

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

УДК 621.391.26

Петров Александр Иванович

**Исследование и практическая реализация
программно-аппаратных средств
проведения полимеразной цепной реакции с
наблюдением в реальном времени**

Специальность:

01.04. 01 - Приборы и методы экспериментальной физики

диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель

д.т.н., проф. Курочкин В.Е.

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2016

Список сокращений

АНК	Анализатор нуклеиновых кислот
АПК	Аппаратно программный комплекс
АЯ	Автоматный язык
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
КА	Конечный автомат
ЛИС	Лабораторная информационная система
МФ	Модельная функция
НК	Нуклеиновая кислота
ПНИЭР	Прикладная научно исследовательская экспериментальная работа
ПО	Программное обеспечение
ПОЯ	Проблемно ориентированный язык
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция с наблюдением в реальном времени

Оглавление

Список сокращений	2
Введение.....	6
1 Современное состояние АПК ПЦР-РВ.....	14
1.1 Приборы для проведения ПЦР-РВ	14
1.2 Принцип действия “Анализатора нуклеиновых кислот”	16
1.3 Программное обеспечение приборов для ПЦР-РВ.....	19
1.4 Основные направления совершенствования АПК для проведения ПЦР-РВ	20
1.5 Перспективы разработки новых приборов ПЦР-РВ.....	21
1.6 Алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ	23
1.6.1 Базовые алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ	25
1.6.2 Использование модельных функций:	29
1.7 Детальная формулировка цели и задач исследования	32
1.8 Выводы	33
2 Исследования тепловых режимов работы при проведении ПЦР	34
2.1 Анализ скорости нагрева/охлаждения	34
2.2 Анализ времени установления.....	39
2.3 Оценка разброса температуры в пробирке	41
2.4 Выводы	43
3 Синтез оптимального алгоритма фильтрации первичной обработки сигнала флуоресценции	44
3.1 Оценка параметра интенсивности по методу максимума апостериорной плотности вероятностей.....	44
3.2 Математическое ожидание и дисперсия	46
3.3 Выводы	48
4 Оптимизация алгоритмов управления приборами АНК (Переход от проблемно-ориентированного языка к автоматному при проектировании аналитических приборов)	49
4.1 Разработка ПОЯ и АЯ.....	49

4.2	Сравнение алгоритмов работы прибора на ПОЯ и АЯ.	53
4.3	Выводы.....	56
5	Совершенствование алгоритмов вторичной обработки	58
5.1	Эффективность фильтрации сигналов ПЦР-РВ.....	58
5.1.1	Оценка эффективности фильтрации.....	60
5.1.2	Погрешности расчета порогового цикла без фильтрации.....	63
5.1.3	Влияние фильтрации на погрешности расчета пороговых циклов ..	65
5.1.4	Выводы.....	67
5.2	Классификация кинетических кривых.....	68
5.3	Исследование особенностей количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	70
5.3.1	Получение исходных данных для расчета порогового цикла.....	70
5.3.2	Погрешности расчета порогового цикла.....	71
5.3.3	Выводы.....	74
5.4	Выбор модельной функции при аппроксимации кинетических кривых ПЦР-РВ.....	75
5.4.1	Сравнение модельных функций.....	79
5.4.2	Усовершенствованная S-образная функция	79
5.4.3	Усеченная модельная функция.....	81
5.4.4	Исследование влияния дрейфа нулевой линии детектора.....	82
5.4.5	Выводы.....	83
5.5	Исследование особенностей многокомпонентного анализа НК.....	85
5.5.1	Построение многокомпонентных модельных сигналов	86
5.5.2	Компенсация помех от соседних спектральных каналов	88
5.5.3	Определение оптимизированных параметров и построение восстановленных однокомпонентных сигналов	89
5.5.4	Выводы.....	90
5.6	Выводы и результаты.....	90
6	Внедрение результатов работы	92

6.1	Аппаратное обеспечение АПК.....	92
6.2	Программное обеспечение АПК АНК.....	95
6.2.1	Программное обеспечение АПК АНК Версия 1	95
6.2.2	Программное обеспечение АПК АНК Версия 2	96
6.2.3	Программное обеспечение АПК АНК Версия 3	98
6.2.4	Программное обеспечение АПК АНК Версия 4	100
6.3	Выводы.....	102
7	Заключение.....	103
8	Список литературы.....	105

Введение

Полимеразная цепная реакция – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять молекулярно биологические исследования и, как следствие, медицинскую диагностику на качественно новый уровень. Основные принципы использования праймеров (коротких искусственно синтезированных молекул ДНК) и состав ингредиентов, входящих в реакционную смесь для получения копий ДНК впервые были описаны *Klepp* с соавт. в 1971 году [1]. Однако тогда еще не была продемонстрирована основная черта ПЦР - экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК как результат реакции. В 1983 году сотрудник фирмы «Cetus» *Kary Mullis* предложил метод, ставший в дальнейшем известным как полимеразная цепная реакция [2].

Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое применение метода. В 1985 году *Saiki* с соавт. опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β -глобина [3]. С этого момента количество публикаций, в которых авторы сообщали о применении ПЦР в своих работах, стало увеличиваться в геометрической прогрессии. Метод приобрел такую популярность, что сегодня уже трудно представить работу в области молекулярной биологии без его использования. Особенно бурное развитие метод ПЦР получил благодаря международной программе «Геном человека».

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода [4 - 13].

В последнее десятилетие произошло активное внедрение метода ПЦР в лабораторную и диагностическую практику. Благодаря своей скорости, высокой специфичности и чувствительности он получил широкое применение в первую очередь в клинической диагностике. Появление флуоресцентных методов детекции накопления продуктов ПЦР в процессе реакции (ПЦР в реальном времени, ПЦР-РВ) открыло дополнительные преимущества в использовании ПЦР-анализа, в частности, возможность количественной оценки содержания молекул нуклеиновых кислот в исследуемом образце.

Для проведения ПЦР-РВ используют специальные приборы, способные одновременно осуществлять термостатирование образцов с быстрыми переходами между температурами по заданной программе и регистрацию флуоресценции образцов на заданных длинах волн, соответствующих применяемым флуоресцентным красителям. К приборам такого класса можно отнести модели «iQ5», CFX96 («BioRad», США), «Mx3000P» («Stratagene», США), «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралия), «StepOne»(Applied Biosystems, США), DT-48, DT-96 (НПФ ДНК-Технологии, Россия) и АНК-32 (ИАП РАН, Россия).

Важнейшая роль в составе таких анализаторов отводится аппаратным и программным средствам, образующими аппаратно-программные комплексы анализаторов нуклеиновых кислот (АПК АНК). АПК АНК позволяют обеспечить полную автоматизацию управления процессом ПЦР, автоматизацию измерения сигналов флуоресценции и анализа кинетики происходящей реакции. АПК АНК позволяют реализовать эффективные методы обработки данных для достижения высоких аналитических характеристик приборных комплексов и осуществлять непрерывный контроль работоспособности технических средств.

Как правило, АПК каждого производителя – это закрытые системы, обладающие как аппаратным, так и программным ноу-хау, дополнительно защищенные целой серией патентов. К тому же, методы анализа ДНК быстро и

постоянно развиваются, что в свою очередь требует непрерывного и быстрого совершенствования АПК. Совершенствованию аппаратной части служит постоянно развивающаяся элементная база, особенно в части микроконтроллеров и силовых элементов управления. Стремительное развитие информационных технологий так же предоставляет новые возможности для формирования информационной среды поддержки АПК АНК, что весьма благоприятно сказывается на развитии методов анализа ДНК.

Учитывая стратегическую важность указанных приборов, в Институте аналитического приборостроения Российской академии наук была разработана серия АПК АНК - специализированных приборов для экспресс анализа нуклеиновых кислот: АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, Нанофор -05.

В результате для создания собственных АПК АНК потребовалось разработать собственные подходы к проектированию аппаратной части и к построению программного обеспечения АПК АНК, что и определило актуальность темы диссертации.

Целью работы является развитие научно практических основ создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ.

Задачи исследований. Для достижения указанной цели в работе ставились и решались следующие задачи:

1. Провести экспериментальные исследования с целью определение правил задания рабочих параметров теплового блока (амплификатора).
2. Осуществить синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции.
3. Разработать проблемно ориентированный язык управления экспериментом и автоматный язык управления аппаратной частью.
4. Совершенствовать алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.
5. Создать программное обеспечение для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе полимеразной цепной реакции (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, АНК-96).

6. Внедрить разработанный комплекс приборов в научные и практические генетические исследования.

Методы исследования. Теоретические и практические исследования базируются на комплексном использовании положений математической статистики, теории обнаружения и оценивания стохастических сигналов, линейной алгебры, теории вероятностей, теории конечных автоматов, теории взаимодействия открытых систем, методов системного и функционального анализа, функционального и объектно-ориентированного программирования и проектирования, имитационного моделирования, структурно-функционального описания аппаратуры.

Научная новизна работы состоит в развитии научно практических основ создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ, имеющей важное народнохозяйственное значение. В результате исследований автором получены следующие основные научные результаты:

1. Впервые экспериментально исследованы тепловые характеристики амплификатора на элементах Пельтье при проведении ПЦР-РВ для пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Ахуген", PCR-0.2D-C).
2. Синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определяет устройство его реализующее и оценивает погрешность его работы.
3. Впервые предложен классификатор кинетических кривых на основе анализа первой производной, введены критерий наличия роста, признак аномальности.
4. Установлено, что для аппроксимации кинетической кривой на экспоненциальном участке лучше всего подходит цензурированная сигмоидная функция.

Положения выносимые на защиту:

1. При использовании пробирок объемом 0.2 мл (фирма "Ахуген", PCR-0.2D-C) для получения достоверных результатов количественного анализа ПЦР необходимо обеспечивать скорость их нагрева/охлаждения не более 2°C
2. Несмещенные эффективные оценки сигналов флуоресценции могут быть получены в результате обработки интегратором или фильтром низких частот.
3. Критерием наличия реакции является отношение максимума производной к среднеквадратичному отклонению амплитуды шумов производной, рассчитанных с 5 по 10 цикл. Достоверным критерием является значение отношения больше 5.
4. Использование АЯ при реализации алгоритма управления прибором сокращает время разработки более чем в 3 раза.

Практическая значимость работы

- Проведенные исследования позволили уточнить механизм тепловых процессов амплификации в приборах АНК. Установлены параметры режимов питания элементов Пельтье в режиме нагрева и охлаждения, что позволило увеличить скорость нагрева в 2 раза, а охлаждения в 1.2 раза. Общее время амплификации при этом сократилось на 10–15 мин.
- Показано, что увеличение скорости нагрева более $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$ ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}/\text{с}$) приводит к большому значению распределения температур в реакционной смеси (больше 10°C), тем самым, ухудшая качество проведения ПЦР.
- Разработанные алгоритмы первичной и вторичной обработки сигналов легли в основу программного обеспечения для серийно выпускаемых приборов серии АНК.
- Разделение алгоритмов управления на ПОЯ и АЯ повысило надежность работы АНК и позволило использовать одно и то же ПО для различных типов приборов.

Реализация результатов работы и внедрение

Теоретические и практические результаты, полученные в диссертационной работе, использованы в научно-исследовательских и опытно-конструкторских работах, проводимых в ИАП РАН и ЗАО «СИНТОЛ».

Приоритет разработок защищен тремя патентами [14, 15, 16].

Разработаны и внедрены в серийное производство АПК приборов серии АНК (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64).

Результаты работы использованы в учебных лекционных курсах, которые читаются автором в СПбГУ ИТМО.

Приборы АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64 успешно используются в биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораториях, а также лабораториях СЭС, МО РФ и клинических лабораториях поликлиник и больниц.

Результаты диссертационной работы были полностью использованы при разработке высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований (АНК-96). Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификационный номер ПНИЭР RFMEFI60714X0095).

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались в 1999 – 2016 годах на научных семинарах ИАП РАН (г. Санкт-Петербург), Университета ИТМО (г. Санкт-Петербург), СПб ГУАП (г. Санкт-Петербург), ВНИИСБ (г. Москва) и на международном конгрессе [17 - 19].

Публикации. По теме диссертации опубликованы 17 печатных работ [20-30], среди которых 11 статей в изданиях, включенных в список ВАК РФ.

Личный вклад автора.

Автором сформулированы цели и задачи исследований, осуществлены теоретические и экспериментальные исследования. Проводилось руководство коллективом разработчиков программных средств в части планирования работ и проведения разработки АПК АНК, включая личное участие в отработке алгоритмов управления АПК АНК, в создании и тестировании алгоритмов обработки. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 112 страницах текста, содержит 41 рисунок, 12 таблиц, список литературы включает 68 наименований.

Первая глава посвящена анализу современного состояния АПК ПЦР-РВ. Приведена общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ. Рассмотрен принцип действия анализатора нуклеиновых кислот. Приведен состав программного обеспечения приборов ПЦР-РВ. Выделены основные направления совершенствования АПК ПЦР-РВ. Сформулированы перспективы разработки новых приборов. Рассмотрены алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ. Сформулированы цель и задачи диссертационного исследования.

Вторая глава посвящена исследованию тепловых режимов амплификации при проведении ПЦР на приборах серии АНК. Оценены время установления температуры в пробирке, разность температуры планшета и реакционной смеси в зависимости от скорости нагрева/охлаждения. Получены рабочие параметры работы элементов Пельтье при нагреве и охлаждении.

Третья глава посвящена синтезу алгоритма первичной обработки данных на основе максимума апостериорной плотности вероятности. Синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определяет устройство его реализующее и оценивает погрешность его работы.

Четвертая глава посвящена реализации алгоритмов управления на основе создания проблемно ориентированного языка описания эксперимента и создания автоматного языка управления прибором. ПОЯ построен на основе методических указаний конечных пользователей. Проведен переход от ПОЯ к АЯ. Разработан КА-исполнитель, реализующий алгоритмы работы прибора. Приведены результаты реализации алгоритмов и сформулированы выводы.

Пятая глава посвящена исследованию алгоритмов вторичной обработки. Проведено исследование алгоритмов фильтрации шумов, предложена оценка

эффективности фильтрации, произведена оценка погрешности и изучено влияние фильтрации на погрешность расчета пороговых циклов. Предложены критерии классификации кинетических кривых на основе анализа первой производной. Исследованы особенности аппроксимации кинетических кривых модельными функциями. Проведено сравнение аппроксимации различными модельными функциями, изучено влияние дрейфа базовой линии на погрешности моделирования сигмоидной функции. Исследована возможность определения значения порогового цикла из параметров аппроксимации. Исследованы особенности многокомпонентного анализа ПЦР-РВ. Был выработан базовый набор алгоритмов математической обработки кинетических кривых, который был использован при реализации программного обеспечения для приборов серии АНК, выпускаемых ИАП РАН. Сформулированы выводы.

Шестая глава посвящена описанию внедрения результатов работы. Описано развитие версий ПО АПК АНК от первой к четвертой.

В заключении приведены перспективы развития данного направления и сформулированы результаты и выводы диссертационного исследования.

1 Современное состояние АПК ПЦР-РВ

1.1 Приборы для проведения ПЦР-РВ

Для проведения ПЦР-РВ используют специальные приборы, способные одновременно осуществлять термостатирование образцов с быстрыми переходами между температурами по заданной программе и регистрацию флуоресценции образцов на заданных длинах волн, соответствующих применяемым флуоресцентным красителям. Технология проведения реакции ПЦР-РВ была запатентована [4], патент датирован 1991 г. и принадлежит фирме Roche, США. Аппарат для проведения ПЦР-РВ запатентован в 1997 г., патент принадлежит фирме Applied, США [5].

Общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ приведена на рис. 1.

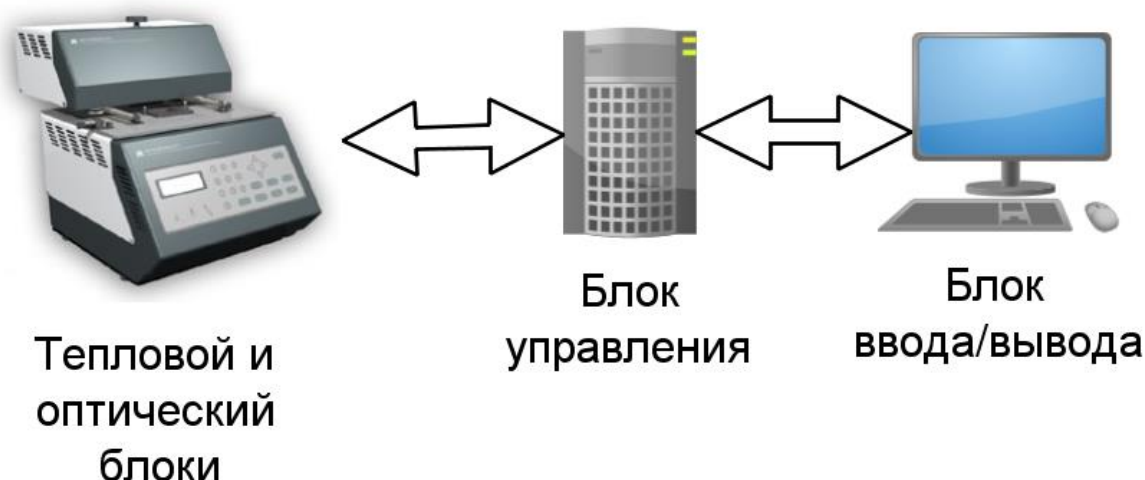


Рис. 1 – Общая схема прибора для проведения ПЦР-РВ

Прибор состоит из следующих блоков:

- 1) **тепловой блок** – осуществляет нагрев, охлаждение и поддержание температуры контейнеров (пробирок), находящихся в блоке образцов; может представлять собой управляемый твердотельный термостат на элементах Пельтье, либо воздушный термостат, в котором регулируется температура воздуха, обдувающего блок образцов;

- 2) **оптический блок** – представляет собой флуориметр, позволяющий осуществлять регистрацию флуоресценции образцов в режиме реального времени; содержит источник света для возбуждения флуоресценции (галогеновая лампа, лазер, светодиод) и детектор сигнала флуоресценции (ПЗС-матрица, фотодиод, ФЭУ), также содержит систему светофильтров и оптико-механических элементов, позволяющую возбуждать и регистрировать флуоресценцию от многих образцов на нескольких длинах волн (от 1 до 8), соответствующих флуоресцентным красителям, обычно расположен над тепловым блоком;
- 3) **блок управления** – содержит электронные схемы для управления тепловым и оптическим блоками, а также интерфейс и программное обеспечение (ПО), позволяющие пользователю при помощи ПК задавать режимы термостатирования, получать с оптического блока и обрабатывать данные о ходе ПЦР-РВ. ПО может реализовывать различные математические алгоритмы обработки и анализа данных, поддерживать ведение отчетной документации и интеграцию с внешними базами данных;
- 4) **блок ввода/вывода** – обычно представляет собой стандартный персональный компьютер с установленным специализированным программным обеспечением.

Из описаний технических параметров основных моделей АПК для ПЦР-РВ (было рассмотрено 28 моделей приборов), присутствующих на рынке, можно оценить распространенность основных технических решений, применяемых при создании приборов этого вида.

В большинстве моделей применяют тепловые блоки, построенные на элементах Пельтье. При этом в 5-ти моделях используют воздушные термостаты. Формат тепловых блоков варьирует в широком диапазоне, позволяя одновременный анализ от 4 до 384 образцов. В случае использования стандартных пробирок объемом 0,2 мл, типичный формат блока составляет 32-96 образцов. Многие

приборы рассчитаны на 96-луночный планшет. Из 28 рассмотренных приборов, 11 имеют формат менее 96 образцов.

Количество каналов флуоресценции варьируется от 1 до 6, при этом 14 приборов имеют 4 и менее каналов регистрации. Лишь 3 прибора рассчитаны на использование 6-ти каналов, из них для двух (последние модели Rotor Gene) такая конфигурация при поставке является дорогостоящей опцией.

В качестве источников излучения обычно используют как галогеновые лампы, так и светодиоды.

Детекторами в большинстве моделей являются ПЗС-матрицы. В 5 приборах детекцию проводят с помощью ФЭУ, и еще в 5-ти – с помощью фотодиодов.

Практически все приборы, за исключением моделей Rotor Gene, обладают нагреваемой крышкой теплового блока.

Основными характеристиками приборов являются: скорость нагрева/охлаждения теплового блока образцов, число пробирок в блоке образцов, число каналов регистрации (длин волн регистрации флуоресценции) и время регистрации.

1.2 Принцип действия “Анализатора нуклеиновых кислот”

Работа анализатора нуклеиновых кислот основана на применении метода полимеразной цепной реакции с одновременной детекцией изменения сигнала флуоресценции во время амплификации [6, 13].

Для реализации условий полимеразной цепной реакции, анализируемые образцы смешиваются в пробирках с реакционной смесью, в состав которой входят:

1. Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, которые обеспечивают специфичность реакции;
2. Таq ДНК-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3’-конца второй цепи ДНК;
3. смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, используется Таq ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК;
4. интеркалирующий краситель или специфические зонды;

5. буфер - смесь катионов и анионов, обеспечивающих оптимальные условия для реакции.

Используются одноразовые стандартные полипропиленовые пробирки с герметичными крышками. Пробирки устанавливаются в блок образцов. При нагревании пробирок до 95°C молекулы анализируемых образцов ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. Праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени и создают искомый фрагмент. При температуре порядка 60°C Taq ДНК-полимераза достраивает вторую цепь НК с 3'-конца праймера.

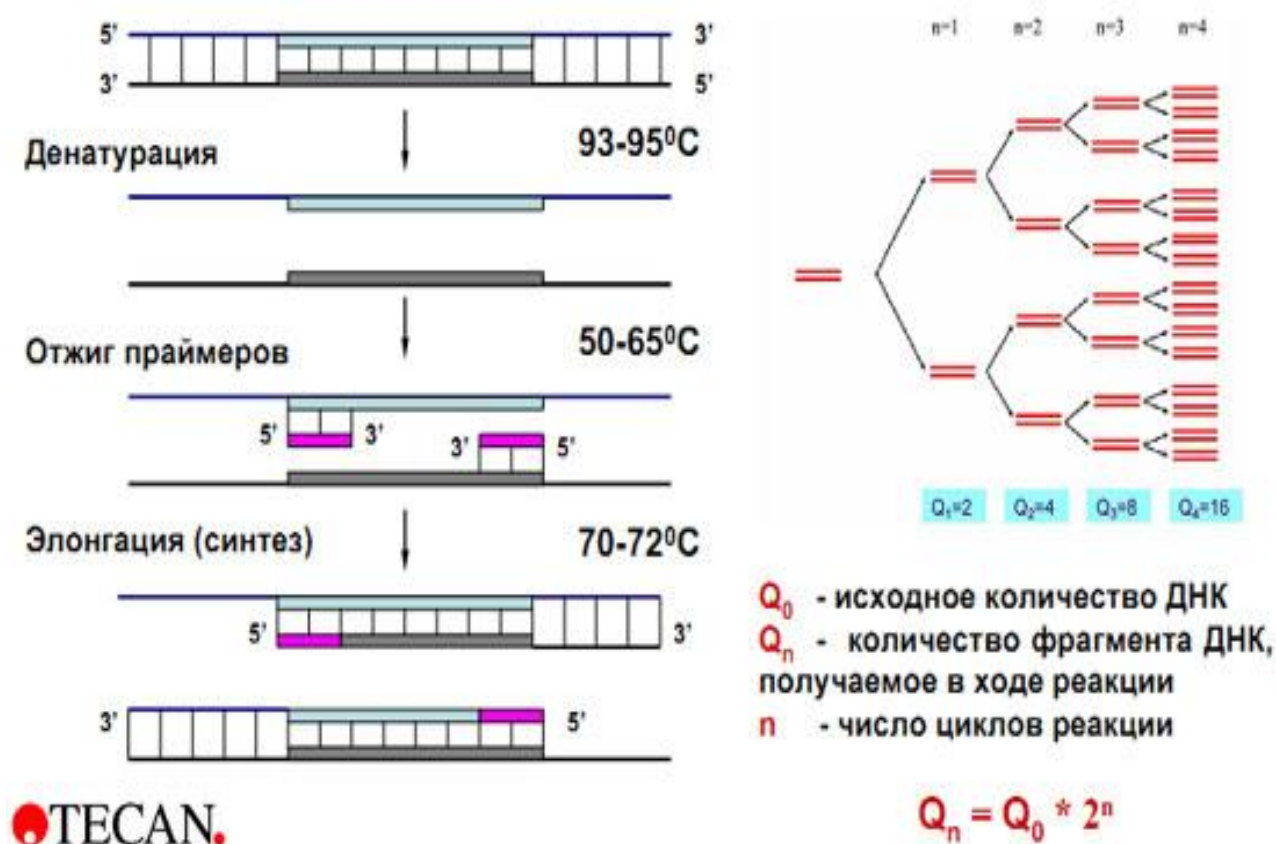


Рис. 2 – Общая схема проведения ПЦР

При малой концентрации анализируемых образцов температурный цикл амплификации повторяется до 40 - 50 раз. Реактивы обеспечивают избирательность полимеразной цепной реакции и позволяют выделить искомую НК на фоне других. При каждом цикле амплификации, синтезированные ранее фрагменты вновь копируются Taq ДНК-полимеразой. При этом происходит экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК (рис.2). Концентрация

исходных специфических фрагментов ДНК до известного момента увеличивается приблизительно как 2^N , где N- количество циклов.

В основе используемого метода ПЦР-РВ лежит наблюдение в реальном времени сигналов флуоресценции специфического для данной ДНК зонда, который подобно праймеру в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК. В ходе синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется. Он содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце - гаситель флуоресценции. В результате расщепления происходит пространственное разобщение красителя и гасителя, что приводит по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

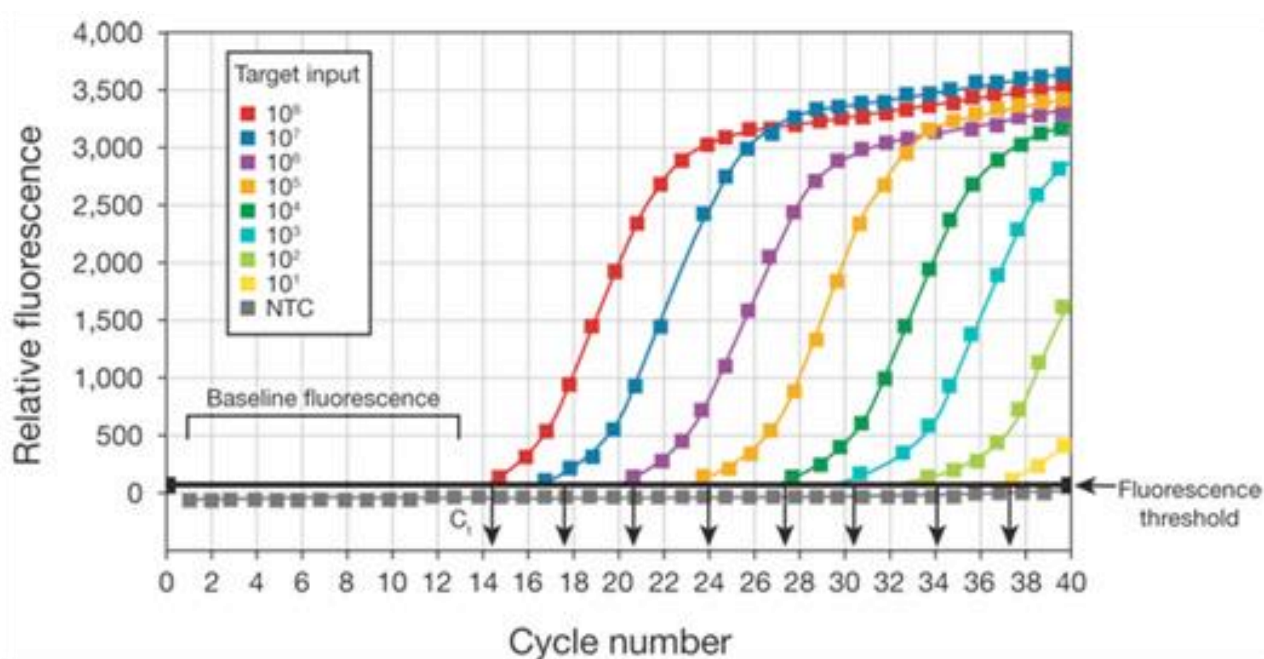


Рис. 3 - Кинетические кривые ПЦР-РВ, расчет пороговых циклов с использованием горизонтальной линии - порога

Исходные данные для получения кривой ПЦР-РВ (кинетические кривые) представляют собой средний уровень флуоресценции образца на определенном канале детекции в течение периода отжига на каждом цикле амплификации [17]. Кривая содержит количество точек, равное количеству циклов ПЦР, в ходе которых проводили регистрацию сигнала (обычно 40-50 циклов). Основные понятия, относящиеся к анализу кривых ПЦР, проиллюстрированы на Рис. 3. На начальном участке кривая описывает фоновый сигнал, обычно постоянного уровня либо

совершающий медленный монотонный дрейф, в сочетании с шумовым компонентом, зависящим от работы оптического блока прибора. По мере накопления продукта сигнал в определенный момент превышает уровень шумов, и отмечается начало роста кривой ПЦР. Рост сигнала носит экспоненциальный характер на протяжении нескольких циклов, сменяясь постепенным снижением скорости роста и выходом кривой на плато.

