



БЕЛОВ Дмитрий Анатольевич

**НОВЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ И  
МЕТОДИКИ ОБРАБОТКИ СИГНАЛОВ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ  
АМПЛИФИКАТОРОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

Специальность:

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)

Научный руководитель: Киселев Игорь Георгиевич, д. т. н., профессор кафедры «Электротехника и теплоэнергетика» ФГБОУ ВО «Петербургский государственный университет путей сообщения Императора Александра I», Заслуженный работник высшей школы Российской Федерации

Официальные оппоненты: Чернышев Андрей Владимирович, д. т. н., профессор ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)»

Давыдов Вадим Владимирович, д. ф.-м. н., профессор ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникации

Ведущая организация: ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», Центр технологий и микрофабрикации

Защита состоится 10 марта 2023 г. в 14:30 на заседании диссертационного совета 29.1.024.01 на базе ИАП РАН по адресу: 198095, г. Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте [www.iairas.ru](http://www.iairas.ru). Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, г. Санкт-Петербург, а/я 207.

Автореферат разослан

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д. ф.-м. н.



А.Л. Буляница

## **Общая характеристика работы**

### **Актуальность темы исследования**

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). 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).

Ежегодно на рынке появляются новые модели амплификаторов, а их разработкой занимаются такие зарубежные компании, 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 ООО "ДНК-Технология".. При всем многообразии практического применения амплификаторов основными направлениями улучшения их характеристик является уменьшение времени проведения анализов и разброса температур между анализируемыми образцами. 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

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, 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.

**Целью работы** является 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 уменьшения 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  $\lambda_{eq}$  и переменным коэффициентом теплоотдачи  $\alpha_s$  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 работы**

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.

### **Поддержка работы грантами и научными программами**

Грант Комитета по науке и высшей школе 2019 года для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга в соответствии с распоряжением Комитета по науке и высшей школы от 14.10.2019 № 176, проект «Исследование тепловых процессов и сигналов анализаторов нуклеиновых кислот», 2019 г.

Диплом за лучший доклад на VIII Международной молодежной научной конференции «Физика. Технологии. Инновации. ФТИ-2021», Екатеринбург, 17-21 мая 2021 г.

Победитель Международного конкурса молодых ученых в сфере интеллектуальной собственности «Интеллект» 2021 года под эгидой Федеральной службы по интеллектуальной собственности.

### **Реализация результатов работы и внедрение**

Теоретические и практические результаты диссертационной работы получены и использованы при выполнении следующих работ в ИАП РАН:

- 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).

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в постановке цели и задач исследований, анализе литературных источников, 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, 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 и зарегистрирована 1 программа для ЭВМ.

**Структура 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.

### **Основное содержание работы**

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, описана степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость результатов выполненной работы, приведены положения, выносимые на защиту.

**Первая глава (литературный обзор)** состоит из 3 разделов.

**В разделе 1.1** приведены теоретические основы ПЦР и основанные на нём методы анализа, в том числе, наиболее популярный в настоящее время метод ПЦР-РВ. Выполнен обзор приборного и методического обеспечения ПЦР-РВ и анализ существующих схем исполнения амплификаторов, в частности, входящего в их состав теплового блока, приведено сравнение

технических характеристик амплификаторов. Выявлены основные направления совершенствования амплификаторов: увеличение скорости изменения температуры образцов, минимизация разброса температуры по держателю пробирок и между анализируемыми образцами.

**В разделе 1.2** изучены и описаны теоретические основы метода плавления ДНК и метода HRM. Определены факторы, влияющие на температуру плавления ДНК  $T_m$ , оценена степень их влияния, выполнен обзор существующих моделей для вычисления теоретического значения температуры  $T_m$ . Приведены известные методики экспериментального определения двух основных параметров графиков плавления: температуры плавления ДНК  $T_m$  и ширины интервала плавления  $\Delta T$ . Выявлена необходимость уменьшения погрешности определения характерных параметров и сокращения времени проведения анализа. Обоснована актуальность разработки новых методик обработки сигналов амплификаторов при реализации анализа методом HRM.

**В разделе 1.3** приведены достоинства и недостатки различных контактных и бесконтактных методов измерения температуры.

**Во второй главы** описаны разработанные технические решения.

**В разделе 2.1** представлены новые технические решения, направленные на измерение и компенсацию неоднородности температурного поля теплового блока амплификатора.

На Рисунке 1 приведена упрощенная схема амплификатора с корректирующей системой (выделена жирной линией), обеспечивающей уменьшение разброса температур плавления  $T_m$  анализируемых образцов.

