

КОНВЕКЦИОННАЯ ПЦР В КОНВЕКТИВНЫХ ЯЧЕЙКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ

¹Чемерис Д.А., ¹Гарафутдинов Р.Р., ¹Сахабутдинова А.Р., ²Малеев Г.В., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, Уфа, 450054, пр. Октября, 71. E-mail: chemeris@anrb.ru

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Россия, Москва, 119334, ул. Вавилова, 26

Резюме

Описаны всевозможные варианты проведения конвекционной ПЦР, основанной на термогравитационных конвективных ячейках, в реакционных сосудах разных типов, среди которых большинство представлено капиллярами различных видов и форм, включая стандартные микропробирки. В меньшей степени для конвекционной ПЦР используются шланги и микрофлюидные устройства, вкпе с их вращением, а также иные типы реакционных сосудов. Рассмотрены способы и места подвода тепла к реакционным сосудам для формирования конвективных потоков жидкости. Значительное внимание уделено типам конвективных ячеек, включая исторические аспекты их открытия и изучения. Приведены оценки чувствительности разных вариантов конвекционной ПЦР, в том числе для коммерчески производимых моделей, включая приборы, работающие в режиме реального времени. Собрана практически вся литература по конвекционной ПЦР, среди которой немалая часть представлена патентами и заявками на патенты на различные способы амплификации нуклеиновых кислот с помощью термоконвекции.

Ключевые слова: ПЦР, конвекционная ПЦР, изоляционная изотермическая ПЦР, ииПЦР, конвекция, термогравитационная конвекция, термокапиллярная конвекция, конвективная ячейка

Цитирование: 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. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52

CONVECTION PCR IN DIFFERENT TYPES OF CONVECTIVE CELLS

¹Chemeris D.A., ¹Garafutdinov R.R., ¹Sakhabutdinova A.R., ²Maleev G.V., ¹Chemeris A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, Prospect Oktyabrya 71, chemeris@anrb.ru

²Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, 26 Vavilov Street, Moscow, 119334, Russia

Resume

Herein we describe existing platforms for convection PCR based on thermo-gravitation in convective cells of reaction vessels. Patents, patent applications and the available published literature have been extensively reviewed in order to compare the various platforms and approaches to nucleic acid amplification by thermal convection. First, we evaluate and review the different reaction vessels for convection PCR, including standard microtubes, capillary tubes, pieces of tubing, microfluidic devices, rotating microchips and also other types of vessels. We then consider the methods and sources of heat supply to the reaction for the formation of convective fluid flows. Particular attention was paid to the types of convective cells, including historical aspects of their discovery and study. We provide real-time

operating sensitivity estimates for the various platforms of convection PCR, which include commercially produced models as well as homemade constructions.

Keywords: PCR, convection PCR, convective PCR, insulated isothermal PCR, iiPCR, convection, convective cell, thermogravitational convection, thermocapillary convection

Citation: 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. V. 10(4). P. 410-443. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-52 (In Russian)

Содержание	Стр.
Введение	411
Типы конвективных ячеек	413
Конвекционная ПЦР в капиллярах и пробирках	417
Конвекционная ПЦР в шлангах	421
Микрофлюидная конвекционная ПЦР	423
Изоляционная изотермическая ПЦР	424
Конвекционная ПЦР, сопряженная с вращением реакционных сосудов	425
Конвекционная ПЦР в прочих типах реакционных сосудов	426
Заключение	428
Литература	428
References	436

Content	Pages
Introduction	411
Types of convective cells	413
Convection PCR in capillaries and in tubes	417
Convection PCR in tubings	421
Microfluidic convection PCR	423
Insulated isothermal PCR	424
Convection PCR with a centrifugation	425
Convection PCR in another types of vessels	426
Conclusion	428
References (in Russian)	428
References	436

Введение

С тех пор как в середине 80-х годов прошлого века была разработана полимеразная цепная реакция (ПЦР), обеспечивающая специфичную амплификацию выбранного участка молекул ДНК, данный метод продолжает непрерывно совершенствоваться. При этом серьезное внимание отводится вопросу сокращения времени всего процесса, которое во многом зависит от скорости смены температур в реакционных камерах ДНК-термоциклеров различных типов, поскольку ПЦР относится к реакциям, управляемым сменой температур и требуется своя для разных этапов. На первом этапе каждого цикла необходимо «распелести» или исходную двухцепочечную ДНК или образовавшиеся ампликоны, представляющие собой ограниченные праймерами целевые участки амплифицируемой ДНК и перевести ее/их в одноцепочечное состояние, что

достигается высокотемпературной денатурацией, которую в классическом варианте ПЦР легко осуществить, нагревая до 95-96°C реакционную смесь тем или иным способом. На втором этапе (обычно протекающем в диапазоне от 50 до 65°C) должен произойти отжиг олигонуклеотидных праймеров, элонгация которых происходит (преимущественно) на следующем этапе, осуществляемом уже при температурах около 72-74°C, являющихся оптимальными для работы присутствующих в растворе термостабильных ДНК полимераз, хотя этот процесс начинает идти уже на этапе отжига. Другими обязательными компонентами реакционной смеси, представляющей собой несжимаемую жидкость, коей служит вода, являются подходящий буфер и дезоксинуклеозидтрифосфаты, под действием ДНК полимеразы в виде дезоксинуклеозидмонофосфатов образующие новые цепи молекул ДНК (ампликонов). Чтобы произошло

заметное накопление в реакционной смеси ожидаемых целевых ампликонов, требуется цикличное повторение всех этих этапов. И от времени, затрачиваемого на переход от одной температуры к другой, в немалой степени зависит общая продолжительность всей реакции.

Наиболее распространенным сейчас типом ДНК-термоциклеров являются приборы, где реакционные блоки на разное число пробирок представлены твердотельными конструкциями из алюминия или серебра (позолоченного), поскольку данные металлы, имея, соответственно, коэффициенты теплопроводности 209,3 и 418,7 Вт/м²·°Кельвина, обеспечивают относительно быструю смену температур, где источником нагрева/охлаждения служат элементы Пельтье. Однако смена температур происходит не мгновенно ввиду некой массивности таких термоблоков, и из-за неизбежной инерции при переходе от одной температуре к другой теряется довольно значительное время. Помимо инерции самого термоблока задержка в достижении нужной температуры реакционной смеси имеет место за счет стенок реакционных пробирок, обычно изготавливаемых из полипропилена, обладающего не лучшей теплопроводностью. Более быструю смену температур в реакционной смеси удалось достичь благодаря использованию специальных тонкостенных полипропиленовых пробирок, которые сейчас поставляются множеством фирм. Для ДНК-термоциклеров, в которых с помощью манипулятора происходит перемещение реакционных планшет между термоблоками с фиксированными температурами, эффект инерционности термоблока отсутствует и переход между температурами происходит быстрее, поскольку на передачу тепла влияют лишь стенки реакционных сосудов, а также кратковременное нахождение пробирок в воздухе вне зон активного воздействия температур выше комнатной. Еще один распространенный тип ДНК-термоциклеров характеризуется полой воздушной камерой, нагреваемой обычно мощной инфракрасной лампой и охлаждаемой вентилятором, где также на смену температур влияют главным образом стенки реакционных сосудов, которые делают, в том числе и из стекла, обладающей лучшей теплопроводностью, нежели полимерные материалы.

Для любых ДНК-термоциклеров одной из важных характеристик служит однородность температурного поля в разных частях термоблока или камеры, и многие производители подчеркивают для своих приборов лишь незначительные на несколько десятых градуса отличия по температуре

по всему термоблоку, что характеризует такие приборы с лучшей стороны. Однако для конвекционной ПЦР напротив свойственна различная температура в разных зонах пробирки, капилляра или иного реакционного сосуда, или точнее в самой реакционной смеси имеет место градиент температур, возникающий за счет разных внешних воздействий, к рассмотрению которых мы ниже и перейдем, по возможности соблюдая хронологический порядок.

Пожалуй, впервые в связи с ПЦР упоминание в патентах США конвективных сил обнаруживается в документе под номером 5,589,136, выданном 31 декабря 1996 г. [Northrup et al., 1996], заявка на который была подана 20 июня 1995 г. Данный патент был призван охранять микрофлюидное устройство на основе кремния, предназначенное для проведения в небольших объемах реакционных смесей различных реакций с нуклеиновыми кислотами, включая ПЦР, а также лигазную цепную реакцию. А явление термоконвекции в том способе амплификации нуклеиновых кислот использовалось авторами для охлаждения части раствора, контактирующей со стенками из кремния, не подвергающимися нагреву. В одной из статей, посвященных разработке отличающегося способа нагрева реакционной смеси за счет ее электролитического сопротивления при подаче напряжения, упоминается, что охлаждение происходит за счет принудительных конвекционных потоков воздуха [Near et al., 2000]. Но в обоих случаях это была еще не настоящая конвекционная ПЦР. Тем более что в любом варианте ПЦР при смене температур в реакционной смеси неизбежно возникает слабая термоконвекция. В отечественной литературе также имеется сообщение, где в связи с проведением ПЦР в массивном термоблоке упоминаются конвективные потоки жидкости, при этом отмечается, что они довольно слабы [Чернышев и др. (Chernyshev et al.), 2011]. Первый же патент на истинную конвекционную ПЦР, где движущей силой, активно перемещающей слои жидкости, служили исключительно конвективные токи, был выдан в США 1 июля 2003 г. под номером 6,586,233 [Bennett et al., 2003]¹, заявка на который была подана 9 марта 2001 г. и опубликована 12 сентября 2002 г. с присвоенным номером US 2002/0127152. В связи с упоминанием патентов хотим заметить, что за небольшими исключениями будем цитировать только патенты США и заявки на их получение.

¹ Подробнее о данном способе конвекционной ПЦР пойдет речь в соответствующем разделе данной статьи.

В англоязычной литературе с приблизительно равной частотой употребляются термины «convection PCR» и «convective PCR», тогда как в публикациях на русском языке (которых пока крайне мало) эту реакцию называют «конвекционной ПЦР». В последние годы для одного из вариантов такой ПЦР стало использоваться сокращенное наименование как «iiPCR» (insulated isothermal PCR), не имеющего пока аналогов в русскоязычных статьях, но в данной обзорной работе мы все же решили использовать аббревиатуру ииПЦР, поскольку довольно большая группа работ выполнена с применением именно этого варианта конвекционной ПЦР, для которого уже существуют промышленно изготавливаемые приборы.

Насколько нам известно, обзорных статей по конвекционной ПЦР не имеется, если не считать двух относительно старых работ Д.Брауна с соавтором [Braun, 2004; Braun, Libchaber, 2004], в которых рассмотрены далеко не все варианты (даже на тот момент) этой реакции амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот. Данный обзор восполняет имеющийся в мировой литературе пробел, затрагивая, в том числе, историю развития взглядов на конвективные ячейки и возникающие в них движущие жидкость силы. Несколько статей посвящены рассмотрению исключительно теоретических вопросов конвекционной ПЦР [Yariv et al., 2005; Allen et al., 2009; Wang, Wang, 2010; Волкова (Volkova), 2010; Alexandersen et al., 2013; Моисеев (Moiseev), 2012; Moiseev et al., 2013], но математический аппарат конвекционной ПЦР оставлен здесь без внимания, поскольку явится предметом рассмотрения для другой нашей статьи.² Ранее нами рассмотрены различные вариации приборного оснащения ПЦР [Чемерис и др., 2011], где значительное внимание уделено особенностям различных способов смены температур в твердотельных реакционных термоблоках, а также в полых воздушных камерах ДНК-термоциклеров соответствующих типов. Микрожидкостной ПЦР и особенностям смены температур в разнообразных ПЦР-чипах была посвящена другая наша статья [Магданов и др., 2013]. Целью же данного обзора является рассмотрение особенностей конвекционной ПЦР, в которой смены температур в реакционной смеси происходят под действием конвективных процессов, несколько отличающихся друг от друга по характеру их протекания, а также описание примеров

практического применения такого варианта ПЦР для целей ДНК-диагностики.

