

На правах рукописи
УДК 615.47

Чернышев Андрей Владимирович



**СОЗДАНИЕ ТЕОРИИ РАБОЧИХ ПРОЦЕССОВ, МЕТОДОВ
РАСЧЕТА И РАЗРАБОТКА ОБОРУДОВАНИЯ
ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ**

**Специальность 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского
назначения**

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук**

Москва – 2006

Работа выполнена в Московском государственном техническом университете им. Н.Э. Баумана

Официальные оппоненты:

доктор технических наук,
профессор, Виктор В.А.

доктор технических наук,
Квашнин С.Е.

доктор физ.-мат. наук,

У1765726

Чернышев А.В.

Ведущая организация: Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики
2006 0-00
Защита диссертационног
техническом уни
Бауманская улиц

ростроения РАН

1:30 час. на заседании
ком государственным
: 105005, Москва, 2-я

и:

У 1765726

ГТУ

п
у

ВОЗВРАТИТЕ КНИГУ НЕ ПОЗЖЕ
обозначенного здесь срока

ения,
, д.5,

и:
п

енно
имя

нов



1765726

Чернышев А. В. Сознание тео

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В настоящее время объектами научных и диагностических исследований медико-биологических лабораторий всего мира все чаще становятся нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК. Наиболее доступным, достоверным и высокочувствительным методом, позволяющим обнаружить ДНК в пробе и оценить ее количество, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Разработка в 1983 г. сотрудником фирмы «Cetus», США, Кэри Мюллимсом, метода ПЦР явилась одним из крупнейших методологических открытий в современной молекулярной биологии.

Метод ПЦР, применяемый при анализе ДНК, позволяет сегодня решать такие научно-исследовательские и диагностические задачи, как: диагностика социально значимых заболеваний, например, гепатиты В и С, туберкулез, СПИД; анализ онкологических и генетических заболеваний; генотипирование (в медицине используется, например, для определения антибиотикорезистентных штаммов), в криминалистике — для идентификации личности; в сельском хозяйстве — для селекции ценных пород животных и сортов растений; идентификация генных мутаций; мониторинг экспрессии генов при разработке новых лекарственных средств и многие другие. Уже сейчас методики на основе ПЦР широко используются в научных исследованиях, в практическом здравоохранении и в системе Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Огромное значение метод ПЦР имеет в области борьбы с биологическим терроризмом, так как позволяет наиболее быстро и точно обнаружить факт биологического воздействия.

К разработке оборудования для проведения ПЦР приступили практически одновременно с разработкой самого метода. За два десятилетия в промышленно развитых странах создано много вариантов устройств для реализации ПЦР — амплификаторов ДНК. Разработка общей теории расчета и создание высокопроизводительного оборудования для ПЦР способны дать дополнительный импульс развитию отечественных высокотехнологических производств и направлены на выпуск продукции, конкурентоспособной на мировом рынке медицинского и научного оборудования.

Актуальность темы диссертации, посвященной созданию теории рабочих процессов, методов расчета и разработке оборудования для проведения ПЦР, подтверждается также тем, что основные ее положения разрабатывались и реализовывались в процессе выполнения работ по договорам и контрактам в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002-2006 годы.

Объектом исследований в данной работе является базовое оборудование для проведения ПЦР-диагностики — амплификаторы ДНК, а предметом

исследований – рабочие процессы, протекающие в этих устройствах и определяющие их технические и эксплуатационные характеристики.

Цель работы: дальнейшее развитие теории рабочих процессов, создание методов расчета и разработка отечественного конкурентоспособного оборудования для ПЦР-диагностики – амплификаторов ДНК различного назначения.

Достижение поставленной цели осуществлялось путем решения следующих основных задач:

1. Изучение теплового взаимодействия реакционной смеси и тепловых блоков амплификаторов ДНК.

2. Разработка общей классификации амплификаторов ДНК.

3. Разработка концептуальной математической модели расчета амплификаторов ДНК.

4. Разработка общих методов расчета амплификаторов ДНК, основанных на различных принципах действия.

5. Проведение теоретических исследований влияния конструктивных и функциональных параметров на основные характеристики амплификаторов ДНК.

6. Проведение исследований, направленных на повышение эффективности и надежности амплификаторов ДНК.

7. Разработка и создание новых типов амплификаторов ДНК.

8. Разработка методики и проведение клинических испытаний созданных амплификаторов ДНК.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Впервые выделены классификационные признаки и предложена общая классификация амплификаторов ДНК: по типу рабочего тела, способу подвода и отвода теплоты, способу преобразования энергии, типу используемых рабочих емкостей для реакционных ПЦР смесей и пр.

2. В результате впервые проведенных исследований теплового взаимодействия реакционной смеси и теплового блока амплификатора ДНК в ходе ПЦР установлено, что одной из основных причин низкой воспроизводимости результатов проведения ПЦР является неоднородность теплового поля рабочего тела в переходных режимах работы амплификаторов ДНК, которая может достигать $\pm (7 \dots 8)$ К при скорости изменения температуры рабочего тела теплового блока $(1 \dots 1,5)$ К/с. Впервые разработана математическая модель и произведен расчет энергетического воздействия химических и физико-химических реакций при матричном синтезе цепей и плавлении ДНК на тепловое состояние реакционной смеси. Установлено, что теплота, выделяемая или поглощаемая в процессе химических и физико-химических реакций $(2,0 \cdot 10^{-5} \dots 1,0 \cdot 10^{-4}$ Дж), не вызывает существенного изменения теплового состояния реакционной смеси.

3. Впервые разработана научная основа для описания рабочих процессов в тепловых блоках амплификаторов ДНК. Создана обобщенная структурная

схема, определяющая характер взаимодействия компонентов теплового блока.

4. На основе обобщенной структурной схемы построена концептуальная модель расчета процессов тепломассопереноса, которая позволяет формировать единый подход к созданию частных математических моделей амплификаторов ДНК, базирующихся на различных принципах действия. Концептуальная модель состоит из системы нестационарных дифференциальных уравнений энергии, движения и неразрывности вязкой среды в трехмерной постановке, начальных и граничных условий.

5. Впервые разработана модель расчета термоэлектрических преобразователей энергии на основе законов неравновесной термодинамики.

6. На основе концептуальной модели созданы математические модели расчета различных типов твердотельных амплификаторов ДНК. На основе метода контрольного объема созданы методы и алгоритмы расчета, проведены численные исследования тепловых блоков амплификаторов ДНК и определены конструктивные и функциональные параметры, позволившие обеспечить однородность теплового поля рабочего тела на уровне $\pm(0,08...0,15)$ К при скорости изменения температуры от 1,5 К/с до 4,6 К/с.

7. На базе обобщенной структурной схемы и основных законов классической равновесной термодинамики для открытых систем впервые созданы математическая модель и алгоритм расчета пневматического амплификатора ДНК.

Практическая ценность и внедрение результатов работы.

1. Разработаны не имеющие аналогов концептуальная модель расчета, обобщенная расчетная схема и методы расчета, которые могут быть использованы при создании новых типов амплификаторов ДНК, основанных на различных принципах действия. Концептуальная модель и методы расчета позволяют существенно (в 5 – 10 раз) сократить сроки создания данного типа оборудования.

2. Выявлены направления и разработаны способы повышения надежности работы твердотельных амплификаторов ДНК на основе термоэлектрических элементов. Предложена новая комбинированная твердотельная электро-термоэлектрическая схема амплификатора ДНК, позволяющая качественно изменить условия работы термоэлектрических элементов. Достигнуто значительное (до 100 раз) увеличение количества рабочих циклов функционирования твердотельных устройств на основе термоэлектрических элементов.

3. Математические модели и методики расчета внедрены в практику проектирования в ЗАО «СТМ-Ц», г. Москва, ЗАО «Ресурс-Прибор», г. Обнинск, ОАО «Приборный завод «Сигнал», г. Обнинск, Институт аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург. С использованием созданных методик и программ расчета разработаны и серийно производятся ЗАО «СТМ-С», г. Москва, ЗАО «Ресурс-Прибор», г. Обнинск, ОАО «Приборный завод «Сигнал», г. Обнинск, Институт аналитического приборостроения РАН,

г. Санкт-Петербург, следующие типы амплификаторов ДНК: «Циклотемп-2», «Циклотемп-4», «Циклотемп-106», «Циклотемп-107», амплификаторы ДНК для количественного анализа ДНК в реальном времени – анализаторы нуклеиновых кислот АНК 16, АНК 32.

4. С применением созданных методик и программ расчета впервые разработана и изготовлена партия специализированных амплификаторов ДНК, предназначенных для работы с биологическим микропирами. Устройство запатентовано в Российской Федерации (Пат. 43871 РФ, МПК⁷ C12M 1/34) и внедрено в Институте молекулярной биологии РАН, г. Москва, и Институте аналитического приборостроения РАН, г. Санкт-Петербург.

5. С использованием разработанных методик и программ расчета разработан опытный образец малогабаритного мобильного пневмомеханического амплификатора ДНК для работы в полевых условиях. Устройство предназначено для проведения оперативной биологической разведки с целью индикации и идентификации агентов биологического воздействия непосредственно в зоне их обнаружения

6. Амплификатор ДНК «Циклотемп-107» и анализаторы нуклеиновых кислот АНК 16, АНК 32 прошли приемочно-технические испытания во ВНИИМТ МЗ РФ и клинические испытания в исследовательских центрах и научно-исследовательских институтах МЗ РФ, МО РФ и РАМН, рекомендованы к применению в медицинской практике, внесены в Государственный Реестр изделий медицинского назначения и серийно производятся.

7. Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедр «Биомедицинские технические системы и устройства» и «Вакуумная и компрессорная техника» МГТУ им. Н.Э. Баумана.

Достоверность полученных данных подтверждена результатами испытаний созданного оборудования для проведения ПЦР в лицензированных испытательных центрах, хорошей повторяемостью результатов, полученных в условиях реальной эксплуатации, и внедрением, в том числе, в медицинские учреждения.