Процесс завершения ПЦР обусловлен расходом реагентов при накоплении специфических продуктов амплификации. При этом увеличение сигнала флуоресценции сначала замедляется и затем прекращается вовсе.

По изменению сигнала флуоресценции можно проследить кинетику ПЦР и использовать полученные данные для расчета значения порогового цикла – величины, позволяющей судить об исходном количестве копий ДНК и сравнивать образцы между собой.

1.3 Программное обеспечение приборов для ПЦР-РВ

Проведя анализ руководств пользователя для приборов: iCycler iQ, Applied Biosystems 7300/7500, BioRad CFX96 Touch и других, можно утверждать, что в комплект каждого прибора для ПЦР-РВ включено программное обеспечение, в котором предусмотрены следующие возможности:

- различные калибровки прибора – по температуре, по регистрации оптических сигналов;

- задание протокола работы - циклограммы для теплового блока и порядок работы оптического блока;

- введение паспортных данных наборов, образцов и контролей (в том числе, с помощью штрих-кодирования);

- показ кинетических кривых в виде графиков в ходе проведения ПЦР и после окончания работы;

- анализ интенсивности флуоресценции по данным в конечной точке, по кривым отжига (кинетические кривые) и кривым плавления;

- отображение стандартных кривых для количественного анализа;

при мультиплексном анализе: возможны, как регистрация результатов по всем красителям на одном графике, так и анализ по каждому красителю отдельно;

устранение ряда артефактов ПЦР;

автоматическое или интерактивное вычисление порогового цикла для каждой кинетической кривой;

автоматическое вычисление концентрации специфических нуклеиновых кислот в исследуемых образцах;

проведение и независимая обработка анализов нескольких участков НК в одной постановке;

экспорт результатов анализов в Excel, Word, текстовые файлы, pdf-файлы и файлы других форматов.

Программное обеспечение приборов для проведения ПЦР-РВ позволяет управлять проведением реакции ПЦР, а также обрабатывать получаемые данные. Кроме того, ПО может обеспечивать решение других задач, таких как создание отчетов о результатах анализа, поддержка баз данных, содержащих сведения об образцах и протоколах анализа, интеграция с другими приборами, такими как приборы для автоматической пробоподготовки.

На основе результатов диссертационного исследования необходимо будет разработать алгоритмы для программного обеспечения разрабатываемых в ИАП РАН приборов АНК ПЦР-РВ. В состав алгоритмов должны входить алгоритмы управления на основе заданного протокола работы, алгоритмы первичной и вторичной обработки.

1.4 Основные направления совершенствования АПК для проведения ПЦР-РВ

Все ведущие производители приборов для ПЦР-РВ постоянно расширяют модельный ряд за счет доработки имеющихся моделей и создания полностью новых приборов, отвечающих растущим запросам практики.

Анализ патентных материалов ведущих стран показал, что основными направлениями разработок является создание и совершенствование конструкций тепловых блоков (амплификаторов - термоциклеров), оптических блоков (детекторов - флуориметров) и блоков образцов (сопряжение теплового и

оптического блоков). Кроме того, значительное количество патентов направлено на совершенствование применяющихся наборов реактивов, необходимых для калибровки и эксплуатации приборов, основанных на ПЦР. На современном рынке распространены: приборы «iQ5» и CFX96 производства «BioRad», США, прибор «Mx3000P» производства «Stratagene», США, прибор «Rotor Gene 6000» производства Corbett Research, Австралия, прибор StepOne и 7500 производства Applied Biosystems, США, АНК-32 производства ИАП РАН, Россия и т.д.

Непрерывно идет разработка новых алгоритмов обработки данных ПЦР-РВ о чем символизирует непрекращающийся поток публикаций. В работе [32] приведено краткое описание возможностей и сравнение 27 пакетов программ, как фирменного программного обеспечения, так и ПО в свободном доступе.

На базе нескольких приборов создают лаборатории – аппаратно-программные комплексы для решения совместных задач в рамках лабораторных измерительных систем.

Основными направлениями совершенствования АПК для проведения ПЦР-РВ являются:

- 1) увеличение количества одновременно анализируемых образцов;
- 2) увеличение скорости изменения температуры при амплификации;
- 3) увеличение числа каналов флуоресцентной детекции;
- 4) совершенствование алгоритмов управления работой прибора;
- 5) совершенствование алгоритмов обработки результатов;
- 6) совершенствование пользовательского интерфейса и интеграции в лабораторные измерительные системы.

Эти тенденции, безусловно, необходимо учитывать при проведении диссертационных исследований.

1.5 Перспективы разработки новых приборов ПЦР-РВ

Существенным недостатком приборов для ПЦР-РВ западного производства, ограничивающим их широкое внедрение в массовую практику, является их высокая цена. Кроме того, существует тенденция по созданию закрытых АПК, рассчитанных на использование реагентов и расходных материалов ограниченного круга

производителей, обычно самого производителя прибора. Эти факторы делают особо актуальной разработку современного недорогого прибора для ПЦР-РВ, позволяющего работать с тест-системами основных российских и зарубежных производителей.

В сотрудничестве с ЗАО «Синтол» Институтом аналитического приборостроения РАН, была разработана и запущена в производство линейка приборов для ПЦР-РВ серии АНК. Широкое распространение получил прибор АНК-32. На момент создания этот прибор не уступал либо превосходил аналоги по своим тепловым и оптическим параметрам. Ключевыми достоинствами АНК-32 являются высокая точность работы теплового блока, обеспечивающего пространственную однородность не хуже $0,15^{\circ}\text{C}$ и абсолютную погрешность поддержания температуры не более $0,1^{\circ}\text{C}$ в рабочем диапазоне температур. Прибор также обеспечивает высокую динамическую однородность по температуре: температуры образцов отличаются в процессе теплового перехода не более чем на 1°C . Оптическая система прибора на основе ФЭУ обладает чувствительностью на уровне $2,5 \cdot 10^{-9}$ М флуоресцентного красителя на канал при динамическом диапазоне 9 порядков.

Новые разрабатываемые приборы по техническим параметрам должны соответствовать либо превосходить имеющиеся аналоги, а именно обеспечивать, как минимум, 7-ми цветную детекцию со временем амплификации 40 циклов ПЦР менее 1 часа. ПО АПК должно обладать дружественным интерфейсом и обеспечивать реализацию новых алгоритмов обработки данных и возможность автоматического анализа.

Для достижения необходимых параметров требуется детальное изучение тепловых процессов при амплификации в используемых технических решениях, что является одной из ключевых задач диссертационного исследования.

1.6 Алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ

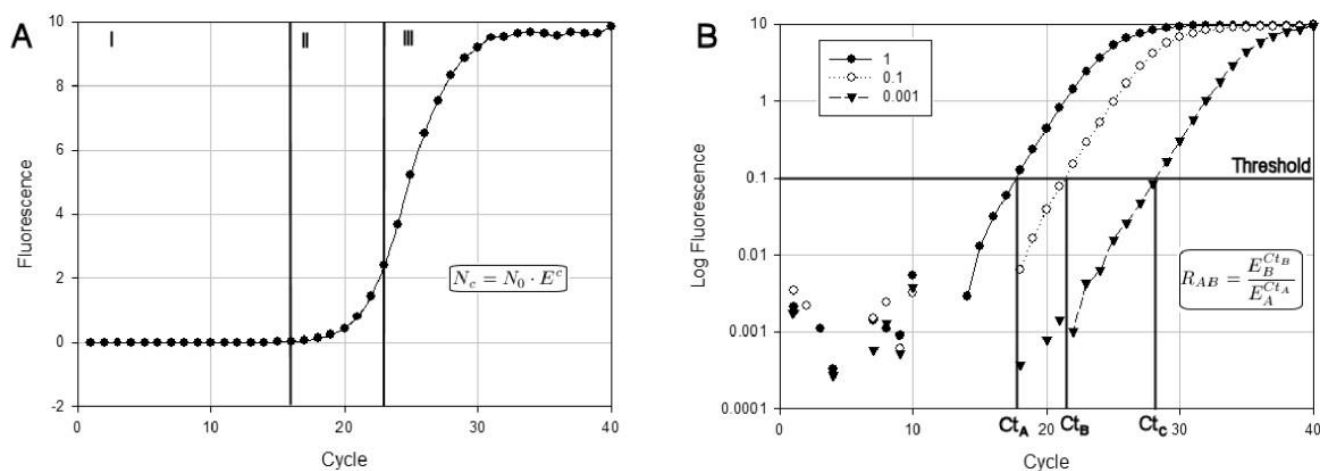


Рис. 4 - Кинетическая кривая

В кинетической кривой ПЦР можно выделить три стадии (Рис. 4А) [34]:

- I. **Базовую линию** (стадию инициации, когда ПЦР-продукты еще не детектируется флуоресцентной меткой) .
- II. **Экспоненциальную стадию** (в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР).
- III. **Плато** (стадию насыщения).

Экспоненциальная стадия ПЦР описывается уравнением (1):

$$N_c = N_0 * E^C, \quad (1)$$

где N_c - количество молекул продукта к циклу n , N_0 - исходное количество молекул, содержащих амплифицируемый фрагмент (template), E - эффективность амплификации.

В идеальных условиях $E=2$, т.е. на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта. Считаем, что интенсивность сигнала флуоресценции прямо пропорциональна количеству молекул продукта.

Прологарифмируем обе части уравнения 1 и преобразуем его к виду:

$$C = - (1/\log E) * \log N_0 + \log N_c / \log E. \quad (2)$$

Назовем пороговым циклом (threshold cycle, Ct) такой цикл n , на котором достигается некий заданный уровень флуоресценции - пороговая флуоресценция $N_{Ct} = \text{const}$. Для $C=Ct$ уравнение 2 принимает вид:

$$Ct = - (1/\log E) * \log N_0 + \log N_{ct}/\log E. \quad (3)$$

Т.е. значение Ct прямо пропорционально логарифму количества продукта. Таким образом, ПЦР-РВ позволяет сравнивать количества продуктов при условии, что эффективность реакции и заданный уровень пороговой флуоресценции одинаковы для каждой из сравниваемых реакций (Рис. 4В).

$$R_{AB} = N_B/N_A = E_B^{C_{TB}}/E_A^{C_{TA}}. \quad (4)$$

При $E_A = E_B$ и прологорифимировав, получаем $\log N_B / \log N_A = C_{TB} / C_{TA}$.

Исходя из выше изложенного, информация об исходном продукте содержится только на I и II участках кинетической кривой, для описания III участка до сих пор не создано не противоречивого описания процессов. На практике, на I участке регистрируются только шумы, определяемые процессами в реакционной смеси, фотоприемником и системой регистрации. На втором участке также заметно влияние шумовой составляющей сигнала, к тому же экспоненциальный участок реально содержит небольшое, порядка 5 число точек, что также накладывает ограничения на выбор положения пороговой линии. III участок не используется для расчетов в виду неопределенности процессов.

Для уменьшения шумовой составляющей и повышения чувствительности флуориметрического детектора требуется провести анализ характера шумов и синтезировать оптимальный алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции.

Использование пороговых циклов для сравнения исходного количества продуктов ПЦР требует наличия базового набора алгоритмов вторичной обработки для получения достоверных алгоритмов обработки.

Отсюда следует, что задачами диссертационного исследования являются разработка и совершенствование алгоритмов первичной и вторичной обработки сигналов.

1.6.1 Базовые алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ

Основой количественного анализа ПЦР-РВ стал метод стандартной кривой, подробно описанный в [33]. Общеупотребительные алгоритмы обработки данных ПЦР-РВ включают в себя:

- сглаживание кривых (Smoothing curve);
- коррекцию базовой или нулевой линии (Baseline correction);
- нормировка;
- расчет порогового цикла (Threshold cycle);
- оценка качества кривой;
- использование модельных функций;
- построение стандартной кривой (Standard curve);
- расчет эффективности реакции;

С использованием базовых алгоритмов проводят:

- качественный анализ;
- абсолютный количественный анализ;
- относительное количественное сравнение;
- многокомпонентный анализ.

Сглаживание кривых

Сглаживание кривых проводят с использованием цифровых фильтров различного вида (обычно скользящее среднее либо фильтр Савицкого-Голэя). Способ сглаживания и его степень определяются создателями ПО и не поддаются модификации. Степень сглаживания выбирают таким образом, чтобы избежать размывания области быстрого роста кривой, что привело бы к систематической ошибке (занижению) при определении порогового цикла.

Коррекция базовой линии (Baseline correction)

Базовый уровень флуоресценции - это тот уровень флуоресценции, который наблюдается в реакционной смеси до появления полезного сигнала. Как правило, управляющие программы ПЦР-РВ позволяют задать базовый уровень тремя разными способами.

1. Среднее значение в диапазоне циклов (average over cycle range).

2. Минимальное значение в диапазоне циклов (minimum over cycle range).
3. Тотальный минимум (minimum over all data).

Обычно выбирают такой способ, при котором обеспечивается минимальный уровень флуоресценции до появления полезного сигнала, а начало экспоненциальной фазы детектируется с наибольшей точностью.

В общем случае, базовую линию следует выбирать как среднее значение флуоресценции в достаточно широком диапазоне циклов до начала детекции экспоненциальной фазы. При выборе диапазона желательно также избегать и циклы вне экспоненциальной фазы, в которых наблюдаются скачки флуоресценции.

Расчет порогового цикла (Threshold cycle)

Зависимость 3 работает в самом начале детекции экспоненциальной фазы. На более поздних этапах вклад стохастических эффектов в кинетику реакции становится все более значительным. Поэтому пороговый уровень флуоресценции выбирают в самом начале экспоненциальной фазы, когда стохастические процессы не столь велики. Выбор порога обычно осуществляется по превышению над стандартным отклонением кинетической кривой - это установка порога таким образом, чтобы превышение порогового уровня над базовым уровнем (threshold над baseline) было достаточно малым, но уже статистически достоверным. Обычно выбирают значения в диапазоне 8-10 стандартных отклонений.

Оценка качества реакции

Оценку качества реакции проводят по следующим параметрам:

- форме кинетической кривой PCR,
- специфичности амплификации, определяемой из кривой плавления (для SYBR Green),
- достоверности количественной оценки,
- эффективности амплификации.

Определение эффективности амплификации

Из уравнения 3 следует, что результаты ПЦР-РВ с данной парой праймеров (зондом) и серийными разведениями образца должны ложиться на прямую в координатах $Ct - \log(N_0)$, а эффективность амплификации E можно определить из

угла наклона прямой. В качестве N_0 может выступать и относительная концентрация - например, концентрацию с наименьшим разведением можно принять за 1.

Из уравнения 3 видно, что эффективность реакции можно рассчитать как $E = 10^{-1/k}$, где k берется из уравнения прямой $Ct = k \log(N_0) + b$, полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных. При $E = 2$ (максимально теоретически возможном значении) $k \sim -3.32$. Желательно добиваться таких условий реакции, в которых эффективность амплификации составляет, по меньшей мере, 1.7 - 1.8 (k не меньше -4 — -4.2). Недостатком такого подхода является необходимость постановки в одном эксперименте большого количества пробирок для одного образца с учетом различных разведений.

Эффективность реакции определяют так же, непосредственно решая уравнение 3, то есть выделяют линейный участок кинетической кривой в логарифмическом масштабе и аппроксимируют линейной зависимостью. Недостатком такого подхода является низкая точность расчета из-за малого числа точек на данном участке.

Стандартная кривая (Standard curve)

Этот метод является основным в количественном анализе ПЦР-РВ [33], он предполагает построение калибровочного графика в координатах $Ct - \log(N_0)$ с серией разведений ДНК-стандарта, из которого находят концентрацию продукта N_0 в экспериментальных образцах.

Точность метода зависит от того, насколько условия ПЦР (и, прежде всего, эффективность амплификации) серии стандартов близки к условиям ПЦР экспериментальных образцов. Поэтому при расчете концентрации особое внимание уделяется одинаковым условиям расчета пороговых циклов и обязательно проводится расчет эффективности реакции. Обязательно серия разведений стандартной ДНК должна охватывать весь диапазон возможных концентраций экспериментальной ДНК.

Качественный анализ ПЦР-РВ

Результатом качественного анализа является подтверждение присутствия в исследуемых образцах специфических фрагментов ДНК. Чтобы проверить

реактивы, рекомендуется одновременно с исследуемыми образцами устанавливать в тепловой блок положительные и отрицательные контрольные образцы. Анализ проводится прямым сравнением пороговых циклов исследуемого и положительного контрольного образца.

Количественный анализ ПЦР-РВ

Количественный анализ выполняется методом сравнения с использованием калибровочных образцов с известной концентрацией специфических фрагментов ДНК. Расчет концентраций проводят алгоритмом расчета стандартной кривой, при этом в текущей постановке требуется необходимое количество серий разведений ДНК-стандарта или расчета поправочных коэффициентов с стандартной кривой на основе положительного контрольного образца известной концентрации.

Многокомпонентный анализ

В анализаторах применяют многоканальные флуориметры, благодаря которым появляется возможность использовать несколько красителей и обнаруживать разные специфических фрагментов ДНК в каждой пробирке одновременно.

Например, для обнаружения и определения процентного содержания генетически модифицированной сои (ГМ) Roundup Ready™ используются две независимые реакции в одной пробирке. Первая реакция позволяет обнаружить присутствие ДНК гена лектина, которая присутствует как в ГМ, так и в обычной сое. Вторая реакция позволяет обнаружить присутствие в геноме сои генетической модификации. Наличие положительной динамики для обеих реакций говорит о наличии ГМ сои, а сравнение значений порогового цикла позволяет определить процентное содержание ГМ в общем количестве ДНК сои. Каждая реакция имеет свой флуоресцентный краситель. Для обнаружения лектина сои используется зонд, меченый R6G, а для ГМ – зонд, меченый ROX. Многокомпонентный анализ добавляет в алгоритмы компенсацию взаимного влияния каналов регистрации.

Относительное количественное сравнение

Относительно количественное сравнение успешно применяется при многокомпонентном анализе для получения количественных оценок, при котором сравниваются кинетические кривые полученные не только для разных образцов, но

и для различных каналов регистрации. Из уравнения 4 следует, что при равной эффективности реакции E в образцах А и В, относительная концентрация продукта

$$R_{AB} = N_B / N_A = E_B^{C_{TB}} / E_A^{C_{TA}} = E^{-\Delta C_t}, \quad (5)$$

где $\Delta C_t = C_{tA} - C_{tB}$.

Проведем нормализацию этих результатов по данным амплификации с контрольной последовательностью REF (соответствующей, например, housekeeping gene). Пусть реакция REF в обоих образцах протекает с эффективностью E_{ref} . Тогда

$$R = E^{-\Delta C_t} / E_{ref}^{-\Delta C_{tref}}. \quad (6)$$

Если эффективности "контрольной" и "опытной" реакций сходны, приближенно можно записать:

$$R = E^{-\Delta C_t} / E^{-\Delta C_{tref}} = E^{\Delta C_{tref} - \Delta C_t}. \quad (7)$$

И, наконец, если обе реакции протекают со сходной эффективностью, близкой к 2, формула упрощается до вида:

$$R = E^{\Delta C_{tref} - \Delta C_t} \sim 2^{\Delta C_{tref} - \Delta C_t} = 2^{-\Delta \Delta C_t}. \quad (8)$$

Для создания программного обеспечения необходимо критически проанализировать применяемые базовые алгоритмы, определить их состав и границы применимости, по возможности, усовершенствовать для получения более достоверных результатов вторичной обработки.

1.6.2 Использование модельных функций:

Использование модельной функции преследует основную цель повысить качество оценки порогового цикла и эффективности реакции для последующего расчета дополнительных параметров: концентрация, экспрессия и т.п., тем самым сделать расчет автоматическим, не зависящим от стохастических составляющих процесса измерений.

Первая модель, которую широко начали использовать [35] - это модель сигмоидной функции.

$$f = A / (1 + \exp(-(x - x_0) / B)), \quad (9)$$

где A , x_0 , B — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением (9).

В работе [36] Г.С.Краснов использует аппроксимацию кинетической кривой двумя моделями — моделью «сигма», определяемой уравнением (9) и моделью, определяемой уравнением

$$f^{1+P/C} + f \cdot e^{(B \cdot P \cdot x + W \cdot P)/C} - P \cdot e^{(B \cdot P \cdot x + W \cdot P)/C} = 0 \quad (10)$$

Здесь f — уровень флуоресценции на циклах, A , B , C , W , P , x_0 — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением. Эти уравнения аппроксимируют кривые, из которых вычтен уровень флуоресценции на «нулевой линии», которая определяется по методу наименьших квадратов. Модель (10) используется впервые. Способы аппроксимации кинетической кривой моделями (9) и (10) предполагают использование всей кривой, а не только её экспоненциального участка, поэтому должны быть выполнены дополнительные требования, например, кривые в фазе «плато» должны быть параллельны оси абсцисс.

В работах [37, 38] А.Л. Буляница так же использовал две модели логистического роста на основе показательной (11) и степенной (12) функций:

$$X_n = X_m / (1 + (B-1)a_0^n) \quad (11)$$

Здесь X_n — величина сигнала на n -м шаге измерения ($n = 0, 1, \dots, N$, где N обычно 30–40). Коэффициент a_0 , обычно находящийся в пределах 1.78–1.98 (при теоретическом пределе, равном 2), характеризующий эффективность проведения реакции. Этот коэффициент определяет средний прирост количества ДНК за 1 цикл. Величина X_m характеризует максимальный информативный сигнал, т. е. либо величину сигнала при максимальном количестве ДНК (при достижении режима насыщения), либо максимально допустимую величину сигнала, определяемую чувствительностью измерения, разрядностью устройств (в частности, АЦП) и другими факторами, связанными не с ПЦР, а с выбранным режимом измерения. Параметр B численно равен отношению X_m и X_0 — сигнала, соответствующего начальному (достаточно малому) количеству ДНК. Соответствующее отношение B обычно не менее 10^3 , но может достигать 10^6 – 10^7 .

$$X_n = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (n/n_0)^p), \quad (12)$$

где X_n — величина сигнала на n -м шаге измерения ($n = 0, 1, \dots, N$, где N обычно 30–40). Величина A_1 характеризует величину сигнала при максимальном количестве

ДНК, A_2 — сигнала, соответствующего начальному (достаточно малому) количеству ДНК. Коэффициенты p и p_0 , обычно характеризуют крутизну кривой.

В статье [39] Zhao S. сравнивает четыре модели, характеризующие логистические зависимости: логистическую степенную (11), сигмоидную (9), функцию Гомпертца (Gompertz) (13) и функцию Chapman-Richards (14).

$$f = a \cdot \exp(b \cdot \exp(c \cdot x)). \quad (13)$$

$$f = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot x))^c. \quad (14)$$

Использование модельных функций предполагает использовать в расчетах максимум информации, заложенной в кинетических кривых, что должно способствовать повышению точности количественного анализа с одной стороны и автоматизировать расчеты за счет выбора вычисляемых параметров для оценки концентраций продукта.

Отсюда следует, что применение модельных функций является самым перспективным направлением исследований в задаче совершенствования вторичных алгоритмов обработки, а так же задаче создания соответствующего ПО.

1.7 Детальная формулировка цели и задач исследования

Аналитический обзор показал что основными направлениями развития современных АПК для проведения ПЦР-РВ являются:

- 1) увеличение количества одновременно анализируемых образцов;
- 2) увеличение скорости изменения температуры при амплификации;
- 3) увеличение числа каналов флуоресцентной детекции;
- 4) совершенствование алгоритмов управления работой прибора;
- 5) совершенствование алгоритмов обработки результатов;
- 6) совершенствование пользовательского интерфейса и интеграции в лабораторные измерительные системы.

Эти направления определили цель и задачи настоящего диссертационного исследования.

Целью работы является развитие научно практических основ создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ.

Задачи исследований. Для достижения указанной цели в работе ставились и решались следующие задачи:

1. Провести экспериментальные исследования с целью определения правил задания рабочих параметров теплового блока (амплификатора).
2. Осуществить синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции по критерию максимума апостериорной плотности вероятности.
3. Разработать проблемно ориентированный язык управления экспериментом и автоматный язык управления аппаратной частью.
4. Усовершенствовать алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.
5. Создать программное обеспечение для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе полимеразной цепной реакции (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64, АНК-96).
6. Внедрить разработанный комплекс приборов в научные и практические генетические исследования.

1.8 Выводы

1. Проведен аналитический обзор методов ПЦР-РВ и приборов для ее проведения.
2. Сформулированы основные направления совершенствования АПК для проведения ПЦР-РВ.
3. Сформулированы цель и задачи диссертационного исследования.

2 Исследования тепловых режимов работы при проведении ПЦР

2.1 Анализ скорости нагрева/охлаждения

При расчете и изготовлении тепловых блоков использованы рекомендации и расчеты, представленные в работе Чернышева А.В. «Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики» [40]. Суть технологических решений заключается в применении новых типов модифицированных термоэлементов (элемент Пельтье) марки ТМС-127-1.4-6.0 российского производства [41].

Рассмотрим упрощенную модель теплового блока на примере АНК-16 (рис. 5).

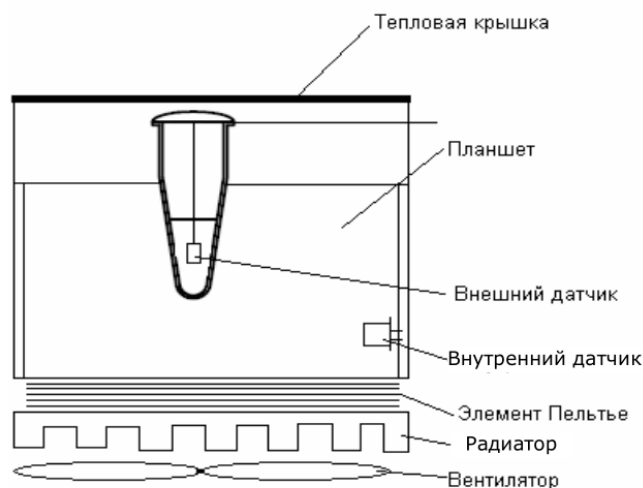


Рис. 5 - Модель теплового блока

Расчетная область модели включает:

- тепловая крышка;
- пробирку с внешним датчиком температуры;
- планшет для пробирок (рис. 6), выполненный из алюминиевого сплава;
- внутренний датчик температуры;
- элемент Пельтье;
- радиатор;
- вентилятор.

