

УДК 510.87:544.431.7:577.21

ЗАДАЧА ОПТИМАЛЬНОГО КЕРУВАННЯ СТАДІЄЮ ЕЛОНГАЦІЇ ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

В.П. МАРЦЕНЮК, А.С. СВЕРСТЮК, І.С. ГВОЗДЕЦЬКА

Застосовано загальну методологію керування для отримання розв'язку задачі оптимального перебігу стадії елонгації у полімеразно-ланцюговій реакції. У досліджуваній моделі стадії елонгації використано рівняння Арреніуса, яке враховує залежність швидкості реакції від абсолютної температури. Цю залежність може бути використано для дослідження стадії елонгації полімеразно-ланцюгової реакції, оскільки керуючим впливом при цьому є саме температура. Розглянуто схему температурного керування. При реалізації полімеразно-ланцюгової реакції застосовано принцип максимуму Понтрягіна до задачі оптимального керування та сформульовано необхідну умову оптимальності. Отримані результати необхідні для чисельного обчислення оптимального керування досліджуваної стадії та допоможуть мінімізувати необхідний час для реалізації стадії елонгації, що в майбутньому дозволить мінімізувати час проведення полімеразно-ланцюгової реакції.

ВСТУП

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є експериментальним методом молекулярної біології, під час якого значно збільшуються малі концентрації бажаних фрагментів дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у біологічному матеріалі (пробі). Крім простого збільшення числа копій ДНК (цей процес називається ампліфікацією), ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом, і широко використовується в біологічній та медичній практиках, наприклад для клонування генів, створення й визначення генетично модифікованих організмів, діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства [1].

ПЛР базується на багаточисленному копіюванні (селективній ампліфікації) досліджуваної ДНК ферментом ДНК-полімеразаю. Утворені копії ДНК ідентифікують за допомогою методу електрофорезу.

Для проведення ПЛР виконується 20–35 циклів [2], кожен з яких складається з трьох стадій (рисунок).

1. Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 367–369 К (або до 371 К, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5–10 хв., щоб ланцюги ДНК розділилися. Ця стадія називається денатурацією — руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами. Іноді перед першим циклом проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2–5 хв. для повної денатурації матриці й праймерів.

2. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається відпадом, її температура залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 4–5 К нижче за їх температуру плавлення. Час стадії — 0,5–2 хв.

3. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюжок, використовуючи праймер як затравку. Це так звана стадія елонгації. Температура елонгації залежить від полімерази. Полімерази *Taq* й *Pfu*, що найчастіше використовуються, найактивніші за 345 К. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини фрагмента, який ампліфікують. Середня швидкість елонгації — 1000 пар основ за 1 хв. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюжкові фрагменти. Ця стадія триває 10–15 хв.

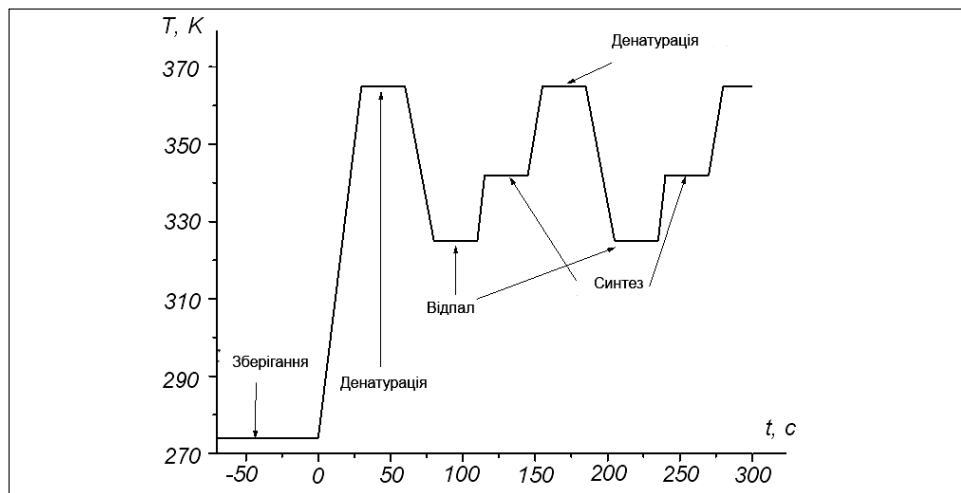


Рисунок. Схема температурного керування для реалізації ПЛР [3]