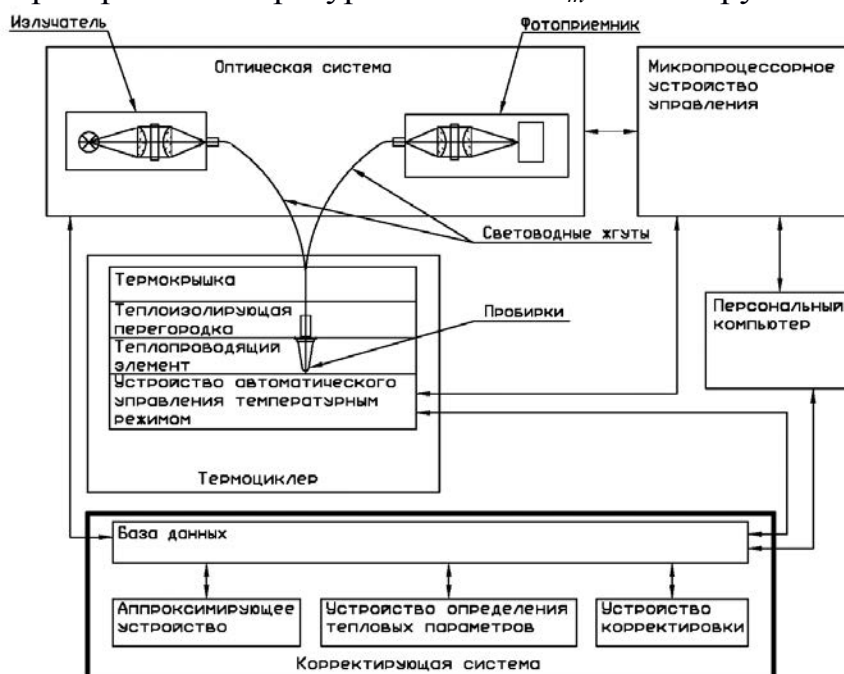


Рисунок 1 – Упрощенная функциональная схема амплификатора с корректирующей системой

Для оценки неоднородности температурного поля держателя пробирок в качестве бесконтактных датчиков могут использоваться пробы ДНК с



гасимыми флуоресцентными зондами. Различия в значениях  $T_m$  идентичных проб во множество пробирок опосредованно характеризует температурное поле держателя пробирок. На основе значений  $T_m$ , определяемым аппроксимирующим устройством, формируется гистограмма, соответствующая температурному полю держателя пробирок. Пример гистограммы для амплификатора АНК-32 представлен на Рисунке 2. За счет краевого эффекта пробирки А1, А8, D1 и D8 имеют максимальные локальные значения  $T_m$ , что соответствует участкам держателя пробирок с минимальными температурами.

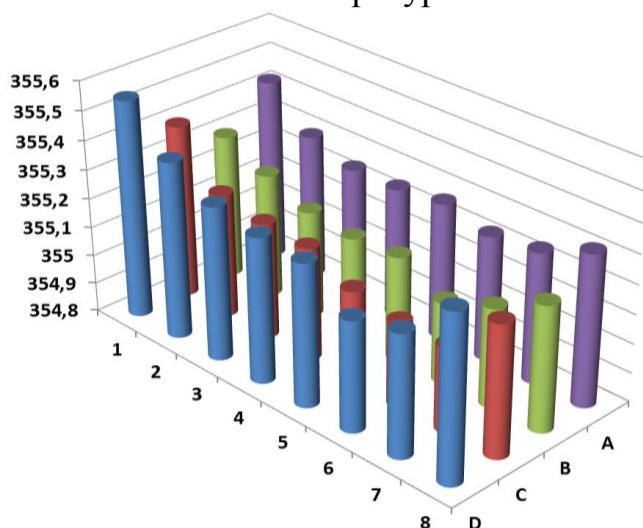


Рисунок 2 - Гистограмма значений температуры плавления  $T_m$  32 проб. Вертикальная ось – температура, К

Температурный режим амплификатора обеспечивается несколькими элементами Пельтье, каждому элементу соответствует определенная группа (кластер) пробирок. Устройство корректировки на основе различий в средних значениях  $T_m$  кластера формирует сигналы коррекции для управления каждым элементом Пельтье, обеспечивая компенсацию неравномерности температурного поля держателя пробирок.

Отклонения температуры  $T_m$  каждого образца от среднего значения определяют систематические погрешности, которые могут быть использованы в качестве поправок для уменьшения погрешности определения значений  $T_m$  образцов в последующих экспериментах с подобными условиями.

Технические решения, приведенные в настоящем разделе, зарегистрированы в виде патента на изобретение РФ № RU 2691763.

**Раздел 2.2** посвящен техническим решениям, направленным на увеличение скорости изменения температуры в циклическом и выравнивание температурного поля держателя пробирок в статическом тепловых режимах.

Предложено ввести в состав амплификатора термогидравлическую систему (Рисунок 3), обеспечивающую движение жидкости заданной температуры по каналам держателя пробирок.

Термоэлектрический элемент 2 поддерживает заданную температуру в емкостях 1 и 2. В режиме охлаждения движение жидкости встречными потоками (противотоком) по каналам держателя пробирок из емкости 1 обеспечивается насосом 2. После окончания охлаждения каналы держателя

пробирок заполняются воздухом с помощью насоса 1. Выравнивание температурного поля в режиме плавления обеспечивается насосом 3 за счет циркуляции жидкости через каналы держателя пробирок.

