

01

Исследование влияния тепловых процессов в детектирующем амплификаторе на результаты анализа методом плавления ДНК высокого разрешения

© А.Л. Буляница, А.С. Альдекеева, Д.А. Белов

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: belov.da@list.ru

Поступило в Редакцию 1 декабря 2025 г.

В окончательной редакции 5 января 2026 г.

Принято к публикации 14 января 2026 г.

Для успешной реализации метода плавления ДНК высокого разрешения требуется прецизионное обеспечение температурных режимов. Представлены результаты численного моделирования тепловых процессов в тепловом блоке детектирующего амплификатора, а также соответствующие аналитические решения в пространственно одномерном приближении и при однородной по теплопроводности среде. Даны экспериментальные оценки распределения температуры на детектирующем амплификаторе при реализации различных режимов нагрева. Полученные результаты позволят уменьшить погрешности определения температуры плавления путем выбора условий анализа и/или внесения поправки на систематическую погрешность и могут быть применены при разработке новых приборов.

Ключевые слова: плавление ДНК, численное моделирование, температурное поле, флуоресценция, теплопроводность.

DOI: 10.61011/PJTF.2026.09.62703.20587

Плавление ДНК, также называемое денатурацией или переходом спираль–клубок, является основным источником информации об энергетике двойной спирали ДНК [1,2]. Современный метод плавления ДНК высокого разрешения (HRM) основан на мониторинге процесса разрыва водородных связей между комплементарными цепями двуцепочечной ДНК при повышении температуры в присутствии флуоресцентных красителей [3,4]. Различия в нуклеотидном составе (однонуклеотидные полиморфизмы, эпигенетические модификации) влияют на температуру плавления ДНК T_m и форму графика плавления (зависимости интенсивности флуоресценции от температуры), что фиксируется высокочувствительными приборами — детектирующими амплификаторами [5]. Достоверность выявления этих различий напрямую зависит от точного определения температуры T_m [6], а время проведения анализа — от скорости изменения температуры пробы.

Реализация высокоскоростного HRM ($8\text{ }^\circ\text{C/s}$) позволила помимо обеспечения меньшего времени проведения анализа увеличить достоверность его проведения [7]. В работе [8] показано, что незначительные различия в температурах T_m легче обнаружить при более высоких скоростях плавления. Актуальной является оценка влияния тепловых процессов, обусловленных особенностями приборной реализации HRM, на результаты анализа.

В большинстве детектирующих амплификаторов тепловой режим обеспечивается элементами Пельтье, имеющими тепловой контакт с металлическим держателем пробирок с одной стороны и с радиатором, обдуваемым потоком воздуха от вентилятора, с другой сторо-

ны (рис. 1). Температура держателя пробирок регулируется по показаниям датчиков AD590JF (Analog Devices) с максимальной абсолютной погрешностью $\pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$. Пробирки с образцами, помещенные в лунки держателя пробирок, сверху прижимаются тепловой крышкой, предотвращающей образование конденсата на стенках пробирок за счет нагрева, как правило, до $105\text{ }^\circ\text{C}$.

В настоящей работе предложено аналитическое решение уравнения теплопроводности применительно к „усредненной“ среде. Уравнение нестационарное, про-

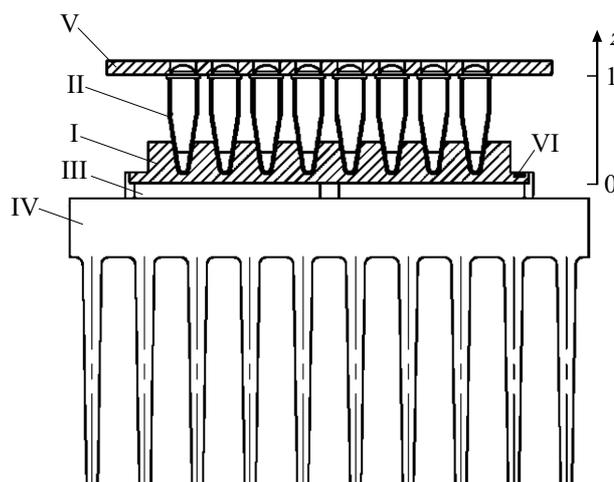


Рис. 1. Схематическое изображение теплового блока детектирующего амплификатора в поперечном разрезе. I — держатель пробирок, II — пробирки III — элементы Пельтье, IV — радиатор, V — тепловая крышка, VI — датчик температуры.