Для ефективного проведення ПЛР необхідно забезпечити багатостадійний циклічний режим зміни температури. Кожна стадія циклу (денатурація, відпал, елонгація) має відбуватися за певних температур та протягом відповідного часу. В іншому випадку необхідних перетворень молекул ДНК може не відбуватися. Таким чином задача математичного моделювання і відповідних розрахунків полягає в оцінюванні мінімально необхідного часу реалізації кожної стадії циклу, що в загальному випадку забезпечить досягнення мінімального часу проведення ПЛР.

У багатьох роботах [4–6] наведено різні моделі ПЛР, однак для ефективного використання методів ПЛР, доцільно провести дослідження керованості цих моделей. Таким чином задача математичного моделювання і відповідних розрахунків полягає в оцінюванні мінімально необхідного часу реалізації кожної стадії циклу, що в загальному випадку забезпечить досягнення мінімального часу та ефективності проведення ПЛР.

Мета роботи — дослідження керованості стадією елонгації ПЛР, яку запропоновано в роботі [6].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Теоретичні основи оптимального керування в ПЛР. У задачах оптимального керування ПЛР за допомогою температури варто розглядати таку множину керувань:

$$U = \{u(t) : a \leq u(t) \leq b, \quad t_1 \leq t \leq t_2, \quad u(t) \text{ — вимірна}\}.$$

Тут $a, b, t_1, t_2 > 0$.

Припускається, що стан системи $x(t) \in R^n$ у випадку заданого керування $u \in U$ визначається системою звичайних диференціальних рівнянь:

$$\begin{aligned} \frac{dx(t)}{dt} &= f(t, x, u), \\ x(t_0) &= x_0, \end{aligned} \quad (1)$$

де $f : R \times R^n \times R \rightarrow R^n$ є неперервною і має неперервні перші частинні похідні відносно x та u . Оскільки припускається, що $u(t)$ є вимірною та обмеженою, то права частина системи (1) є неперервною відносно x й лише вимірною відносно t для фіксованого x . Отже, розв'язки (1) є абсолютно неперервними функціями, які задовольняють (1) майже скрізь. За таких умов існування розв'язку (1) $x(t, u)$ доведено в роботах [7, 8].

Задача оптимального керування містить критерій якості $J[u]$ вигляду:

$$J[u] = \int_{t_1}^{t_2} L(t, x, u) dt + \phi(x(t_2)),$$

де L — задана дійснозначна функція; ϕ — неперервнодиференційовна дійснозначна функція. Метою є знаходження керування $u^* \in U$ такого, що

$$J[u^*] = \inf_{u \in U} J[u]. \quad (2)$$

Після того, як описано модель та визначено критерій якості, в теорії оптимального керування ставлять ряд задач [9]:

- доведення існування оптимального керування;
- опис побудови оптимального керування;
- доведення єдиності оптимального керування;
- чисельне обчислення оптимального керування;
- дослідження залежності оптимального керування від параметрів моделі.

Достатні умови існування оптимального керування для задачі (1)–(2) без термінальної складової в критерії якості наведено в роботах [9, 10].

Теорема 1. Розглядається задача оптимального керування (1)–(2) на фіксованому інтервалі $[t_1, t_2]$. Припустимо, що:

- існує стала $M > 0$ така, що $\|x(t, u)\| \leq M$ для всіх $u \in U$ та $t_1 \leq t \leq t_2$;
- L є напівнеперервною знизу;
- множина $D^+ = \{(y^0, y) : \exists v \in U, y = f(t, x, v), y^0 \geq L(t, x, v)\}$ є опуклою для $(t, x) \in [t_1, t_2] \times \{x : |x| \leq M\}$.

Тоді існує оптимальне керування $u^* \in U$.

Опис побудови оптимального керування для задачі (1)–(2) дає принцип максимуму Понтрягіна з термінальною складовою [11, 12].