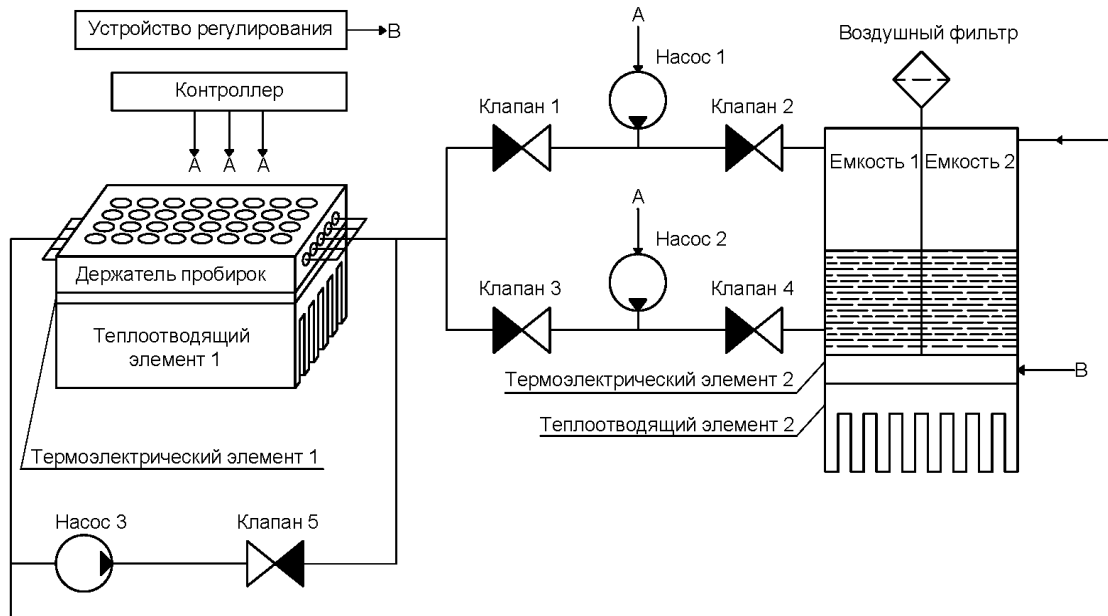


Рисунок 3 – Функциональная схема элементов амплификатора с термогидравлической системой

Разработано 4 варианта исполнения термогидравлической системы, которые обеспечивают упрощение конструкции и/или уменьшение геометрических размеров термогидравлической системы по сравнению с приведенным вариантом. Выполнено сравнение систем. Новизна предложенных технических решений подтверждается двумя полученными патентами на изобретения РФ: №№ RU 2640186 и RU 2666209.

**Третья глава** посвящена моделированию рабочих процессов, протекающих в элементах амплификатора с предложенной термогидравлической системой.

**В разделе 3.1** сформулирована математическая модель процессов теплопереноса. В качестве расчетной области выбрана та часть теплового блока, которая наиболее полно и точно отражает рабочие процессы (Рисунок 4). Использование двумерной модели не требует значительных вычислительных ресурсов и позволяет оперативно оценивать изменения параметров модели. Расчетная область состоит из держателя пробирок  $\Omega_1$ , пробирок  $\Omega_2$  и реакционной смеси  $\Omega_3$ .

Уравнение теплопроводности для нелинейной задачи в двумерной постановке имеет вид:

$$c_{pi}\rho_i \frac{\partial T}{\partial \tau} = \frac{\partial}{\partial x} (\lambda_i \frac{\partial T_i}{\partial x}) + \frac{\partial}{\partial y} (\lambda_i \frac{\partial T_i}{\partial y}), \quad (1)$$

где  $T_i = T(\tau, x, y)$  – температура соответствующего элемента, К;  $\tau$  – время, с;  $\lambda_i$  – коэффициент теплопроводности соответствующего элемента, Вт/(м·К);  $c_{pi}$  – удельная теплоемкость, Дж/(кг·К);  $\rho_i$  – плотность, кг/м<sup>3</sup>.

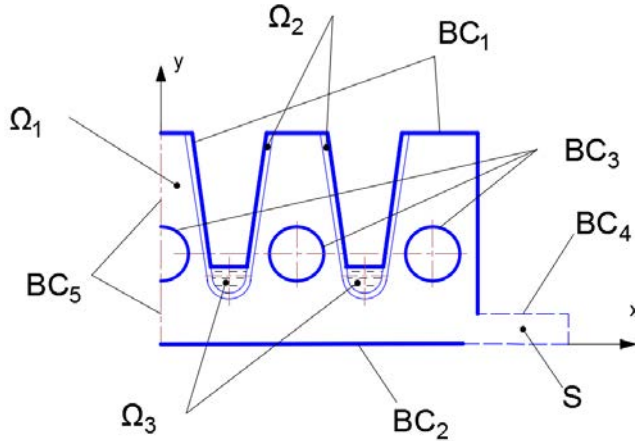


Рисунок 4 - Схема расчетной области

Начальное условие:  $T_i|_{\tau=0} = T_0$ .

Элементы сверху имеют конвективный теплообмен с воздухом (BC<sub>1</sub>):

$$-\lambda_i \cdot \left( \frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_1} = \bar{\alpha}_a (T_i - T_f), \quad (2)$$

где  $T_f$  – температура окружающей среды, К;  $\bar{\alpha}_a$  – средний по поверхности коэффициент теплоотдачи воздуха со стороны держателя пробирок, Вт/(м<sup>2</sup>·К).