странственно одномерное (вертикальная нормированная координата z), где уровень нуля — поверхность (низ), на которой осуществляется температурное управление либо скачком ΔT , либо по линейному закону bt ; на верхней границе задана постоянная температура T_0 . Аналитическое решение позволяет установить связь между температурой управления при $z = 0$ и границами температуры в пробирке с пробой и внести поправку на систематическую ошибку при определении температуры T_m .

Переход к одномерному моделированию базируется на решении (бесконечная сумма) для примера [9] с граничным условием $\frac{dT}{dr} + haT = 0$ с малым теплообменом ($ha \ll 1$). Для оценки соотношения между температурными изменениями в радиальной плоскости и в вертикальном направлении можно ограничиться слагаемым суммы с первым положительным корнем уравнения $\gamma_1 J_1(\gamma_1) = ha J_0(\gamma_1)$, где J_k — цилиндрическая функция Бесселя первого рода порядка k . Радиальные вариации температуры определяются изменением функции Бесселя от 1 до $J_0(\gamma_1)$, вертикальные связаны с изменением гиперболического косинуса от 1 до $ch(\gamma_1 l/a)$. Если взять для примера $ha = 0.3$, то диапазон значений функции Бесселя 0.865–1, а для отношения высота/радиус $l/a = 5$ гиперболический косинус изменяется в пределах 1–20.748, при использовании пробирок для ПЦР-РВ объемом 0.2 ml (радиус 6 mm, высота 22 mm) $l/a > 7$. Таким образом, теплоперенос в вертикальном направлении многократно превосходит радиальный, и можно им ограничиться.

Для удобства расчетов все значения температуры смещены на уровень начальной температуры. Наименьшая постоянная времени, соответствующая нормированному значению коэффициента теплопроводности, составила около 2.2 s^{-1} .

Задача получения математически точных, но физически приближенных зависимостей температуры в пробирке, что соответствует $z = [0.1; 0.15]$, решается классическим методом разделения переменных (Фурье) с последующим разложением решения по собственным функциям вида $\sin(\pi j z)$, $j = 1, 2, \dots$.

Для первого варианта — скачок температуры на 2°C на границе снизу держателя пробирок $z = 0$ (заданная температура управления) и далее поддержание температуры постоянной — расчетные кривые температуры внизу пробы ($z = 0.1$) и вверху пробы ($z = 0.15$) приведены на рис. 2.

Расчетные формулы по методу разделения переменных для данной задачи теплопроводности следующие:

$$T(z, t) = \Delta T + (T_0 - \Delta T)z + \sum_{j=1}^{\infty} \alpha_j \exp(-a^2(\pi j)^2 t) \sin(\pi j z),$$

где

$$\alpha_j = -\frac{2}{\pi j} \left((1 - (-1)^j) \Delta T + (-1)^j (T_0 - \Delta T) \right).$$

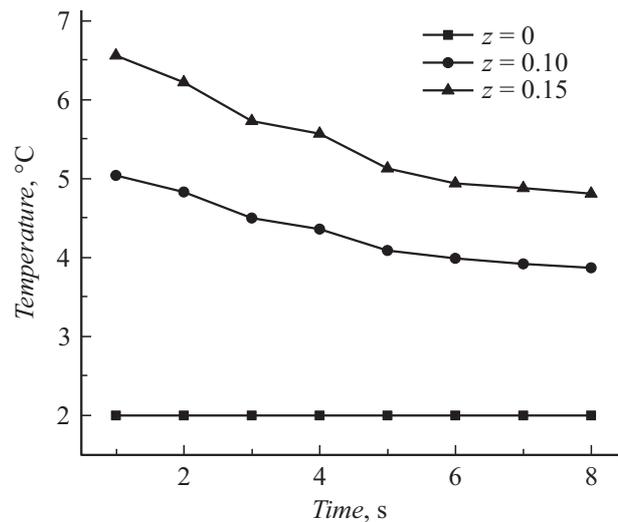


Рис. 2. Расчетные значения температур внизу пробы ($z = 0.10$) и вверху пробы ($z = 0.15$); управляющая температура снизу держателя пробирок ($z = 0$).

