

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В КОНВЕКТИВНОЙ ЯЧЕЙКЕ

Волкова Е. В.

Институт механики УНЦ РАН, Уфа

Аннотация. Исследуется полимеразная цепная реакция, проходящая в условиях конвекции, с использованием упрощенной схемы ячейки Релея–Бенара. Во время реакции создаются копии исходных ДНК-шаблонов вследствие циркуляции потока между холодными и горячими областями. Процесс создания копий исходных ДНК-шаблонов (амплификации ДНК) описывается уравнениями эволюции, которые определяют концентрации для каждого из компонентов смеси.

1. Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — перспективный способ увеличения количества ДНК для быстрой и точной диагностики заболеваний. Для выяснения диагноза или установления наследственности необходим большой объем определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК). В биоматериале, взятом у пациента, количество ДНК зачастую является недостаточным. Таким образом, с помощью ПЦР специалисты получают необходимое количество исследуемой ДНК, что существенно облегчает диагностику. Реакцию проводят в специальном приборе — термоциклере.

Реакция протекает при нагревании буферной смеси реактивов, содержащей двунитевые ДНК-матрицы, короткие фрагменты ДНК (праймеры), нуклеотиды, а также амплификационные ферменты. Выделяют три этапа ПЦР: денатурация (94°C), при которой двойная спираль ДНК разделяется на две одонитевые;

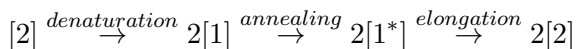
отжиг ($50\text{--}65^\circ\text{C}$) — в зависимости от последовательности праймеров), где праймеры связываются с концами разделенных нитей ДНК; элонгация (72°C), во время которой образуются две новые копии исходных ДНК.

В данной работе рассмотрена модель реакции ПЦР в квадратной ячейке, нижняя пластина которой поддерживается при температуре денатурации, а верхняя — при температуре отжига. Для достаточно больших чисел Релея разность температур дает повышение неустойчивости Релея–Бенара, проявляющееся в циркуляции потока между пластинами. Тщательной настройкой параметров потока возможно произвести отдельный конвективный валик, который перемещает молекулы ДНК между двумя пластинами, таким образом производя температурную историю, аналогичную той, что достигается в обычном термоциклере. Одна из моделей ПЦР в условиях естественной конвекции была предложена в работе [1].

Целью настоящей работы является исследование влияния различных параметров на процесс развития и успешность выполнения ПЦР, достижение условий, аналогичных условиям в обычном термоциклере.

2. Постановка задачи

Рассмотрим кинетическую модель, где различные элементы нуклеиновой кислоты преобразуются вследствие реакций первого порядка:



где [1] — однострелечная ДНК; [1*] — отожженная с праймером ДНК; [2] — двустрелечная ДНК.

Пренебрежем любыми воздействиями поверхностей на кинетику. Предположим, что диффузия всех разновидностей ДНК характеризуется постоянным коэффициентом диффузии D . Поля концентраций для указанных выше трех компонентов смеси описываются уравнениями конвекции–диффузии–реакции,

представленными в безразмерной форме:

$$\begin{aligned}\frac{\partial c_1}{\partial t} + \frac{1}{\text{Da}^C} \mathbf{u} \cdot \nabla c_1 &= \frac{1}{\text{Da}^D} \nabla^2 c_1 + 2k_d f_d(\mathbf{x}) c_2 - k_a f_a(\mathbf{x}) c_1; \\ \frac{\partial c_3}{\partial t} + \frac{1}{\text{Da}^C} \mathbf{u} \cdot \nabla c_3 &= \frac{1}{\text{Da}^D} \nabla^2 c_3 + k_a f_a(\mathbf{x}) c_1 - k_e f_e(\mathbf{x}) c_3; \\ \frac{\partial c_2}{\partial t} + \frac{1}{\text{Da}^C} \mathbf{u} \cdot \nabla c_2 &= \frac{1}{\text{Da}^D} \nabla^2 c_2 + k_e f_e(\mathbf{x}) c_3 - k_d f_d(\mathbf{x}) c_2,\end{aligned}\quad (1)$$

где c_1 , c_3 , c_2 — концентрации однопитевых, отождженных и двухпитевых ДНК соответственно; $\mathbf{u}(x)$ — поле скорости; k_a , k_e , k_d — безразмерные константы скоростей соответствующих реакций (отжига, элонгации и денатурации); функции f_a , f_e , f_d — интенсивности соответствующих реакций. Также введены конвекционное и диффузионное числа Дамкелера:

$$\text{Da}^C = \frac{kH}{U}; \quad \text{Da}^D = \frac{kH^2}{D},$$

где k — характерная скорость реакции; H — размеры ячейки; U — скорость.