Держатель пробирок контактирует с элементами Пельтье (BC<sub>2</sub>). На границе держателя пробирок и элементов Пельтье принимаются граничные условия II рода:

$$-\lambda_i \cdot \left( \frac{\partial T}{\partial y} \right) \Big|_{BC_2} = q = const. \quad (3)$$

Симметричность рассматриваемого тела позволяет построить математическую модель для половины области исследования, ось симметрии при этом является линией граничных условий II рода с нулевым теплообменом (BC<sub>5</sub>). Боковые поверхности (BC<sub>4</sub>) теплоизолированы, они также имеют граничные условия II рода:

$$-\lambda \cdot \left( \frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_4, BC_5} = 0. \quad (4)$$

По отверстиям в держателе пробирок протекает жидкость (BC<sub>3</sub>). Теплообмен описывается граничными условиями III рода при температурах поверхности держателя пробирок  $T_i$  и жидкости  $T_f$ :

$$-\lambda \cdot \left( \frac{\partial T}{\partial n} \right) \Big|_{BC_3} = \frac{\partial \alpha_c}{\partial T_i} (T_i - T_f). \quad (5)$$

Вычисленные значения чисел Рейнольдса  $Re$  и Релея  $Ra_f$  соответствуют ламинарному вязкостному режиму движения жидкости. При этом режиме число Нуссельта, необходимое для расчёта коэффициента теплоотдачи  $\alpha_c$ , определяется по формуле:

$$Nu_f = 1,55 \cdot \left( \frac{Pe \cdot d_{in}}{l} \right)^{\frac{1}{3}} \left( \frac{\mu_f}{\mu_w} \right)^{0,14} \overline{\varepsilon_l}, \quad (6)$$

где  $Pe$  – число Пекле;  $l$  – длина канала, м;  $\mu_f$  – динамический коэффициент вязкости при температуре жидкости, Па·с;  $\mu_w$  – динамический коэффициент вязкости при температуре поверхности канала, Па·с;  $\overline{\varepsilon_l}$  – поправка на длину канала.

Естественная циркуляция жидкости в ограниченном пространстве пробирки рассматривается как элементарное явление теплопроводности с введением понятия эквивалентного коэффициента теплопроводности  $\lambda_{eq}$ , равного произведению коэффициента теплопроводности среды  $\lambda_{env}$  и коэффициента конвекции  $\varepsilon_c$ , характеризующего влияние конвекции на перенос теплоты:

$$\lambda_{eq} = \lambda_{env} \cdot \varepsilon_c. \quad (7)$$

Найдены зависимости значений  $\lambda_{eq}$  от средней температуры пробы в диапазоне температур 333-368 К для объемов пробы 10-20 мкл и определены значения коэффициента  $\alpha_c$  для различных средних температур (303-370 К) и скоростей протекания жидкости (0,1-0,35 м/с), что позволяет выполнить расчет динамики тепловых процессов численными методами в диапазоне рабочих температур амплификатора.

**Раздел 3.2** посвящен расчету динамики тепловых процессов в амплификаторе численными методами. Расчет сводится к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности жидкости  $\lambda_{eq}$  и переменным коэффициентом  $\alpha_c$ .

Для нахождения искомого численного решения задачи расчетная область покрывается сеткой (Рисунок 5а) с переменным шагом, непрерывная функция дискретизируется по пространству и времени. Программа ELCUT<sup>®</sup> позволяет получить температурное поле (Рисунок 5б) и значения температуры в реперных точках в любой момент времени.

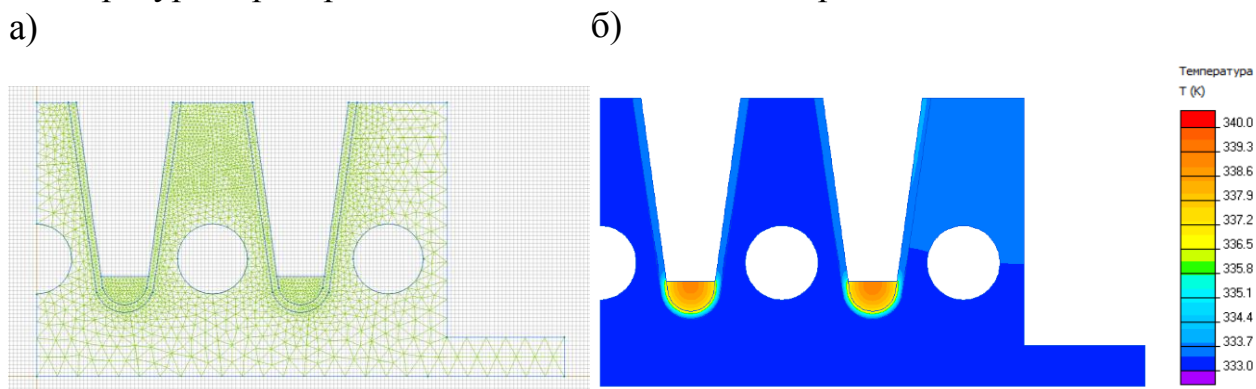


Рисунок 5 - Геометрия исследуемого тела с расчетной сеткой (а) и температурное поле исследуемой области в конце процесса охлаждения (б)

Исследования численными методами показали следующее:

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

- проба обладает значительной тепловой инерцией, обусловленной низкой теплопроводностью пробирок;

- использование термогидравлической системы позволяет уменьшить время цикла ПЦР на 43 секунды и сократить длительность анализа на величину до 36 минут или около 25 % от общей продолжительности.

