены на Рисунке 2.2.

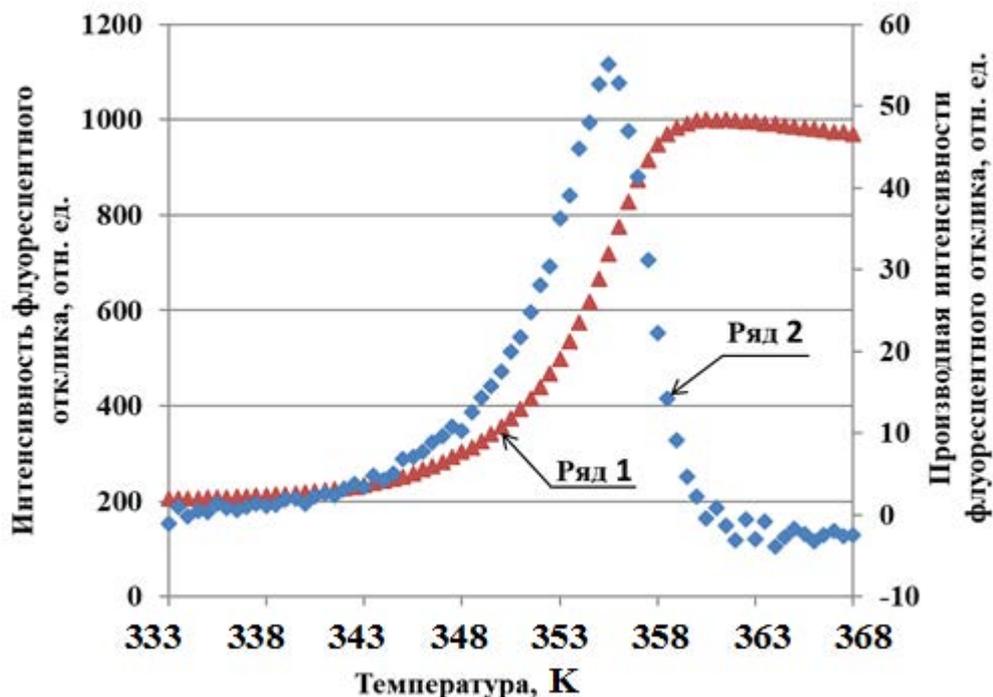


Рисунок 2.2 - График плавения (Ряд 1) и его производная по температуре (Ряд 2)

Для зондов вблизи температуры плавления коэффициент температурной зависимости флуоресценции имеет значительную величину порядка $10\% / \text{К}$, что позволяет определять температуры плавления образцов с относительно низкой погрешностью, которая может быть уменьшена путем применения методик, приведенных в Главе 4 настоящей диссертации.

Полученные значения температур плавления образцов, опосредованно характеризующие распределение температур теплового блока амплификатора, могут быть использованы для компенсации неоднородности температурного поля держателя пробирок.

2.1.2 Компенсация неоднородности температурного поля теплового блока

С целью компенсации неоднородности температурного поля держателя пробирок предложено ввести в состав амплификатора (Рисунок 2.3) корректирующую систему (на рисунке выделена жирной линией), содержащую базу данных, аппроксимирующее устройство, устройство определения тепловых параметров пробирок и устройство корректировки.

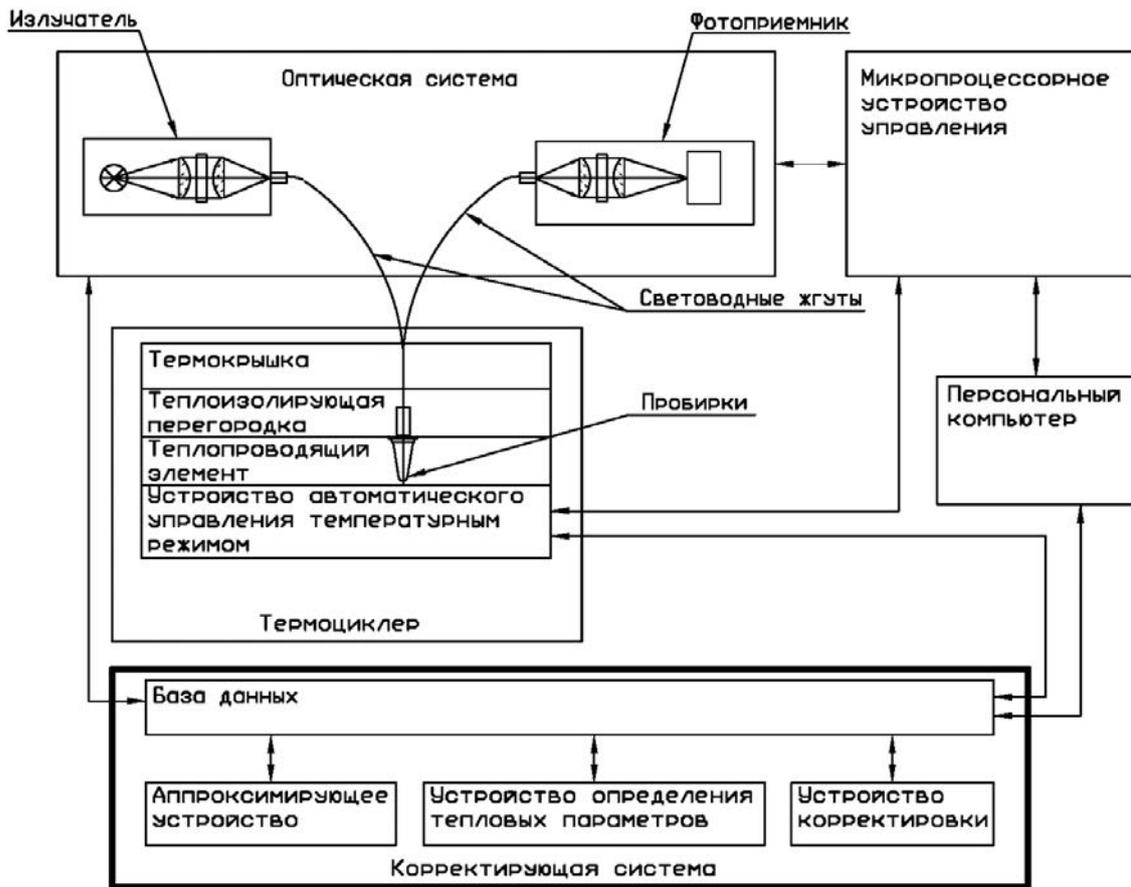


Рисунок 2.3 – Упрощенная схема амплификатора с корректирующей системой и персональным компьютером

Тепловой блок содержит термокрышку, держатель пробирок и устройство автоматического управления температурным режимом. Значения температуры задаются с помощью микропроцессорного устройства управления по программе в персональном компьютере.

Оптический блок имеет источник излучения и фотоприемник, а также двухлинзовые конденсоры, между линзами которых установлены интерференционные светофильтры возбуждения и эмиссии, и световодные жгуты. Исходные «сырые» сигналы кривой плавления передаются в базу данных корректирующей системы.

Корректирующая система используется для предварительного определения отклонения значения температуры каждой пробирки от среднего значения и формирования сигналов управления устройством автоматического управления

температурным режимом для каждого элемента Пельтье.

Аппроксимирующее устройство обеспечивает вычисление производной кривой плавления каждой пробирки по температуре, выполнение операции аппроксимации производной кривой плавления непрерывной функцией, например, полиномом или производной сигмоидальной функции, а также сохранение непрерывной функции в базе данных. Аппроксимация производной кривой плавления непрерывной функцией позволяет значительно уменьшить погрешность определения температуры плавления: исключается погрешность дискретизации, усредняется влияние шумов и компенсируется дрейф нулевой линии. Подробное описание методик аппроксимации производной кривой плавления непрерывной функцией приведено в Главе 4 диссертации.

Устройство определения температурных параметров пробирок обеспечивает нахождение значений температуры плавления T_m флуоресцентного зонда каждой пробирки, а также обеспечивает сохранение этих значений в базе данных.

Гистограмма значений температуры плавления T_m 32 пробирок амплификатора АНК-32 представлена на Рисунке 2.4. Видно, что за счет краевого эффекта пробирки А1, А8, D1 и D8 имеют максимальные значения T_m , что соответствует минимальным значениям температур проб во время процесса плавления ДНК.

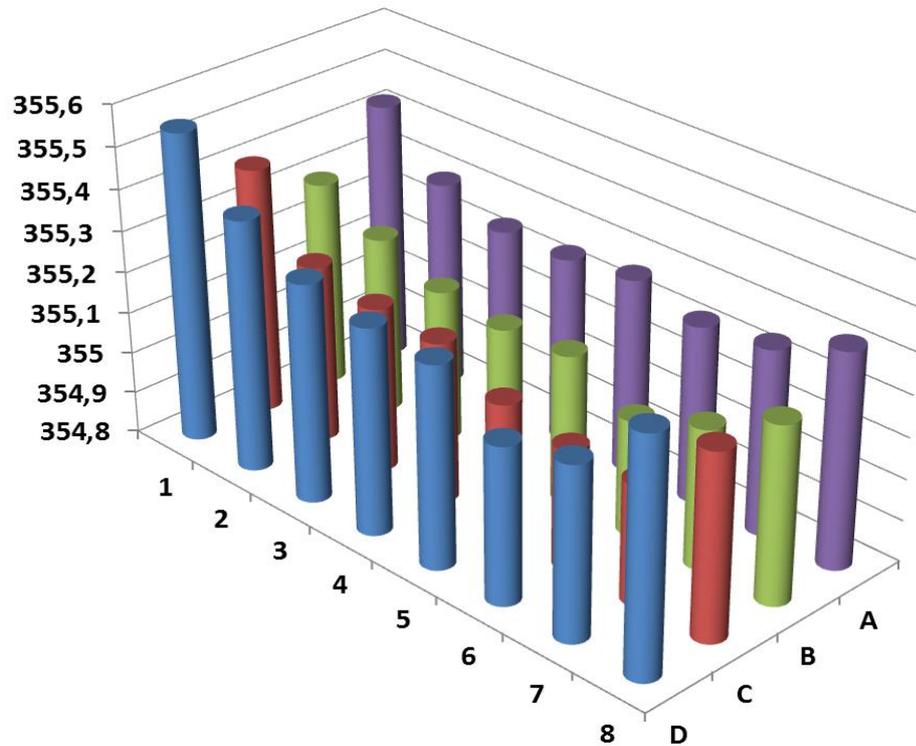


Рисунок 2.4 - Гистограмма значений температуры плавления T_m 32 пробирок.
Вертикальная ось – температура, К

Сохраненные в базе данных значения температуры плавления всех пробирок с помощью устройства корректировки используются для выполнения операций определения среднего значения температурных параметров всех пробирок, сохраненных в базе данных, определения отклонения значения температуры плавления каждой пробирки от среднего значения и среднеквадратического отклонения (СКО) пробирок, формирования сигналов корректировки температуры для устройства автоматического управления температурным режимом, соответствующих среднему значению отклонения температурных параметров пробирок во всех кластерах, количество которых равно количеству элементов Пельтье, а также сохранение сигналов управления в базе данных. При этом значение СКО может служить критерием начальной неравномерности тепловых параметров пробирок.

Все выполненные операции могут быть применены к сигналам нескольких зондов с другими температурами кривых плавления для формирования сигналов корректировки температуры в диапазоне рабочих температур. При этом сигналы

корректировки формируются путем выполнения операции определения средней температуры плавления нескольких зондов.

Сигналы корректировки используются в устройстве автоматического управления температурным режимом для значительного уменьшения различия средних значений температуры пробирок кластеров, относящихся к разным элементам Пельтье. Для этого в устройстве автоматического управления температурным режимом сигнал управления микропроцессорного устройства управления каждого элемента Пельтье изменяется согласно соответствующему сигналу корректировки.

После выполнения корректировки температуры с помощью устройства автоматического управления температурным режимом предлагаемое устройство может использоваться для повторного выполнения определения отклонения значения температуры каждой пробирки от среднего значения и значения СКО температурных параметров пробирок. При этом значение СКО может служить критерием остаточной неравномерности тепловых параметров пробирок.

Сигналы с выходов детектора, микропроцессорного устройства управления и базы данных корректирующей системы поступают на входы персонального компьютера для наблюдения сигналов на экране монитора.

После выполнения корректировки температуры с помощью устройства автоматического управления температурным режимом амплификатор может использоваться для определения температуры плавления исследуемых образцов в каждой пробирке. При этом повторно определенные значения отклонения температуры плавления зонда в каждой пробирке от среднего значения зондов могут использоваться в качестве поправок для уменьшения погрешности определения температуры плавления исследуемых образцов.

Технические решения, приведенные в настоящем разделе, защищены патентом на изобретение RU 2691763 С2 «Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты» от 18.06.2019, патентообладатель – ИАП РАН [20].

2.2 Разработка технических решений, направленных на увеличение скорости изменения температуры анализируемых образцов

2.2.1 Увеличение скорости изменения температуры в режиме охлаждения

Длительность проведения анализа ПЦР-РВ обусловлена, в частности, скоростью изменения температуры анализируемых образцов. В большинстве современных амплификаторов на основе ПЦР для изменения температуры в циклическом режиме применяются термоэлектрические элементы (элементы Пельтье). Скорости нагрева и особенно охлаждения образцов ограничены. Для увеличения скорости изменения температуры в режиме охлаждения предлагается в состав амплификатора ввести термогидравлическую систему, которая обеспечивает дополнительный сток теплоты за счёт протекания жидкости в теле держателя пробирок (Рисунок 2.5).

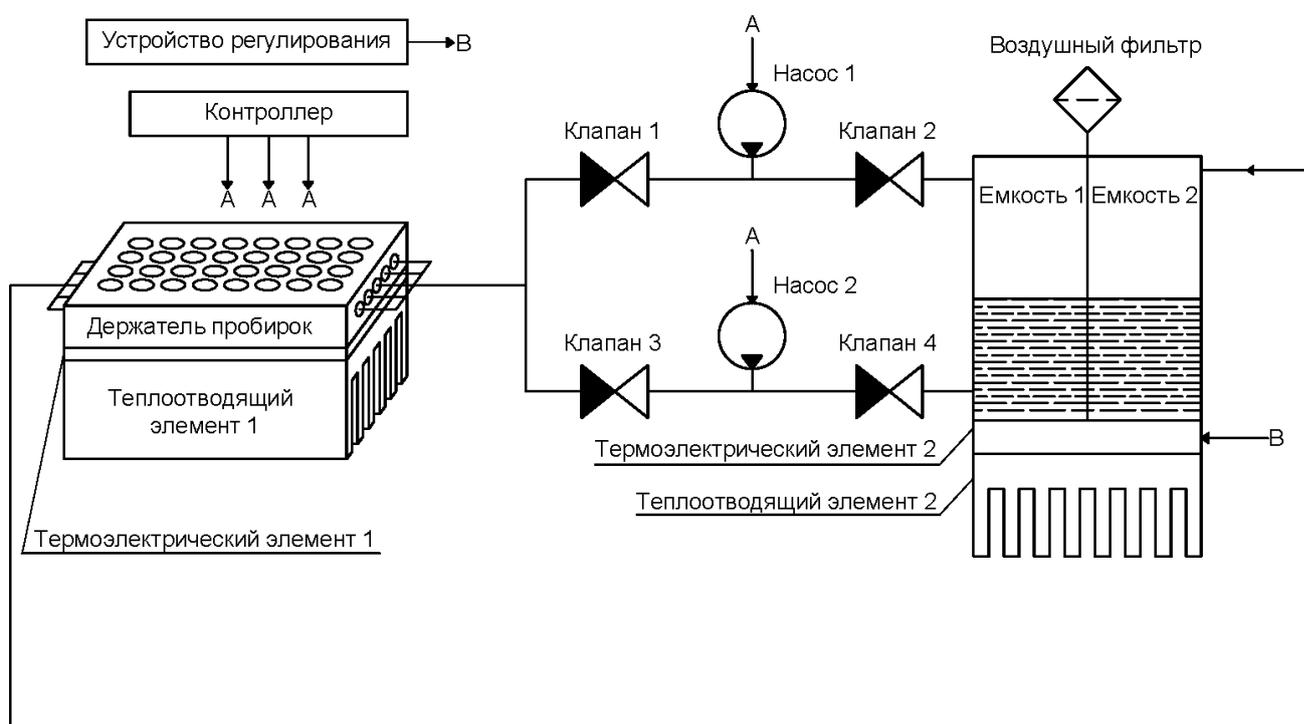


Рисунок 2.5 - Функциональная схема элементов амплификатора с термогидравлической системой

В одном из отечественных патентов [123] матрица для плашек с реагентами, используемых при термоциклировании при проведении полимеразной цепной

реакции, изготовлена из алюминиевого сплава, а между лупками для плашек с реагентами во взаимно перпендикулярных направлениях выполнены пазы треугольной формы (Рисунок 2.6).

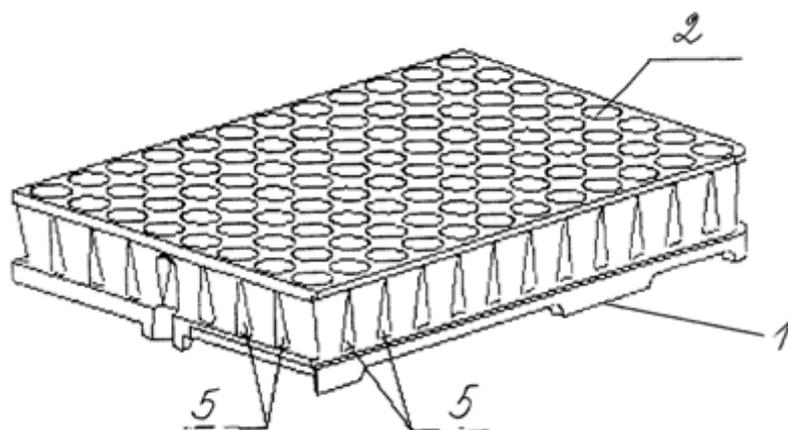


Рисунок 2.6 - Облегчённый держатель для пробирок [123]

В иностранном патенте [124] конструкция держателя для пробирок облегчена сквозными отверстиями в 3 направлениях (Рисунок 2.7).

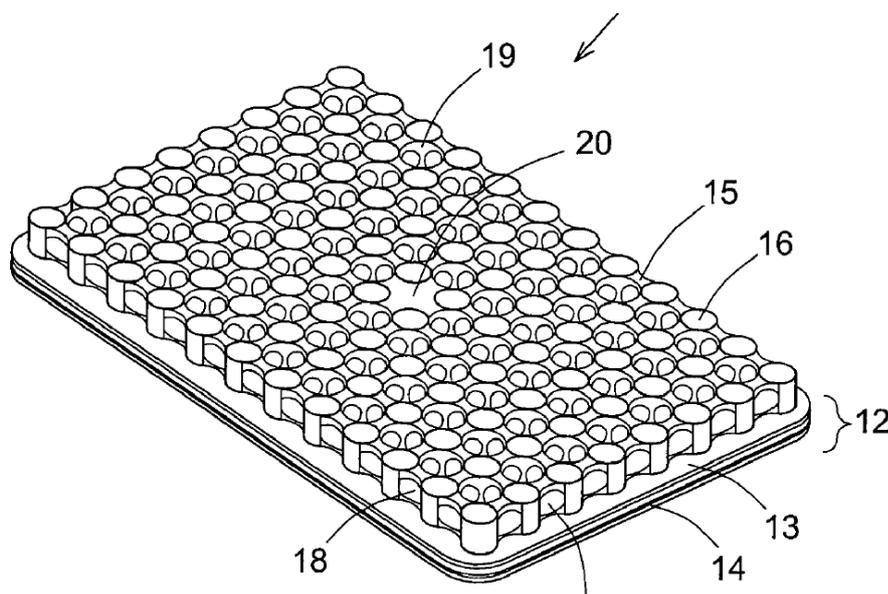


Рисунок 2.7 - Облегчённый держатель для пробирок [124]

В предложенной системе держатель пробирок выполнен с внутренними каналами, которые уменьшают массу и, соответственно, теплоемкость держателя пробирок.

В режиме охлаждения насос 2 через клапаны 3 и 4 обеспечивает заполнение жидкостью и ее протекание через каналы держателя пробирок. В конце режима охлаждения насос 2 останавливается, а насос 1 через клапаны 1 и 2 обеспечивает удаление жидкости из каналов держателя пробирок в емкость 2. Через отверстия в перегородке выравниваются уровни жидкости в емкостях 1 и 2. Температурные циклы многократно повторяются.

При всех температурных режимах работают термоэлектрические элементы. Температура заполняющей емкости жидкости с помощью радиаторов поддерживается на уровне температуры окружающей среды. При протекании жидкости через внутренние каналы теплопроводящего элемента активно происходит теплообмен между нагретым теплопроводящим элементом и жидкостью, обладающей значительно меньшей температурой.

В режимах стабилизации температуры на нижнем уровне, нагрева и стабилизация температуры на верхнем уровне жидкость во внутренних каналах теплопроводящего элемента отсутствует. За счет внутренних каналов уменьшаются масса и теплоемкость держателя пробирок и снижается длительность режима нагрева.

Предложенная конструкция термогидравлической системы направлена на увеличение скорости изменения температуры в режиме охлаждения и повышение быстродействия и производительности амплификатора путем сокращения времени анализа.

Известно [125], что надежность электронных компонентов в составе сложных радиоэлектронных устройств напрямую зависит от коэффициента электрической нагрузки элемента. С целью повышения надежности коэффициенты нагрузки элементов выбирают значительно меньше единицы [126]. Таким образом, дополнительное охлаждение делает возможным уменьшение мощности элементов Пельтье и, соответственно, увеличение их надежности. Это особенно актуально для амплификаторов с количеством пробирок более 48, чей тепловой режим обеспечивают шесть и более элементов Пельтье.

Численная оценка результатов применения предложенной конструкции выполнена в главе 3 настоящей диссертации.

2.2.2 Компенсация неоднородности температурного поля теплового блока

Одной из основных причин увеличения погрешностей измерения температуры плавления ДНК является разность температур соседних пробирок за счет неравномерности температурного поля держателя пробирок. Для решения задачи выравнивания температуры пробирок в режиме плавления предложено дополнение к термогидравлической системе, приведенной в разделе 2.2.1.

Термогидравлическая система дополнительно содержит насос 3 и электромагнитный или обратный клапан 5 (Рисунок 2.8).

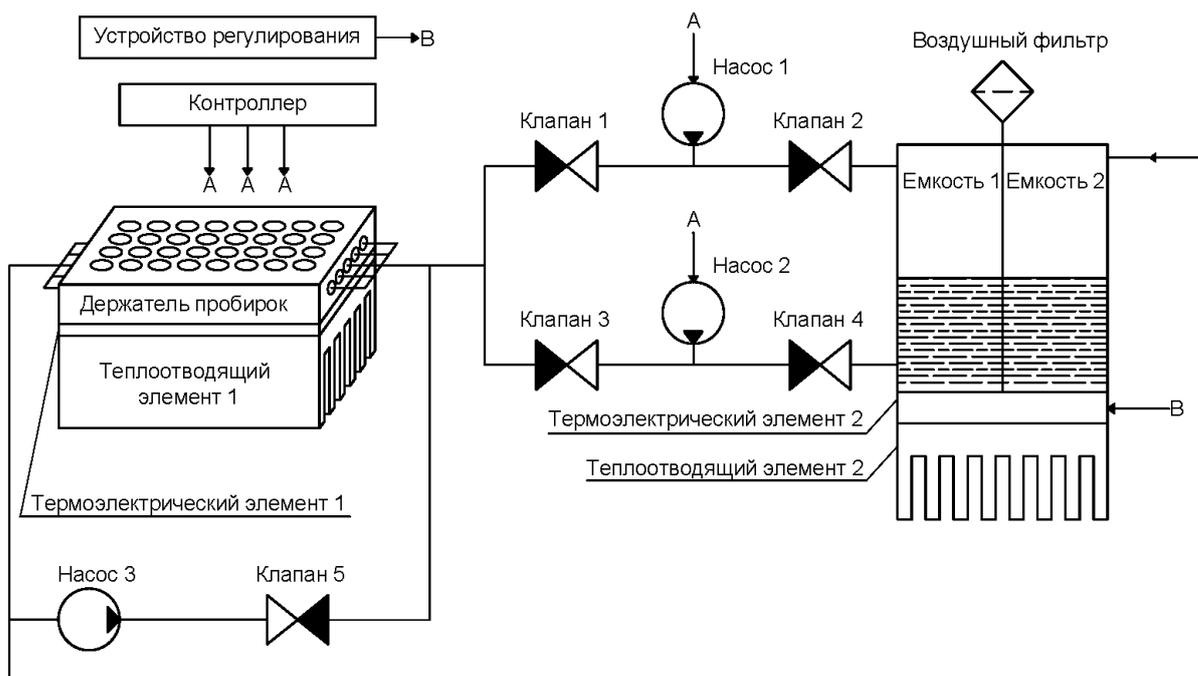


Рисунок 2.8 - Функциональная схема элементов амплификатора с термогидравлической системой

Режим плавления выполняется путем непрерывного или ступенчатого изменения температуры держателя пробирок за счет работы термоэлектрических элементов. С помощью насоса 2 через клапан 3 внутренние каналы держателя пробирок заполняется жидкостью. При протекании жидкости через каналы активно происходит теплообмен между нагреваемым держателем пробирок с

пробирками и жидкостью. Потоки жидкости с выходов внутренних каналов смешиваются. С помощью насоса 3 через клапан 5 жидкость усредненной температуры поступает на входы внутренних каналов держателя пробирок. Круговое движение жидкости в каналах обеспечивает выравнивание температуры всех пробирок, содержащих реакционную смесь, экспериментальное подтверждение приведено в главе 3 настоящей диссертации.

На разработанную конструкцию термогидравлической системы, описанную в разделах 2.2.1 и 2.2.2, получен патент на изобретение [18].

