

раздел МАТЕМАТИКА и МЕХАНИКА

УДК 532.5.031

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2025.4.1

**ВЛИЯНИЕ УГЛА НАКЛОНА МИКРОПРОБИРКИ
НА ТЕМПЕРАТУРНЫЙ РЕЖИМ КОНВЕКТИВНОЙ ПЦР:
ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

© Л. Ю. Привалов

*Институт механики им. Р. Р. Мавлютова
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр-т Октября, 71.*

*Email: lavrenty.privalov@gmail.com

В работе исследуется влияние угла наклона стандартной полипропиленовой микропробирки объемом 50 мкл на температурный режим конвективной полимеразной цепной реакции. Для описания течения жидкости используется приближение Буссинеска, реализованное в пакете OpenFOAM. В качестве рабочей среды используется вода. В качестве модели движения ДНК-молекул применяется метод Монте-Карло: случайным образом размещенные частицы перемещаются в вычислительном поле скоростей, а их температура фиксируется для каждого шага трассировки. Для выбранного диапазона углов от -90° до 90° получены данные вычислительного эксперимента, построены гистограммы распределения времени пребывания частиц в температурных интервалах. Результаты показывают, что при наклоне в сторону холодной границы преобладающие температуры снижаются, тогда как при наклоне в противоположную сторону диапазон температур смещается вверх. Полученные данные позволяют оптимизировать параметры конвективной ПЦР простым изменением угла наклона микропробирки и граничных температур, что может повысить чувствительность и надежность портативных ПЦР-систем.

Ключевые слова: приближение Буссинеска, конвективная ПЦР, метод Монте-Карло, микропробирка, распределение температур.

Введение

Конвективные течения играют ключевую роль в различных природных и технологических процессах. Они проявляются как в природных (атмосферных), так и в техногенных системах. В технологических процессах конвективное течение в том или ином виде используется для вынужденного движения сплошной среды с целью перемешивания или переноса свойств из одной области в другую.

Одним из современных применений конвекции является конвективная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в стандартной полипропиленовой микропробирке [1]. Основная идея конвективной ПЦР по сравнению с классической [2] – это максимальная простота, заключающаяся в использовании только необходимых компонентов: самой микропробирки, нагревательного и охладительного элементов. Это снижает трудоемкость и стоимость, исключая необходимость сложного оборудования. Метод включен в обзор [3] как один из наиболее простых и быстрых вариантов проведения ПЦР. ПЦР включает три этапа, соответствующих трем температурным режимам: денатурация (95°C), отжиг (60°C) и элонгация (72°C). При этом последние два этапа могут проводиться одновременно, так как 60°C и 72°C являются только оптимальными значениями температуры. В работе [4] приводятся конкретные времена (20, 30 и 60 сек), при которых обычно проводится ПЦР; в [3] упоминается также более короткий цикл (около 5 сек), за который происходит полное обращение жидкости внутри емкости, который также успешно позволяет проводить реакцию. Авторы оригинального метода конвективной ПЦР в микропробирке оценивают скорость прохождения полного цикла лишь в 10 сек [5]. Рассматриваемая в случае микропробирки конфигурация с использованием вертикально расположенного тонкого канала принято называть капиллярной конвекционной ПЦР. Одним из первых образцов таких установок является капиллярный канал с крупной емкостью сверху, охлаждаемой пассивным способом; такой подход не теряет актуальности и освещается в современной работе [6]. Результатом этой работы является значительное снижение времени реакции при использовании простой установки. Тем не менее, в таком подходе используется специальная центрифуга.

Пример конвекционной ПЦР без использования капилляра представлен в работе [7], где в качестве реакционной емкости используется кольцевой канал, напоминающий «гоночную трассу».

В обзорной статье [3] приводится либо результат моделирования индивидуальной молекулы, либо результаты экспериментальной установки, а основной упор делается либо на длину капиллярного канала, либо на экспериментальные установки другого вида, не рассматриваются результаты изменения других параметров, таких как угол наклона и температуры охладительных и нагревательных элементов.