На защиту выносятся:

1. Основные положения теории рабочих процессов, общая классификация, концептуальная модель расчета и обобщенная структурная схема оборудования для проведения ПЦР – амплификаторов ДНК;

2. Результаты исследований взаимодействия реакционных смесей и тепловых блоков амплификаторов ДНК в ходе ПЦР;

3. Математическая модель и метод расчета твердотельных амплификаторов ДНК и математическая модель термоэлектрических преобразователей энергии – источников тепла на основе законов неравновесной термодинамики;

4. Теоретические и экспериментальные исследования твердотельного на основе термоэлектрических элементов Пельтье, твердотельного комбиниро-

ванного электропневматического, а так же пневмоэлектромеханического амплификаторов ДНК;

5. Результаты исследований теплового поля рабочего тела;

6. Результаты исследований, направленных на повышение эффективности и надежности амплификаторов ДНК на основе термоэлектрических элементов Пельтье;

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на конференциях и симпозиумах:

1. Научно-технической конференция «165 лет МГТУ им. Н.Э. Баумана», Москва, 1995 г.

2. Всероссийская научно-практической конференция «Применение цепной полимеразной реакции для диагностики инфекционных заболеваний», г. Сочи, апрель 1996 г.

3. Симпозиум международной выставки "Биотехнология", г. Ганновер, Германия, октябрь 1997 г.

4. Третья Российская национальная конференция по тепломассообмену, Москва, Россия, октябрь 2002 г.

5. Пятая международная научно-техническая конференция «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии», г. Владимир, Россия, 2002 г.

6. Третья, четвертая, пятая и шестая научно-технические конференции «Медико-технические технологии на страже здоровья», г. Анталия, Турция, октябрь 2002 г.; г. Шарм Эль Шейх, Египет, октябрь 2003 г.; о. Крит, Греция, октябрь 2004 г; п-ов. Халкидики, г. Салоники, Греция, октябрь 2005 г.

7. Научно-техническая конференция «40 лет Биотехническим системам», г. Санкт-Петербург, СПб ГЭТУ, март 2004 г.

8. Международный симпозиум. «Образование через науку», г. Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана, июнь 2005 г.

Созданное оборудование экспонировалось на российских и международных выставках: «Инновации-99», г. Москва, 1999 г., «Биотехнология», г. Ганновер, Германия, октябрь 1997 г., «Научное приборостроение», 2002, 2003, 2005 гг., г. Москва, «Биотехнология», г. Санкт-Петербург, 2003 г, «Мир биотехнологии», г. Москва, 2003, 2004, 2005, 2006 гг., «Здравоохранение», г. Москва, 2004, 2005 гг., «Генодиагностика», г. Москва, 2004 г., Новосибирск, 2005 г., Третий съезд Общества биотехнологов России, г. Москва, 2005 г.

По результатам выставки «Инновация-99. Технологии живых систем» амплификатор ДНК «Циклотемп-107» награжден медалью ВВЦ. В 2006 г. амплификаторы ДНК для количественного анализа в реальном времени АНК-16 и АНК-32 награждены золотыми медалями выставки «Мир биотехнологии» в номинации «Медицинское оборудование».

Личный вклад автора заключается в проведении теоретических и экспериментальных исследований, в разработке методов расчета и создании оборудования для ПЦР-диагностики. Все вошедшие в диссертационную ра-

боту результаты получены лично автором или при его непосредственном участии.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 39 работ, в том числе один патент.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, восьми глав, списка используемой литературы из 181 наименования. Работа изложена на 366 страницах текста, включая 127 иллюстраций и 15 таблиц.

Содержание работы

Во введении дается общая характеристика работы, обоснована актуальность темы, сформулирована научная проблематика, определены объект и предмет исследований.

В первой главе представлен обзор современного состояния проблем разработки оборудования для проведения ПЦР, который показал, что большое разнообразие выявленных конструктивных схем обосновывает необходимость определения классификационных признаков, разработки общей классификации и создания концептуальной модели расчета амплификаторов ДНК. Существует целый ряд проблем, решению которых уделяется основное внимание. Это, прежде всего, обеспечение однородности теплового поля рабочего тела; повышение скорости нагрева и охлаждения рабочего тела; снижение динамического разброса температуры рабочего тела в процессе стабилизации температуры; повышение надежности устройства. Решить указанные проблемы необходимо на этапе выбора структурной схемы и разработки конструктивной схемы амплификатора ДНК. Адекватность полученных результатов базируется на результатах расчетно-теоретических исследований на математических моделях, на основе которых определяются основные конструктивные и функциональные параметры.

Темпы развития современной науки требуют значительного сокращения сроков и стоимости разработки данного типа устройств, и способствовать этому могут создание общей концептуальной модели и методов расчета. Решение задачи усложняется и тем, что амплификаторы ДНК в сочетании с реакционной смесью представляет собой биотехническую систему. Успешная разработка или эффективное совершенствование характеристик данной системы возможны лишь при взаимном учете и согласовании параметров всех ее составляющих.

Вопросы разработки методов математического моделирования рабочих процессов в амплификаторах ДНК мало изучены. По принципу действия и назначению данный тип устройств является разновидностью термостатирующих устройств, работающих в динамическом, управляемом режиме. Некоторые принципы обобщения при создании математической модели выполнены в работе Н.А. Ярышева и Л.Б. Андреевой. Известны попытки решения подобных задач аналитическими методами. Максимально в направлении создания методики расчета прецизионных устройств нагрева/охлаждения, работающих в динамическом режиме, продвинулась О.В. Белова, разработавшая

подход, использующий численные методы решения. Однако в ее работе предложена модель только твердотельного варианта исполнения устройства нагрева/охлаждения на термоэлектрических элементах Пельтье. При построении пространственной модели теплового блока расчетные области, в которые входят полупроводниковые материалы, медные спаи и воздух, были заменены на некий эффективный объем, теплофизические свойства которого представлены в виде эффективных плотности и коэффициента теплопроводности.

$$[\tilde{\lambda}]_j = [\lambda]_j K_j + [\lambda]_0 (1 - K_j), \quad \tilde{\rho}_i = \rho_i K_i + \rho_0 (1 - K_i),$$

где: $K_i = \frac{V_i}{\tilde{V}_i}$ – коэффициент преобразования; V_i – объем материала;

ρ_i и ρ_0 – плотность; $[\lambda]_i$ и $[\lambda]_0$ – коэффициент теплопроводности материала и воздуха соответственно. При решении задач однородности теплового поля данный подход не позволяет учитывать неоднородность теплового потока самого теплового источника – элемента Пельтье. Для описания теплового состояния рабочего тела, через которое тепло передается лабораторным емкостям с исследуемыми образцами, необходимо совместное решение трехмерного нестационарного уравнения теплопроводности всего теплового блока и уравнения энергии для потока теплоносителя в каналах охлаждения теплообменного устройства.

Основные способы преобразования энергии в амплификаторах ДНК основываются на эффекте Джоуля и термоэлектрических эффектах. Базовые теоретические исследования полупроводниковых термоэлектрических элементов были разработаны А.Ф. Иоффе и его сотрудниками. Дальнейшее развитие методы расчета термоэлементов получили в работах Г.К Котырло, В.С. Мартыновского, Л.И. Анатычука, А.И. Бурштейна, В.М. Зорина, Е.К. Иорданишвили, Б.Е. Малковича и других авторов. Большинство известных методов расчета базируются на описании процессов в термоэлементе, изолированном от взаимодействующих с ним тел. При рассмотрении одномерного стационарного температурного поля предполагается, что материал ветвей однороден и изотропен, зависимость свойств материала от температуры пренебрегают; горячие спаи теплоизолированы; боковые поверхности ветвей термоэлемента адиабатически изолированы; тепловая нагрузка на спаи отсутствует; контактными сопротивлениями пренебрегают; принимается, что теплота Джоуля равномерно расходится к холодным и горячим спаям. Теплота, поглощаемая холодным спаем, термоэлемента составляет:

$$Q_C = e_c I T_C - \lambda_c (T_H - T_C) - \frac{1}{2} I^2 R - \frac{1}{2} \tau_c (T_H - T_C) I,$$

теплота, выделяемая на горячем спаем, составляет:

$$Q_H = e_H I T_H - \lambda_H (T_H - T_C) + \frac{1}{2} I^2 R + \frac{1}{2} \tau_H (T_H - T_C) I,$$

где: $T_C, T_H, e_C, e_H, \tau_C, \tau_H$ – температура, коэффициенты термо-ЭДС и коэффициенты Томсона холодного и горячего спаев соответственно.

Нестационарный режим работы термоэлементов рассматривается, в основном, при определении их быстродействия; при этом определение их рабочих параметров ведется на основе метода Фурье или операционным методом. Известен комплекс нестационарных задач, связанных с определением режима питания термоэлементов. Исходное интегральное уравнение решается при этом методом последовательных приближений, методами теории нелинейных колебаний и др.

Известные методы расчета термоэлементов позволяют с достаточной степенью точности рассчитывать процессы в термоэлектрических устройствах, работающих в условиях термодинамического равновесия. В усилителях ДНК время переходных процессов сопоставимо со временем стабилизации температуры, следовательно, подобный подход для моделирования рабочих процессов не применим.

Построение методики расчета теплового блока на базе термоэлектрических элементов в динамическом режиме заключается в совместном решении задачи нестационарной теплопроводности и теплообмена всех элементов и описания термоэлектрических эффектов методами неравновесной термодинамики. Для этой цели получены нестационарные уравнения тепловых источников в термоэлектрических элементах в зависимости от вектора плотности тока, основывающиеся на принципах, изложенных Э.В. Осиповым.

Решение задачи исследования нестационарного теплового состояния теплового блока усилителей ДНК в трехмерной постановке основано на численных методах. В связи с наличием нелинейных граничных условий для достижения приемлемой точности решения необходимо учитывать баланс тепловых потоков во всей расчетной области, что становится возможным при применении метода Ваничева (метод взвешенных невязок) в варианте метода контрольного объема.

На основе проведенного обзора современного состояния разработок оборудования для проведения ПЦР сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

Вторая глава посвящена биотехническим аспектам создания оборудования для проведения ПЦР.