В разделе 3.3 выполнена оценка погрешности вычислений методом конечных элементов путем выявления расхождений в значении функции в точках исследуемой области для различных наборов конечных элементов. Значения коэффициента вариации  $CV$  не превысили 0,1 %, что подтверждает возможность использования полученных результатов анализа и сходимость результатов при различных значениях шагов сетки.

Раздел 3.4 посвящен проведению натурального эксперимента и обработке его результатов. Схема экспериментального стенда на основе амплификатора АНК-32 представлена на Рисунке 6. На Рисунке 7а приведен график изменения температуры при различных скоростях протекания жидкости.

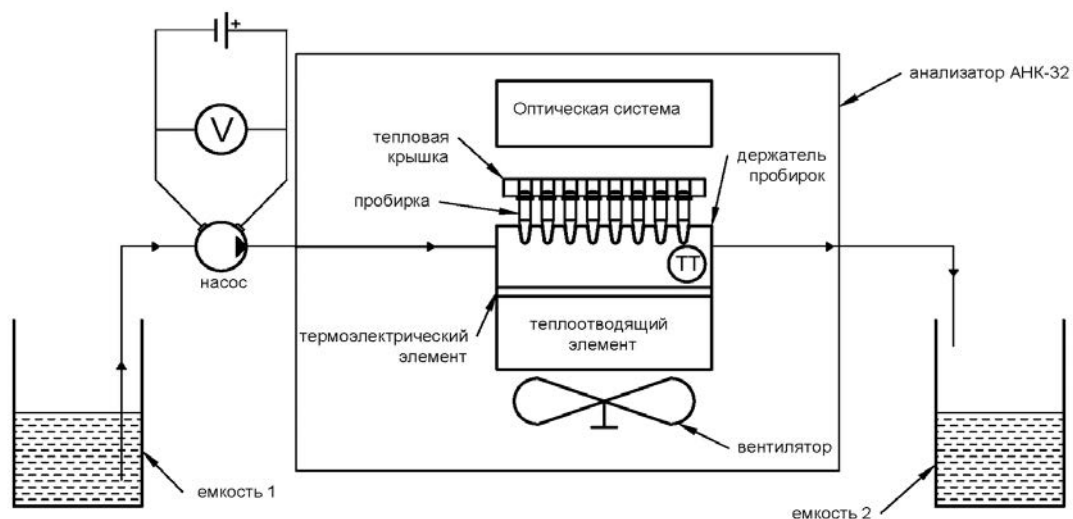


Рисунок 6 – Функциональная схема экспериментального стенда

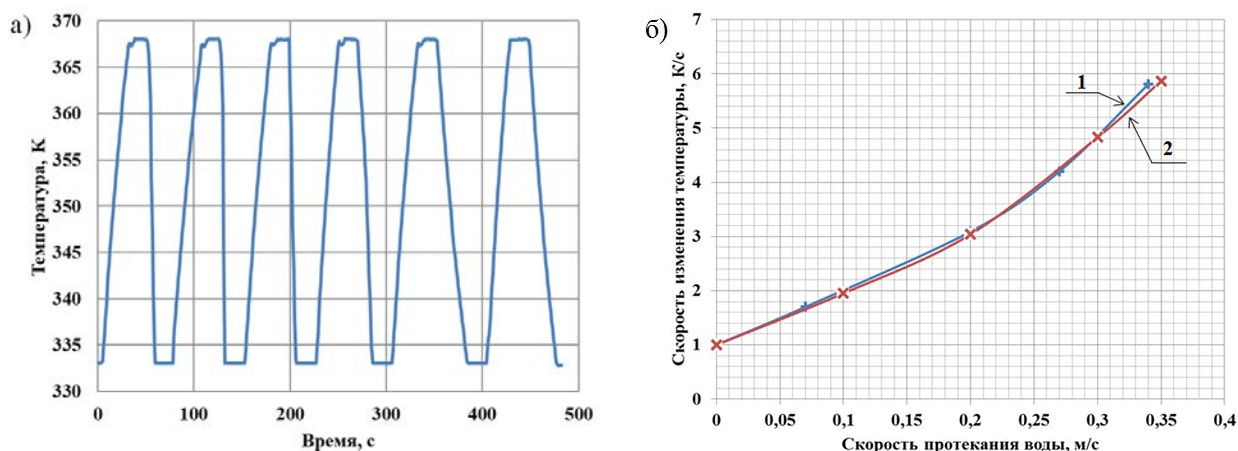


Рисунок 7 - Результаты экспериментальных исследований для различных скоростей протекания жидкости через каналы держателя пробирок (а) и сравнение расчетных (ряд 1) и экспериментальных (ряд 2) данных (б)

Экспериментально подтверждено сокращение времени охлаждения держателя пробирок при скорости протекания воды 0,34 м/с на 29,5 с при стандартной продолжительности цикла ПЦР около 120 с. Результаты применения математической модели согласуются с результатами экспериментальных исследований (Рисунок 7б), максимальное отклонение по средней скорости охлаждения при различных скоростях протекания жидкости составляет 8,4 %.