Существуют специально разработанные методы для вероятностной симуляции ПЦР реакции, как описано в [8], однако такой подход сложен в реализации и воспроизвести результаты симуляции на практике затруднительно.

Все исследования в этом направлении достаточно старые, а современные исследования эффективности установок проводятся на практике.

Исходя из изложенного, цель работы – исследование параметров для проведения конвективной ПЦР в стандартной микропробирке. Данная работа посвящена в первую очередь исследованию влияния наклона микропробирки на гипотетическую молекулу ДНК, взвешенную в случайном месте в объеме микропробирки, что определяет температурные диапазоны, через которые проходит молекула ДНК.

Постановка задачи численного исследования

В основе данной задачи используется стандартная полипропиленовая микропробирка, объемом 50 мкл, используемая как емкость для проведения ПЦР на выявление ДНК-маркеров. Микропробирка применяется в конвективной ПЦР [1], где нагревание снизу и охлаждение сверху создают конвективные потоки, обеспечивающие перемешивание.

Для этой задачи уже была подготовлена качественная трехмерная сетка, где приведена детальная информация о ее качестве [9–10]. Схема конструкции нижней части этой микропробирки приведена на рис. 1. Так как чаще всего используется лишь небольшой объем пробы, моделирования нижней трети достаточно для данной постановки. Дно пробирки нагревается в области T_H до температуры 375 К, в области охлаждения T_C поддерживается температура 280 К.

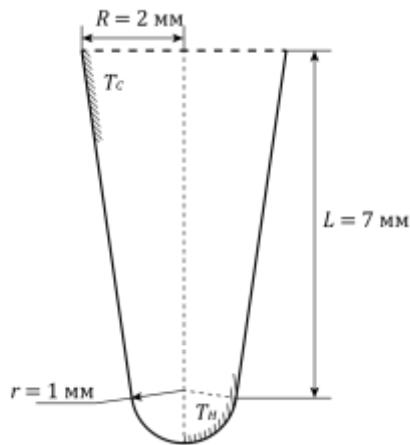


Рис. 1. Схема конструкции микропробирки.

В данной работе сделано допущение, что рабочей средой является дистиллированная вода, хотя на практике в пробирке содержится многокомпонентная смесь. Следует отметить, что температура в области нагрева немного превышает точку кипения воды 373,15 К, но не более чем на 2 градуса. Можно допустить, что вода не находится долго при данной температуре, и только в очень небольшой части объема, поэтому можно считать, что наблюдается метастабильное состояние.

В качестве основной системы уравнений, описывающей движение жидкости в пробирке, используются уравнения динамики несжимаемой вязкой жидкости с учетом плавучести, описываемой в приближении Буссинеска [11]:

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0, \quad (1)$$

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\frac{1}{\rho_0} \nabla p + \nu \nabla^2 \mathbf{u} + \beta(T - T_0) \mathbf{g}, \quad (2)$$

$$\frac{\partial T}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) T = \alpha \nabla^2 T, \quad (3)$$

где ν – кинематическая вязкость, β – коэффициент теплового расширения, ρ_0 – эталонная плотность, T_0 – эталонная температура, α – коэффициент температуропроводности.

Программный пакет OpenFOAM включает в себя реализацию системы уравнений (1)–(3). При помощи сравнения с результатами расчетов при использовании полной системой уравнений Навье–Стокса с учетом плавучести, во-первых, были получены наиболее оптимальные значения теплофизических свойств, соответствующие рабочему диапазону температур, и, во-вторых, подтверждено, что разница между решениями полной и приближенной постановки незначительна. Для задания свойств среды необходимы значения кинематической вязкости, коэффициента температурного расширения, эталонной температуры и числа Прандтля, которые равны соответственно $\nu = 3,9 \cdot 10^{-5}$ м²/с, $\beta = 4 \cdot 10^{-4}$ кг/(м³К), $T_0 = 350,15$ К и $Pr = 2,4$.