Процесс ПЦР – это циклически повторяющаяся обработка содержащего ДНК раствора, в результате которой происходит квазиэкспоненциальное накопление копий определенного фрагмента исходной двухцепочечной ДНК. В состав реакционной смеси кроме двухцепочечной ДНК входят праймеры – два олигонуклеотида-затравки (химически синтезированные одноцепочечные короткие (15 ... 25)-звенные фрагменты ДНК, комплиментарные разным цепям выбранного участка ДНК, четыре дезоксирибонуклеотидтрифосфата: дезоксиаденинтрифосфат (dATP), дезоксигуанинтрифосфат (dGTP), дезоксицитидинтрифосфат (dCTP), дезокситимидинтрифосфат (dTTP), буферная

система и фермент ДНК-полимераза. В основе ПЦР лежит процесс достройки праймера на матрице ферментом ДНК-полимеразой. Каждый цикл реакции состоит из трех этапов: денатурация исходной двухцепочечной ДНК (разведение спирали); гибридизация праймеров с комплементарными участками исследуемой последовательности при температуре, определяемой длиной и структурой праймеров, и ферментативное достраивание двухцепочечной структуры на заданном участке.

На рис. 1 приведен пример изменения температуры реакционной смеси и соответствующий ему идеализированный цикл процесса ПЦР. На первых двух циклах образуются лишь протяженные копии исходной ДНК. И только на третьем цикле появляются первые две «полноценные» двукратные копии выбранного фрагмента исходной ДНК.

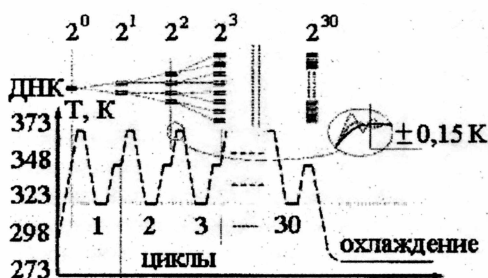


Рис. 1.

Пример изменения температуры реакционной смеси и идеализированный цикл процесса ПЦР

При большом количестве циклов (25 ... 30) наблюдается резкое снижение темпа накопления ПЦР-продукта. Вызвано это тем, что концентрация наработанных копий фрагментов ДНК приближается к концентрации оставшихся свободных праймеров, и они начинают реально «конкурировать» в процессе гибридизации.

Приближенное к реальному процессу математическое описание ПЦР может быть представлено в виде:

$$Q_n = 0 \text{ при } n < 3 \text{ и } Q_n = Q_0 \cdot (f^{n-1} - 2) \text{ при } n_k \geq n \geq 3,$$

где: Q_n – количество фрагмента ДНК, получаемого в ходе реакции, Q_0 – исходное количество ДНК, n – число циклов реакции; n_k – номер цикла, после которого происходит резкое снижение темпов прироста ПЦР-продукта; f – коэффициент, характеризующий качество ПЦР-процесса. В идеальном случае значение f стремится к 2.

Физический смысл коэффициента f в том, что копировать полностью удастся не все однотожевые фрагменты ДНК. Часть из них не успевает гибридизоваться с праймером, на части процесс энзиматической полимеризации не доходит до конца. Величина коэффициента зависит от многих параметров, в том числе от качества оборудования, реализующего протокол теплового процесса. При идентичных условиях проведения процесса ПЦР в различных амплификаторах ДНК будут получаться продукты ПЦР, различающиеся количественно и качественно (наличие и доля побочных продуктов, образо-

вание «шмеров» на аналитических гелях и пр.).

В результате проведенного изучения процессов взаимодействия биохимической (реакционная смесь) и технической (амплификатор ДНК) составляющих биотехнической системы удалось обосновать ряд требований, предъявляемых к амплификаторам ДНК. Так, например, установлено, что при увеличении скорости нагрева/охлаждения возможно снижение разброса по выходу ПЦР-продукта. Показано, что, несмотря на достаточно высокую однородность теплового поля рабочего тела в статических режимах $\pm(0,1...0,15)$ К, в идентичных образцах наблюдается разброс результатов по наработке ПЦР-продукта. Причина в том, что на переходных режимах однородность теплового поля блока значительно хуже и разброс температуры может достигать $\pm(7...8)$ К и выше.

Проведено математическое моделирование и численное исследование тепловых физических процессов, имеющих место в лабораторных емкостях с ПЦР-смесью при работе амплификатора ДНК. На рис. 2 в качестве примера показаны результаты численного исследования теплового поля реакционной смеси объемом 30 мкл в тон-

костенной пластиковой ПЦР-пробирке объемом 200 мкл на 10-й и 100-й секунде процесса нагрева от 290 К до 356 К. На рис. 3 и 4 показаны изменение средней по объему температуры реакционной смеси и максимальный разброс температуры в объеме реакционной смеси в процессе нагрева. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что на первых 20 секундах нагрева разброс температуры в объеме реакционной смеси (30 мкл) может достигать 9 К. В результате численных исследований установлено, что переходные тепловые процессы могут оказывать существенное влияние на протекание ПЦР и должны заканчиваться до завершения каждого стационарного этапа температурного протокола.

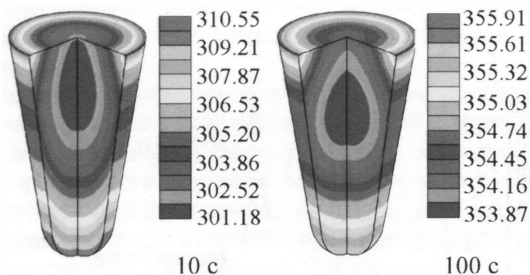


Рис. 2.

Результаты численного исследования теплового поля реакционной смеси объемом 30 мкл на 10-й и 100-й секунде нагрева от 290 до 356 К.

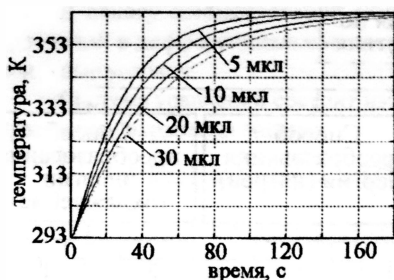


Рис. 3.

Изменение средней по объему температуры реакционной смеси (5 ... 30 мкл) в процессе нагрева

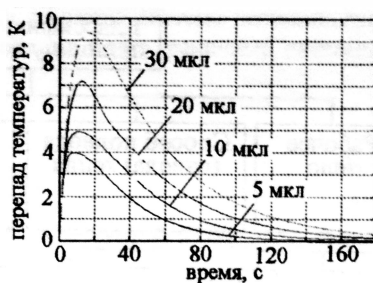


Рис. 4.

Максимальный разброс температуры в объеме реакционной смеси (5 ... 30 мкл) в процессе нагрева

Для получения максимально высокой равномерности теплового поля и повышения выхода ПЦР-продукта следует использовать наиболее интенсивные способы подвода теплоты к реакционным смесям и минимизировать их объем, необходимо адаптировать ПЦР-протокол к конкретному типу емкостей (микропробирки, планшеты и пр.), используемых в амплификаторе ДНК. Проведена оценка влияния тепловых эффектов, обусловленных ходом ПЦР на исполнение заданного температурного протокола. Установлено, что теплота ($2,0 \cdot 10^{-5} \dots 1,0 \cdot 10^{-4}$) Дж, выделяемая или поглощаемая в процессе химических и физико-химических реакций при матричном синтезе цепей и плавлении ДНК не вызывает существенного изменения теплового состояния реакционной смеси.

Третья глава посвящена анализу вариантов исполнения и разработке общей классификации и концептуальной модели расчета амплификаторов ДНК. Классификация проведена по двум основным категориям: по принципу действия и по техническим и эксплуатационным характеристикам (рис. 5).

Выявленные квалификационные признаки позволили синтезировать обобщенную структурную схему теплового блока амплификаторов ДНК (рис.6), охватывающую практически все возможные варианты исполнения рассматриваемого типа оборудования.

На обобщенной структурной схеме базируется концептуальная модель расчета амплификаторов ДНК. Расчетная область концептуальной модели включает объект исследования – реакционную смесь и компоненты теплового блока: носитель, рабочее тело, преобразователь энергии, теплообменное устройство и теплоноситель.



Рис. 5.
Классификация амплификаторов ДНК

В основу концептуальной модели заложена система нестационарных уравнений в дифференциальной постановке, а также граничные, начальные и конечные условия.

Система уравнений состоит из:
уравнения сохранения энергии:

$$\frac{\partial(\rho c) \cdot T}{\partial t} + \operatorname{div}[(\rho c) \cdot \vec{u} \cdot T - [\lambda] \cdot \operatorname{grad}(T)] = S_T, \quad (1)$$

трехмерного нестационарного уравнения теплопроводности:

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \operatorname{div}(\operatorname{grad} T), \quad (2)$$

уравнений движения:

$$\begin{aligned} \rho \frac{du_x}{dt} &= -\frac{\partial p}{\partial x} + \mu \cdot \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_x), \\ \rho \frac{du_y}{dt} &= -\frac{\partial p}{\partial y} + \mu \cdot \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_y), \\ \rho \frac{du_z}{dt} &= \rho F_z - \frac{\partial p}{\partial z} + \mu \cdot \operatorname{div}(\operatorname{grad} u_z), \end{aligned} \quad (3)$$

и уравнения неразрывности потока:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \operatorname{div}(\rho \cdot \vec{u}) = 0, \quad (4)$$

где: c – теплоемкость среды, Вт/(кг·К); S_T – мощность объемных источников, Вт/м³; t – время, с; T – температура, К; $\vec{u}$ – вектор скорости, м/с; ρ – плотность, кг/м³; $[\lambda]$ – коэффициент теплопроводности, Вт/(м·К), p – давление, Па; μ – динамическая вязкость, кг/м·с, F_z – сила тяжести, Н.

Система уравнений (1...4) концептуальной модели расчета, описывающая процессы в расчетной области, соответствующей обобщенной структурной схеме, может быть представлена в виде таблицы 1.

Взаимодействие между компонентами расчетной области описывается одним из видов граничных условий:

$$\vec{u} = 0, \quad (5)$$

$$(-[\lambda] \operatorname{grad} T, \vec{n})|_{S_{k-l}} = (-[\lambda] \operatorname{grad} T, \vec{n})|_{S_{l-k}}, \quad k \neq l. \quad (6)$$

$$(-[\lambda] \operatorname{grad} T, \vec{n})|_{S_{k-l}} = \alpha_f (T - T_f)|_{S_{k-l}}, \quad k \neq l \quad (7)$$

$$T|_{S_{k-l}} = T|_{S_{l-k}}, \quad k \neq l, \quad (8)$$

где: α_f – коэффициент теплоотдачи, Вт/(м²·К); T_f – температура жидкости, К; $\vec{n}$ – вектор нормали к поверхности границы; S_{k-l} , S_{l-k} – взаимодействующие поверхности компонентов расчетной области.