**В разделе 3.5** выполнено экспериментальное исследование выравнивания температурного поля держателя пробирок термогидравлической системой. Для большей показательности эксперимента параллельно с одним из двух элементов Пельтье подключен набор резисторов, обладающих общим сопротивлением 15 Ом. На Рисунке 8 представлены зависимости температуры плавления образцов от номера пробирки в одном ряду для эксперимента с применением термогидравлической системы (2) и без неё (1). 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.

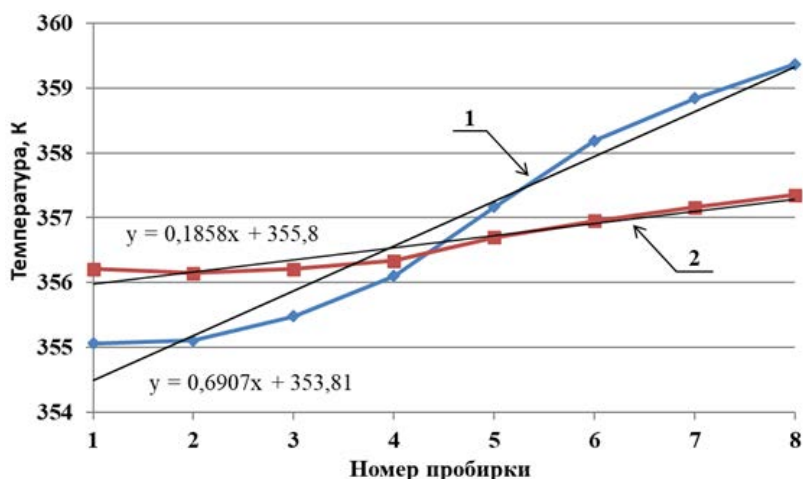


Рисунок 8 – График зависимости температур  $T_m$  образцов в ряду от номера пробирки при нагреве элементами Пельтье (1) и при использовании термогидравлической системы (2), а также их линии тренда

Предложено определять показатель эффективности  $E$ , как отношение коэффициентов из уравнения линий тренда (Рисунок 8) при нагреве элементами Пельтье ( $f_{1.1}$ ) и при использовании термогидравлической системы ( $f_{1.2}$ ):

$$E = \frac{f_{1.1} - f_{1.2}}{f_{1.1}} \cdot 100\%, \quad (8)$$

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 уменьшился на 7 %.

**В разделе 3.6** приведена конструкция гидрораспределителей, позволяющих выровнять гидравлические сопротивления каналов и значительно упростить конструкцию теплового блока, описанную в главе 2.

**Четвертая глава** посвящена методикам обработки экспериментальных сигналов плавления ДНК.

**В разделе 4.1** предложена методика на базе усовершенствованной сигмоидальной функции (SF).

График плавления (ГП) имеет форму S-образной кривой, однако не может быть описан известными функциями класса сигмоид из-за нелинейной базовой линии. Предложена усовершенствованная сигмоидальная функция (Таблица 1), позволяющая адекватно аппроксимировать ГП.

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 исходной кривой плавления. В результате определяются ориентировочные значения параметров  $f_0$  и  $f_1$ .

2) Определяются предварительные значения параметров:  $F_m = F_{max} - F_{min}$  и  $T_m = T : \frac{dF}{dT} = \left(\frac{dF}{dT}\right)_{max}$ .

3) Полная последовательность по всему диапазону аппроксимируется SF. Значения параметров  $f_0$  и  $f_1$  подставляются в виде констант. Выполняется уточнение параметров  $F_m$ ,  $T_m$ ,  $k$  и  $f_2$ .

4) Выполняется повторная аппроксимация SF полной последовательности. При этом оптимизируются все параметры SF.

Предложено два варианта определения температуры плавления:  $T_{m1}$  как параметр  $T_m$ , заложенный в сигмоидальную модель;  $T_{m2}$  как максимальное значение первой производной сигмоидальной модели по температуре, построенной с шагом дискретизации температуры 0,01.

Интервал плавления определяется 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  $F_m = 1$  ( $\Delta T_2$  в Таблице 1).

**В разделе 4.2** изложена методика, основанная на использовании производной от СФ по температуре (SFD, Таблица 1).

Применение SFD вместо SF позволяет уменьшить количество оптимизируемых параметров функции и упростить их сходимость. В результате дифференцирования уменьшается отношение сигнал/шум, поэтому для вычисления величины  $T_m$  предлагаются следующие операции.

1) Численное дифференцирование путем нахождения центральной разности первого порядка:

$$\frac{dF_i}{dT} = \delta F_i = \frac{F_{i+1} - F_{i-1}}{2 \cdot h}, \quad (9)$$

где  $h$  - разность между соседними значениями температуры  $T_{i+1}$  и  $T_{i-1}$ . При таком способе дифференцирования не наблюдается сдвига ГП и температуры  $T_m$ .

2) Определение предварительных значения  $F_m = F_{max} - F_{min}$  и  $T_m = T : \frac{dF}{dT} = \left(\frac{dF}{dT}\right)_{max}$ .