Типы конвективных ячеек

Прежде чем приступить к описанию конвекционной ПЦР, необходимо кратко коснуться истории изучения известных типов конвективных ячеек, под которыми понимаются не формы реакционных сосудов, а возникающие из-за температурных различий те или иные струи жидкости, образующие специфические ячейки с некими условными размытыми границами. Поскольку ПЦР – температурозависимая реакция, то в связи с этим интерес в этой статье представляет рассмотрение исключительно термоконвекции и другие физические воздействия, вызывающие конвективное движение жидкостей, останутся здесь без внимания.

Термогравитационная конвекция вызывается тем, что более нагретая жидкость, которая в ПЦР представляет собой водные растворы ряда компонентов этой реакции, имеет меньшую плотность и потому стремится вверх, благодаря силе плавучести, являющейся разницей между силой Архимеда и силой тяжести, тогда как более холодные слои жидкости с большей плотностью напротив стремятся вниз, вызывая тем самым перемещение слоев жидкости, скорость которого тем больше, чем сильнее разница температур и соответственно разница плотностей у этих слоев. При этом силе плавучести противостоит сопротивление вязкости жидкости и диффузия тепла, которая направлена на выравнивание температуры разных слоев жидкости. Что касается термокапиллярной конвекции, то ее приводят в действие силы поверхностного натяжения жидкости со свободной поверхностью, граничащей с газовой фазой. Величина поверхностного натяжения меняется с температурой, и она больше там, где жидкость холоднее и поэтому разница температур жидкости на поверхности порождает градиент поверхностного натяжения, а вслед за ним и конвективные потоки жидкости по направлению к зонам с большим поверхностным натяжением и меньшей температурой. При этом неподвижное состояние системы становится неустойчивым, если температурный градиент достаточно велик, чтобы преодолеть диссипативные эффекты вязкости и тепловой диффузии.

Температурная конвекция изучается уже, по крайней мере, два столетия и более столетия весьма интенсивно, но поскольку история несколько запутанная и до некоторой степени противоречива, то мы решили уделить здесь определенное внимание развитию взглядов на термоконвекцию. Термин «конвекция» (от лат. convectio — «перенесение») был предложен в 1834 г. английским физиком W.Prout

² В настоящее время нами готовится рукопись статьи, посвященной теоретическим вопросам конвекционной ПЦР [Моисеев и др.].

для обозначения процесса распространения тепла в неоднородном тепловом поле, исследованного и описанного еще в самом конце XVIII-го века исследователем В.Thompson более известным как С.Rumford на примерах распределения сохраняющегося тепла при остывании яблочного пирога и супа [Brown, 1957]. Но еще раньше предположения о неких механизмах переноса тепла в разных средах делали в 1735 г. английский метеоролог G.Hadley и в 1753 г. российский ученый М.В.Ломоносов. Хотя считается, что сам физический феномен в виде температурной природной конвекции известен со времен Архимеда [Normand, Pomreau, 1977]. Возможно, первое практическое применение тепловой конвекции состоялось в середине XVIII-го века благодаря англичанину полковнику W.Cook, предложившему для согрева помещений использовать проложенные вдоль стен комнат металлические трубы, в которые подавался водяной пар из специальной емкости, нагреваемой на кухне [Cook, 1744].

В 1855 г. J.Thomson (старший брат лорда Кельвина – урожденного W.Thomson) описал эффект, известный как «слезы вина», в основе которого лежит явление поверхностного натяжения, сопровождаемого конвекцией [Thomson, 1855]. При этом он опирался на более раннюю работу Mr. C.Varley [Varley, 1836], в которой тот описал свои наблюдения под микроскопом вращательных движений капель жидкостей. Позже изучение этого явления продолжил итальянский физик - специалист в области поверхностного натяжения С.Marangoni, защитивший докторскую диссертацию по математике на тему «Sull'espansione delle gocce di un liquido galleggiante sulla superficie di altro liquido»³ и опубликовавший свои результаты в 1865 г. [Marangoni, 1865]. В силу сложившихся обстоятельств это явление получило позже название эффекта Марангони. По мнению американских авторов [Scriven, Sterling, 1960], проводивших фактически целое расследование, имя Дж. Томсона оказалось незаслуженно забытым, отчасти из-за того, что в ряде случаев его статьи несколько раз разные авторы не процитировали. Тот же Дж. Томсон, наблюдая за конвективными процессами, в 1882 г. описал возникновение конвекции в тонком слое жидкости, которой ему послужила мыльная вода [Thomson, 1882]. На рубеже XIX-го и XX-го столетий французский ученый Г.Бенар (H.Benard) опубликовал ряд статей [Benard, 1900; 1900a; 1901 и др.], во многом положивших начало систематическим

исследованиям термоконвекции. При этом Г.Бенар⁴ также не сослался на работы Дж.Томсона, что еще в 1916 году в своей знаменитой эпохальной статье отметил лорд Рэлей (Lord Rayleigh) (см. ниже). Г.Бенар наблюдал возникновение конвективных ячеек в тонком слое спермацета, налитого на металлическую пластину, подогреваемую снизу. Подвести некую основу под опыты Г.Бенара взялся известный английский ученый W.J.Strutt, ставший к тому времени лордом Рэлеем и опубликовавший в 1916 г. подробный анализ конвективных ячеек Бенара, в первых строках своей статьи [Lord Rayleigh, 1916] отметивший, что хочет попытаться теоретически объяснить тщательно и умело выполненные эксперименты Г.Бенара. После не менее скрупулезно им самим проведенного анализа такие ячейки стали называть ячейками Бенара-Рэля. При этом однако, лорд Рэлей ошибочно посчитал, что в опытах Г.Бенара возникали конвекционные процессы, вызванные так называемой плавучей плотностью, являющейся разницей между силой Архимеда и силой земного притяжения. И данное заблуждение просуществовало вплоть до середины 50-х гг. прошлого века, однако и сейчас в литературе нередко встречаются разночтения при описании различных термоконвективных ячеек.

Что касается конвективных ячеек, действительно образующихся под действием плавучей плотности, и предсказанных Рэлеем [Lord Rayleigh, 1916], то теоретическая проработка данного вопроса продолжилась в трудах Н.Jeffreys [Jeffreys, 1926; 1928], но лишь в 1935 г. было получено соответствующее экспериментальное подтверждение [Schmidt, Milverton, 1935] однако таковым оно тогда воспринято не было из-за царивших ложных представлений о конвекции в силу авторитета Рэля. Среди тех, кто в числе первых указал на несоответствие теории, предложенной лордом Рэлеем, происходящим событиям в конвективных ячейках Бенара, был эмигрировавший во Францию и ставший там студентом Г.Бенара В.Волковьский, подготовивший довольно объемный труд, предисловие к которому написал сам Г.Бенар [Volkovisky, 1939]. Собственно Г.Бенар и ранее высказывал предположение, что в наблюдавшейся им термоконвекции определенную роль играет температурная зависимость коэффициента

³ В переводе с итальянского – «О расширении капель плавающей жидкости на поверхности другой жидкости»

⁴ По признанию Г.Бенара он узнал о работах Дж.Томсона только некоторое время спустя. Также Г.Бенар сожалел, что Первая мировая война помешала ему вовремя ознакомиться со статьей лорда Рэля еще при жизни последнего и тем самым он не смог вступить с ним в дискуссию [Wesfreid, 2006].

поверхностного натяжения [Гетлинг (Getling), 1991]. Но еще в 1912 г., исследуя конвекцию в расплавленном воске, один из соавторов Г. Бенара С. Dauzere предположил, что она может быть вызвана различиями в поверхностном натяжении, которые в свою очередь могут происходить из-за разной степени очистки воска [Fauve, 2017]. В середине 50-х гг. М. J. Block опубликовал в журнале Nature статью, в которой однозначно указывалось, что термоконвекцию в ячейках Бенара в его опытах начала XX-го века обеспечивала не плавучая плотность, а различия в поверхностном натяжении жидкости, вызванные градиентом температур [Block, 1956]. Данная статья вызвала поначалу даже определенное неприятие среди специалистов в области термоконвекции. Но окончательно все вопросы были сняты теоретическими выкладками, произведенными два года спустя J.R.A. Pearson [Pearson, 1958], хотя надо отметить, что теория Пирсона с трудом пробивала себе дорогу, тогда как теория Рэлея была воспринята сразу во многом благодаря авторитету автора. Несколько позже была опубликована статья, в которой произведенные подсчеты убедительно показывали вклад в термоконвекцию как гравитационных сил, так и сил поверхностного натяжения [Nield, 1964]. Тем более, что полностью исключить роль сил плавучести в возникновении конвективных ячеек Бенара в условиях Земли, где действует сила земного притяжения, невозможно. Спустя несколько лет эксперименты с термоконвективными ячейками Бенара были воспроизведены в космосе в условиях ослабленной гравитации при 10^{-6} и 10^{-8} g [Grodzka, Bannister, 1972; 1975], подтвердившие, что для возникновения конвекции в ячейках Бенара, содержащих только уже не спермацет, а фторуглеродное масло, в виде заметной для глаза движения жидкости – все же достаточно действия только сил поверхностного натяжения, хотя вне всякого сомнения, что на Земле сила плавучести при определенных условиях играет также существенную роль.

На явление термоконвекции и тип формируемых конвективных ячеек действительно влияет множество факторов. Так, тонкий слой жидкости, подогреваемой снизу и не закрытый сверху, формирует типичную термокапиллярную ячейку Бенара с вертикальным градиентом температур и различиями сил поверхностного натяжения, которые являются температурозависимыми. Причиной движения слоев жидкости является действие капиллярных сил, тангенциально направленных к границе раздела фаз и возникающих как отклик системы на неоднородное распределение поверхностного натяжения. В такой

