

14;15

Метод бесконтактного измерения температуры в реакторах полимеразной цепной реакции

© Д.Г. Сочивко¹, Д.А. Варламов², А.А. Федоров³, В.Е. Курочкин³

¹ ЗАО „Синтол“, Москва

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

³ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

E-mail: f_aa@mail.ru

Поступило в Редакцию 27 ноября 2015 г.

Предложен новый метод бесконтактного измерения температуры жидкости на основе флуоресцентных зондов. Метод позволяет измерять температуру реакционной среды в реакторах приборов для полимеразной цепной реакции в реальном времени и может быть использован для оценки динамических температурных параметров.

Непрерывное измерение температуры в малых объемах жидкой среды представляет собой нетривиальную задачу. Использование датчиков, таких как термопары, не всегда возможно по двум основным причинам. Во-первых, такой метод измерения обладает инертностью, определяемой массой измерительного элемента и скоростью выравнивания его температуры при изменении температуры среды. При большой массе датчика, относительно массы оцениваемой среды, его присутствие будет вносить существенные искажения в динамику изменения температуры среды, в результате чего измерения становятся неинформативными в принципе. Во-вторых, датчик должен находиться в контакте с измеряемой средой, что не всегда возможно технически, например, если среда должна находиться в герметично закрытом реакторе. Кроме того, использование датчиков не позволяет анализировать пространственное распределение температуры при наличии температурной неоднородности среды, что весьма вероятно в ходе нагрева или охлаждения исследуемого объекта.

Бесконтактные методы измерения температуры лишены упомянутых недостатков. Одним из используемых методов является измерение

собственного теплового излучения исследуемого объекта с помощью ИК-датчика либо тепловизора. Другой бесконтактный метод измерения температуры основан на применении флуоресцентных зондов, чувствительных к температуре среды [1]. Данный метод удобен тем, что позволяет исследовать процессы в закрытых емкостях, в том числе микролитровых объемах, из материала, прозрачного для видимого света [2]. Измерение проводят с помощью флуориметрических детекторов различного рода.

Так, в работе [3] было предложено использовать в качестве зонда для измерения флуоресцентный краситель родамин В, квантовый выход флуоресценции которого зависит от температуры по причине подвижности аминогрупп в составе молекулы. Коэффициент температурной зависимости его флуоресценции в диапазоне измеряемых температур составил $2.3\% \text{K}^{-1}$, что позволило авторам проводить измерения с погрешностью $\pm 1.4 \text{K}$ (95%-й доверительный интервал). В работе [4] для регистрации температуры был применен сульфородамин В с максимальной температурной зависимостью $1.55\% \text{K}^{-1}$ при длине волны возбуждающего света 560 nm. При длинах волн 470–483 nm, использованных в указанной работе для измерения температуры, температурная зависимость флуоресценции сульфородамина В составила $1.19\% \text{K}^{-1}$ [4].

Целью нашей работы была разработка метода бесконтактного измерения температуры в реакторах приборов для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ является одним из наиболее широко применяемых методов молекулярно-генетического анализа, используемым в медицине, сельском хозяйстве, криминалистике и многих других областях. Для проведения ПЦР необходимо обеспечить циклическое нагревание и охлаждение реакционной среды между различными заданными уровнями температуры в диапазоне от 60 до 95°C. Приборы для ПЦР-РВ представляют собой комбинацию управляемого термостата и флуориметрического детектора для измерения концентрации продуктов реакции. Поскольку для практического применения анализа важно выполнять его за минимальное время, стараются сокращать длительность переходных процессов в ходе термоциклирования [5]. Для этого производители приборов стремятся увеличить скорость нагрева и охлаждения термостата. Однако система „термостат–реактор–реакционная смесь“ обладает существенной инерцией, поскольку тепловой контакт между стенками термостата и реактора неидеален, в объеме смеси отсутствует механическое перемешивание, а выравнивание температуры происходит преимущественно за счет

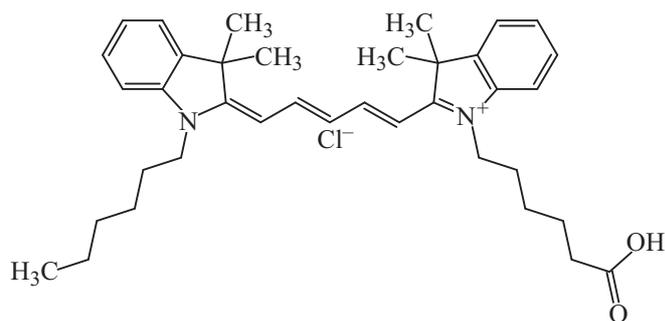


Рис. 1. Структурная формула флуоресцентного зонда Cy5 (1-[6-гексил]-1'-[6-гексановая кислота]-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианина хлорид).