Тепловое взаимодействие между компонентами расчетной области концептуальной модели, для каждого конкретного случая, может описываться

одним из видов граничных условий, также представленными в виде таблицы 2.

Начальные условия. В момент времени, $t = 0$, для всех компонентов расчетной области обобщенной структурной схемы имеется следующее распределение параметров:

$$T = T(t, x, y, z), p = p(t, x, y, z), \rho = \rho(t, x, y, z), \bar{u} = \bar{u}(t, x, y, z).$$

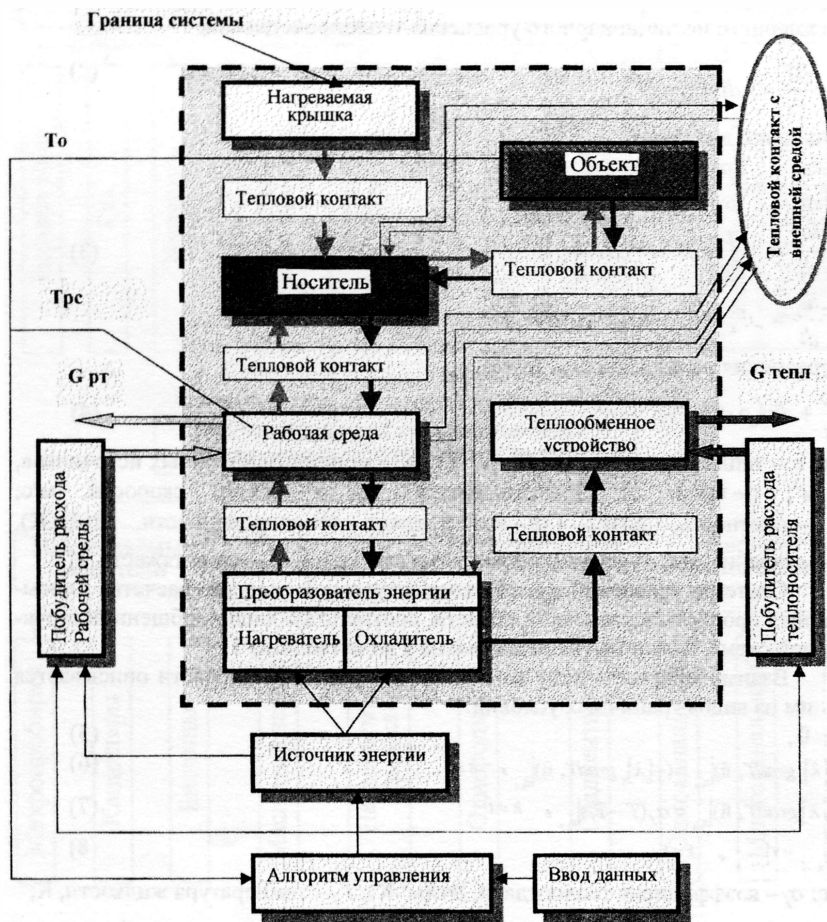


Рис.6.

Обобщенная структурная схема теплового блока амплификатора ДНК.
 T_0 , T_{pc} – температура объекта и рабочего тела, G_{pc} , $G_{тепл}$ – расход рабочего тела и теплоносителя соответственно.

Конечные условия могут быть заданы в вариантном виде: значение температуры исследуемой точки (расчетной области) достигло заданного значения ($T_{r_k} = T_{\text{зад}}$); время расчета равно заданному ($t_{\text{ком}} = t_{\text{зад}}$); значение исследуемого параметра достигло заданного значения ($X_{\text{ком}} = X_{\text{зад}}$).

Таблица 1

Компонент расчетной области	Уравнение энергии	Уравнение теплопроводности	Уравнение движения	Уравнение неразрывности
Объект исследования	+(1)	-	+(3)	+(4)
Носитель	-	+(2)	-	-
Рабочее тело (твердое тело)	-	+(2)	-	-
Рабочее тело (газ, жидкость)	-	+(2)	+(3)	+(4)
Преобразователь энергии	+(1)	-	-	-
Теплообменное устройство	-	+(2)	-	-
Теплоноситель	-	+(2)	+(3)	+(4)

Таблица 2

Взаимодействующие компоненты расчетной области		Для уравнений неразрывности и движения	Для уравнения энергии
Объект исследов.	Носитель	(5)	(6)
Носитель	Рабочее тело (твердое тело)	-	(6)
	Рабочее тело (газ, жидкость)	(5)	(7)
	Объект исследования	(5)	(6)
	Внешняя среда	(5)	(7)
Рабочее тело (твердое тело)	Носитель	-	(6)
	Преобразователь энергии	-	(6)
	Внешняя среда	-	(7)
Рабочее тело (газ, жидкость)	Носитель	(5)	(7)
	Преобразователь энергии	(5)	(7)
	Внешняя среда	-	-
Преобразователь энергии	Теплообменное устройство	-	(6)
	Внешняя среда	(5)	(7)
Теплообменное устройство	Преобразователь энергии	-	(6)
	Теплоноситель	(5)	(7)
	Внешняя среда	(5)	(6)
Теплоноситель	Теплообменное устройство	(5)	(6)

Четвертая глава посвящена разработке теории рабочих процессов и созданию на базе концептуальной модели методики расчета твердотельных амплификаторов ДНК. В качестве преобразователей энергии в этих устройствах могут использоваться как термоэлектрические элементы Пельтье (ТЭ), так и электрические нагреватели. Как и любые другие варианты амплификаторов ДНК, твердотельные состоят из теплового блока и системы управления. На рис. 7 приведена конструктивная схема твердотельного амплификатора ДНК на базе термоэлектрических преобразователей энергии.

В состав теплового блока устройства входят: пластина-держатель 1 (рабочее тело) для размещения микропробирок 8 с реакционной смесью, датчики температуры 2, радиатор 3, батарея термоэлектрических элементов 5, ограничитель потока воздуха 7, теплоизоляция 6 и нагреваемая крышка 17. Система управления включает: предварительный усилитель 9, АЦП 10, микро-процессорное устройство 11, ЦАП 12, усилитель тока 13, импульсный источник тока 14,

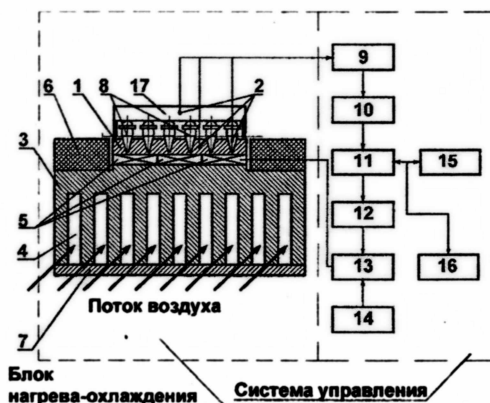


Рис. 7.

Тепловой блок твердотельного амплификатора ДНК на основе термоэлектрических элементов Пельтье (см. текст)

устройство ввода/вывода информации 15 и внешнюю ЭВМ с программным обеспечением для сбора и обработки информации 16. При подаче тока заданной полярности на термоэлектрические элементы происходит нагрев пластины-держателя и охлаждение радиатора; при изменении полярности включения тока направление тепловых потоков меняется на противоположное. Во избежание испарения воды из реакционной смеси (во время нагрева) и конденсации ее на крышке и стенках микропробирок 8 в состав устройства включена нагреваемая крышка, температура которой поддерживается в диапазоне (381 ... 388) К.

Математическая модель расчета теплового блока твердотельного амплификатора ДНК создана с учетом основных допущений: все рассматриваемые материалы элементов расчетной области однородны по составу и изотропны по теплофизическим свойствам; контакты между отдельными элементами расчетной области приняты идеальными; теплоемкость c , плотность ρ и коэффициент теплопроводности λ в твердом теле постоянны и не зависят от температуры; для циклического процесса нагрева/охлаждения за-

дан закон изменения вектора силы тока по направлению и по модулю $\vec{j} = f(t)$ от времени; температурные деформации элементов системы пренебрежимо малы по сравнению с их линейными размерами.

Расчетная область состоит из следующих элементов: нагреваемая крышка (внешняя среда), воздушная камера (внешняя среда), пластина-держатель (рабочее тело), преобразователь энергии (термоэлектрический элемент и/или электрический нагреватель) и теплообменное устройство. В свою очередь, термоэлектрический элемент состоит из: верхней керамической подложки; верхнего медного спая; полупроводниковых переходов; нижнего медного спая и нижней керамической подложки. Теплообменное устройство (радиатор) включает собственно радиатор и поток воздуха в воздушных каналах радиатора.

Тепловой блок. Математическая модель, описывающая процесс переноса тепла в тепловом блоке твердотельного устройства, состоящего из рабочего тела (пластины-держателя), преобразователей энергии и радиатора, описывается трехмерным нестационарным уравнением теплопроводности:

$$\rho c \frac{\partial T}{\partial t} = \lambda \operatorname{div}(\operatorname{grad} T) + S_r, \quad (9)$$

где S_r – мощность внутренних источников (стоков) теплоты.

Для пластины-держателя и радиатора $S_r = 0$. В преобразователях энергии, термоэлектрических элементах и электрическом нагревателе этот член уравнения (S_r) будет состоять из нескольких слагаемых.

Воздушные каналы теплообменного устройства. Передача тепла в каналах радиатора происходит посредством вынужденного конвективного теплообмена. В связи с этим приняты некоторые допущения: при движении воздуха в каналах радиатора существует доминирующее, маршевое направление движения потока воздуха, совпадающее с направлением канала; вязкой диффузией в доминирующем направлении можно пренебречь по сравнению с вязкой диффузией в направлениях, перпендикулярных доминирующему.