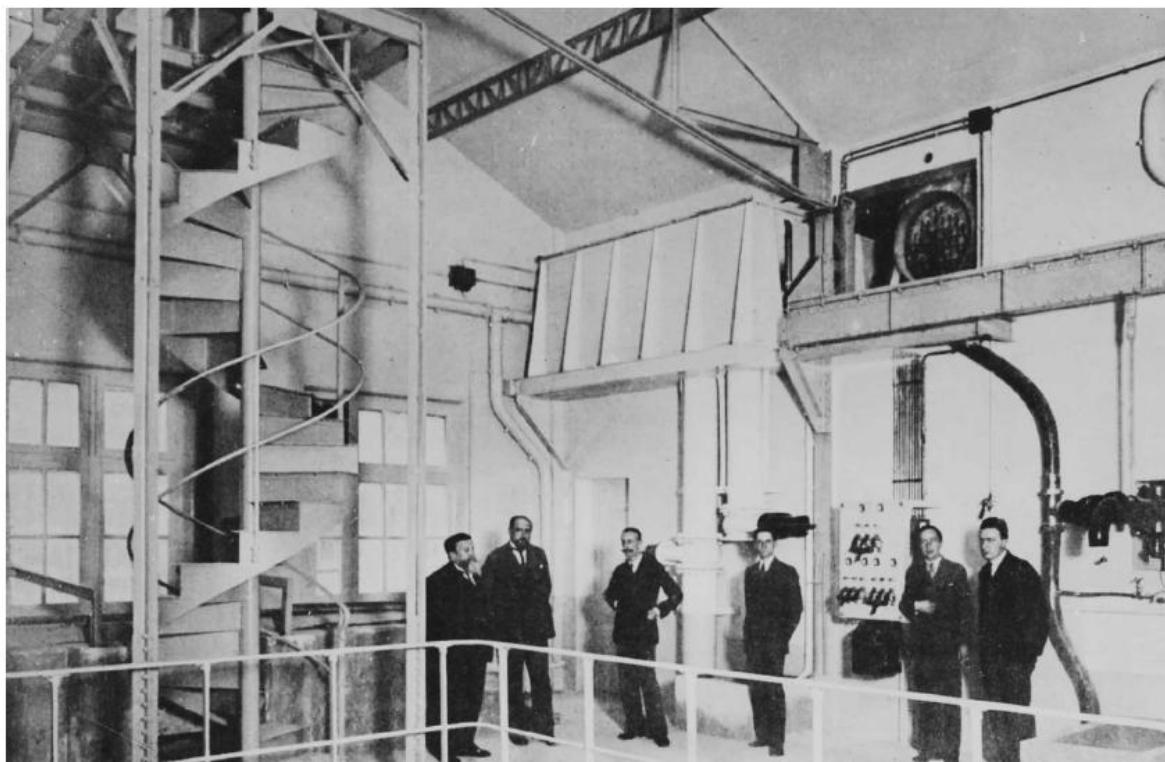
ячейке образуются упорядоченные гексагональные структуры, внутри которых жидкость или поднимается по центру и опускается по граням ячейки (*l*-тип) или наоборот (*g*-тип), что зависит от ряда факторов. Например, от толщины слоя подогреваемой снизу жидкости, даже кардинально меняющего характер конвекции [Cerisier et al., 1984]. При этом конечно необходимо учитывать вязкость жидкости, которая крайне важна и для термогравитационной конвекции. В термогравитационных ячейках, не имеющих четко выраженных межфазных границ, тип движения жидкости иной – валиковый. При этом возникают цилиндрические валы, вращающиеся навстречу друг другу по типу сцепленных шестеренок. Значительное влияние на термоконвекцию оказывают и форма резервуара, включая соотношение высоты и ширины слоя жидкости, и формируемый градиент температур, от масштаба которого зависит хаотичность перемещения слоев жидкости. Так, с увеличением градиента температуры и ускорением диффузии каждый вал распадается на два вала меньшего размера и при дальнейшем росте этого параметра возникает хаос. Вообще, в зависимости от условий конвекция может проявляться в разнообразных формах. Конвективные ячейки могут иметь разную конфигурацию, формируя некие, в той или иной степени, упорядоченные пространственные структуры. Ток жидкости может приобретать стационарный характер, испытывать колебания или становиться полностью турбулентным.

Подводя некоторый итог вышесказанному, следует сказать, что, благодаря имеющему место в разных зонах некоего объема жидкости градиенту температур, нарушается устойчивость системы и возникает термоконвекция. Механизмы, лежащие в ее основе, заключаются в действии силы плавучести, являющейся разницей между Архимедовой силой и силой тяжести, и/или в действии силы поверхностного натяжения. Более справедливо конвекцию за счет термокапиллярных сил называть «ячейками Бенара-Марангони», а возникающие термогравитационные конвективные ячейки «ячейками Рэлея-Бенара». Несколько упрощенно они обозначаются еще как «ячейки Марангони» и «ячейки Бенара» соответственно, хотя это неправильно в принципе, поскольку фактически они представляют собой один и тот же тип ячеек. Возможно, более правильным было бы называть термокапиллярные и термогравитационные ячейки как «ячейки Бенара-Марангони» и «ячейки Рэлея-Джеффриса», соответственно. Или восстанавливая историческую справедливость для первого типа, учитывая вклад авторов – «ячейками Бенара-

Марангони-Томсона». Но это, скорее всего, приведет к еще большей путанице.

Важнейшая роль Г.Бенара в изучении конвективных процессов заключается в том, что он, как уже говорилось выше, первым стал систематически изучать это явление. А через столетие после пионерных работ Г.Бенара возникла конвекционная ПЦР, в которой происходит амплификация молекул ДНК. В этой связи нельзя не привести фотографию одного из помещений Института механики жидкостей Парижского

университета, где Г.Бенар работал в 30-ые годы прошлого века [Wesfreid, 2017]. Причем Г.Бенар изучал не только температурную конвекцию, но и прочие вихревые потоки и на данной фотографии (рис. 1) изображен большой зал, где велись кинематографические съемки вихрей, однако в первую очередь это помещение интересно для нас своей лестницей с перилами, сильно напоминающими спираль ДНК, которая в то время еще известна не была и станет открыта лишь спустя пару десятилетий [Watson, Crick, 1953; 1953a].



"Institut de mécanique des fluides de l'université de Paris", 4, rue de la Porte-d'Issy, Paris XV^e, in the 1930s. From left to right: H. Bénard, D. Riabouchinsky, H. Villat, H. Journaud, C. (K) Woronetz (Voronetz) and L. Santon. On the left, the stairs leading to the cinematographic camera used for the vortex shedding experiments.

Рис. 1. Фотография одного из экспериментальных помещений Institut de mécanique des fluides de l'université de Paris в Париже, где в 1930-ые гг. Г. Бенар работал и оказался сфотографированным стоящим рядом с лестницей, поручни которой поразительно напоминают двойную спираль ДНК, до открытия которой оставалось еще два десятилетия.
(Доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0)

Fig. 1. Photograph one of the experimental halls of the Institut de mécanique des fluides de l'université de Paris in Paris, where H. Benard worked in the 1930s. He is standing next to the stairs. The handrails of this stairway strikingly resemble a double helix of DNA, before the discovery of which remained two decades.
(Available via license CC BY-NC-ND 4.0)

Можно заметить, что за все время изучения термоконвекции все рассматриваемые типы конвективных ячеек «подогревались» либо снизу, обеспечивая вертикальный градиент температур, или с боков к ним прикладывались отличающиеся температуры, что приводило к формированию

горизонтального градиента температур. Долго считалось, что приложенное к конвективным ячейкам тепло сверху к неустойчивости систему привести не может и термоконвекции не возникнет. Но использование лазера, способного обеспечить локальный нагрев жидкости, например, в центре

подходящей емкости вызывает конвективные токи жидкости, что нашло применение в одном из вариантов конвекционной ПЦР, который опишем ниже. Однако насколько можем судить по доступной нам литературе, никто до нас в термогравитационных ячейках не пытался создать наклонный градиент температур, который как оказалось, коренным образом меняет характер термоконвекции и направления тока жидкости, о чем речь также пойдет дальше.

Конвекционная ПЦР в капиллярах и пробирках

25 октября 2002 г. вышел очередной номер журнала *Science*, в котором было опубликовано краткое сообщение о проведении конвекционной ПЦР в ячейке Рэлея-Бенара [Krishnan et al., 2002], где перемещения слоев жидкости приводились в действие силой плавучести, являющейся разницей между Архимедовой силой и силой тяжести. Для проведения данной конвекционной ПЦР в кубике из оргстекла был сделан вертикальный канал глубиной 1,5 см и диаметром приблизительно 1,5 мм ($h/d=10$), вмещавший 35 мкл реакционной смеси. Снизу производился нагрев кубика до 97°C , а сверху он был термостатирован при температуре 61°C . В результате за 1,5 часа реакции нарабатался специфичный ПЦР-продукт в виде фрагмента β -актинового гена размером 295 п.н., количество которого оказалось достаточным, чтобы его увидеть с помощью агарозного гель-электрофореза.

В своей следующей работе, посвященной конвекционной ПЦР, эти авторы [Krishnan et al., 2004] данную ПЦР-систему несколько усовершенствовали. Так, вместо кубика с одним каналом был изготовлен специальный многоколודцевый картридж из оргстекла, который сверху и снизу нагревался алюминиевыми пластинами до нужных температур (аналогичным тем, что были в их прежней работе). Однако серьезная проблема исключения образования вверху полостей воздушных пузырьков, способных изменить устанавливаемый температурный режим, можно сказать, была не решена, поскольку предлагалось слегка переполнять полость жидкостью, не допуская при этом перекрестного загрязнения образцов, для чего отверстия сверлились на достаточно большом расстоянии друг от друга, что, учитывая высокую чувствительность ПЦР и случающиеся ложнопозитивные результаты [Чемерис и др., 2012], не может характеризоваться положительно. Тем не менее, в результате 60-ти минутной амплификации нарабатывался ПЦР-продукт размером 191 п.н., причем было продемонстрировано, что стартовые количества от 250 тысяч до всего 550 копий матрицы длиной 3,9 т.п.н. обеспечивали специфичную

амплификацию [Krishnan et al., 2004]. В другой работе 2004 г. эти авторы [Ugaz, Krishnan, 2004] сообщили дополнительную информацию об изготовленном картридже, несущем 25 отверстий (5×5), и о передаче на него тепла от алюминиевых блоков, а также привели данные об успешной амплификации с помощью конвекционной ПЦР фрагмента ДНК размером 474 п.н. На данный способ конвекционной ПЦР был выдан патент США под номером 7,537,890 от 26 мая 2009 г. [Krishnan et al., 2009].

В дальнейшем этими авторами была продолжена работа по оптимизации конвекционной ПЦР в капиллярах и опубликована целая серия статей на эту тему [Muddu et al., 2009; 2010; 2011; 2011a; Pryie et al., 2012; 2013]. Главное внимание в этих работах было уделено варьированию соотношения h/d высверливаемых полостей в оргстекле или поликарбонате. Так, несмотря на то, что произведенные вычисления свидетельствовали в пользу капилляров с $h/d=9$, для которых для удвоения числа ампликонов теоретически было достаточно 11,6 сек, тогда как для полостей с $h/d=3$ достижение этого показателя требовало уже 27,3 сек, в самих экспериментах целевые продукты ПЦР напротив нарабатывались значительно быстрее для 3:1 капилляров. Причем для них было обнаружено отсутствие неспецифических продуктов, присутствующих при ПЦР в 9:1 капиллярах. Авторы связали такую ускоренную амплификацию с хаотическим движением жидкости в конвективных ячейках с соотношением $h/d=3$, тогда как, по их мнению, ламинарное течение жидкости не способствовало эффективному протеканию конвекционной ПЦР в 9:1 капиллярах. Отдельно стоит задержать внимание на одной из этих работ [Pryie et al., 2012], поскольку она несла образовательный характер и была предназначена для выполнения студентами лабораторных практикумов по конвекционной ПЦР в рамках профессиональных программ по биотехнологии Texas A&M University. Данная статья содержала специальный вопросник, а также сопровождалась видеокурсом. На одной из конференций этой группой авторов сообщено о возможности использования их варианта конвекционного ДНК-термоциклера в рамках сообщества Do-It-Yourself [Ugaz et al., 2012]. Было сообщено о проведении конвекционной ПЦР в капилляре, нагреваемом единственным источником тепла снизу, вошедшим в состав мобильного недорогого комплекса, рассчитанного на детекцию результатов амплификации с помощью фотосистемы смартфона, объединенной с увеличительной линзой и соответствующим светофильтром [Pryie, Ugaz, 2014; 2016; 2017]. Развитием данной разработки стало

объединение этой конструкции, весящей без смартфона всего 298 г, с ее транспортировкой с помощью квадрокоптера, ведя процесс конвекционной ПЦР буквально на лету, то есть в полете, в течение 20 мин [Priye et al., 2016]. При этом было показано, что такой вариант конвекционной ПЦР может успешно идти при температуре окружающей среды от 5°C до 35°C. Себестоимость данной конструкции без смартфона и без дрона авторы оценили приблизительно в 25 долларов США.

Оптимизация соотношений высоты и диаметра капилляров стала одной из задач по разработке портативного конвекционного термоциклера китайско-японским коллективом авторов [Li et al., 2016]. В качестве реакционных сосудов они использовали просверленные отверстия разных диаметров (1 мм, 1,5 мм и 2 мм) в поликарбонатных блоках разной толщины (от 6 мм до 16,5 мм), в которых в течение 20 мин велась амплификация фрагмента ДНК фага лямбда (исходное количество копий которого, к сожалению, не сообщается) путем приложения к этим блокам снизу температуры 97°C и к верхней поверхности – 55°C. Проведенное сравнение показало, что наилучшие результаты обеспечивал капилляр с соотношением $h/d=10$, а именно 15 мм и 1,5 мм. В рамках этой работы было также показано, что добавление в реакционную смесь 1% поливинилпирролидона с молекулярным весом 1300 кДальтон улучшает результаты данного варианта конвекционной ПЦР.