Теорема 2. Нехай $u^* \in U$ — оптимальне керування в задачі (1)–(2). Тоді існує спряжена функція $\lambda : R \rightarrow R^n$ така, що $x(t, u^*)$, u^* , λ задовольняють систему:

$$\begin{aligned} \frac{dx(t)}{dt} &= f(t, x, u^*), \\ x(t_1) &= x_1 \end{aligned} \quad (3)$$

та спряжену систему:

$$\begin{aligned} \frac{d\lambda(t)}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial x} = -L_x(t, x, u^*) - \lambda^T f_x(t, x, u^*), \\ \lambda(t_2) &= \phi'(x(t_2)) \quad \text{— (умова трансверальності),} \end{aligned} \quad (4)$$

де функція Гамільтона–Понтрягіна H задається як

$$H(t, x, u) = L(t, x, u) + \lambda^T f(t, x, u). \quad (5)$$

ЗАДАЧА ОПТИМАЛЬНОГО КЕРУВАННЯ СТАДІЇ ЕЛОНГАЦІЇ ПЛР

Розглядається модель стадії елонгації ПЛР, яку запропоновано в роботі [6]. Для стадії елонгації

$$\frac{ds'}{dt} = -k_2 s' q + k_{-2} c, \quad (6)$$

$$\frac{dq}{dt} = -k_2 s' q + k_{-2} c + k_3 c n, \quad (7)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_2 s' q - k_{-2} c - k_3 c n, \quad (8)$$

$$\frac{dn}{dt} = -k_3 c n, \quad (9)$$

$$\frac{dd}{dt} = k_3 c n, \quad (10)$$

де k_{-2} , k_2 — пряма і зворотня швидкості реакції для утворення комплексу, q — Taq молекула, c — число копій, n — нуклеотидна послідовність для елонгації, k_{-3} , k_3 — пряма і зворотня швидкості реакції для елонгації, d — дволанцюгова ДНК.

У той же час за проведення фази елонгації ПЛР керуючим впливом є температура [7–8]. Залежність швидкості реакції k від абсолютної температури T описується рівнянням Арреніуса [8]:

$$k = A e^{-E_a / RT}, \quad (11)$$

де A характеризує частоту зіткнень молекул, R — універсальну газову сталу, E_a — енергію активації.

Виходячи з рівняння Арреніуса (11) система диференціальних рівнянь для стадії елонгації (6)–(10) може бути уточнена таким чином:

$$\frac{ds'}{dt} = -k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c, \quad (12)$$

$$\frac{dq}{dt} = -k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c + k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \quad (13)$$

$$\frac{dc}{dt} = k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' q - k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c - k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \quad (14)$$

$$\frac{dn}{dt} = -k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \quad (15)$$

$$\frac{dd}{dt} = k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \quad (16)$$

з відповідними початковими умовами:

$$s'(t_1) = s_0, q(t_1) = q_0, c(t_1) = c_0, n(t_1) = n_0, d(t_1) = d_0.$$

У системі диференціальних рівнянь (12-16) $r = \frac{E_a}{R}$ — стала. Вважаємо,

що $T = T(t)$ — функція керування. Припускаємо, що $T(t) \in [T_e^{\min}, T_e^{\max}]$.

Для стадії елонгації метою є отримати якнайбільше двохланцюгових ДНК d , при цьому витративши якнайменше Taq молекул, тобто:

$$J(s', q, c, n, d, T) = \int_{t_1}^{t_2} (d^2(t) - Wq^2(t)) dt \rightarrow \inf_{T \in U},$$

де $W > 0$ — ваговий коефіцієнт, U — множина кусково-неперервних функцій $T(t) \in [T_e^{\min}, T_e^{\max}]$.

Біологічно значимою областю є

$$\Omega_1 = (s', q, c, n, d, T) \in R_+^5, \quad (17)$$

що накладає фазові обмеження:

$$s' \geq 0, q \geq 0, c \geq 0, n \geq 0, d \geq 0. \quad (18)$$

Отже, метою є визначення оптимального керування $T^* \in U$, що задовольняє:

$$J[T^*] = \inf_{T \in U} J[T]. \quad (19)$$

На основі теореми 1 бачимо, що оптимальне керування в задачі (12)–(19) існує, оскільки підінтегральний вираз у критерії якості є опуклою функцією, а траєкторія системи належить простору L^∞ .