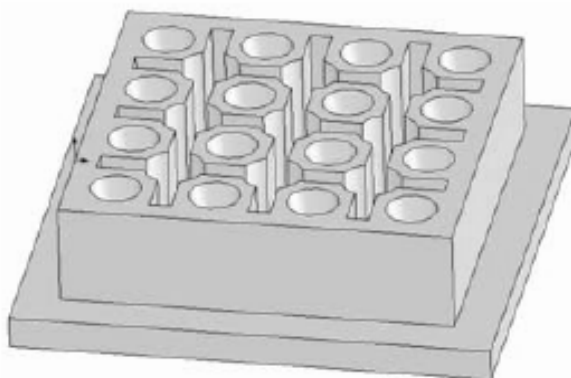


Рис. 6 - Планшет для пробирок

Элемент Пельтье является источником тепловой энергии при реализации температурного протокола при проведении амплификации. Термостатируемый объем ограничен тепловой крышкой, выполненной из алюминиевого сплава. В приборах АНК-16/32 температура тепловой крышки устанавливается в пределах 104 - 106 °С соответственно.

Паспортные параметры работы элемента Пельтье ТМС-127-1.4-6.0М

$I_{\max}=6\text{А}$ $U_{\max}=14.6\text{В}$ $\Delta T=71^{\circ}\text{К}$ $Q_{\text{сmax}}=53\text{Вт}$.

Рассмотрим процесс переноса тепла в нашей системе [40]. Процессы в элементе Пельтье основаны на том, что носители заряда (электроны или дырки), пройдя через спай, попадают в область с меньшей энергией, передают избыток энергии кристаллической решетке, в результате чего вблизи контакта происходит выделение теплоты Пельтье ($Q_{\text{П}} > 0$) и температура контакта повышается. При этом на другом спае носители, переходя в область с большей энергией, заимствуют недостающую энергию от решетки; происходит поглощение теплоты Пельтье ($Q_{\text{П}} < 0$) и понижение температуры. Таким образом, в зависимости от направления тока выделяется или поглощается некоторое количество тепла $Q_{\text{П}}$, пропорциональное прошедшему через контакт заряду (15):

$$Q_{\text{П}} = \Pi * I * t, \quad (15)$$

где Π — коэффициент Пельтье, I — сила тока, t — время.

При прохождении тока в цепи происходит выделение джоулева тепла:

$$Q_{\text{Джоуль}} = I^2 * R_{\text{Пельтье}}, \quad (16)$$

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

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

$$Q_T = \tau (T_1 - T_0) \cdot I \cdot t. \quad (17)$$

Коэффициент Томсона τ зависит от природы материала.

На радиаторе, обдуваемом вентилятором, происходит рассеяние тепла $Q_{\text{рассеяния}}$, величина которого зависит от площади радиатора и производительности вентилятора. Процессы переноса тепла в нашей системе можно описать уравнениями (18) при нагреве

$$Q = Q_{\text{П}} + Q_{\text{Джоуль}} + Q_T - Q_{\text{рассеяния}} \quad (18)$$

и (19) — при охлаждении

$$Q = Q_{\text{П}} - Q_{\text{Джоуль}} + Q_T + Q_{\text{рассеяния}}. \quad (19)$$

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

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

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

При исследованиях были использованы два типа датчиков температуры — внешний и внутренний. Внешний датчик температуры размещался в пробирке объемом 0.2 мл (фирма "Axugen", PCR-0.2D-C), в которой находилось 25 мкл вазелинового масла. Внутренний температурный датчик изначально установлен в приборе АНК. Типы датчиков:

- внутренний — AD590JF фирмы Analog Devices, Inc.;
- внешний — HEL700-U-1-A фирмы Honeywell Inc., 1 кОм, 1.65×1.27 мм.

Анализатор нуклеиновых кислот (АНК-16) работал в циклическом режиме. Время нахождения "на полке" 60–95°C составляло 60 секунд (рис. 7). Использование двухэтапного ПЦР и выбор температур соответствовал стандартным значениям при проведении полимеразной цепной реакции на наборах ЗАО "Синтол".

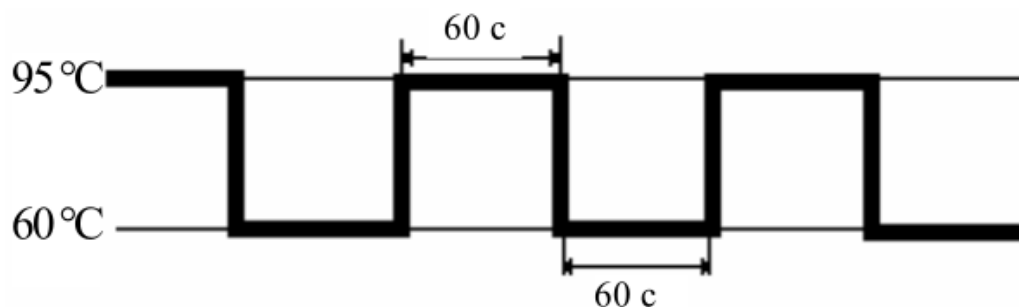


Рис. 7 - Циклический режим работы прибора

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

Данные, полученные датчиками, обрабатывались с помощью персональной ЭВМ. Для каждого датчика была получена зависимость температуры от времени с шагом по времени в одну секунду. После обработки полученных данных получили семейство графиков вида рис. 8.

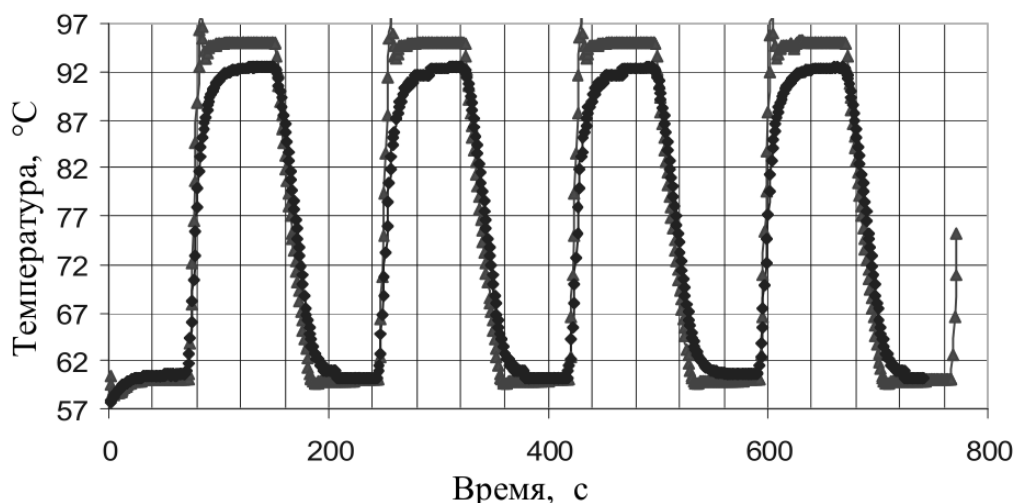


Рис. 8 - График зависимости температуры от времени (напряжение 29 В).

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

По полученным данным были рассчитаны скорость нагрева (60–95 °С) и охлаждения (95–60 °С) по обоим датчикам. Скорость рассчитывалась как отношение разности температур на линейного участка графика (в переходном процессе) на время в секундах.

На графике рис. 9 видно, что при увеличении подводимого к системе напряжения линейно ускоряется процесс нагрева. В тоже время иная ситуация с охлаждением: увеличение напряжения не приводит к увеличению скорости охлаждения.

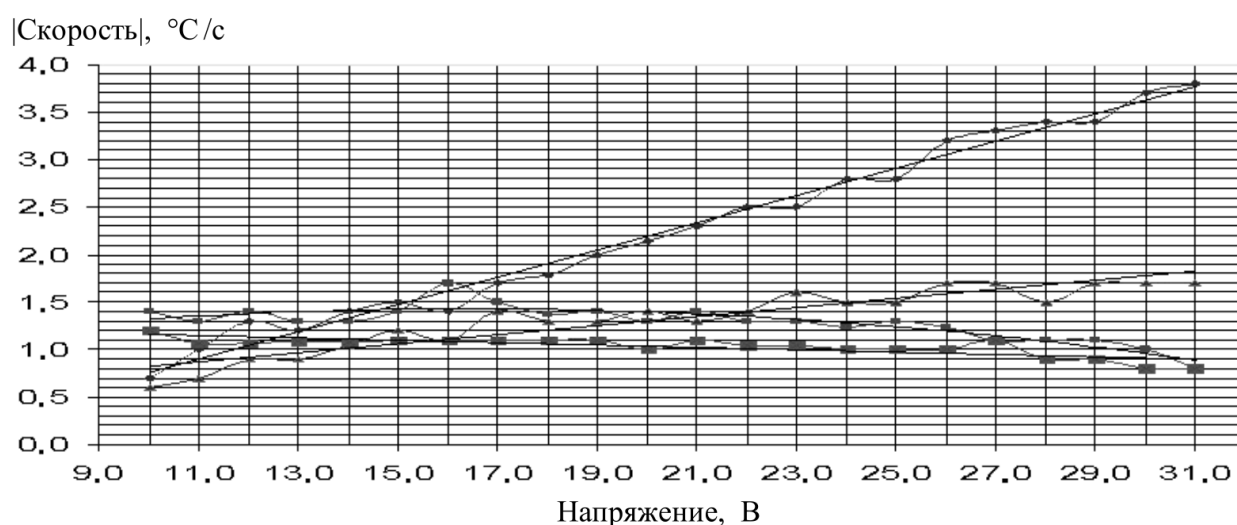


Рис. 9 - График зависимости скорости нагрева—охлаждения от напряжения на элементе Пельтье.

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

В среднем скорость нагревания планшета по внутреннему датчику равна 2.2 °C/c (+/- 0.1 °C/c) при $U = 19$ В, при охлаждении — 1.3 °C/c (+/- 0.1 °C/c) при $U = 12$ В; скорость нагревания реакционной смеси, по внешнему датчику, равна 1.3 °C/c (+/- 0.1 °C/c), скорость охлаждения — 1 °C/c (+/- 0.1 °C/c).

2.2 Анализ времени установления

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

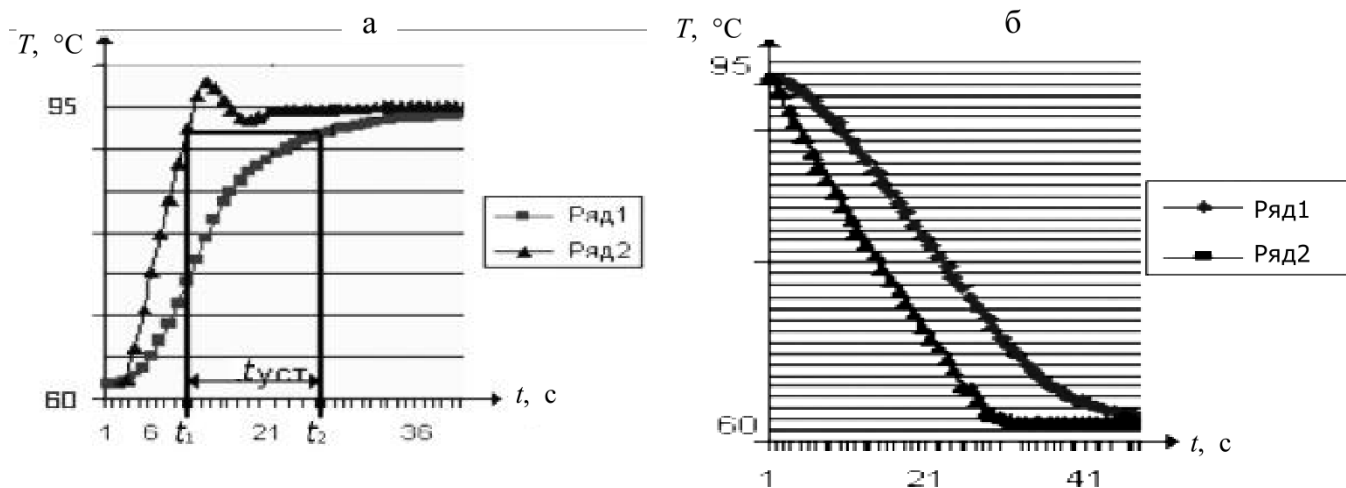


Рис. 10 - Графики зависимости температуры от времени.

Ряд1 — показания внешнего датчика, ряд2 — показания внутреннего датчика

Рассчитать время установления можно следующим образом. Выбираем передний фронт циклограммы (рис. 10, а). Момент времени, когда начинаются изменения показаний обоих датчиков, принимаем за нулевое. Когда внутренний датчик достигает отметки $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), фиксируем время t_1 . Аналогично выбираем точку по внешнему датчику, получая время t_2 . Таким образом, время установления — это

$$t_{уст} = t_2 - t_1 ,$$

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

Таким же способом можно рассчитать $t_{уст}$ для $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (рис. 10, б).

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

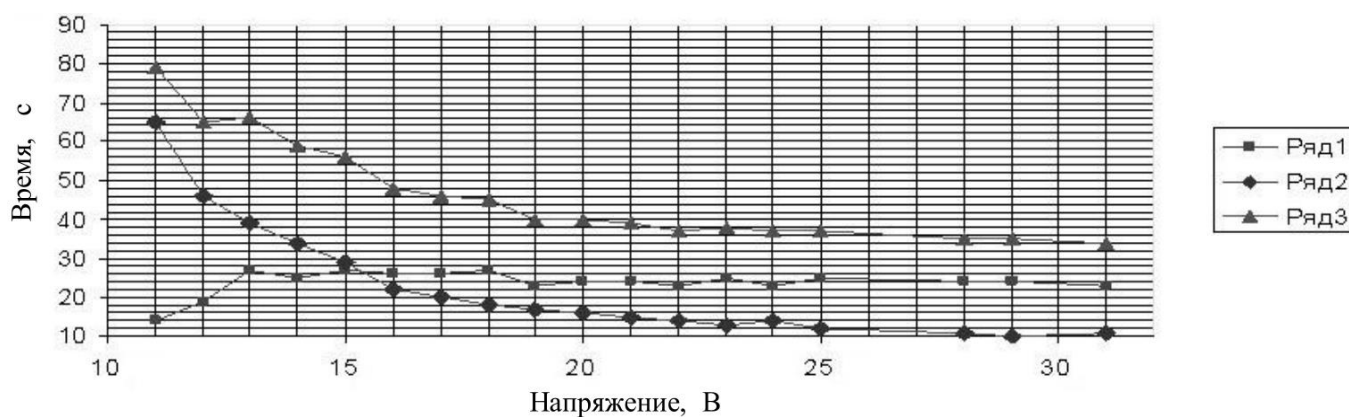


Рис. 11 - График зависимости времени установления нагрева от напряжения.

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

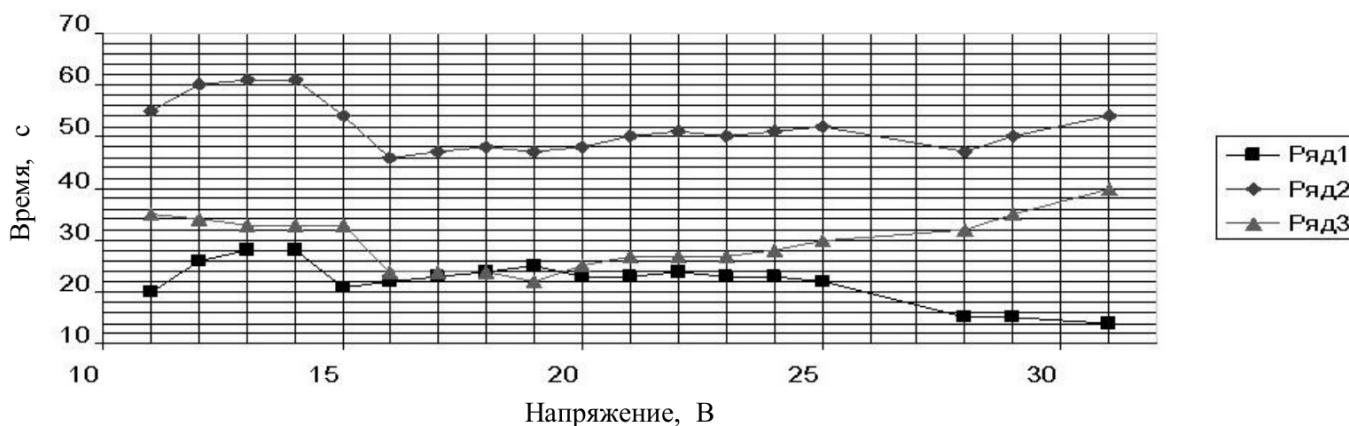


Рис. 12 - График зависимости времени установления охлаждения от напряжения.

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

Из графика рис. 11 видно, что при напряжении на элементе Пельтье 10 В время нагрева исследуемой системы составляет $65\text{--}80\text{ с}$, при напряжении 30 В — время находится в диапазоне $10\text{--}40\text{ с}$. Учитывая $t_{\text{уст}}$, делаем вывод, что

увеличение подаваемого напряжения больше 19 В бессмысленно, т. к. увеличение мощности не дает выигрыша во времени.

При охлаждении (рис. 12) наиболее возможным видится уменьшение напряжения на элементе Пельтье до 14 В.

2.3 Оценка разброса температуры в пробирке

Разность температур в нашей системе — это разность в показаниях внешнего и внутреннего температурных датчиков, находящихся в приборе АНК, в фиксированный момент времени. Мы будем рассматривать два случая: первый — когда внешний датчик достиг отметки $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$); второй — когда внутренний датчик достиг отметки $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

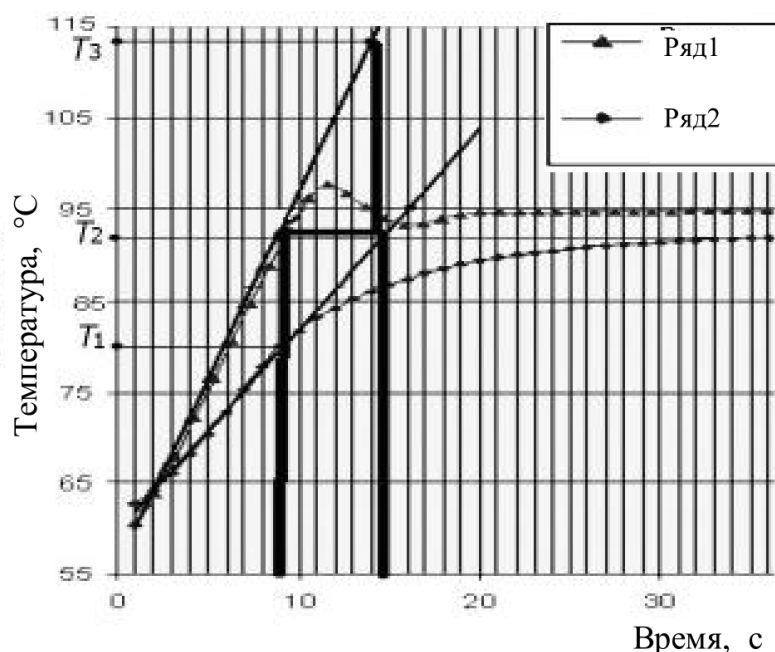


Рис. 13 - График зависимости температуры от времени.

Ряд1 — показания внутреннего датчика; ряд2 — показания внешнего датчика

Первый случай будем экстраполировать, т. к. реального эксперимента система не выдержит. Для этого (рис. 13) температурным уровнем $T_2 \approx 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ выделяем начальный квазилинейный участок кривой ряд1 ($\approx 65\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$). Его проекция на кривую ряд2 дает соответствующий ему начальный участок на кривой ряд2 до соответственной точки с температурным уровнем T_1 . Когда планшет нагрет до заданной температуры T_2 ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)), то температура пробы в пробирке достигла $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (точка T_1). Линейно аппроксимируем выделенные начальные

участки на обеих кривых и экстраполируем полученные прямые: для ряд2 — до пересечения с уровнем T2, для ряд1 — до точки-проекции полученного пересечения (с получением соответственного температурного уровня T3). Когда температура в пробирке достигнет T2, тогда прибор будет нагрет до температуры T3 (около 115 °С). Повышение температуры до такой высокой отметки губительно для реакционной смеси. Таким образом, речь идет о двух случаях разности температур: T1 – T2 и T2 – T3. Первый (T1 – T2) показывает разницу температур между планшетом и реакционной смесью в пробирке, когда планшет нагрелся до заданной температуры. Второй скорее теоретический, для иллюстрации картины, которая возможна при установлении температуры в пробирке 95 °С (+/- 0.5 °С).

Оценив зависимость разности температур от скорости нагрева (рис. 14), делаем вывод: чем быстрее происходит нагрев пробирки, тем больше разность температур между планшетом и реакционной смесью. В нашем опыте она составляет 12.2 °С (рис. 14).

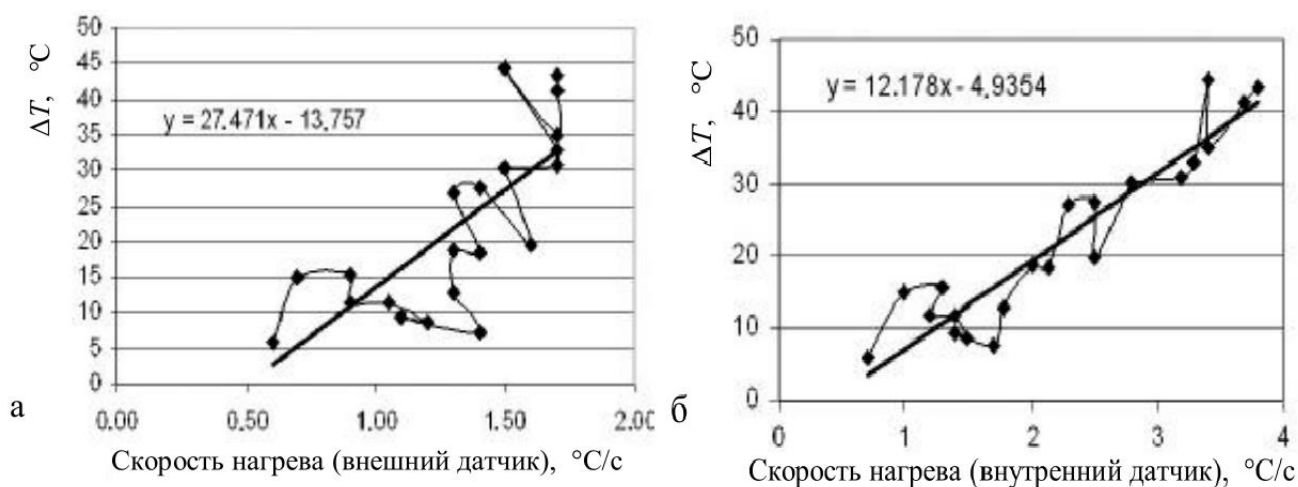


Рис. 14 - Оценка разности температур ΔT в зависимости от скорости нагревания внешнего датчика (а) и внутреннего (б)

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

2.4 Выводы

Оценка зависимости разности температур от скорости нагрева (рис. 14а) показывает, что чем быстрее происходит нагрев пробирки, тем больше разность температур между планшетом и реакционной смесью. В нашем опыте она составляет 12.2 °С (рис. 14). Это значение совпадает с расчетным значением постоянным времени для пробирок данного типа полученным в работе [42].

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

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

Анализ разности температур планшета и реакционной смеси показал, что дальнейшее увеличение скорости нагрева более 2 °С/с приводит к большому значению разности температур (больше 10 °С) и, следовательно, к увеличению неоднородности температуры реакционной смеси, тем самым ухудшая качество проведения ПЦР.

3 Синтез оптимального алгоритма фильтрации первичной обработки сигнала флуоресценции

3.1 Оценка параметра интенсивности по методу максимума апостериорной плотности вероятностей.

При разработке анализаторов нуклеиновых кислот основной задачей является уменьшение объема реактивов в пробирках для количественных анализов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). При меньшем объеме реактивов уменьшается стоимость каждого анализа и повышается быстродействие амплификатора за счет уменьшения тепловой инерции. Нижний допустимый предел объема реактивов в пробирках при количественных анализах методом ПЦР-РВ ограничен чувствительностью флуориметрического детектора [44, 45].

Для любого измерительного прибора, реализующего оптимальный алгоритм измерений, вид плотности вероятности оцениваемого параметра θ должен быть известен. При отсутствии априорных сведений о распределении плотности вероятностей $p(\theta)$ в динамическом диапазоне измерений, обычно её принимают равномерной или нормальной с большой дисперсией [44]. Что касается измерительных приборов можно показать аналитически, что это действительно так и

$$p(\theta) = 1/\theta_0. \quad (20)$$

где θ - оцениваемый параметр, а θ_0 - оценка.

Будем рассматривать регистрируемый сигнал флуориметрического детектора как сумму различных составляющих:

$$\theta = K * I + BG + N_{\text{реакции}} + N_{\text{детектора}} + N_{\text{усилителя}}, \quad (21)$$

где I - собственно сигнал флуоресценции; BG - аддитивная составляющая фонового сигнала; K - мультипликативная составляющая аппаратной функции детектора; $N_{\text{детектора}}$ - шумы фотоприемника; $N_{\text{реакции}}$ - шумы реакции; $N_{\text{усилителя}}$ - шумы системы регистрации (усилителя, АЦП).

Переход к такой форме описания сигнала возможен, так как сигнал флуоресценции на каждом цикле ПЦР является стационарным и, следовательно,

аппаратная функция детектора может считаться не зависящей от времени и равна постоянному коэффициенту усиления.

Для определения оптимальности оценок используют различные широко распространенные критерии. Наиболее часто используется критерий максимума апостериорной плотности вероятности и правдоподобия [44, 46]

Поскольку измерение проводится в реальном масштабе времени, то устройство оценки сигнала должно выдавать точечную оценку после завершения процессов обработки, которая обеспечивает наилучшую оценку интенсивности импульсов флуоресцентного излучения. Таким образом, оценивание интенсивности устройство должно проводить по выборке отсчетов сигнала флуоресценции во временном интервале $(0; \tau)$. Можно показать, что выборку из импульса можно получить детерминированную, за исключением оцениваемого параметра θ , характеризующего интенсивность флуоресценции.

Оценка параметра θ по методу максимума апостериорной плотности вероятностей требует определения максимума по θ от $\ln\{P(k/\theta)\}$ [44, 46, 47]:

$$\max_{\theta} \left\{ \sum_{i=1}^m k_i \ln[\mu_i(\theta) + \mu_{\phi}] - \int_0^{\tau} n(t, \theta) dt + \ln p(\theta) \right\}, \quad (22)$$

где $k = \{k_1, k_2, \dots, k_m\}$ – вектор фотоотсчетов ФЭУ, соответствующий последовательности фотоотсчетов на интервале $(0; \tau)$, μ_i – коэффициент усиления ФЭУ, μ_{ϕ} – средний отсчет фонового шума ФЭУ на интервале, $n(t, \theta)$ – фоновый шум.

Анализ (22) показывает, что оно принимает максимальное значение при некотором

$\theta = \hat{\theta}_{max}$, которое является единственным корнем следующего уравнения,

получаемого дифференцированием (22) по θ :

$$\frac{p'(\hat{\theta}_{max})}{p(\hat{\theta}_{max})} + \sum_{i=1}^m k_i \left[\frac{\mu'_i(\hat{\theta}_{max})}{\mu_i(\hat{\theta}_{max}) + \mu_{\phi}} \right] - \int_0^{\tau} n'(t, \hat{\theta}_{max}) dt = 0. \quad (23)$$

Для равномерно распределенной априорной плотности вероятностей $\ln p(\theta) = \text{const}$, уравнение (23) принимает следующий вид:

$$\frac{n_c \tau}{\hat{\theta}_{\max} n_c \tau + n_\phi \tau} \sum_{i=1}^m k_i - n_c \tau = 0 . \quad (24)$$

Решение уравнения (23) можно записать так:

$$\hat{\theta}_{\max} = \frac{1}{n_c \tau} \sum_{i=1}^m k_i - n_\phi / n_c . \quad (25)$$

Таким образом, аналитически получено, что устройство оценки по методу максимальной апостериорной плотности вероятностей должно суммировать (интегрировать) отсчеты на интервале $(0, \tau)$ в соответствии с выражением (25).