2.2.3 Рекуперативная термогидравлическая система

Для увеличения скорости изменения температуры в циклическом режиме предлагается в состав термогидравлической системы разрабатываемого амплификатора ввести дополнительные элементы, которые обеспечивают дополнительный рекуперативный сток и приток теплоты за счёт протекания в теле держателя пробирок жидкостей. Температуры жидкостей соответствуют значениям температур циклического режима.

На Рисунке 2.9 приведены дополнительные элементы, отсутствующие на Рисунке 2.8: насос 4, клапаны 6 и 7, емкости 3 и 4, термоэлектрические элементы 2 и 3, радиатор 3, устройства управления 2 и 3, а также фильтр 2.

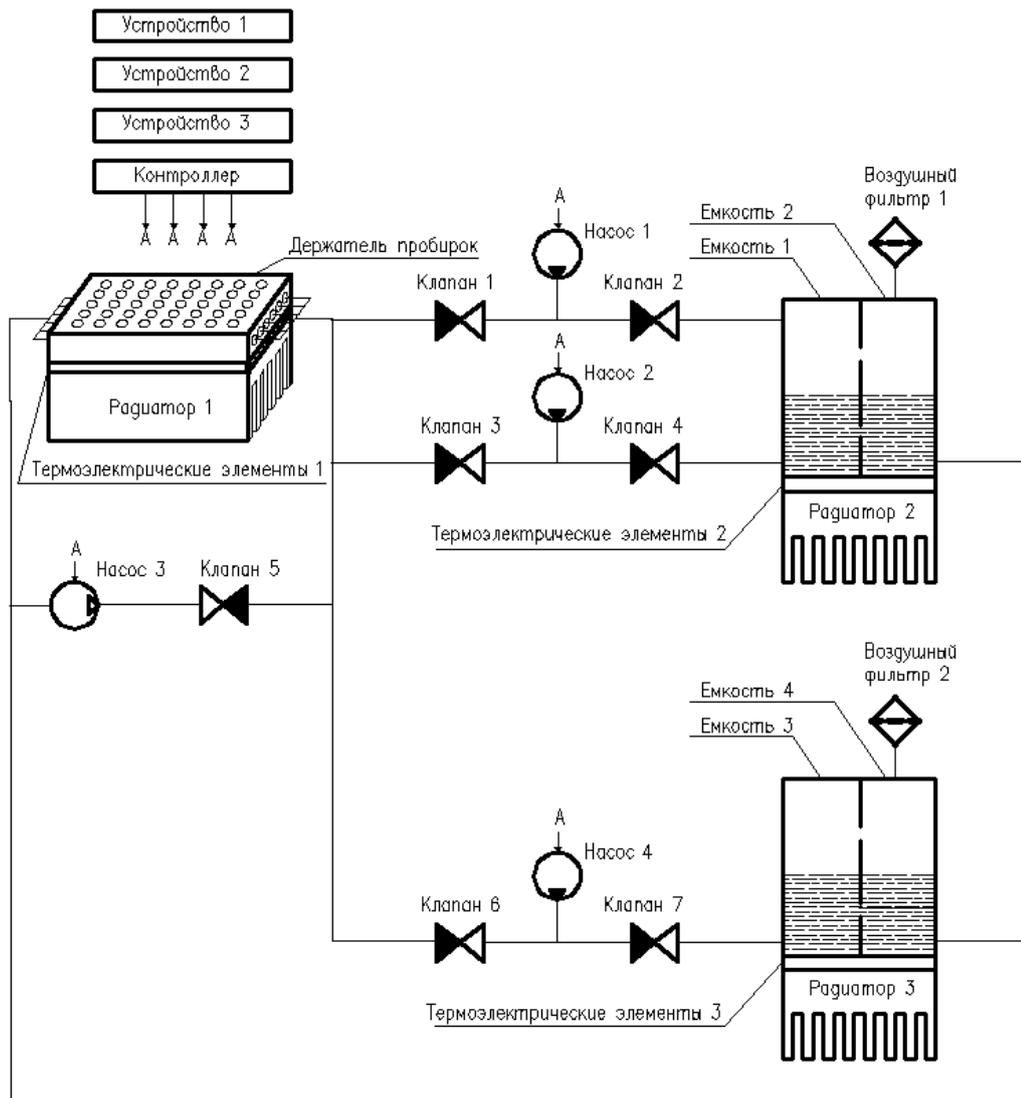


Рисунок 2.9 - Функциональная схема элементов амплификатора с рекуперативной термогидравлической системой

При работе термогидравлической системы в циклическом режиме активно работают термоэлектрические элементы 1, управляемые устройством 1. Термоэлектрические элементы 2, управляемые устройством 2, поддерживают заданную температуру в емкостях 1 и 2 на нижнем уровне, например, 333 К. Термоэлектрические элементы 3, управляемые устройством 3, поддерживают температуру в емкостях 3 и 4 на верхнем уровне, например, 368 К.

Предварительно с помощью контроллера насосы 1 и 2 через клапаны 2 и 4 заполняются с выходов емкости 1 соответственно воздухом и жидкостью, а насос 4 через клапан 7 заполняется жидкостью с выхода емкости 3.

В режиме охлаждения и стабилизации температуры на нижнем уровне насос 2 через клапан 3 обеспечивает заполнение жидкостью и проточный режим каналов держателя пробирок. С выхода каналов жидкость поступает в емкость 2 и через отверстия в перегородке восполняет потерю жидкости в емкости 1. В конце режима охлаждения насос 2 останавливается.

В режиме нагрева и стабилизации температуры на верхнем на верхнем уровне насос 4 через клапан 6 обеспечивает замену жидкости в каналах держателя пробирок и проточный режим. С выхода каналов жидкость поступает в емкость 4 и через отверстия в перегородке восполняет потерю жидкости в емкости 3. В конце режима нагрева насос 3 останавливается. Затем температурные циклы многократно повторяются.

При протекании жидкости через внутренние каналы теплопроводящего элемента активно происходит теплообмен между держателя пробирок и жидкостью. Длительность циклического режима значительно снижается, при этом сокращается общее время анализа. Одновременно происходит выравнивание температурного поля в режиме изменения и стабилизации температуры, при этом уменьшается разброс эффективностей ПЦР в анализируемых пробах.

За счет внутренних каналов уменьшается масса и теплоемкость держателя пробирок, при этом также снижается длительность режимов охлаждения и нагрева.

Выравнивание неравномерности температурного поля предложенной системы в режиме плавления обеспечивается насосом 3 и клапаном 5 аналогично схеме на Рисунке 2.8.

Предложенная термогидравлическая система выполняет функции аналогично системе, приведенной в разделе 2.2.1, и дополнительно направлена на увеличение скорости нагрева пробирок и повышения быстродействия и производительности амплификатора путем сокращения времени анализа.

2.2.4 Рекуперативная термогидравлическая система с воздушным компрессором

Предложен новый вариант термогидравлической системы, схема которой представлена на Рисунке 2.10. Эта система решает задачи, аналогичные системе, описанной в разделе 2.2.3. Главное отличие новой системы заключается в применении компрессора, который по заданной программе через клапаны 1, 4, 5 и 8 создает повышенное давление в емкостях 1, 2 и 3, 4. При этом в этой системе отсутствуют насосы 1, 2 и 4, используемые в системе, представленной на Рисунке 2.9.

За счет управления контроллером по заданной программе клапанами 1-16 происходят операции, аналогичные системе из раздела 2.2.3: заполнение охлаждающей жидкостью из емкости 1 и нагревающей жидкости из емкости 3 внутренних каналов держателя пробирок, компенсация потери жидкости в емкостях, вытеснение жидкости воздухом, выравнивание уровня жидкости в емкостях 1, 2 и 3, 4.

Использование компрессора позволяет уменьшить количество насосов в термогидравлической системе, приведенной в разделе 2.2.4, и, таким образом, увеличить ее надежность.

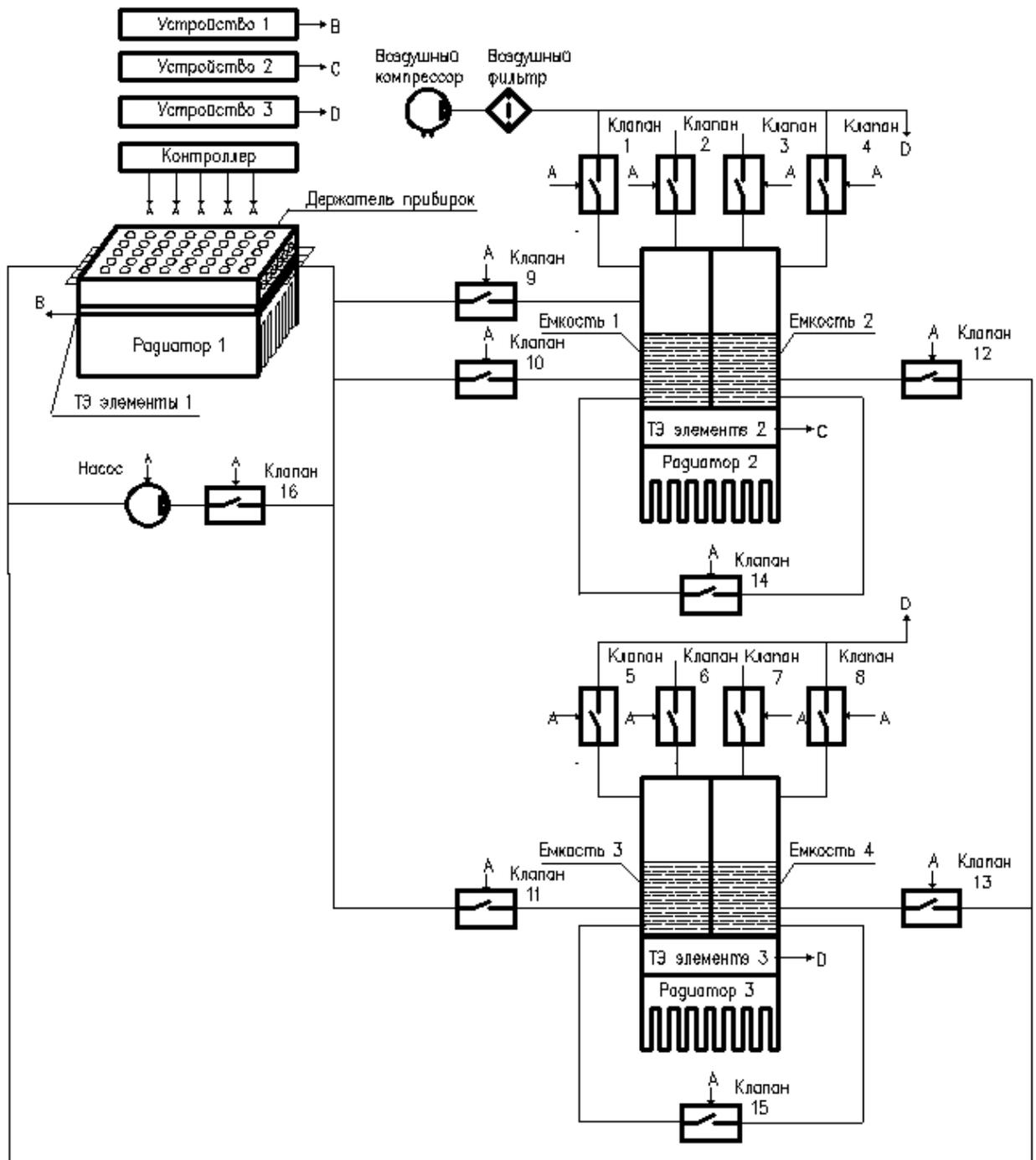


Рисунок 2.10 - Функциональная схема элементов амплификатора с рекуперативной термогидравлической системой с воздушным компрессором

Обеспечение режима плавления реализовано аналогично системе из раздела 2.2.2.

На разработанную конструкцию термогидравлической системы получен патент на изобретение [19].

2.2.5 Сравнение и выбор конструкций термогидравлической системы

В настоящей главе приведено четыре различные конструкции термогидравлической системы. Сравнение систем по ряду параметров приведено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Сравнение разработанных термогидравлических систем

Параметр	Схема термогидравлической системы (номер раздела диссертации)			
	2.2.1	2.2.2	2.2.3	2.2.4
Обеспечение охлаждения	+	+	+	+
Обеспечение нагрева	-	-	+	+
Обеспечение термостатирования	-	+	+	+
Общее количество элементов	13	15	25	31
Количество насосов	2	3	4	2
Наличие рекуперации	-	-	+	+

Термогидравлическая система, приведенная в разделе 2.2.1, является наиболее простой по количеству элементов, однако обеспечивает лишь охлаждение проб. Два дополнительных элемента, включенных в систему, как показано в разделе 2.2.2, позволяют дополнительно выравнять температурное поле в режиме термостатирования.

Варианты исполнения термогидравлической системы в соответствии с разделами 2.2.3 и 2.2.4 обеспечивают нагрев, охлаждение и выравнивание температурного поля при термостатировании. Система по разделу 2.2.3 имеет максимальное количество насосов, наиболее дорогостоящих и ненадежных элементов системы, однако общее количество элементов значительно меньше (на 6 шт.), чем в системе по разделу 2.2.4. Абсолютное преимущество одной системы над другими не является очевидным, окончательный выбор целесообразен на стадии опытно-конструкторских работ (ОКР) при разработке нового амплификатора.

2.3 Основные результаты главы 2

1 Разработана корректирующая система, направленная на компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок амплификатора и основанная на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье и формировании поправок температур проб при повторных анализах по выявленным различиям температур плавления образцов в массиве пробирок. Применение корректирующей системы в составе амплификатора направлено на реализацию анализа методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также обнаружение небольших различий (0,1-0,3 К) в температурах плавления проб при анализе методом HRM, требуемому в задачах генотипирования образцов с близкими профилями плавления. Предложенное техническое решение может быть реализовано в амплификаторах без изменений их конструкции.

2 Предложены варианты реализации термогидравлической системы в составе теплового блока амплификатора, направленные на увеличение скорости изменения температуры анализируемых проб в циклическом режиме и обеспечение выравнивания температуры всех пробирок, содержащих реакционную смесь. Новые технические решения направлены на:

- повышение производительности амплификатора путем увеличения скоростей нагрева и охлаждения анализируемых проб за счет протекания жидкости заданной температуры и ее удаления в каналах держателя пробирок амплификатора;

- компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок за счет циркуляции жидкости в каналах держателя пробирок.

Подобные системы могут быть реализованы в новых амплификаторах, в том числе, планируемом к разработке в ИАП РАН приборе АНК-96.

3 Сравнительный анализ предложенных термогидравлических систем не выявил абсолютного преимущества одной системы над другими, окончательный выбор целесообразен на стадии ОКР при разработке нового амплификатора.

4 Созданные технические решения защищены тремя патентами на изобретение РФ.

3 Исследование рабочих процессов в тепловом блоке амплификатора с термогидравлической системой

3.1 Математическое моделирование рабочих процессов

Разработчики амплификаторов сталкиваются с проблемами оценки технических характеристик оборудования. В основном это связано с отсутствием адекватных математических моделей и методов измерения, позволяющих исследовать динамику температурных полей тепловых блоков с учетом реальной геометрии. Известные исследования охватывают как отдельные элементы теплового блока [127, 128], так и весь блок в целом [31, 129-132], однако ни одно исследование не учитывало влияние параметров термогидравлической системы на рабочие процессы, протекающие в тепловом блоке амплификатора.

Необходимым шагом при разработке нового прибора является формулирование и обоснование математической модели, позволяющей адекватно описать процессы теплопереноса в тепловом блоке, для этого необходимо выбрать расчетную область, сформулировать допущения и условия однозначности (граничные и начальные условия).

3.1.1 Расчетная область

В качестве расчетной области выбрана та часть теплового блока, которая наиболее полно и точно отражает рабочие процессы, при этом, ее размеры сведены к приемлемому минимуму с целью упрощения расчетов (Рисунок 3.1). Предложенные в главе 2 технические решения предполагают наличие дополнительных каналов в держателе пробирок, по которым жидкость протекает в режимах нагрева и охлаждения и циркулирует в режиме термостатирования. Нецелесообразно включать в расчетную область элементы Пельтье, пробирки, тепловую крышку и теплоотводящий элемент, предлагается заменить их влияние граничными условиями. Расчетная область состоит из держателя пробирок Ω_1 , пробирок Ω_2 и реакционной смеси Ω_3 .

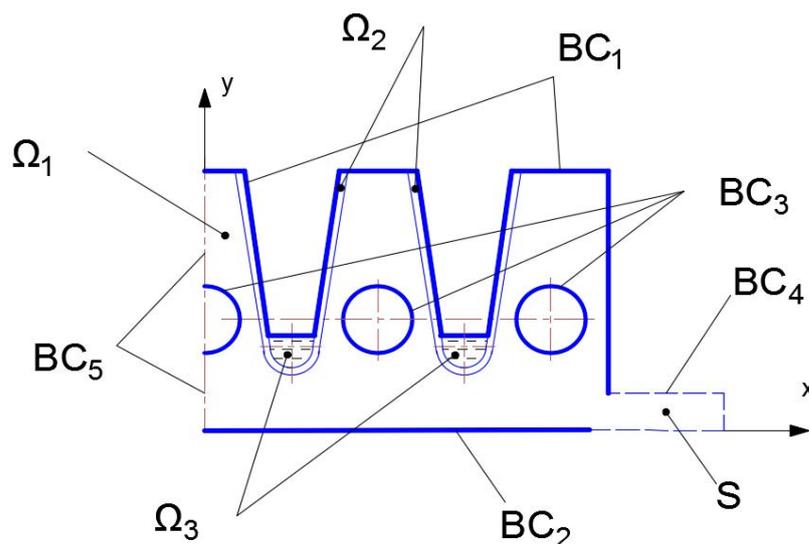


Рисунок 3.1 - Схема расчетной области

Использование двумерной модели не требует значительных вычислительных ресурсов и позволяет оперативно оценивать изменения параметров модели. Решение задачи симметрично относительно центра держателя пробирок вдоль линии, перпендикулярной основанию держателя, позволяет вдвое уменьшить расчетную область.

3.1.2 Математическая модель

Уравнение теплопроводности для нелинейной задачи в двумерной постановке имеет вид:

$$c_{pi}\rho_i \frac{\partial T}{\partial \tau} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda_i \frac{\partial T_i}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\lambda_i \frac{\partial T_i}{\partial y} \right), \quad (3.1)$$

где $T_i = T(\tau, x, y)$ – температура соответствующего элемента, К; τ – время, с; λ_i – коэффициент теплопроводности соответствующего элемента, Вт/(м·К); c_{pi} – удельная теплоемкость, Дж/(кг·К); ρ_i – плотность, кг/м³.

Начальное условие:

$$T_i|_{\tau=0} = T_0, \quad (3.2)$$

Держатель пробирок и пробирки имеют конвективный теплообмен с воздухом (BC_1):

$$-\lambda_i \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_1} = \overline{\alpha_a} (T_i - T_f), \quad (3.3)$$

где T_f – температура окружающей среды, К;

$\overline{\alpha_a}$ – средний по поверхности коэффициент теплоотдачи воздуха со стороны пробирок и держателя пробирок, Вт/(м²·К).

Держатель пробирок контактирует с элементами Пельтье (BC_2). Суммарная тепловая мощность элементов в устройстве АНК-32 регулируется автоматически, при этом поддерживается принятая для дальнейшего расчета скорость охлаждения $q = 1$ К/с. В первом приближении для обеспечения постоянной скорости охлаждения необходима постоянная мощность элементов Пельтье. Таким образом, на границе держателя пробирок и элементов Пельтье принимаются граничные условия II рода:

$$-\lambda_i \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial y} \right) \Big|_{BC_2} = q = const. \quad (3.4)$$

Симметричность рассматриваемого тела позволяет построить математическую модель только для половины области исследования. Ось симметрии при этом является линией граничных условий II рода с нулевым теплообменом (BC_5). Боковые поверхности (BC_4) теплоизолированы, они также имеют граничные условия II рода:

$$-\lambda \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_4, BC_5} = 0. \quad (3.5)$$

По отверстиям в держателе пробирок протекает жидкость (BC_3). Здесь теплообмен описывается граничными условиями III рода, задается зависимость плотности теплового потока за счет теплопроводности со стороны держателя при

температурах поверхности держателя пробирок T_i и жидкости T_f . В случае охлаждения держателя $T_i > T_f$ имеем:

$$-\lambda \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_3} = \frac{\partial \alpha_c}{\partial T_i} (T_i - T_f). \quad (3.6)$$

Коэффициент теплоотдачи α_c не является физической постоянной и зависит от многих факторов: геометрической формы и размеров тела, физических свойств обтекающего его потока, направления и скорости потока, температурных условий и др.

3.1.3 Определение коэффициентов теплоотдачи

Коэффициент теплоотдачи α характеризует интенсивность теплообмена между поверхностью каналов держателя пробирок и протекающей водой и определяется через критериальное уравнение:

$$Nu = \frac{\alpha_c \cdot d_{in}}{\lambda_f}, \quad (3.7)$$

Режим течения жидкости в каналах держателя пробирок определяется числом Рейнольдса, которое вычисляется по формуле [133]:

$$Re = \frac{V \cdot d_{in}}{\nu}, \quad (3.7)$$

V - скорость движения жидкости, м/с; d_{in} - диаметр канала, м; ν - коэффициент кинематической вязкости жидкости, м²/с.

Число Рейнольдса в настоящей постановке задачи соответствует ламинарному течению жидкости – $Re < 2300$.

При ламинарном течении жидкости в каналах возможны два режима движения: вязкостный и вязкостно-гравитационный. Наличие в жидкости разности температур приводит к возникновению подъемной силы, т. е. к существованию наряду с вынужденной конвекцией еще свободной конвекции. Ламинарный режим вынужденной конвекции, при котором влиянием свободной

конвекции можно пренебречь, называется вязкостным. В этом режиме передача теплоты к поверхности канала (и наоборот) осуществляется только теплопроводностью. Вязкостно-гравитационный режим имеет место, когда вынужденное течение жидкости сопровождается естественной конвекцией. В этом режиме теплота передаётся не только теплопроводностью, но и конвекцией.

Для выбора правильного критериального уравнения теплообмена и оценки влияния естественной конвекции на интенсивность теплопередачи при ламинарном режиме необходимо вычислить значение числа Рэлея Ra_f , определяемого числами Прандтля Pr_f и Грасгофа Gr_f , которые являются критериями подобия процессов естественной конвекции [134]:

$$Ra_f = Pr_f \cdot Gr_f. \quad (3.8)$$

Число Грасгофа характеризует соотношение подъемной силы и силы тяжести, вызывающих свободно-конвективное движение жидкости, и определяется по формуле:

$$Gr_f = \frac{g \beta d^3}{\nu^2} \Delta T, \quad (3.9)$$

где g – ускорение свободного падения, м/с^2 ; β – температурный коэффициент объемного расширения при температуре воды, град^{-1} ; d – эквивалентный диаметр канала, м; ΔT – средняя разность температур жидкости и поверхностью канала, К.

Число Прандтля Pr_f характеризует теплофизические свойства жидкости, является табличным значением и принимается в зависимости от ее температуры [135].

В настоящей постановке задачи имеет место вязкостный режим движения жидкости – $Ra_f < 8 \cdot 10^5$. При этом режиме число Нуссельта, характеризующее соотношение между интенсивностью теплообмена за счёт конвекции и интенсивностью теплообмена за счёт теплопроводности, и необходимый для расчёта коэффициента теплоотдачи, определяется по формуле [136]:

$$Nu_f = 1,55 \cdot \left(\frac{Pe \cdot d_{in}}{l} \right)^{\frac{1}{3}} \left(\frac{\mu_f}{\mu_w} \right)^{0,14} \bar{\varepsilon}_l, \quad (3.10)$$

где Pe – число Пекле; l – длина канала, м; μ_f – динамический коэффициент вязкости при температуре жидкости, Па·с; μ_w – динамический коэффициент вязкости при температуре поверхности канала, Па·с; $\bar{\varepsilon}_l$ – поправка на длину канала, определяется в зависимости от режима течения жидкости в канале и от отношения длины канала к его диаметру [137].

При расчетах использовались известные физические свойства воды [135].

Были вычислены значения коэффициента теплоотдачи α_c для различных средних температур и скоростей протекания воды в каналах держателя пробирок, их графики зависимости от разности температур между поверхностью каналов держателя пробирок и протекающей в них жидкостью приведены на Рисунках 3.2-3.4.