Числа Дамкелера отражают отношение скоростей реакции к конвективным и диффузионным процессам. Граничные условия для i -го компонента соответствуют отсутствию потока через границы области: $\mathbf{n} \cdot \nabla c_i = 0$, где \mathbf{n} — вектор нормали к границе. Начальные условия: $c_1 = c_3 = 0$, $c_2 = c_0$.

В рассматриваемой области ($0 < x < 1$, $0 < y < 1$) температура нижней границы ($y = 0$) больше температуры верхней границы ($y = 1$). Для вращающихся против часовой стрелки потоков безразмерную горизонтальную и вертикальную составляющие скорости примем такими же, как и в работе [1]:

$$u = -\cos \frac{\pi x}{2} \sin \frac{\pi y}{2}, \quad v = \sin \frac{\pi x}{2} \cos \frac{\pi y}{2}.$$

Скорости химических реакций f_a , f_e , f_d :

$$f_a = \begin{cases} 1, & \text{если } \frac{2}{3} < x < 1; \\ 0, & \text{если } 0 < x < \frac{2}{3}, \end{cases}$$

$$f_e = \begin{cases} 1, & \text{если } \frac{1}{3} < x < \frac{2}{3}; \\ 0, & \text{если } 0 < x < \frac{1}{3}, \frac{2}{3} < x < 1, \end{cases}$$

$$f_d = \begin{cases} 1, & \text{если } 0 < x < \frac{1}{3}; \\ 0, & \text{если } \frac{1}{3} < x < 1. \end{cases}$$

Константы скоростей химических реакций определяются из тех соображений, что реакция элонгации проходит вдвое медленнее реакций отжига и денатурации: $k_a = k_d = 1$ и $k_e = 1/2$.

3. Основные результаты

Численное решение системы дифференциальных уравнений в частных производных (1) методом контрольного объема [2] позволило исследовать развитие и установление конвективного поля концентраций компонентов смеси.

На рис. 1 показаны концентрации компонентов смеси на конечном этапе расчетов. Переход от светлого к темному соответствует увеличению концентрации. На рис. 1(а) видно, что концентрация однонитевых ДНК c_1 наиболее высока у правой стенки конвективной ячейки. Это объясняется тем, что, появляясь на нижней, подогреваемой пластине, однонитевые ДНК потоком переносятся против часовой стрелки, но у верхней части уже отжигаются с праймерами. Отожженные с праймерами цепочки ДНК (Рис. 1(с)) потоком переносятся к левой стенке ячейки, где происходит элонгация — достраивание до двунитевых цепочек. Далее часть двунитевых ДНК концентрируется в центре ячейки (рис. 1(б)), а часть посредством диффузии переносится в нижнюю область ячейки, после чего процесс повторяется до тех пор,