3.2 Математическое ожидание и дисперсия

Оценка $\hat{\theta}_{\max}$ соответственно имеет среднее значение:

$$m_1(\hat{\theta}_{\max}) = m_1 \left\{ \left[\frac{1}{n_c \tau} \sum_{i=1}^m k_i \right] - \frac{n_\phi}{n_c} \right\} = \frac{m_1(\theta) n_c \tau + n_\phi \tau}{n_c \tau} - \frac{n_\phi \tau}{n_c \tau} = m_1(\theta) . \quad (26)$$

Нетрудно видеть, что $m_1(\hat{\theta}_{\max}) = m_1(\theta)$, т.е. оценка является несмещенной, причем $m_1(\hat{\theta}_{\max}) = 1/2$.

Дисперсия оценки:

$$M_2(\hat{\theta}_{\max}) = m_1[\hat{\theta}_{\max} - m_1(\hat{\theta}_{\max})]^2 . \quad (27)$$

Так как среднее оценки $\hat{\theta}_{\max}$ равно среднему параметру θ , то

$$\hat{\theta}_{\max} - m_1(\hat{\theta}_{\max}) = \hat{\theta}_{\max} - m_1(\theta) = \left\{ \sum_{i=1}^m k_i - [m_1(\theta) n_c \tau + n_\phi \tau] \right\} / n_c \tau . \quad (28)$$

Можно заметить, что $m_1\left(\sum_{i=1}^m k_i\right) = \sum_{i=1}^m m_1(k_i) = m_1(\theta) n_c \tau + n_\phi \tau$.

Следовательно $\hat{\theta}_{\max} - m_1(\hat{\theta}_{\max}) = \left[\sum_{i=1}^m k_i - m_1\left(\sum_{i=1}^m k_i\right) \right] / n_c \tau$.

Отсюда дисперсия оценки:

$$M_2(\hat{\theta}_{\max}) = m_1 \left[\frac{\sum_{i=1}^m k_i - m_1(\sum_{i=1}^m k_i)}{n_c \tau} \right]^2 = \frac{1}{n_c^2 \tau^2} m_1 \left[\sum_{i=1}^m k_i - m_1(\sum_{i=1}^m k_i) \right]^2 = \frac{M_2(\sum_{i=1}^m k_i)}{n_c^2 \tau^2} = \frac{\sum_{i=1}^m M_2(k_i)}{n_c^2 \tau^2}.$$

В нашем случае будем считать, что θ принимает значения от 0 до 1, при этом получаем, что $m_1(\theta) = 1/2$, следовательно, окончательно получаем:

$$M_2(\hat{\theta}_{\max}) = \frac{1}{2n_c \tau} + \frac{n_\phi}{n_c^2 \tau}. \quad (29)$$

Таким образом, способность оценивать интенсивность импульсов флуоресцентного излучения может быть улучшена обработкой максимально возможной интенсивности флуоресценции продуктов ПЦР, а также увеличением интервала выборки фотоотсчетов $(0; \tau)$. При $n_c \tau \rightarrow \infty$ дисперсия оценки стремится к нулю и оценка приближается к истинному значению параметра.

Если время наблюдения (интервал выборки) $(t-\tau; t)$ много меньше периода изменения интенсивности импульса флуоресцентного излучения, то устройство оценки, работающее по методу максимума апостериорной плотности вероятности, соответствует прибору, реализуемому соотношением (24) на любом интервале $(0; \tau)$ и должно быть **интегратором** или, в первом приближении, **фильтром низких частот** с полосой пропускания, достаточно большой по сравнению с полосой частот огибающей импульса флуоресцентного излучения.

Исходя из выше изложенного был синтезирован алгоритм, при котором использовалась выборка отсчетов 12-ти разрядного АЦП с периодом 100 мксек, общее время измерений составляет 80 мсек, что позволяет накопить нужную статистику для оценки плотности вероятности и построить ФНЧ с полосой 12,5 Гц. Алгоритм был программно реализован в плате регистрации флуориметрического детектора АНК32. Такой алгоритм позволил обеспечить период опроса 32 образцов за 3 секунды, что является типовым временем регистрации для приборов ПЦР-РВ.

3.3 Выводы

Для реализации алгоритма первичной обработки (оценивания) сигнала флуоресценции необходимо соблюдение условий:

период дискретизации отсчетов должен быть много меньше периода изменения сигнала флуоресценции;

для получения оценки достаточно построить фильтр низких частот для выборки отсчетов сигналов флуоресценции.

В результате работы был синтезирован оптимальный алгоритм первичной обработки сигнала флуоресценции ПЦР, при котором оценка является несмещенной, а ее дисперсия уменьшается с ростом интенсивности сигнала. Разработанный алгоритм непосредственно определил устройство его реализующее как интегратор.

4 Оптимизация алгоритмов управления приборами АНК (Переход от проблемно-ориентированного языка к автоматному при проектировании аналитических приборов)

4.1 Разработка ПОЯ и АЯ

Анализируя опыт по созданию АПК для различных применений, в которых автору приходилось участвовать наиболее перспективным оказалось использование подхода описания алгоритмов, использующихся в АПК на основе теории конечных автоматов. А.А.Шалыто удачно назвал такой подход автоматным программированием [48, 49].

При создании алгоритмов управления требуется:

описание алгоритмов работы АПК АНК с точки зрения конечного пользователя, который обычно называют протоколом работы и который включает в себя задание параметров работы теплового блока и флуориметрического детектора, параметров первичной и вторичной обработки данных;

описание алгоритмов работы теплового блока и флуориметрического детектора при проведении анализа с точки зрения разработчика аппаратуры;

описание алгоритмов первичной и вторичной обработки данных с точки зрения эксперта методиста, разработчика тест-системы.

Причем алгоритмы первичной обработки обычно реализуются в аппаратной части прибора в программном обеспечении микроконтроллеров управления. Вторичная обработка осуществляется на компьютере после завершения анализа.

На примере руководства «Растение / 35S+FMV / NOS скрининг» Тест-система для обнаружения ГМО растительного происхождения» ЗАО Синтол / ВНИИСБ Каталожный номер. № GM-415 [50], в котором приведен сценарий работы Анализатора (АНК-32М: Протокол «Раст/35S/NOS») рассмотрим формирование описаний.

Табл. 1. Циклограмма для теплового блока

Номер ступени	Температура, °С	Время, сек	Кол-во циклов	Метки циклов
1	95	300	1	
2	60	40	50	Начало
3	72	15	50	
4	95	15	50	Конец

Табл. 2. Реакции и цветовые каналы для оптического блока

Номер канала	ДНК мишень	Канал регистрации
1	Растение	R6G / HEX / JOE / Yellow
2	Промотор 35S+FMV	ROX / TxRed / Orange
3	Терминатор NOS	FAM / Green
4	ВПК	Cy5 / Red

На основе таблиц (табл.1 и табл.2) опишем сценарий работы анализатора, так чтобы было понятно конечному пользователю:

Циклограмма

Ступень 1: T=95°, t=300 сек,

Измерить каналы:R6G, ROX, FAM, Cy5;

Цикл: 40 повторов.

Ступень 1: Отжиг, T=60°, t=40сек;

Измерить каналы:R6G, ROX, FAM, Cy5;

Ступень 2: Элонгация, T=72°, t=15сек;

Измерить каналы:R6G, ROX, FAM, Cy5;

Ступень 3: Денатурация, T= 95°, t=15сек;

Измерить каналы:R6G, ROX, FAM, Cy5;

Конец цикла

Конец работы

Такое описание будем называть проблемно ориентированным языком [51]. Поскольку температурные и временные параметры относятся к тепловому блоку, а временные и каналы измерений относятся к оптическому блоку, то имеет смысл рассматривать совместную работу блоков в едином алгоритме.

С учетом того, что в реальной циклограмме может быть несколько циклов, а начало работы может состоять из двух ступеней: отжиг и денатурация, отобразим алгоритм работы в виде блок-схемы:

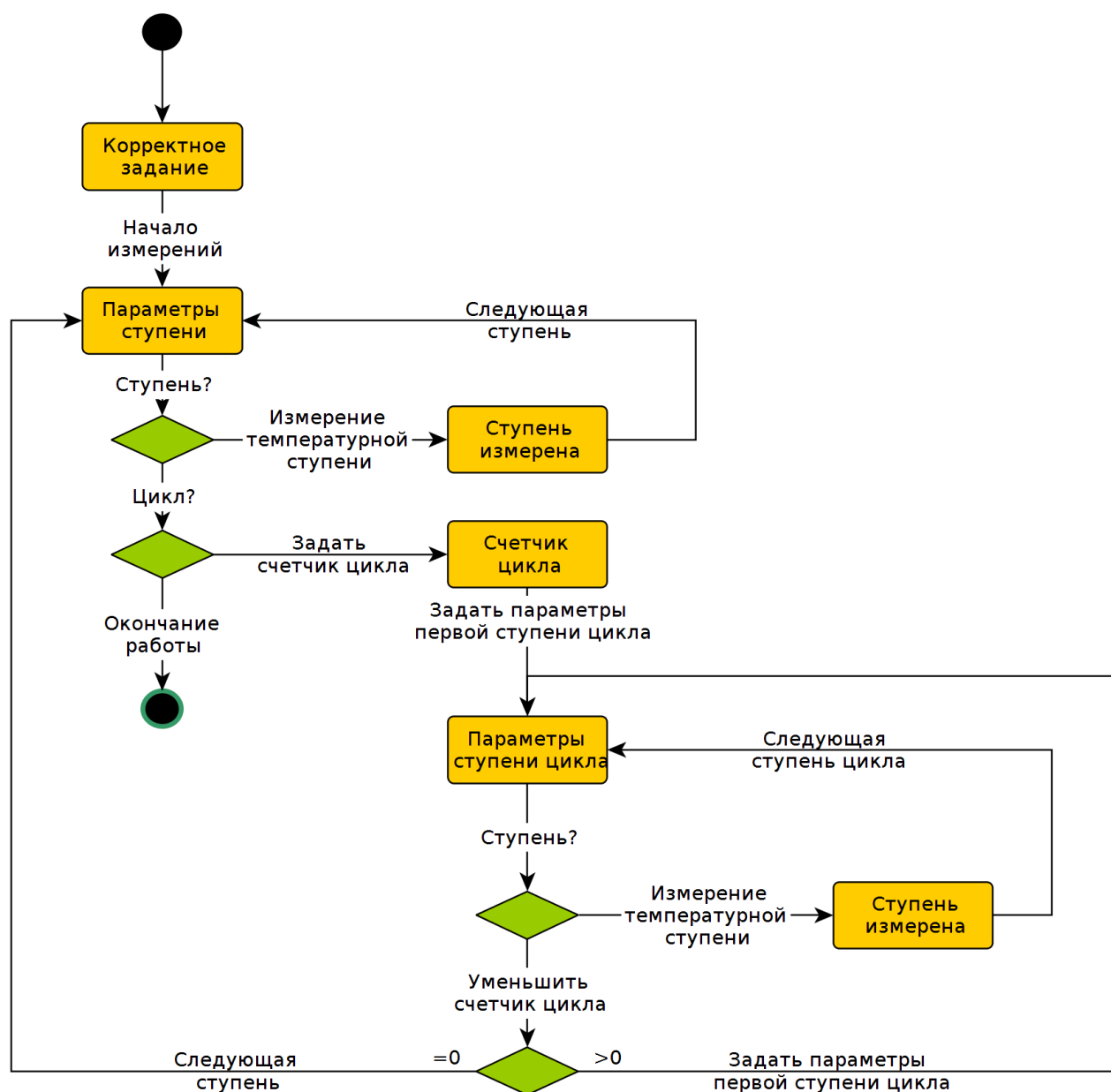


Рис. 15. Блок-схема алгоритм работы анализатора

В предлагаемом подходе рассмотрим алгоритм работы анализатора в виде развертки по времени. При этом получим пошаговую схему работы блоков анализатора (табл. 3) в виде последовательности команд - элементарных алгоритмов работы теплового и оптических блоков. Такая схема соответствует таблице переходов конечного автомата реализующего алгоритм работы прибора в целом [52].

Табл. 3 - Пошаговая схема работы анализатора

№	Описание функции алгоритма
1	Включить тепловой блок
2	Включить оптический блок
3	Задать температуру 95°C
4	Ждать стабилизации температуры
5	Установить канал регистрации FAM
6	Запустить регистрацию данных
7	Получить данные по образцам
8	Установить канал регистрации R6G
9	Запустить регистрацию данных
10	Получить данные по образцам
11	Установить канал регистрации ROX
12	Запустить регистрацию данных
13	Получить данные по образцам
14	Установить канал регистрации Су5
15	Запустить регистрацию данных
16	Получить данные по образцам
161	Задать температуру 95°C
162	Ждать стабилизации температуры
2116	Выключить оптический блок
2114	Выключить тепловой блок

Для реализации такой модели очень хорошо подходит простой автоматный язык, по семантике совпадающий с командами указанными в таблице (табл.3). и соответствующий АЯ конечный автомат:

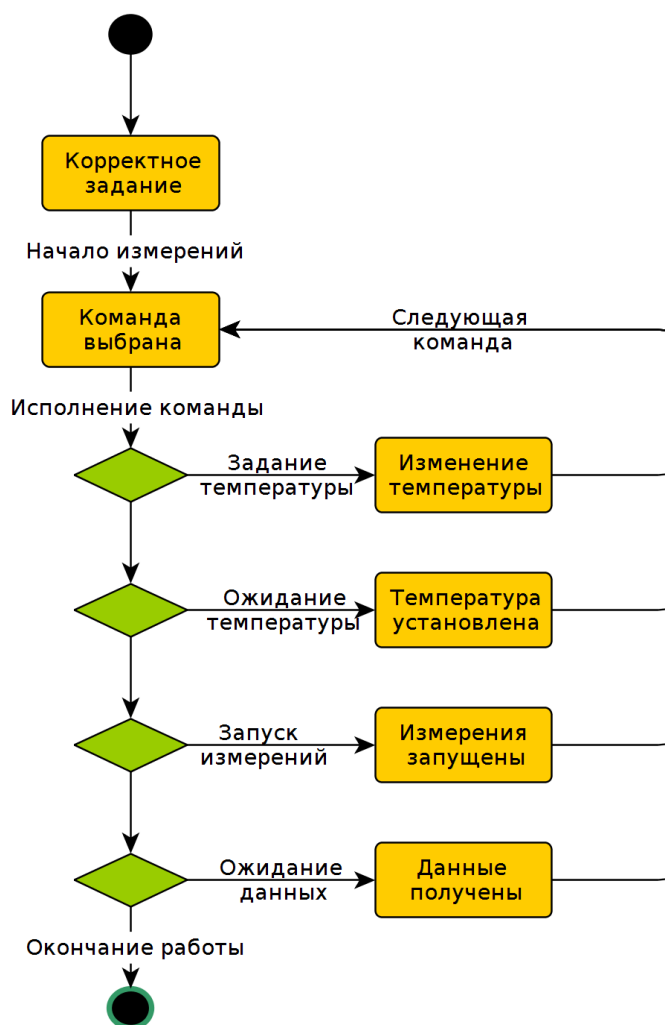


Рис. 16. – Конечный автомат для реализации АЯ

4.2 Сравнение алгоритмов работы прибора на ПОЯ и АЯ.

Первое, что бросается в глаза при сравнении ПОЯ и АЯ – это семантический разрыв в описании одно и того же алгоритма работы прибора:

- ПОЯ написан экспертом- методистом ПЦР лаборатории, то есть конечным пользователем прибора.
- АЯ написан инженером-разработчиком с точки зрения работы составных блоков анализатора.

Во-вторых, очевидно, что конечный автомат АЯ имеет более простую структуру, меньшее число состояний и переходов. К тому же в нем отсутствуют переходы с условиями, что упрощает алгоритм работы, повышает надежность работы алгоритма.

Главное отличие реализации АЯ в том, что команды управления аппаратурой можно чередовать в произвольном порядке и менять параметры (например, температуры) по любому правилу. Все эти изменения будут касаться только входного алфавита предложенного автомата, но не самого автомата.

Попытка изменить параметры в случае ПОЯ потребует изменения входного алфавита и, что самое существенное, реализации конечного автомата, что приведет к еще большему усложнению алгоритма работы КА-распознавателя ПОЯ, а, следовательно, и аппаратуры, если делать аппаратную реализацию данного КА.

Таким образом:

- ПОЯ: “простой” алфавит - “сложный” автомат.
- АЯ: “сложный” алфавит - “простой” автомат.

Предлагаемый подход позволяет совместить оба подхода, взяв простоту входного алфавита ПОЯ и простоту конечного автомата АЯ:

- ПОЯ - является естественным для конечного пользователя.
- АЯ - является естественным для аппаратуры.
- КА распознавателя ПОЯ – осуществляет преобразование одного заданного алфавита (ПОЯ) в другой (АЯ), так же заранее определенный.

Дополнительно учтем, что для корректном работы прибора алгоритм работы должен быть реализован, что называется, в «железе», то есть в микроконтроллере, что требует обязательно тестирования во всех необходимых режимах работы и не позволяет быстро добавлять новые схемы или комбинации. Подход на основе АЯ лишен этого недостатка, так как все схемы работы реализуются как входной алфавит конечного автомата, а функций перехода значительно меньше, чем вариантов схем анализов. Однако предлагаемый подход требует реализации КА-интерпретатора, позволяющего переходить от описания на ПОЯ к исполнению АЯ. Но эта задача не требует модернизации встроенного ПО прибора, а касается только ПО, разворачиваемого на компьютере.

В конечном итоге очень эффективной оказалась схема реализации алгоритма управления прибором (Рис. 17).

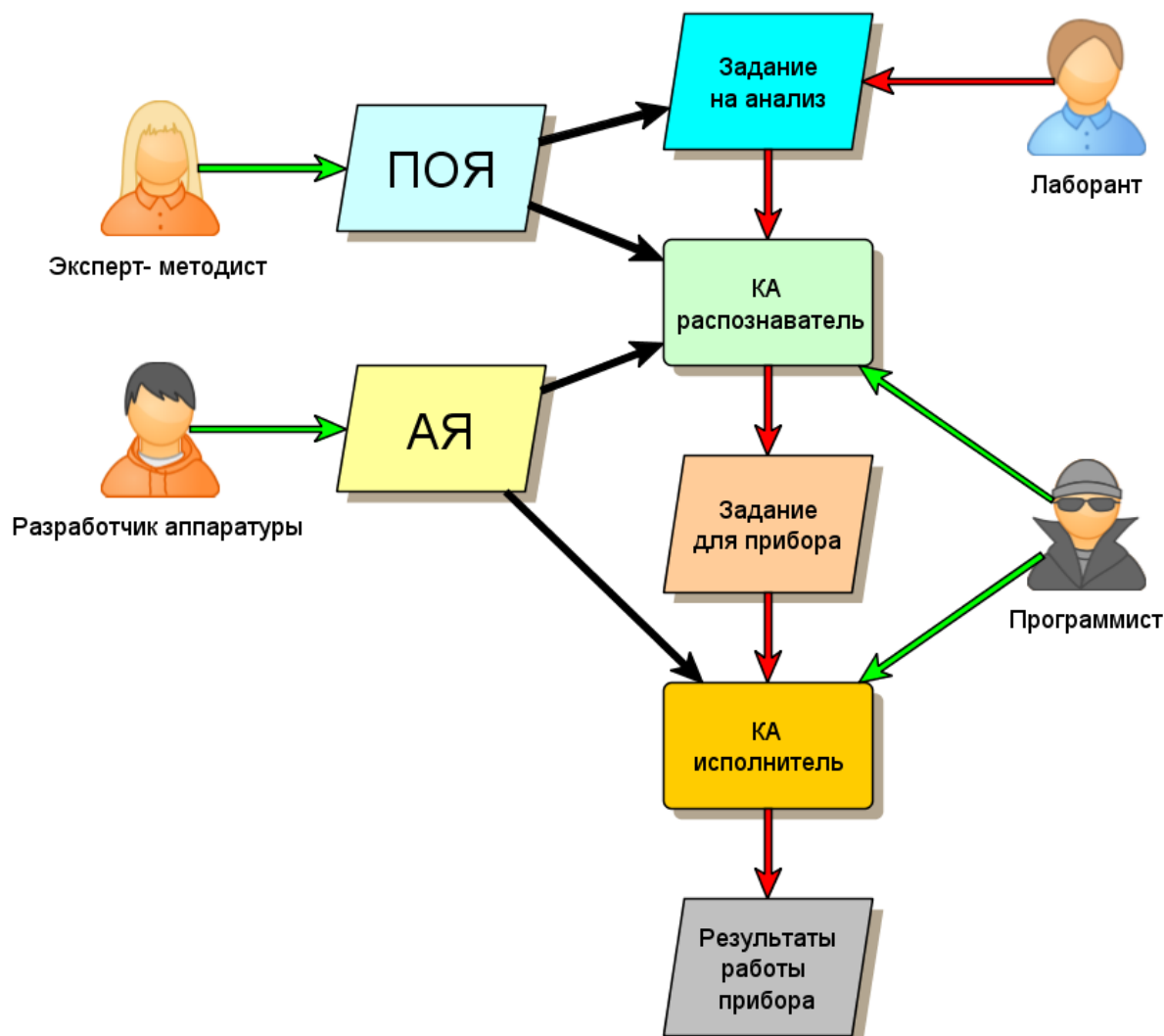


Рис. 17 – Структурная схема реализации алгоритма управления прибором

Эксперт-методист формирует входной алфавит ПОЯ.

Инженер-разработчик аппаратуры формирует входной алфавит для АЯ.

Программист реализует КА-распознаватель - транслятор ПОЯ -> АЯ.

Программист реализует КА-исполнитель для распознавания АЯ.

Лаборант, используя ПОЯ, формирует задание на анализ, которое с помощью КА-распознавателя преобразуется на основе АЯ в задание для прибора. КА-

исполнитель обрабатывает задание для прибора и формирует результаты работы прибора.

Наличие промежуточного автомата, связывающего ПОЯ и АЯ, позволяет проводить верификацию алгоритма на основе ПОЯ без запуска реальных измерений, что повышает надежность измерений.

Простой в реализации КА-исполнитель и входной алфавит на основе АЯ позволяют ускорить разработку ПО для АПК и упростить процедуру тестирования аппаратуры.

4.3 Выводы

В ходе работ был создан ПОЯ описания управления экспериментом и разработан АЯ управления аппаратной частью. В результате реализация алгоритма управления на основе предлагаемой схемы:

- 1) создан проблемно ориентированный язык управления экспериментом;
- 2) произведена оптимизации работы оборудования за счет сокращения числа функций управления;
- 3) повышена надежности работы АПК за счет исключения циклических процедур из алгоритма работы аппаратуры;
- 4) сокращено время разработки аппаратной части за счет упрощения алгоритмов работы, уменьшения числа функций;
- 5) сокращено время тестирования алгоритмов, за счет отсутствия длительных циклических встроенных процедур;
- 6) предоставлена возможность работы с моделью АПК;
- 7) разработана общая схема эксперимента, с разделением зон ответственности участников разработки АПК.

Реализация ПОЯ позволила проводить полностью автоматизированные генетические исследования, на примере внедренной в практику тест-системы «Амплитуб» для быстрой диагностики туберкулёза, в том числе с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ, ШЛУ-ТБ).

Полностью описываемая схема была реализована при разработке высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для

молекулярно-генетических исследований (АНК-96). Разработка программного обеспечения показала, что время разработки и отладки встроенного ПО анализатора было сокращено в три раза по сравнению с аналогичным временем при создании АНК-32. Был ощутимо сокращен набор тестов для проверки работоспособности различных схем проведения анализа.

5 Совершенствование алгоритмов вторичной обработки

Как было отмечено в п.1.6.1 для вторичной обработки используется базовый набор алгоритмов, реализованный у каждого производителя программного обеспечения для приборов ПЦР-РВ. Задача создания программного обеспечения для новых приборов приводит к необходимости критически проанализировать применяемые базовые алгоритмы, определить их состав и границы применимости и по результатам исследования, при необходимости, усовершенствовать для получения корректных результатов вторичной обработки.

Были проведены исследования возможностей известных алгоритмов вторичной обработки:

- уменьшения шумов, фильтрации, сглаживания кинетических кривых без потери информационной составляющей о ходе реакции;
- учета базовой линии, вклад в которую дают аппаратные особенности канала регистрации, фон и температурный дрейф;
- аппроксимации кинетической кривой модельными функциями;
- учета взаимного влияния каналов регистрации в случае многокомпонентного анализа.

Впервые для реализации автоматической вторичной разработки ставится задача классификации кинетических кривых для обнаружения наличия реакции и выбора наилучшего алгоритма определения параметров реакции.

5.1 Эффективность фильтрации сигналов ПЦР-РВ

Согласно сложившейся практике вторичной обработки [33] оценкой кинетической кривой является значение порогового цикла, следовательно, алгоритмы фильтрации, применяемые при обработке кривых, не должны вносить искажения в значение порогового цикла. С другой стороны формула (1) работает на экспоненциальном участке кривой, где велико влияние шумовой составляющей сигнала, поэтому для выбора алгоритма необходимо учитывать требования к уменьшению амплитуды шума.

Исходный модельный сигнал, приведенный на Рис. 18, был получен из реальных сигналов ПЦР-РВ анализатора нуклеиновых кислот АНК-32, который серийно выпускается ИАП РАН [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Для этого был вычислен усредненный нормированный сигнал ПЦР от 31 пробирки с одинаковыми реактивами; первому участку в течение 14 температурных циклов усредненного сигнала присвоены нулевые значения, а третьему участку от 30 до 50 циклов были присвоены значения 1000 относительных единиц (о.е.).

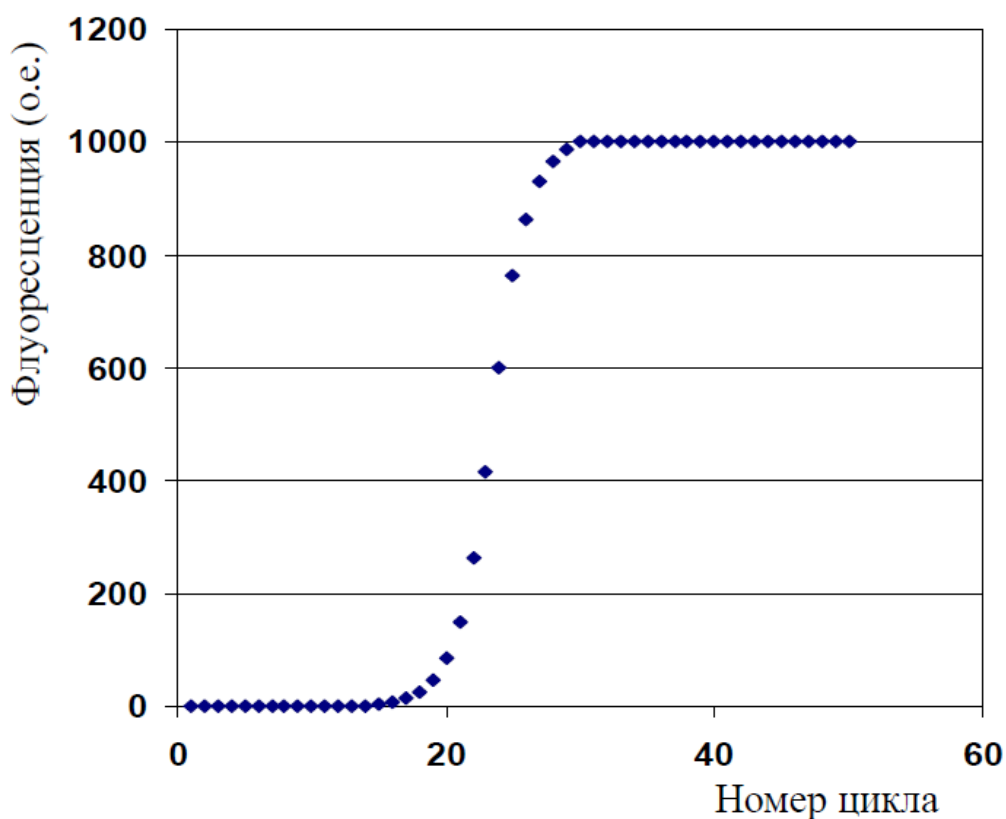


Рис. 18 - Исходный модельный сигнал ПЦР-РВ

Если обозначить значение модельного сигнала флуоресценции Y_n (n - номер цикла), то в качестве полезного аналитического сигнала ПЦР можно выбрать приращение интенсивности флуоресценции L_1 или L_5 за 1 или 5 циклов в середине графика, где наблюдается максимальная крутизна.