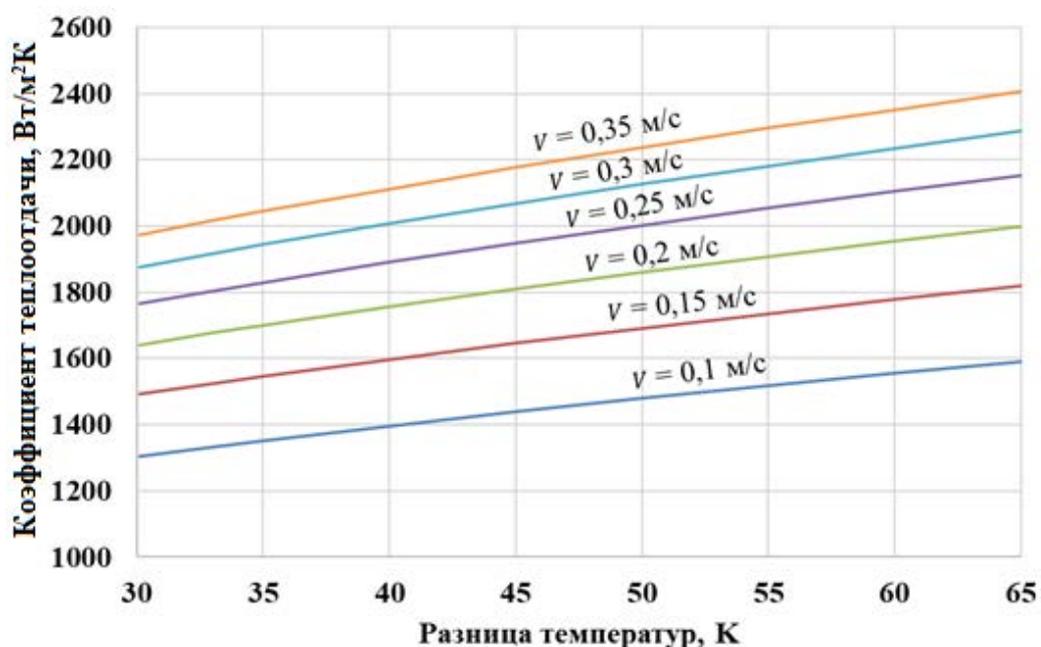


Рисунок 3.2 – Значения коэффициента теплоотдачи при средней температуре воды 303 К

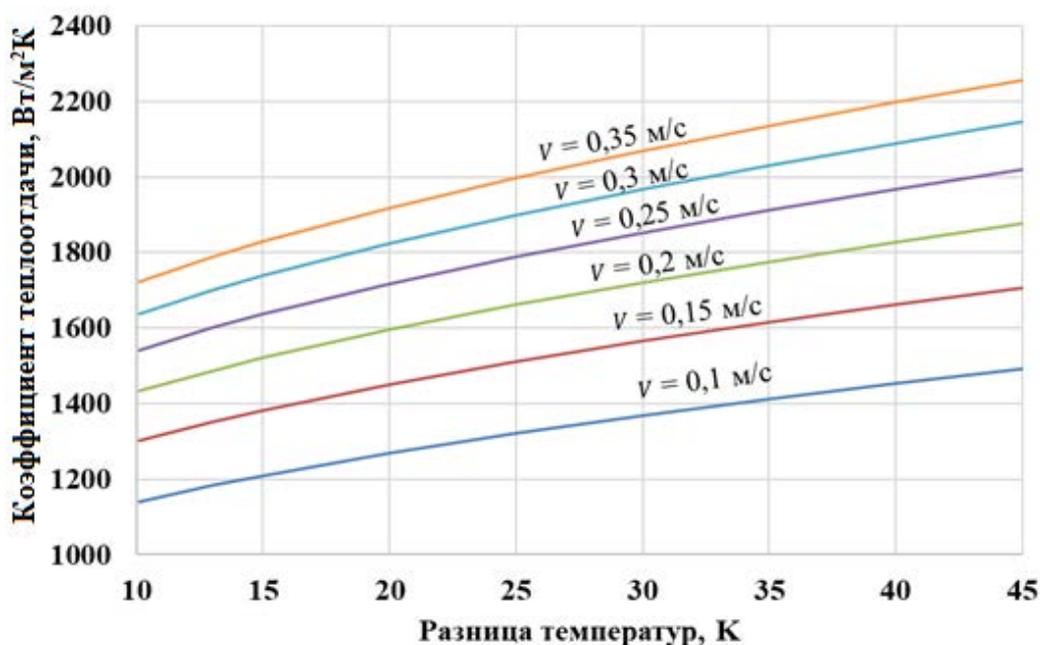


Рисунок 3.3 – Значения коэффициента теплоотдачи при средней температуре воды 323 К

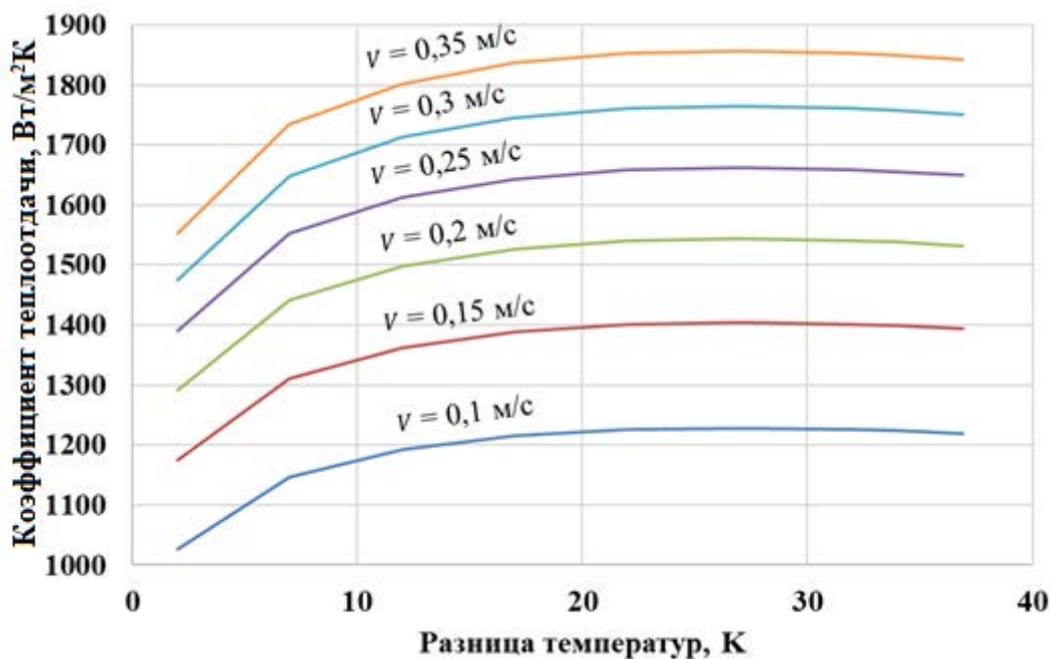


Рисунок 3.4 – Значения коэффициента теплоотдачи при средней температуре воды 370 К

Полученные результаты позволяют применить численные методы для исследования рабочих процессов в широком диапазоне параметров термогидравлической системы.

Выполненные расчеты показали, что значения коэффициента теплоотдачи могут различаться в каждом цикле изменения температуры держателя пробирок до 30 % (Рисунки 3.2-3.4), поэтому целесообразно учитывать изменение его значения при моделировании. Таким образом, расчет динамики процессов численными методами при термоциклировании пробы в тепловом блоке усилителя сводится к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности жидкости λ_{eq} и переменным коэффициентом теплоотдачи α_c .

3.2 Исследования рабочих процессов численными методами

3.2.1 Метод решения задачи

Современным путем создания высокоэффективной техники является использование параметрических численных исследований, которые достаточно адекватно моделируют рассматриваемые физические явления. Наиболее часто при решении задач теплопроводности используются численные методы: метод конечных разностей (МКР) и метод конечных элементов (МКЭ) [138, 139]. Оба метода относятся к классу сеточных методов приближенного решения краевых задач. С точки зрения теоретических оценок точности методы обладают примерно равными возможностями. В зависимости от формы области, краевых условий, коэффициентов исходного уравнения оба метода имеют погрешности аппроксимации.

Основная идея МКР заключается в решении вместо дифференциального уравнения, соответствующего ему уравнения в конечных разностях, которое получается, если производные заменяются их выражениями через разности с большей или меньшей степенью точности, т.е. непрерывная область пространственной переменной заменяется совокупностью дискретно расположенных узловых точек. Главной трудностью при решении задачи теплопроводности МКР является построение правильной разностной схемы.

При использовании МКЭ исследуемая область разбивается с учетом ее геометрических особенностей на отдельные фигуры – конечные элементы.

Исходная функция аппроксимируется кусочно-непрерывной функцией, определенной на множестве конечных элементов. Достоинствами МКЭ по сравнению с МКР являются гибкость и разнообразие сеток, стандартные приемы построения дискретных задач для произвольных областей, возможность более детального (по сравнению с остальными подобластями) разбиения приграничных областей. Кроме того, математический анализ МКЭ является более простым, он применим к более широкому классу исходных задач, а оценки погрешностей приближенных решений, как правило, получаются при менее жестких ограничениях.

Для решения задачи численного исследования тепловых процессов далее используется программный продукт ELCUT[®], который позволяет выполнить моделирование процессов теплопереноса с учётом физических параметров сред и геометрии тел методом конечных элементов.

3.2.2 Реализация численных методов

Для нахождения искомого численного решения задачи непрерывная функция дискретизируется по пространству и времени, двумерная расчетная область покрывается сеткой (Рисунок 3.5).

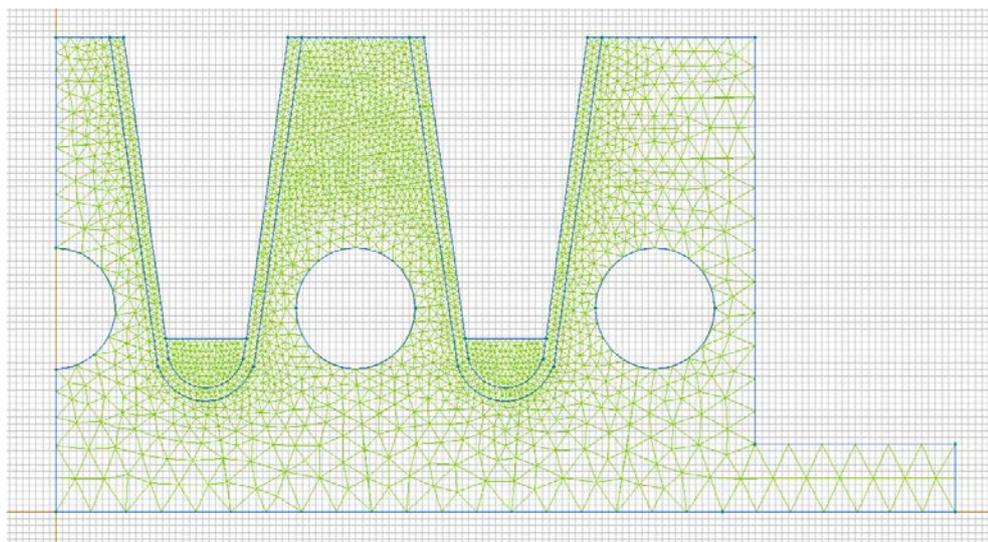


Рисунок 3.5 - Геометрия исследуемого тела с расчетной сеткой

При моделировании предполагалось, что все материалы элементов конструкции однородны по составу и изотропны по свойствам; тепловые

контакты между элементами идеальны. Теплофизические свойства материалов, приведены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Теплофизические свойства материалов

Наименование	Материал	Коэффициент теплопроводности, Вт/(м·К)	Удельная теплоемкость, Дж/(кг·К)	Плотность, кг/м ³
Держатель пробирок	алюминий	230	953	2750
Пробирка	полипропилен	0,22	1930	0,915
Проба	вода	λ_{eq}	983	4182

Естественная циркуляция жидкости в ограниченном пространстве пробирки рассматривается как элементарное явление теплопроводности с введением понятия эквивалентного коэффициента теплопроводности λ_{eq} . Процесс конвективного теплообмена в этом случае сводится к явлению теплопроводности, что исключает из рассмотрения уравнений гидродинамики и существенно упрощает математическое описание теплообмена.

Значением вышеуказанного коэффициента является произведение коэффициента теплопроводности среды λ_{env} и коэффициента конвекции ε_c , характеризующего влияние конвекции на перенос теплоты:

$$\lambda_{eq} = \lambda_{env} \cdot \varepsilon_c. \quad (3.11)$$

Значение коэффициента конвекции ε_c является функцией числа Рэлея Ra_f . При малых значениях Ra_f коэффициент ε_c равен 1, что обуславливает передачу тепловой энергии в жидкости в пробирке только теплопроводностью:

$$Ra_f < 10^3 \rightarrow \varepsilon_c = 1. \quad (3.12)$$

$$10^3 \leq Ra_f < 10^6 \rightarrow \varepsilon_c = 0,105(Ra_f)^{0,3}. \quad (3.13)$$

$$10^6 \leq Ra_f < 10^{10} \rightarrow \varepsilon_c = 0,4(Ra_f)^{0,2}. \quad (3.14)$$

Большие значения числа Рэлея характеризуют снижение теплообмена противоположным взаимодействием, возникающим при движении нагретых восходящих и охлажденных нисходящих потоков жидкости.

Зависимости значений ε_c от средней температуры пробы в диапазоне 333-368 К были определены для различных объемов пробы:

- $\varepsilon_c = 0,0057 \cdot T - 1,1053$ - для пробы объемом 10 мкл;

- $\varepsilon_c = 0,0082 \cdot T - 1,6661$ - для пробы объемом 20 мкл;

- $\varepsilon_c = 0,0107 \cdot T - 2,1584$ - для пробы объемом 30 мкл.

3.2.3 Результаты расчета численными методами

При проведении расчета задавались следующие параметры:

а) объем жидкости в пробирке – 20 мкл;

б) удельная тепловая мощность элементов Пельтье – 26500 Вт/м²;

в) скорость протекания воды от 0 до 0,35 м/с.

На Рисунке 3.6 приведено распределение температур держателя пробирок в конце процесса охлаждения элементами Пельтье, а именно, достижения температуры 333 К в реперной точке S. Заметно, что температура пробы значительно отстает от температуры держателя пробирок и приближается к ней только к 60-й секунде (Рисунок 3.7а).

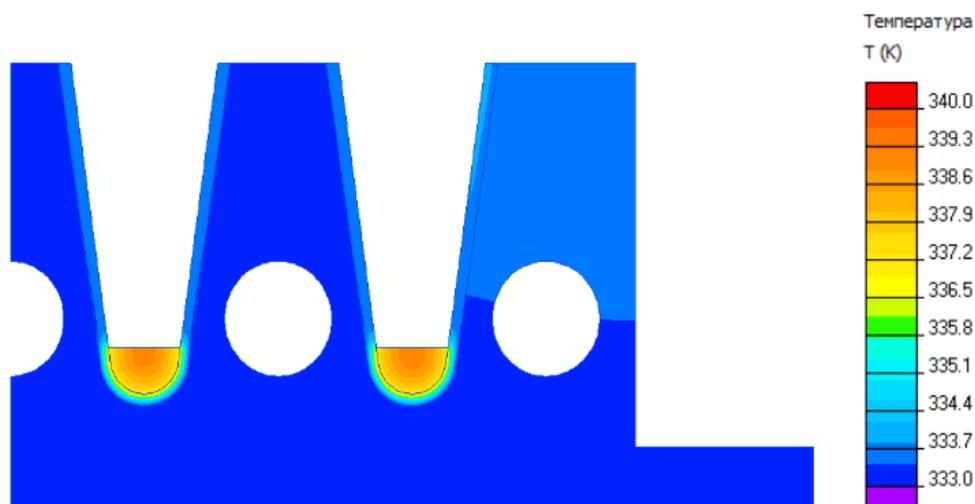


Рисунок 3.6 - Температурное поле держателя пробирок в конце процесса охлаждения элементами Пельтье

Для уменьшения времени достижения заданной температуры пробы используется кратковременное снижение температуры держателя пробирок ниже заданной, тем самым увеличивая градиент температуры. Снижение температуры до 331 К позволяет сократить продолжительность охлаждения пробы до 43 секунд (Рисунок 3.7б).

На Рисунке 3.7в приведены графики изменения температуры при совместном охлаждении элементами Пельтье и жидкостью, протекающей в каналах со скоростью 0,2 м/с. Расчет численным методом был выполнен для различных скоростей и температур охлаждающей жидкости, результаты приведены в Таблицах 3.2 и 3.3. При скорости жидкости 0,35 м/с время охлаждения пробы снижается до 15,9 секунд. Эффективность использования дополнительного охлаждения жидкостью очевидна – время охлаждения снизилось более чем в 2 раза на 27,3 секунды на один температурный цикл. Скорость нагревания при использовании термогидравлической системы несколько ниже, что объясняется меньшей разницей между температурами жидкости и держателя пробирок, чем при охлаждении: при скорости протекания жидкости 0,35 м/с время нагрева снизилось с 43,5 до 27,5 секунд.

При выполнении анализа ПЦР-РВ, который, как правило, составляет 40-50 температурных циклов, применение термогидравлической системы может

обеспечивать значительное сокращение времени: $(27,3 + 16) \cdot 50 = 2165$ секунд или более 36 минут, что составляет около 25 % от общего времени анализа с длительностью термостатирования на верхнем и нижнем температурных значениях по 30 и 60 секунд соответственно.

Таблица 3.2 – Длительность изменения температуры держателя пробирок/пробы в зависимости от скорости протекания и температуры жидкости, с

Режим	Температура воды, К	Скорость протекания жидкости, м/с				
		0	0,1	0,2	0,3	0,35
Охлаждение	303	35/43,2	17,9/34,2	11,5/23,5	7,2/17,2	6,0/15,9
Нагрев	370	35/43,5	24,3/35,2	20,9/31,3	18,1/28,7	17/27,5

Таблица 3.3 – Скорость изменения температуры держателя пробирок/пробы в зависимости от скорости протекания и температуры жидкости, К/с

Режим	Температура воды, К	Скорость протекания жидкости, м/с				
		0	0,1	0,2	0,3	0,35
Охлаждение	303	1,00/0,81	1,95/1,02	3,04/1,49	4,83/2,04	5,87/2,2
Нагрев	370	1,00/0,80	1,44/0,99	1,67/1,12	1,93/1,22	2,06/1,27

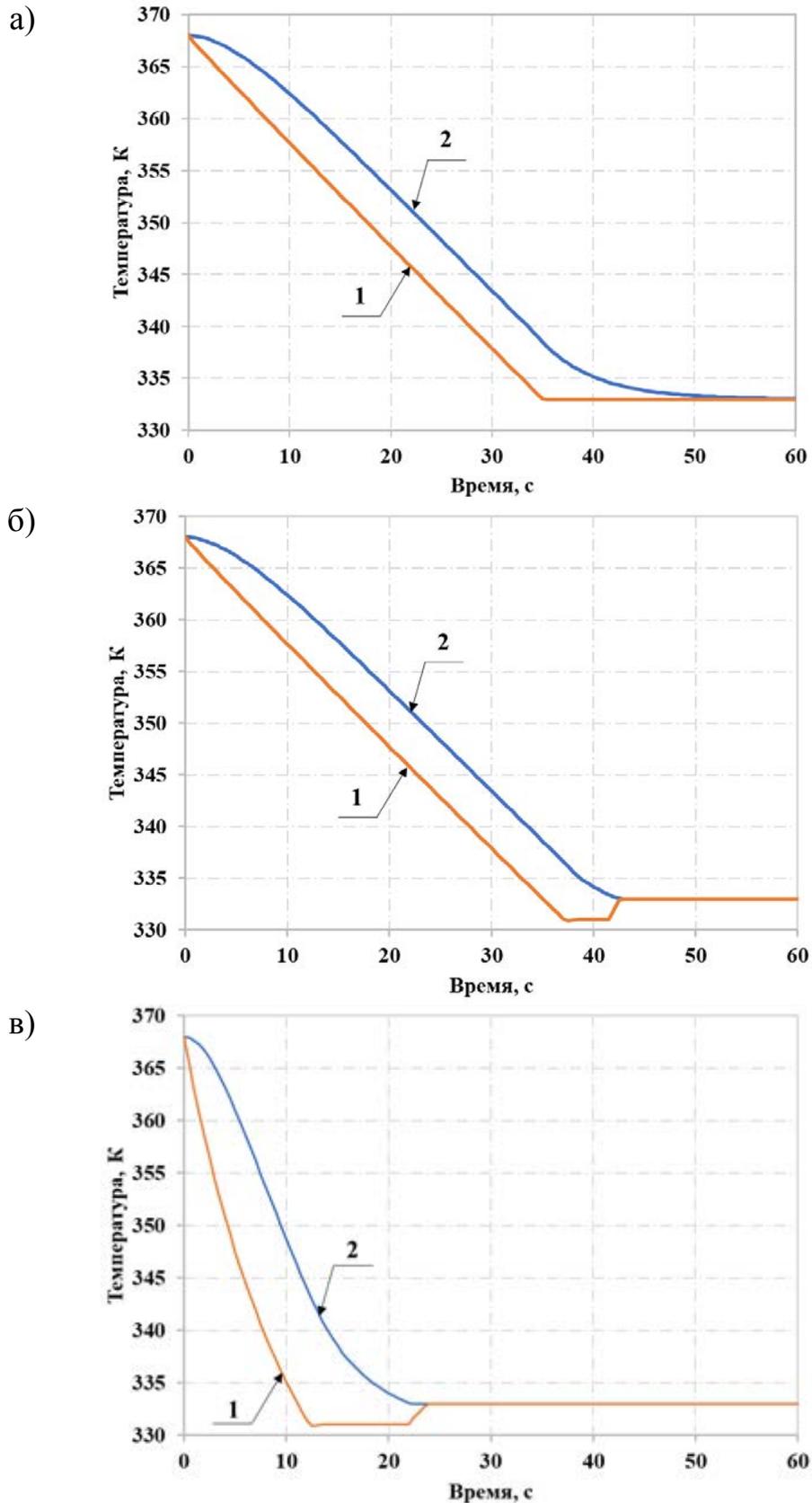


Рисунок 3.7 – Зависимость температуры держателя пробирок в реперной точке S (ряд 1) и пробы (ряд 2) от времени при охлаждении только элементами Пельтье (а и б) и совместном охлаждении элементами Пельтье и жидкостью с температурой 303 К, протекающей в каналах со скоростью 0,2 м/с (в)

На основе выполненных расчетов сформулированы следующие выводы:

- термогидравлическая система обеспечивает значительное, до 6 раз, сокращение времени охлаждения держателя пробирок. Время нагрева сокращается более чем в 2 раза;

- проба обладает значительной тепловой инерцией, которая обусловлена низкой теплопроводностью пробирок. Значение температуры пробы значительно отстает от температуры держателя пробирок при его охлаждении. При охлаждении только элементами Пельтье отставание составляет 8 с, при использовании термогидравлической системе и скорости протекания воды 0,35 м/с – 9,9 с;

- использование термогидравлической системы позволяет уменьшить длительность теплового цикла ПЦР-РВ на 43 секунды, тем самым, сократить время проведения стандартного анализа на величину до 36 минут или около 25 %.

3.2.4 Оценка погрешности

При решении задачи теплопроводности методом конечных элементов возникают ошибки аппроксимации и ошибки дискретизации. Это связано с тем, что существует бесконечное количество разбиений расчетной области на конечные элементы. С уменьшением максимального размера элементов увеличивается число узлов и неизвестных узловых параметров. Вместе с этим повышается возможность более точно удовлетворить уравнениям задачи и тем самым приблизиться к искомому решению. Погрешности при решении задачи теплопроводности методом конечных элементов объясняются следующими ошибками:

- ошибками дискретизации, связанными с различием между геометрией рассчитываемой области и ее аппроксимацией в виде совокупности конечных элементов;

- ошибками аппроксимации, связанными с различием между действительными функциями для каждого конечного элемента и их аппроксимирующими функциями.

Ошибки дискретизации напрямую зависят от размера конечных элементов. Эти ошибки тем меньше, чем меньше размер конечного элемента. В зависимости от формы области, краевых условий, коэффициентов исходного уравнения возникают погрешности аппроксимации. Эти погрешности не обязательно снижаются по мере уменьшения размеров элементов, но могут уменьшать сходимость к точному решению задачи.

Оценка погрешности МКЭ при решении поставленной задачи выполнена путем выявления расхождений в значении функции в точках исследуемой области для различных наборов конечных элементов. Программный продукт ELCUT позволяет изменять шаг дискретизации сетки, создавая различные наборы конечных элементов. Характерные точки изображены на Рисунке 3.8.

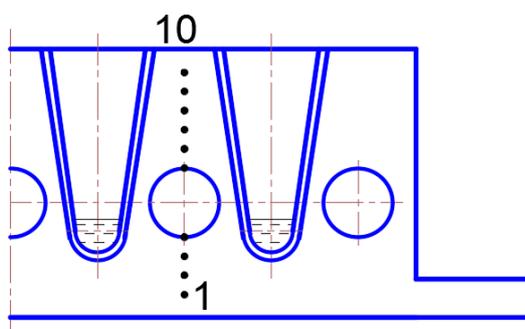


Рисунок 3.8 – Расположение характерных точек на расчетной области

В зависимости от шага значения температуры в выбранных характерных точках температурного поля имеют различие (Рисунок 3.9).

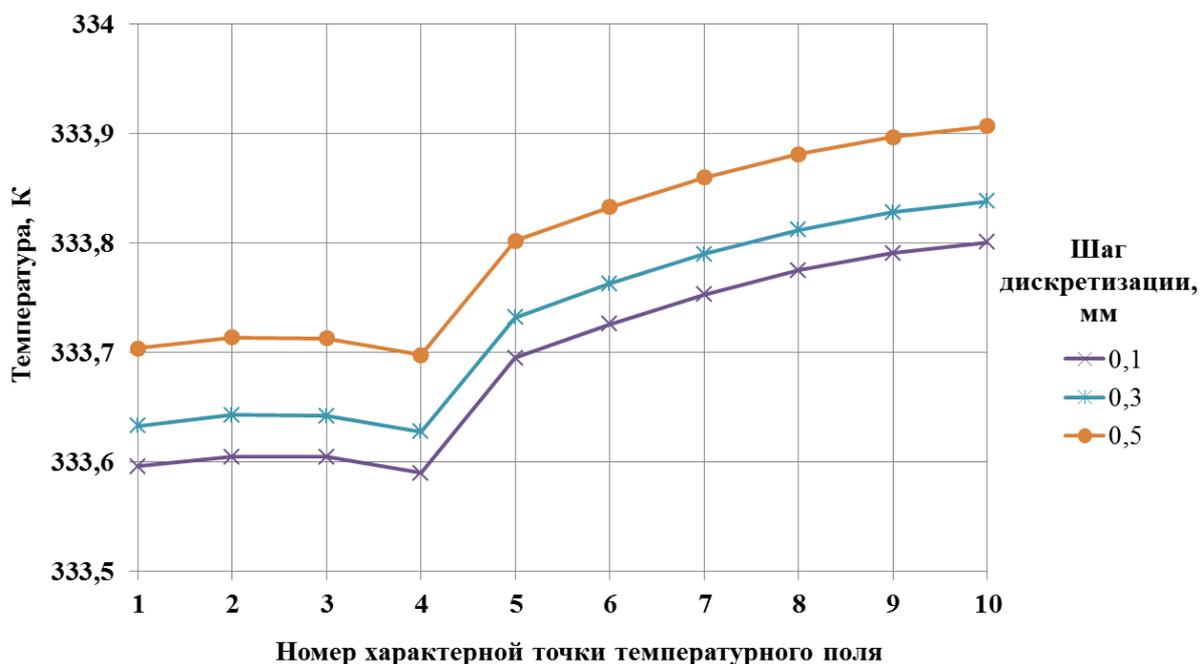


Рисунок 3.9 – Зависимость температуры в характерных точках от выбранного шага дискретизации сетки конечных элементов

В качестве безразмерной характеристики разброса случайных величин часто используют коэффициент вариации, который рассчитывается путем деления среднеквадратичного отклонения на среднее арифметическое значение температуры в характерной точке [140, 141]:

$$CV = \frac{s}{\underline{t}} \cdot 100\% \quad (3.11)$$

где s - среднее квадратическое отклонение значения температуры; \underline{t} - среднее значение температуры в характерной точке температурного поля.