Предполагается что, в воде взвешены единичные молекулы ДНК. Как известно, молекула ДНК является сложной и значительно более тяжелой по сравнению с молекулой воды, в растворе которой она пребывает. Это позволяет считать растворенную ДНК с одной стороны тяжелым раствором, с другой – взвешенной частицей. При этом количество молекул ДНК настолько мало, что их влияние на течение можно считать незначительным, поэтому для описания течения можно использовать процесс конвективной диффузии для значения концентрации. Это полностью соответствует уравнению (3), где вместо температуры T используется некоторое значение концентрации C и собственное значение диффузии D :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla)C = D\nabla^2 C. \quad (4)$$

В уравнении (4) затруднительно определить точное значение коэффициента диффузии D , однако его можно оценить. В первую очередь, подвижность молекулы описывается формулой Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (5)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость жидкости, r – радиус частицы.

Если предположить, что температуропроводность молекулы воды (что и есть результат движения молекул) описывается таким набором свойств, что получается температуропроводность α , то для молекулы ДНК разница состоит лишь в радиусе r , который значительно больше, чем у воды. К тому же, при оценке диффузии в водных растворах, например медного купороса, время эксперимента для получения измеримых результатов составляет недели [12], потому что темп диффузии в воде очень мал. Следовательно, за короткие интервалы времени диффузия ДНК-молекул пренебрежимо мала.

Проведение расчетов и сбор результатов

Численный эксперимент содержит множество постановок, идентичных указанным выше, но при различных углах наклона в плоскости, проходящей через обе температурные области, т.е. в плоскости, показанной на рис. 1. Наклон пробирки в поле тяжести варьируется от -90° , что соответствует полному горизонтальному положению при наклоне влево, до 90° – горизонтальное положение при наклоне вправо. Положение, изображенное на рис. 1, принято за угол наклона 0° .

В ходе ранних вычислительных экспериментов [10] было выявлено, что в интервале наклонов от 0° до 20° возникает смена режима, что потребовало уточненного шага по углу наклона. В связи с этим во всем интервале наклонов отдельный расчет производится каждые 10° наклона, кроме интервала от 0° до 20° , где расчет производится через 1 градус. При этом выбран шаг по времени $\Delta t = 0,002$ с, достаточный для соблюдения условия числа Куранта, а конечное время t_1 выбрано равным 30 с, что достаточно для установления стационарного режима.

В ходе эксперимента всего рассмотрено 37 вариантов расчета. В каждом из них устанавливается свое поле скоростей. Примеры линий тока и их направлений для углов -60° и 20° показаны на рис. 2.



Рис. 2. Примеры линий тока для некоторых углов наклона:
 (а) стабильная циркуляция при наклоне -60° ;
 (б) образование сложного течения при наклоне 20° .

Для ПЦР важно, в каких температурных диапазонах находится молекула ДНК. Тогда как данные о средней температуре, а также распределении этих температур в объеме могут быть посчитаны с легкостью, наибольший интерес представляет статистика температурных диапазонов, которые проходит индивидуальная молекула ДНК при начале движения из случайной точки внутри объема пробирки. Это соответствует интегралу Монте-Карло от температуры по времени вдоль путей молекул.

Стоит отметить, что в силу условия несжимаемости интеграл некоторой переменной по всем траекториям внутри объема жидкости представлял бы собой не более чем среднее значение этой переменной по объему, однако в данном случае речь идет об интеграле *по времени*, то есть сколько времени будет проводить та или иная

молекула ДНК при данном температурном режиме. Это немного изменяет получаемый результат, хотя и во многом очень сильно коррелирует с простым средним по объему.

Как было сказано ранее, в малых интервалах времени диффузию можно считать незначительной и каждая новая запущенная молекула в течении короткого времени не будет значительно отклоняться от идеальной траектории. Иными словами, если запустить множество молекул, время жизни которых в данном эксперименте не превышает 5 сек, то в уравнении (4) слагаемое $D\nabla^2 C$ можно считать малым, в связи с чем молекула движется согласно простому уравнению переноса. Запуск достаточно большого числа частиц будет представлять из себя метод Монте-Карло.