Максимальное приращение исходного модельного сигнала ПЦР за один цикл (цикл № 24) равно:

$$L_1 = Y_{24} - Y_{23} = 598 - 416 = 182 \text{ о.е.}$$

Приращение за пять циклов (циклы № 22-26) равно:

$$L_5 = Y_{26} - Y_{21} = 864 - 150 = 714 \text{ о.е.}$$

В большинстве случаев в результате фильтрации приращение сигнала флуоресценции L_{1f} или L_{5f} уменьшается.

Исходные шумовые сигналы моделировались 10 последовательностями 50 случайных чисел, имеющих дискретное значение при каждом температурном цикле (Рис. 19).

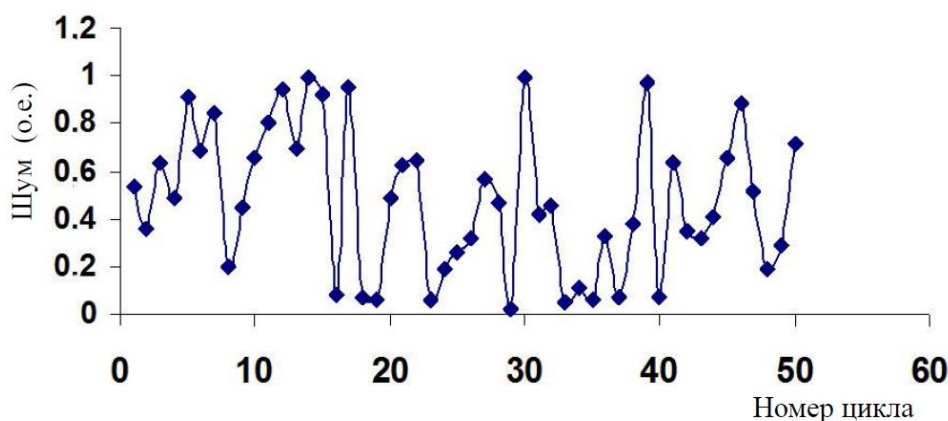


Рис. 19 - Один из исходных модельных шумовых сигналов. По горизонтальной оси – номер цикла n , по вертикальной оси – величина шума в относительных единицах. Для наглядности дискретные значения шумового сигнала условно соединены линиями

Интенсивности исходных шумовых сигналов определялись путем вычисления стандартного отклонения S . При максимальной амплитуде однополярного шума, равной одной относительной единице, стандартное отклонение $S = 0,31$ о.е., а после фильтрации величина $S_f \leq S$.

5.1.1 Оценка эффективности фильтрации

С целью определения улучшения отношения сигнала к шуму K (эффективность фильтрации) предложены следующие предварительные показатели:

- относительное уменьшение полезного сигнала ПЦР $L_o = L_f / L$
- относительное изменение интенсивности шума $S_o = S_f / S$.

Применение относительных величин позволяет исключить влияние масштабов исходных величин.

В результате эффективность фильтрации K (о.е.) можно выразить следующим образом:

$$K = L / S. \quad (30)$$

Желательно, чтобы в результате фильтрации величина L_0 незначительно отличалась от 1, а величина S_0 была минимальной.

С целью сравнения эффективности были использованы следующие фильтры:

- скользящее среднее значение (прямоугольное окно) по 3 пороговым циклам (далее - С3);
- последовательное применение этого фильтра 2 и 3 раза (2С3 и 3С3);
- скользящее среднее значение по 5 пороговым циклам (С5);
- фильтр Савицкого–Голея (СГ) ;
- спектральный фильтр (СП);
- медиана по 3 и 5 точкам (М3 и М5).

Результаты фильтрации интенсивности сигнала Y_n для цикла с номером n таких фильтров может быть выражены в следующем виде:

$$Y_{C3n} = (Y_{n-1} + Y_n + Y_{n+1})/3.$$

$$Y_{2C3n} = (Y_{n-2} + 2Y_{n-1} + 3Y_n + 2Y_{n+1} + Y_{n+2})/9.$$

$$Y_{3C3n} = (Y_{n-3} + 3Y_{n-2} + 6Y_{n-1} + 7Y_n + 6Y_{n+1} + 3Y_{n+2} + Y_{n+3})/27.$$

$$Y_{C5n} = (Y_{n-2} + Y_{n-1} + Y_n + Y_{n+1} + Y_{n+2})/5.$$

$$Y_{CGn} = (-2Y_{n-3} + 3Y_{n-2} + 6Y_{n-1} + 7Y_n + 6Y_{n+1} + 3Y_{n+2} - 2Y_{n+3})/21.$$

Фильтр СГ называют также фильтром полиномиального цифрового сглаживания на основе метода наименьших квадратов [53]. Фильтр СГ был реализован по формулам Y_{CG5} , Y_{CG7} .

Спектральный фильтр был реализован следующим способом. После Фурье-преобразования действительная и мнимая части спектра умножались на спадающую экспоненциальную функцию $\text{EXP}(-0,1*(n-1))$, где n – порядковый номер спектральной точки, например, при $n = 2$ значение $\text{EXP}(-0,1) = 0,9048$ соответствует ослаблению величины сигнала второй точки по сравнению с величиной сигнала первой точки спектра. В качестве фильтрованного сигнала ПЦР использовалась реальная часть обратного Фурье-преобразования.

Медиана выделяет число, которое является серединой упорядоченного множества значений нечетного числа членов.

Результаты применения фильтрации к модельным сигналам ПЦР и шума приведены в табл. 4.

Табл. 4. Сравнение эффективности фильтров K (о.е.)

Фильтр	L_{01}	L_{05}	S_0	K_1	K_5
СЗ	0,92	0,96	0,52	1,77	1,85
2СЗ	0,85	0,92	0,43	1,98	2,14
3СЗ	0,80	0,89	0,38	2,11	2,34
С5	0,79	0,88	0,40	1,98	2,20
СГ	0,93	0,99	0,57	1,63	1,74
СП	0,8	0,86	0,44	1,82	1,95
МЗ	1	1	0,71	1,41	1,41
М5	1	1	0,62	1,61	1,61

Видно, что медиана совершенно не изменяет приращение интенсивности флуоресценции ($L_0 = 1$). Это свойство медианы означает, что шумы фильтруются только на части сигнала вне этого участка. Лучшие результаты (значения K больше 2) получены при использовании 3-х кратной фильтрации прямоугольным окном по 3 точкам. Можно предположить, что величина K_1 будет иметь существенное значение при последующей аппроксимации графика по 2 точкам, а K_5 – при аппроксимации графика по многим точкам.

При анализе искажения формы кривой на экспоненциальном участке получаем, что наибольшее значение смещения порогового цикла наблюдается при фильтрации прямоугольным окном, а наименьшее у медианного и фильтра СГ.

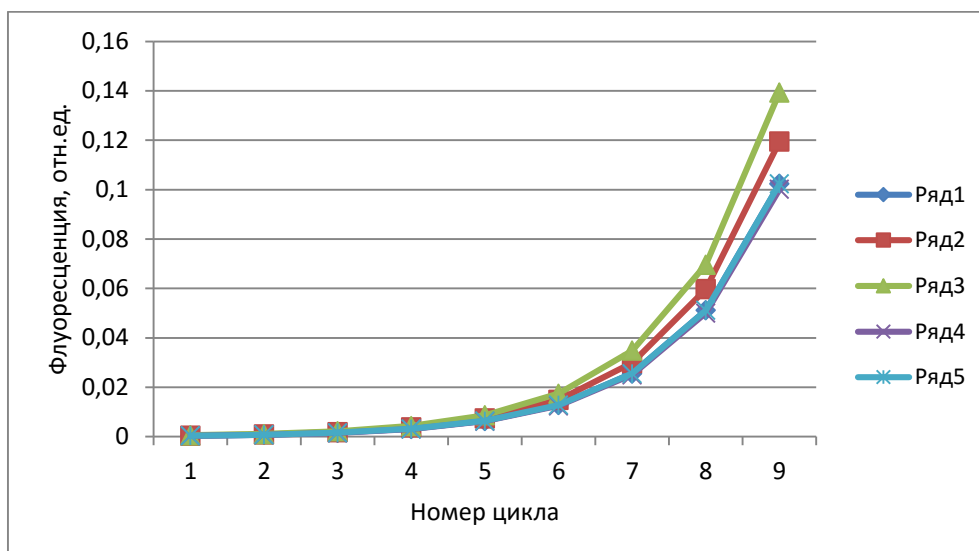


Рис. 20 - Результаты работы фильтров, ряд1 – исходная кривая, ряд два СЗ, ряд 3 – 2СЗ, ряд 4 –СГ, ряд5 –МЗ.

Таким образом оптимальным с точки зрения минимума искажений и максимума отношения сигнал/шум является выбор в пользу фильтра СГ с параметрами окна 5 точек.

5.1.2 Погрешности расчета порогового цикла без фильтрации

Для оценки влияния шума на погрешности измерения пороговых циклов исходный модельный сигнал, содержащий одно числовое значение при каждом температурном цикле, суммировался со случайными числами. При амплитуде исходного модельного сигнала 1000 относительных единиц (о.е.) выбирались следующие максимальные величины однополярных случайных чисел: 25, 50 и 100 о.е. В результате получались 3 блока суммарных модельных сигналов с разными величинами случайных чисел. Каждый из 10 сигналов в одном блоке отличается друг от друга последовательностями случайных чисел. Три блока суммарных модельных сигналов и исходный модельный сигнал вводились в программу анализатора АНК-32 в качестве имитации сигналов от пробирок.

В программе анализатора была выполнена нормировка: привязка к нулю среднего значения сигналов от 1 до 14 циклов и привязка к 1000 среднего значения сигналов от 30 до 50 циклов. При нормировке на начальном участке шумовые сигналы становятся симметричными относительно нуля. При этом максимальные амплитуды шума для трех наборов сигналов соответствует 12,5; 25 и 50 о.е. На рис.

21 приведены одновременно графики всех суммарных модельных сигналов и линия на уровне 500 о.е.

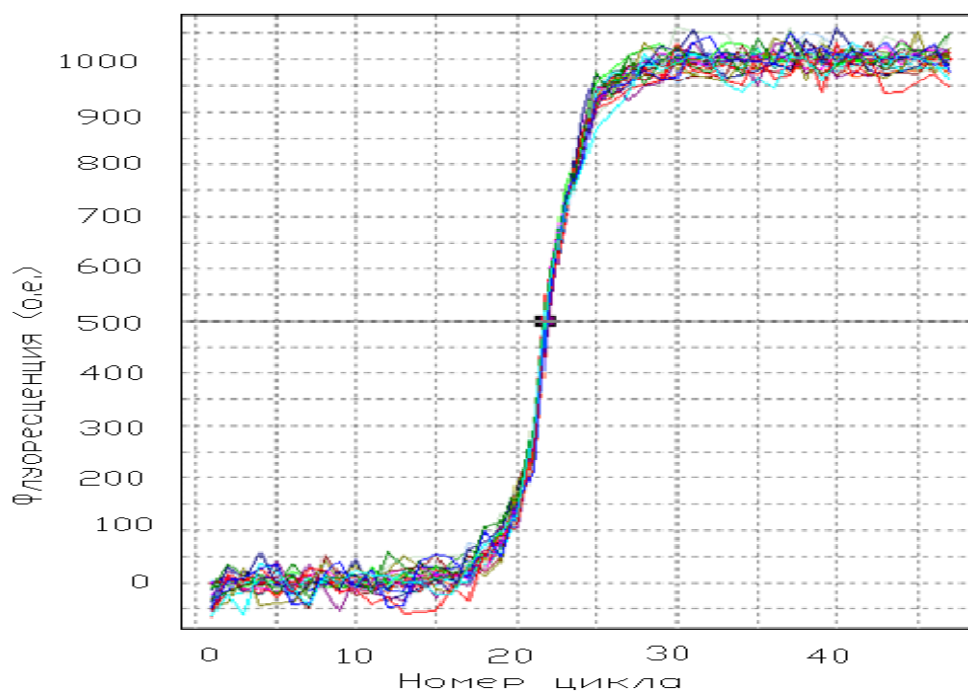


Рис. 21 - Графики сигналов ПЦР с разными уровнями шума

Анализаторы АНК позволяют рассчитать пороговые циклы методом порога, используя разные способы аппроксимации: способ кусочно-линейной аппроксимации по двум точкам (в дальнейшем - АДТ), способ аппроксимации по всем точкам графика (АВТ), а также способ аппроксимации на базе S-образной функции (АСФ) [34]: .

Для сравнения этих методов выполнена оценка погрешности измерения путем расчета значений стандартного отклонения S пороговых циклов 3 блоков, содержащих по 10 суммарных модельных сигналов.

Результаты расчета погрешностей пороговых циклов приведены в табл. 5. Погрешности пороговых циклов в табл. 5 и следующей таблице вычислены как отношение к одному циклу, например, $S = 0,029$ соответствует погрешности 2,9 % от 1 цикла.

Табл. 5. Значения стандартного отклонения S при различных способах расчета пороговых циклов в зависимости от уровня шума при пороге 500 о.е.

Амплитуда шума о.е.	Способы расчета пороговых циклов		
	S при АДТ	S при АВТ	S при АСФ
12,5	0,029	0,022	0,021
25	0,056	0,047	0,047
50	0,117	0,095	0,099

Видно, что величины стандартного отклонения при различных способах расчета пороговых циклов имеют близкие значения и приблизительно линейно зависят от уровня шума.

5.1.3 Влияние фильтрации на погрешности расчета пороговых циклов

Для достижения минимальной погрешности пороговых циклов необходимо оптимизировать выбор трех уровней на графиках сигналов ПЦР: уровни привязки к нулю и к максимальному значению, а также уровень порога.

Для определения уровней привязки к нулю и к максимальному значению можно рекомендовать участки, на которых даже после фильтрации не заметно изменение сигнала флуоресценции. Необходимо также исключать несколько точек в начале и конце графика, которые не могут быть правильно отфильтрованы (некоторые фильтры усредняют значения по 7 температурным циклам). Уровни привязки вычисляются как средняя величина сигналов на выбранном участке, т.о. добавляется еще одно звено фильтрации шумов. Рекомендации для выбора оптимального уровня порога (500 о.е.) приведены ниже.

С целью сравнения эффективности фильтров при разных методах расчета были использованы 10 модельных сигналов при уровне шума 50 о.е. При расчете значений S пороговых циклов для привязки к нулю выбран участок от 5 до 10 циклов, для привязки к 1000 – участок от 35 до 40 циклов. Уровень порога выбран 500 о.е. Результаты расчета приведены в табл. 6.

Табл. 6. Величины стандартного отклонения S и отклонения среднего значения D при различных способах фильтрации и способах расчета пороговых циклов

Фильтры	Показатель	АДТ	АВТ	АСФ
Нет	S	0,123	0,094	0,080
	D	0,036	0,017	0,019
ЗСЗ	S	0,092	0,083	0,079
	D	0,002	-0,014	0,012
СГ	S	0,102	0,093	0,084
	D	0,001	0,015	0,008

Видно, что наибольшая величина S наблюдается при способе АДТ без фильтрации, а наименьшая величина - при АСФ с фильтром ЗСЗ. Фильтр ЗСЗ уменьшает величину S при АДТ на 25 %, а при АСФ – только на 1 %.

В этой таблице приведен еще один критерий для сравнения влияния фильтров - отклонение среднего значения D вычисленных пороговых циклов с использованием фильтров от порогового цикла исходного сигнала, как отношение к 1 циклу. Можно отметить, что величина D значительно меньше S и поэтому не вносит заметного вклада в погрешности измерения.

В табл. 6 приведены значения S при пороге 500 о.е., однако при изменении уровня порога величины стандартного отклонения изменяются (рис. 22).

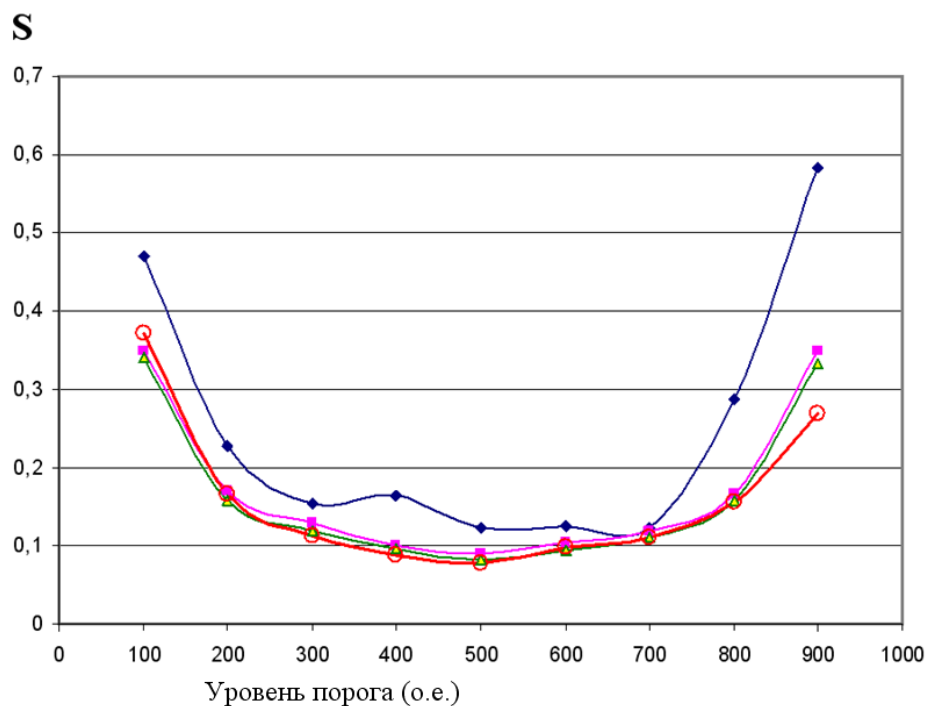


Рис. 22 - Зависимости S от уровня порога.

Ряд 1 - АДТ без фильтра, ряд 2 - АДТ с фильтром ЗСЗ, ряд 3 - АВТ с фильтром ЗСЗ, ряд 4 - АСФ с фильтром ЗСЗ.

На графике 1 ряда (Рис. 22 - АДТ без фильтра) величины S сильно зависят от уровня порога. При использовании фильтрации сигналов ПЦР зависимости величин S от уровня порога для разных способов аппроксимации практически совпадают, при этом минимальные величины S наблюдаются при пороге 500 о.е. Этот уровень порога можно считать оптимальным.

5.1.4 Выводы

С помощью предложенных модельных сигналов установлено, что при увеличении уровня шума происходит приблизительно линейное увеличение значения стандартного отклонения пороговых циклов.

На основе предложенных критериев выполнено сравнение эффективности нескольких типов фильтров сигналов ПЦР-РВ. Лучшие результаты получены при использовании 3-кратной фильтрации с помощью скользящего среднего значения по 3 пороговым циклам.

Исследовано влияние фильтрации на погрешности расчета пороговых циклов. Даны рекомендации по выбору участков для нормировки сигналов. Показано, что

разные способы аппроксимации могут быть дополнены предварительной фильтрацией сигналов ПЦР, при этом способ аппроксимации по двум точкам по величине стандартного отклонения приближается к двум другим более сложным способам аппроксимации.

Исследована зависимость погрешности расчета пороговых циклов от уровня порога. В результате при расчетах может быть рекомендован уровень порога 500 о.е., при котором получаются минимальные погрешности измерения.

Полученные результаты позволяют пользователю выбрать объем реактивов в пробирках при количественных анализах ПЦР на основе критериев: допустимого уровня шума и допустимой погрешности измерения. Например, в соответствии с табл. 6 при максимальной амплитуде шума 12.5 о.е. и сигнале 1000 о.е. стандартное отклонение S имеет приблизительно величину 0.02 или 2 % порогового цикла. Примерно такие результаты получаются при реальных анализах ПЦР с объемом реактивов 23 мкл и объемом пробы 2 мкл.

5.2 Классификация кинетических кривых

Для автоматического анализа данных важным является классификация кинетических кривых, результатом которой бывают классификация кривых по признакам наличия/отсутствия реакции, первичной оценки фонового сигнала, амплитуды шумов, первичной оценки кривой.

Для этого очень хорошо подходит анализ первой производной кинетической кривой (Рис. 23). Для расчета первой производной кинетической кривой было выбрано полиномиальное дифференцирование по Савицкому—Голею [53], что позволило совместить процедуру сглаживания и дифференцирования в одном модуле.

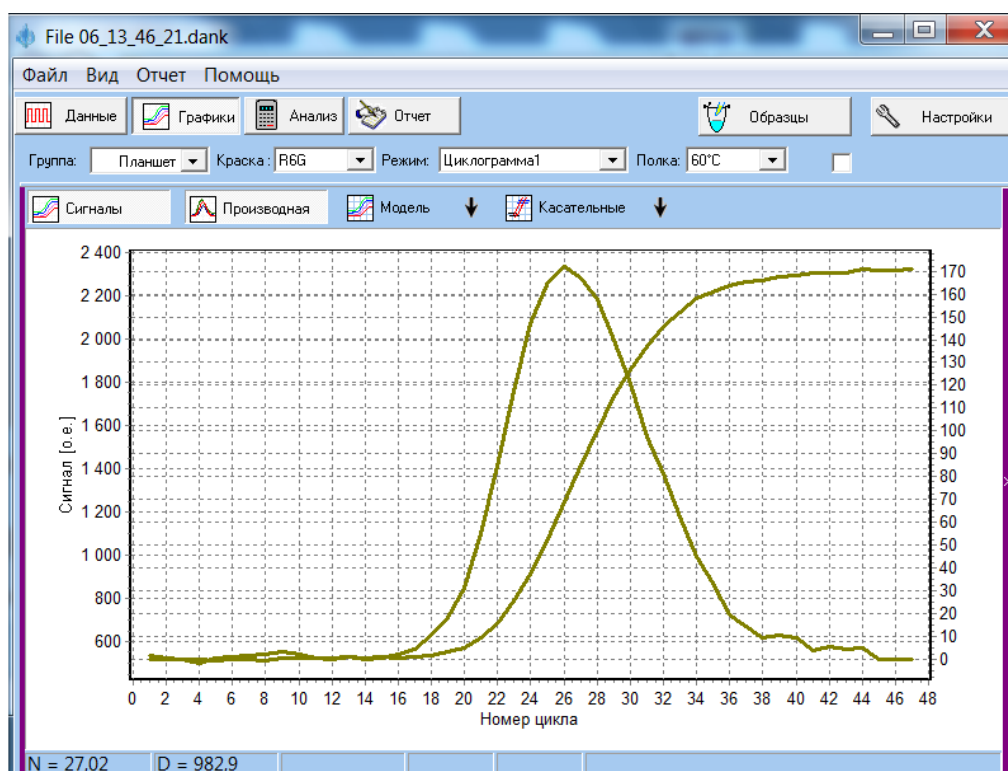


Рис. 23 - График кинетической кривой и ее производная

Наличие максимума производной соответствует признаку наличия ПЦР реакции.

Координата максимума позволяет более точно определить характерные участки кинетической кривой: базовая линия, участок экспоненциального роста, точка перегиба, участок насыщения (плато). Если координата максимуму находится на правой границе кривой, то это означает, что кривая является усеченной и к ней не применимы некоторые алгоритмы обработки.

Координату максимума, в первом приближении, можно считать количественной оценкой кривой по смыслу равной значению порогового цикла.

Введено количественное определение признака наличия реакции как отношение максимума производной к стандартному отклонению амплитуды шумов производной, рассчитанных на 5 - 10 циклах. При значениях отношения больше 5 устойчиво классифицировались кинетические кривые. Отличие значения от 3 (правило 3σ для нормально распределённой случайной величины) обусловлено возрастанием амплитуды шумов при дифференцировании.

На основе анализа формы кривой введен признак аномальности кривой равный отношению полуширин пика максимума производной. При значениях отношения

более 1.5 кривая является аномальной из-за наличия явно выраженной асимметрии кривой или дрейфа в районе плато. Признак аномальности важен для выбора модельной функции при аппроксимации и последующих оценок.

5.3 Исследование особенностей количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Первым шагом при обработке сигналов флуоресценции при проведении анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) является определение пороговых циклов C_t , при которых сигналы флуоресценции образцов достигают постоянного уровня, выбранного оператором. Высокая воспроизводимость определения пороговых циклов (среднеквадратичное отклонение менее чем 0,2 циклов) [54] позволяет сравнивать концентрации исследуемых образцов [55]. При этом используется основное свойство ПЦР: рост сигналов на начальной стадии реакции происходит по экспоненциальному закону.

При малых объемах реактивов, которые экономически выгодны при выполнении массовых анализов, возникает необходимость изучения влияния шумов и дрейфа нулевой линии детектора на погрешности количественных измерений. В статье [21] было выполнено сравнение разных способов определения C_t .

5.3.1 Получение исходных данных для расчета порогового цикла

Результаты ПЦР исследуемых образцов НК получены на анализаторах нуклеиновых кислот АНК-32 и АНК-64, которые разработаны и серийно изготавливаются в ИАП РАН. Образцы НК приготовлены с использованием реактивов производства ЗАО «Синтол», Москва.

В качестве стандарта использовалась плаزمид рUC-18 со вставкой фрагмента ДНК человека гена Fc фрагмента IgG. ПЦР в реальном времени проводилась в пробирках 0,2 мл, содержащих 23 мкл реакционной смеси и 2 мкл выделенной ДНК, растворенной в TE буфере. Условия проведения ПЦР в реальном времени: 95 °C на 300 секунд, затем 50 циклов денатурации при 95 °C 25 секунд и отжига при 60 °C 20 секунд.

В качестве примера на рисунке 24 приведены графики зависимости флуоресценции от номера температурного цикла от 31 исследуемого образца НК с условным номером «100604» после выполнения операций сглаживания, привязки к нулю и к максимуму на уровне 1000 относительных единиц (о.е.).

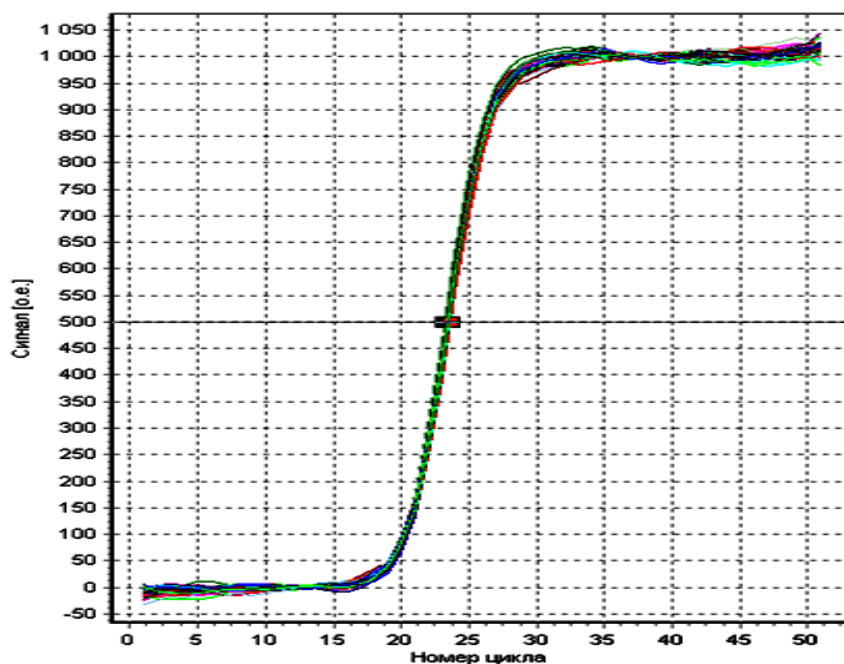


Рис. 24 - Графики зависимости флуоресценции от номера температурного цикла. Значения порогового цикла C_t при пороге 500 о.е. приблизительно равны 23,5.