Наблюдается систематическое существенное расхождение температуры с управляющей температурой, которое убывает по мере завершения процесса ее установления. При этом а) заметные изменения температуры наблюдаются при временах, превышающих трехкратную величину указанной выше постоянной времени 2.2 s^{-1} ; б) расхождение температур в пределах пробирки снижается с 1.5 до $\sim 1^\circ\text{C}$.

Рис. 3 иллюстрирует модельную динамику температур в пробирке с пробой при управлении по линейному закону bt с различными значениями скорости изменения b . Температура 2°C достигается к временам 8, 4 и 2.5 s соответственно.

Расчетные формулы для подобного варианта управления температурой имеют вид

$$T(z, t) = b(1 - z)t + T_0 z + \sum_{j=1}^{\infty} \sin(\pi j z) \left[\beta_j \exp(-a^2(\pi j)^2 t) + \gamma_j (1 - \exp(-a^2(\pi j)^2 t)) \right],$$

где

$$\beta_j = \frac{2T_0(-1)^j}{\pi j},$$

$$\gamma_j = -\frac{2b}{a^2(\pi j)^3}.$$

При наибольшем из трех рассмотренных вариантов значений скорости нагрева расхождение между температурой в пробирке и управляющей температурой составляет всего $0.08 - 0.20^\circ\text{C}$, разброс температур в пределах пробы в пробирке также достаточно мал. Рассматриваемые времена практически сопоставимы с наименьшей постоянной времени, и это состояние распределения температуры было бы далеко от стационарного, если