конвекции. Из практики известно, что константа времени для тепловых переходов внутри реактора составляет примерно 10 с. Известно, что в различных приборах для ПЦР-РВ скорость выравнивания температуры в реакторах существенно отличается [5,6]. От скорости этого процесса и динамической равномерности температуры, понимаемой как минимальное отклонение констант скорости для отдельных реакторов от среднего значения, существенно зависит погрешность количественного анализа на основе ПЦР-РВ [7,8]. В реакторах с более медленным выравниванием температуры эффективность ПЦР падает, поскольку в этом случае недостаточно времени для полного протекания реакции.

Для экспериментального анализа тепловых процессов в реакторах приборов ПЦР-РВ нами был адаптирован метод бесконтактного измерения температуры на основе флуоресцентных зондов. В качестве зонда был использован индодикарбоцианиновый флуоресцентный краситель Cy5 (рис. 1), применяемый в молекулярной биологии в качестве длинноволнового флуорофора (длина волны возбуждения 645 нм, эмиссии 670 нм). Флуоресценция красителей данного типа определяется цепью сопряженных двойных связей, соединяющих два индольных ядра, при этом длина волны флуоресценции пропорциональна длине этой цепи. Такая система является весьма подвижной, что и определяет, по видимому, чувствительность ее флуоресценции к температуре.

Измерения проводили при объеме реакционной смеси 25 μL , содержащей 0.2- μM водный раствор флуоресцентного зонда Cy5. В качестве реактора использовали стандартные микропробирки для ПЦР объе-

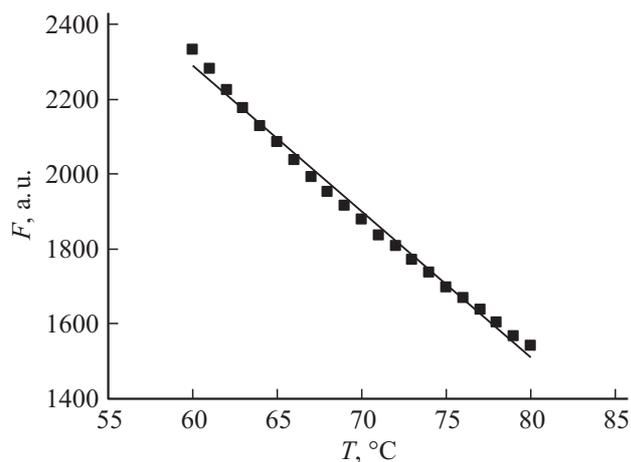


Рис. 2. Зависимость флуоресценции зонда Су5 от температуры.

мом 0.2 mL. Зависимость флуоресценции от температуры в исследуемом диапазоне температур достаточно линейна (рис. 2), отклонение от линейности на концах диапазона не превышает 0.3 К. Коэффициент температурной зависимости составил $2.1\% \text{ K}^{-1}$, что существенно лучше, чем в работе [4], и близко к результату, полученному в [3]. Случайная погрешность измерения температуры при интервале измерения 0.5 s на точку составила $\pm 0.33 \text{ K}$ (95%-й доверительный интервал).

Данная методика позволила оценить скорость переходных тепловых процессов в реакторах приборов для ПЦР-РВ серии АНК, разрабатываемых ИАП РАН. На рис. 3 приведен пример результатов регистрации переходных процессов в двух реакторах (тонкие линии) и тепловом блоке термостата. В качестве примера были выбраны реакторы, наиболее отличающиеся по скорости переходных процессов. Значения температур в интервалах 1, 2 и 3 составили 60, 80 и 60°C соответственно. Скорость изменения температуры термостата составляла 1.7° C/s . Приведенные на графике значения нормированы к разности значений флуоресценции между первым и вторым интервалами. Для количественного анализа динамики температуры реакционной среды значения флуоресценции в интервале 20–66 s были аппроксимированы экспоненциальной зависимостью.