Особенностью еще одного конвекционного ДНК-термоциклера можно считать то, что подводился единственный нагрев к нижней части стеклянных капилляров с внутренним диаметром 2,2 мм, которые числом до 96 погружались в емкость с силиконовым маслом, нагретым до 95°C, а верх этих капилляров никак не термостатировался [Chen et al., 2012; 2015]. Сообщается об успешной амплификации фрагмента ДНК размером 122 п.н. за менее чем полчаса.

Группа авторов из разных университетов Тайваня предложила свой вариант капиллярной конвекционной ПЦР [Chou et al., 2011]. Они использовали стеклянную пробирку капиллярного типа, коммерчески реализуемую фирмой Roche. Ее внутренний диаметр составил 2,3 мм, а высота 26 мм, из которых на реакционную смесь приходилось 18 мм. Для предотвращения испарения сверху насаивалось минеральное масло. Нижняя часть капилляра помещалась в углубление термостатируемой пластины, верх капилляра находился в условиях комнатной температуры. В результате 30 минутной ПЦР происходила успешная амплификация фрагмента ДНК размером свыше 500

п.н. с чувствительностью, позволяющей обнаружить 30 исходных копий мишени. В своей следующей работе эти авторы сообщили о разработке специального микрофлюидного модуля, одним из элементов которого стала предложенная ими ранее конвекционная ПЦР в капилляре, нагреваемом снизу [Hsieh et al., 2012]. В дальнейшем они успешно преобразовали предложенный ранее способ проведения конвекционной ПЦР в вариант с регистрацией результатов амплификации в режиме реального времени [Hsieh et al., 2013].

Другая группа тайваньских авторов [Chang et al., 2012] реализовала конвекционную ПЦР в поликарбонатных капиллярах собственной конструкции R-tube, но поскольку они назвали свой метод *insulated isothermal PCR (iiPCR)* и с помощью выпущенного под эти капилляры специального прибора проведена детекция возбудителей различных болезней и уже опубликовано немало статей на тот счет, то более подробно эта технология будет описана ниже в соответствующем разделе «Изоляционная изотермическая ПЦР».

Также в капилляре собственной конструкции, названным D-tube, состоящим из амплификационной и детектирующей частей, был предложен довольно оригинальный вариант конвекционной ПЦР [Zhang et al., 2013; 2014]. Амплификационная часть D-tube представляла собой цилиндр с внутренним диаметром 1,7 мм и с высотой конвективной ячейки в нем 19 мм, погружаемый нижним концом в термостатированный при 95°C алюминиевый блок. В детектирующей части располагалась тестовая полоска, изготовленная из нитроцеллюлозы и содержащая набор соответствующих антител. За 20 мин с помощью конвекционной ПЦР происходила амплификация, включая ее асимметричный вариант с разным соотношением праймеров для улучшения детекции целевых продуктов с помощью иммуноферментной реакции, которая осуществлялась путем нескольких переверотов вручную D-tube с целью попадания пост-амплификационной смеси на тестовую полоску, на которой через 3 мин можно было визуально наблюдать специфические сигналы (окрашенные полосы). Причем было показано, что можно использовать лиофилизированные ингредиенты, заранее помещенные в амплификационную часть D-tube [Zhang et al., 2014]. На основе данных разработок этими авторами недавно сообщено об изготовлении портативного конвекционного ДНК-термоциклера модели TD-01, весящего 1,5 кг и имеющего габариты – 180 (Ш), 180 (Г) и 120 мм (В), в котором можно вести одновременную амплификацию 4 образцов [Zhuo et al., 2018]. В модельном эксперименте была

продемонстрирована детекция 0,1 TCID₅₀/мл⁵ вируса гриппа, на которую ушло всего 30 мин. Авторы отмечают, что разработанная ими конвекционная ПЦР вкупе с прибором TD-01 вполне соответствует требованиям, предъявляемым к ДНК-диагностике в так называемом режиме «по месту лечения» или «Point-of-Care Testing» [Wang, Gubler, 2018], чему во всем мире уделяется серьезное внимание, поскольку считается, что в будущем такой вариант детекции патогенов может приобрести большие масштабы и в этом случае простота и дешевизна прибора будет играть главенствующую роль. Естественно, при сохранении высокой достоверности таких анализов.

В изобретении южнокорейских авторов из фирмы Ahram Biosystems, Inc. [Hwang et al., 2009a; 2011; 2017] реакционным сосудом служила открытая с верхней стороны толстостенная стеклянная трубка. Ее высота составляла 55-60 мм, внутренний диаметр - 2 мм, внешний диаметр - 8 мм, запаянный нижний конец имел толщину стенок 3 мм. Она помещалась в полнотелый реакционный блок, разделенный изолятором на нижнюю и верхнюю части, где для каждой задавались свои температуры, формирующие градиент температур, приводящий к термоконвекции. Целевой продукт на электрофорезе появлялся лишь после часовой инкубации, причем в ходе конвекционной ПЦР реакционный сосуд находился под давлением азота в 1,2 атм. для исключения кипения. Поскольку конвекционная ПЦР, эксплуатирующая силы плавучести, создает ситуацию, когда в верхней части реакционного сосуда температура не доходит до температуры денатурации ДНК и соответствует температуре отжига, то это дает возможность использовать не только термостабильные ДНК полимеразы, но и мезофильные ДНК полимеразы, обладающие уникальными полимеризующими способностями, но не выдерживающими сильного нагрева. Основной акцент на способе локализации ДНК полимеразы в зоне с низкой температурой был сделан в других патентах этих авторов [Hwang et al., 2009; 2016], что было достигнуто ими, в том числе иммобилизацией фермента, например на золотой проволоке, скрученной в форме катушки (для увеличения общей поверхности золота, находящегося в реакционной смеси) и опускаемой в реакционный сосуд с таким расчетом, что ДНК полимеразы всегда находятся только в самой верхней части жидкости, где температура относительно низка и некоторые нетермостабильные ферменты ее выдерживают. В серии других патентов этой южнокорейской фирмы,

имеющих отношение к конвекционной ПЦР, описаны устройства, в которых реакционными сосудами служили уже небольшие полипропиленовые пробирки конической формы, помещаемые в термоблок или из трех горизонтальных пластин с фиксированными температурами, разделенных температурными изоляторами [Hwang et al., 2017; 2018] или в термоблок всего из двух таких пластин, разделенных изолятором [Hwang et al., 2018a]

На основе вышеописанных разработок южнокорейская фирма Ahram Biosystems, Inc. создала целую линейку конвекционных ДНК-термоциклеров, представленных, в том числе в различной цветовой гамме, на их сайте <http://ahrambio.com>. Несколько моделей Palm PCR™ из данной серии⁶ обеспечивают с помощью конвекционной ПЦР детекцию менее 10 копий мишеней ДНК, и, имея в целом 7 режимов амплификации, позволяют за 18 – 39 мин нарабатывать продукты ПЦР размером от 400 до 2000 п.н. в зависимости от выбранной продолжительности реакции. Амплификация ведется в объеме 20 мкл в специальных реакционных полипропиленовых сосудах цилиндрической формы с небольшим конусом, также поставляемых данной фирмой. Одновременно позволяет вести процесс амплификации для 12 образцов с последующей детекцией продуктов амплификации по конечной точке с помощью гель-электрофореза. Palm PCR™ G1-12 представляет собой базовую модель, которая в одной из работ малайзийскими авторами была сравнена со стандартным ДНК-термоциклером MyCycler американской фирмы Bio-Rad Laboratories [Ahmed et al., 2016]. Хотя термоциклер Palm PCR™ G1-12 в целом зарекомендовал себя неплохо, но по ряду показателей он все же уступил использовавшемуся для сравнения ДНК-термоциклеру MyCycler на элементах Пельтье и авторы сделали вывод, что данная модель конвекционного ДНК-термоциклера нуждается в доработке. Определенным недостатком конвекционных ДНК-термоциклеров служит некоторая ограниченность в выборе температур отжига, которая для моделей Palm PCR™ находится в диапазоне от 52°C до 60°C. Модель Palm PCR™ G2-12 является более продвинутой версией своего предшественника Palm PCR™ G1-12, но характеризуется схожими характеристиками и теми же габаритами, включая одинаковый вес – 350 г с батареей. Имеется также экономичная модель Palm PCR™ F1-12, рассчитанная на быструю амплификацию относительно коротких фрагментов

⁵ TCID₅₀/мл - доза инфекционного агента, инфицирующего 50% клеточной культуры (Tissue Culture Infective Dose)

⁶ Габариты Palm PCR™ ДНК-термоциклеров (71 x 121 x 47 мм) таковы, что они действительно могут умещаться на ладони.

ДНК длиной до 1000 п.н. Заявлено о скором появлении новых конвекционных ДНК-термоциклеров из линейки Palm PCR™, работающих в режиме реального времени – моделей Palm PCR™ S1 и Palm PCR™ S1e с высокой скоростью амплификации - 18 сек на цикл. В них будет возможно проведение мультиплексной ПЦР с регистрацией з 12 мин флуоресцентных сигналов по 6 длинам волн. Габариты этих приборов также впечатляют, поскольку они представляют некий «кубик» с длинами сторон менее чем 20 см каждая и весом 3,0 кг (с батареей 3,8 кг). Но пока этих термоциклеров еще нет, специалистами фирмы Ahram Biosystems выполнен ряд работ на приборе Palm PCR™ G2-12, показавших его пригодность для быстрой детекции специфических участков ДНК. Так, с помощью мультиплексной конвекционной ПЦР было продемонстрировано присутствие в мясных продуктах из говядины, баранины и свинины загрязнений в виде постороннего мяса [Song et al., 2017; 2018]. Предел детекции составил 1% загрязнений при анализе всего 1 г образца за короткое время, равное 24 мин. В других своих статьях эта же группа авторов смогла выявить в молоке присутствие патогенных бактерий двух сероваров *Salmonella enterica* – Enteridis и Typhimurium [Kim et al., 2017]. Предел чувствительности составил 30 копий, а время реакции 10,5 мин. Эта работа получила продолжение и к детекции двух упомянутых выше патогенов добавилось выявление патогенного штамма *E.coli* O157:H7 [Kim et al., 2018]. Время конвекционной ПЦР составило в этой работе 14 мин и еще 5 мин потребовалось для детекции продуктов амплификации с помощью системы детекции латеральной хроматографией иммунного ответа, подробнее, которого касаться здесь не будем, поскольку это выходит за рамки тематики данной статьи.

Специалистами фирмы Ahram Biosystems вместе с коллегами из ряда южнокорейских университетов [Kim et al., 2018a] с целью расширения контингента пользователей ДНК-термоциклеров Palm PCR™ за счет как отмечают авторы «децентрализации» ДНК-диагностических процедур путем ее доступности для широких масс опробовано использование в реакционных смесях компонентов, один из которых, являясь редуцирующим агентом - трис(2-карбоксиэтил)фосфин, способствует поддержанию ферментативной активности ДНК полимераз, а другой - третичный бутиловый спирт используется для изготовления лиофилизированных препаратов для их длительного хранения. Проведенные эксперименты показали, что эти вещества в используемых концентрациях лишь

незначительно негативно влияют на эффективность конвекционной ПЦР и это может быть шагом к изготовлению для проведения конвекционной ПЦР с помощью приборов Palm PCR™ лиофилизированных реакционных смесей, хранящихся длительное время при комнатной температуре.