Значение коэффициента вариации не превышает 0,1 % (Рисунок 3.10).

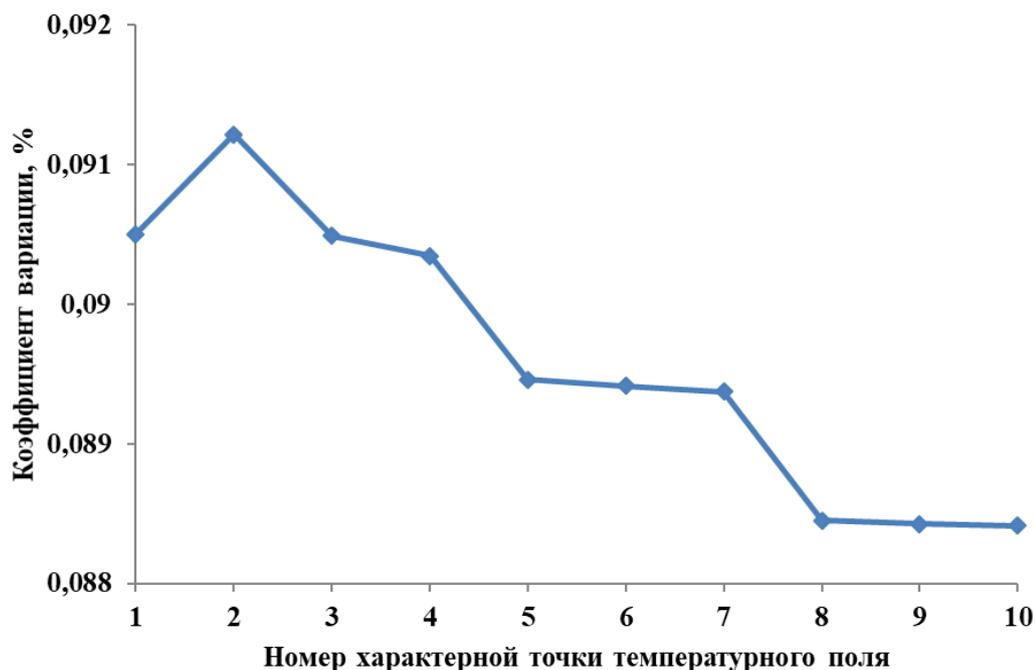


Рисунок 3.10– Значение коэффициента вариации для характерных точек температурного поля

Полученные значения коэффициента вариации CV говорят о сходимости результатов анализа при различных наборах конечных элементов.

3.3 Экспериментальные исследования

3.3.1 Разработка экспериментального стенда

Для проверки адекватности разработанной математической модели и экспериментального подтверждения результатов, полученных численным методом, разработан и испытан экспериментальный стенд на основе амплификатора АНК-32. Стенд схематически изображен на Рисунке 3.11.

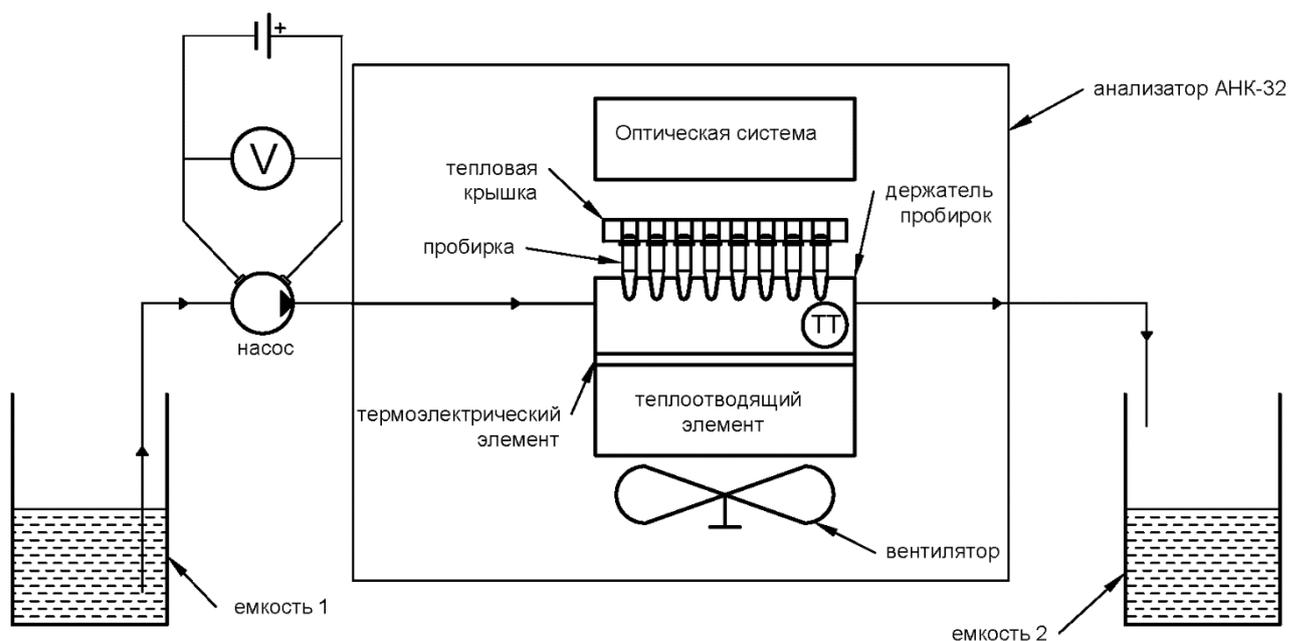


Рисунок 3.11 – Функциональная схема экспериментального стенда

Новый держатель пробирок выполнен из алюминиевого сплава (размеры 42x84x9 мм) и имеет 5 сквозных каналов диаметром 3,6 мм. Для измерения температуры в реперной точке S использовался цифровой датчик DS18B20 в корпусе TO-92. В качестве охлаждающей жидкости использована дистиллированная вода. Подача воды в каналы держателя пробирок из емкости с водой обеспечивается по шлангам PUN-3X0,5-BL через цанговые штуцеры QSM-M5-3 фирмы FESTO с помощью центробежного электронасоса типа 13НЦ2,5-12 (напряжение питания – до 12 В, ток – до 4,5 А, расход жидкости – не более 30 мл / с при давлении 1,8 кг / см²). Электронасос подключен к блоку питания DC POWER SUPPLY HY3005M-3 фирмы MASTECH (выходное напряжение - до 30 В, сила тока - до 5 А). Используются пробирки для ПЦР емкостью 0,2 мл с реакционной смесью РС «АМТЕтест» (FAM-ROX), производства ООО «Синтол». Тепловой блок экспериментального стенда без насоса и ёмкости с водой показан на Рисунке 3.12.

Подача и скорость движения воды в каналах контролировались напряжением питания электронасоса. Предварительно были измерены объемы подачи (расхода) воды в зависимости от напряжения на клеммах электронасоса. При изменении напряжения от 0 В до 10 В расход воды изменялся от 0 до 6,9

мл/с, при этом скорость воды варьировалась в диапазоне значений от 0 до 0,34 м/с (Таблица 3.4).

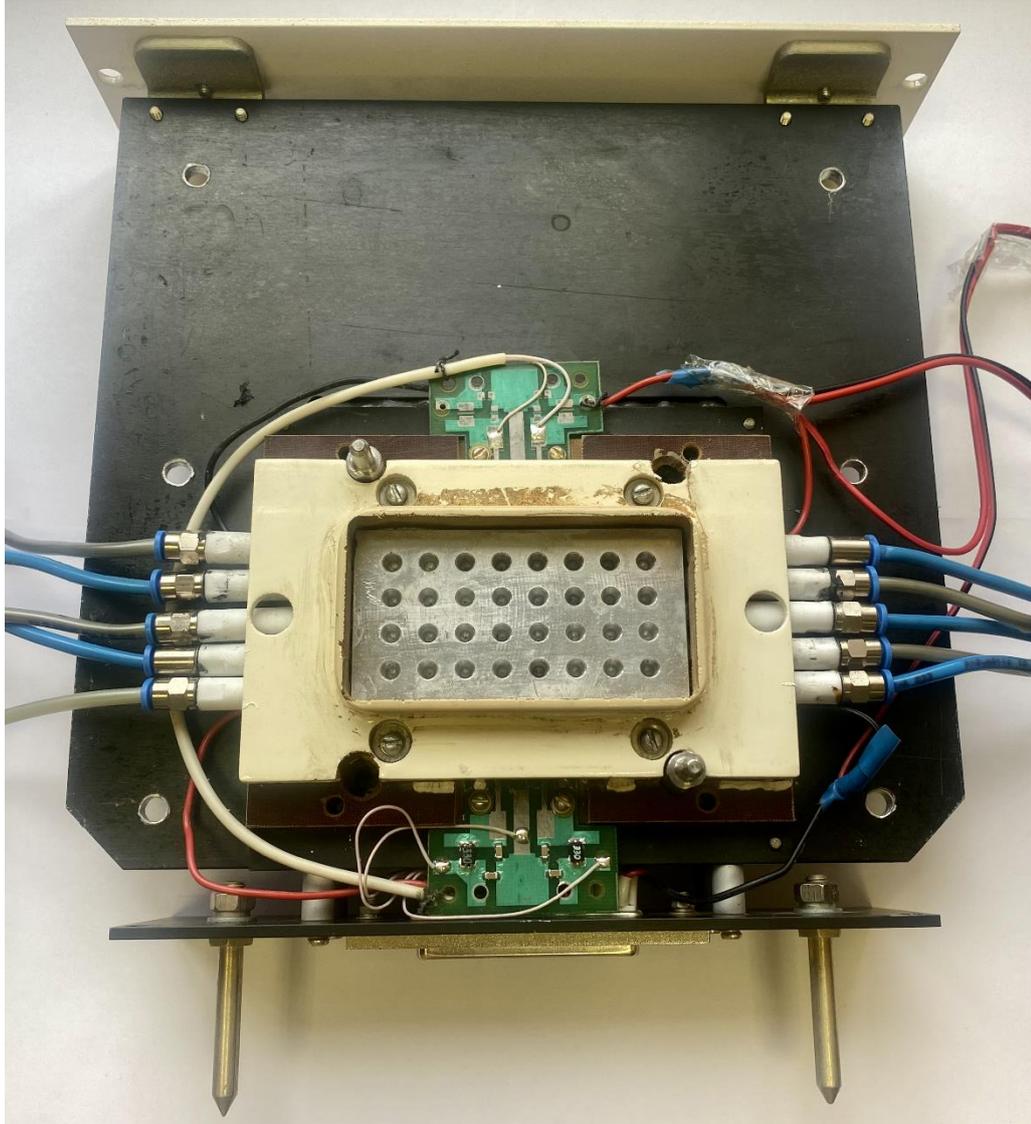


Рисунок 3.12 – Тепловой блок экспериментального стенда

Схема движения воды в каналах держателя пробирок представлена на Рисунке 3.13.

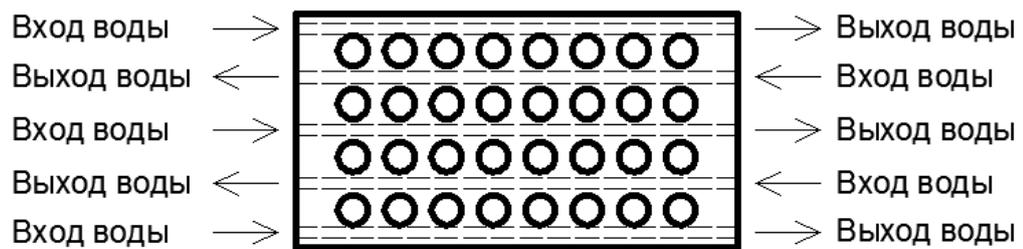


Рисунок 3.13 – Схема движения воды в каналах держателя пробирок

За счет встречных потоков (противотока) обеспечивается компенсация влияния изменения температуры воды при ее движении в каналах держателя пробирок.

3.3.2 Оценка эффективности теплового блока с термогидравлической системой в режиме охлаждения

Элементы Пельтье являются основными исполнительными устройствами, обеспечивающими регулирование и стабилизацию температуры держателя пробирок. Для реализации дополнительного охлаждения после завершения термостатирования при температуре 368 К параллельно с работой элементов Пельтье включается насос, который по шлангам из внешней емкости прокачивает охлаждающую воду через внутренние каналы держателя пробирок. После достижения температуры держателя пробирок значения, близкого к 333 К, движение воды во внутренних каналах прекращается.

На Рисунке 3.14 приведен график изменения температуры в циклическом режиме. Режим охлаждения при каждом температурном цикле обеспечивался при различных напряжениях питания насоса: циклы с 1 по 4 при напряжении 10, 8, 6 и 4 В; 5 и 6 циклы проводились без напряжения, перед 6 циклом вода из каналов держателя пробирок удалялась путем продувки с помощью 1-канального дозатора фиксированного объема Biohit Proline Plus, 1000 мкл.

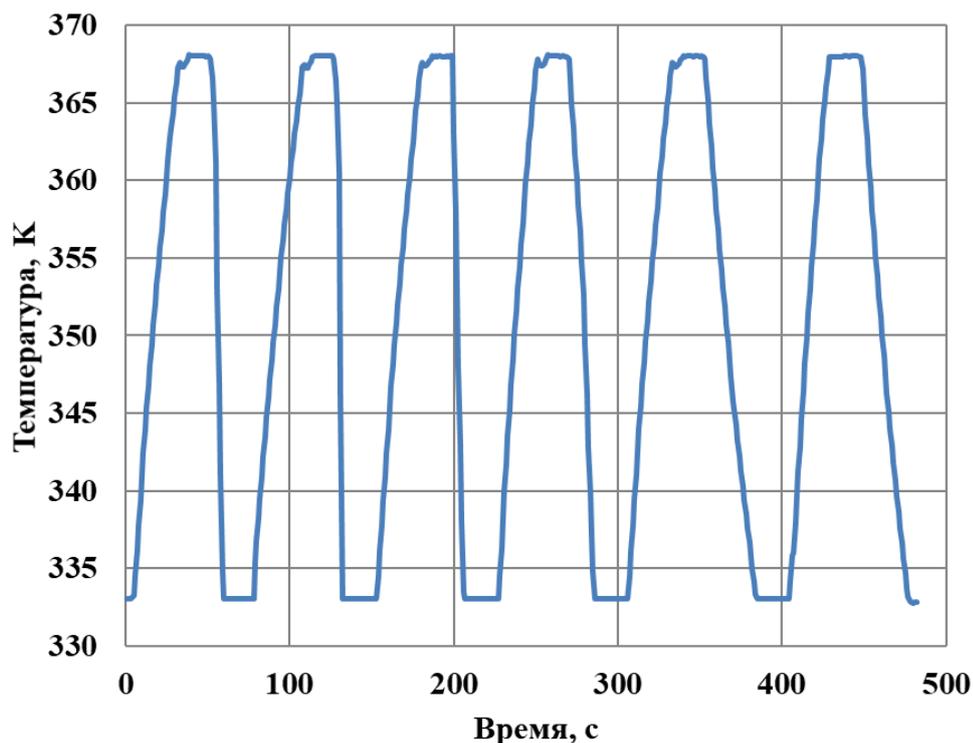


Рисунок 3.14 – График изменения температуры в циклическом режиме

В Таблице 3.4 приведены средние значения скорости изменения температуры держателя пробирок в реперной точке S с начала (368 К) до конца (333 К) режима охлаждения.

Таблица 3.4 – Результаты испытания экспериментального стенда в режиме охлаждения

Номер цикла	1	2	3	4	5, 6
Напряжение питания насоса, В	10	8	6	4	0, без воды
Расход воды, мл/с	6,9	5,6	4,1	1,4	0
Расход воды за цикл, мл	38	44,8	49,2	28	0
Время охлаждения, с	5,5	8	12	20	35
Расход воды за цикл, мл	38	45	49	28	0
Средняя скорость протекания воды, м/с	0,34	0,27	0,20	0,07	0
Средняя скорость изменения температуры, К/с	6,02	4,21	3,09	1,70	1,00

На основе результатов, приведенных в Таблице 3.4, можно отметить следующее:

- расход воды за один цикл охлаждения составляет от 28 до 49,2 мл при средних скоростях протекания воды от 0,07 до 0,34 м/с;

- сокращение времени охлаждения при скорости протекания воды 0,34 м/с:
 $26 - 5,5 = 20,5$ с;

- максимальное приращение скорости изменения температуры: $6,02 - 1,0 = 5,02$ К / с;

- максимальное отношение скоростей изменения температуры: $6,02 / 1,0 = 6,02$.

3.3.3 Оценка эффективности теплового блока с термогидравлической системой в режиме термостатирования

Для опосредованной оценки эффективности пневмогидравлической системы на основе определения разброса температур плавления образцов в различных пробирках разработан экспериментальный стенд на основе стенда, описанного в разделе 3.1, его схема представлена на Рисунке 3.15. Жидкость протекает последовательно по замкнутому контуру с помощью насоса через каналы держателя пробирок и расширительный сосуд.

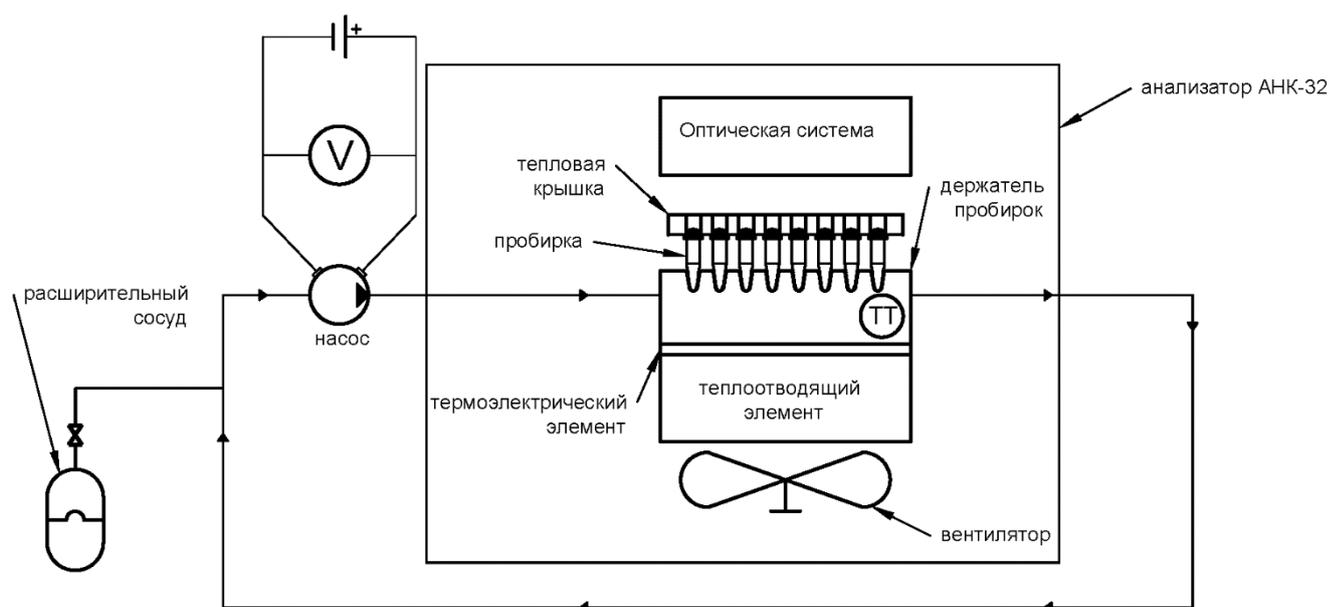


Рисунок 3.15 – Функциональная схема экспериментального стенда

Схема движения воды в каналах держателя пробирок представлена на Рисунке 3.16.

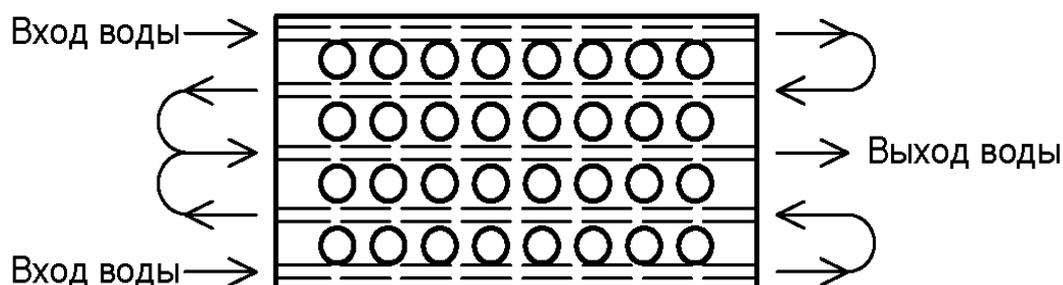


Рисунок 3.16 – Схема движения воды в каналах держателя пробирок

Циркулирующая вода с температурой, соответствующей средней температуре каналов, во время движения по шлангам и при нахождении в расширительном сосуде охлаждается из-за теплового контакта с окружающей средой. Проведённые измерения показали, что уменьшение температуры жидкости может достигать значения 10 К, при этом выравнивание температурного поля держателя пробирок не достигается.

В расширительный сосуд был добавлен электрический нагреватель, обеспечивающий нагрев воды до значений температур держателя пробирок, задаваемой компьютером в соответствии с программой термостатирования.

При обычном разбросе температур порядка 0,4 К затруднительно оценить положительный эффект влияния термогидравлической системы на равномерность температурного поля держателя пробирок. Поэтому для большей доказательности эксперимента параллельно с одним из двух элементов Пельтье добавлен набор резисторов, обладающих общим сопротивлением 15 Ом. При этом мощность этого элемента Пельтье уменьшилась, а градиент температуры увеличился.

В ходе эксперимента в каждой пробирке выполнялось плавление двух проб с различными значениями температуры плавления ДНК T_m : у пробы с красителем FAM значение $T_m \approx 338$ К, с красителем ROX $T_m \approx 359$ К. Такой подбор проб позволил оценить эффективность термогидравлической системы при различных температурах.

Шаг изменения температуры и измерений на экспериментальном стенде - 0,5 К, время каждого шага – 60 секунд.

Определение температур плавления образцов выполнялось с помощью методики на основе полиномиальной функции, описанной в разделе 4.4. Вычисления производились в программной среде MATLAB для одного ряда из восьми пробирок. На Рисунке 3.17 представлены зависимости температуры плавления образцов от номера пробирки для образцов с красителем FAM при нагреве элементами Пельтье (1) и с использованием термогидравлической системы (2). На Рисунке 3.18 приведены аналогичные зависимости для образцов с красителем ROX.