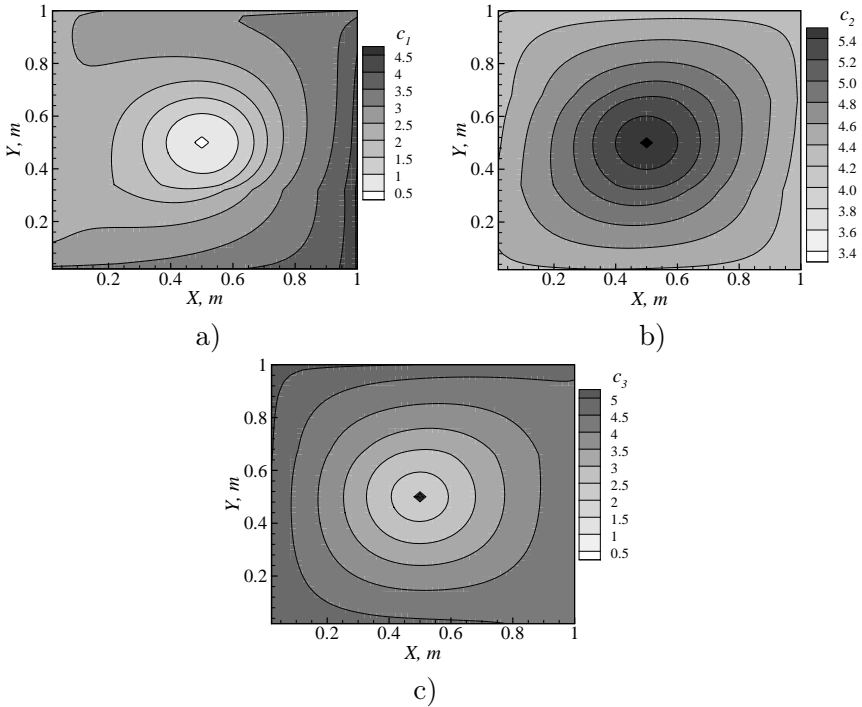


Рис. 1. Поля концентраций c_1 , c_2 , c_3 . $D = 10^{-11}$ см²/с, $k = 0.19$ с⁻¹

пока мы не получим необходимое количество копий ДНК шаблона.

На рис. 2–3 показаны графики зависимости темпа роста концентрации двунитевых ДНК от диффузионного и конвективного чисел Дамкелера. Видно, что скорость увеличения концентрации c_2 выше при меньших значениях чисел Дамкелера. Но на темп роста больше влияет конвективное число Дамкелера: даже небольшие его изменения приводят к значительной перемене в скорости процесса амплификации. Соответственно, чем его значение ниже, тем быстрее идет реакция (рис. 3).

Исследована зависимость темпа роста концентрации двунитевых ДНК от радиуса r удаленности от центра ячейки (рис. 4).

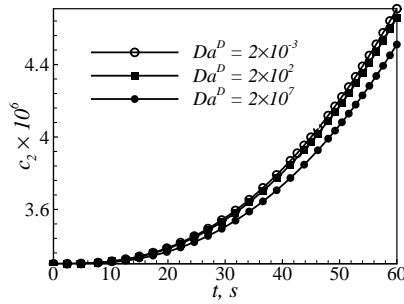


Рис. 2. Зависимость c_2 от времени при различных значениях диффузионного числа Дамкелера: $Da^D = 10^{-3}$, $Da^D = 10^2$, $Da^D = 10^7$

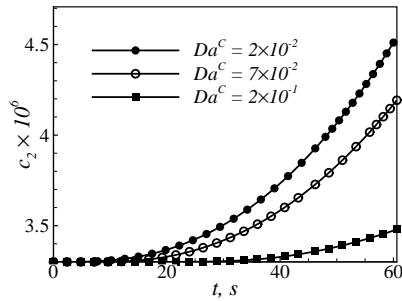


Рис. 3. Зависимость c_2 от времени при различных значениях конвективного числа Дамкелера: $Da^C = 2$, $Da^C = 7 \cdot 10^{-1}$, $Da^C = 2 \cdot 10^{-1}$

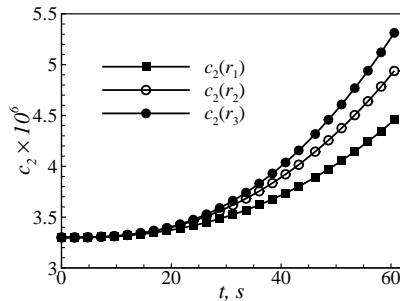


Рис. 4. Зависимость c_2 от времени при различной степени удаленности от центра ячейки: $r_1 = 0.57$ см, $r_2 = 0.28$ см, $r_3 = 0.14$ см

Обнаружено, что концентрация c_2 увеличивается по мере приближения к центру ячейки. Соответственно, в отдаленных от центра областях количество копий исходного ДНК шаблона резко падает.

4. Заключение

Рассмотрена модель амплификации ДНК вследствие полимеразной цепной реакции в системе с естественной конвекцией. С использованием схематической модели конвективной ячейки изучено поведение полей концентрации компонентов реагирующей смеси, исследована зависимость выхода реакции от конвективного и диффузионного чисел Дамкелера. Показано, что при типичных параметрах проведения ПЦР в конвективной ячейке, поля концентраций характеризуются значительной пространственной неоднородностью, растущей со временем.

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] Патанкар С. Численные методы решения задач теплообмена и динамики жидкости. Москва: Энергоатомиздат, 1984. 149 с.