Течение несжимаемой жидкости в каналах радиатора описывается уравнением движения (уравнение Навье-Стокса). С учетом принятых допущений: о возможности не учитывать сжимаемость воздуха, то есть плотность газа постоянна по всему полю потока; вязкость среды постоянна ($\mu = \text{const}$) и о существовании маршевого направления, уравнения движения принимают вид:

$$\begin{aligned} \rho \frac{du_x}{dt} &= -\frac{\partial p}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 u_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u_x}{\partial z^2} \right), \\ \rho \frac{du_y}{dt} &= \mu \left(\frac{\partial^2 u_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u_y}{\partial z^2} \right), \end{aligned} \quad (10)$$

$$\rho \frac{du_z}{dt} = \rho F_z + \mu \left(\frac{\partial^2 u_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u_z}{\partial z^2} \right).$$

Уравнение сохранения энергии для потока газа в каналах радиатора теплообменного устройства аналогично уравнению (1), только отсутствует внутренний источник тепла, $S_r = 0$:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} + \text{div}(\rho c_p u T - \lambda \text{grad} T) = 0. \quad (11)$$

Уравнение сохранения массы для потока газа в теплообменном устройстве (в каналах радиатора) или уравнение неразрывности:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho u) = 0. \quad (12)$$

Воздушная камера – замкнутый объем, заполненный воздухом. Передача тепла происходит посредством естественной конвекции. Система уравнений, описывающая процессы теплового взаимодействия, состоит из:

уравнения движения воздуха –

$$\begin{aligned} \frac{d\rho u_x}{dt} &= -\frac{\partial p}{\partial x} + \frac{1}{3} \mu \frac{\partial}{\partial x} \text{div} u + \mu \text{div}(\text{grad} u_x), \\ \frac{d\rho u_y}{dt} &= -\frac{\partial p}{\partial y} + \frac{1}{3} \mu \frac{\partial}{\partial y} \text{div} u + \mu \text{div}(\text{grad} u_y), \end{aligned} \quad (13)$$

$$\frac{d\rho u_z}{dt} = \rho F_z - \frac{\partial p}{\partial z} + \frac{1}{3} \mu \frac{\partial}{\partial z} \text{div} u + \mu \text{div}(\text{grad} u_z);$$

уравнения сохранения энергии –

$$c_p \frac{\partial \rho T}{\partial t} + \text{div}(\rho c_p u T - \lambda \text{grad} T) = 0; \quad (14)$$

уравнения сохранения массы (уравнение неразрывности) –

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \text{div}(\rho u) = 0, \quad (15)$$

Начальные и граничные условия являются неотъемлемой частью математической модели и задаются для всех элементов расчетной области.

При разработке математической модели для совместного решения задачи нестационарной теплопроводности и теплообмена всех элементов расчетной области проведено математическое моделирование термоэлектрических эффектов методами неравновесной термодинамики и выведено уравнение закона сохранения энергии для однородной термоэлектрически изотропной среды:

$$\int_v \frac{dw}{dt} dv = \int_v \left[\frac{\partial}{\partial y} \lambda(T) \frac{\partial T}{\partial y} + e^2 \rho_s(T) j^2 - eT \frac{\partial \alpha}{\partial T} \frac{\partial T}{\partial y} j \right] dv. \quad (16)$$

В полученном уравнении в квадратных скобках находятся тепловые источники:

выделение тепла Джоуля –

$$S_{\text{Дж}} = e^2 \rho_s (T) j^2; \quad (17)$$

выделение/поглощение тепла Пельтье-Томсона –

$$S_{\text{П-Т}} = eT \frac{\partial \alpha}{\partial T} \frac{\partial T}{\partial y} j. \quad (18)$$

Решение представленной системы дифференциальных уравнений (9...18) выполняется методом контрольного объема в конечно-элементной постановке, для применения которого разработаны дискретные аналоги всех дифференциальных уравнений системы.

В главе 5 приведены численные исследования твердотельных тепловых блоков амплификаторов ДНК. Исследуются причины возникновения неоднородности теплового поля рабочего тела, к которым, прежде всего, относятся: неоднородность теплофизических свойств материала и теплового потока от источника тепла, подвод или отвод тепла по границам взаимодействия с окружающей средой или элементами конструкции. На рис. 8 и 9 приведены результаты исследования влияния материалов и размеров включений на однородность температурного поля. Ось ординат (dT) – разность между температурой поверхности (материал без включений) и температурой поверхности над включением. Так как в действительности величины включений порядка $(0,4 \times 0,4 \times 0,4)$ мм не встречаются, то можно сделать вывод, что они практически не оказывают существенного влияния на неоднородность теплового поля.

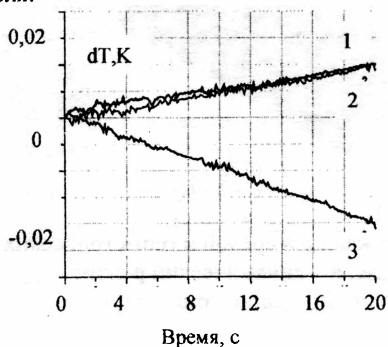


Рис. 8.

Влияние материала включения на неоднородность теплового поля. 1 – сталь; 2 – медь; 3 – воздушная пора

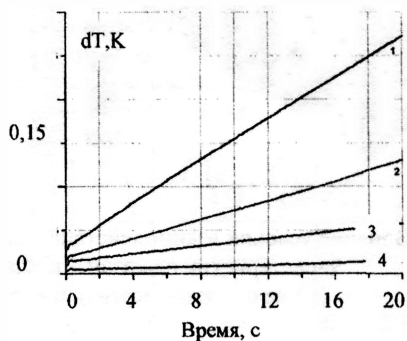


Рис. 9.

Влияние размера включения на неоднородность теплового поля. 1 – $(1 \times 1 \times 1)$ мм, 2 – $(0,8 \times 0,8 \times 0,8)$ мм, 3 – $(0,6 \times 0,6 \times 0,6)$ мм и 4 – $(0,4 \times 0,4 \times 0,4)$ мм

Из приведенных на рис. 10 данных видно, что тепловой поток от источника тепла оказывает существенное влияние на распределение температуры в зоне контакта, однако на температурное поле самого рабочего тела –

пластины-держателя с ячейками эта неоднородность практически не влияет. Результаты исследования влияния условий взаимодействия с окружающей средой и геометрических характеристик пластины-держателя представлены на рис.11. Из приведенных результатов следует, что в динамическом режиме (12-ая секунда нагрева – рис.11,а) распределение температуры существенно неравномерное, а в стационарном режиме (этап стабилизации температуры) влияние этих факторов незначительно (рис. 11,б).

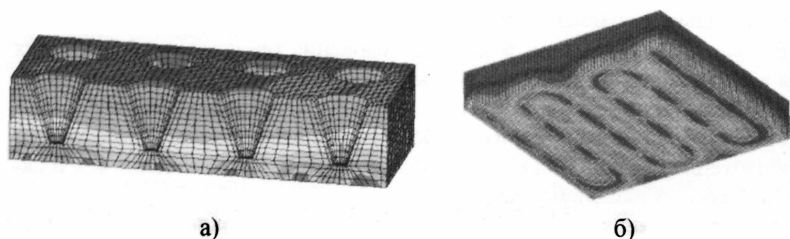


Рис. 10.

Влияние источников тепла на однородность теплового поля: а – разрез по пластине-держателю, б – вид снизу

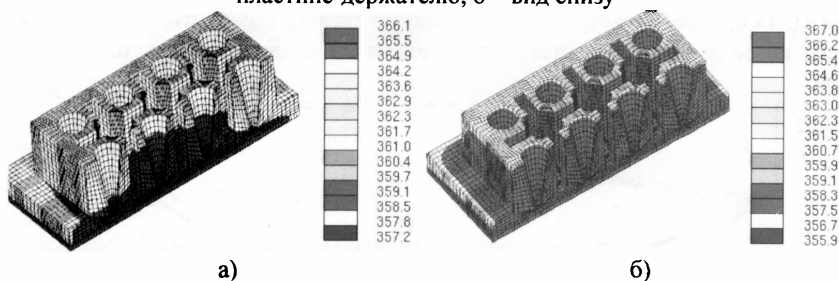


Рис. 11.

Влияние условий взаимодействия с окружающей средой и геометрических характеристик пластины-держателя: а – динамический режим (12-ая секунда нагрева), б – этап стабилизации температуры

Проведены комплексные численные исследования тепловых блоков различной вместимости (96-, 16- и 32-луночные) на основе термоэлектрических элементов. Были исследованы влияния: режимов работы вентилятора, выбора материала пластины-держателя, мощности элемента Пельтье, геометрических размеров и формы пластины-держателя и других факторов на работу тепловых блоков амплификаторов ДНК. На рис. 12 показаны изменения температуры 96-луночной пластины-держателя (1) и радиатора (2) теплового блока в процессе исполнения температурного протокола.

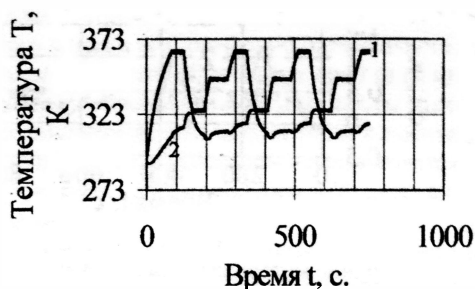


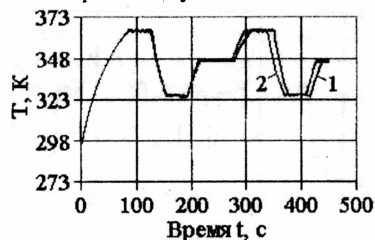
Рис. 12.

Изменения температуры пластины-держателя в процессе исполнения температурного протокола.

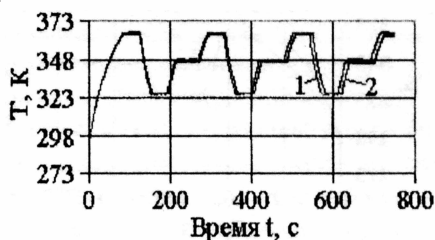
1 – центральная ячейка пластины-держателя, 2 – центр радиатора

повышение скорости нагрева/охлаждения (рис. 13,б). Хороших результатов в повышении скорости нагрева/охлаждения можно добиться управлением режимом работы вентилятора, применяя для изготовления пластины держателя сплав Д16Т (рис. 13,а).