5.3.2 Погрешности расчета порогового цикла

Программное обеспечение анализаторов АНК позволяет рассчитать пороговые циклы методом порога, методом с использованием точки перегиба, методом на базе S-образной функции и методом аппроксимации по всем точкам графика.

Сравнение погрешностей пороговых циклов, рассчитанных разными методами, выполнено при анализе результатов ПЦР двух серий образцов с условными номерами «100604» и «141514» (количество образцов 31 и 32 шт.). Исходные данные получены соответственно на анализаторах АНК-32 и АНК-64, при нижней температуре цикла 60 °С и верхней температуре цикла 95 °С.

Оценка погрешности измерения выполнялась путем расчета значений стандартного отклонения S пороговых циклов. Стандартное отклонения S связано с более известным среднеквадратическим отклонением σ и вычисляется по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{n}{n-1}\sigma^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

где x_i — значение порогового цикла в i -й пробирке; \bar{x} — среднее арифметическое значение пороговых циклов; n — общее количество пробирок. Известно, что вероятность попадания случайной величины в диапазон $\pm\sigma$ равна 68,2 %. При большом количестве пробирок стандартное и среднеквадратическое отклонение практически совпадают. (ru.wikipedia.org)

В таблице 7 приведены погрешности пороговых циклов S образцов, вычисленных разными методами.

Табл. 7 - Погрешности пороговых циклов S образцов

№ образца и температура наблюдения	Метод порога 50 о.е.	Метод порога 500 о.е.	S-образная функция	Точка перегиба а 500 о.е.	Перегиб из мод канон	Аппроксимация по всем точкам	Касательная
100604 60 °С	0,139	0,080	0,079	0,076	0,130	0,093	0,257
100604 95 °С	0,321	0,066	0,065	0,092	0,217	0,120	0,237
141514 60 °С	0,432	0,088	0,063	0,096	0,355	0,108	0,171
141514 95 °С	0,282	0,067	0,064	0,087	0,346	0,095	0,153

Погрешности пороговых циклов в таблице 7 и последующих таблицах вычислены как отношение к одному циклу, например, $S = 0,08$ соответствует 8 % от 1 цикла.

Если принять максимально возможную эффективность $E = 2$ (изменение концентрации фрагментов ДНК за 1 цикл), то при погрешности цикла $S = 0,08$ можно определить погрешность вычисления концентрации ДНК следующим способом:

$$\Delta = 2^{0,08} - 2^0 = 0,057 \text{ или } 5,7 \%$$

Сравнивая полученные данные, можно сделать вывод, что погрешность пороговых циклов, вычисленных методом на базе S-образной функции, а также методами порога и точки перегиба на уровне 500 о.е., имеют наименьшие значения. Метод аппроксимации по всем точкам и метод порога на уровне 50 о.е. имеют большие погрешности. Такие результаты можно объяснить влиянием шумов и нестабильности нулевой линии при измерении флуоресценции от каждой пробирки (влияние шумов минимально вблизи точки перегиба, где график имеет максимальный наклон).

На рис. 25 показаны значения пороговых циклов образцов «141514», вычисленных разными методами. Для наглядности точки графиков соединены линиями. У некоторых пробирок изменения пороговых циклов частично совпадают, поэтому такие изменения можно отнести за счет разброса свойств реакционной смеси в разных пробирках и неравномерности теплового поля термостата анализатора (разная эффективность E).

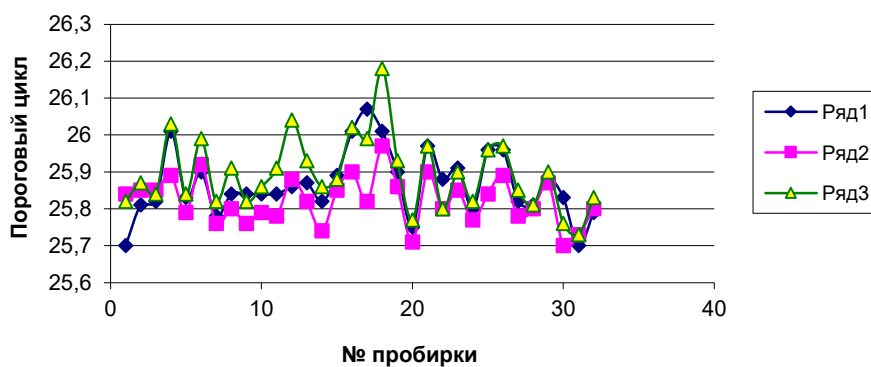


Рис. 25 - Значения пороговых циклов образцов.

Ряд 1 - метод порога на уровне 500, ряд 2 - метод на базе S-образной функции, ряд 3 - метод точки перегиба на уровне 500.

Влияние случайных величин на результаты вычислений несколько уменьшается, если усреднить исходные данные пороговых циклов каждой пробирки (полусумма), полученные при нижней температуре цикла 60 °С и при верхней температуре цикла 95 °С.

Табл. 8

№ образца и температура наблюдения	Метод порога 500 о.е.	S-образная функция	Точка перегиба а 500 о.е.	Метод порога 500 о.е. (полусумма)	S-образная функция (полусумма)	Точка перегиба 500 о.е. (полусумма)
100604 60 °С	0,080	0,079	0,076	0,066	0,066	0,074
100604 95 °С	0,066	0,065	0,092			
141514 60 °С	0,088	0,063	0,096	0,057	0,047	0,085
141514 95 °С	0,067	0,064	0,087			

Если предположить, что разброс пороговых циклов вызван случайными причинами, то можно предложить исключать из расчета стандартного отклонения самые крайние значения (максимальные и минимальные), считая их случайными выбросами. При этом стандартное отклонение уменьшается примерно на 10 % (для образца «141514» и температуре наблюдения 60 °С при методе порога 500 о.е. $S = 0,077$, при S-образной функции $S = 0,055$).

5.3.3 Выводы

Приведены условия проведения ПЦР в реальном времени на анализаторах АНК-32 и АНК-64 и выполнено экспериментальное сравнение погрешностей методов расчета пороговых циклов путем вычисления стандартного отклонения. Показано, что погрешности расчета пороговых циклов, вычисленных методом на базе S-образной функции, а также методами порога и точки перегиба на уровне 500 о.е., имеют наименьшие значения.

Предложена методика оценки разброса свойств реакционной смеси в разных пробирках с помощью коэффициента корреляции и вычисления совпадающих и отличающихся вкладов в погрешности разных методов расчета пороговых циклов.

Показана возможность уменьшения погрешности за счет усреднения пороговых циклов каждой пробирки, полученных при нижней температуре цикла 60 °С и при верхней температуре цикла 95 °С, исключения случайных выбросов, а также объединения результатов разных методов расчета.

Результаты приведенных экспериментов и расчетов подтверждают высокие технические характеристики анализаторов АНК-32 и АНК-64 и их программного обеспечения.

5.4 Выбор модельной функции при аппроксимации кинетических кривых ПЦР-РВ

На этапе исследования поиск параметров модельных функций (МФ) осуществлялся с помощью электронной таблицы Excel. Был использован инструмент поиска решения Microsoft Excel, который использует алгоритм нелинейной оптимизации Generalized Reduced Gradient (GRG2), разработанный Леоном Ласдоном (Leon Lasdon, University of Texas at Austin) и Аланом Уореном (Allan Waren, Cleveland State University).

Для тестирования были выбраны функции:

МФС S-образной функции (Сигмоидная)

$$Y = 1 / (1 + \exp((C_0 - C) / k)), \quad (31)$$

где Y – сигнал флуоресценции, C – номер цикла, C₀, k — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением 31.

МФЭ Модельная функция эффективности

$$y_{i+1} = E_{c_i} * y_i$$

$$E_{c_{i+1}} = E_{c_0} - y_i * (E_{c_i} - 1) / ((y_i - 1) * (E_{c_i} - 1) * b + 1), \quad (32)$$

где E_{c_i} – значение эффективности реакции на i –цикле, y_i– значение сигнала флуоресценции на i –цикле, b – коэффициент определяемый из аппроксимации кинетической кривой уравнением 32.

МФК Модельная функция с учетом процессов на основе уравнения диффузии

$$\begin{aligned} c_i &= \ln(1 + y_i * Re / p_i) * p_i / Re \\ y_{i+1} &= y_i + c_i & p_{i+1} &= p_i - c_i, \end{aligned} \quad (33)$$

где y_i– значение сигнала флуоресценции на i –цикле, c_i– концентрация продукта, выработанного на i –цикле, p_i– концентрация трифосфатов на i –цикле, Re – коэффициент диффузии определяемый из аппроксимации кинетической кривой уравнением 33.

МФБ Логистическая кривая на основе степенной функции

$$Y = 1 / (1 + (y_0 - 1)E^{c \cdot n}), \quad (34)$$

где Y – сигнал флуоресценции, n – номер цикла, y_0 , E^c — коэффициенты, определяемые из аппроксимации кинетической кривой уравнением 34.

Все модельные функции тестировались на одном входном наборе данных ПЦР-РВ (рис. 26). Фон учитывался в качестве параметра аппроксимации в виде константы. Для критерия качества аппроксимации были построены разностные кривые исходных данных и модельной функции.

Для аппроксимации реальных данных y каждой модельной функции были добавлены два параметра Amp – амплитуда флуоресценции и BG нулевая линия.

Оптимизация параметров каждой модели выполняется путем использования инструмента **Поиск решения** из меню **Сервис**. Для этого необходимо выполнить следующие действия: **Установить целевую ячейку C10, Равной минимальному значению**, и **Выполнить, Изменяя ячейки C4:C9**. В результате в ячейках C11:C60 получают числовые значения зависимости оптимизированной модели от номера цикла, а в ячейках C4:C9 – новые параметры **МФ**. Модель получается оптимизированной по методу наименьших квадратов ошибок.

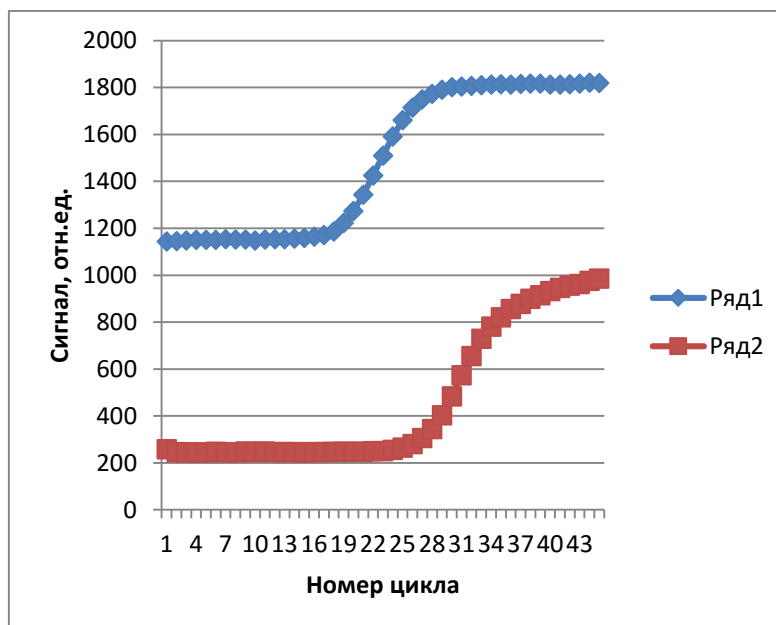


Рис. 26 - Реальные кинетические кривые ПЦР-РВ для тестирования модельных функций. Где Ряд 1 – нормальная кривая; Ряд 2 – аномальная кинетическая кривая.

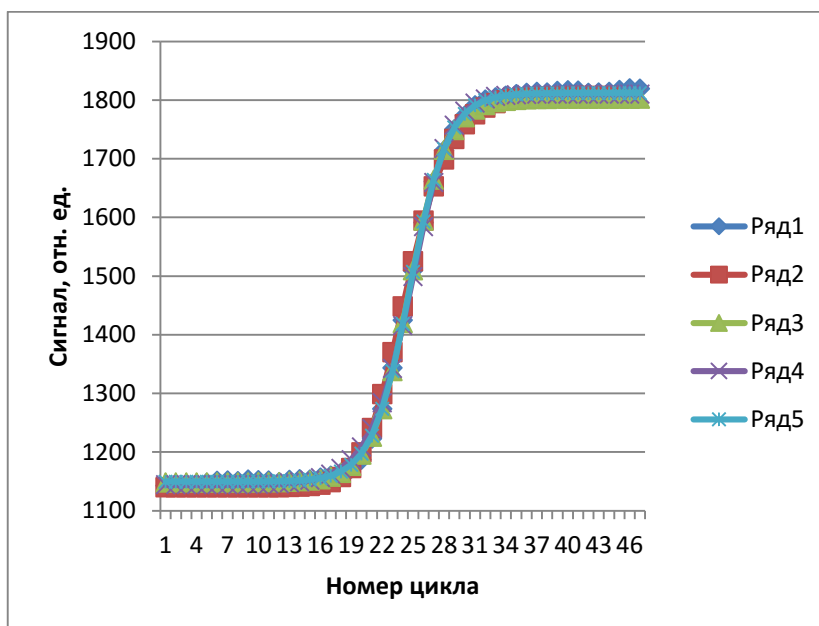


Рис. 27 Аппроксимация нормальной кинетической кривой. Где Ряд 1 – кинетическая кривая; Ряд 2 – МФК; Ряд 3 – МФС; Ряд 4 – МФЭ; Ряд 5 – МФБ

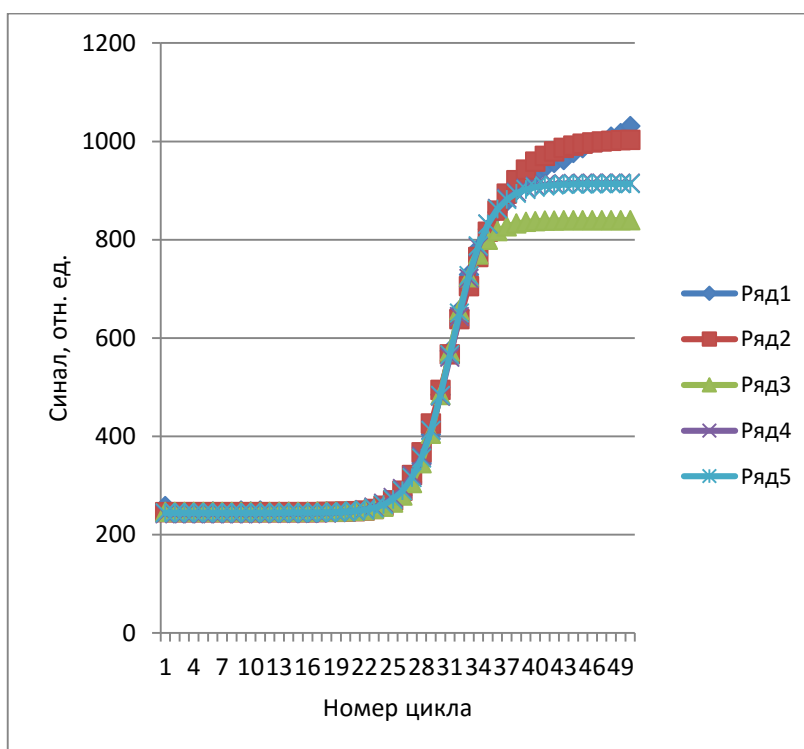


Рис. 28. Аппроксимация аномальной кинетической кривой. Где Ряд 1 – кинетическая кривая; Ряд 2 – МФК; Ряд 3 – МФС; Ряд 4 – МФЭ; Ряд 5 – МФБ

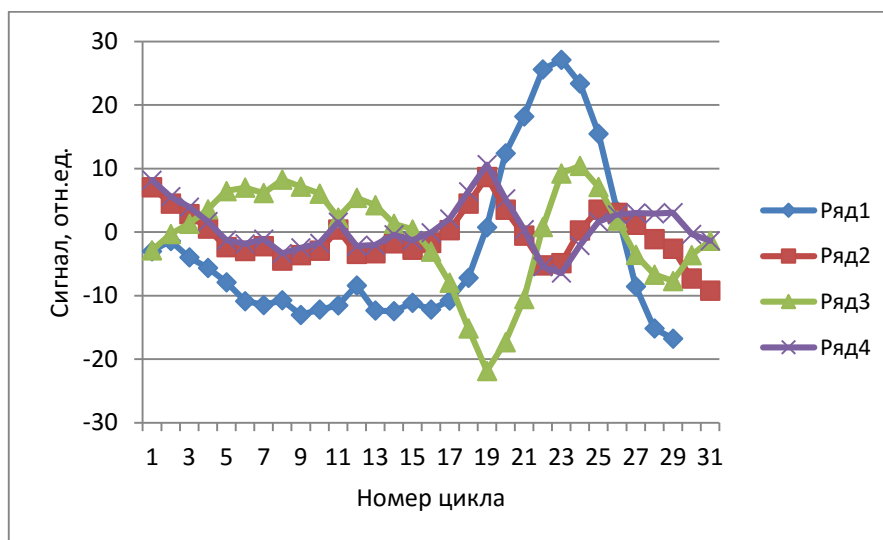


Рис. 29. Разностные кривые МФ – ПЦР для нормальной кривой. Где Ряд 1 – МФК; Ряд 2 – МФС; Ряд 3 – МФЭ; Ряд 4 – МФБ

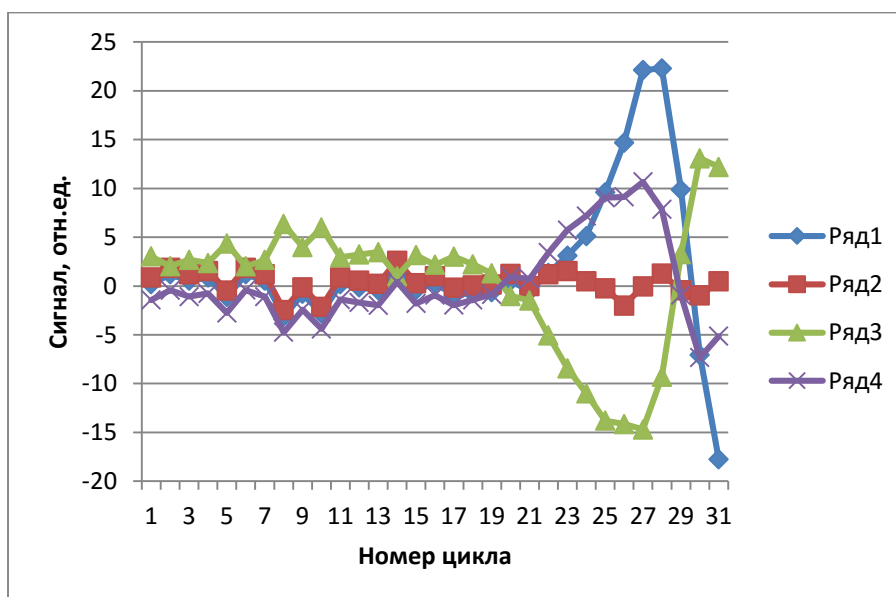


Рис. 30 Разностные кривые МФ – ПЦР для аномальной кривой. Где Ряд 1 – МФК; Ряд 2 – МФС; Ряд 3 – МФЭ; Ряд 4 – МФБ

Табл. 9. Коэффициент детерминации аппроксимации модельными функциями на 1 - 31 циклах

Тип кривой	МФК	МФС	МФЭ	МФБ
Нормальная	0,99415	0,99985	0,99534	0,99808
Аномальная	0,99682	0,99972	0,99891	0,99974

В табл. 9 представлены значения коэффициента детерминации для различных модельных функций, рассчитанные на 1 -31 циклах.

5.4.1 Сравнение модельных функций

Реальные данные ПЦР ни одна из моделей не аппроксимирует без ошибок в районе насыщения (плато).

МФС и МФБ одинаково хорошо аппроксимируют кинетические кривые до точки перегиба, показав при этом лучшие результаты с наименьшими значениями коэффициента детерминации.

Аномальные кривые хорошо аппроксимирует только МФК.

Все модельные функции являются исключительно нелинейными, что требует применения специальных алгоритмов оптимизации. Для практической реализации был выбран алгоритм Левенберга — Марквардта решения задачи о наименьших квадратах.

$$F = \sum (M\Phi(a, n) - Y_n)^2, \quad (35)$$

где a — вектор параметров функции, n номер цикла (точки кривой), Y_n — значение флуоресценции в точке n .

5.4.2 Усовершенствованная S-образная функция

Кинетическая модель сигналов ПЦР-РВ на базе усовершенствованной S-образной функции (МФС) класса сигмоид может быть выражена в следующем виде:

$$F = F_m / (1 + \exp((C_0 - C) / k)) + f_0 + f_1 * C + f_2 * C^2, \quad (36)$$

где F — интенсивность флуоресценции реакции при порядковом номере цикла амплификации C , F_m — максимальная интенсивность флуоресценции в конце реакции, C_0 — дробный цикл, при котором интенсивность флуоресценция достигает половины значения F_m , k — коэффициент, который определяется наклоном кривой, f_0 — смещение нулевой линии (фон детектора).

Традиционное выражение МФС дополнено двумя слагаемыми:

$f_1 * C + f_2 * C^2$. Коэффициент f_1 определяется линейным дрейфом нулевой линии, коэффициент f_2 учитывает квадратичную составляющую дрейфа нулевой линии. Необходимость дополнительных слагаемых возникает в случаях, когда с целью экономии используются малые объемы реактивов, при этом интенсивность флуоресценции реакции становится соизмеримой с дрейфом нулевой линии.

Дробный цикл C_0 удобно принять в качестве величины порогового цикла C_t реального сигнала ПЦР. Условие $C_t = C_0$ выполняется, если выбрать уровень порога, при котором интенсивность флуоресценция достигает половины значения F_m .

С помощью электронной таблицы Excel можно построить МФС и оптимизировать ее параметры (табл. 10).

Табл. 10. Электронная таблица для вычисления параметров МФС

	A	B	C	D	E	F
1						
2		Порог =	500			
3		$C_t =$	23,500			
4		$C_0 =$	23,5			
5		$F_m =$	1000			
6		$k =$	1,39			
7		$f_0 =$	0			
8		$f_1 =$	0			
9		$f_2 =$	0			
10	$C =$	$d =$	0			
11	1	9,33E-05	9,33E-05	0	9,33E-05	0
...
24	14	1,07	1,07	0	1,07	0
...
43	33	998,9	998,9	0	998,9	0
...
60	50	1000	1000	0	1000	0

В ячейках C4:C9 таблицы 1 заданы исходные параметры модели.

В терминах Excel интенсивность флуоресценции в ячейке C11 вычисляется следующим образом:

$$C11 = \$C\$5 / (1 + \text{EXP}((\$C\$4 - A11) / \$C\$6)) + \$C\$7 + \$C\$8 * A11 + \$C\$9 * (A11)^2,$$

где порядковый номера цикла $C=1$ приведен в ячейке B11.

Полностью МФС строится в ячейках C11:C60 как зависимость от номера цикла, записанного в ячейках A11:A60=1:50.

В ячейках В11:В60 можно расположить полученную на анализаторе ПЦР зависимость флуоресценции от номера цикла в числовом выражении, желательно нормированную при $F_m=1000$ и $f_0=0$ о.е. (относительных единиц). Ячейки D11:D60 можно использовать для имитации дрейфа нулевой линии детектора и других видов помех. В ячейках E11: E60 вычисляются суммы $(B11+D11):(B60+D60)$. В ячейках F11:F60 получаются квадраты разностей $(E11-C11)^2:(E60-C60)^2$, а в ячейке С10 – остаточная сумма квадратов разностей s .

Оптимизация параметров модели выполняется путем использования инструмента **Поиск решения** из меню **Сервис**. Для этого необходимо выполнить следующие действия: **Установить целевую ячейку С10, Равной минимальному значению, и Выполнить, Изменяя ячейки С4:С9**. В результате в ячейках С11:С60 получаются числовые значения зависимости оптимизированной модели от номера цикла, а в ячейках С4:С9 - новые параметры **МФС**. Модель получается оптимизированной по методу наименьших квадратов ошибок.

5.4.3 Усеченная модельная функция

После завершения ПЦР, результатом которой является быстрый рост сигнала флуоресценции, может наблюдаться медленное увеличение или уменьшение сигнала флуоресценции. Этот эффект подобен дрейфу нулевой линии, хотя имеет другую причину. Уменьшить влияние этого эффекта можно путем использования укороченной модели S-образной функции (**УМФС**). Приведенная в ячейке В24 табл. 9 интенсивность модельного сигнала при 14 цикле отличается от нуля примерно на 1 о.е., а интенсивность модельного сигнала при 33 цикле (В43) отличается от максимального значения (1000 о.е.) также примерно на 1 о.е. Поэтому при допустимой погрешности интенсивности сигнала около 0,1 % можно применить **УМФС** в интервале от 14 до 33 циклов. Результаты вычисления основных параметров (C_0 , k и r_2) укороченной **УМФС** при дрейфе нулевой линии с кубической зависимостью, приведенные в крайнем правом столбце табл. 10, мало отличаются от исходных параметров.

Для использования в качестве иллюстрационного материала можно построить упрощенные модели, используя таблицу 9 с вновь вычисленными параметрами C_0 и k при $F_m = 1000$ о.е. и f_0, f_1, f_2 , равными нулю.

Критерием приближения прогнозируемой модели к исходной фактической последовательности может служить остаточная сумма квадратов разностей s (**ssresid**). В терминах Excel в безразмерной форме функциональную близость можно оценить с помощью коэффициента корреляции r^2 :

$$r^2 = 1 - \text{ssresid}/\text{sstotal}, \quad (37)$$

где $\text{sstotal} = \sum(F - F_c)^2$ – общая сумма квадратов разностей действительных значений F при всех циклах и среднего значения F_c . Вычисленные значения этих критериев приближения приведены в табл. 10 (значение r^2 приведено в виде разности согласно формуле 37).

5.4.4 Исследование влияния дрейфа нулевой линии детектора

С помощью электронной таблицы Excel выполнен численный эксперимент, результаты которого доказывают, что даже при неблагоприятных условиях с помощью МФС удастся устранить влияние дрейфа нулевой линии.

Для имитации дрейфа нулевой линии детектора формировались числовые последовательности $f_0, f_1 \cdot C, f_2 \cdot C^2$ и $f_3 \cdot C^3$ с величинами коэффициентов $f_0 = 100$ о.е., $f_1 = 2$ о.е., $f_2 = 0,04$ о.е. и $f_3 = 0,0008$ о.е. При таких коэффициентах максимальное отклонение нулевой линии составляет 100 о.е., т.е. 10 % от максимальной нормированной интенсивности флуоресценции в конце реакции $F_m = 1000$ о.е. Дополнительно формировалась числовая последовательность суммы $f_0 + f_1 \cdot C + f_2 \cdot C^2$.

Результаты вычисления параметров МФС ячейках для разных значений дрейфа базовой линии приведены в таблице 11.

