

Влияние режимов конвекции на полимеразную цепную реакцию в квадратной полости¹

Моисеев К.В.

Институт механики им. Р.Р. Мавлютова УНЦ РАН, Уфа

Численно исследуется влияние различных режимов свободно-конвективного теплообмена ньютоновской несжимаемой жидкости на полимеразную цепную реакцию в квадратной полости. В качестве математической модели процесса свободной конвекции рассматривается приближение Обербека–Буссинеска. Для полимеразной цепной реакции применяются уравнения переноса вещества, учитывающие физико-химические взаимодействия компонент смеси. Полагалось, что смесь состоит из трех компонент. Результаты расчетов позволяют оценить влияние режимов течений конвекции на общую продолжительность проведения реакции и поля концентраций компонент, а также выявить оптимальные тепловые параметры для ПЦР.

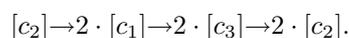
1. Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Также ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с ДНК: введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК, что широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний, для установления отцовства, для клонирования и выделения новых генов. При проведении ПЦР выполняется несколько циклов, каждый из которых состоит из трех стадий: денатурация — сильный нагрев, разрушение водородных связей двойных цепей ДНК; отжиг — охлаждение смеси, связывание специальных ферментов (праймеров) с разделенными цепями ДНК; элонгация — образование двух новых копий исходных ДНК, данная стадия происходит при некоторой средней между денатурацией и отжигом температуре. ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок с исходной смесью (пробой), содержащей малое количество ДНК. Ввиду того, что свободно конвективный теплообмен может обеспечить массоперенос смеси в полости, стенки которой поддерживаются при темпера-

турах денатурации и отжига, и где, следовательно, существует область с температурой благоприятной для элонгации, то цикл ПЦР будет выполняться посредством свободной конвекции, а не периодического нагрева. Это обстоятельство, в свою очередь, может оказать воздействие на скорость реакции ПЦР. Целью данной работы является исследование влияния параметров свободно конвективного теплообмена на успешность выполнения ПЦР и достижение условий, аналогичных условиям в амплификаторе.

2. Постановка задачи

Пусть исходная смесь состоит из трех компонент, обозначим через c_1 — концентрацию одноцепочечных ДНК, c_2 — двухцепочечных и c_3 — отождженных. Положим, что различные элементы ДНК преобразуются вследствие реакций первого порядка [1, 2]:



Пренебрежем любыми воздействиями поверхностей на кинетику реакции. Предположим, что диффузия всех разновидностей ДНК характеризуется постоянным коэффициентом диффузии — D , тогда для концентраций компонент ДНК можно записать следующие безразмерные уравнения:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla c_i = \frac{1}{Pe} \Delta c_i + Da \cdot r_i, \quad (1)$$

где c_i , ($i = 1..3$) — концентрации соответствующих ДНК; \vec{v} — вектор скорости жидкости; r_i — источники членны:

$$\begin{aligned} r_1 &= 2k_d f_d c_2 - k_a f_a c_1, & r_3 &= k_a f_a c_1 - k_e f_e c_3, \\ r_2 &= k_e f_e c_3 - k_d f_d c_1, \end{aligned}$$

¹Работа выполнена при финансовой поддержке Программы № 15 ОЭМПУ РАН и гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-834.2012.1).

где k_a, k_e, k_d — безразмерные скорости реакции отжига, элонгации и денатурации соответственно; f_a, f_e, f_d — интенсивности соответствующих реакций.

Безразмерные параметры:

$$Pe = \frac{\nu}{D}, \quad Da = \frac{kL^2}{\nu}$$

— число Пекле и конвективное число Дамкелера соответственно, где ν — кинематическая вязкость жидкости; k — характерная скорость реакции.

Предполагалось, что интенсивности реакций $f_i, (i = 1..3)$ являются функциями нормального распределения по температуре:

$$f_i = \exp \left[-\frac{(\theta - \theta_i^*)^2}{2\sigma_i^2} \right],$$

где $\theta = \frac{T - T^*}{\Delta T}$ — безразмерная температура; T^* — некоторая средняя температура; ΔT — перепад температуры в полости; θ_i^* — благоприятная температура для i -ой реакции и σ_i — допустимое отклонение температуры для i -ой реакции.