Улучшение динамических характеристик теплового блока достигнуто совершенствованием геометрической формы пластины-держателя (рис. 15). Кривые изменения температуры для исходного и облегченного варианта при прочих равных условиях показаны на рис. 16. Применение облегченной формы не привело к увеличению неоднородности теплового поля.



а)



б)

Рис. 13.

Изменение температуры пластины-держателя. а) в зависимости от режима работы вентилятора. 1 – скорость воздуха 5 м/с, вентилятор работает постоянно, 2 – скорость воздуха 2 м/с, вентилятор включается на режимах охлаждения и термостабилизации; б) – в зависимости от материала пластины-держателя (1 – серебро, 2 – сплав Д16Т)

Данные по влиянию режима работы вентилятора и материала пластины-держателя на характер изменения температуры рабочего тела в ходе процесса приведены на рис. 13 и 14. Из полученных результатов следует, что использование серебра позволяет значительно снизить разброс температуры (до 0,6 К) по пластине держателю в динамическом режиме (рис. 14) и не оказывает существенного влияния на по-

На рис. 17 приведены данные расчета разброса температуры по рабочему телу (пластине-держателю) 32-луночного теплового блока. Из рисунка видно, что на этапах стабилизации температуры максимальный разброс не превышает 0,1 К, а в динамическом режиме разброс находится в пределах (0,3 ... 0,4) К.

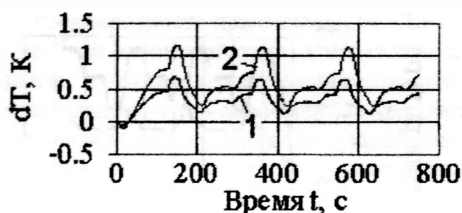
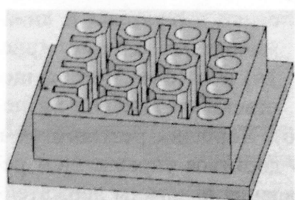


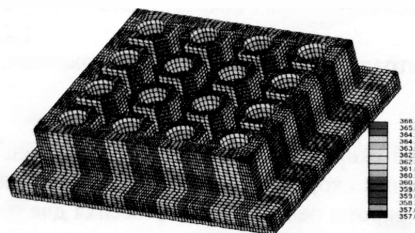
Рис. 14.

Влияние материала детали (пластины-держателя) на разброс температуры.

1 – серебро, 2 – сплав Д16Т



а)



б)

Рис. 15.

а – внешний вид облепченной пластины-держателя, б – тепловое поле облепченной пластины-держателя в процессе нагрева

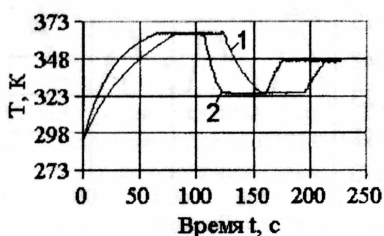


Рис. 16.

Температура центральной ячейки исходного 1 и облепченного 2 варианта пластины-держателя

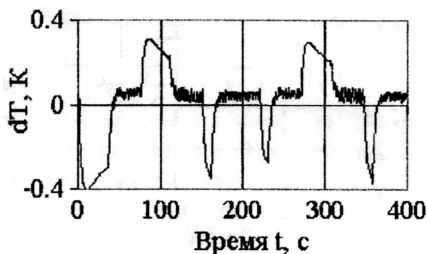


Рис. 17.

Разброс температуры по пластине-держателю 32-луночного теплового блока

Глава 6 посвящена разработке методики расчета, численным и экспериментальным исследованиям характеристик пневматических амплификаторов ДНК. Активная разработка пневматических амплификаторов ДНК обусловлена относительной простотой конструкции и необходимостью создания

12 К/с). Устройства данного типа отличаются большой вместимостью теплового блока и возможностью оптимального, с конструктивной точки зрения, размещения системы детекции при создании количественного амплификатора ДНК, предназначенного для работы в реальном времени. В пневматических амплификаторах подвод тепла к носителю (капилляр или микропробирка) с исследуемым образцом осуществляется за счет замещения рабочего тела – воздуха, перемещаемого побудителем расхода через преобразователь энергии.

Для сокращения времени расчета при компоновке и анализе рабочих характеристик исследуемых схем пневматических амплификаторов ДНК создана математическая модель, основанная на основных принципах равновесной термодинамики с сосредоточенными параметрами. Расчетная схема пневматического амплификатора ДНК приведена на рис. 18.

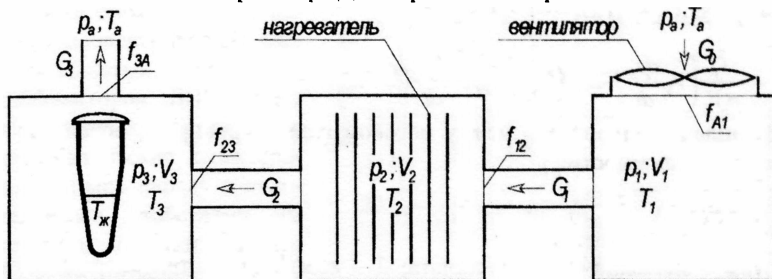


Рис. 18.

Расчетная схема пневматического амплификатора ДНК

Расчетная схема пневматического амплификатора ДНК представляет набор из трех пневматических емкостей, соединенных между собой и с окружающей средой условными дросселями с проходными сечениями f_{A1}, f_{12}, f_{23} и f_{3A} . На входе в емкость 1 установлен вентилятор, обеспечивающий подачу рабочего тела с расходом G_0 . Из емкости 1 рабочее тело (воздух) поступает в емкость 2 (расход G_1), в которой установлен преобразователь энергии – электрический нагреватель, и далее в емкость 3 (расход G_2), и оттуда выбрасывается в окружающую среду (расход G_3). Микропробирка с реакционной смесью размещена в емкости 3. $V_1, V_2, V_3, p_1, p_2, p_3, T_1, T_2$ и T_3 – объемы пневматических емкостей, давление и температура воздуха в емкостях соответственно, p_a и T_a – давление и температура воздуха окружающей среды. Математическая модель построена с учетом допущений: рабочее тело – идеальный газ, подчиняющийся термодинамическому уравнению состояния; процесс истечения – адиабатический; поток газа – установившийся; течение газа происходит без трения (отсутствуют диссипативные силы). Модель базируется на системе обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающих

изменение давления, температуры и теплового взаимодействия в открытой термодинамической системе:

$$\begin{aligned}\frac{dp_1}{dt} &= \frac{k}{V_1} (RT_a G_0 - RT_1 G_1); \quad \frac{dT_1}{dt} = \frac{T_1}{p_1 V_1} \left(V_1 \frac{dp_1}{dt} - RT_1 (G_a - G_1) \right); \\ \frac{dp_2}{dt} &= \frac{k}{V_2} \left(RT_1 G_1 - RT_2 G_2 + \frac{dQ_2}{dt} (k-1) \right); \\ \frac{dT_2}{dt} &= \frac{T_2}{p_2 V_2} \left(V_2 \frac{dp_2}{dt} - RT_2 (G_1 - G_2) + \frac{dQ_2}{dt} (k-1) \right); \\ \frac{dT_{cn}}{dt} &= \frac{P - \alpha S (T_{cn} - T_2)}{c_{cn} m_{cn}}; \quad \frac{dQ_2}{dt} = \alpha \cdot S \cdot (T_{cn} - T_2); \quad \frac{dT_{ж}}{dt} = \frac{Q}{c_{np} m_{np} + c_{ж} m_{ж}}; \quad \frac{dQ_3}{dt} = Q; \\ \frac{dp_3}{dt} &= \frac{k}{V_3} \left(RT_2 G_2 - RT_3 G_3 - \frac{dQ_3}{dt} (k-1) \right); \\ \frac{dT_3}{dt} &= \frac{T_3}{p_3 V_3} \left(V_3 \frac{dp_3}{dt} - RT_3 (G_2 - G_3) - \frac{dQ_3}{dt} (k-1) \right).\end{aligned}$$

Коэффициент теплоотдачи между потоком газа и пробиркой определен по известной зависимости:

$$\alpha_1 = \frac{\overline{Nu}_{ж} \cdot \lambda}{d_1},$$

где $\overline{Nu}_{ж}$ – значение числа Нуссельта; λ – коэффициент теплопередачи газа при определяющей температуре; d_1 – внешний диаметр пробирки, являющийся определяющим размером.

Для расчета числа Нуссельта использована критериальная зависимость для поперечного обтекания тела цилиндрической формы:

$$\overline{Nu}_{ж} = (0,43 + 0,55 \cdot Re_{ж}^{0,5} \cdot Pr_{ж}^{0,38}) \cdot \varepsilon_{\varphi}, \quad Re_{ж} = \frac{\overline{w} \cdot d_1}{\nu},$$

$\varepsilon_{\varphi} = 0,5$ – коэффициент, учитывающий угол между направлением течения потока и осью цилиндра.

Аналогичным образом вычислен коэффициент теплоотдачи между нагревательным элементом и рабочим телом. Число Нуссельта в данном случае:

$$\overline{Nu} = 0,41 Re^{0,6} \cdot Pr^{0,33} \cdot \left(\frac{Pr_{ж}}{Pr_c} \right)^{0,25} \cdot \varepsilon_s; \quad Re_{ж} = \frac{\overline{w} \cdot d}{\nu};$$

$$\varepsilon_s = (s_1/s_2)^{1/6} \quad \text{при } s_1/s_2 < 2; \quad \varepsilon_s = 1,12 \quad \text{при } s_1/s_2 \geq 2,$$

где w , м/с – средняя скорость газа; ν , м²/с – коэффициент кинематической вязкости газа, $Pr_{ж}$ – значение числа Прандтля для газа вычисляются при определяющей температуре, а Pr_c – значение числа Прандтля для газа при температуре спирали.