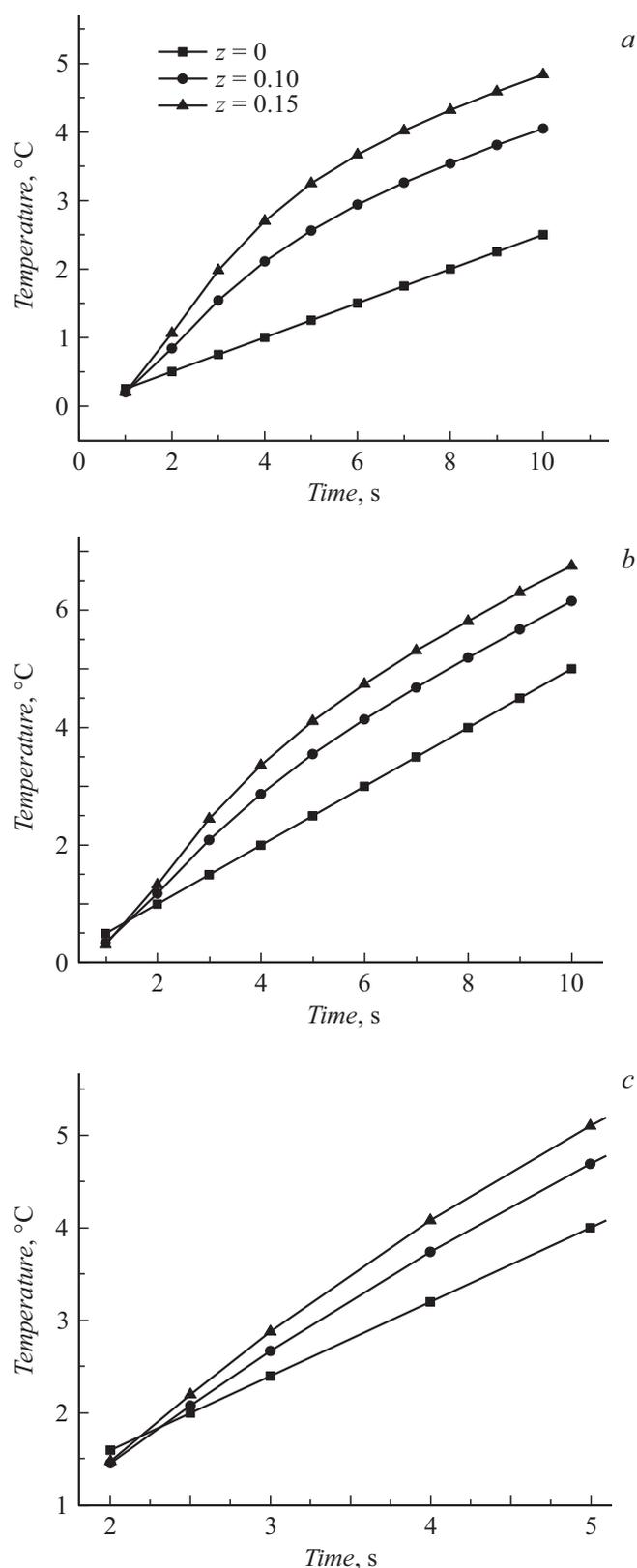


Рис. 3. Расчетные значения температур в пробирке с пробой при управлении по линейному закону bt при $b = 0.25$ (a), 0.5 (b) и 0.8 °C/s (c).

бы таковое было возможно в рассматриваемом случае. Следовательно, даже в рамках модельного расчетного решения возможно определить режим линейного температурного управления, который был бы оптимален с точки зрения минимума расхождения между температурой в пробе и управляющей температурой.

Оценка влияния скоростей изменения температур на неравномерность температур выполнялась посредством анализа T_m двух образцов ДНК с температурами плавления около 60 и 80 °C, содержащих флуоресцентные красители FAM и гасители RTQ1 (Синтол, Россия), ковалентно присоединенные на 5'- и 3'-концах соответственно. Графики плавления получены на амплификаторе АНК-48 (ИАП РАН, Санкт-Петербург) при нагревании анализируемых образцов в диапазоне 45 – 90 °C с предварительным термостатированием при 95 °C в течение 60 s.

Обработка графиков выполнялась путем аппроксимации сигмоидальной функцией в среде MATLAB с определением температур T_m по экстремумам их первых производных [10].

Экспериментально получены данные по средним значениям и среднеквадратичным отклонениям (СКО) σ температур плавления двух проб ДНК в 48 пробирках при трехкратном повторе измерений при пяти различных скоростях изменения управляющей температуры по линейному закону bt , где $b = 0.05, 0.1, 0.25, 0.5$ и 0.8 °C/s, общее число измерений — 30 (рис. 4).

При установлении температуры около 60 °C зависимость СКО σ от b имеет близкий к линейному вид: $\sigma = (0.082 \pm 0.023) + (0.744 \pm 0.053)b$ (коэффициент детерминации $R^2 \geq 0.93$). Аналогичная зависимость для управляющей температуры около 80 °C имеет схожий вид: $\sigma = (0.057 \pm 0.031) + (0.716 \pm 0.071)b$ ($R^2 \geq 0.97$). Обе эти зависимости не проходят через нуль, что может объясняться случайной составляющей измерений температуры, а фактор увеличения σ с ростом температуры может объясняться эффектом усиления неравномерности нагрева в пределах пробирки. Можно предположить, что для образцов с другими значениями T_m , варьирующимися, как правило, в диапазоне 55 – 95 °C, выявленные зависимости сохранят свой линейный характер.

Таким образом, предположение [6,7] о целесообразности обеспечения высоких скоростей нагрева проб для повышения достоверности результатов при реализации анализа методом HRM осталось неподтвержденным с точки зрения тепловых процессов, протекающих в тепловом блоке детектирующего амплификатора, из-за увеличения неравномерности температурного поля. При этом выявленные зависимости позволяют учесть систематическую составляющую погрешности определения температуры T_m , связанную с различием управляющей температуры и температуры образцов, путем ее суммирования со значением T_m , определяемым амплификатором АНК-48.