Застосуємо теорему 2 для отримання необхідних умов оптимальності. Функція Гамільтона–Понтрягіна має вигляд:

$$H = d^2 - Wq^2 + \lambda_1 (-k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c) +$$

$$\begin{aligned}
 & + \lambda_2(-k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c + k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \\
 & + \lambda_3(k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q - k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c - k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \lambda_4(-k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \lambda_5(k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn). \quad (20)
 \end{aligned}$$

Отже, з теореми 2 маємо спряжену систему:

$$\begin{aligned}
 \frac{d\lambda_1}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial s'} = k_2 e^{-\frac{r}{T}} q(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3), \\
 \frac{d\lambda_2}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial q} = 2Wq + k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'(\lambda_1 + \lambda_2 - \lambda_3), \\
 \frac{d\lambda_3}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial c} = k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} (\lambda_1 - \lambda_2 + \lambda_3) - k_3 e^{-\frac{r}{T}} n(\lambda_2 - \lambda_3 - \lambda_4 + \lambda_5), \quad (21) \\
 \frac{d\lambda_4}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial n} = k_3 e^{-\frac{r}{T}} c(-\lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 - \lambda_5), \\
 \frac{d\lambda_5}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial d} = -2d.
 \end{aligned}$$

Позначимо:

$$\begin{aligned}
 \Phi(t) &= \lambda_1(-k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c) + \lambda_2(-k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c + k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \\
 & + \lambda_3(k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q - k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c - k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \lambda_4(-k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn) + \lambda_5(k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn). \quad (22)
 \end{aligned}$$

Враховуючи (22), функцію Гамільтона–Понтрягіна (20) запишемо у вигляді:

$$H = d^2 - Wq^2 + e^{-\frac{r}{T}} [\Phi(t)]. \quad (23)$$

Звідси бачимо, що максимальні значення H будуть при $T = T^*(t)$, де:

$$T^*(t) = \begin{cases} T_e^{\min}, & \text{якщо } \Phi(t) > 0, \\ T_e^{\max}, & \text{якщо } \Phi(t) < 0, \\ \text{будь-яке з } [T_e^{\min}, T_e^{\max}], & \text{якщо } \Phi(t) = 0. \end{cases} \quad (24)$$

Отже, оптимальні траєкторія $(s^*, q^*, c^*, n^*, d^*)$ на керування T^* можуть бути побудовані в результаті розв'язку крайової задачі:

$$\begin{aligned}
 \frac{ds'}{dt} &= -k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c, \\
 \frac{dq}{dt} &= -k_2 e^{-\frac{r}{T}} s'q + k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c + k_3 e^{-\frac{r}{T}} cn,
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{dc}{dt} &= k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' q - k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} c - k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \\
 \frac{dn}{dt} &= -k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \\
 \frac{dd}{dt} &= k_3 e^{-\frac{r}{T}} c n, \\
 \frac{d\lambda_1}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial s'} = k_2 e^{-\frac{r}{T}} q (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3), \\
 \frac{d\lambda_2}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial q} = 2Wq + k_2 e^{-\frac{r}{T}} s' (\lambda_1 + \lambda_2 - \lambda_3), \\
 \frac{d\lambda_3}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial c} = k_{-2} e^{-\frac{r}{T}} (\lambda_1 - \lambda_2 + \lambda_3) - k_3 e^{-\frac{r}{T}} n (\lambda_2 - \lambda_3 - \lambda_4 + \lambda_5), \\
 \frac{d\lambda_4}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial n} = k_3 e^{-\frac{r}{T}} c (-\lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 - \lambda_5), \\
 \frac{d\lambda_5}{dt} &= -\frac{\partial H}{\partial d} = -2d.
 \end{aligned} \tag{25}$$

З крайовими умовами:

$$s'(t_1) = s_0, \quad q(t_1) = q_0, \quad c(t_1) = c_0, \quad n(t_1) = n_0, \quad d(t_1) = d_0;$$

$$\lambda_1(t_2) = 0, \quad \lambda_2(t_2) = 0, \quad \lambda_3(t_2) = 0, \quad \lambda_4(t_2) = 0, \quad \lambda_5(t_2) = 0.$$

Теорема 3. Для досить малого значення t_2 розв'язок системи (25) є єдиним.