Для решения системы ОДУ используется жестко устойчивый метод

Гира. На базе созданной математической модели проведен комплекс численных исследований. Для проверки адекватности модели и подтверждения правомочности использования полученных результатов создан экспериментальный стенд. Сопоставление результатов теоретических и экспериментальных исследований температур жидкости в микропробирке и рабочего тела в третьей полости (рис. 19) показывают, что расхождение результатов расчета относительно данных, полученных опытным путем, не превышает (5 ... 10) %, что вполне приемлемо для инженерных расчетов и подтверждает правомочность использования разработанной математической модели при создании и исследовании пневматического амплификатора ДНК.

Глава 7 посвящена повышению эффективности и надежности твердотельных амплификаторов ДНК на основе термоэлектрических элементов Пельтье. Данный тип амплификаторов ДНК имеет наиболее высокие технические и потребительские характеристики. Однако наряду с положительными свойствами им присущи недостатки. Прежде всего – это ограниченный ресурс термоэлектрических элементов при работе в динамическом, реверсном режиме. В работе сформулированы основные технологические и конструктивные направления решения данной проблемы. Кроме того, разработана эффективная система автоматического регулирования температуры, позволяющая отказаться от импульсного (релейного) режима управления. Суть технологических решений заключается в применении новых типов модифицированных ТЭ марки ТМС-127-1.4-6.0 российского производства, выдерживающих до $2000 \cdot 10^3$ циклов испытаний. Базовые ТЭ отечественного производства, изготовленные по обычной технологии, выдерживают до $18 \cdot 10^3$ циклов, а лучшие аналогичные модули зарубежного производства (фирмы Ferrotec America Corporation (США) – $28 \cdot 10^3$ циклов. Применение модифицированных модулей позволяет увеличить ресурс работы амплификатора ДНК минимум в (30...40) раз.

Конструктивное совершенствование заключается в разработке комбинированной электро-термоэлектрической схемы блока нагрева/охлаждения. В плоскости стыка пластины-держателя и термоэлектрических элементов размещают толстопленочный электрический нагреватель, нанесенный на ке-

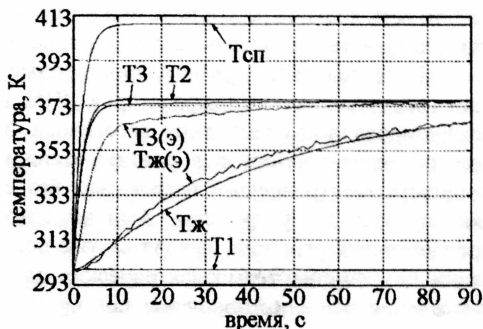


Рис. 19.

Сопоставление результатов теоретических и экспериментальных исследований.

$T_{ж(э)}, T_{ж}, T_3, T_{3(э)}$ – экспериментальное и расчетное значения температуры реакционной смеси и воздуха в полости 3

ралическую подложку. Это позволяет отказаться от использования термоэлектрических элементов Пельтье как источника тепла. Нагрев и стабилизация температуры пластины-держателя обеспечивает выделение тепла в электрическом нагревателе. Термоэлектрические элементы выполняют две функции: используются в качестве теплового насоса в режиме охлаждения пластины-держателя и в качестве вариаторов тепловых потоков. Впервые применение термоэлектрических устройств в качестве вариаторов теплообмена, реализующих обратный тепловой цикл и усиливающих (или ослабляющих) теплообмен, было описано В.С. Мартыновским и В.А. Наером. Применив комбинированную схему, можно создать эффект “теплового ключа”, то есть достичь результата, при котором теплота, выделяемая электрическим нагревателем, не передается на радиатор или значительно снижается.

Численные исследования, проведенные на математической модели расчета твердотельных амплификаторов ДНК, подтвердили работоспособность комбинированной схемы теплового блока. Установлено, что работа термоэлектрических элементов в режиме «теплового ключа» позволяет снизить мощность электрического нагревателя без существенной потери динамических показателей устройства. Амплификаторы ДНК, созданные на основе предложенных решений, находятся уже более пяти лет в реальной эксплуатации без замены термоэлектрических элементов. Это практическое подтверждение решения проблемы повышения надежности и ресурса данных изделий.

Глава 8 посвящена разработке, созданию и клиническим испытаниям амплификаторов ДНК. На основе предложенной в работе общей классификации и обобщенной структурной схемы синтезированы частные структурные схемы семейства твердотельных и пневматических устройств. На их базе и с учетом результатов численных исследований разработаны конструкции и созданы новые амплификаторы ДНК различного назначения.

Твердотельные амплификаторы ДНК

Амплификаторы ДНК: «Циклотемп-2», «Циклотемп-4» (рис. 20) и их более поздняя версия – «Циклотемп-106» (рис. 21) предназначены для обслуживания научно-исследовательских работ. Вместимость теплового блока – 24 микропробирки объемом 0,5 мл. Скорость изменения температуры (0,6...1,0) К/с, точность поддержания температуры $\pm 0,1$ К. Амплификаторы ДНК «Циклотемп-2», «Циклотемп-4» и «Циклотемп-106» прошли успешные испытания в ряде ведущих российских и зарубежных исследовательских центров.

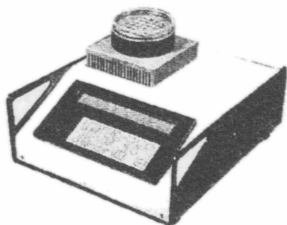


Рис. 20.

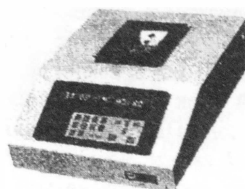


Рис. 21.

Амплификатор ДНК «Циклотемп-4» Амплификатор ДНК «Циклотемп-106»

Прецизионный программируемый термостат «Циклотемп-107» – амплификатор ДНК (рис. 22) предназначен для проведения любых лабораторных работ, требующих термостатирования реакционных смесей, и, прежде всего, для проведения ПЦР. Основные области применения – практическая медицина, фундаментальная наука, сельское хозяйство, судебно-медицинская экспертиза, система Роспотребнадзора. Отличительными характеристиками амплификатора ДНК «Циклотемп-107» являются: большая вместимость теплового блока - количество ячеек для образцов – 96 (0,2 мл) или 60 (0,5 мл); сменяемость теплового блока; высокая точность поддержания температуры ($\pm 0,15$ K) и равномерности теплового поля рабочего тела ($\pm 0,15$ K); высокая надежность. В данном устройстве используются 6 элементов ТМ-127-1,4-6,0 серии ТМС. Средняя скорость изменения температуры в цикле нагрев/охлаждение (313 K– 368 K– 313 K) – более 2,2 K/c; ресурс работы до замены микроохладителей – не менее 5 лет. Амплификатор ДНК «Циклотемп-107» снабжен системой защиты от испарения воды из реакционной смеси.

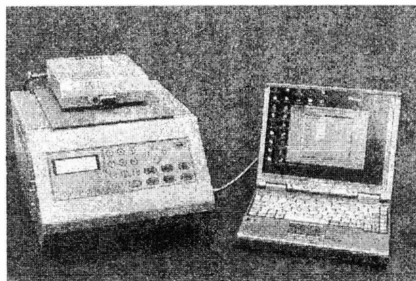


Рис. 22.
Амплификатор ДНК
«Циклотемп-107»



Рис. 23.
Анализатор нуклеиновых кислот
АНК 32

Анализаторы нуклеиновых кислот АНК 16 и АНК 32 (рис. 23) – одни из первых отечественных амплификаторов ДНК для количественного анализа в реальном времени включают: тепловой блок для проведения ПЦР и оптический блок для измерения сигнала флуоресценции образца. Изменение сигнала в ходе ПЦР пропорционально изменению количества ампликона в реакционной смеси. Четырехцветное измерение сигнала флуоресценции дает возможность наблюдать четыре независимых реакции в одном образце одновременно. Программное обеспечение позволяет задавать и контролировать условия проведения ПЦР и измерения флуоресценции, а также обрабатывать результаты и выдавать их в заданном виде. Количество ячеек для образцов – 16/32 (0,2 мл). Температурный диапазон – (273 ... 372) К. Точность поддержания температуры: $\pm 0,1$ К. Разброс температуры рабочего тела: $\pm 0,15$ К. Средняя скорость изменения температуры в цикле нагрев/охлаждение более 1,5 К/с.



Рис. 24.
Амплификатор ДНК для проведе-
ния ПЦР на биологических микро-
чипах

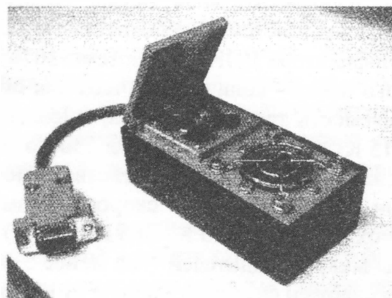


Рис. 23.
Мобильный
пневмомеханический амплификатор
ДНК

Амплификатор ДНК для проведения ПЦР на биологических микро-чипах (рис. 24) разработан по заказу института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Биологические микрочипы состоят из массива трех-мерных гидрофильных ячеек геля, расположенных на гидрофобной поверхности стекла. Основная область применения – практическая медицина, сельское хозяйство, судебно-медицинская экспертиза и др. Данные амплификаторы ДНК применяются в лаборатории биологических микрочипов в целом ряде приложений таких, как обнаружение возбудителей туберкулеза, идентификация вирусных агентов в донорской крови, детекция возбудителей особо опасных инфекций.

Отличительными особенностями данного типа амплификатора ДНК являются малые масса (0,15 кг) и габариты – (110x70x105) мм. Потребляемая (пиковая) мощность – 30 Вт при напряжении питания теплового блока – 12 В. Тип носителя исследуемых образцов – предметные стекла «in situ» или био-

логические микрочипы. Температурный диапазон – (308 ... 373) К. Точность поддержания и разброс температуры рабочего тела $\pm 0,15$ К и $\pm 0,1$ К соответственно. Средняя скорость изменения температуры: (3,5 ... 4,6) К/с.