3) Аппроксимация полной последовательности.

4) Определение значений  $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ,  $\Delta T_1$  и  $\Delta T_2$  выполняется аналогично методике по разделу 4.1 (Таблица 1).

**В разделе 4.3** описана предложенная методика на основе функции Гаусса (FG), приведенной в Таблице 1. Алгоритм методики аналогичен алгоритму, приведенному в разделе 4.2.

**В разделе 4.4** предложена методика, включающая выбор оптимального порядка аппроксимирующей полиномиальной функции (PF).

Выполнено сравнение показателей, минимальное значение которых является критерием оптимального порядка аппроксимирующего полинома. В качестве предпочтительного показателя выбран модифицированный информационный критерий Акаике ( $AIC_c$ ):

$$AIC_c(p) = AIC + 2p \frac{p+1}{N-p-1}, \quad (10)$$

где  $p$  – степень PF;  $N$  – число измерений в эксперименте.

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.

Методика предполагает следующий алгоритм обработки ГП.

1 Выполняется численное дифференцирование ГП (см. раздел 4.2).

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 аппроксимации ГП.

3 Выполняется сдвиг и нормализация температурной шкалы ГП:

$$T_{ni} = \frac{T_i - \bar{T}}{\sigma_T}, \quad (11)$$

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

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

Применение аппроксимирующей PF 4-ого порядка позволяет вывести аналитические значения для определения температуры и диапазона плавления (Таблица 1).

**Раздел 4.5** посвящен проверке адекватности моделей, значение коэффициента детерминации  $R^2 \geq 0,98$  подтверждает адекватность. Для сравнения методик между собой определены значения  $AIC_c$  (Таблица 2).

**В разделе 4.6** приведено сравнение результатов применения методик из разделов 4.1-4.4 (Таблица 2) к ГП, полученным на амплификаторе АНК-32 при трехкратном анализе 3 отличных образцов ампликонов цитокератина



(СК-19) с интеркалирующими красителями SYBR Green I в четырехкратном повторении в диапазоне температур образца 343-368 К с шагом 0,5 К и длительностью выдержки каждого значения температуры 30 секунд.

Основным результатом применения методик является уменьшение погрешности определения значений  $T_m$ , а также вычисление интервала плавления без необходимости компенсации базовой линии и нормировки ГП. Максимальное значение СКО не превышает 0,13 К для всех методик. Наименьшая погрешность определения значений  $T_{m1}$  и  $\Delta T_1$  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 PF показала наименьшую затратность вычислительных ресурсов и является наиболее удобной в практическом применении за счет лучшей сходимости ее коэффициентов.

**В разделе 4.7** приведены результаты применения разработанной экспериментальной версии программного обеспечения ANK\_Melting, основанной на предложенной методике PF, на сигналах экспериментального образца амплификатора АНК-96, полученных с температурным шагом 0,5 К и длительностью измерений на каждом шаге 30 с. Полученные значения СКО величины  $T_m$  не превышают 0,1 К, что говорит о достижении соответствия требованиям метода плавления высокого разрешения при реализации анализов с температурным шагом 0,5 К. Общее время эксперимента составило менее 10 мин.

**В разделе 4.8** 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.

Таблица 1 - 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  $F_m$  — 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;  $f_k$  — коэффициенты аппроксимирующего полинома. Среднее значение температуры  $\underline{T}$  и стандартное отклонение температуры  $\sigma_T$  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 2 – 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
				$\Delta T_1$	0,041
				$\Delta T_2$	0,332
SFD	0,9897	0,2136±0,0044	120,6	$T_{m1}$	0,063
				$T_{m2}$	0,064
				$\Delta T_1$	0,030
				$\Delta T_2$	0,116
GF	0,9910	0,2448±0,0065	120,5	$T_{m1}$	0,060
				$T_{m2}$	0,063
				$\Delta T_1$	0,035
				$\Delta T_2$	0,117
PF	0,9831	0,1602±0,0062	113,5	$T_{m1}$	0,053
				$\Delta T_1$	0,022

### Основные результаты диссертации

1 Разработана корректирующая система, которая путем компенсации неоднородности температурного поля держателя пробирок амплификатора, позволяет реализовать анализ методом ПЦР-РВ с высокой и сопоставимой во всех пробирках эффективностью амплификации, а также обнаружить небольших различий (0,1-0,3 К) температур плавления при анализе методом HRM.

2 Предложены четыре варианта реализации термогидравлической системы в составе теплового блока амплификатора, направленные на повышение производительности амплификатора путем увеличения скоростей нагрева и охлаждения анализируемых проб за счет протекания жидкости заданной температуры и компенсацию неоднородности температурного поля держателя пробирок за счет циркуляции жидкости в каналах держателя пробирок. Сравнительный анализ не выявил абсолютного преимущества одного варианта реализации термогидравлической системы над другими, окончательный выбор целесообразен на стадии ОКР при разработке нового амплификатора.