Процедура запуска молекул может быть произведена с использованием программы paraView, плотно работающей с типом выходных данных пакета OpenFOAM и позволяющей производить анализ результатов, в т.ч. и требуемой в данном случае трассировкой линий тока. В результате трассировки было получено приблизительно 1,7 млн значений температуры для каждого из углов наклонов, которые представляют собой время интегрирования и соответствующую ему температуру. Диапазон температур от 0 °C до 110 °C был разбит на интервалы по 5 °C. Суммирование времени пребывания молекулы при определенной температуре определяется этими интервалами, что позволяет построить гистограммы для каждого угла наклона. Для наглядности гистограммы строились в процентах от общего времени пребывания, а не абсолютного числа. Пример такой гистограммы для нескольких углов наклона показан на рис. 3.

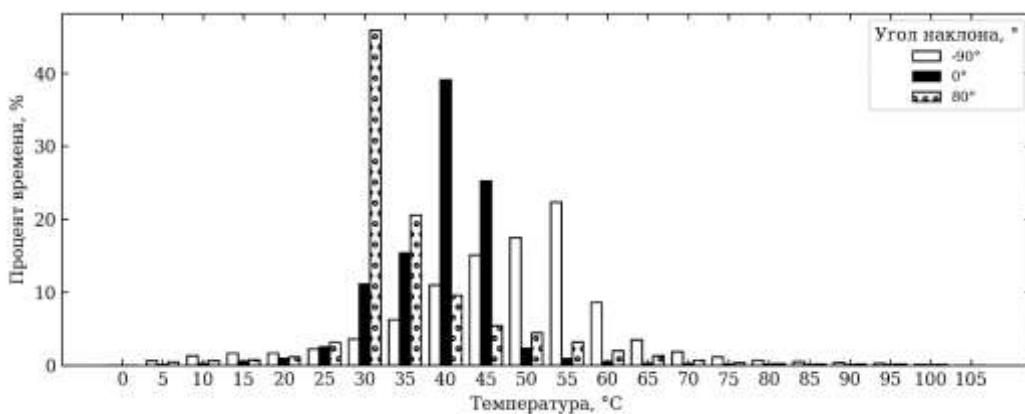


Рис. 3. Гистограмма времени пребывания молекулы в определенных температурных интервалах при углах наклона пробирки -90° , 0° и 80° .

На рис. 3 показано, что смысл гистограммы заключается в оценке распределения температур, через которые проходит молекула ДНК: по мере движения из произвольной точки молекула ДНК проходит множество температурных режимов. В данном случае, при вертикальном положении (угол наклона 0°) можно видеть преобладание температур от 30 °C до 45 °C. Кроме того, при наклоне вправо, т.е. в сторону нагревательного элемента до угла 80° , распределение температур, во-первых, смещается к более низким значениям, а во-вторых, становится более сфокусированным около некоторого определенного значения. При наклоне влево до -90° происходит в точности противоположный процесс.

Обсуждение результатов

Одним из ключевых моментов при проведении полимеразной цепной реакции является тот температурный диапазон, при котором будет пребывать условная молекула ДНК, оказавшаяся в случайном месте в растворе. Как было сказано во введении, желательно, чтобы молекула большую часть времени находилась в температурном диапазоне от 60 °C до 72 °C, с редким повышением до 95 °C. На рис. 4 этот диапазон не более чем достигается снизу, но на самом деле это легко исправляется изменением на холодную границу T_C , при этом уменьшение разницы температур между нагревательным и охладительным элементом замедлит поток, что может благоприятно повлиять на ход реакции ПЦР.

Важное свойство наклона пробирки – это возможность управлять преобладающей температурой в реакционной зоне. При наклоне пробирки вправо – температура уменьшается, при наклоне влево – увеличивается. При этом стоит учитывать еще и разброс температур, т.к. при наклоне влево получается больший охват, тогда как при наклоне вправо диапазон главных температур является более сконцентрированным, что видно на представленных гистограммах. Таким образом, можно «выбирать» основную температуру, в которой будут пребывать молекулы ДНК и изменять ее без воздействия на элементы нагрева или охлаждения лишь за счет изменения положения пробирки в пространстве.