Табл. 11. Результаты вычисления параметров МФС

	Исходные параметры	$f_0 =$ 100 о.е. (макс.)	$f_1 * C =$ 100 о.е. (макс.)	$f_2 * C^2 =$ 100 о.е. (макс.)	$f_0 + f_1 * C + f_2 * C^2 =$ 300 о.е. (макс.)	$f_3 * C^3 =$ 100 о.е. (макс.)	$f_3 * C^3 =$ (от 14 до 33 циклов)
C_0	23,5	23,499	23,499	23,500	23,500	23,496	23,500
F_m	1000	999,997	999,988	999,988	999,989	988,441	998,215
k	1,39	1,390	1,390	1,390	1,390	1,371	1,389
f_0	0	99,999	-2,003	0,038	98,038	2,728	8,024
f_1	0	0,000118	2,0004	-0,083	1,917	-0,900	-1,241
f_2	0	-4,5E-07	-1,7E-06	0,042	0,042	0,060	0,057
s	0	2,07E-05	0,00016	0,00015	0,0002	49,041	0,010
r_2	0	(1 – 1,8E-12)	(1 – 1,4E-11)	(1 – 1,3E-11)	(1 – 1,5E-11)	(1 – 4,4E-06)	(1 – 9,3E-10)

Сравнивая полученные в таблице параметры (выделены жирным шрифтом) с заданными параметрами ($f_0 = 100$, $f_1 = 2$, $f_2 = 0,04$ о.е.) можно сделать вывод о хорошем совпадении параметров моделей и исходных последовательностей с дрейфом нулевой линии. Особенно ценным качеством модели с предложенными дополнительными параметрами является малая зависимость от дрейфа величины C_0 , которую можно принять в качестве порогового цикла. Даже при дрейфе нулевой линии, который характеризуется кубической зависимостью, величина C_0 отличается от исходной величины менее чем на 0,5 % амплификационного цикла.

5.4.5 Выводы

Проведено сравнение модельных функций сигналов ПЦР-РВ для аппроксимации кинетических кривых.

На основе усовершенствованной модели S-образной функции проведено исследование влияние дрейфа нулевой линии, проведено исследование погрешностей моделирования.

Приведены критерии приближения прогнозируемой модели к фактическому росту интенсивности сигналов флуоресценции в ходе реакции.

Показана возможность полной автоматизации вычислений пороговых циклов сигналов ПЦР-РВ.

При определении порогового цикла предложено выбирать уровень порога, при котором интенсивность модельного сигнала достигает половины значения максимальной интенсивности в конце реакции. Выполнен численный эксперимент, результаты которого доказывают, что даже при неблагоприятных условиях с помощью этой модели при таком выборе уровня порога удается устранить влияние дрейфа нулевой линии. Рассмотрены преимущества использования цензурированной модели S-образной функции.

Показано, что при моделировании сигналов ПЦР-РВ сигмоидальной функцией при использовании метода порога и фильтрации сигналов можно уменьшить влияние шума при измерении пороговых циклов (в приведенном примере величина стандартного отклонения понизилась на 22%).

5.5 Исследование особенностей многокомпонентного анализа НК

Многокомпонентный ПЦР-анализ применяется с целью обеспечения одновременного выполнения двух и более типов анализа в одной пробирке и позволяет снизить затраты на проведение ПЦР [56].

В современных приборах для ПЦР в реальном времени предусмотрены варианты детекции сигналов флуоресценции нескольких красителей одновременно [56, 57]. Для этого приборы заранее настраиваются на детекцию сигнала при максимальной флуоресценции каждого красителя. Каналы обычно называют по названию красителя, максимум которого они детектируют.

Самые распространенные варианты многокомпонентного ПЦР: два канала - **FAM** и **HEX**, три канала - **FAM**, **HEX** и **Sy5**, четыре канала - **FAM**, **HEX**, **ROX** и **Sy5**.

Каналы выбираются таким образом, чтобы детектировать сигнал основного красителя и уменьшить мешающие сигналы других красителей, спектральные характеристики которых значительно различаются. Например, при количественном определении генетически модифицированных организмов (ГМО) используется двухкомпонентный ПЦР-анализ, когда одновременно проводятся две независимые реакции в одной пробирке [58].

Одна реакция позволяет обнаружить ДНК анализируемого растения (соя, кукуруза и т.п.), при этом используется зонд, меченный красителем **R6G**. Другая реакция позволяет обнаружить последовательность, специфичную для конкретной линии генетически модифицированного растения. Для этого используется зонд, меченный красителем **FAM** или **ROX**.

Если красители, например **FAM** и **VIC** [59, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**], флуоресцируют в близких диапазонах, прибор будет считывать спектральные компоненты этих красителей в пропорциях, которые определяются перекрытием спектров флуоресценции красителей и избирательностью оптических фильтров. При этом наблюдается заметное (до 10%) прохождение мешающих сигналов от соседних оптических каналов.

Один из вариантов алгоритма компенсации взаимного влияния каналов регистрации реализован в программном обеспечении анализатора нуклеиновых кислот АНК-32, который серийно выпускается в ИАП РАН. Для компенсации прохождения сигналов каждого из четырех красителей в измеряемые каналы используется матрица пересчета. Если экспериментально подобрать коэффициенты матрицы, то при дальнейшей работе взаимное влияние красителей соседних каналов будет минимально.

В следующем подразделе описан способ на основе сигмоидальной (S-образной) функции (СФ), обеспечивающий автоматическую полную компенсацию взаимного влияния красителей соседних спектральных каналов с автоматическим расчетом коэффициентов матрицы пересвета.

5.5.1 Построение многокомпонентных модельных сигналов

Для построения модельных сигналов СФ в нескольких каналах использованы аналитическая форма и методика расчета, приведенные в статьях [21- 25]:

Ниже приведен пример вычислений трехкомпонентных модельных сигналов СФ с помощью электронной таблицы Excel (табл. 12).

Табл. 12. Трехкомпонентные модельные сигналы СФ

Номер ячейки	Номер цикла С	A	B	C	D	E	N	S
2	-	m=	-	-	-	0,048	0,097	0,028
3	-	n=	-	-	-	0,056	0,069	0,037
4	-	C ₀ =	18,5	23,5	28,5	18,5000	23,4999	28,5000
5	-	F _m =	100 0	100 0	100 0	992,9	992,7	995,6
6	-	k =	1,39	1,39	1,39	1,390	1,389	1,390
7	-	f ₀ =	0	0	0	0,00	0,01	0,00
8	-	f ₁ =	0	0	0	0,00	0,00	0,00
9	-	f ₂ =	0	0	0	0,00	0,00	0,00
10	-	S _k =				0,00001	0,007	0,0003
11...60	1...50	F _{1...F} 50

Компенсационные коэффициенты m и n , а также суммы квадратов сигналов ошибок S_k определяются путем дальнейших расчетов.

Параметры исходных однокомпонентных моделей были выбраны, исходя из следующих критериев.

Величины S_0 , равные 18,5; 23,5 и 28,5 ед. циклов амплификации, выбраны с разностью, равной 5 циклам, поскольку в статье [22] было показано, что при такой разности наблюдаются максимальные погрешности измерений. Величины F_m и f_0 , равные 1000 и 0 о.е., соответствуют обычному динамическому диапазону ПЦР-сигналов после нормализации. Величина $k = 1,39$ соответствует наклону реальных графиков ПЦР-сигналов.

Вычисления модельных сигналов СФ в трех каналах выполнялись в следующей последовательности.

1. В ячейках В11:В60 вычислялась интенсивность флуоресценции F исходной однокомпонентной модели СФ по формуле 1 с параметрами, приведенными в ячейках В4:В9, как зависимость от номера цикла C (рис. 31, ряд 1).

2. Аналогично в ячейках С11:С60 и D11:D60 вычислялись однокомпонентные модели СФ с параметрами в ячейках С4:С9 и D4:D7 (рис. 31, ряды 2 и 3).

3. В следующих ячейках G11:G60, H11:H60 и I11:I60 (в табл. 11 не показаны) были вычислены трехкомпонентные модели СФ с произвольно выбранными в качестве примера коэффициентами взаимного влияния соседних спектральных каналов от 0,03 до 0,1. В первых ячейках сигналы этих моделей можно выразить следующим образом:

$$G11 = B11 + C11 * 0,05 + D11 * 0,06 \quad (38)$$

$$H11 = C11 + B11 * 0,1 + D11 * 0,075 \quad (39)$$

$$I11 = D11 + B11 * 0,04 + C11 * 0,03 \quad (40)$$

В этом примере для модельного сигнала G11 в формуле 38 модельные сигналы $C11 * 0,05$ и $D11 * 0,06$ являются аналогами 5% и 6% помех от соседних спектральных каналов. Аналогично для модельного сигнала H11 в формуле 39 модельные сигналы $B11 * 0,1$ и $D11 * 0,075$ являются аналогами 10% и 7,5% помех от соседних спектральных каналов.

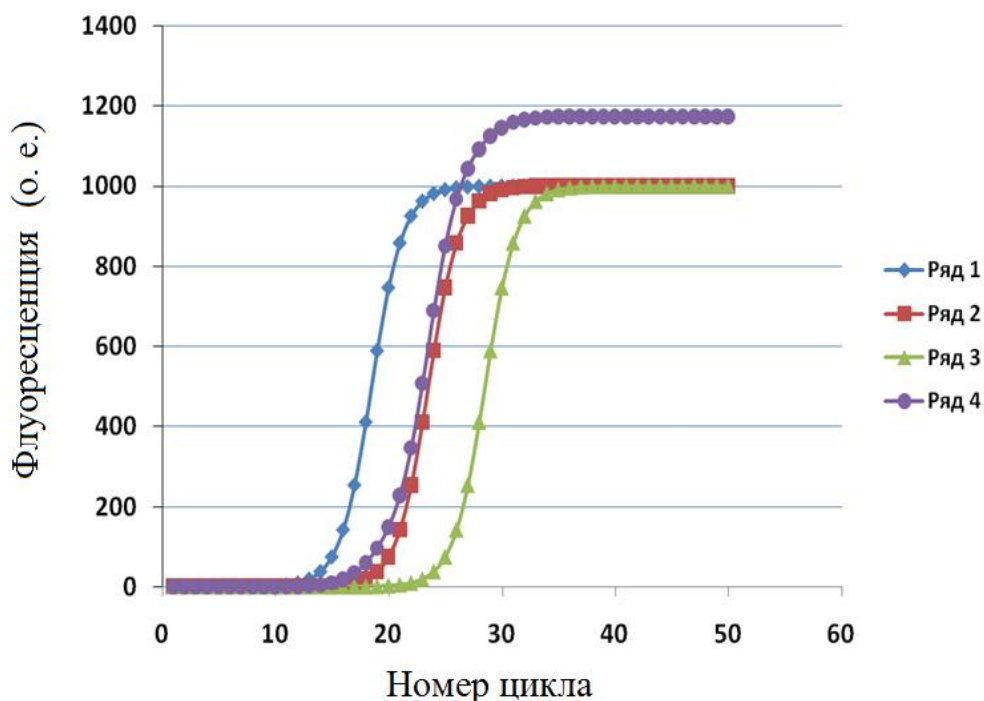


Рис. 31. Зависимости модельных сигналов флуоресценции от номера температурного цикла с параметрами, приведенными в табл. 12.

Ряды 1, 2 и 3 - модельные сигналы с параметрами в столбцах В, С и D, ряд 4 – сигнал трехкомпонентной модели в столбце Н.

На рис. 31 приведены графики модельных сигналов. Видно, что сигнал трехкомпонентной модели в столбце Н значительно отличается от исходного сигнала в столбце С.

5.5.2 Компенсация помех от соседних спектральных каналов

Предлагается способ расчета параметров исходных однокомпонентных сигналов и компенсации помех от соседних спектральных каналов путем использования оптимальных комбинаций многокомпонентных сигналов.

Для случая трехкомпонентных сигналов вводится понятие компенсационных коэффициентов, которые обозначены \mathbf{m} и \mathbf{n} . Компенсация помех в ячейках J11, O11 и T11 может быть достигнута следующим способом:

$$\mathbf{J11} = \mathbf{G11} - \mathbf{H11} * \mathbf{m}_1 - \mathbf{I11} * \mathbf{n}_1 \quad (41)$$

$$\mathbf{O11} = \mathbf{H11} - \mathbf{G11} * \mathbf{m}_2 - \mathbf{I11} * \mathbf{n}_2 \quad (42)$$

$$\mathbf{T11} = \mathbf{I11} - \mathbf{G11} * \mathbf{m}_3 - \mathbf{H11} * \mathbf{n}_3 \quad (43)$$

Вычисления однокомпонентных сигналов в остальных ячейках столбцов J, O и T могут быть выполнены аналогично по формулам (41, 42 и 43) с теми же компенсационными коэффициентами.

5.5.3 Определение оптимизированных параметров и построение восстановленных однокомпонентных сигналов

Для вычисления компенсационных коэффициентов и оптимизированных параметров восстановленных однокомпонентных сигналов предлагается использовать аппроксимацию компенсированных сигналов **J11:J60**, **O11:O60** и **T11:T60** сигналами однокомпонентных моделей СФ, предварительно построенных с произвольными параметрами в ячейках **E11:E60**, **N11:N60** и **S11:S60** и оптимизированных при дальнейших расчетах методом наименьших квадратов.

Для оптимизации этих сигналов вычислялись квадраты сигналов ошибок в ячейках $K11=(J11-E11)^2$; $P11=(O11-N11)^2$; $U11=(T11-S11)^2$ и в остальных ячейках этих столбцов.

Затем вычислялись суммы квадратов сигналов ошибок S_k в ячейках **E10=СУММ(K11:K60)**; **N10=СУММ(P11:P60)**; **S10=СУММ(U11:U60)**.

Оптимизированные параметры однокомпонентных сигналов СФ в ячейках E2:E9 (табл. 11) были получены путем достижения условий минимального значения величин S_k в ячейке E10 при использовании опции "Поиск решения" из меню "Данные". Для этого выполнялись следующие действия: "Установить целевую ячейку E10", "Равной минимальному значению", "Изменяя ячейки **E2:E9**" и "Выполнить".

Аналогично вычислены оптимизированные параметры однокомпонентных сигналов СФ в ячейках **N2:N9** и **S2: S9**.

При сравнении исходных параметров моделей СФ в столбцах B, C и D с оптимизированными параметрами в столбцах E, N и S соответственно можно отметить очень малые отличия. Графики, построенные по этим параметрам, также мало отличаются. Основным положительным результатом предложенного способа автоматического восстановления однокомпонентных сигналов является совпадение

восстановленных величин C_0 с точностью до 4 знака после запятой (18,5000; 23,4999 и 28,5000).

Аналогичные результаты получены при аппроксимации и оптимизации параметров двухкомпонентных и четырехкомпонентных ПЦР-сигналов.

Можно рекомендовать восстановленные величины C_0 использовать в качестве пороговых циклов C_t реальных многокомпонентных сигналов ПЦР, при этом влияние красителей соседних каналов на погрешности измерения будет несоизмеримо малым по сравнению с влиянием шумов и других дестабилизирующих факторов.

5.5.4 Выводы

Предложен способ построения модельных сигналов многокомпонентного ПЦР-анализа на основе сигмоидальной (S-образной) функции (СФ).

Предложен способ компенсации помех от соседних спектральных каналов. Для этого введено понятие компенсационных коэффициентов, которые используются при аппроксимации комбинаций многокомпонентных сигналов однокомпонентными сигналами.

Предложен способ автоматического определения 8 оптимизированных параметров восстановленных однокомпонентных сигналов. Приведен пример определения этих параметров при аппроксимации трехкомпонентных сигналов.

Показано, что погрешности измерения пороговых циклов за счет влияния красителей соседних каналов не превосходят одной сотой процента единицы температурного цикла.

5.6 Выводы и результаты

1. Для реализации базовых алгоритмов фильтрации были выбраны: скользящее среднее значение по 3 точкам, фильтр Савицкого—Голея по 5 точкам и медианный фильтр по 3 точкам.
2. Для расчета первой производной кинетической прямой было выбрано полиномиальное дифференцирование по Савицкому—Голею.

3. Были предложены оригинальные алгоритмы классификации кинетических кривых на основе анализа первой производной, что позволило упростить автоматический анализ и получить первичное оценивание кривых, достаточное для проведения качественного ПЦР-анализа.
4. Были реализованы алгоритмы аппроксимации модельными функциями методом оптимизации Левенберга — Марквардта для функций сигмоида, каноническая, упрощенная (степенная).
5. Было предложено использовать результаты аппроксимации модельными функциями для оценки кинетических кривых: расчет порогового цикла и эффективности реакции.
6. Впервые для расчета базовой линии был использован полином второй степени совместно с модельной функцией.
7. Впервые был использован алгоритм расчета матрицы перекрестного влияния каналов регистрации на основе модельной функции, что позволило практически полностью компенсировать перекрестное влияние каналов для каждого образца при многокомпонентном анализе.
8. При исследовании алгоритмов был выработан базовый набор алгоритмов математической обработки кинетических кривых, который был реализован в версиях программного обеспечения для приборов серии АНК, выпускаемых ИАП РАН.

6 Внедрение результатов работы

6.1 Аппаратное обеспечение АПК

На основе предложенных подходов начиная с 2004 года была разработана серия приборов АНК: АНК-4, АНК-16, АНК-32, АНК-М, АНК-64, АНК-96.



Рис. 32 – АНК-4 (4 образца, 4 канала регистрации флуоресценции)



**Рис. 33 – АНК-16 (16 образцов, 4 канала регистрации флуоресценции)
АНК-32 (32 образца, 5 каналов регистрации флуоресценции)**

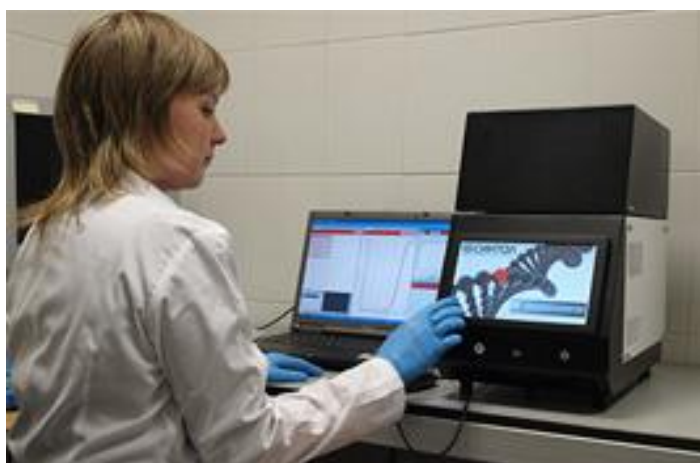


Рис. 34 АНК-48 (48 образцов, 8 каналов регистрации флуоресценции)



Рис. 35 – АНК-64(64 образца, 8 каналов регистрации флуоресценции)



Рис. 36 – АНК-96 (96 образцов, 8 каналов регистрации флуоресценции)

Приборы АНК-32, АНК-32М зарегистрированы в федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор). АНК-48 проходит клинические испытания.

150478



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

**РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ
НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ**
от 21 августа 2015 года № ФСР 2010/08892

На медицинское изделие
Устройство компьютеризированное четырехканальное для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфической последовательности нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции «АНК» по ТУ 9443-003-04699534-2005

Настоящее регистрационное удостоверение выдано
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), Россия, 190103, Санкт-Петербург, Рижский проспект, д. 26

Производитель
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН), Россия, 190103, Санкт-Петербург, Рижский проспект, д. 26

Место производства медицинского изделия
Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31 -33, лит. А

Номер регистрационного досье № РД-8181/37431 от 11.08.2015

Вид медицинского изделия **215980**

Класс потенциального риска применения медицинского изделия **2а**

Код Общероссийского классификатора продукции для медицинского изделия **94 4340**

приказом Росздравнадзора от 21 августа 2015 года № 5925
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

**Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения**



Д.В. Пархоменко

0013785

6.2 Программное обеспечение АПК АНК

Было разработано 4 версии ПО для АПК серии приборов АНК (АНК-4, АНК-16, АНК-32, АНК-М, АНК-64, АНК-96).

6.2.1 Программное обеспечение АПК АНК Версия 1

Жизненный цикл: 2004-2010 гг.

Разработка, тестирование, госиспытания и внедрение проводились в 2004-2006 годах. Получены регистрационные удостоверения Росздравнадзора и Госстандарта.

Платформа: ПК с ОС Windows XP.

Среда разработки: Borland C++ Builder 6.

Работа с прибором: прямое подключение к ПК.

Поддерживаемые приборы: АНК-16 и АНК-32.

Число каналов регистрации: до 4.

Задание для прибора: в виде таблицы с параметрами режима работы. Возможны только три режима работы: изотермический, циклический или плавление.

Схема обработки: фиксированная (сглаживание, нормировка расчет порогового цикла).

Формирование отчетов: в MS Excel.

Объем выпуска: 130 приборов.

На рис. 37 приведен вид главного окна ПО промежуточного отчета после сглаживания, нормировки, расчета порогового цикла.

Версия 1 проектировалась в виде одного программного модуля с фиксированными схемами анализа. Версию отличала простота в освоении и скорости запуска анализа

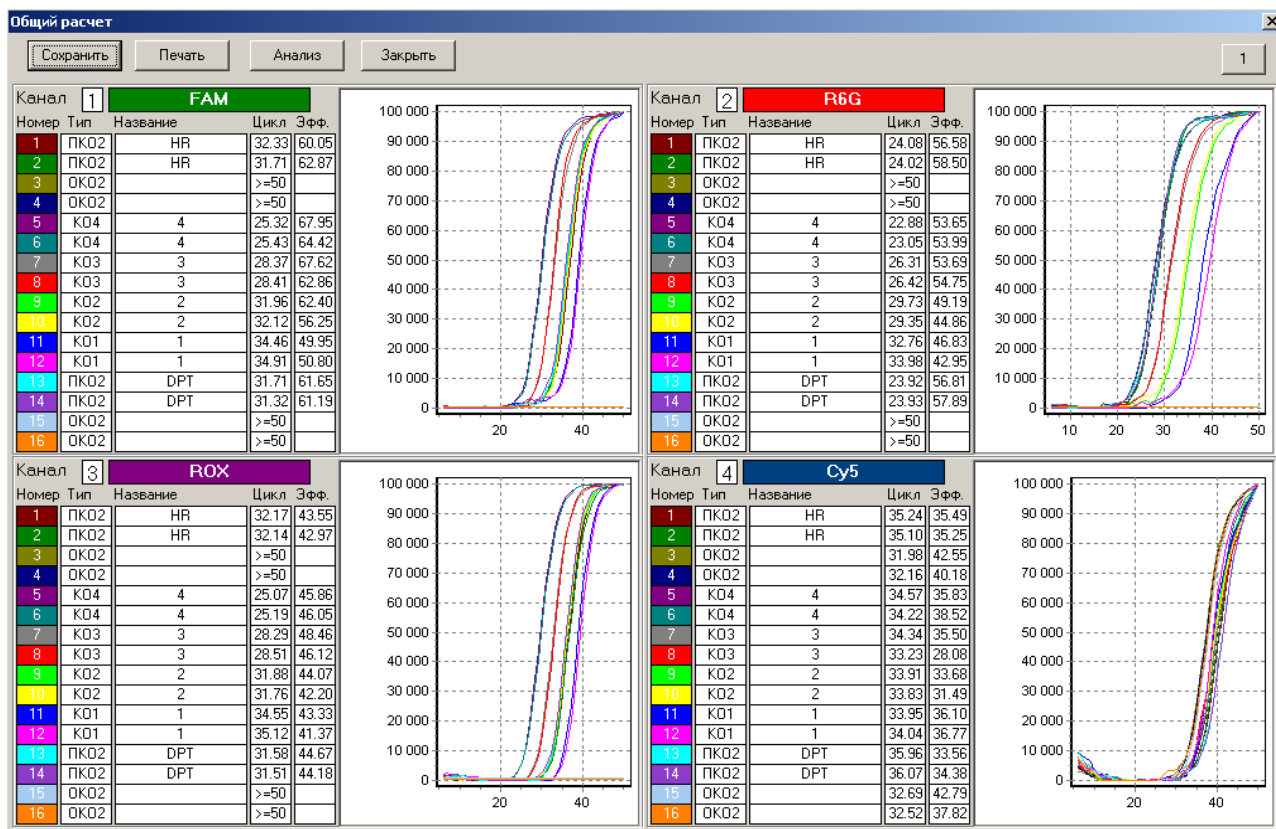


Рис. 37 – Вид промежуточного отчета в первой версии

6.2.2 Программное обеспечение АПК АНК Версия 2

Жизненный цикл: 2008 – 2016 гг.

Разработка, тестирование, госиспытания и внедрение проводились в 2008-2010 годах. Осуществлена перерегистрация приборов в Росздравнадзоре и Госстандарте.

Платформа: ПК с ОС Windows XP, Windows 7.

Среда разработки: Borland C++ Builder 6.

Работа с прибором: прямое подключение к ПК.

Поддерживаемые приборы: АНК-4, АНК-32 и АНК-64.

Число каналов регистрации: до 8.

Задание для прибора: в виде таблицы с режимами работы: изотермический, циклический и плавление. Возможна комбинация режимов работы в произвольном сочетании.

Схема обработки: настраиваемая в шаблоне (сглаживание, нормировка, фильтрация по модели, расчет порогового цикла, расчет концентраций).

Формирование отчетов: встроенное, настраиваемое в шаблоне. Выходная форма отчета в формате html.

Объем выпуска: 30 приборов.

На рис. 38 приведен вид главного окна ПО при просмотре данных – показаны совмещенные исходные данные ПЦР-РВ и плавление.

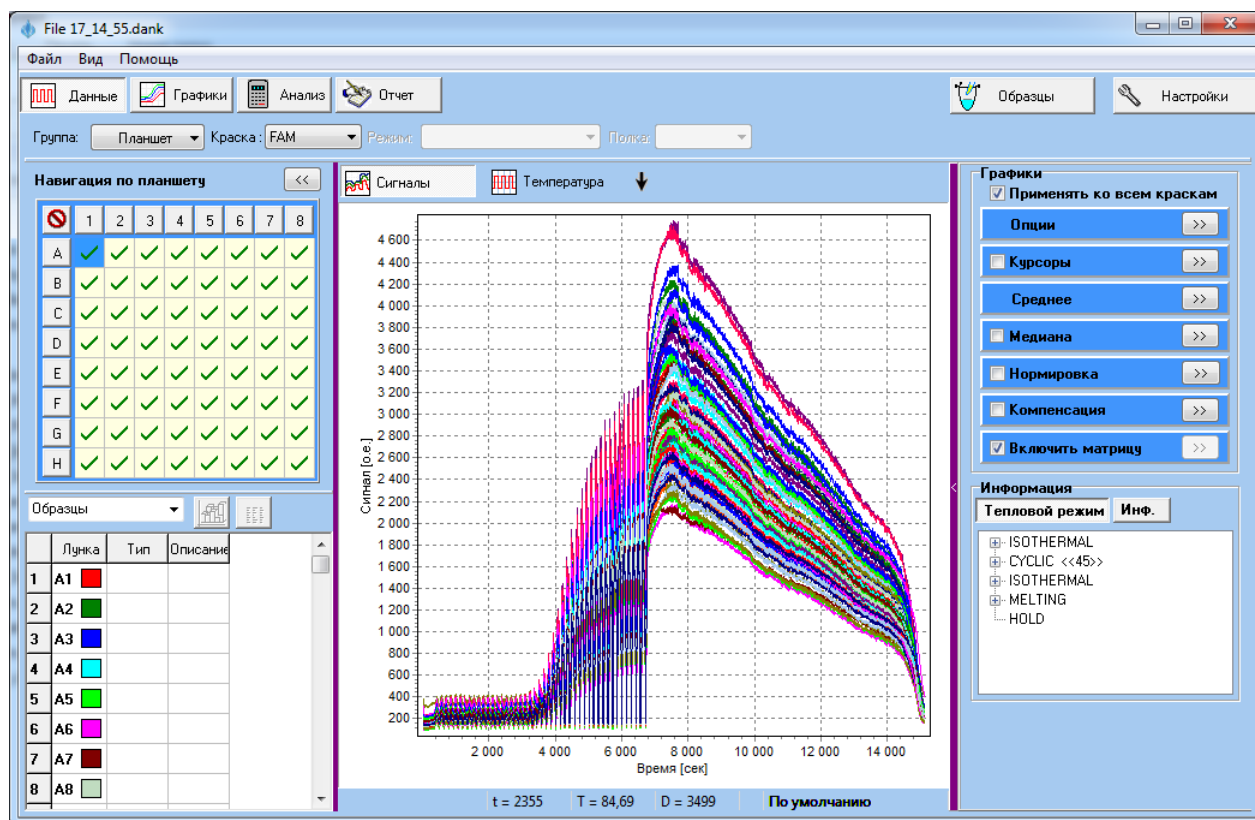


Рис. 38 – Вид главного окна при просмотре данных в версии 2

Во второй версии были выделены функционально законченные поведенческие модели в виде отдельных программных модулей: «редактор шаблонов», «просмотр файлов», «работа с данными», «запуск анализа». Во второй версии появился шаблон – ПОЯ описывающий эксперимент. Был реализован механизм “Plug in” («подключаемые модули»), который позволил поддержать все виды приборов серии АНК. Появилась возможность гибко управлять экспериментом, например, сразу после ПЦР-РВ провести реакцию плавления для проверки специфичности полученных результатов (рис. 38, левая часть графика – ПЦР-РВ, правая – «плавление»). Развитие версии пришлось прекратить из-за особенностей среды программирования Borland C++ Builder 6.