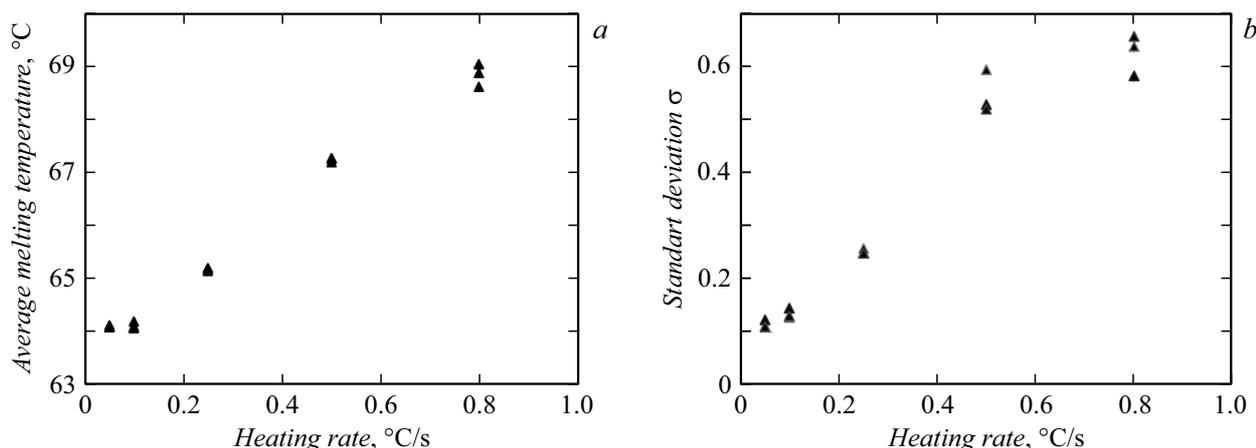


Рис. 4. Значения средних температур плавления 48 образцов (a) и их СКО (b) в зависимости от скоростей нагрева.

Можно предположить, что существуют два фактора, действующие в условно противоположных направлениях, и соответственно есть нетривиальный оптимум, позволяющий достичь разумного компромисса.

Стационарное распределение температуры в пределах пробы предполагает линейное изменение температур, т.е. закладывается разница температур в пределах этой пробы. При постановке задачи уменьшения градиента температур в пределах проб целесообразно дожидаться завершения стационарных процессов и фиксировать температуру на временах, сопоставимых с наименьшей постоянной времени.

Финансирование работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00492).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A. Vologodskii, M.D. Frank-Kamenetskii, *Phys. Life Rev.*, **25**, 1 (2018). DOI: 10.1016/j.pprev.2017.11.012
- [2] I.V. Likhachev, A.S. Shigaev, V.D. Lakhno, *Phys. Lett. A*, **510**, 129547 (2024). DOI: 10.1016/j.physleta.2024.129547
- [3] C.T. Wittwer, A.C. Hemmert, J.O. Kent, N.A. Rejali, *Mol. Aspects Med.*, **97**, 101268 (2024). DOI: 10.1016/j.mam.2024.101268
- [4] A.A. Федоров, Д.Г. Сочивко, Д.А. Варламов, *ЖТФ*, **90** (9), 1581 (2020). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49693.422-19 [A.A. Fedorov, D.G. Sochivko, D.A. Varlamov, *Tech. Phys.*, **65** (9), 1516 (2020). DOI: 10.1134/S1063784220090169].
- [5] I.V. Botezatu, V.N. Kondratova, A.M. Stroganova, *Clin. Chim. Acta*, **551**, 117591 (2023). DOI: 10.1016/j.cca.2023.117591
- [6] O.I. Mir, U.K. Gupta, I. Qasim, A.A. Pandith, F.A. Mir, *Nano TransMed*, **3**, 100047 (2024). DOI: 10.1016/j.ntm.2024.100047

- [7] J.T. Myrick, R.J. Pryor, R.A. Palais, S.J. Ison, L. Sanford, Z.L. Dwight, J.J. Huuskonen, S.O. Sundberg, C.T. Wittwer, *Clin. Chem.*, **65** (2), 263 (2019). DOI: 10.1373/clinchem.2018.296608
- [8] M. Li, R.A. Palais, L. Zhou, C.T. Wittwer, *Anal. Biochem.*, **539**, 90 (2017). DOI: 10.1016/j.ab.2017.10.015
- [9] Г.А. Жукова-Малицкая, Ю.Н. Кузьмин, *Задачи по математической физике* (ЛПИИ, 1984), с. 58.
- [10] V.E. Kurochkin, D.A. Belov, Yu.V. Belov, A.N. Zubik, *Biomed. Eng.*, **55** (5), 333 (2022). DOI: 10.1007/s10527-022-10130-5