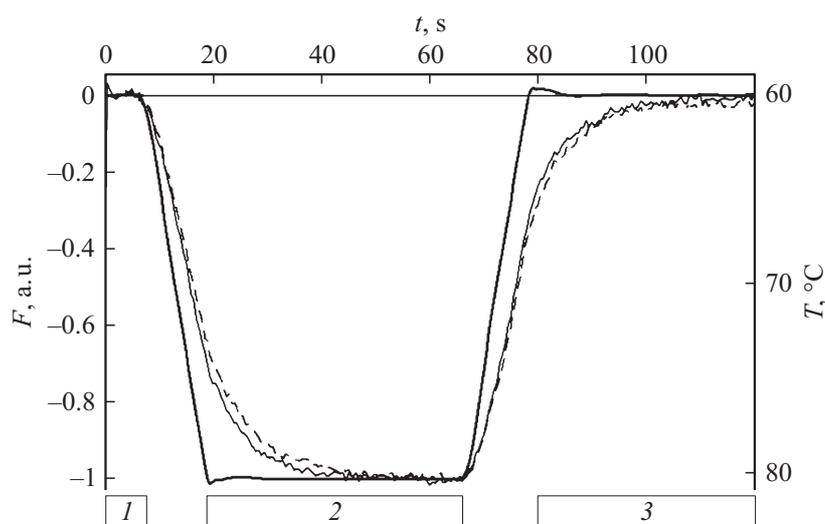


Рис. 3. Регистрация флуоресценции в двух реакторах прибора для ПЦР-РВ серии АНК. Тонкие линии — обратная нормализованная зависимость флуоресценции от времени. Толстая линия — зависимость температуры термостата от времени.

С помощью описанной выше методики было исследовано влияние прижима крышки термостата на качество теплового контакта между стенками термостата и реактора, характеризуемое скоростью и равномерностью прогрева среды в реакторах прибора для ПЦР-РВ. Для этого проводили измерение флуоресценции в реакторах и оценивали константу времени экспоненциальной зависимости, аппроксимирующей зависимость флуоресценции от времени. Далее, увеличивали прижимное усилие, подаваемое на крышку термостата, и снова оценивали константу времени изменения флуоресценции. Полученные значения до и после усиления прижима составили 7.5 ± 0.5 и 7.0 ± 0.4 s соответственно. Таким образом, качество теплового контакта может быть повышено путем увеличения в известных пределах усилия прижима крышки термостата. Также было обнаружено, что тепловой контакт улучшается при предварительном прогреве системы до $95^\circ C$ в течение нескольких минут, о чем свидетельствует снижение константы вре-

мени до 6.0 ± 0.5 s. Данный эффект, вероятно, является результатом деформации реактора, приводящей к его более плотной усадке в ячейке теплового блока.

Полученные результаты показывают, что предложенный метод бесконтактного измерения температуры является эффективным инструментом для исследования тепловых процессов в реакторах приборов для ПЦР-РВ. Такие исследования играют важную роль при разработке новых приборов с улучшенными тепловыми характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках мероприятия 1.3 ФЦП „Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы“ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0095) с использованием оборудования Центра коллективного пользования „ВНИИСБ“ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии (уникальный идентификационный номер RFMEFI62114X0003).

Список литературы

- [1] *Lou J., Finegan T.M., Mohsen P., Hatton T.A., Laibinis P.E.* // *Rev. Anal. Chem.* 1999. V. 18. N 4. P. 235–284.
- [2] *Lee J., Kotov N.A.* // *Nano Today.* 2007. V. 2. N 1. P. 48–51.
- [3] *Sakakibara J., Adrian R.J.* // *Exp. Fluids.* 1999. V. 26. P. 7–15.
- [4] *Sanford L.N., Wittwer C.T.* // *Anal. Biochem.* 2013. V. 434. P. 26–33.
- [5] *Kim Y.H., Yang I., Bae Y.-S., Park S.-R.* // *BioTechniques.* 2008. V. 44. N 4. P. 495–505.
- [6] *Schoder D., Schmalwieser A., Schaubberger G., Hoorfar J., Kuhn M., Wagner M.* // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V. 43. N 6. P. 2724–2728.
- [7] *Saunders G.C., Dukes J., Parkes H.C., Cornett J.H.* // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. N 1. P. 47–55.
- [8] *Yang I., Kim Y.H., Byun J.Y., Park S.R.* // *Anal. Biochem.* 2005. V. 338. N 2. P. 192–200.