6.2.3 Программное обеспечение АПК АНК Версия 3

Жизненный цикл: 2010 – 2016 гг.

Разработка, тестирование, госиспытания и внедрение проводились в 2010-2012 годах. Осуществлена перерегистрация приборов в Росздравнадзоре и Госстандарте. Получено регистрационное свидетельство на медицинское изделие №ФСР2010/08892 от 21.08.2015г.

Платформа: ПК с ОС Windows XP, Windows 7, Windows 10.

Среда разработки: MS Visual Studio C#.

Работа с прибором: прямое подключение к ПК.

Поддерживаемые приборы: АНК-4, АНК-32, АНК-М(АНК-48) и АНК-64.

Число каналов регистрации: до 8.

Задание для прибора: в виде таблицы с режимами работы: изотермический, циклический и плавление. Возможна комбинация режимов работы в произвольном сочетании.

Схема обработки: настраиваемая в шаблоне (сглаживание, нормировка, фильтрация по модели, расчет порогового цикла, расчет концентраций).

Добавлена схема интерпретации результатов, так же настраиваемая в шаблоне.

Формирование отчетов: встроенное, настраиваемое в шаблоне. Выходная форма отчета в формате html.

Объем выпуска: более 200 приборов

На рис. 39 приведен вид главного окна ПО.

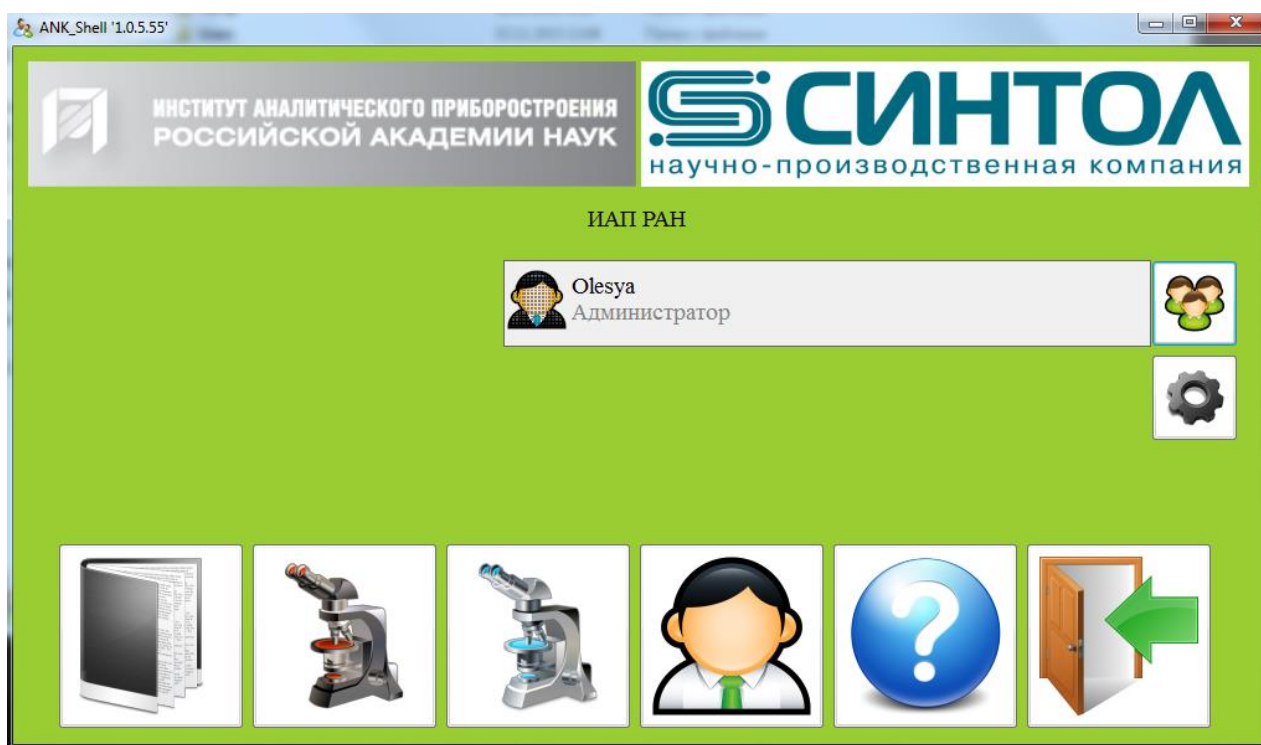


Рис. 39 – Главное окно программы

В основном окне можно выполнить следующие операции:



- открыть окно «Просмотр файлов данных»;



- открыть окно «Новое исследование»;



- открыть окно «Задание на исследование»;



- «Быстрый старт»;



- выход из программы;



- открыть окно «Авторизация пользователя», выбор пользователя;



- настройки программы.

На рис. 40 приведен вид отчета для анализа «Растение 35S+FMV-NOS»

Организация Синтол
 Дата 29.03.2016
 Прибор ANK-48[011404]
 Файл 2016_02_02_19_08_Растение 35S+FMV-NOS.dank

Отчет

Информация

Шаблон: Растение 35S+FMV-NOS
 Начало теста: 02.02.2016

Вывод

№	Образец	Тип	Растение	Вывод	Действие
1	ПКО1	ПКО	Да	Принимается	Завершено
2	ПКО2	ПКО	Да	Принимается	Завершено
3	ОКО1	ОКО	Нет	Принимается	Завершено
4	ОКО2	ОКО	Нет	Принимается	Завершено
5	ОКО-В 1 2Б	ИО	Нет	Нет растительной ДНК	Завершено / Запрос сырья
6	ОКО-В 2 2А	ИО	Нет	Нет растительной ДНК	Завершено / Запрос сырья
7	2-1А	ИО	Да	ГМ растение	Идентификация и определение %
8	2-2А	ИО	Да	ГМ растение	Идентификация и определение %
9	2-3А	ИО	Да	ГМ растение	Идентификация и определение %

Результат

Поз.	Описание	Реактор	Тип	Ct FAM	Ct R6G	Ct ROX	Ct Cy5	FAM	R6G	ROX	Cy5	Растение	Вывод	Действие
A1	ПКО1	35S NOS	ПКО	32,86	19,36	32,36	30,51	+	+	+	+	Да	Принимается	Завершено
A2	ПКО2	35S NOS	ПКО	33,01	19,46	32,45	30,62	+	+	+	+	Да	Принимается	Завершено
A3	ОКО1	35S NOS	ОКО	-	-	-	30,84	-	-	-	+	Нет	Принимается	Завершено
A4	ОКО2	35S NOS	ОКО	-	36,52	-	30,78	-	-	-	+	Нет	Принимается	Завершено
A5	ОКО-В 1 2Б	35S NOS	ИО	-	37,66	-	30,63	-	-	-	+	Нет	Нет растительной ДНК	Завершено / Запрос сырья
B1	2-1А	35S NOS	ИО	35,21	15,5	32,92	30,63	+	+	+	+	Да	ГМ растение	Идентификация и определение %
B2	2-2А	35S NOS	ИО	32,38	15,05	31,76	30,29	+	+	+	+	Да	ГМ растение	Идентификация и определение %

Рис. 40 – Вид отчета

В версии 3 были реализованы ПОЯ и АЯ, а так же КА-распознаватель, что резко повысило устойчивость работы программы и прибора. ПО было спроектировано по модульному принципу с технологией “Plug in”, что позволяет добавлять новые приборы, новые алгоритмы обработки и интерпретации.

6.2.4 Программное обеспечение АПК АНК Версия 4

Жизненный цикл: 2015 – 2016 гг.

В настоящее время заканчивается разработка. Пройдены государственные технические испытания, получен допуск Росздравнадзора к проведению медицинских испытаний в составе АПК АНК-М.

Платформа: любая: ПК, Сервер, Облако. ОС - любая Windows, Linux, Android. Для отображения интерфейса пользователя может быть использован любой WEB-браузер: Internet Explorer 9.0, Google Chrome, Mozilla FireFox, Opera, Safari.

Среда разработки: SQL, PHP, Perl.

Работа с прибором: прямое подключение к ПК, подключение к ЛВС лаборатории, подключение к Internet.

Поддерживаемые приборы: АНК-4, АНК-32, АНК-М(АНК-48) и АНК-64, АНК-96.

Число каналов регистрации: до 8.

Задание для прибора: в виде таблицы с режимами работы: изотермический, циклический и плавление, возможна комбинация режимов работы в произвольном сочетании. Возможно задание алгоритма в произвольной форме, например с изменением длительности ступени по времени в ходе ПЦР для оптимизации хода реакции.

Схема обработки: настраиваемая в шаблоне (сглаживание, нормировка, фильтрация по модели, расчет порогового цикла, расчет концентраций).

Схема интерпретации результатов: настраиваемая в шаблоне.

Формирование отчетов: встроенное, настраиваемое в шаблоне. Выходная форма отчета в формате html.

На рис. 41 приведен вид главного окна ПО при верификации файла.

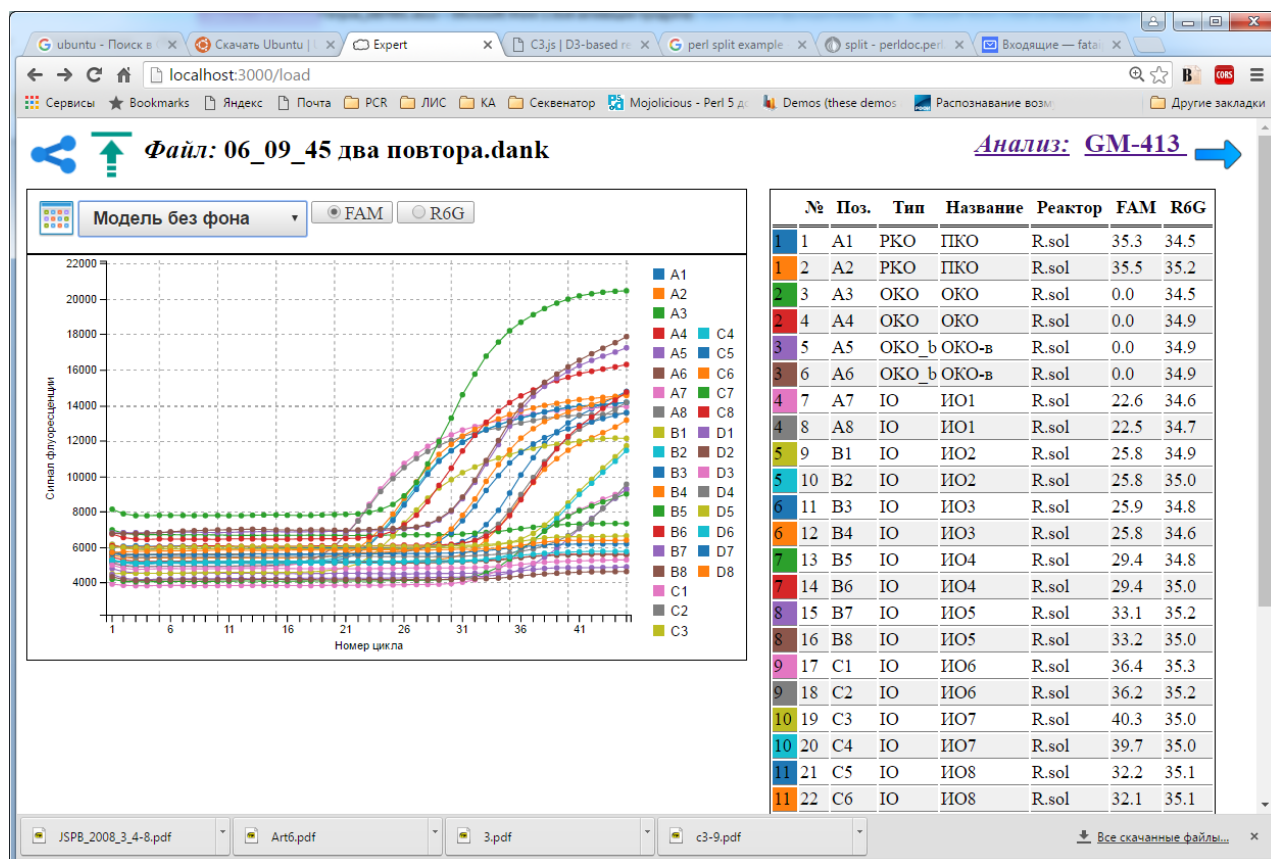


Рис. 41 – Вид главного окна верификации файла

Версия 4 – естественный шаг в развитии предложенной методологии, при котором оказались использованы все современные технологии проектирования распределенных систем: поддержка удаленной базы данных, использование WEB-технологии для построения системы, использование Internet как среды обмена данными. В этой версии структура ПО полностью соответствует предложенной методологии.

6.3 Выводы

Все приборы успешно используются в биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораториях, а также лабораториях СЭС и клинических лабораториях поликлиник и больниц. Список уже решаемых задач на приборах ПЦР-РВ серии АНК включает в себя поддержку более 200 наборов тест-систем[60]. Использование ПОЯ позволяет разрабатывать новые тест системы, не привлекая разработчиков и программистов. Разработанные приборы позволили получить новые результаты исследований различных биологических объектов разной природы.

7 Заключение

Полученные результаты позволили развить научно практические основы создания современных программно-аппаратных средств проведения ПЦР-РВ.

Практическая реализация позволила предоставить в распоряжение исследователей и практиков современные многофункциональные приборы для генетических исследований, позволяющие создавать новые методики измерений и обработки результатов анализа нуклеиновых кислот.

Разработанные и внедренные в практику приборы имеют первостепенное значение для военной, гражданской и судебной медицины, медицины МЧС, санитарного и эпидемиологического контроля, генетических исследований в сельском хозяйстве.

Основные результаты работы.

1. Экспериментально установлены правила определения рабочих параметров (мощность подводимая к элементу Пельтье и время задержки перед началом измерений) тепловых блоков приборов АНК.
2. Осуществлен синтез оптимального алгоритма первичной обработки сигнала флуоресценции для оптического блока приборов АНК.
3. Создан проблемно ориентированный язык управления экспериментом и автоматный язык управления аппаратной частью прибора АНК.
4. Разработаны алгоритмы вторичной обработки сигналов для многокомпонентного количественного и качественного анализа ПЦР-РВ.
5. Создано четыре версии программного обеспечения для комплекса аналитических приборов - анализаторов нуклеиновых кислот, на методе ПЦР-РВ (АНК-16, АНК-32, АНК-48, АНК-64 и АНК-96).
6. Разработанные программно-аппаратные комплексы успешно используются более чем в 300 приборах АНК для биологических, химических, экологических, генетических научных и производственных лабораторий, а также в лабораториях СЭС, МО РФ и клинических лабораториях поликлиник и больниц.

В перспективе предполагается внедрение разработанных приборов в лабораторные информационно-измерительные системы (ЛИИС). Такие системы обычно представляют собой объединение различных диагностических приборов в частности биохимических, иммунологических и генетических анализаторов при решении общих диагностических целей. Получаемые при этом данные требуют новые способы обработки и интерпретации результатов диагностики.

8 Список литературы

1. Kleppe K.E. Molineux and Khorana, Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases [Текст] / K.E. Kleppe, R. Ohtsuka, I. Kleppe // J. Mol. Biol. - 1971. – Vol.56 .- Pp.341-346.
2. A critical review on PCR, its types and applications [Текст] / J. Singh¹, N. Birbian, S. Sinha, A. Goswami // Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. – 2014. – V. 1. – N. 7. – Pp. 65–80.
3. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia [Текст] / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, // Science. – 1985. - V. – 230. Pp. 1350-1354.
4. Пат. 5994056, United States, US 07/695, 201. Homogeneous methods for nucleic acid amplification and detection [Текст] / R. G. Higuchi, патентообладатель: Roche Molecular Systems, Inc.; - заявл. 02.05.1991; опубл. 30.11.1999.
5. Пат. 6814934, United States, US 08/968, 208. Instrument for monitoring nucleic acid amplification [Текст] / R. G. Higuchi, патентообладатель: R. G. Higuchi: - заявл. 12.07.1997; опубл. 09.11.2004.
6. Real time quantitative PCR [Текст] / C. A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams. //Genome Res. – 1996 Oct. – V. 6. – N. 10. – Pp. 986-994.
7. The real-time polymerase chain reaction [Текст] / M. Kubista, J.M. Andrade, et al. // Mol Aspects Med. – 2006. – V. 27. – N. 2-3. –Pp. 95-125.
8. Hunt M. Real time PCR / M. Hunt [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.microbiologybook.org/pcr/realtime-home.htm>.
9. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [Текст] / R. Higuchi, G. Dollinger, P.S. Walsh, R. Griffith. // Biotechnology. – 1992. – V. 10. – N. 4. – Pp. 413-417.

10. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions [Текст] / R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson // Biotechnology. – 1993. – V. 11. – N. 9. – Pp. 1026-1030.
11. Lee L.G. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes [Текст] / L.G. Lee, C.R. Connell, W. Bloch // Nucleic Acids Res. – 1993. – V. 21. – N. 16. – Pp. 3761-3766.
12. Магданов Э.Г. Современное приборное оснащение количественной и цифровой ПЦР [Текст] / Э.Г. Магданов, Д.А. Чемерис, А.В. Чемерис // Биомика, 2011. – Т. 1. - № 1. - С. 15-60.
13. ПЦР в «реальном времени» [Текст] / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семёнов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. - М:БИНОМ, 2009. - 223с.
14. Пат. 2304277 Российская Федерация, МПК G01N 21/63. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В.; патентообладатели: Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В. , - заявл. 23.06.2005; опубл. 10.08.2007.
15. Пат. 2418289 Российская Федерация, МПК G01N 21/64. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Петров А.И., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В., патентообладатель: «Учреждение Российской академии наук Институт аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)», - заявл. 25.11.2009; опубл. 10.05.2011.

16. Пат. на полезную модель 110864 Российская Федерация, МПК G01N 21/64. Устройство для одновременного контроля в реальном масштабе времени множества амплификаций нуклеиновой кислоты [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Богданов В.М., Варламов Д.А., Коновалов С.В., Курочкин В.Е., Петров А.И., Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Сочивко Д.Г., Чернышев А.В., патентообладатель: ЗАО «Синтол», - заявл. 31.10.2011; опубл. 10.07.2012.
17. Абсолютное определение сверхмалых количеств днк в пробе методом пцр в реальном времени [Текст] / Я.И. Алексеев, В.Е. Курочкин, К.А. Благодатских, Д.Г. Сочивко, А.А. Федоров, Д.Г. Петров, А.И. Петров, И.В. Чубинский-Надеждин [Электронный ресурс] //Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С. 215-216. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=215
18. Высокопроизводительный анализатор с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований / В.Е. Курочкин, Ю.В. Белов, С.В. Коновалов, А.И. Петров [Электронный ресурс] //Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С. 240-241. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=240
19. Информационная система для лабораторий генетического анализа / В.Е. Курочкин, Ю.В. Белов, А.И. Петров, К.С. Сычев [Электронный ресурс] //Научные труды конгресса "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" Конгресс-2015 (симпозиум С) «Новые технологии в профилактической и восстановительной медицине». - С.241-243. – Режим доступа: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=241

20. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [Текст] / Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А., Коновалов С.И., Курочкин В.Е., Маракушин Н.Ф., Петров А.И., Петряков А.О., Румянцев Д.А. Скоблилов Е.Ю., Соколов В.Н., Фесенко А.В., Чернышев А.В.. // Научное приборостроение. - 2006. - Т. 16. № 3. с. 132-136.
21. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21.- № 1. - С. 44–49.
22. Изучение влияния шумов детектора на погрешности количественных анализов нуклеиновых кислот на приборах ПЦР-РВ [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21. - № 2. - С. 27–33.
23. Оптимизация параметров сигмодалльной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.В. Лавров, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21. - № 3. - С. 130–134.
24. Белов Ю.В. Исследование погрешностей моделирования сигмодалльной функцией сигналов полимеразной цепной реакции в реальном времени [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21, - № 4 - С 28-34.
25. Белов Ю. В. Двухкомпонентный количественный ПЦР-анализ [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2012. - Т. 22. - № 4. - С 72-76.
26. Генетический анализатор для фрагментного анализа ДНК [Текст] / Я. И. Алексеев, Ю. В. Белов, О. П. Малюченко, Ю. А. Монахова, А. Н. Натыров, В. А. Орехов, С. В. Коновалов, В. Е. Курочкин, А. И. Петров // Научное приборостроение. - 2012. - Т. 22. - № 4. - С 86-92.

27. Белов Ю. В. Многокомпонентный количественный ПЦР-анализ [Текст] / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23.- № 2. - С 5-8.
28. Коррекция базовой линии сигналов флуоресцентного детектора генетического анализатора [Текст] / Ю. В. Белов, И. А. Леонтьев, А. И. Петров, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23. - № 2. – С. 9-13.
29. Построение калибровочной линии при фрагментном анализе ДНК [Текст] / Ю. В. Белов, И. А. Леонтьев, В. В. Панчук, А. И. Петров, В. Е. Курочкин // Научное приборостроение. - 2013. - Т. 23. - № 3. – С. 26-31.
30. Петров А. И. Переход от проблемно-ориентированного языка к автоматному при проектировании аналитических приборов [Текст] / А. И. Петров // Научное приборостроение. – 2016. – Т. 26.- № 2. - С. 82–92.
31. Real-time PCR 3rd Edition [Электронный ресурс] // Life Technologies Corporation. – 2014. – 68p. – Режим доступа: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
32. Pabinger S., A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data [Текст] / S. Pabinger, S. Rödiger, A. Kriegner, K. Vierlinger, A. Weinhäuser // Biomolecular Detection and Quantification. – 2014. - Vol. 1. - P. 23–33.
33. Larinov A., A standard curve based method for relative real time PCR data processing / A. Larinov, A. Krause, W. Miller [Электронный ресурс] // BMC Bioinformatics. – 2005. - 6:62. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/6/62>.
34. Statistical analysis of real-time PCR data / J.S. Yuan, A. Reed, F. Chen, C.N. Stewart Jr. [Электронный ресурс] // BMC Bioinformatics.- 2006. - 7:85
Режим доступа:
<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-7-85>.

35. 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 [Электронный ресурс] // BMC Biotechnology. - 2008.- 8:47. – Режим доступа: www.biomedcentral.com/1472-6750/8/47.
36. Новые программы, используемые при количественной оценке копийности и уровня транскрипции генов. [Текст] / Г.С. Краснов, А.А. Дмитриев, А.В. Кудрявцева, Е.А.Анедченко, Н.Ю. Опарина, В.Н. Сенченко // ТРУДЫ МФТИ. - 2010. – Т. 2, - № 2, - С. 23-27.
37. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч. 1. Оптимизация условий оценивания при наличии аддитивной случайной помехи [Текст] / А.Л. Буляница // Научное приборостроение. – 2009.- Т. 19. - № 3. - С. 3–11.
38. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч. 2. Оценивание и компенсация систематической погрешности измерения. Сопоставление двух различных форм математической модели логистического роста [Текст] / А.Л. Буляница // Научное приборостроение. – 2009. – Т. 19. - № 3. - С. 12–20.
39. Zhao S., Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction [Текст] / S. Zhao, R. D. Fernald // Journal of computational biology. – 2005. - V. 12. – N. 8. - Pp. 1047–1064.
40. Чернышев А.В. Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики: автореф. дис. д-ра техн. наук. 05.11.17 [Текст] / А.В. Чернышев; – МГТУ им Н.Э. Баумана. - М., 2006.
41. Иоффе А.Ф. Полупроводниковые элементы [Текст] / А.Ф. Иоффе. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1960. - 188 с. - (С. 57–58).
42. Моделирование теплового состояния микропробирок с образцами в ходе полимеразной цепной реакции [Текст] / А.В. Чернышев, Д.А. Бакай, В.Е.

- Куручкин, В.Н. Соколов, Е.Ю. Скоблилов. // Научное приборостроение. - 2005. -Т. 15. - № 3. - С. 54–62.
43. Отчет о прикладных научных исследованиях и экспериментальных разработках по теме: «Разработка высокопроизводительного анализатора с многоканальным детектированием для молекулярно-генетических исследований» 2016 г.
44. Тихонов В.И. Статистический анализ и синтез радиотехнических устройств и систем [Текст]: учеб. пособие для вузов / В.И. Тихонов, В.Н. Харисов. – М.: Радио и связь, 1991. – 608 с.
45. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии [Текст]/ Дж. Лакович. - М.: Мир, 1986. - 496 с.
46. Гальярди Р.М. Оптическая связь [Текст]: пер. с англ. С.М.Бабия, под ред.А.Г.Шереметьева / Р.М. Гальярди, Ш. Карп – М.: Связь, 1978. - 423с.
47. Сосулин Ю.Г. Теория обнаружения и оценивания стохастических сигналов [Текст] / Ю.Г. Сосулин. – М.:Сов. Радио, 1978. – 320 с.
48. Шалыто А.А. Автоматное проектирование программ. Алгоритмизация и программирование задач логического управления [Текст] / А.А. Шалыто //Известия РАН. Теория и системы управления. 2000. - №6. - С.63-81
49. Поликарпова Н. И. Автоматное программирование [Текст] / Н. И. Поликарпова, А. А. Шалыто. - СПб.: Питер, 2009. - 176 с.
50. Руководство «Растение / 35S+FMV / NOS скрининг» Тест-система для обнаружения ГМО растительного происхождения / ЗАО Синтол [Электронный ресурс] // ВНИИСБ. - Режим доступа: <http://syntol.ru/bitrix/docs/GM-415-instrukciya.pdf>
51. Васильев С. С. Об использовании в программировании проблемно-ориентированных языков [Текст] / С. С. Васильев, В. Б. Новосельцев //Известия Томского политехнического университета. Выпуск № 5 /2008 Т.313. С. 68-71.
52. Марченков С.С. Конечные автоматы [Текст] / С.С. Марченков. - М.: Физматлит, 2008. - 56 с.

53. Savitzky, A. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures [Текст] / A. Savitzky, M.J.E. Golay // Analytical Chemistry, 1964, 36 (8): 1627–39
54. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case / A. Ståhlberg, N. Zoric, P. Åman, M. Kubista [Электронный ресурс] // Expert Rev. Mol. Diagn. 5(2), 2005. - Режим доступа: http://tataa.com/files/documents/qpcr_review.pdf.
55. Pfaffl. M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [Текст] / M. W. Pfaffl. // Nucleic Acids Research. - 2001. - V. 29, N. 9, Pp. 2002-2007.
56. Приборы для проведения ПЦР с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени (real time PCR). Applied Biosystems 7900HT Real Time PCR System и др. Общее методическое руководство [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://spt.by/images/stories/AB_info/7300_7500_Chemistry_guide_rus.pdf.
57. Справочная информация ООО "ДНК-Синтез". Красители для ПЦР в реальном времени [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.oligos.ru/spravka-krasiteli-tushiteli.html>.
58. Качественное и количественное определение генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в продуктах питания и пищевом сырье тест-системами производства ЗАО «Синтол». Методические рекомендации МР № 02.008-06. // Москва, 2006 г.
59. Количественный ПЦР анализ для детекции ГМО / Ф.Вэйгхардт [Электронный ресурс] // Сессия 10. Всемирная Организация Здравоохранения. Европейское Региональное Бюро. Режим доступа: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/docs-manual-RUS.htm>.
60. Прайс-лист ЗАО Синтол [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.syntol.ru/price.pdf?v=38>