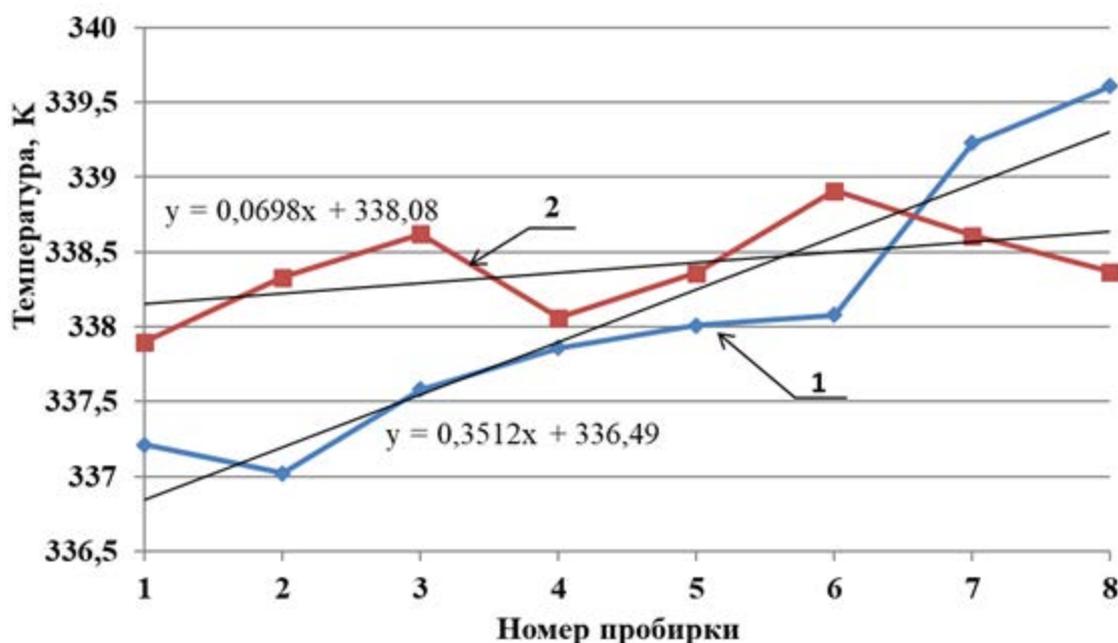


Рисунок 3.17 - Зависимость значения T_m при использовании красителя FAM от номера пробирки при дополнительном использовании термогидравлической системы (1), и при нагреве элементами Пельтье (2) а также их линии тренда

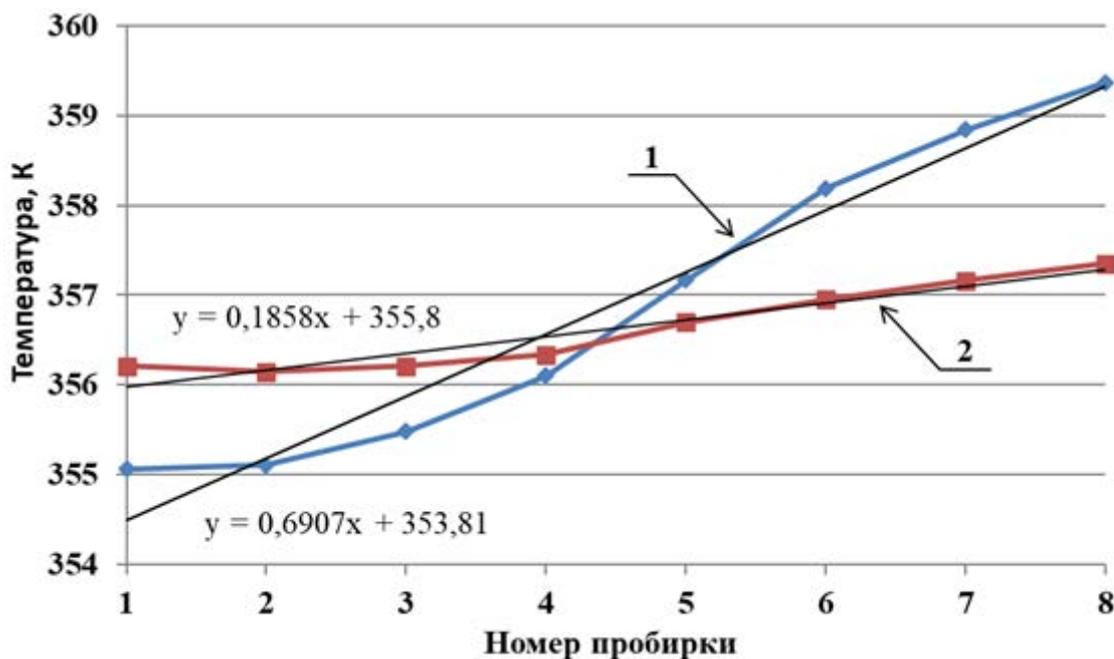


Рисунок 3.18 - Зависимость значения T_m при использовании красителя ROX от номера пробирки при дополнительном использовании термогидравлической системы (1) и при нагреве элементами Пельтье (2), а также их линии тренда

Для оценки эффективности использования термогидравлической системы предложено построить линию тренда зависимости температуры плавления от номера пробирки полиномиальной функции первого порядка вида:

$$T = f_0 + f_1 \cdot N, \quad (3.16)$$

где f_0 и f_1 – коэффициенты полиномиальной функции, N – номер пробирки.

Предложено использовать коэффициент f_1 перед аргументом в аппроксимирующей функции как критерий разброса температур: наклон аппроксимирующей прямой характеризует усредненный градиент температур по пробиркам в ряду. Отношение коэффициентов численно определяет показатель эффективности E , демонстрирующий, на сколько процентов уменьшился разброс температур по пробиркам. При полной компенсации неравномерности температурного поля показатель будет равен 100 %. В случае, если система никак не повлияла, показатель будет равен 0.

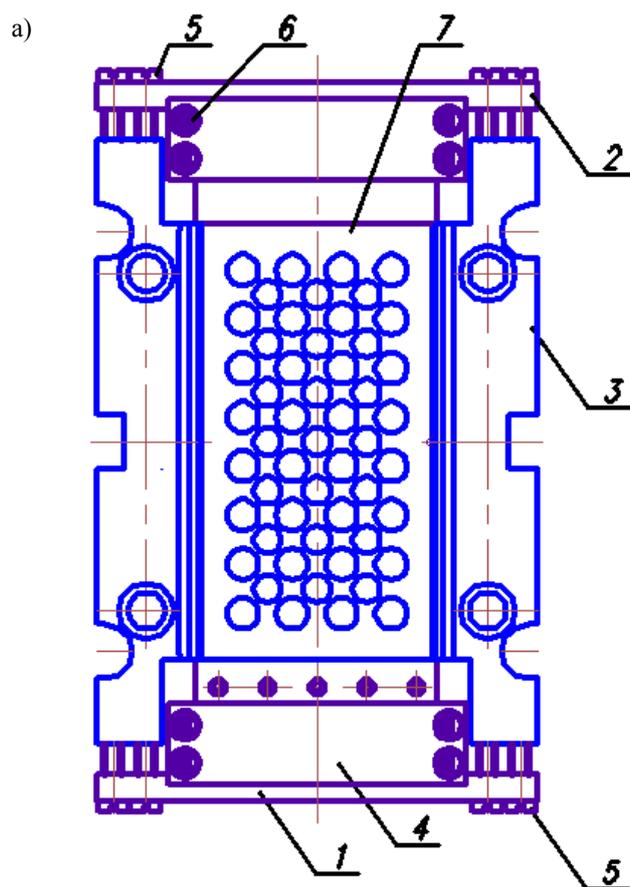
$$E = \frac{f_{1.1} - f_{1.2}}{f_{1.1}} \cdot 100\%, \quad (3.17)$$

где $f_{1.1}$ – критерий разброса температур при нагреве элементами Пельтье, $f_{1.2}$ – критерий разброса температур при использовании термогидравлической системы.

Для образцов с красителем FAM показатель эффективности $E = 80,1 \%$, с красителем ROX $E = 73,1 \%$. Применение термогидравлической системы обеспечивает уменьшение разброса температур пробирок до 5 раз, однако снижается при повышении значений рабочих температур: при увеличении температуры на 21 К показатель эффективности уменьшается на 7 %.

3.3.4 Экспериментальный стенд с гидрораспределителем

При значительном увеличении равномерности температур пробирок вдоль одного ряда наблюдается заметный градиент температур между рядами. Это объясняется различной скоростью протекания воды вследствие различных гидравлических сопротивлений каналов. Для выравнивания гидравлических сопротивлений и упрощения конструкции разработан гидрораспределитель (Рисунок 3.19).



б)



Рисунок 3.19 –Держатель пробирок с гидрораспределителями: а) – схематическое изображение, б) – внешний вид

Гидрораспределители 1 и 2 обеспечивают движение жидкости согласно схеме на Рисунке 3.13. Гидрораспределитель (1) имеет резьбовые отверстия для пяти балансирующих пластиковых винтов, с помощью которых можно изменять гидравлические сопротивления каналов и, соответственно, скорости течения жидкости.

Пластмассовый корпус (3) обеспечивает жёсткость конструкции. Гидрораспределители закрыты сверху крышками (4) и соединены винтами (5) с пластмассовым корпусом (3). Гидрораспределители (1) и (2) соединены с крышками (4) винтами (6). Держатель пробирок (7) соединён с гидрораспределителями (1) и (2), при этом отверстия для течения жидкости совпадают. Для герметизации в местах их соединения проложены резиновые уплотняющие кольца.

Конструкция гидрораспределителей предусматривает отверстия для цанговых штуцеров ввода и вывода жидкости. Коммутация с помощью шлангов и тройников обеспечивает в держателе пробирок противоток жидкости.

3.3.5 Сравнение расчетных и экспериментальных данных

На Рисунке 3.20 приведены графики зависимости скорости охлаждения от скорости течения воды для эксперимента и расчета численными методами.

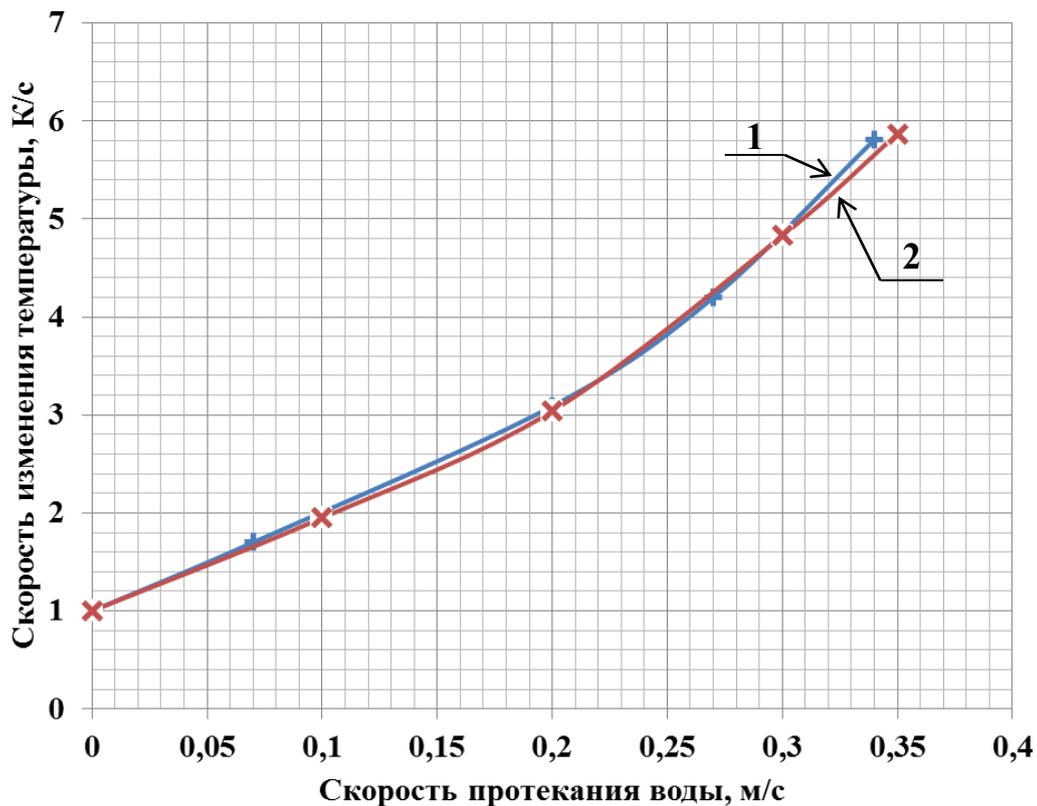


Рисунок 3.20 – График зависимости средней скорости охлаждения от скорости течения воды для эксперимента (1) и расчета численными методами (2)

Стоит отметить хорошую сходимость результатов расчёта и эксперимента, максимальное отклонение по средней скорости охлаждения при различных скоростях протекания жидкости составляет 8,4 %.

3.4 Основные результаты главы 3

1. Сформулирована математическая модель, позволяющая оценить влияние термогидравлической системы на характеристики амплификатора. Расчет динамики тепловых процессов при термоциклировании пробы в тепловом блоке

амплификатора сведен к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности жидкости λ_{eq} и переменным коэффициентом теплоотдачи α_c между поверхностью каналов держателя пробирок и протекающей при различных скоростях и температурах жидкости.

2. Выполнен расчет динамики тепловых процессов численными методами, выявлено следующее:

- термогидравлическая система обеспечивает значительное, до 6 раз, сокращение времени охлаждения держателя пробирок;

- проба обладает значительной тепловой инерцией, в основном, за счет низкой теплопроводности пробирок, температура пробы значительно отстает от температуры держателя пробирок при его охлаждении;

- использование термогидравлической системы позволяет уменьшить время теплового цикла ПЦР-РВ на 43 секунд, тем самым, сократить время проведения анализа на величину до 36 минут или около 25 % от общей продолжительности.

3. Разработан и испытан экспериментальный стенд на основе амплификатора АНК-32. Выявлена приемлемая сходимость результатов расчёта и эксперимента, отклонение результатов по средней скорости охлаждения держателя пробирок в диапазоне скоростей протекания жидкости 0-0,35 м/с не превысило 8,4 %.

4. Оценена эффективность использования термогидравлической системы в режиме термостатирования путем определения показателя эффективности пневмогидравлической системы на основе определения значений разброса температур плавления образцов в различных пробирках. Уменьшение разброса температур проб в пробирках при использовании системы достигает 5 раз. Выявлено, что эффективность увеличивается при снижении значений рабочих температур: при уменьшении температуры на 21 К показатель эффективности увеличивается на 7 %.

5. Разработана конструкция гидрораспределителя, позволяющая упростить конструкцию термогидравлической системы и регулировать гидравлические сопротивления в каналах держателя пробирок.

4 **Обработка сигналов плавления ДНК**

Влияние шумов, дрейфа нулевой линии и дискретизации сигналов может быть в значительной степени уменьшено путем аппроксимации графиков плавления непрерывной функцией. Выбор функции, обеспечение сходимости их параметров и определение характерных параметров ГП является нетривиальной задачей. В настоящей главе приводятся разработанные методики обработки ГП, позволяющие определить параметры ГП, выполнить их сравнение и повысить разрешающую способность амплификаторов серии АНК при реализации метода плавления.

4.1 **Методика обработки графиков плавления на основе усовершенствованной сигмоидальной функции**

Сигнал плавления имеет форму S-образной кривой, однако не может быть описан известными функциями класса сигмоид [34] из-за нелинейной формы базовой линии. Предложена усовершенствованная сигмоидальная функция (SF), позволяющая адекватно аппроксимировать графики плавления:

$$F_c = \frac{F_m}{1 + e^{-\frac{T_m - T}{k}}} + f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2 \quad (4.1)$$

где F_c — относительная величина интенсивности флуоресценции (относительные единицы флуоресценции, О.Е.Ф.); F_m — размах графика плавления (О.Е.Ф.); T_m — дробное значение температуры плавления (К); k — коэффициент, определяющий наклон кривой. Слагаемые f_0 , $f_1 \cdot T$ и $f_2 \cdot T^2$ учитывают смещение, линейную и квадратичную зависимости нулевой линии от температуры соответственно.

Численное определение коэффициентов сигмоидальной функции выполняется методом наименьших квадратов (МНК), при этом определяется сумма квадратов отклонений Q модели F_{ci} от экспериментальных данных F_i , значения коэффициентов принимаются из условия минимума величины Q :

$$Q = \sum_{i=0}^{n-1} (F_{ci}(F_m, T_m, k, f_0, f_1, f_2) - F_i)^2, \quad (4.2)$$

где n – количество отсчётов.

SF имеет шестой порядок, что усложняет сходимость коэффициентов функции при реализации МНК и требует предварительного подбора их значений. Для этого предложен следующий алгоритм.

1) Нулевая линия ГП аппроксимируется полиномом $f_0 + f_1 \cdot T$ на начальном участке исходного ГП. В результате принимаются приближенные значения параметров f_0 и f_1 .

2) Вычисляется приближенное значение параметра F_m , соответствующего размаху ГП:

$$F_m = F_{\min} - F_{\max}, \quad (4.3)$$

где F_{\max} и F_{\min} соответствуют максимальному и минимальному значениям ГП соответственно.

3) Определяется приближенное значение температуры плавления T_m , для этого выполняется поиск максимального абсолютного значения производной графика плавления по температуре:

$$T_m = T : \left| \frac{dF_c}{dT} \right| = \left(\left| \frac{dF_c}{dT} \right| \right)_{\max} \quad (4.4)$$

4) График плавления по всему диапазону аппроксимируется SF, при этом оптимизируются все параметры функции.

5) Температура плавления T_{m1} соответствует параметру T_m , заложенному в сигмоидальную модель.

$$T_{m1} = T_m \quad (4.5)$$

Методика реализована в программе Excel. В двух столбцах Таблицы 4.1 приведены значения температуры T в диапазоне от 334 до 363 К и

соответствующие относительные значения интенсивности флуоресценции F пробы. В третьем столбце приведены значения флуоресценции F_c , вычисленные по формуле 4.1. В следующем столбце находятся значения D_c - квадраты отклонений значений F от F_c , а в целевой последней ячейке — остаточная сумма квадратов отклонений S . Оптимизация параметров SF выполняется методом наименьших квадратов средством анализа «Поиск решения» из меню «Данные», при этом определяется минимальное значение величины S путем изменения параметров SF.

Таблица 4.1 - Оптимизация параметров SF в программе Excel

T, K	F	F_c	D_c	S
334	894,23	880,67	183,91	704,99
335	889,36	880,33	81,52	
336	884,51	882,67	3,41	
337	879,68	877,67	4,05	
338	874,86	874,00	0,74	
...	
...	
359	670,99	670,33	0,43	
360	666,56	661,33	27,29	
361	662,14	659,33	7,89	
362	657,74	651,00	45,47	
363	653,36	645,67	59,23	

В Таблице 4.2 приведены оптимизированные значения параметров SF для одинаковых проб в двух смежных пробирках 1 и 2.

Таблица 4.2 - Результаты вычисления параметров SF

Пробы	Параметры SF	Значения
1	$T_{m1.1}$	347,50
	F_m	141,88
	k	1,22
	f_0	1507,75
	f_1	-7,44
	f_2	0,009
2	$T_{m1.2}$	347,44
1 - 2	$T_{m1.2} - T_{m1.1}$	0,06

На Рисунке 4.1 приведены графики исходных кривых плавления двух одинаковых проб, полученных в результате проведения анализа методом плавления, и графики SF с оптимизированными параметрами. Эти графики отражают зависимости интенсивности флуоресценции F и F_c от температуры T , приведенные в Таблице 4.1. Можно визуально отметить хорошее совпадение этих графиков.

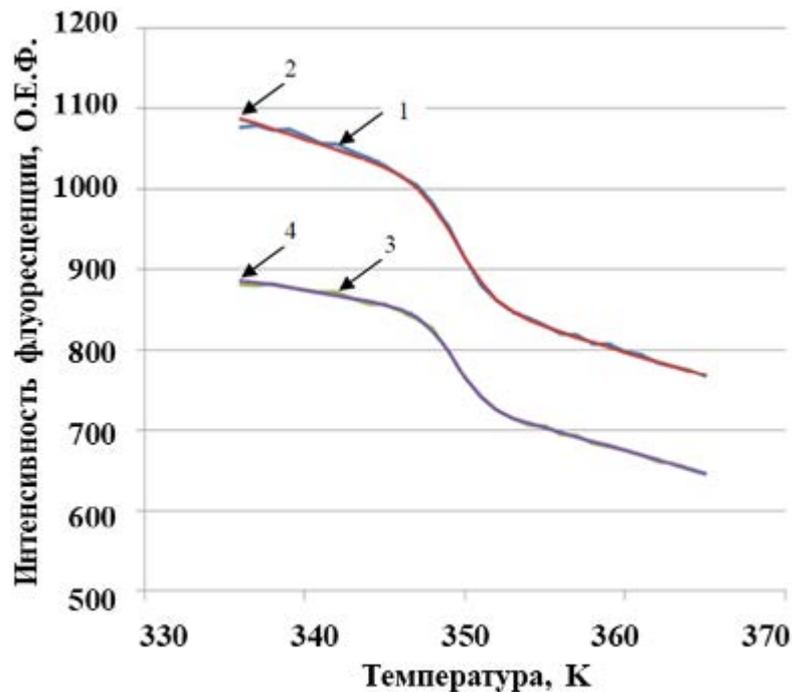


Рисунок 4.1 – Исходные данные плавления для двух проб (ряды 1 и 3, кривые с шумом) и SF с оптимизированными параметрами (ряды 2 и 4, гладкие кривые)

Предложенная методика реализована также в программной среде MATLAB.

SF задается в виде формулы:

$$f = @ (x, u) (-x(2) ./ (1 + \exp((x(1) - u) ./ x(3)))) + x(4) + x(5) * u + x(6) * u.^2, \quad (4.6)$$

где $x(1)$: $x(6)$ соответствуют параметрам T_m , F_m , k , f_0 , f_1 и f_2 в формуле 4.1.

Использованы следующие команды MATLAB:

$x_0 = [348 \ 141 \ 1 \ 1500 \ -7 \ 0.009]$ - задаются приблизительные значения параметров;

$x = \text{lsqcurvefit}(f, x_0, s, V)$ - новые значения параметров. Здесь исходные данные s и V – значения температуры и интенсивности флуоресценции (ранее обозначенные как T и F);

$V_n = f(x, s)$ - новые значения данных;

Команды программы MATLAB сохранены в виде М-файла, при этом расчет температуры плавления выполняется в автоматическом режиме.

Предложено температуру плавления T_{m2} альтернативно определять, как максимальное абсолютное значение первой производной сигмоидальной модели по температуре, построенной с шагом дискретизации сигнала 0,01 (Таблица 4.4):

$$T_{m2} = T : \left| \frac{dF_c}{dT} \right| = \left(\left| \frac{dF_c}{dT} \right| \right)_{\max} \quad (4.7)$$

График плавления характеризуется еще одним параметром - шириной интервала плавления ΔT , который, так же, как и температура плавления T_m , зависит от состава фрагмента ДНК [50].

Предложено интервал плавления определять либо как параметр k , заложенный в модель, либо на основе нормированной модельной функции с нулевыми коэффициентами f_1, f_2 и f_3 и параметром $F_m = 1$:

$$\Delta T_1 = k \quad (4.8)$$

$$\Delta T_2 = \frac{1}{\left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}} \quad (4.9)$$

Разработанные алгоритмы определения значений T_m и ΔT реализованы в программной среде MATLAB, при этом, достигнута полная автоматизация вычислений. Результаты применения методики и сравнение с другими методиками приведены в Таблице 4.5.

4.2 Методика обработки графиков плавления на основе производной усовершенствованной сигмоидальной функции

Традиционно значение температуры плавления определяют, как максимум отрицательной производной ГП по температуре, которая имеет колоколообразный вид. Было предложено для этих целей применить производную от сигмоидальной функции (SFD), приведенную в формуле 4.10, вместо SF (формула 4.1). Такой подход позволил уменьшить количество неизвестных коэффициентов функции.

$$-\frac{dF_c}{dT} = \frac{F_m \cdot e^{\frac{T_m-T}{k}}}{k(1+e^{\frac{T_m-T}{k}})^2} + f_1 + 2 \cdot f_2 \cdot T \quad (4.10)$$

В результате дифференцирования уменьшается отношение сигнал/шум, поэтому для уменьшения погрешности вычисления величины T_m предлагаются следующие операции.

1) Определение предварительных значений F_m и T_m выполняется аналогично методике, приведенной в разделе 4.1.

2) Численное дифференцирование путем нахождения центральной конечной разности первого порядка:

$$\frac{dF_i}{dT} = \delta F_i = \frac{F_{i+1} - F_{i-1}}{2 \cdot h} \quad (4.11)$$

где h - разность между соседними значениями температуры T_{i+1} и T_{i-1} .

При таком способе дифференцирования не наблюдается сдвига графиков и, соответственно, значения температуры плавления T_m .

3) Аппроксимация производной ГП по температуре (Рисунок 4.2).

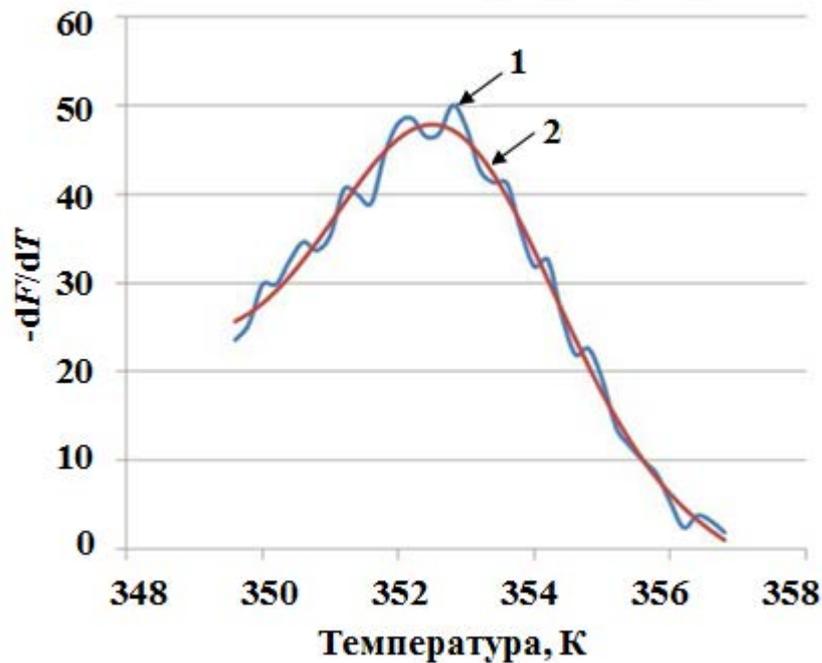


Рисунок 4.2 – Производная графика плавления по температуре (1) и график производной усовершенствованной сигмоидальной функции (2)

4) Определение значений T_{m1} , T_{m2} , ΔT_1 и ΔT_2 выполняется аналогично методике по разделу 4.1 по формулам 4.5, 4.7, 4.8 и 4.9 соответственно (Таблица 4.4).

4.3 Методика обработки графиков плавления на основе усовершенствованной функции Гаусса

В общем виде функция Гаусса имеет вид:

$$F = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(T-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (4.12)$$

где σ – среднеквадратичное отклонение, μ – математическое ожидание.

В статье [142] описана методика аппроксимации функцией Гаусса. Функция Гаусса является симметричной относительно математического ожидания и не может качественно описать несимметричную кривую плавления. В статье предлагается описывать кривую плавления сложной функцией, являющейся суммой нескольких функций Гаусса.

Методика имеет недостатки: требуется предварительная нормализация экспериментальных данных и последовательное вычитание фоновой флуоресценции красителя на участках предплавления и постплавления. Для этого требуются дополнительные ручные операции.