Доведення. Припустимо навпаки, що існують два розв'язки (25), а саме:

$$T^* = (s'^*, q^*, c^*, n^*, d^*, \lambda_1^*, \lambda_2^*, \lambda_3^*, \lambda_4^*, \lambda_5^*),$$

$$T^{**} = (s'^{**}, q^{**}, c^{**}, n^{**}, d^{**}, \lambda_1^{**}, \lambda_2^{**}, \lambda_3^{**}, \lambda_4^{**}, \lambda_5^{**}).$$

Праві частини системи (25) є Ліпшицевими функціями аргументів $s', q, c, n, d, \lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5$. Звідси існує стала $C > 0$ така, що:

$$\|T^*(t) - T^{**}(t)\| \leq \int_{t_1}^{t_2} C \left(\|T^*(s) - T^{**}(s)\| \right) ds. \tag{26}$$

Застосовуючи до (26) теорему про середнє значення, маємо, що існує момент часу $\xi: t_1 \leq \xi \leq t_2$ такий, що:

$$\|T^*(t) - T^{**}(t)\| \leq t_2 C \left(\|T^*(\xi) - T^{**}(\xi)\| \right)$$

при всіх $t \in [t_1, t_2]$. Якщо ж виберемо t_2 таким, що $t_2 < \frac{1}{C}$, то отримуємо суперечність.

ВИСНОВКИ

Сформульовано задачу оптимального керування протікання стадії елонгації у ПЛР. Застосовано принцип максимуму Понтрягіна до задачі оптимального керування та сформульовано необхідну умову оптимальності. Отримані результати необхідні для чисельного обчислення оптимального керування досліджуваної стадії та допоможуть мінімізувати необхідний час для реалізації стадії елонгації, що в майбутньому дозволить мінімізувати час проведення полімеразно-ланцюгової реакції.

У подальших дослідженнях потрібно дослідити керованість інших стадій ПЛР та провести відповідне чисельне обчислення оптимального керування.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Сверстюк А.С., Бігуняк Т.В., Перевізник Б.О.* Огляд методів та моделей полімеразно-ланцюгової реакції // Медична інформатика та інженерія. — № 3. — С. 97–100.
2. *Путинцева Г.Й.* Медична генетика: підручник. — К.: Медицина, 2008. — С. 81–87.
3. *Буляница А.Л.* Математическое моделирование циклических режимов управления температурой при реализации полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для метода молекулярных колоний (ММК) на микрочипе // Научное приборостроение. — 2011. — **21**, № 1. — С. 87–96.
4. *Arnheim N.* Polymerase chain reaction strategy // Annual review of biochemistry. — 1992. — **61**, XIV+1359P. — P. 131–156.
5. *Xiangchun X., Sinton D., Dongqing L.* Thermal end effects on electroosmotic flow in capillary // Int. J. of Heat and Mass transfer. — 2004. — **47**. — P. 3145–3157.
6. *Stone E., Goldes J., Garlick M.* A multi-stage model for quantitative PCR // Mathematical biosciences and engineering. — http://hs.umt.edu/math/research/technical-reports/documents/2009/10_pcrpaper4.pdf
7. *Lukes D.L.* Differential Equations: Classical to Controlled // Academic Press, New York. — 1982. — **162**. — P. 322.
8. *Piccinini L. C., Stampacchia G., Vidossich G.* Ordinary Differential Equations in Rn. Problems and Methods Ordinary // Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, Springer-Verlag. — 1984. — **XII**. — P. 385.
9. *Macki J., Strauss A.* Introduction to Optimal Control Theory, Springer-Verlag // New York. — 1982. — **XIV**. — P. 168.
10. *Fleming W.H., Rishel R.W.* Deterministic and Stochastic Optimal Control, Springer Verlag // New York. — 1975. — **XIII**. — P. 222.
11. *Kamien M.I., Schwartz N.L.* Dynamic Optimization // North-Holland, Amsterdam. — 1991. — **3**. — P. 272.
12. *Понтрягин Л.С., Болтянский В.Г., Гамкрелидзе П.В., Мищенко Е.Ф.* Математическая теория оптимальных процессов. — М.: Наука, 1983. — 393 с.
13. *Kelly K., Kostin M.* Non-Arrhenius rate constants involving diffusion and reaction // Journal of Chemical Physics. — 1986. — **85**, issue 12. — P. 7318.

Надійшла 28.02.2014