Относительно недавно разработан недорогой конвекционный ДНК-термоциклер в капиллярах с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени, причем подчеркивается намерение коммерциализации данной модели для «анализа по месту лечения» ввиду простоты процедуры [Qui et al., 2017; 2017a]. Реакционными сосудами для этого ДНК-термоциклера служат специально изготовленные пробирки из поликарбоната с внутренним диаметром 1,7 мм и высотой 19 мм, подвод тепла к которым производится как снизу (95°C), так и к верхней части (55°C). Проведенная модельная амплификация фрагмента вируса гриппа штамма H1N1 показала возможность детекции 1 TCID₅₀/мл. Также продемонстрировано использование в данном варианте конвекционной ПЦР сухих лиофилизированных ингредиентов. В еще одной своей работе эти авторы пошли дальше в плане приближения разработанного ими варианта конвекционной ПЦР для «анализов по месту лечения», применив для детекции флуоресценции фотокамеру смартфона [Qui et al., 2017b]. Мишенью также послужила РНК штамма вируса гриппа H1N1, присутствие которой удалось обнаружить за полчаса. Причем сам конвекционный ДНК-термоциклер был устроен еще проще и имел всего одно место подвода тепла (снизу), а светодиодный источник, вызывающий свечение подходящего флуорохрома в составе TaqMan системы, был смонтирован на крышке упоминаемой выше поликарбонатной пробирки.

Асимметричную конвекционную ПЦР провели немецкие авторы [Duwensee et al., 2009]. К особенностям этого варианта можно отнести реакционные сосуды, представляющие собой 0,2 мл полипропиленовую пробирку, в которой через два проделанных около дна пробирки отверстия были заведены кусочки платиновой проволоки, концы которых затем были спаяны. Амплификация велась в 50 мкл реакционной смеси, сверху которых еще находилось 40 мкл минерального масла. Нужный температурный режим создавался за счет помещения пробирки в водяную баню, установленную на 50°C, а через платиновую проволоку внутрь пробирки заводилась температура 89°C, создававшая тем самым градиент температур и термоконвекцию. Но поскольку целью их работы была не наработка, стартуя с малого числа копий, целевого ПЦР-

продукта, то такой режим обеспечил им нужный уровень амплификации и последующую детекцию ампликона путем электрохимической детекции.

Разработанный нами [Chemieris et al., 2010; 2011; Чемерис и др. (Chemieris et al.), 2011] вариант конвекционной ПЦР проводился в специально сконструированном ДНК-термоциклере, оснащенный особым реакционным термоблоком, обеспечивающем в реакционных сосудах формирование наклонного градиента температуры, ориентированного под углом к направлению действия силы тяжести.⁷ Амплификация велась в стандартных полипропиленовых пробирках объемом 0,2 мл, содержащих 30 мкл реакционной смеси. После приложения заданных температур к реакционным пробиркам внутри них очень быстро создавался наклонный градиент температур, запускающий механизм конвекции, основанный на силе плавучести, являющейся разницей между Архимедовой силой и силой тяжести. Причем, благодаря наклонному градиенту температур возникало направленное движение слоев жидкости, в массе своей не разбивающееся на многочисленные конвективные ячейки как это часто происходит в случае приложения вертикального градиента температур. С помощью специальных окрашенных пробных частиц, видимых визуально, была оценена скорость вращения жидкости по эллипсоподобному пути, составившая от 2 до 3 секунд на оборот, благодаря чему за это время жидкость из зоны с высокой температурой (зона денатурации) проходила зону средней температуры (нерабочая зона), попадала в зону низкой температуры (зона отжига), вновь попадала в зону средней температуры (зона элонгации) и затем опять в зону высокой температуры и т.д. Таким образом, один цикл занимал около 2 - 3 секунд и за 3 минуты такой конвекционной ПЦР стартовое количество копий служившего матрицей синтетического олигонуклеотида, равное 10^7 , превращалось в 10^{11} , что позволяло увидеть данный ампликон после гель-электрофореза. Ввиду того, что жидкость в средней части пробирки описывала меньший эллипс, то молекулы ДНК, находящиеся в ней, не оказывались в зоне высокой температуры, где происходила денатурация ампликонов и соответственно затем не мог произойти отжиг праймеров и их удлинение. Однако, благодаря имеющей место диффузии и флуктуациям потоков, слои жидкости из центральной части смещались и оказывались также вовлеченными

в этот температурный круговорот. При этом абсолютно неважно, что не все ампликоны одновременно вели себя одинаково. Главное, чтобы успевало размножиться молекул столько, что можно было регистрировать их или по конечной точке электрофорезом или в реальном времени по свечению соответствующего красителя(ей).

Недавно была подана заявка на патент США на конвекционный ДНК-термоциклер, рассчитанный на детекцию ампликонов в реальном времени при термоциклировании образца в пробирке капиллярного типа, имеющей сложную конструкцию, направленную, в том числе на уменьшение реакционного объема жидкости [Liu et al., 2018].

Фактически во всех этих реакционных сосудах капиллярного или пробирочного типов при конвекционной ПЦР возникают термогравитационные ячейки, где перемещение слоев жидкости приводится в действие преимущественно силой плавучести. На этом же принципе основана конвекционная ПЦР в шлангах, к рассмотрению которой сейчас и перейдем

Конвекционная ПЦР в шлангах

В 2004 г. появилось несколько работ, описывающих ПЦР в замкнутых шлангах или в трубках, движение реакционной смеси в которых происходило под действием термогравитационной конвекции. Так, в статье американских авторов, опубликованной в июльском номере журнала *Analytical Chemistry* [Chen et al., 2004], описывалась конструкция, представляющая собой отрезок тефлонового шланга с внутренним диаметром 764 мкм и общей длиной 260 мм, вмещающей 119 мкл жидкости. Данный шланг пропусклся через три разделенных теплоизоляторами алюминиевых термоблока, поддерживающих каждый свою температуру – 94°C, 55°C и 72°C. После заполнения его реакционной смесью концы вставлялись в кусочек другого шланга чуть большего диаметра, обеспечивая достаточную герметичность. Помимо герметичности крайне важно было не допустить попадания пузырьков воздуха, которые в отличие от капиллярной конвекционной ПЦР могли бы сильно затормозить (или даже остановить) движение жидкости по шлангу, а не просто нарушить температурный режим. Для того, чтобы скорость не была слишком большой данная конструкция располагалась авторами под углом в 60° к горизонту. За 60 мин успевало пройти 35 циклов (полных оборотов жидкости по шлангу за 104 сек каждый). В итоге происходила наработка двух ампликонов размером 305 и 700 п.н., ясно видимых после гель-электрофореза. При этом надо заметить, что стартовое количество мишени в виде тотальной ДНК

⁷ В настоящее время готовится рукопись экспериментальной статьи по конвекционной ПЦР с наклонным градиентом температур [Гарафутдинов и др.].

Bacillus cereus равнялось в одном случае 13,5 и в другом 27 нг/мкл, что составляет величины между 10^5 - 10^6 копиями генома.

Осенью 2004 г. вышла уже цитированная выше в связи с конвекционной ПЦР в капиллярах работа [Krishnan et al., 2004], в которой также предлагалось проводить конвекционную ПЦР и в отрезках шланга длиной 9 см, вмещающих в себя 15 мкл жидкости. Как и в случае с картриджем с колодцами, здесь также рекомендовался некоторый перелив при заполнении, которое необходимо производить, изогнув кусочек шланга в форме буквы U. Замыкание шланга в кольцо после ее заполнения производилось маленьким отрезком другой трубки подходящего диаметра, после чего такому реакционному сосуду можно придавать разные формы, обеспечивая подвод к соответствующим участкам шланга с помощью элементов Пельтье нужных температур, для возникновения конвективных ячеек и потоков жидкости. Сообщалось, что скорость течения жидкости составила около 0,7 мм/сек, и один цикл ПЦР занимал около 2 мин 15 сек. Было показано, что фрагмент ДНК размером 191 п.н., детектируемый затем гель-электрофорезом, нарабатывался за 90 мин. Определенное внимание в этой статье было уделено авторами и миниатюризации конвекционной ПЦР. Способ проведения ПЦР в отрезках трубок получил свое продолжение [Agrawal, Ugaz, 2006; 2007] и дальнейшее развитие [Agrawal et al., 2007] в виде создания карманного конвекционного термоциклера, питающегося от батареек типа AA. Но при этом такой портативный способ амплификации с помощью конвекционной ПЦР сохранил все недостатки своих более крупногабаритных предшественников. Карманный конвекционный термоциклер представлял собой три алюминиевых блока, не соприкасающихся непосредственно и скрепленных между собой винтами с разной теплопроводностью из нержавеющей стали и нейлона, с помощью которых нужное количество тепла передавалось с только одного нагреваемого блока денатурации на блоки элонгации и отжига, вокруг которых, включая блок денатурации, обматывался шланг длиной 5,5 см в котором происходил конвективный ток жидкости и шла амплификация. Шланги могли быть слегка отличающимися по диаметру, вмещаая от 10 до 25 мкл реакционной смеси. Количество параллельно идущих амплификаций зависело от того сколько может уместиться таких шлангов на алюминиевых блоках. Если судить по фотографии в цитируемой статье, то одновременно могло амплифицироваться 8 – 10 образцов. В зависимости от диаметра шлангов один цикл (оборот жидкости вокруг термоблоков) занимал от 42 до 102 сек. Себестоимость всей конструкции

авторы [Agrawal et al., 2007] оценили в 10 долларов США. На такой портативный ДНК-термоциклер на основе конвекционной ПЦР 23 января 2008 г. была подана заявка на получение патента США [Ugaz, Agrawal, 2008].

Еще один вариант шлангового конвекционного термоциклера предложили китайские авторы [Zhang, Xing, 2009]. В приборе их конструкции тонкостенный тефлоновый шланг длиной 180 мм, вмещавший 35 мкл реакционной смеси, проходил через зоны с тремя температурами, которые генерировались на медной подложке, имевшей размеры 45 x 40 x 4 мм, в результате чего за 45 мин нарабатывался фрагмент *tyrB* гена *E.coli* длиной 112 п.н. Стартовые концентрации ДНК составляли 2,4 нг/мкл, 340 пг/мкл, 44 пг/мкл, 5,4 пг/мкл, 640 фг/мкл. Уверенная амплификация происходила для первых двух концентраций, соответствующих приблизительно 10^7 - 10^6 геномным копиям, при третьей ампликон был чуть виден.

Разработан портативный шланговый конвекционный ДНК-термоциклер, имеющий габариты 90 x 96 x 125 мм и работающий в режиме реального времени [Shu et al., 2017]. Реакционной ячейкой в нем служит прозрачная тефлоновая трубка с внутренним диаметром 0,6 мм и длиной 84 мм, замыкаемой в кольцо коротким (12-ти мм) отрезком силиконового шланга. Треугольную форму данной реакционной емкости придает остов из нержавеющей стали со специальным желобом под данный тефлоновый шланг. Через основание образующегося треугольника ведется детекция меняющейся в ходе амплификации флуоресценции образца, а подвод тепла от единственного источника (95°C) производится на одной из боковых сторон треугольника. Показано, что предел чувствительности при такой конвекционной амплификации ДНК, длящейся 25 мин, составляет одну копию мишени на 1 мкл. Также продемонстрирована линейность динамического ряда при детекции от 10^6 до 10^1 копий мишеней ДНК.

Довольно сложной конструкции реакционный сосуд в виде вместо полимерного шланга U-образной стеклянной трубки с внутренним диаметром 1,6 мм и высотой 60 мм с открытыми верхними торцами, но имеющим на высоте 40 – 45 мм наклонную перегородку было предложено использовать в термогравитационной конвекционной ПЦР с одним (нижним) источником тепла, представляющим собой алюминиевый блок со специальными углублениями для данного U-образного сосуда, в которые добавлялось минеральное масло для обеспечения лучшей теплопередачи [Chou et al., 2017]. При этом такой конвекционный термоциклер рассчитан на детекцию

происходящей амплификации в режиме реального времени для чего был изготовлен специальный светозащитный кожух. Показано хорошее воспроизведение результатов в нескольких повторностях в виде 6×10^6 , 6×10^5 и 6×10^4 копий исходной ДНК матрицы и отсутствие подъема флуоресценции в отрицательном контроле без ДНК.