Предложена усовершенствованная модель производной ГП на базе функции Гаусса (GF):

$$-\frac{dF_c}{dT} = F_m \cdot e^{-\frac{(T-T_m)^2}{2\sigma_g^2}} + f_1 + 2 \cdot f_2 \cdot T \quad (4.13)$$

Модель использована в программе MATLAB в виде формулы:

$$f = @(x,u) x(2)./(1.77245.*x(3)).*exp(-(u-x(1)).^2./(2.*x(3).^2)) + x(4) + 2*x(5)*u, \quad (4.14)$$

где f - относительная величина интенсивности флуоресценции при температуре образца u (K);

$x(1)$ - значение температуры (математическое ожидание), соответствующее максимальному значению GF (K);

$x(2)$ – максимальное значение GF;

$x(3)$ – полуширина функции для уровня 0,6 от максимального значения функции.

Для учета смещения и линейной зависимости нулевой линии от температуры в усовершенствованную модель предложено ввести слагаемые $x(4) + 2*x(5)*u$.

Значения T_{m1} , T_{m2} и ΔT_2 вычисляются по аналогии с разделом 4.1 (Таблица 4.4), величина ΔT_2 определяется как параметр аппроксимирующей функции σ_g .

4.4 Методика обработки графиков плавления на основе полиномиальной функции

В случае зависимости от одной переменной, полиномиальная функция (PF) имеет вид:

$$F_c = \sum_{k=0}^n f_n T^n = f_0 \cdot T^n + f_1 \cdot T^{n-1} + \dots + f_n \quad (4.15)$$

где f_n – коэффициенты ПФ; n – степень ПФ; T – температура образца, К.

Сдвиг и нормализация температурной шкалы графика плавления позволяют уменьшить значение степени n , увеличить точность аппроксимации ПФ и рекомендуются при значениях $n > 3$ [143]:

$$T_{ni} = \frac{T_i - \bar{T}}{\sigma_T}, \quad (4.16)$$

где \bar{T} – среднее значение температуры, σ_T – стандартное отклонение температуры.

Модель производной ГП на базе полиномов реализуется в программе MATLAB командой *polyfit*.

Важной задачей является выбор оптимальной степени ПФ, т.к. слишком низкая степень приводит к неприемлемой погрешности описания экспериментальных данных, а слишком высокая - к нежелательным осцилляциям аппроксимирующей функции. Один из способов выбора основан на оценке величины дисперсии σ_T^2 . За оптимальное значение степени полинома принимается значение p , начиная с которого величина σ_T^2 прекращает значительное уменьшение или начинает возрастать [103].

В настоящее время при выборе оптимальной модели из ряда параметрических регрессионных моделей при одинаковых длинах выборок наиболее часто применяются следующие показатели.

1 Информационный критерий Акаике (*AIC*) [144]:

$$AIC(p) = N \cdot \ln \sigma_T^2 + 2p, \quad (4.17)$$

где N – число измерений в эксперименте.

2 Информационный критерий Байеса или критерий Шварца (*BIC*) [145]:

$$BIC(p) = N \cdot \ln \sigma_T^2 + p \cdot \ln N, \quad (4.18)$$

3 Модифицированный информационный критерий Акаике (AIC_c) [146]:

$$AIC_c(p) = AIC + 2p \frac{p+1}{N-p-1}, \quad (4.19)$$

При использовании перечисленных критериев оптимальный порядок регрессионной модели достигается при условии минимального значения выбранного критерия. Графики зависимости критериев AIC , BIC и AIC_c от количества параметров PF , аппроксимирующей экспериментальные данные, приведены на Рисунке 4.3а.

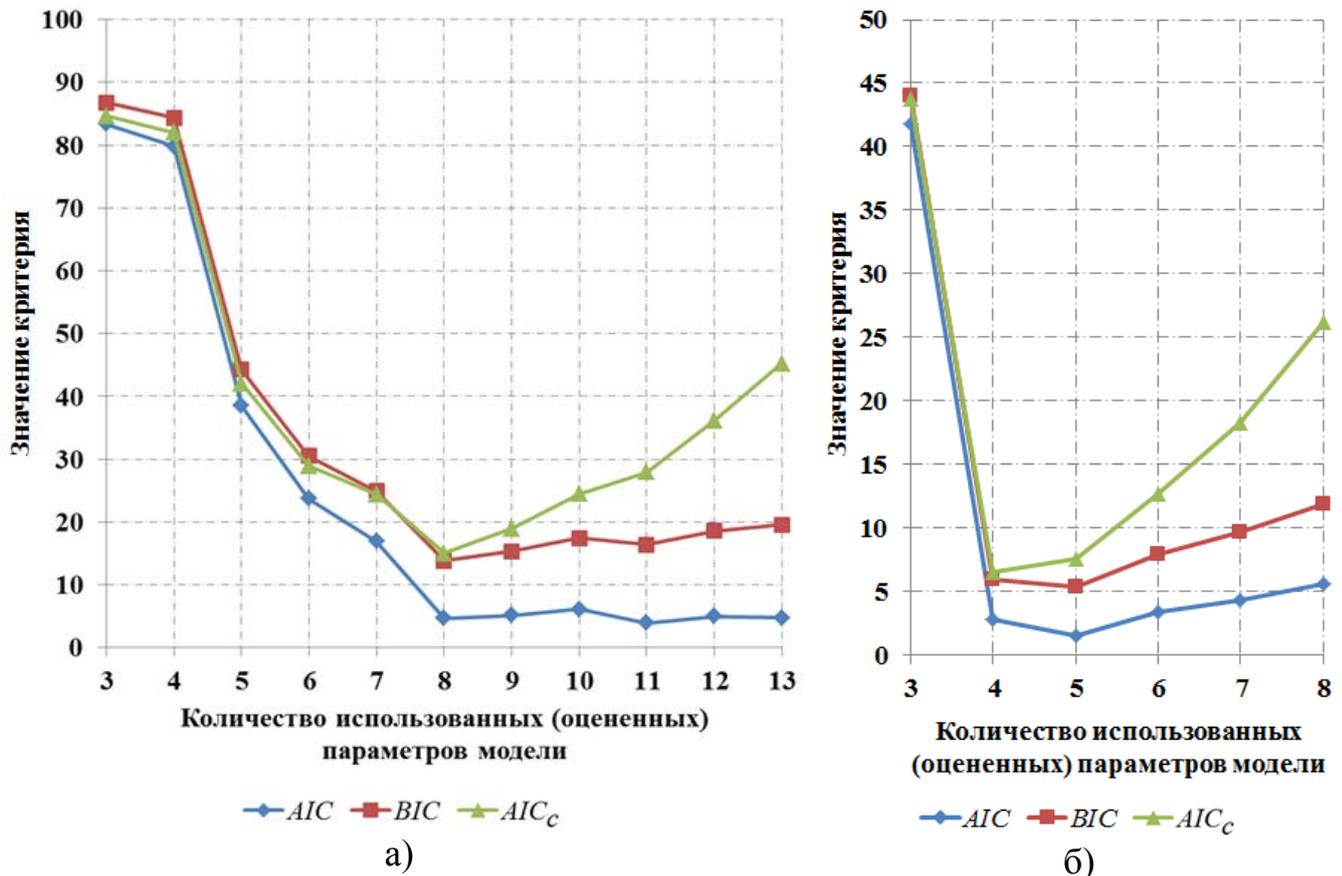


Рисунок 4.3 – Зависимость значений информационных критериев от количества параметров модели

При аппроксимации экспериментальных данных на значительно диапазоне температур 343-353 К (Рисунок 4.1) минимальные значения критериев BIC и AIC_c достигались при количестве параметров $p = 8$. Локальный минимум критерия AIC

достигается так же при $p = 8$ ($AIC = 4,73$), однако абсолютный минимум - при $p = 11$ ($AIC = 3,95$).

Предпочтительным при выборе оптимальной степени является критерий AIC_c , т.к. критерии AIC и BIC в меньшей степени учитывают увеличение числа параметров модели. Критерий AIC_c рекомендуется применять при $N / p < 40$, это условие выполняется при шаге дискретизации температуры не более 0,2 К и диапазоне аппроксимации ГП в диапазоне температур менее 50 К, что выполняется при реализации предложенной методики.

Большое число параметров используемой модели является избыточным, не соответствующим физической природе описываемых процессов, и объясняется наличием ложных максимумов и минимумов за счет случайных составляющих. Предлагается ограничить аппроксимируемый диапазон участком наиболее значительного изменения величины интенсивности флуоресценции соответствующего участку между максимальным T_{m1D2} и минимальным T_{m2D2} значениями второй производной графика плавления по температуре (Рисунок 4.4). Полученный участок отрицательной производной ГП имеет две точки перегиба, что теоретически соответствует 4-ей степени аппроксимирующей график плавления функции PF.

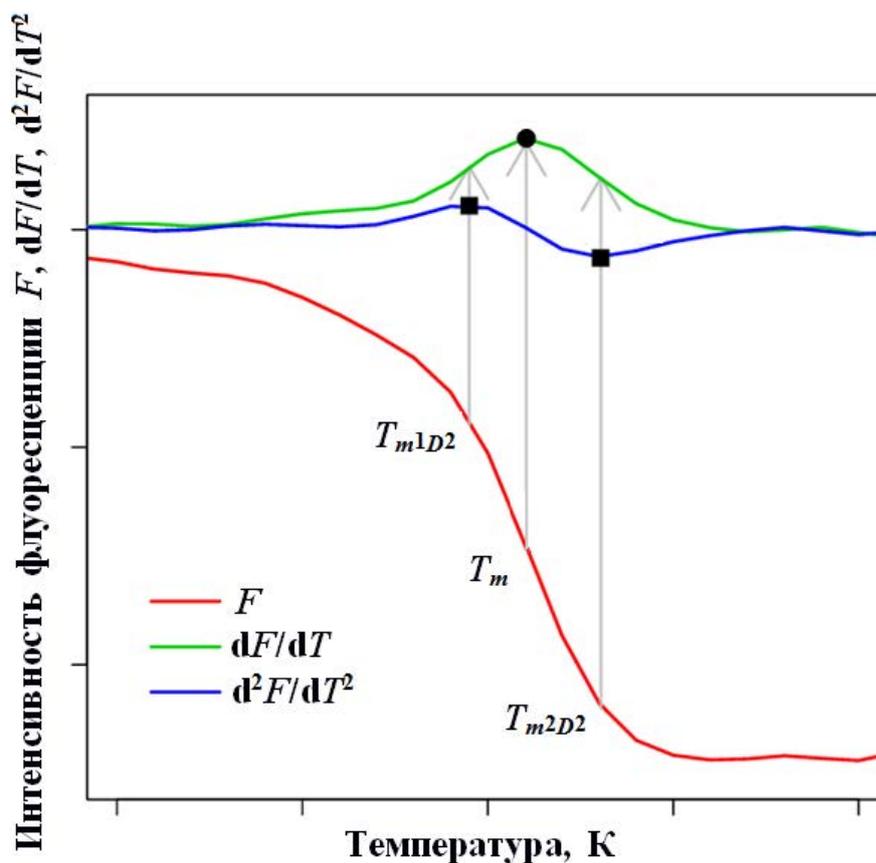


Рисунок 4.4 – График плавления, отрицательная первая и вторая производные графика плавления по температуре [148]

Минимальное значение AIC_c соответствует количеству параметров PF $p = 4$ (Рисунок 4.36). При расхождении оптимальной степени PF по критерию минимального значения AIC_c с обоснованной физическим процессом степень, предложено проверять значимость различий дисперсий путем нахождения величины проверочной статистики на основе F-критерия Фишера. На основании оценки вероятности равенства дисперсий сделать вывод о возможности использования модели со степенью PF, обоснованной формой графика плавления.

Предлагается следующий алгоритм обработки ГП, ориентированный на PF 4-ой степени и позволяющий аналитически определить значения T_m и ΔT в расчетном диапазоне температур.

1 Выполняется дифференцирование ГП по формуле 4.11.

2 Определяются значения температуры $T_1 = T_{m1D2} - 0,5 = (d^2F/dT^2)_{\max} - 0,5$ и $T_2 = T_{m2D2} + 0,5 = (d^2F/dT^2)_{\min} + 0,5$, ограничивающие новый диапазон графика плавления.

3 Выполняется сдвиг и нормализация температурной шкалы графика плавления по формуле 4.16.

4 По методу наименьших квадратов определяются коэффициенты аппроксимирующей ПФ 4-ого порядка.

$$F_c = f_4 \cdot T^4 + f_3 \cdot T^3 + f_2 \cdot T^2 + f_1 \cdot T + f_0 \quad (4.20)$$

Применение аппроксимирующей ПФ 4-ого порядка позволяет вывести аналитические значения для определения температуры и диапазона плавления.

Вторая производная ГП по температуре имеет вид:

$$\frac{\partial^2 F_c}{\partial T^2} = 12f_4 \cdot T^2 + 6f_3 \cdot T + 2f_2 \quad (4.21)$$

Предлагается значения ΔT определять, как расстояние между точками перегиба ГП. Для аналитического нахождения координат искомых точек необходимо определить корни следующего уравнения:

$$6f_4 \cdot T^2 + 3f_3 \cdot T + f_2 = 0 \quad (4.22)$$

$$T_{k1} = \frac{-3f_3 + \sqrt{9f_3^2 - 24f_2 \cdot f_4}}{6f_4} \quad (4.23)$$

$$T_{k2} = \frac{-3f_3 - \sqrt{9f_3^2 - 24f_2 \cdot f_4}}{6f_4} \quad (4.24)$$

Тогда значение ΔT_2 в исходной шкале координат:

$$\Delta T_1 = (T_{k2} \cdot \sigma_T + \underline{T}) - (T_{k1} \cdot \sigma_T + \underline{T}) = \frac{\sqrt{9f_4^2 - 24f_2 \cdot f_3}}{6f_4} \cdot \sigma_T \quad (4.25)$$

Предложенное аналитическое выражение для вычисления значения ΔT_2 по сравнению с известными методиками не требует предварительной нормализации графика плавления и позволяет упростить и автоматизировать обработку результатов анализа.

Вычисление значения температуры плавления в исходном диапазоне температур можно осуществить по формуле среднего значения корней уравнения:

$$T_{m1} = \frac{(T_{k1} \cdot \sigma_T + \underline{T}) + (T_{k2} \cdot \sigma_T + \underline{T})}{2} = -\frac{f_3}{4f_4} + \underline{T} \quad (4.26)$$

Для вычисления T_{m1} и ΔT_1 выполнялось построение графика первой производной ГП по температуре на основе предварительно определенных значений параметров модельной функции с шагом дискретизации 0,01 К. Определялась в табличном или графическом виде точка, соответствующая максимальному значению модельной функции, и определяются значения T_{m1} и $\Delta T_1 = (dF/dT)_{\max 1}$.

Значения параметров T_m и ΔT для 4 образцов, определенных по новой методике, их средние значения (MV) и значения СКО (RMS) приведены в Таблице 4.3.

Таблица 4.3 - Результаты определения значений T_m и ΔT 4 проб двумя методиками

Наименование параметра	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4	MV	RMS
T_{m1} , К	361,02	360,93	360,93	360,85	360,93	0,07
T_{m2} , К	361,02	361,01	361,01	360,96	361	0,03
ΔT_1 , К	3,08	3,05	3,09	3,03	3,06	0,03
ΔT_2 , К	1,85	1,84	1,81	1,82	1,83	0,02

На основе значений СКО определенных двумя методиками величин T_m и ΔT можно предположить о преимуществах новой методики. Стоит отметить некоторые особенности разработанной методики:

- формула для определения T_{m2} не учитывает асимметрию ГП и подходит исключительно для задач, направленных на сравнение значений температур плавления различных образцов;

- диапазон аппроксимации, как правило, составляет всего несколько градусов, поэтому методика неприменима при температурном шаге более 0,5 К.

Отношение средних величин $k_{dT} = \Delta T_2 / \Delta T_1 = 3,06 / 1,83 = 1,67$ можно использовать в качестве расчетного коэффициента для сравнения величин ΔT , полученных в результате применения двух методик.

4.5 Адекватность разработанных моделей

Общепринятым подходом к проверке адекватности моделей является определение коэффициента детерминации R^2 (R -квадрат), который оценивает соответствие модели экспериментальным данным [147]. Чем ближе значение коэффициента к единице, тем теснее связь результативного значения с анализируемыми факторами и, соответственно, выше адекватность (качество) модели. Средние значения коэффициентов R^2 приведены в Таблице 4.5.

Значения R^2 увеличиваются (не уменьшаются) при добавлении новых параметров в модель, поэтому для сравнения и выбора моделей в Таблице 4.5 приведены средние значения модифицированного информационного критерия Акаике AIC_c (формула 4.19).

4.6 Оценка погрешности определения температуры плавления ДНК при использовании предложенных методик

Исходные данные получены на амплификатор АНК-32 в результате выполнения трехкратных анализов трех образцов онкомаркера цитокератина (СК-19) при четырехкратном повторении по методике плавления в диапазоне температур 343-368 К с шагом 0,5 К и длительностью выдержки каждого

значения температуры 30 секунд. Образцы имеют различное содержание GC-пар нуклеотидов, равное 55,7, 58,8 и 58,2 %, при длине фрагментов L_p , равной 131, 209 и 309 п. н. Для получения образцов проводили ПЦР с исходной концентрацией ДНК-мишени 10^6 копий / мкл. В реакционную смесь «ПЦР-Микс» с красителем SYBR Green I (ООО «Синтол», Москва) добавляли специально разработанные праймеры (ООО «ДНК-Синтез», Москва). Амплификацию проводили в стандартных пробирках (0,2 мл) при следующем тепловом режиме: прогрев 5 минут при 368 К, затем 50 циклов ПЦР с температурой 333 К в течение 50 секунд и 368 К в течение 20 секунд.

Было выполнено сравнение приведенных в разделах 4.1-4.4 методик по формулам, приведенным в Таблице 4.4. Результаты определения характерных параметров ГП с диапазоном температур 360-366 К различными методиками приведены в Таблице 4.5.

Таблица 4.4 - Методики обработки сигналов плавления ДНК

Наименование модели	Уравнение	Температура плавления	Интервал плавления
SF	$F_c = \frac{F_m}{1 + e^{-\frac{T_m - T}{k}}} + f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2$	$T_{m1} = T_m$	$\Delta T_1 = k$
		$T_{m2} = T : \frac{dF_c}{dT} = \left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}$	$\Delta T_2 = \frac{1}{\left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}}$
SFD	$-\frac{dF_c}{dT} = \frac{F_m \cdot e^{-\frac{T_m - T}{k}}}{k(1 + e^{-\frac{T_m - T}{k}})^2} + f_1 + 2 \cdot f_2 \cdot T$	$T_{m1} = T_m$	$\Delta T_1 = k$
		$T_{m2} = T : \frac{dF_c}{dT} = \left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}$	$\Delta T_2 = \frac{1}{\left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}}$
GF	$-\frac{dF_c}{dT} = \frac{1}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(T - T_m)^2}{2\sigma_g^2}} + f_1 + 2 \cdot f_2 \cdot T$	$T_{m1} = T_m$	$\Delta T_1 = \sigma$
		$T_{m2} = T : \frac{dF_c}{dT} = \left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}$	$\Delta T_2 = \frac{1}{\left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}}$
PF	$F_c = \sum_{k=0}^n f_k T^k$	$T_{m1} = -\frac{f_3}{4f_4} + \underline{T}$	$\Delta T_1 = \frac{\sqrt{9f_4^2 - 24f_2 \cdot f_3}}{6f_4} \cdot \sigma_T$
		$T_{m2} = T : \frac{dF_c}{dT} = \left(\frac{dF_c}{dT} \right)_{\max}$	$\Delta T_2 = T : \left(\frac{d^2 F_c}{dT^2} \right)_{\max} - T : \left(\frac{d^2 F_c}{dT^2} \right)_{\min}$

где F — относительная величина интенсивности флуоресценции (О.Е.Ф.); F_m — размах графика плавления (О.Е.Ф.); T_m — дробное значение температуры плавления (К); k — коэффициент, который определяется наклоном кривой; $f_0 - f_n$ — коэффициенты аппроксимирующего полинома. Среднее значение температуры \bar{T} и стандартное отклонение температуры σ_T используются для сдвига и нормализации температурной шкалы графика перед аппроксимацией полиномиальной функцией. Слагаемые f_0 , $f_1 \cdot T$ и $f_2 \cdot T^2$ учитывают смещение, линейную и квадратичную зависимость нулевой линии от температуры соответственно.

Таблица 4.5 – Сравнение результатов применения методик обработки сигналов плавления ДНК

Наименование модели	Среднее значение коэффициента детерминации R^2	Затратность вычислительных ресурсов, с	Среднее значение критерия AIC_c	Наименование показателя	Значение СКО, град.
SF	0,9996	0,3292±0,0069	131,4	T_{m1}	0,064
				T_{m2}	0,063
				ΔT_1	0,041
				ΔT_2	0,332
SFD	0,9897	0,2136±0,0044	120,6	T_{m1}	0,063
				T_{m2}	0,064
				ΔT_1	0,030
				ΔT_2	0,116
GF	0,9910	0,2448±0,0065	120,5	T_{m1}	0,060
				T_{m2}	0,063
				ΔT_1	0,035
				ΔT_2	0,117
PF	0,9831	0,1602±0,0062	113,5	T_{m1}	0,053
				ΔT_1	0,022

Наименьшая погрешность определения значений температуры плавления и ширины интервала плавления достигнута при использовании методики PF. Наилучшее качество аппроксимации по критерию величины R^2 у методики SF, по критерию AIC_c – у методики PF. Также методика на основе PF показала наименьшую затратность вычислительных ресурсов и является наиболее удобной в практическом применении за счет лучшей сходимости ее коэффициентов. Эта методика выбрана для реализации в экспериментальной версии программного обеспечения.

4.7 Разработка экспериментальной версии программного обеспечения метода плавления ДНК высокого разрешения

В известном программном обеспечении режима плавления ANK_Shell, разработанном в ИАП РАН для амплификаторов АНК-32 и АНК-48, пользователем последовательно активизируются операции: фильтрация, привязка к нулю, привязка к максимуму, дифференцирование и определение T_m . Поскольку аппроксимация ГП не используется, значения T_m вычисляются с дискретностью, равной шагу изменения температуры. Для обеспечения высокого разрешения шаг изменения температуры не должен превышать 0,1 К, при этом значительно увеличивается продолжительность анализа [2].

Разработана экспериментальная версия программного обеспечения для амплификатора АНК-32, АНК-48 и экспериментального образца АНК-96 с условным названием ANK_Melting. Программа ANK_Melting использует предложенную методику на основе полиномиальной функции. Разработанная версия программного обеспечения позволяет аппроксимировать ГП, автоматически определять значение T_m и исключить погрешность дискретизации без предварительных ручных операций.

На Рисунке 4.5а изображено рабочее окно программы, в котором осуществляется выбор анализируемых пробирок для вывода графиков исходных ГП амплификатора АНК-48, графиков аппроксимации, графиков первой и второй производных, выбор диапазона просмотра графиков по времени, например, до

6000 секунд, и диапазона по температуре (от 349 до 359 К). Температуры в программе указаны в градусах Цельсия для удобства оператора.

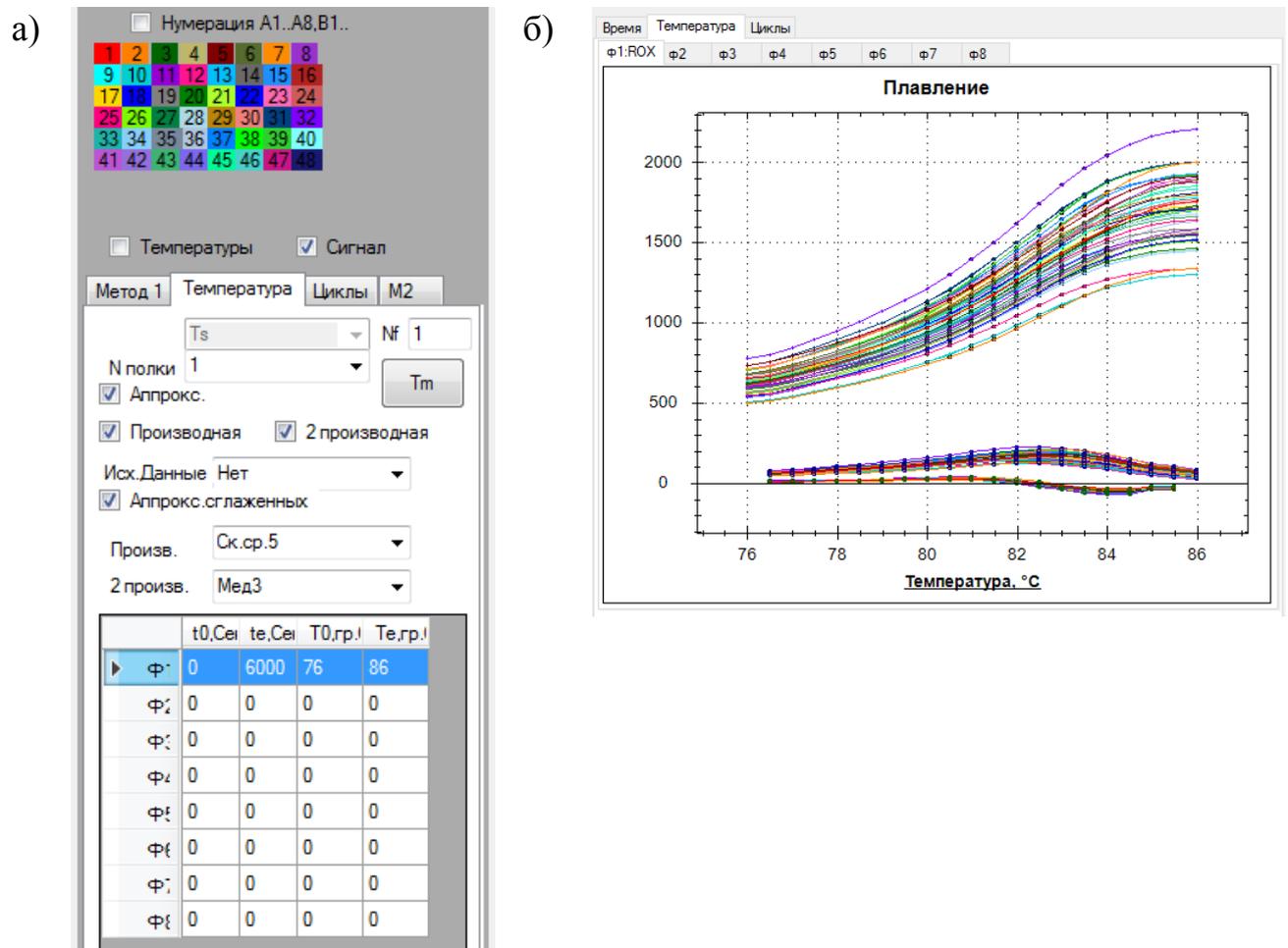


Рисунок 4.5 – Рабочие окна экспериментальной версии программы ANK_Melting: а) окно выбора параметров для просмотра и обработки ГП; б) окно с графиками зависимостей интенсивности флуоресценции и их первой и второй производных, вертикальная ось – относительные единицы флуоресценции

Для определения диапазона аппроксимации ГП дважды дифференцируются (Рисунок 4.5б). Для повышения отношения сигнала к шуму программное обеспечение ANK_Melting позволяет заранее выбрать способ фильтрации первой и второй производных зависимости интенсивности флуоресценции, в частности фильтр скользящего среднего и медианный фильтр.