В качестве модели тепломассопереноса использовались уравнения свободной конвекции вязкой несжимаемой жидкости в приближении Обербека–Буссинеска [3, 4], которые в безразмерном виде можно записать следующим образом:

$$\operatorname{div} \vec{v} = 0, \quad (2)$$

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v} = -\nabla p + \Delta \vec{v} + \operatorname{Gr} \cdot \theta \cdot \frac{\vec{g}}{|\vec{g}|}, \quad (3)$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \theta = \frac{1}{Pr} \Delta \theta, \quad (4)$$

где p — безразмерное отклонение от гидростатического давления; $\operatorname{Gr} = \frac{gL^3\beta\Delta T}{\nu^2}$ — число Грасгофа;

$Pr = \frac{\nu}{\chi}$ — число Прандтля; \vec{g} — вектор ускорение свободного падения; L — характерный размер полости; β — коэффициент температурного расширения; χ — коэффициент теплопроводности.

Рассмотрим процесс изменения концентраций ДНК с течением времени при свободно конвективном теплообмене в квадратной полости со стороной L . Предполагалось, что нижняя граница полости поддерживается при температуре денатурации, а верхняя — при температуре отжига, боковые стенки считались теплоизолированными. Для компонент вектора скорости на границах использовались условия прилипания, для концентраций компонент смеси — условия отсутствия потока через границы полости.

3. Параметры задачи

Все вычисления производились на равномерной сетке 55×55 узлов с безразмерным шагом интегрирования по времени $\delta t = 10^{-4}$. В качестве исходной смеси использовалась вода ($Pr = 2$) с малой концентрацией двухцепочных ДНК: $c_2 = c_0$,

$c_1 = c_3 = 0$. В начальный момент полагалось, что жидкость находится в равновесии. Для модели выбраны следующие параметры: оптимальная температура денатурации равна 95°C , отклонение $85 - 95^\circ \text{C}$, отжига 55°C , отклонение $55 - 60^\circ \text{C}$, элонгации — $72 \pm 2^\circ \text{C}$. Константы скоростей химических реакций определяются из тех соображений, что реакция элонгации проходит вдвое медленнее реакций отжига и денатурации $k_a = k_d = 1$ и $k_e = 0.5$. Для изучения влияния режимов свободно конвективного теплообмена на ПЦР варьировались числа Грасгофа, для исследования влияния диффузии и скорости течения реакции числа Пекле и Дамкелера соответственно.

4. Результаты моделирования

Уравнения для концентраций (1) и система уравнений свободной конвекции (2)–(4) численно интегрировались методом контрольного объема [5, 6], для исключения давления из уравнений движения применялась процедура «simple». Выбор этого численного метода обусловлен, прежде всего, тем, что он является неявным, консервативным и простым в реализации.

На рис. 1 представлены линии тока и поле температуры (слева) и поле концентрации двухцепочных ДНК c_2 (справа) для числа Грасгофа $\operatorname{Gr} = 3000$, в момент времени $t = 100$ безразмерных секунд. Из рис. 1 видно, что реализуется режим течения с преимущественно одним вихрем в центре полости, и наибольшая концентрация двухцепочных ДНК оказывается внутри этого вихря, то есть, благоприятная температура для элонгации оказывается внутри свободно конвективного вихря.

На рис. 2 приведены линии тока и поле температуры (слева) и поле концентрации c_2 (справа), для числа Грасгофа $\operatorname{Gr} = 15000$, в момент времени $t = 100$ безразмерных секунд. Из рис. 2 легко заметить, что реализуется режим течения с преимущественными двумя симметричными вихрями по отношению к вертикальной средней линии полости, наибольшая концентрация двухцепочных ДНК оказывается внутри этих вихрей, отметим также, что величина максимальной концентрации на порядок выше, чем для случая при $\operatorname{Gr} = 3000$. Можно сделать вывод, что поливихревой режим свободно конвективного течения более благоприятен для реализации ПЦР.

На рис. 3 показано изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Дамкелера, можно увидеть, что с увеличением числа Дамкелера реакция происходит быстрее, так как становится выше характерная скорость реакции.