Относительно недавно индийские авторы [Ajit et al., 2017] сообщили о проведенной подготовительной работе по созданию микрофлюидного устройства, скорее напоминающего конвекционную ПЦР в шлангах или трубках, поскольку в качестве резервуара использован силиконовый шланг диаметром 1 мм и длиной 13 см, проложенный через зоны алюминиевого блока с разной температурой, требуемой для прохождения ПЦР, и как сообщается только на следующей стадии ими намечено проведение самой амплификации участка ДНК патогенного микроорганизма.

Микрофлюидная конвекционная ПЦР

Желая масштабировать вниз конвекционную ПЦР, тайваньские авторы [Yao et al., 2007] выполнили работу, в которой сконструировали целую линейку микрофлюидных чипов с диаметрами в 1, 1,5 и 2 мм с разным соотношением h/d от 1 до 7 и объемом от 1 до 7 мкл. К нижней части таких чипов прикладывалась температура 370°K , а к верхней – 335°K , что соответствует приблизительно 97°C и 62°C . Реакционная полость была выполнена из полидиметилсилоксана и чтобы сделать его поверхность гидрофильной им пришлось обрабатывать ее кислородной плазмой. Проведенные эксперименты по амплификации фрагмента тимусной ДНК длиной 401 п.н. показали, что наибольшую скорость наработки целевого продукта обеспечивает вариант с соотношением $h/d=2$ при диаметре чипа 2 мм. При проведении конвекционной ПЦР в таком чипе видимый после гель-электрофореза ампликон образовывался всего за 1 мин. При этом в исходной ПЦР смеси количество мишени составляло 100 нг/мкл раствора, что приблизительно соответствует 10^5 геномным копиям ДНК теленка. Данный тип микрофлюидного чипа для конвекционной ПЦР можно условно считать капиллярного типа.

Южнокорейские авторы [Chung et al., 2009] изготовили конвекционный ПЦР чип, напоминающий шланговый тип, поскольку сконструировали вариант замкнутого кольца, пролегающего через зоны с температурами денатурации, отжига и элонгации. Среднее время обращения жидкости по данному чипу, вмещающему 19 мкл реакционной смеси, составило около 10 сек и таким образом 30 циклов ПЦР укладывались в менее чем 5 мин, в ходе которой происходила наработка ампликона размером 122 п.н.,

видимого на электрофоретической картине. После 10-ти и 15-ти мин такой конвекционной ПЦР количества нарабатываемых продуктов несколько превышали образующиеся в результате обычной ПЦР. К сожалению, авторы упоминают лишь, что вносимое в реакцию количество ДНК составляло 1 нг на 100 мкл, не раскрывая что же это была за ДНК. Из-за этого невозможно оценить каково было исходное количество копий целевого участка ДНК – мишени для амплификации. Вес их портативного прибора составил около 3 кг. В следующей работе эти же авторы сообщили о создании усовершенствованного варианта своей микрофлюидной конструкции для конвекционной ПЦР [Chung et al., 2010]. Вес данного прибора снизился до 0,6 кг и энергопотребление составило всего 1 Ватт на рабочий процесс. Для проверки работоспособности данной конструкции эти авторы вели амплификацию двух фрагментов ДНК размерами 127 и 470 п.н. На электрофоретической картине результатов амплификации меньшего фрагмента отображены результаты 10, 20 и 40 минутной ПЦР, при этом сами авторы отмечают, что интенсивности полос были практически одинаковы. Данное обстоятельство прямо свидетельствует о том, что в их экспериментах в стартовой смеси присутствовало слишком высокое количество матриц. Внимательное прочтение методического раздела этой статьи подтверждает данное предположение, поскольку в нем сообщается, что предварительно наработанные ампликоны в обычной ПЦР служили матрицами для проведения конвекционной ПЦР, правда не указывается аликвота какого размера бралась в дальнейшую работу. Однако при описании амплификации фрагмента ДНК размером 470 п.н. говорится, что его стартовое количество составляло 0,2 нг, что соответствует 10^8 копий, а при достижении числа ампликонов 10^{12} в силу множества причин ПЦР, как правило, выходит на плато, что и имело место для разных образцов независимо от продолжительности самой конвекционной ПЦР. На данную технологию выдан патент США под номером 8,735,103 от 27 мая 2014 г. [Chung et al., 2014]. Продолжая усовершенствовать данный вариант конвекционной ПЦР, этими авторами было предложено использовать в качестве нагревательного элемента вместо непрозрачного металла слои прозрачного (на 80-90%) графена для улучшенной детекции продуктов ПЦР по флуоресценции в реальном времени [Chung et al. 2014a].

Особенностью другого микрочипа для проведения конвекционной ПЦР явилось то, что в нем было объединено смешивание ингредиентов и проведение самой ПЦР без применения насосов, поскольку оба эти процесса обеспечивались

конвективным током жидкости, вызываемом одним или двумя нагревательными элементами [Kim et al., 2009]. Реакционная (амплификационная) камера этого чипа имела форму прямоугольника со сторонами по 2,9 мм и толщиной 180 мкм. Продолжительность одного цикла ПЦР составила 35 сек и через 20 циклов такой амплификации с исходным количеством ДНК-матрицы в концентрации 1 нг/мкл на гель-электрофорезе был виден продукт ПЦР размером 690 п.н., принадлежащий одному из штаммов вируса гриппа.

Авторы из Южной Кореи описали проведение в проточном микрожидкостном устройстве конвекционной ПЦР, основанной, как они посчитали, на эффекте Марангони, где движение жидкости между зонами чипа с фиксированными температурами в них обеспечивается различиями в поверхностном натяжении по-разному нагретых частей жидкости и осенью 2005 г. подали заявку на получение патента США [Lee et al., 2006]. При этом в данной заявке ими упоминается, что это первый способ проведения конвекционной ПЦР, основанной на эффекте Марангони и что непрерывным условием конвективного движения жидкости за счет градиента поверхностного натяжения является граница раздела жидкой и газовой фаз, и последняя в их конструкции должна была формироваться за счет покрытия вытравленных в чипе каналов некоей крышкой, оставляющей воздушную прослойку. Однако необходимо заметить, что для исключения конденсата, легко образующегося от нагретой жидкости (а зона денатурации в их варианте имеет 95°C, да и остальные две (отжиг и элонгации) – далеко не комнатной температуры), необходимо такую крышку во избежание полного или частичного испарения жидкости постоянно держать высоконагретой, что непременно должно было исказить температурные условия воздушной фазы над каналами, проложенными в чипе в зонах с разными температурами, а про крышку, нагретую соответственно температурным зонам чипа ничего не сообщается.

Изоляционная изотермическая ПЦР

Как уже говорилось выше, один из вариантов конвекционной ПЦР в капиллярах был назван изоляционной изотермической ПЦР (ииПЦР). Реакционным сосудом для него послужили поликарбонатные капилляры R-tube с конвективной зоной высотой 20 мм и соотношением h/d – 11,6, которые стала производить фирма GeneReach Biotechnology Corporation (Тайвань). В результате 30 минутной амплификации происходила наработка фрагмента ДНК размером 67 п.н., причем вполне уверенно детектировались исходные количества его

копий равные 10^3 и 10^2 [Chang et al., 2012]. В своих последующих статьях эти авторы в приборе собственной конструкции, изолирующей образец от воздействий окружающей среды, успешно детектировали ДНК-содержащий WSS вирус [Tsai et al., 2012]. Преобразовав данный способ в режим детекции итоговой флуоресценции на платформе TaqMan, эти авторы сумели детектировать 10 копий данного вируса за 30 мин [Tsai et al., 2012a]. С помощью созданного на основе данной конструкции изолирующего конвекционного ДНК-термоциклера РОСКИТ Nucleic Acid Analyzer удалось детектировать целый ряд вирусов, в том числе РНК-содержащих, а также сальмонеллу [Tsen et al., 2013; Balasuriya et al., 2014; Tsai et al., 2014].

ДНК-термоциклер РОСКИТ Nucleic Acid Analyzer фирмы GeneReach Biotechnology Corporation (<http://www.genereach.com>) представляет собой компактный прибор весом 2,1 кг, позволяющий одновременно вести конвекционную ПЦР в 8 капиллярах типа R-tube в рабочем объеме 45 – 55 мкл и по завершению протекающей в течение часа реакции выдающий на дисплей информацию о регистрации накопления продукта по свечению при двух длинах волн – 520 и 550 нм. Полученные результаты сохраняются также на SD карте. Была разработана миниатюрная версия данного прибора, получившая название РОСКИТ Micro Duo, рассчитанного на проведение амплификации с одновременной детекцией нарабатываемых за 45 минут ПЦР-продуктов с помощью двух каналов флуоресценции в четырех R-tube капиллярах. Допустимый диапазон окружающей среды при проведении анализов достаточно широк - 15 – 35°C, что немаловажно для конвекционного ДНК-термоциклера, тем более работающего в полевых условиях. На данную технологию конвекционной ПЦР в капиллярах R-tube фирмой GeneReach Technology Corporation подана заявка на патент США [Su et al., 2016].

За последние несколько лет, как разработчиками данной технологии, так и другими авторами опубликовано значительное число статей, в которых описываются успешное использование ииПЦР для детекции этиологических агентов разнообразных заболеваний главным образом вирусной природы, в том числе РНК-содержащих вирусов у человека и домашних животных, включая птиц, а также инфекционных агентов в дикой природе [Wilkes et al., 2015; 2015a; Carossino et al., 2016; Go et al., 2016; Soltan et al., 2016; Zhang et al., 2016; Ambagala et al., 2017; 2017a; Balasuriya et al., 2017; Carossino et al., 2017; Go et al., 2017; Lung et al., 2017; Cook et al., 2018; Cooke et al., 2018; Lauterbach et al., 2018; Ruggiero et al., 2018; Tsai et al., 2018; Vissani

et al., 2018; Wilkes et al., 2018]. Причем во многих статьях подчеркивается удобство ииПЦР в плане ее применимости в приборе РОСКИТ в полевых условиях. Помимо обнаружения вирусов, ииПЦР использовалась для выявления бактериальной и грибной инфекции, а также для обнаружения носительства патогенных простейших [Chua et al., 2016; Kuo et al., 2016; Lin et al., 2016; Wu et al., 2017]. Отмечается, что портативный конвекционный ДНК-термоциклер РОСКИТ может использоваться при проведении конвекционной ииПЦР в режиме по «месту лечения». В одной из работ для детекции ГМО на примере обнаружения 35S промотора у генно-модифицированной сои, устойчивой к глифосату, сравнивается использование ПЦР в реальном времени, проводимой в приборе Step One Plus (ThermoFisher Scientific, США), и метод ииПЦР в портативном устройстве РОСКИТ, показавших в целом сопоставимые результаты [Tung et al., 2016].