Фильтр скользящего среднего является одним из наиболее простых и эффективных фильтров. Медианный фильтр удаляет из сигнала фрагменты с размерами, не превышающими половину размера окна фильтра. Наиболее

известным применением медианной фильтрации является устранение из сигнала коротких импульсных помех [106]. Фильтры использованы только для определения диапазона аппроксимации, поэтому не влияют на значение определяемой величины T_m .

На Рисунке 4.5б изображено активное окно, в котором выводятся ГП 48 проб, экспериментально полученные на амплификаторе АНК-48, с наложением графиков аппроксимации (верхние), графики первых (средние) и вторых (нижние) производных ГП по температуре.

На Рисунке 4.6 в окне, удобном для наблюдения, приведены графики первых и вторых производных зависимостей интенсивности флуоресценции при плавлении ДНК образцов одного ряда.

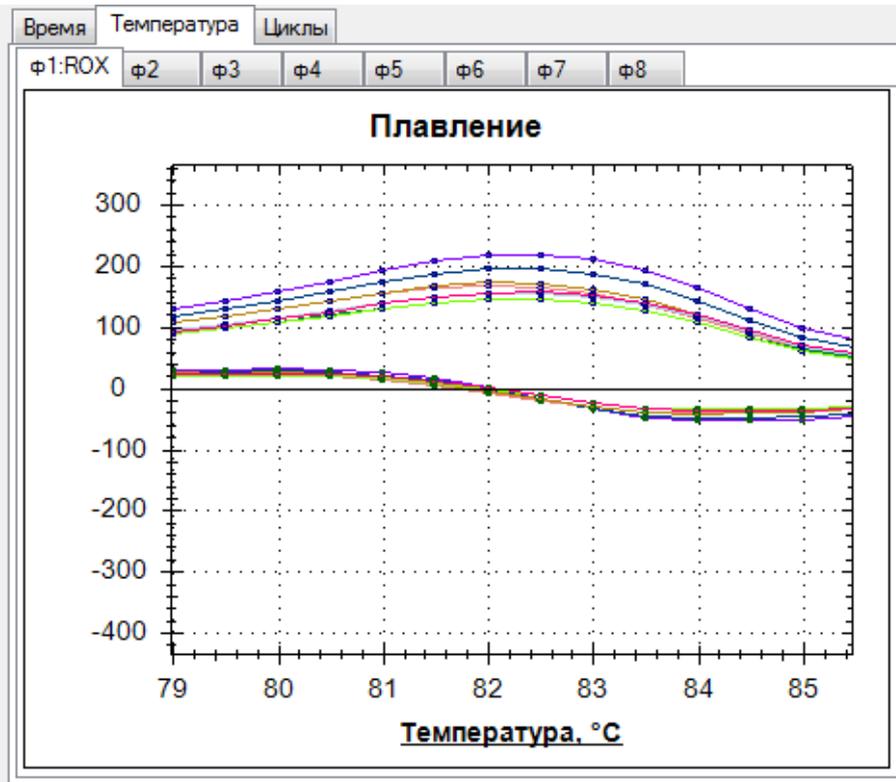


Рисунок 4.6 - Окно с графиками первой и второй производных зависимостей интенсивности флуоресценции. Вертикальная ось – относительные единицы флуоресценции

В Таблице 4.6 приведены результаты определения величины T_m от 48 проб. Для сравнения в последней строке таблицы приведены результаты применения известной программы ANK_Shell.

Таблица 4.6 - Величины T_m и СКО образцов при реализации методик ANK_Melting и ANK_Shell (К)

№ пробы	1	2	3	...	46	47	48	СКО
ANK_Melting	355,4	355,46	355,43	...	355,26	355,33	355,33	0,20
ANK_Shell	355,5	355,5	355,5	...	355	355	355,5	0,29

Сравнение результатов определения величины T_m позволяет сделать следующие выводы:

- применение известной программы ANK_Shell обеспечивает дискретность результатов, равную шагу изменения температуры (0,5 К). Определена величина, которая является характеристикой погрешности, СКО = 0,29 К;

- при использовании разработанной программы ANK_Melting обеспечивается дискретность результатов не более 0,01 К. Величина СКО = 0,20 К.

Язык программирования программы ANK_Melting: C++ и C# из Microsoft Visual Studio.

4.8 Анализ погрешностей определения температуры плавления ДНК

Приведенные в Таблице 4.6 значения СКО являются характеристиками погрешностей, которые содержат систематическую и случайную составляющие [12]. Отклонения значений T_m множества проб с одинаковыми образцами от среднего значения могут быть использованы для определения неравномерности распределения температуры в лунках держателя пробирок. Эти отклонения значений T_m можно считать систематическими погрешностями, поскольку они определяются тепловыми параметрами конкретного анализатора.

Случайные погрешности можно определить путем определения отклонений значений T_m от среднего значения в каждой пробирке при многократных анализах. Такие измерения были выполнены на экспериментальном образце

амплификатора АНК-96. Для уменьшения шумов отсчеты флуоресцентного отклика пробы суммируются на интервале наблюдения. В детекторе используется выборка отсчетов 12-разрядного аналого-цифрового преобразователя (АЦП). Общее время единичного измерения составляет 80 мс, что позволяет накопить нужную статистику для оценки плотности вероятности. Такой алгоритм позволяет обеспечить период опроса всех 96 образцов в одном канале за 3 с.

Для получения исходных данных были применены пробы, содержащие зонд-ДНК-мишень с флуорофором (ROX) в комбинации с гасителем производства ООО «Синтол». Температура изменялась в диапазоне 349 до 359 К с шагом 0,5 К. Каждое значение интенсивности флуоресценции определяется как сумма 8 измерений при каждом шаге изменения температуры пробы в интервале измерений в интервале 30 с. Общее время эксперимента составило менее 10 мин.

В ячейках Таблицы 4.7, расположенных в столбце А1 и строках от В1 до Е8, приведены результаты определения величины T_m от 32 проб, которые расположены в лунках держателя пробирок от В1 до Е8. В столбцах от А2 до А12 находятся результаты еще 11 повторных анализов. В столбце СЗВ приведены средние значения величин T_m , а в столбце СКОВ – значения СКО от 12 анализов каждой пробы. В строке СЗА - средние значения величин T_m при каждом анализе, а в строке СКОА - значения СКО от 32 проб при каждом анализе.

Таблица 4.7- Величины T_m , СЗ и СКО (К)

№ пробы	Положение пробы	Номер анализа					Функции	
		А1	А2	...	А11	А12	СЗВ	СКОВ
1	В1	353,93	353,86	...	353,82	353,85	353,87	0,03
2	В2	353,84	353,83	...	353,74	353,76	353,77	0,03
...
31	Е7	354,09	354,03	...	354	353,93	354,01	0,04
32	Е8	354,25	354,2	...	354,2	354,15	354,16	0,05
Функции	СЗА	354,04	354,04	...	353,99	353,98	354,01	0,03
	СКОА	0,13	0,13	...	0,13	0,13	0,13	

Первый основной результат (1ОР - среднее значение от значений СКО каждой из 32 проб при 12 анализах) приведен в ячейке С3А, СКОВ: 1ОР = 0,03 К. Этот результат определяет случайную погрешность определения величин T_m , при 12 анализах 32 проб.

Второй основной результат (2ОР - среднее значение от значений СКО всех 32 проб при 12 анализах) приведен в ячейке С3В, СКОА: 2ОР = 0,13 К. Этот результат оценивает в основном систематическую погрешность определения величин T_m 32 проб при 12 анализах.

Подобные результаты приведены в Таблице 4.8. Величины T_m получены при обработке зависимостей интенсивности флуоресценции других 32 проб, которые расположены в лунках держателя проб от I1 до L8.

Таблица 4.8 - Величины T_m , СЗ и СКО (К)

№ пробы	Положение пробы	Номер анализа					Функции	
		A1	A2	...	A11	A12	СЗВ	СКОВ
1	I1	353,8	353,88	...	353,81	353,81	353,8	0,03
2	I2	354,11	354,14	...	354,2	354,19	354,17	0,03
...
31	L7	354,51	354,49	...	354,47	354,39	354,47	0,04
32	L8	354,8	354,71	...	354,69	354,68	354,71	0,05
Функции	С3А	354,18	354,2	...	354,15	354,15	354,16	0,04
	СКОА	0,35	0,32	...	0,30	0,29	0,31	

Основные результаты: 1ОР = 0,04 К и 2ОР = 0,31 К.

Сравнение результатов определения величин 1ОР и 2ОР позволяет сделать следующие выводы:

- величины 1ОР (0,03 и 0,04 К) определяют случайные погрешности измерения определения величин T_m , при 12 анализах двух кластеров из 32 проб;

- величины 2σ (0,13 и 0,31 К) определяют систематические погрешности измерения величин T_m двух кластеров из 32 проб при 12 анализах, поскольку они отражают неравномерность распределения температуры в лунках держателя пробирок.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что применение новой методики автоматического определения величины температуры плавления T_m и экспериментальной версии программы ANK_Melting позволяют достичь стандартов плавления высокого разрешения. За счет аппроксимации ГП полностью исключена составляющая погрешности, которая определяется дискретностью сигналов. Случайная погрешность определения температуры T_m не превышает 0,05 К, что соответствует условиям методики плавления высокого разрешения. Использование программы позволило увеличить производительность амплификатора: при диапазоне изменения температуры от 349 до 359 К, при шаге 0,5 К и длительности наблюдения интенсивности флуоресценции при каждом шаге, равной 30 с, общее время экспериментов составляет 10 минут по сравнению с традиционным протоколом исследований, предполагающем 50 минут анализа. Показано, что за счет высокой производительности методики можно выполнить повторные анализы, по результатам которых определяются случайная и систематическая погрешности измерения величины T_m .

4.9 Основные результаты главы 4

1 Разработаны методики обработки сигналов плавления ДНК на основе их аппроксимации непрерывными функциями: усовершенствованными сигмоидальной (SF), производной сигмоидальной (SFD), Гаусса (GF) и полиномиальной функцией оптимальной степени (PF).

Методика SF позволяет адекватно аппроксимировать график плавления, обладающий нелинейной формой базовой линии. Для улучшения сходимости коэффициентов SF при реализации МНК выполняется предварительная оценка их значений на основе значений амплитуды, максимума отрицательной производной

ГП по температуре и определении наклона начального участка ГП. Предложены аналитические выражения для вычисления основных параметров ГП: T_m и ΔT .

Методики на основе SFD и GF основаны на аппроксимации центральной конечной разности ГП 1-ого порядка. Улучшение сходимости коэффициентов аппроксимирующих функций и определение значений T_m и ΔT выполняется аналогично методике SF.

При реализации методики PF в качестве критерия оптимальной степени полиномиальной функции выбран модифицированный критерий Акаике. Предложено ограничивать диапазон аппроксимации по максимальному и минимальному значениям второй производной ГП по температуре. Приведены аналитические формулы определения значений T_m и ΔT , ориентированные на полином 4 степени.

Все методики реализованы в программных средах Excel и MATLAB. Применение методик обеспечивает высокое разрешение анализа методом плавления при температурном шаге 0,5 К.

2 Выполнено сравнение результатов применения методик на экспериментальных данных. Наименьшая погрешность определения значений температуры плавления и ширины интервала плавления достигнута при использовании методики PF. Наилучшее качество аппроксимации по критерию величины R^2 у методики SF, по критерию AIC_c – у методики PF. Также методика на основе PF показала наименьшую затратность вычислительных ресурсов и является наиболее удобной в практическом применении за счет лучшей сходимости ее коэффициентов. Эта методика выбрана для реализации в экспериментальной версии программного обеспечения.

3 На базе предложенной методики, основанной на аппроксимации полиномиальной функцией, создана экспериментальная версия программного обеспечения ANK_Melting для серийно выпускаемых амплификаторов АНК-32, АНК-48, АНК-64 и экспериментального образца АНК-96. Сравнение результатов применения разработанной программы с известным ПО ANK Shell на основе

экспериментальных данных, полученных на амплификаторе АНК-32, выявили следующие достоинства разработанного ПО:

- обработка результатов без участия оператора;
- более низкая погрешность определения характерных параметров ГП по сравнению с известной программой ANK_Shell: 0,20 К против 0,29 К.

4 Выполнена оценка систематической и случайной погрешностей определения разработанной программой ANK_Melting температуры плавления T_m на экспериментальном образце амплификатора АНК-96. Систематическая погрешность не превысила 0,39 К, случайная – 0,05 К. Систематическая погрешность в значительной степени обусловлена неравномерностью температурного поля держателя пробирок. Случайная погрешность обусловлена невоспроизводимостью условий при выполнении анализов методом плавления ДНК.

Заключение

В рамках настоящей диссертации получены следующие основные результаты:

1 Разработана корректирующая система, направленная на компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок амплификатора и основанная на корректировке сигналов управления температурным режимом элементов Пельтье и формировании поправок температур проб при повторных анализах по выявленным различиям температур плавления образцов в массиве пробирок. Применение корректирующей системы в составе амплификатора направлено на реализацию анализа методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также обнаружение небольших различий (0,1-0,3 К) температур плавления при анализе методом HRM, требуемому в задачах генотипирования образцов с близкими профилями плавления. Предложенное техническое решение может быть реализовано в амплификаторах без изменений их конструкции.

2 Предложены варианты реализации термогидравлической системы в составе теплового блока амплификатора. Новые технические решения направлены на:

- повышение производительности амплификатора путем увеличения скоростей нагрева и охлаждения анализируемых проб за счет протекания жидкости заданной температуры и ее удаления в каналах держателя пробирок амплификатора;

- компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок за счет циркуляции жидкости в каналах держателя пробирок.

Подобные системы могут быть реализованы в новых амплификаторах, в том числе, планируемом к разработке в ИАП РАН приборе АНК-96.

Сравнительный анализ предложенных термогидравлических систем не выявил абсолютного преимущества одной системы над другими, окончательный выбор целесообразен на стадии опытно-конструкторских работ (ОКР) при разработке нового амплификатора.

3 Сформулирована математическая модель, позволяющая описать процессы теплопереноса в тепловом блоке амплификатора с термогидравлической системой. Расчет динамики тепловых процессов при термоциклировании пробы в тепловом блоке амплификатора сведен к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности жидкости λ_{eq} и переменным коэффициентом теплоотдачи α_c между поверхностью каналов держателя пробирок и протекающей при различных скоростях и температурах жидкости.

4 Выполнен расчет динамики тепловых процессов численными методами, выявлено следующее:

- термогидравлическая система обеспечивает значительное, до 6 раз, сокращение времени охлаждения держателя пробирок;

- проба обладает значительной тепловой инерцией, в основном, за счет низкой теплопроводности пробирок, температура пробы значительно отстает от температуры держателя пробирок при его термоциклировании;

- использование термогидравлической системы позволяет уменьшить время теплового цикла ПЦР на 43 секунд, тем самым, сократить время проведения анализа на величину до 36 минут при реализации 50 циклов ПЦР-РВ или около 25 % от общей продолжительности.

5 Разработан и испытан экспериментальный стенд на основе амплификатора АНК-32, содержащий термогидравлическую систему. Экспериментально подтверждено повышение скорости изменения температуры держателя пробирок при использовании термогидравлической системы до 6 раз. Проведено сравнение результатов эксперимента и численного расчета, максимальное отклонение по средней скорости охлаждения держателя пробирок при различных скоростях протекания жидкости составляет 8,4 %.

Установлено, что за счет введения в состав амплификатора термогидравлической системы достигается уменьшение разброса температур по

лункам держателя пробирок до 5 раз. Эффективность термогидравлической системы повышается при уменьшении значений рабочих температур анализа.

6 Разработаны методики обработки графиков плавления ДНК, позволяющие определить основные характерные параметры T_m и ΔT , достичь стандартов плавления высокого разрешения и автоматизировать вычислительный процесс. Методики основаны на аппроксимации графиков плавления различными функциями: усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией оптимальной степени. Разработан комплекс программ в рамках системы MATLAB для реализации предложенных методик. Выполнено сравнение результатов их применения на основе экспериментальных данных. Наименьшая погрешность определения значений температуры плавления и ширины интервала плавления достигнута при использовании методики PF. Наилучшее качество аппроксимации по критерию величины R^2 у методики SF, по критерию AIC_c – у методики PF. Также методика на основе PF показала наименьшую затратность вычислительных ресурсов и является наиболее удобной в практическом применении за счет лучшей сходимости ее коэффициентов. Эта методика выбрана для реализации в экспериментальной версии программного обеспечения.

7 Создана экспериментальная версия программного обеспечения для амплификаторов АНК-32, АНК-48, АНК-64 и экспериментального образца АНК-96 на основе разработанной методики обработки графиков плавления с помощью полиномиальной функции. Сравнение результатов применения разработанной программы с известным ПО ANK Shell на основе экспериментальных данных, полученных на амплификаторе АНК-32, выявили следующие достоинства разработанного ПО:

- обработка результатов без участия оператора;
- более низкая погрешность определения характерных параметров ГП по сравнению с известной программой ANK_Shell: 0,20 К против 0,29 К.

8 Выполнена оценка систематической и случайной погрешностей определения разработанной программой ANK_Melting температуры плавления T_m 96 проб ДНК на экспериментальном образце амплификатора АНК-96. Систематическая погрешность не превысила 0,39 К, случайная – 0,05 К. Систематическая погрешность в значительной степени обусловлена неравномерностью температурного поля держателя пробирок, ее в значительной степени можно уменьшить с помощью корректирующей системы, предложенной во второй главе диссертации. Случайная погрешность обусловлена невоспроизводимостью условий при выполнении анализов методом плавления ДНК.

Перспективным направлением дальнейших исследований является разработка методик автоматической кластеризации и классификации сигналов плавления и реализация разработанных алгоритмов в программном обеспечении, предназначенном для широкого перечня коммерческих амплификаторов и типов файлов данных анализа плавления ДНК высокого разрешения.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю Киселеву Игорю Георгиевичу, директору ИАП РАН Евстратову Анатолию Александровичу, заведующему кафедрой ПГУПС Киму Константину Константиновичу и всему коллективу ИАП РАН, в особенности, Белову Юрию Васильевичу, Булянице Антону Леонидовичу, Курочкину Владимиру Ефимовичу и Манойлову Владимиру Владимировичу за бесценную помощь и всестороннюю поддержку!

Список сокращений и условных обозначений

АЦП	аналога-цифровой преобразователь
ВАК	Высшая аттестационная комиссия
ГП	график плавления
дАТФ, dATP	дезоксиаденозинтрифосфат
дГТФ, dGTP	дезоксигуанозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДИ	доверительный интервал
дТТФ, dTTP	дезокситимидинтрифосфат
дЦТФ, dCTP	дезоксцитозинтрифосфат
кДНК	комплементарная ДНК
МГК, PCA	метод главных компонент, principal component analysis
МКР	метод конечных разностей
МКЭ	метод конечных элементов
МЛУ МБТ	множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза
МНК	метод наименьших квадратов
НИР	научно-исследовательская работа
О.Е.Ф.	относительные единицы флуоресценции
ОКР	опытно-конструкторская работа
ПНИЭР	прикладная научно исследовательская экспериментальная работа
ПО	программное обеспечение
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с наблюдением в реальном времени
РНК	рибонуклеиновая кислота
СВЧ	сверхвысокие частоты
СКО, RMS	среднеквадратическое отклонение, root mean square
США	Соединённые Штаты Америки

ФЭУ	фотоэлектронный умножитель
ЭВМ	электронная вычислительная машина
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
CAGR	compound annual growth rate, совокупный среднегодовой темп роста
GF	функция Гаусса
HRM	high resolution melting, плавление высокого разрешения
MS-HRM	methylation-sensitive high resolution melting, метод плавления высокого разрешения, чувствительного к метилированию
PF	полиномиальная функция
SF	сигмоидальная функция
SFD	производная сигмоидальной функции
SNP	single-nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм

Список литературы

- 1 Ребриков, Д.В. ПЦР в «реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов. – М.: БИОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
- 2 Никитина, Д.И. Использование высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК в диагностике наследственных заболеваний / Д.И. Никитина, М.А. Маретина, А.А. Егорова, А.Б. Масленников, А.В. Киселев // Медицинская генетика. – 2017. – №16(5). – 26–33 с.
- 3 Li, H. High resolution melting curve analysis with MATLAB-based program / H. Li, R. Lan, N. Peng, J. Sun, Y. Zhu // Measurement. – Vol. 90. – 2016. – P. 178-186.
- 4 Белов, Д.А. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК / Д.А. Белов, Н.А. Корнева, А.С. Альдекеева, Ю.В. Белов, И.Г. Киселев // Научное приборостроение. – 2016. – 26 т. – № 2. – С. 17-22.
- 5 Белов, Д.А. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, В.В. Манойлов // Научное приборостроение. – 2016. – 26 т. – № 3. – С. 10-14.
- 6 Белов, Д.А. Инновационные решения при разработке прецизионного термостата / Д.А. Белов, И.Г. Киселев, Я.С. Ватулин // Профессиональное образование, наука и инновации в XXI веке, т. 1: Сборник трудов X Санкт-Петербургского конгресса – СПб.: ФГБОУ ВО ПГУПС. – 2016. – С. 45-48.
- 7 Белов, Д.А. Разработка методик обработки сигналов плавления ДНК / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, В.В. Манойлов // Научное приборостроение. – 2017. – 27 т. – № 1. – С. 83-89.
- 8 Белов, Д.А. Методика определения разброса температур по лункам анализаторов нуклеиновых кислот / Д.А. Белов, А.С. Альдекеева, Ю.В. Белов, И.Г. Киселев // Научное приборостроение. – 2017. – 27 т. – № 4. – С. 34-39.
- 9 Белов, Д.А. Новая методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2018. – 28 т. – № 1. – С. 3-10.

10 Белов, Д.А. Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, А.Л. Широкопад // Научное приборостроение. – 2018. – 29 т. – № 2. – С. 11-19.

11 Белов, Д.А. Совершенствование теплового блока анализатора нуклеиновых кислот / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, И.Г. Киселев, Ю.О. Водопьянова // Бюллетень результатов научных исследований. – 2018. – № 4. – С. 5-11.

12 Belov, D.A. Development of a new technique for quantitative PCR analysis / D.A. Belov, Yu.V. Belov, V.E. Kurochkin // J. Phys.: Conf. Ser. – 2019. – 1400 033021.

13 Курочкин, В.Е. Определение модельных констант при вычислении температуры плавления ДНК / В.Е. Курочкин, Д.А. Белов, Ю.В. Белов, А.Н. Зубик // Научное приборостроение. – 2020. – Т. 30, № 2. – С. 10–16.

14 Belov, D.A. Modeling of the DNA Melting Point Dependence on Various Analysis Factors / D.A. Belov, Yu.V. Belov, I.G. Kiselev // IEEE 2020 International Multi-Conference on Industrial Engineering and Modern Technologies (FarEastCon). – 2020. – P. 1-3.

15 Belov, D.A. Analytical determination of DNA melting characteristic parameters using the optimal degree polynomial regression model / D.A. Belov, A.L. Bulyanitsa, N.A. Korneva, A.S. Aldekeeva, Yu.V. Belov // Journal of Physics: Conference Series. – 2021. – 2103 012057.

16 Kiselev, I.G. Physical processes simulation in a precision device for liquid samples thermal cycling / I.G. Kiselev, D.A. Belov // Journal of Physics: Conference Series. – 2021. – 2131 022061.

17 Курочкин, В.Е. Методика определения характерных параметров при плавлении ДНК в анализаторах нуклеиновых кислот / В.Е. Курочкин, Д.А. Белов, Ю.В. Белов, А.Н. Зубик // Медицинская техника. – 2021. – № 5. – С. 23-25. (Англ. версия: Kurochkin, V.E., Belov D.A., Belov Yu.V., and Zubik A.N. A method for determining characteristic DNA melting parameters in nucleic acid analyzer / V.E.

Kurochkin, D.A. Belov, Yu.V. Belov, A.N. Zubik // *Biomedical Engineering*. – 2022. – Vol. 55 № 5. – P. 333–336).

18 Патент № RU 2640186. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. Дата регистрации: 26.12.2017.

19 Патент № RU 2666209. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. Дата регистрации: 06.09.2018.

20 Патент № RU 2691763. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты. Дата регистрации: 18.06.2019.

21 Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020665582. Программа для обработки сигналов флуоресценции при плавлении ДНК. Дата регистрации: 27.11.2020.