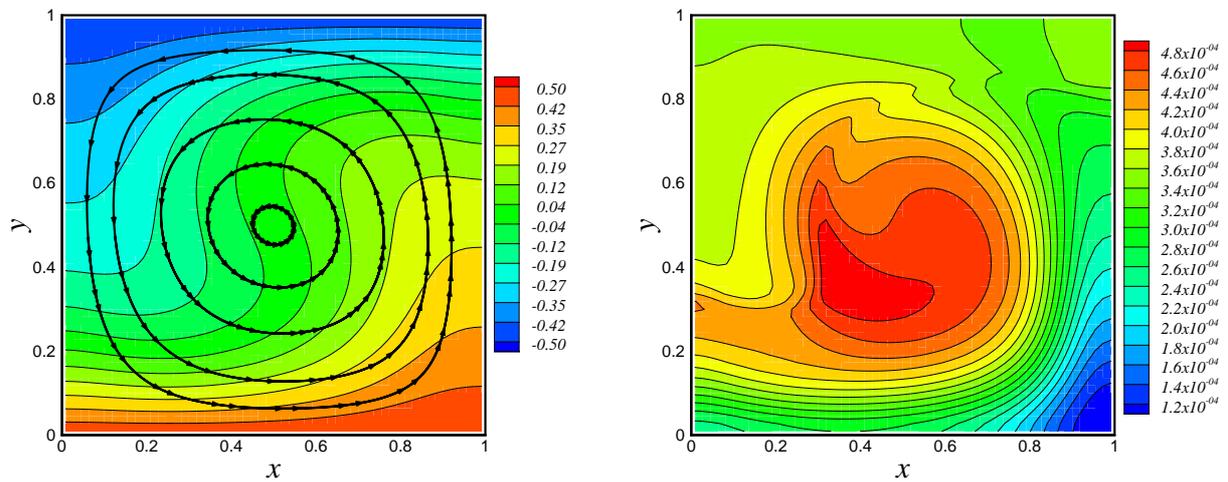


Рис. 1. Линии тока и поле температуры (слева) и поле концентрации c_2 (справа), $Gr = 3000$, $t = 100$

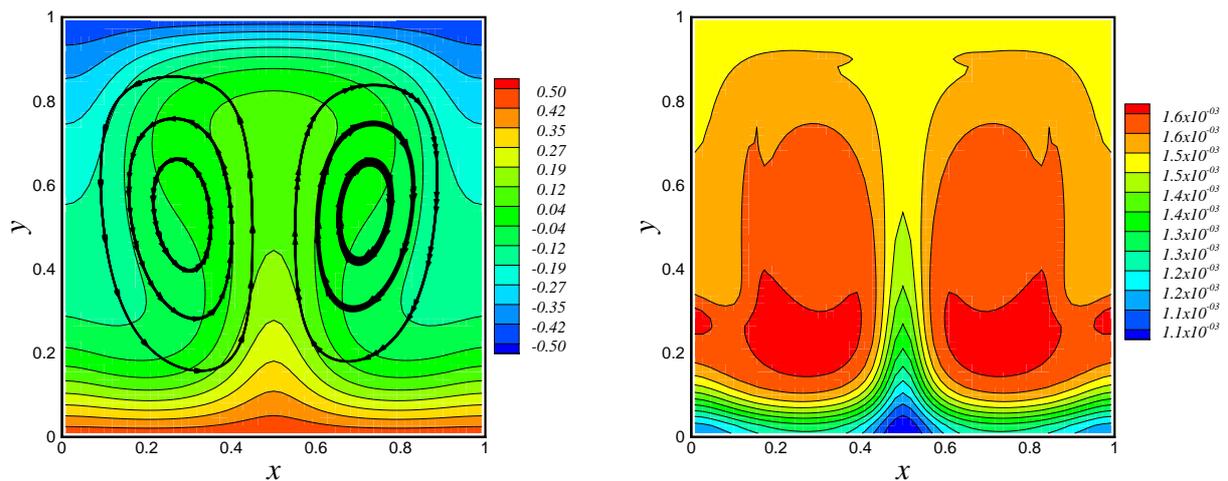


Рис. 2. Линии тока и поле температуры (слева) и поле концентрации c_2 (справа), $Gr = 15000$, $t = 100$