Конвекционная ПЦР, сопряженная с вращением реакционных сосудов

Прежде чем начать описывать настоящую конвекционную ПЦР во вращающихся реакционных сосудах во избежание недоразумений необходимо уделить некоторое внимание обычной ПЦР, сопряженной с центрифугированием образцов, поскольку шведские авторы [Mårtensson et al., 2006] назвали свою технологию SuperConvection™, так как в ней одновременно действует несколько сил – тяжести, плавучести, Кориолиса, центробежная, получив на нее товарный знак. Данная технология амплификации сама также запатентована, и выдан патент США под номером 6,783,993 от 31 августа 2004 г. [Malmquist et al., 2004]. В настоящее время шведской фирмой AlphaHelix Molecular Diagnostics (<http://www.alphahelix.com>) производится соответствующий ДНК-термоциклер модели *αAmp*™, заменивший предыдущую модель *AmpXpress*. Сравнение последнего с ДНК-термоциклером на элементах Пельтье модели Techne TC-412 показало ускоренную амплификацию специфичных фрагментов ДНК бактерии *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* из ротовой полости человека и приматов, занявшую в *AmpXpress* с одновременно идущим центрифугированием всего 35 мин против 2 час в обычном термоциклере [Karched et al., 2012]. Особенностью данного прибора является вращение реакционных пробирок со скоростью 10 тысяч об/мин, обеспечивая ускорение силы тяжести до 7000g и вкуче с силой Кориолиса резко ускоряя перемешивание жидкости внутри сосудов, что позволяет заметно сократить время достижения нужных температур во всем объеме жидкости. Заявляется, что для выравнивания температуры

внутри реакционного сосуда достаточно всего 0,1 сек⁸, благодаря чему время смены температур в ходе ПЦР заметно сокращается. Нагрев осуществляется встроенной инфракрасной лампой, а охлаждение – вращением образцов и создаваемым тем самым потоком воздуха или его конвекцией или точнее следуя термину авторов - суперконвекцией.

Главная цель вращения реакционных сосудов в виде микрофлюидных устройств в ходе термогравитационной конвекционной ПЦР в серии работ японских авторов также заключается в ускорении процесса амплификации, чтобы сделать его более пригодным «для анализов по месту лечения» [Saito et al., 2013; 2017; Takahashi et al., 2016]. Изготовленный из стекла и полидиметилсилоксана чип имел канал в форме кольца, к секторам которого подводился нагрев в виде 95°C (приблизительно одна четверть круга) и 60°C (оставшиеся три четверти круга), вызывая конвективное движение жидкости, ускоренное небольшим вращением, обеспечивающим увеличение силы тяжести в диапазоне от 3 до 10g. Благодаря такому варианту конвекционной ПЦР удалось провести амплификацию фрагмента бета-актинового гена размером 295 п.н. за 10 мин с продолжительностью одного цикла 10,2 сек и пределом чувствительности 70,5 пг ДНК человека, что соответствует приблизительно 19 геномным копиям. Проведенная компьютерная симуляция показала, что сила Кориолиса при вращении индуцирует вторичный поток, способствующий усилению перемешиванию жидкости в микроканалах, что улучшает протекание данной конвекционной ПЦР. Этими авторами на конвекционную ПЦР, сопряженную с центрифугированием, поданы две заявки на патенты США [Saito et al., 2016; 2017a].

Конвекционная ПЦР в прочих типах реакционных сосудов

Неким аналогом шланговой конвекционной ПЦР можно считать проведение амплификации в полипропиленовом мешке объемом 12 мкл, который после его помещения в некую форму с вытравленными каналами принимал вид эллипса или точнее напоминал по форме беговую дорожку вокруг футбольного поля [Bennet et al., 2003; Wheeler et al., 2004]. И это был как уже отмечалось выше первый вариант истинно конвекционной ПЦР, где движущей силой служила разница в плавучих плотностях слоев

⁸ Не надо путать со временем смены температур от например этапа элонгация до этапа денатурация, поскольку имеется ввиду, что за 0,1 сек происходит выравнивание температуры внутри реакционного сосуда у стенок и в средней части.

жидкости, нагретых до разных температур. При этом авторы справедливо отметили, что геометрия конвективной ячейки крайне важна для успешной амплификации. В их работе подвод разных температур осуществлялся к более длинным боковым отрезкам такого сосуда, расположенного вертикально, причем для одной была установлена температура 94°C, а для другой – 57°C. Было определено, что один оборот жидкости происходил за 12 сек, что, фактически, соответствовало одному циклу ПЦР. Авторы сообщают, что ампликоны длиной 90 и 160 п.н. при стартовых концентрациях матриц от 10^5 до 10^7 на 1 мл в их варианте конвекционной ПЦР нарабатывались за 30 мин. Однако, в методическом разделе ими упоминается, что матрицами служили разбавленные в соотношении 1:100 те же ампликоны, образовавшиеся в обычной ПЦР в стандартном ДНК-термоциклере, из чего можно сделать вывод, что в конвекционную ПЦР, скорее всего они вносили приблизительно 10^8 - 10^9 копий мишеней, что крайне много и на несколько порядков превышает обычное стартовое количество ДНК при проведении ДНК-диагностики.

Оригинальный реакционный сосуд в виде конвективной ячейки, представляющей собой круглую камеру диаметром 5 мм и толщиной 1 мм, вмещавшую 20 мкл жидкости и изготовленную из двух покровных стекол, соединенных между собой силиконовой прокладкой в виде кольца, был использован в работе D.Braun и соавторов [Braun et al., 2003]. Нагрев центральной части велся инфракрасным лазером разной мощности (от 60 до 150 Ватт с оптимумом в 75 Ватт), обеспечивая в этой зоне температуру, достаточную для денатурации ДНК. По краям такого сосуда температура достигала приблизительно 52°C, что обеспечивало отжиг праймеров. За счет конвективного тока жидкости от центра к краям и обратно на один цикл амплификации уходило 10 ± 5 сек, что за 20 минут инкубации приводило к наработке целевого продукта ПЦР размером 96 п.н., увеличивая его исходное количество в 100 тысяч раз. Помимо детекции по конечной точке с помощью гель-электрофореза в данной работе велся контроль над происходящей амплификацией в реальном времени путем добавления в реакционную смесь красителя SYBR Green I, при этом уже через 8 мин от начала процесса отчетливо наблюдалось появление ПЦР продукта.

Учитывая высокую стоимость инфракрасного лазера, в другой работе этих авторов [Hennig, Braun, 2005] было предложено в качестве альтернативы вести нагрев реакционной смеси с помощью дешевого терморезистивного нагревателя, в виде специальной медицинской канюли опущенного в центр открытого сосуда, где 20 мкл жидкости от

испарения защищались слоем минерального масла. При этом затрачиваемая энергия на процесс амплификации составляла всего около 20 мВатт х час, что сравнимо с количеством которое может дать маленькая или даже солнечная батарейка. В качестве другого преимущества такого способа проведения конвекционной ПЦР указывалась легкость, с которой можно отбирать финальную реакционную смесь для анализа гель-электрофорезом. В данной конструкции за 20 мин происходила амплификация того же 96 п.н. фрагмента фага лямбда в 500 тысяч раз.

Ирландские авторы [Daly, Davies, 2006] предложили проводить конвекционную ПЦР в прямоугольных сосудах из боросиликатного стекла размерами 1 x 10 x 11 мм, которые помещались между двумя медными блоками, нагретыми так, чтобы внутри реакционной смеси поддерживались температуры 95°C (внизу) и 55°C (вверху) благодаря чему формировался конвективный ток жидкости. Сообщается об успешной амплификации фрагмента ДНК длиной 86 п.н., произошедшей менее чем за 15 мин с продолжительностью одного цикла около 12 сек. На основе данной разработки в 2007 г. этими авторами была подана патентная заявка на конвекционный ДНК-термоциклер для количественного ПЦР-анализа, замененная затем обновленными и опубликованная значительно позже [Davies et al., 2015].

Также в сосудах из боросиликатного стекла прямоугольного сечения с основанием 100 x 50 мкм вели конвекционную ПЦР немецкие авторы [Mast, Braun, 2010]. В данной работе амплифицировался фрагмент ДНК длиной 143 п.н., среднее время удвоения копий которого составило около 50 сек. Средняя скорость перемещения слоев жидкости при градиенте температур в 27°C была около 45 мкм/сек. Нагрев нижней части капилляра осуществлялся с помощью 10-ти ваттного инфракрасного лазера, с помощью линзы, фокусирующей луч внутри данного реакционного сосуда. В продолжение данной работы в аналогичном реакционном сосуде продолговатой формы, установленным горизонтально, был предложен отличающийся вариант конвекционной ПЦР, на который были поданы заявки на патенты Европейского патентного офиса и патентного ведомства США, датированные 5 февраля 2010 г. и 4 февраля 2011 г., соответственно [Braun, Mast, 2011; 2011a]. Размеры реакционного сосуда составили всего 100 x 50 x 1800 мкм. Главной особенностью патентуемого способа является одновременно нагреваемые локально с помощью сфокусированных лучей инфракрасного лазера сразу в нескольких точках внутри данного реакционного сосуда, к тому же смещающихся периодически, что приводит к

формированию нескольких самостоятельных конвективных ячеек, соприкасающихся между собой и обменивающихся потоками жидкости.

Заключение

Как уже говорилось выше, конвективные потоки жидкости под действием температуры вызываются или термогравитационной или термокапиллярной конвекцией. Однако в конвекционной ПЦР действие сил поверхностного натяжения крайне незначительно, поскольку в используемых реакционных сосудах часто не происходит формирования фазовых границ жидкость-воздух и основным двигателем является сила плавучести, возникающая как разность между выталкивающей силой Архимеда и силой тяжести или силой земного притяжения. В тех же случаях, когда реакционный сосуд остается открытым и минеральное масло для исключения испарения не добавляется, возникает и градиент поверхностного натяжения жидкости, но он относительно невелик из-за небольших различий в температуре по краям таких сосудов в реакционной смеси, подвергающейся конвективному движению под действием термогравитации. Собственно, и в обычной ПЦР без использования минерального масла в вариантах с горячей крышкой, где есть граница фаз, при переходе с одного этапа на другой происходит изменение температуры жидкости, начинающееся от стенок реакционных сосудов, и как следствие возникает градиент поверхностного натяжения и появляются термокапиллярные конвективные потоки, но они малозначительны.

За прошедшие почти два десятилетия существования конвекционной ПЦР эта реакция доказала свою жизнеспособность и в настоящее время разработаны различные варианты этого метода с одним, двумя или даже тремя источниками нагрева и разнообразной формой реакционных сосудов, которой надо коснуться отдельно. Безусловно, в любом варианте конвекционной ПЦР геометрия реакционных сосудов крайне важна и дело даже не в простом соотношении h/d (хотя в работах разных авторов можно встретить даже противоположные точки зрения на их оптимальную пропорцию), а необходимо учитывать трение жидкости о стенки, замедляющее скорость потока и если диаметр какого-либо капилляра будет излишне мал, то и конвекция будет замедленной. Что касается источника тепла, обычного подводимого снизу, то он вполне может быть единственным, поскольку формирующаяся температура в верхней части реакционного сосуда будет производной от него с учетом скорости тока жидкости, которая зависит от характера потока (ламинарный, турбулентный) и длиной конвективной ячейки и некоторых других факторов типа

температуры окружающей среды. В этой связи некоторым недостатком конвекционной ПЦР принято считать трудности с установлением оптимальных температур отжига для разных праймерных систем, но здесь можно заметить, что данная проблема может быть решена подбором новых праймеров большей или меньшей длины и с иным GC-составом.

Главное предназначение конвекционной ПЦР это быстрая ДНК-диагностика, в том числе в полевых условиях, включая так называемые «анализы по месту лечения» и уже коммерчески выпускаемые модели конвекционных ДНК-термоциклеров на это нацелены. Важным моментом расширения сферы применения конвекционной ПЦР является разработка ее вариантов с регистрацией результатов амплификации в режиме реального времени или по конечной точке с помощью различных быстрых методов анализа, не прибегая к традиционному гель-электрофорезу. Хранение в реакционных сосудах готовых лиофилизированных смесей для проведения конвекционной ПЦР будет этому, безусловно, способствовать. Нельзя не отметить заметный интерес, проявляемый в некоторых странах Юго-Восточной Азии к конвекционной ПЦР, давший свои плоды в виде организации целого ряда фирм, специализирующихся на выпуске продукции для этой реакции. Историческим центром исследований конвекционной ПЦР являются США. Во многих других странах, включая Россию, или вообще не уделяется внимание конвекционной ПЦР или имеется определенное и даже значительное отставание в этом вопросе.