22 Khandpur R.S. Thermocycler (PCR Machine) / R.S. Khandpur // *Compendium of Biomedical Instrumentation* – 2019. – P. 1927–31.

23 Chargaff, E. The composition of the desoxyribonucleic acid of salmon sperm / E. Chargaff, R. Lipshitz, C. Green, M.E. Hodes // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 192. – P. 223–230.

24 Рис Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию: От клеток к атомам: Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 142 с.

25 Епринцев, А.Т. Идентификация и исследование экспрессии генов: учебно-методическое пособие для вузов / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин. – Воронежский государственный университет, 2008. – 64 с.

26 Rio, D.C. Reverse transcription-polymerase chain reaction / D.C. Rio // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2014. – № 11. – P. 1207-1216.

27 Лопухов, Л.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л.В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2000. – № 3. – С. 96-106.

- 28 Clark, D.P. Polymerase Chain Reaction / D.P. Clark // *Molecular Biology*. – 2019. – P. 168–198.
- 29 Зорина, В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): методическое пособие / В.В. Зорина. – М.: ДНК-Технология, 2012. – 76 с.
- 30 Тупик, А.Н. Разработка микрочипового устройства для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде: дис. канд. техн. наук. – Санкт-Петербург, 2015.
- 31 Бакай, Д.А. Разработка пневматического прецизионного устройства нагрева и охлаждения: дис. канд. техн. наук. – М., 2005.
- 32 Smith, C.J. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology / C.J. Smith, A.M. Osborn // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2009. – Vol. 67. – № 1. – P. 6–20.
- 33 Kralik, P. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything / P. Kralik, M. Ricchi // *Frontiers in Microbiology* – 2017. – 8:108.
- 34 Rutledge, R.G. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. / R.G. Rutledge, D. Stewart // *BMC Biotechnol.* – 2008. – 8:47.
- 35 Белов, Ю.В. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / Ю.В. Белов, А.И. Петров, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин // *Научное приборостроение*. – 2011. – Т. 21. – № 1. – С. 44–49.
- 36 Сочивко, Д. Г. Стохастическое моделирование кинетических кривых полимеразной цепной реакции / Д.Г. Сочивко, А.А. Фёдоров, В.В. Лавров, Д.А. Варламов, В.Е. Курочкин, Р.В. Петров // *Доклады академии наук*. – 2011. – 439 т. – № 5. – С. 696–699.
- 37 Bartlett, J.M. A short history of the polymerase chain reaction. / J.M. Bartlett, D. Stirling // *Methods Mol Biol.* – 2003. – № 226. – P. 3-6.
- 38 Higuchi, R.G. Instrument for monitoring nucleic acid amplification // 11/12/1997 – United States Patent No. 6814934.

39 Алексеев, Я.И. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) / Я.И. Алексеев, Ю.В. Белов, Д.А. Варламов // Научное приборостроение. – 2006. – 16 т. – № 3. – С. 132–136.

40 Hsieh, T.-M. Enhancement of thermal uniformity for a microthermal cycler and its application for polymerase chain reaction / T.-M. Hsieh, C.-H. Luo, F.-C. Huang, J.-H. Wang, L.-J. Chien, G.-B. Lee – 2008. – Vol. 130. – № 2. – P. 848–856.

41 URL: https://www.lifescience.roche.com/global_en/brands/realtime-pcr-overview.html#tab-1 (дата обращения: 16.04.2022).

42 Киселева, Е.В. Совершенствование лабораторной диагностики бактериемий и сепсиса у онкогематологических больных с использованием технологий амплификации нуклеиновых кислот : дис. канд. биол. наук : 14.01.21 / Киселева Екатерина Евгеньевна. – СПб., 2017. – 180 с.

43 Патент № US 10406527. Thermocycler. Дата регистрации: 10.09.2019.

44 Магданов, Э. Г. Современное приборное оснащение количественной и цифровой ПЦР / Э.Г. Магданов, Д.А. Чемерис, А.В. Чемерис // Биомика. – 2011. – 1 т. – № 1. – С. 15-60.

45 Патент № US 7795013. Holder and method for cooling or heating samples. Дата регистрации: 07.09.2006.

46 Патент № US 5942432. Apparatus for fluid impingement thermal cycler. Дата регистрации: 24.09.1999.

47 Шостаковский, П. Современные решения термоэлектрического охлаждения для радиоэлектронной, медицинской, промышленной и бытовой техники / П. Шостаковский // Силовая электроника. – 2009. – №12. – С. 40-46.

48 Иоффе, А.Ф. Полупроводниковые термоэлементы / А.Ф. Иоффе. – М.-Л: АН СССР, 1960. – 188 с.

49 Бараненко, А.В. и др. Холодильные машины: Учеб. для студентов ВТУЗов специальности «Техника и физика низких температур» / Под общ. ред. Л.С. Тимофеевского. – СПб.: Политехника, 1997. – 992 с.

- 50 Веденов, А. А. Переход спираль – клубок в ДНК / А.А. Веденов, А.М. Дыхне, М.Д. Франк-Каменецкий // Успехи физических наук. – 1971. – 105 т. – вып. 3. – С. 479–519.
- 51 Wartell, R.M. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment / R.M. Wartell, A.S Benight // Physics Reports. – 1985. – Vol. 126. – P. 67–107.
- 52 Rice, S.A. The Thermal Denaturation of Deoxyribose Nucleic Acid / S.A. Rice, P. Doty // Journal of American Chemical Society. – 1957. – Vol. 79. – P. 3937–3947.
- 53 Wittwer, C.T. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification / C.T. Wittwer, M.G. Herrmann, A.A. Moss, R.P. Rasmussen // Biotechniques. – 1997. – Vol. 22. – P. 134–138.
- 54 Marmur, J. Heterogeneity in Deoxyribonucleic Acids: I. Dependence on Composition of the Configurational Stability of Deoxyribonucleic Acids / J. Marmur, P. Doty // Nature. – 1959. – Vol. 183. – № 4673. – P. 1427–1429.
- 55 Marmur, J. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature / J. Marmur, P. Doty // Journal of Molecular Biology. – 1962. – Vol. 5. – № 1. – P. 109–118.
- 56 Porschke, D. Cooperative non-enzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix-coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids / D. Porschke // Biopolymers. – 1971. – Vol. 10. – P. 1989–2013.
- 57 Blake, R.D. Cooperative lengths of DNA during melting / R.D. Blake // Biopolymers. – 1987. – Vol. 26. – P. 1063–1074.
- 58 Breslauer, K.J. Predicting DNA duplex stability from the base sequence / K.J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, L.A. Marky // Proc Natl Acad Sci USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 3746–3750.
- 59 Owczarzy, R. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures / R. Owczarzy, Y. You, B.G. Moreira, J.A. Manthey, L. Huang, et al. // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43. – P. 3537–3554.

60 Календарь, Р.Н. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами / Р.Н. Календарь, Ю.М. Сиволап // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 11. – № 3-4. – С. 55–65.

61 Software Methods and Equations. URL: <https://www.dna.utah.edu/tm/tool.html> (дата обращения: 03.02.2022).

62 Blake, R.D. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability / R.D. Blake, S.G. Delcourt // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – №. 11. – P. 2095–2103.

63 Dwight, Z. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application / Z. Dwight, R. Palais, C.T. Wittwer // Bioinformatics. – 2011. – Vol. 27. – № 7. – P. 1019–1020.

64 Privalov, P.L. Determination of stability of the DNA double helix in an aqueous medium / P.L. Privalov, O.B. Ptitsyn, T.M. Birshtein // Biopolymers. – 1969. – Vol. 8. – № 5. – P. 559–571.

65 Gudnason, H. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature / H. Gudnason, M. Dufva, D.D. Bang, A. Wolff // Nucleic Acids Res. – 2007. – Vol. 35 – № 19. – e127.

66 Сочивко, Д.Г. Метод бесконтактного измерения температуры в реакторах полимеразной цепной реакции / Д.Г. Сочивко, Д.А. Варламов, А.А. Федоров, В.Е. Курочкин // Письма в ЖТФ. – 2016. – 42 т. № 7. – С. 53–58.

67 SantaLucia, J.Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – Vol. 95. – № 4. – P. 1460-5.

68 Watkins, N.E.Jr., SantaLucia J.Jr. Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes // Nucleic Acids Res. – 2005. – Vol. 33. – № 19. – P. 6258-67.

69 Wittwer, C. T. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen / C.T. Wittwer, G.H. Reed, C.N. Gundry, J.G. Vandersteen, R.J. Pryor // Clin Chem. – 2003. – Vol. 49 – P. 853–860.

- 70 Reed, G.H. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. / G.H. Reed, J.O. Kent, C.T. Wittwer // *Pharmacogenomics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 597–608.
- 71 Hoek, K.G. Fluorometric Assay for Testing Rifampin Susceptibility of Mycobacterium Tuberculosis Complex / K.G. Hoek, N.C. Gey van Pittius, H. Moolman-Smook, K. Carelse-Tofa, A. Jordaan, G.D Spuy, Streicher E., T.C. Victor, P.D. van Helden, R.M. Warren // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 1369–1373.
- 72 Choi, G. E. High-resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Clinical Isolates / G.E. Choi, S.M. Lee, J. Yi, S.H. Hwang, H.H. Kim, E.Y. Lee, E.H. Cho, J.H. Kim, H.J. Kim, C.L. Chang // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48 – № 11. – P. 3893–3898.
- 73 Jing, W. Assessment for Melting Temperature Measurement of Nucleic Acid by HRM / W. Jing, P. Xiaoming, L. Xingguo // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2016. – P. 1–8.
- 74 Lope, P. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 isolates of Peru using HRM, a post PCR molecular biology method / P. Lope, H. Maribel, M. Egma, B. Henri, P. Carlos // *Bioinformatics* – 2019. – Vol. 15. – № 9. – P. 640-645.
- 75 Tamburro, M. High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature. / M. Tamburro, G. Ripabelli // *Ann Ig.* – 2017. – Vol. 29. – № 4. – P. 293-316.
- 76 Pholwat S., Liu J., Stroup S., Gratz J., Banu S., Rahman S.M., Ferdous S.S., Foongladda S., Boonlert D., Ogarkov O., Zhdanova S., Kibiki G., Heysell S., Houghton E. Integrated microfluidic card with TaqMan probes and high-resolution melt analysis to detect tuberculosis drug resistance mutations across 10 genes // *mBio*. – 2015. – Vol. 6. – № 2. – e0227.
- 77 Лаврова, О.И. HRM – новый молекулярный метод определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза / О.И. Лаврова, М.В. Альварес Фигероа, М.Г. Творогова // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2014. – №7. – С. 62-64.

78 Lehmensiek, A. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley *Theoretical and Applied Genetics* / A. Lehmensiek, M.W. Sutherland, R.B. McNamara, – 2008. – Vol. 117. – № 5. – P. 721–728.

79 S.-B. Wu High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs / Wu S.-B., Wirthensohn M.G., Hunt P., Gibson J.P., Sedgley M. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – Vol. 118. – № 1. – P. 1–14.

80 Ceri, A. Development and validation of a rapid method for genotyping three P-selectin gene polymorphisms based on high resolution melting analysis / A. Ceri, M. Pavic, I. Horvat, M. Radic Antolic, R. Zadro // *J Clin Lab Anal*. – 2019. – Vol. 33 – № 3. – e22698.

81 Liew, M. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons / M. Liew, R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon, C. Wittwer // *Clinical Chemistry*. – 2004. – Vol. 50. – № 7. – P. 1156–1164.

82 Worm, J. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis / J. Worm, A. Aggerholm, P. Guldborg // *Clin Chem*. – 2001 – № 47 – P. 1183–1189.

83 Wojdacz, T.K. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation / T.K. Wojdacz, A. Dobrovic // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – № 35. – e41.

84 Epigenetic-Chronological Age Mismatch Warns of Cancer. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. URL: <https://www.genengnews.com/topics/omics/epigenetic-chronological-age-mismatch-warns-of-cancer> (дата обращения: 12.01.2022).

85 Weidner, C.I. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites / C.I. Weidner, Q. Lin, C.M. Koch et al. // *Genome Biology*. – 2014. – № 15. – R24.

86 Morinha, F. High-resolution melting analysis for bird sexing: a successful approach to molecular sex identification using different biological samples / F.

Morinha, P. Travassos, F. Seixas, N. Santos, R. Sargo, L. Sousa, P. Magalhães, J.A. Cabral, E. Bastos // *Mol Ecol Resour.* – 2013 – Vol. 13. – № 3 – P. 473-483.

87 Balog, J.A. Decoding DNA labels by melting curve analysis using real-time PCR / J.A. Balog, L.Z. Fehér, L.G. Puskás // *Biotechniques.* – 2017 – Vol. 63. – № 6. – P. 261-266.

88 Galarza, M. High-resolution melting analysis for molecular detection of multidrug resistance tuberculosis in Peruvian isolates / M. Galarza, M. Fasabi, K.S. Levano, E. Castillo, N. Barreda, M. Rodriguez, H. Guio. // *BMC Infectious Diseases.* – 2016. – № 16. – 260.

89 Li, B-S. Is High Resolution Melting Analysis (HRMA) Accurate for Detection of Human Disease-Associated Mutations? A Meta Analysis / B.-S. Li, X.-Y. Wang, F.-L. Ma, B. Jiang, X.-X. Song, A.-G. Xu // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – № 12. – e28078.

90 URL: https://dna.utah.edu/Hi-Res/2_Hi-Res_Dyes.html (дата обращения: 03.02.2022).

91 Mao, F. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications / F. Mao, W.-Y. Leung, X. Xin // *BMC Biotechnol.* – 2007. – Vol. 7. – № 76.

92 Eischeid, A.C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR / A.C. Eischeid // *BMC research notes* – 2011. – Vol. 4. – № 1. – P. 263.

93 Radvanszky J. Comparison of different DNA binding fluorescent dyes for applications of high-resolution melting analysis / J. Radvanszky, M. Surovy, E. Nagyova, G. Minarik, L. Kadasi // *Clin Biochem.* – 2015 – Vol. 48. – № 9. – P. 609-616.

94 Price E.P. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni* / E.P. Price, H. Smith, F. Huygens, P.M. Giffard // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – Vol. 73. – № 10. – P. 3431-3436.

95 Pornprasert, S. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis / S.

Pornprasert, A. Phusua, S. Suanta, R. Saetung, T. Sanguansermisri // *Eur J Haematol.* – 2008. – Vol. 80. – № 6. – P. 510-514.

96 Kwok, A. Genotyping a Class 4 SNP by high resolution melt (HRM) using SYBR Green I / A. Kwok, B. Bassam, and V. Reja // *Research report.* – 2007. – P. 1-2.

97 Herrmann M.G. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping / M.G Herrmann, J.D. Durtschi, C.T. Wittwer, K.V. Voelkerding // *Clinical Chemistry* – 2007. – Vol. 53. – № 8. – P. 1-3.

98 Desriani, A. Design and characterization of a SYBR Green I-based melting curve method for investigation of HER2I655V polymorphism in breast cancer / A. Desriani, S.S. Ghaissani, S.R. Kinanti, M.A. Warisman, N. Fitria // *J Genet Eng Biotechnol.* – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. :6.

99 Reja, V. ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis. / V. Reja, A. Kwok, G. Stone, L. Yang, A. Missel, C. Menzel, B. Bassam // *Methods* – 2010. – Vol. 50. – № 4. – S10–S14.

100 Патент № US 8271205. Method and system for analysis of melt curves, particularly dsDNA and protein melt curves. Дата регистрации: 18.09.2012.

101 Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components / H. Hotelling // *Journal of educational psychology.* – 1933. – № 24. – P. 417.

102 Athamanolap, P. Trainable High Resolution Melt Curve Machine Learning Classifier for Large-Scale Reliable Genotyping of Sequence Variants / P. Athamanolap, V. Parekh, S.I. Fraley, V. Agarwal, D.. Shin, M.A. Jacobs, etc. // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – № 10. – e109094.

103 Gundry, C.N. Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes / C.N. Gundry, J.G. Vandersteen, G.H. Reed, R.J. Pryor, Jian Chen, C.T. Wittwer // *Clinical Chemistry.* – 2003. – Vol. 49. – № 3. – P. 396–406.

104 Herrmann, M. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes / M. Herrmann, J. Durtschi, L. Bromley, C. Wittwer, K. Voelkerding // *Clinical chemistry*. – 2006. – № 52. – P. 494-503.

105 Press, W.H. Savitzky-Golay smoothing filters / W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery // *Numerical recipes in C*. 2nd ed. – 1992. – P. 650-655.

106 Lazurkin, Y.S. Perspectives report: Melting of DNA: Its study and application as a research method / Y.S. Lazurkin, M.D. Frank-Kamenetskii, E.N. Trifonov // *Biopolymers*. – 1970. – № 9. – P. 1253-1306.

107 Харакоз, Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое–твердое» в биологических мембранах / Д.П. Харакоз // *Успехи биологической химии*. – 2001. – Т. 41. – С. 333-364.

108 Marky, L.A. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves / L.A. Marky, K.J. Breslauer // *Biopolymers*. – 1987. -№. 2. – P. 1601-1620.

109 Rupprecht, A. Mechanochemical study of conformational transitions and melting of Li-, Na-, K-, and CsDNA fibers in ethanol–water solutions / A. Rupprecht, J. Piškur, J. Schultz, L. Nordenskiöld, Z. Song, G. Lahajnar // *Biopolymers*. – 1994. – №. 34. – P. 897-920.

110 Lando, D.Y. Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves / D.Y. Lando, A.S. Fridman, C.-L. Chang, I.E. Grigoryan, E.N. Galyuk, O.N. Murashko, C.-C. Chen, C.-K. Hu // *Anal. Biochem*. – 2015. – № 479. – P. 28-36.

111 Seipp, M.T. Unlabeled Oligonucleotides as Internal Temperature Controls for Genotyping by Amplicon Melting / M.T. Seipp, J.D. Durtschi, M.A. Liew, J. Williams, K. Damjanovich, G. Pont-Kingdon, C.T. Wittwer // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2007. – Vol.9 – №3. – P. 284–289.

112 Vossen, R.H. High-resolution melting analysis (HRMA): More than just sequence variant screening. / R.H. Vossen, E. Aten, A. Roos, J.T. den Dunnen // *Hum. Mutat.* – 2009. – № 30. – P. 860–866.

113 Słomka, M. High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies / M. Słomka, M. Sobalska-Kwapis, M. Wachulec, G. Bartosz, D. Strapagiel // *Int J Mol Sci.* – 2017. – Vol. 18 – № 11. – P. 2316.

114 Botezatu, I.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS / I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, V.P. Shelepov, A.V. Lichtenstein // *Analy. Biochem.* – 2011. – № 419. – P. 302-308.

115 Воробьев, Д.В. Анализ и реализация методов измерения температуры / Д.В. Воробьев, А.М. Мухамбетов, Н.В. Горячев // Теория и практика имитационного моделирования и создания тренажёров. Сборник статей международной научно-практической конференции. – Пенза, 2016. – С. 42-47.

116 Беленький, А.М. Измерение температуры: теория, практика, эксперимент: Справочное издание: в 3 т. / А.М. Беленький, М.Ю. Дубинский, М.Г. Ладыгичев, В.Г. Лисиенко, Я.М. Щелоков. – М.: Теплотехник, 2007. – 2 т. – 736 с.

117 Методы и средства бесконтактного контроля теплового состояния изделий: учебное пособие / В.К. Битюков, В.А. Петров. – М.: Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики, 1999. – 94 с.

118 Жорина, Л.В. Методы неинвазивного измерения внутренней температуры тела / Л.В. Жорина // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2017. – 22 т. – 2 вып. – С. 464-470.

119 Chamarth, P. Measurement of the Temperature Non-uniformity in a Microchannel Heat Sink Using Microscale Laser-Induced Fluorescence / P. Chamarthy, S.T. Wereley, S.V. Garimella // *CTRC Research Publications.* – 2010. – Paper 137.

120 Варламов, Д.А. Неинвазивный анализ тепловых процессов в реакторах приборов для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени / Д.А. Варламов, М.А. Герасимов, Ж.А. Савина, Д.Г. Сочивко, А.А. Федоров // Информационно-технологический и телекоммуникационный кластер

наукограда Черноголовка: продукция, партнерство и перспективы развития. Материалы конференции. Черноголовка, «Богородский печатник». – 2015. – С. 55-57.

121 Natrajan, V.K. Development of Fluorescent Thermometry Methods for Microfluidic Systems / V.K. Natrajan, K.T. Christensen // Measurement science and technology. – 2008. – Vol. 20 – № 1. – 015401.

122 Руководство по эксплуатации ПКДН.941417.003 РЭ. Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот «АНК». – 2013.

123 Патент № RU 133835. Облегченная матрица для плашек, применяемая в ПЦР-амплификаторе. Дата регистрации: 27.10.2013.

124 Патент № US 7632464. Low-mass sample block with rapid response to temperature change. Дата регистрации: 07.07.2011.

125 Боровиков, С.М. Теоретические основы конструирования, технологии и надежности: учебник для студентов инженерно-технической специальности вузов / С.М. Боровиков. – Мн: Дизайн ПРО, 1998. – 336 с.

126 Боровиков, С.М. Расчёт показателей надёжности радиоэлектронных средств: учебно – методическое пособие / С.М. Боровиков, И.Н. Цырельчук, Ф.Д. Троян. – Минск: БГУ ИР, 2010. – 68 с.

127 Крутиков, А.А. Создание метода расчета и разработка пневматических исполнительных устройств нагрева и охлаждения: дис. канд. техн. наук. – М., 2008.

128 Чернышев, А.В. Моделирование теплового состояния микропробирок с образцами в ходе полимеразной цепной реакции / А.В. Чернышев, Д.А. Бакай, В.Е. Курочкин, В.Н. Соколов, Е.Ю. Скоблилов // Научное приборостроение. – 2005. – 15 т. – № 3. – С. 54–62.

129 Чернышев, А.В. Разработка обобщенной структурной схемы и концептуальной модели расчета амплификаторов ДНК / А.В. Чернышев, О.В. Белова // Научное приборостроение. – 2006. – 16 т. – № 2. – С. 58–65.

130 Белова, О.В. Численное моделирование процессов теплообмена в усилителе ДНК / О.В. Белова, М.А. Корнеева, Д.А. Мустафина [и др.] // Вестник Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана. Серия Машиностроение. – 2008. – 72 т. – № 3. – С. 28-38.

131 Чернышев, А.В. Исследование рабочих процессов в усилителе ДНК в целях повышения выхода количества продукта полимеразной цепной реакции / А. В. Чернышев, С. Ф. Мединцев, Д. Г. Сочивко, Н. В. Атамасов // Вестник Московского государственного технического университета им. Н.Э. Баумана. Серия Машиностроение. – 2011. – № 5. – С. 138-149.

132 Чернышев, А.В. Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики: специальность 05.11.17 "Приборы, системы и изделия медицинского назначения": автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук / Чернышев Андрей Владимирович. – Москва, 2006. – 32 с.

133 LaNasa, P.J. Basic Flow Measurement Laws. Fluid Flow Measurement. / P.J. LaNasa // Upp E. L. – 2014. – P. 19–29.

134 Çengel, Y.A. Heat and Mass Transfer (Second ed.) / Y.A. Çengel // McGraw-Hill. – 2002. – P. 901.

135 Бобылёв, В.Н. Физические свойства наиболее известных химических веществ: Справочное пособие / РХТУ им. Д.И. Менделеева. – М., 2003 – 24 с.

136 Бухмиров, В.В. Расчет коэффициента теплоотдачи (справочник)_v.6. – Иваново, 2007. – 39 с.

137 Афанасьев, В.Н. Теплопередача: электронное учебное издание / В.Н. Афанасьев, Н.В. Кувшинов. – М., 2014.

138 Комиссаров, С.Б. Совершенствование систем разогрева вязких и загустевающих грузов в железнодорожных цистернах: дис. к.т.н., СПб., 2017.

139 Шакирянов, А.А. Применение метода конечных элементов в задачах моделирования показаний зондовых установок электрического каротажа / А.А. Шакирянов, Р.А. Майский, В.Н. Филиппов // Материалы международной научно-

практической конференции «Информационные технологии. Проблемы и решения».

140 Заляпин, И.В. О некоторых свойствах оценки коэффициента вариации длин последовательных интервалов точечного процесса / И.В. Заляпин, В.Ф. Писаренко // Известия Челябинского Научного Центра. 1999. -вып.1(3). – С. 6-10.

141 Алиев Т.И. Основы моделирования дискретных систем. – СПб:СПбГУ ИТМО, 2009. – 363 с.

142 Zaboikin M. Gaussian decomposition of high-resolution melt curve derivatives for measuring genome-editing efficiency. / M. Zaboikin, C. Freter, N. Srinivasakumar // PLoS ONE. – 2018. – Vol.13 – № 1. – e0190192.

143 URL: <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/polyfit.html> (дата обращения: 13.07.2022).

144 Akaike, H. Information theory as an extension of the maximum likelihood principle / H. Akaike, B.N. Petrov, F. Csaki // Second International Symposium on Information Theory Budapest: Akademiai Kiado. – 1973. – P. 267–281.

145 Schwarz, G. Estimating the dimension of a model / G. Schwarz // The annals of statistics. – 1978. – Vol. 6. – № 2. – P. 461–464.

146 Hurvich, C.M. Regression and time series model selection in small samples / C.M. Hurvich, C.-L. Tsai // Biometrika. – 1989. – Vol. 76 – № 2. – P. 297–307.

147 Сирота, А.А. Методы и алгоритмы анализа данных и их моделирование в MATLAB: учебное пособие. — СПб.: БХВ-Петербург, 2016. – 384 с.

148 Rödiger, S. Surface Melting Curve Analysis with R / S. Rödiger, A. Böhm, I. Schimke // The R Journal. – 2013. – № 5. – P. 37-52.