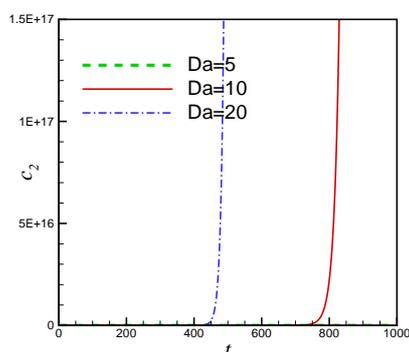


Рис. 3. Изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Дамкелера

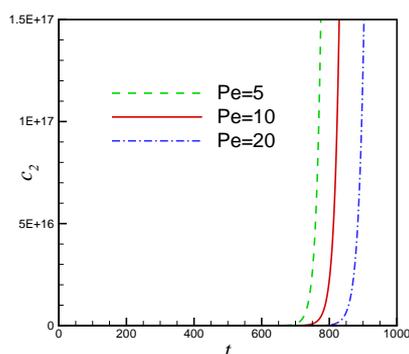


Рис. 4. Изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Пекле

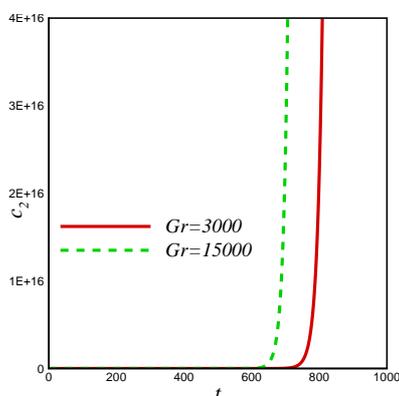


Рис. 5. Изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Грасгофа

На рис. 4 представлено изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Пекле, заметно, что с увеличением числа Пекле реакция происходит медленнее, что является следствием уменьшения коэффициента диффузии.

Таким образом, как диффузионный, так и кинетический механизмы в данной модели находят свое отражение и играют важную роль.

На рис. 5 приведено изменение во времени средней концентрации двухцепочных ДНК в зависимости от числа Грасгофа, видно, что при $Gr = 15000$ реакция ПЦР протекает быстрее, что подтверждает предположение о том, что поливехревой режим более благоприятен для осуществления реакции ПЦР.

5. Заключение

Произведено математическое моделирование ПЦР при свободном конвективном теплообмене в квадратной полости, подогреваемой снизу. Исследовано влияние числа Пекле на ПЦР. Установлено, что при увеличении числа Пекле средняя концентрация молекул ДНК увеличивается медленнее. Изучено влияние числа Дамкелера на ПЦР. Обнаружено, что при увеличении числа Дамкелера средняя концентрация молекул ДНК увеличивается быстрее. Рассмотрено влияние режимов конвекции на ПЦР. Показано, что наиболее благоприятными режимами являются поливехревые режимы течения.

Список литературы

- [1] Yariv E., Ben-Dov G., Dorfman K.D. Polymerase chain reaction in natural convection system: A convection-diffusion-reaction model. *Europhysics Letters*. 2005. Vol. 71. № 6. Pp. 1008–1014.
- [2] Allen J.W., Kenward M., Dorfman K.D. Copled flow and reaction during natural convection. *Microfluid Nanofluid*. 2009. № 6. Pp. 121–130.
- [3] Гершуни Г.З., Жуховицкий Е.М. Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости. Москва: Наука, 1972. 392 с.
- [4] Гершуни Г.З., Жуховицкий Е.М., Непомнящий А.А. Устойчивость конвективных течений. Москва: Наука, 1989. 319 с.
- [5] Патанкар С. Численные методы решения задач теплообмена и динамики жидкости. Москва: Энергоатомиздат. 1984. 152 с.
- [6] Патанкар С.В. Численное решение задач теплопроводности и конвективного теплообмена при течении в каналах: Пер. с англ. Е.В. Калабина; под ред. Г.Г. Янькова. Москва: Издательство МЭИ. 2003. 312 с.