3 Сформулирована математическая модель процессов теплопереноса в тепловом блоке амплификатора с термогидравлической системой. Расчет динамики тепловых процессов сведен к решению нестационарной задачи теплопроводности с эквивалентным коэффициентом теплопроводности жидкости  $\lambda_{eq}$  и переменным коэффициентом теплоотдачи  $\alpha_c$  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, средняя температура пробы значительно отстает от температуры держателя пробирок при его термоциклировании;

- использование термогидравлической системы позволяет уменьшить время теплового цикла ПЦР на 43 секунды и сократить длительность анализа на величину до 36 минут или около 25 % от общей продолжительности.

5 Разработан и испытан экспериментальный стенд на основе амплификатора АНК-32. Подтверждено повышение скорости изменения температуры держателя пробирок при использовании термогидравлической системы до 6 раз. Максимальное отклонение результатов эксперимента и расчета по средней скорости охлаждения держателя пробирок при различных скоростях протекания воды составило 8,4 %.

Установлено, что за счет добавления в состав амплификатора термогидравлической системы достигается уменьшение разброса температур проб до 5 раз. Эффективность термогидравлической системы повышается при уменьшении значений рабочих температур анализа.

6 Разработанные методики обработки ГП позволили уменьшить погрешность определения величины  $T_m$  и достичь критериев высокого разрешения при реализации метода HRM на амплификаторах серии АНК. Предложенные аналитические выражения для вычисления значения ширины интервала плавления  $\Delta T$  в отличие от известных методик не требуют предварительной нормализации ГП и позволяют упростить и автоматизировать обработку результатов анализа. Методики основаны на аппроксимации графиков плавления различными функциями: усовершенствованными сигмоидальной, производной сигмоидальной, Гаусса и полиномиальной функцией. На основе большинства оцениваемых критериев преимуществами обладает методика на основе полиномиальной функции (PF).

7 Создана экспериментальная версия программного обеспечения на основе методики PF. Сравнение результатов ее применения известным ПО ANK Shell выявили достоинства разработанной программы по величине погрешности определения температуры  $T_m$  и автоматизации процесса вычисления.

8 Выполнена оценка систематической и случайной погрешностей определения температуры плавления  $T_m$  96 проб ДНК на экспериментальном образце амплификатора АНК-96 с помощью разработанной программы ANK\_Melting. Систематическая погрешность не превысила 0,39 К, случайная – 0,05 К. Систематическая погрешность в значительной степени обусловлена неравномерностью температурного поля держателя пробирок и может быть уменьшена с помощью предложенной корректирующей системы.

Перспективным направлением дальнейших исследований является разработка методик автоматической кластеризации и классификации сигналов плавления и реализация разработанных алгоритмов в программном обеспечении, способном работать с широким перечнем коммерческих амплификаторов и типов файлов данных при реализации анализа методом HRM.

### Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

- 1 **Белов Д.А.**, Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 2. С. 17-22.
- 2 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Манойлов В.В. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 3. С. 10-14.
- 3 **Белов Д.А.**, Киселев И.Г., Ватулин Я.С. Инновационные решения при разработке прецизионного термостата. Профессиональное образование, наука и инновации в XXI веке. Т. 1: Сборник трудов X Санкт-Петербургского конгресса - СПб.: ФГБОУ ВО ПГУПС, 2016. С. 45-48.
- 4 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Манойлов В.В. Разработка методик обработки сигналов плавления ДНК // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 1. С. 83-89.
- 5 **Белов Д.А.**, Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Методика определения разброса температур по лункам анализаторов нуклеиновых кислот // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 4. С. 34-39.
- 6 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Новая методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 28, № 1. С. 3-10.
- 7 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Широкопад А.Л. Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 29, № 2. С. 11-19.
- 8 **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Киселев И.Г., Водопьянова Ю.О. Совершенствование теплового блока анализатора нуклеиновых кислот // Бюллетень результатов научных исследований. 2018. № 4. С. 5-11.
- 9 **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Kurochkin V.E. Development of a new technique for quantitative PCR analysis // J. Phys.: Conf. Ser. 2019. 1400 033021.
- 10 Курочкин В.Е., **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Зубик А.Н. Определение модельных констант при вычислении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2020. Т. 30, № 2. С. 10–16.
- 11 **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Kiselev I.G. Modeling of the DNA Melting Point Dependence on Various Analysis Factors // IEEE 2020 International Multi-Conference on Industrial Engineering and Modern Technologies (FarEastCon). 2020. pp. 1-3.
- 12 **Belov D.A.**, Bulyanitsa A.L., Korneva N.A., Aldekeeva A.S., Belov Yu.V. Analytical determination of DNA melting characteristic parameters using the optimal degree polynomial regression model // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. 2103 012057.
- 13 Kiselev I.G., **Belov D.A.** Physical processes simulation in a precision device for liquid samples thermal cycling // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. 2131 022061.
- 14 Курочкин В.Е., **Белов Д.А.**, Белов Ю.В., Зубик А.Н. Методика определения характерных параметров при плавлении ДНК в анализаторах нуклеиновых кислот // Медицинская техника. – 2021. – № 5. – С. 23-25. (Kurochkin V.E., **Belov D.A.**, Belov Yu.V., Zubik A.N. A method for determining characteristic DNA melting parameters in nucleic acid analyzer // Biomedical Engineering. 2022. Vol. 55, № 5. P. 333–336).