Заключение

Проведенное численное моделирование показало, что температурное поле внутри стандартной микропробирки объемом 50 мкл существенно зависит от угла ее наклона в поле тяжести. При изменении угла наклона перестраивается структура потока, что приводит к смещению и изменению ширины температурных диапазонов, в которых находятся молекулы ДНК.

Оценка диффузии ДНК-молекул по формуле Стокса-Эйнштейна показала, что в малых временных масштабах вклад диффузии несуществен и перенос частиц определяется преимущественно конвективным механизмом. Это позволило применить трассировку методом Монте-Карло для анализа времени пребывания молекул в различных температурных интервалах.

Результаты расчетов показали, что при наклоне пробирки в сторону нагревателя преобладающие температуры снижаются и становятся более сконцентрированными, тогда как наклон в противоположную сторону приводит к повышению средних температур и расширению диапазона. Таким образом, простое изменение угла наклона позволяет регулировать характер теплового воздействия без вмешательства в параметры нагрева и охлаждения.

Полученные зависимости открывают возможность контроля за температурными режимами конвективной ПЦР за счет простого наклона. Такой подход может быть использован при проектировании портативных и простых ПЦР-установок, где регулирование осуществляется без применения спецоборудования. В дальнейшем целесообразно экспериментально подтвердить выявленные закономерности и исследовать влияние формы пробирки, материала и объема реакционной смеси на эффективность амплификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Garafutdinov R. R., Chemeris D. A., Sakhabutdinova A. R., Moiseev K. V., Urmanceev S. F., Mikhaylenko K. I., Privalov. L. Yu., Chemeris A. V. Convective polymerase chain reaction in standard microtubes // Analytical Biochemistry. 2022 Vol. №641. Art. 114565. DOI: 10.1016/j.ab.2022.114565.
2. Mullis K. B., Falooma F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction // Methods in Enzymology. 1987. Vol. 155. P. 335–350.
3. Miao G., Zhang L., Zhang J., Ge S., Xia N., Qian S., Yu D., Qiu X. Free convective PCR: From principle study to commercial applications – A critical review // Analytica Chimica Acta. 2020. Vol. 1108. P. 177–197. DOI: 10.1016/j.aca.2020.01.069.
4. Naghdloo A., Ghazimirsaeed E., Shamloo A. Numerical simulation of mixing and heat transfer in an integrated centrifugal microfluidic system for nested-PCR amplification and gene detection // Sensors and Actuators B: Chemical. 2019. Vol. 283. P. 831–841. DOI: 10.1016/j.snb.2018.12.084.
5. Чемерис Д. А., Гарафутдинов Р. Р., Сахабутдинова А. Р., Малеев Г. В., Чемерис А. В. Конвекционная ПЦР в конвективных ячейках разных типов // Биомика. 2018. Т. 10. №4. С. 410–443. [Chemeris D. A., Garafutdinov R. R., Sakhabutdinova A. R., Maleev G. V., Chemeris A. V. Convection PCR in different types of convective cells // Biomics. 2018. Vol. 10. No. 4. P. 410–443].
6. Miao G., Guo M., Li K., Ye X., Mauk M. G., Ge S., Xia N., Yu D., Qiu X. An integrated, real-time convective PCR system for isolation, amplification, and detection of nucleic acids // Chemosensors. 2022. Vol. 10(7). Art. 271. DOI: 10.3390/chemosensors10070271.
7. Li C., Xie Y., Yong H., Zhao X., Ke X., Wu Z. A reverse design method for convective PCR chips featuring precise control of steady-state flow fields // Chemosensors. 2025. Vol. 13(1). Art. 6. DOI: 10.3390/chemosensors13010006.
8. Hassibi A., Kakavand H., Lee T. H. A stochastic model and simulation algorithm for polymerase chain reaction (PCR) systems // Proceedings of IEEE Workshop on Genomics Signal Processing and Statistics. 2004. Vol. 1. No. 01.
9. Исламов А. И., Набиуллина К. Р. Моделирование термоконвекции в микропробирке при точечном нагреве: подготовка вычислительной сетки и выбор методов // Многофазные системы. 2024. Т. 19. №2. С. 64–72. [Islamov A. I., Nabiullina K. R. Modeling of thermoconvection in a microtube under point heating: computational grid preparation and choice of method // Multiphase Systems. 2024. Vol. 19. No. 2. P. 64–72]. DOI: 10.21662/mfs2024.2.010.
10. Исламов А. И., Набиуллина К. Р. Моделирование температурной конвекции в микропробирках при точечном нагреве: зависимость скорости конвекции от угла наклона // Многофазные системы. 2024. Т. 19, №3. С. 94–102. [Islamov A. I., Nabiullina K. R. Modeling of temperature convection in microtubes under point heating: Dependence of convection velocity on tilt angle // Multiphase Systems. 2024. Vol. 19. No. 3. P. 94–102]. DOI: 10.21662/mfs2024.3.014.
11. Гершунин Г. З., Жуховицкий Е. М. Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости. М.: Наука, 1972. 392 с. [Gershuni G. Z., Zhukovitsky E. M. Convective stability of an incompressible fluid. Moscow: Nauka, 1972. 392 p.].
12. Семенов И. А., Литвинцев Ю. И., Климов Д. А., Зуева Е. О. Оценка коэффициента диффузии медного купороса в водном растворе // Современные технологии и научно-технический прогресс. 2012. Т. 1. С. 25. [Semenov I. A., Litvintsev Yu. I., Klimov D. A., Zueva E. O. Estimation of the diffusion coefficient of copper sulfate in an aqueous solution // Modern Technologies and Scientific and Technological Progress. 2012. Vol.1. P. 25].