Пневматические амплификаторы ДНК

С применением основных положений данной диссертации и на основе результатов численных исследований создан тепловой блок пневматического малогабаритного пневмомеханического амплификатора ДНК (рис. 23). Целью разработки является создание отечественного устройства с максимально высокими техническими характеристиками и возможностью работы в полевых условиях. Он может быть использован для проведения оперативной биологической разведки с целью индикации и идентификации агентов биологического воздействия по структуре их ДНК. Отличительными особенностями данного амплификатора ДНК являются малая масса (0,1кг) и габариты – (110x30x105) мм. Потребляемая (пиковая) мощность – 8 Вт при напряжении питания – 12 В. ПЦР проводится в одной микропробирке объемом 0,2 мл. Температурный диапазон: (308 ... 373) К. Точность поддержания и разброс температуры рабочего тела $\pm 0,2$ К и $\pm 0,1$ К соответственно. Средняя скорость изменения температуры до 3,5 К/с.

Амплификаторы ДНК «Циклотемп 107», АНК 16 и АНК 32 прошли приемочно-технические и клинические испытания, рекомендованы для применения в медицинской практике и внесены в государственный Реестр изделий медицинского назначения.

Основные результаты и выводы

1. Выделены основные классификационные признаки, на которых предложена общая классификация, позволяющая синтезировать новые структурные и конструктивные схемы амплификаторов ДНК.
2. Проведено исследование взаимодействия реакционной смеси и теплового блока амплификаторов ДНК. Показано, что с теплофизической точки зрения для получения максимального выхода ПЦР-продукта следует снижать объем реакционной смеси, интенсифицировать процесс отдачи тепла от рабочей среды к реакционной смеси и адаптировать температурный протокол процесса ПЦР для каждого типа амплификатора ДНК. Установлено, что одной из основных причин пониженной воспроизводимости результатов проведения ПЦР является неоднородность теплового поля рабочего тела в переходных режимах работы амплификаторов ДНК. Впервые произведен расчет энергетического воздействия химических и физико-химических реакций в ходе ПЦР на тепловое состояние реакционной смеси. Установлено, что теплота, выделяемая или поглощаемая в процессе химических и физико-химических реакций ($2,0 \cdot 10^{-5}$... $1,0 \cdot 10^{-4}$) Дж не вызывает существенного изменения теплового состояния реакционной смеси.
3. Разработана теория рабочих процессов, предложена методология расчета и создания оборудования для ПЦР-диагностики, основу которых составил системный подход к исследованию параметров амплификаторов ДНК.

4. Создана обобщенная структурная схема, определяющая характер взаимодействия компонентов теплового блока. На основе обобщенной структурной схемы построена концептуальная модель расчета процессов тепломассопереноса, которая позволяет формировать единый подход к созданию математических моделей амплификаторов ДНК, базирующихся на различных принципах действия.

5. На базе концептуальной модели расчета создана математическая модель расчета твердотельных амплификаторов ДНК, включающая общую расчетную схему, математическую модель твердотельных амплификаторов ДНК, математическую модель расчета термоэлектрических преобразователей энергии на основе законов неравновесной термодинамики. Разработаны методики и алгоритмы расчета твердотельных амплификаторов ДНК.

6. Проведены комплексные численные исследования влияния конструктивных и функциональных параметров на основные характеристики тепловых блоков амплификаторов ДНК. Проведены численные исследования различных вариантов тепловых блоков твердотельных амплификаторов ДНК на основе термоэлектрических элементов Пельтье и твердотельного комбинированного электромеханического амплификатора ДНК, в результате которых получены общие рекомендации по проектированию тепловых блоков твердотельных амплификаторов ДНК, направленные на повышение скорости нагрева/охлаждения и снижения разброса температуры рабочего тела.

7. На основе обобщенной структурной схемы создана математическая модель пневматического амплификатора ДНК. В основу модели заложены законы классической равновесной термодинамики для открытых систем. Созданы метод и алгоритм численного расчета пневматического амплификатора ДНК. Сопоставление результатов теоретических и экспериментальных исследований температур реакционной смеси и рабочего тела показали, что отклонение результатов расчета относительно данных, полученных опытным путем, не превышает (5...10) %. Подтверждено, что в пневматических амплификаторах ДНК реально достичь скорости изменения температуры рабочего тела (5...10) К/с в диапазоне от 298 К до 363 К.

8. Проведены исследования работы амплификаторов ДНК на основе термоэлектрических элементов, позволяющая в 30 ... 40 раз повысить ресурс их работы. Предложена комбинированная электро-термоэлектрическая схема блока нагрева/охлаждения, позволяющая отказаться от циклического режима работы термоэлектрических элементов. Численные исследования на базе созданной математической модели подтвердили работоспособность данной схемы. Амплификаторы ДНК, созданные на основе предложенных решений, находятся более пяти лет в реальной эксплуатации без замены термоэлектрических элементов, что на практике подтверждает решение проблемы повышения надежности и ресурса данных изделий.

9. Основные положения данной диссертации внедрены в практику создания и проектирования оборудования для ПЦР – диагностики в ООО «НПФ СТМ-

Ц», г. Москва, ЗАО «Ресурс-Прибор», г. Обнинск, ОАО «Приборный завод «Сигнал», г. Обнинск, Институте аналитического приборостроения (ИАНП) РАН, г. Санкт-Петербург.

10. На базе основных положений данной диссертации проведены исследования, разработаны и производятся следующие виды оборудования:

- амплификаторы ДНК: «Циклотемп-4», «Циклотемп-106» и «Циклотемп-107». Амплификатор ДНК «Циклотемп-107» рекомендован Комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ к серийному производству и применению в медицинской практике и внесен в Реестр изделий медицинского назначения. Совместное серийное производство амплификаторов ДНК «Циклотемп-107» организовано ОАО «Приборный завод Сигнал» и ЗАО «Ресурс-Прибор», г. Обнинск;

- анализаторы нуклеиновых кислот АНК 16, АНК 32 – амплификаторы ДНК для количественного анализа (разработаны в ИАНП РАН, г. Санкт-Петербург совместно с МГТУ им. Н.Э. Баумана), рекомендованы к серийному производству и применению в медицинской практике и внесены в Реестр изделий медицинского назначения. Серийное производство анализаторов нуклеиновых кислот АНК организовано ИАНП РАН, г. Санкт-Петербург совместно с ОАО «Приборный завод «Сигнал» и ЗАО «Ресурс-Прибор», г. Обнинск;

- амплификаторы ДНК для проведения ПЦР в биологических микрочипах. Данный тип устройств, впервые создан в России и является одним из первых в мировой практике;

- тепловой блок пневматического малогабаритного мобильного амплификатора ДНК. На базе данного устройства в ИАНП РАН, г. Санкт-Петербург проводится разработка малогабаритного экспресс-анализатора на присутствие биологических агентов непосредственно в зоне предполагаемого воздействия.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах

1. Никитин Ю.Ф., Рыков Н.А., Чернышев А.В. Основы расчета стационарных процессов в теплоэлектрических приводах исполнительных устройств пневматических и вакуумных систем // Труды МВТУ им. Н.Э. Баумана. – М.: Изд-во МВТУ им. Н.Э. Баумана, 1978. - № 269, вып. 4. - С. 22-23.
2. Никитин Ю.Ф., Терентьев О.Д., Чернышев А.В. Моделирование исполнительных устройств систем управления // Известия Вузов. - 1985. - №11. - С. 48-50.
3. Вопросы теории и расчета пневмопривода / М.Н. Кокорев, А.А. Рязанов, А.В. Чернышев; МВТУ им. Н.Э. Баумана. - М., 1984. - 48 с. - Деп. в ЦИНТИхимнефтемаш 06.06.84, № 1120.
4. Чернышев А.В., Белова О.В. Разработка, расчет и проектирование пневмоэлектромеханического и электровакуумного оборудования. Термостатирующие устройства. Мет. ук. - М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 1997. – 16 с.

5. Чернышев А.В., Белова О.В. Метод решения сопряженной задачи конвективного теплообмена на примере термостатирующего устройства // Вестник МГТУ. Сер. Машиностроение. - 1998. - № 4. - С. 77-87.
6. Чернышев А.В. Повышение эффективности программируемых термостатирующих устройств на основе термоэлектрических микроохладителей // Конверсия в машиностроении. – 2002. - № 6. - С. 134-139.
7. Чернышев А.В. Основы теории расчета электропневмомеханического оборудования для анализа ДНК / Научное приборостроение. – 2002. -Том 12, № 1. - С. 53-65.
8. Чернышев А.В., Друца В.Л. Проблемы создания оборудования для медицинской ПЦР диагностики // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. - №12. - С. 18.
9. Белова О.В., Чернышев А.В. Метод математического моделирования тепловых источников в термоэлектрических элементах Пельтье / Научное приборостроение. – 2004. – Том 14, № 1. - С. 51-57.
10. Чернышев А.В., Бакай Д.А. К вопросу исследования однородности теплового поля пластины держателя твердотельного амплификатора ДНК / Научное приборостроение. – 2004. - Том.14, №4 - С. 10-19.
11. Моделирование теплового состояния микропробирок с образцами в ходе полимеразной цепной реакции / А.В. Чернышев, Д.А. Бакай, В.Е. Курочкин, В.Н. Соколов, Е.Ю. Скоблилов // Научное приборостроение. – 2005. -Том 15, №3. - С. 54-62.
12. Разработка математической модели пневматической системы термостабилизации / А.В. Чернышев, К.Е. Демихов, А.В. Полинков и др. // Научное приборостроение. – 2006. -Том 16, № 1. - С. 53-65.
13. Пат. 43871 РФ, МПК⁷ С12М 1/34. Программируемый термостат. / А.В. Чернышев, А.В. Полинков (РФ) - № 43871. Заявлено 24.08.2004; Оpubл. 10.02.2005 Бюл. № 4. – 2 с.
14. Чернышев А.В., Белова О.В. Разработка обобщенной структурной и концептуальной модели амплификаторов ДНК / Научное приборостроение. – 2006. - Том 16, № 2. - С. 58-65.
15. Моделирование тепловых процессов в ПЦР-смеси амплификатора ДНК / А.В. Чернышев, О.В. Белова, В.Л. Друца, А.А. Крутиков // Технологии живых систем. – 2006. - Том 3, № 3. – С. 3-16.
16. Чернышев А.В. Исследование теплофизических процессов в термоблоке амплифактора ДНК / Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005. - №9, С. 40-46.

Подписано к печати 14.07.06г.
Зак. Объем 2,25 пл. тир. 120
Типография МГТУ им. Н.Э. Баумана
105005, Москва, ул. 2-я Бауманская, 5