Поступила в редакцию 18.08.2025 г.

DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2025.4.1

**INFLUENCE OF MICRO-TUBE TILT ANGLE
ON THE TEMPERATURE PROFILE IN CONVECTIVE PCR:
NUMERICAL SIMULATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

© L. Yu. Privalov*

*Mavlyutov Institute of Mechanics of Ufa Federal Research Center of RAS
71 Oktyabrya pr., 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: lavrenty.privalov@gmail.com

The study investigates how the tilt angle of a standard 50 μL polypropylene micro-tube affects the temperature regime of convective polymerase chain reaction (PCR). The fluid flow is modeled using the Boussinesq approximation as implemented in the OpenFOAM suite. Water serves as the working medium. DNA molecule motion is simulated with a Monte Carlo approach: randomly placed particles are advected through the computed velocity field, and their temperature is recorded at each tracking step. For the range of tilt angles from -90° to $+90^\circ$, computational-experiment data were obtained, histograms of particle residence times within specified temperature intervals were constructed, and a heat map was generated. The results show that tilting the tube to the right (positive angles) lowers the dominant temperatures, whereas tilting it to the left (negative angles) shifts the temperature range upward. These findings enable optimization of convective PCR parameters simply by adjusting the micro-tube's tilt angle and boundary temperatures, potentially enhancing the sensitivity and reliability of portable PCR systems.

Keywords: Boussinesq approximation, convective PCR, Monte Carlo method, micro-tube, temperature distribution.

Received 18.08.2025.

Об авторах / about the authors

ПРИВАЛОВ Лаврентий Юрьевич
аспирант Института механики им. Р. Р. Мавлютова
УФИЦ РАН.
Email: lavrenty.privalov@gmail.com

PRIVALOV Lavrentii Yurievich
postgraduate student of Mavlyutov Institute of Mechanics,
Ufa Federal Research Center of RAS.
Email: lavrenty.privalov@gmail.com
ORCID: 0000-0002-3555-376X
Scopus Author ID: 1229668