Для дальнейшего совершенствования конвекционной ПЦР необходимы также исследования связанных с этой реакцией теоретических вопросов, в том числе построение трехмерных моделей движения потоков жидкости в реакционных сосудах с разной геометрией. И подобные работы по сравнению конвективных потоков в ячейках Рэлея-Бенара в двухмерном и трехмерном форматах уже стали проводиться [van der Poel et al., 2013]. Отдельный интерес представляет учет вклада силы Кориолиса в термоконвекцию, сопровождаемую вращением реакционных сосудов, и на эту тему также уже есть публикации [Zimmermann, Groll, 2014]. При этом некоторое время назад было показано преимущество вращения при небольших увеличениях силы тяжести вкупе с силой Кориолиса для микрофлюидной конвекционной ПЦР, заметно ускоряющего процесс амплификации [Saito et al., 2017].

Литература

1. Волкова Е.В. Моделирование полимеразной цепной реакции в конвективной ячейке. *Труды Института механики им. Р.Р. Мавлютова*

- Уфимского научного центра РАН. 2010. Т. 7. С. 83-89.
2. Гетлинг А.В. Формирование пространственных структур конвекции Рэлея-Бенара // *Успехи физических наук*. 1991. Т. 161. № 9. С. 1-80.
 3. Магданов Э. Г., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. Микрожидкостная ПЦР // *Вестник Башкирского университета*, 2013. Т. 18. С. 698-704.
 4. Моисеев К.В. Влияние режимов конвекции на полимеразную цепную реакцию в квадратной полости. *Труды Института механики им. Р.Р. Мавлютова Уфимского научного центра РАН*. 2012. Т. 9. № 2. С. 86-89. DOI: 10.21662/uim2012.2.055
 5. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Вахитов В.А. Вариации приборного обеспечения полимеразной цепной реакции // *Биомика*. 2011. Т.2. С.85-98.
 6. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии*. 2012. Т. 8(3). С. 34-45.
 7. Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А., Урманчиев С.Ф., Лебедев Ю.А. Способ проведения полимеразной цепной реакции с помощью конвекции // Патент на изобретение РФ № 2413770 от 10 марта 2011 г.
 8. Чернышев А.В., Мединцев С.Ф., Сочивко Д.Г., Атамасов Н.В. Исследование рабочих процессов в амплификаторе ДНК в целях повышения выхода количества продукта полимеразной цепной реакции. *Вестник МГТУ им. Н.Э.Баумана. Серия «Машиностроение»*. 2011. №5. С.138-149.
 9. Agrawal N., Hassan Y.A., Ugaz V.M. A pocket-sized convective PCR thermocycler // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007. V.46. P.4316-4319. DOI: 10.1002/anie.200700306
 10. Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR // *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 2006. V. 11. N. 4. P. 217-221. DOI: 10.1016/j.jala.2006.06.004
 11. Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR // *Clin. Lab. Med.* 2007. V.27. P.215-223. DOI: 10.1016/j.cll.2007.01.004
 12. Ahmed S.A., Cheah H., Ravichantar N., Gopinath S., Tang T.H. Evaluation of Palm PCR G1-12 System: a portable battery-operated PCR thermal cyler // *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*. 2016. V. 38. P. 343-348. DOI: 10.14456/sjst-psu.2016.46
 13. Ajit S., Mithun P., Hemanth, Sesham B., Mohan K., Goel S. Towards rapid prototyped convective microfluidic DNA amplification platform // *Proc. SPIE 10061. Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XV*, 100610H. 2017. doi: 10.1117/12.2257843
 14. Alexandersen J., Aage N., Andreasen C.S., Sigmund O. Topology optimisation for natural convection problems // *Int. J. Numer. Meth. Fluids*. 2014. V.76. P. 699-721. DOI: 10.1002/fld.3954
 15. Allen J.W., Kenward M., Dorfman K.D. Coupled flow and reaction during natural convection PCR // *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009. V. 6. N. 1. P. 121-130. DOI: 10.1007/s10404-008-0312-6
 16. Ambagala A, Fisher M, Goolia M, Nfon C, Furukawa-Stoffer T, Ortega Polo R, Lung O. Field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR (RT-iiPCR) assay for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. // *Transbound Emerg Dis*. 2017. V.64(5). P.1610-1623. doi: 10.1111/tbed.12554
 17. Ambagala A, Pahari S, Fisher M, Lee PA, Pasick J, Ostlund EN, Johnson DJ, Lung O. A rapid field-deployable reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction assay for sensitive and specific detection of bluetongue virus. // *Transbound Emerg Dis*. 2017. V.64(2). P.476-486. doi: 10.1111/tbed.12388
 18. Balasuriya U.B., Lee P.Y., Tiwari A., Skillman A., Nam B., Chambers T.M., Tsai Y.L., Ma L.J., Yang P.C., Chang H.F., Wang H.T. Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer // *J Virol Methods*. 2014. V. 207. P. 66-72. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.016
 19. Balasuriya UB, Lee PA, Tsai YL, Tsai CF, Shen YH, Chang HG, Skillman A, Wang HT, Pronost S, Zhang Y. Translation of a laboratory-validated equine herpesvirus-1 specific real-time PCR assay into an insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for point-of-need diagnosis using POCKIT™ nucleic acid analyzer. // *J Virol Methods*. 2017. V.241. P.58-63. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.12.010
 20. Benard H. Tourbillons cellulaires dans une nappe liquide. Premiere partie. Description generale des phenomenes. // *Revue Generale des Sciences Pures et Appliquees*. 1900. V. 11(23). P. 1261-1271.
 21. Benard H. Tourbillons cellulaires dans une nappe liquide. Deuxieme partie. Procédes mecaniques et optiques d'examen. Lois numeriques

- des phenomenes. // *Revue Generale des Sciences Pures et Appliquees*. 1900a. V.11(24). P.1309–1328.
22. Benard. H. Les tourbillons cellulaires dans une nappe liquide transportant de la chaleur par convection en régime permanent. // *Annales de Chimie et de Physique*. 1901. V. 23. P. 62-144.
 23. Bennett W.J., Richards J.B., Milanovich F.P. Convectively driven thermal-cycling // US Patent No 6,586,233 B2. Jul. 1, 2003
 24. Block M.J. Surface tension as the cause of Bénard cells and surface deformation in a liquid film // *Nature*. 1956. V. 178. P. 650-651. DOI: 10.1038/178650a0
 25. Braun D. PCR by thermal convection // *Modern Physics Letters B*. 2004. V. 18. N. 16. P. 775-784.
 26. Braun D., Goddard N.L., Libchaber A. Exponential DNA replication by laminar convection // *Phys. Rev. Lett.* 2003. V.91. 158103-1-4. DOI: 10.1103/PhysRevLett.91.158103
 27. Braun D., Libchaber A. Thermal force approach to molecular evolution // *Phys Biol*. 2004. V. 1. N. 1-2. P. 1-8. DOI: 10.1088/1478-3967/1/1/P01
 28. Braun D., Mast C. Method and apparatus for amplifying nucleic acids sequences. // European Patent Application. EP 2353716 A1. Aug 10, 2011
 29. Braun D., Mast C. Method and apparatus for amplifying nucleic acids sequences. // US Patent Application Publication No 2011/0195458 A1. Aug. 11, 2011
 30. Brown S.C. Count Rumford discovers thermal convection. *Daedalus*. 1957. V.86(4). P.340-343.
 31. Carossino M, Lee PY, Nam B, Skillman A, Shuck KM, Timoney PJ, Tsai YL, Ma LJ, Chang HF, Wang HT, Balasuriya UB. Development and evaluation of a reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction (RT-iiPCR) assay for detection of equine arteritis virus in equine semen and tissue samples using the POKKIT™ system. // *J Virol Methods*. 2016. V.234. P.7-15. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.015
 32. Carossino M, Li Y, Lee PA, Tsai CF, Chou PH, Williams D, Skillman A, Frank Cook R, Brown G, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. Evaluation of a field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR for rapid and sensitive on-site detection of Zika virus. // *BMC Infect Dis*. 2017. V.17(1). P.778. doi: 10.1186/s12879-017-2852-4
 33. Cerisier P., Jamond C., Pantaloni J., Charmet J.C. Déformation de la surface libre en convection de Bénard-Marangoni. // *J. Phys. France*. 1984. V. 45. P.405-411. DOI: 10.1051/jphys:01984004503040500
 34. Chang H.F., Tsai Y.L., Tsai C.F., Lin C.K., Lee P.Y., Teng P.H., Su C., Jeng C.C. A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR // *Biotechnol J*. 2012. V. 7. N. 5. P. 662-666. DOI: 10.1002/biot.201100453
 35. Chemeris D.A., Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A., Urmancheev S.F., Lebedev Yu.A. Convection polymerase chain reaction method // European Patent Application No EP 2 157 187 A2. Feb. 24, 2010
 36. Chen P-J., Chen P-H., Chou W-P., Hsieh Y-F., Yeh S-H. Methods and apparatuses for convection polymerase chain reaction (PCR). // US Patent No 8,187,813 B2. May 29, 2012
 37. Chen P-J., Chen P-H., Chou W-P., Hsieh Y-F., Yeh S-H. Methods and apparatuses for convection polymerase chain reaction (PCR). // US Patent No 9,126,201 B2. Sep. 8, 2015
 38. Chen Z., Qian S., Abrams W.R., Malamud D., Bau H.H. Thermosiphon - based PCR reactor: experiment and modeling // *Anal Chem*. 2004. V. 76. N. 13. P. 3707-3715. DOI: 10.1021/ac049914k
 39. Chou W.P., Chen P.H., Miao M. Jr., Kuo L.S., Yeh S.H., Chen P.J. Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater // *Biotechniques*. 2011. V. 50(1):52-57. DOI: 10.2144/000113589
 40. Chou W.-P., Lee Ch., Hsu Z.-J. 2, Lai M.-H., Kuo L.-Sh., Chen P.-H. Development of capillary loop convective polymerase chain reaction platform with real-time fluorescence detection // *Inventions*. 2017. V. 2. P. 3. DOI: 10.3390/inventions2010003
 41. Chua KH, Lee PC, Chai HC. Development of insulated isothermal PCR for rapid on-site malaria detection. // *Malar J*. 2016. V.15. P.134. doi: 10.1186/s12936-016-1183-z
 42. Chung K.H., Choi Y.H., Jung M.Y. Natural convection PCR in a disposable polymer chip // *IEEE Sensors Conference*. 2009. P. 1217-1220. DOI: 10.1109/ICSENS.2009.5398367
 43. Chung K.H., Choi Y.H., Choi H.K., Kim J.T., Yu Y-J., Choi J.S., Youn D-H., Choi C-G. Convection-based realtime polymerase chain reaction (PCR) utilizing transparent graphene heaters. *SENSORS*, 2014 *IEEE*. DOI: 10.1109/ICSENS.2014.6985173
 44. Chung K-H., Lee D-S., Pyo H-B., Park S-H. Natural convection-driven PCR apparatus and method using disposable polymer chip. // US Patent No 8,735,103 B2. May 27, 2014
 45. Chung K.H., Park S.H., Choi Y.H. A palmtop PCR system with a disposable polymer chip operated by the thermosiphon effect // *Lab Chip*. 2010. V. 10. N. 2. P. 202-210. DOI: 10.1039/b915022f
 46. Cook RF, Barrandeguy M, Lee PA, Tsai CF, Shen YH, Tsai YL, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. Rapid detection of equine

- infectious anaemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions. // *Equine Vet J.* 2018. doi: 10.1111/evj.13032 [Epub ahead of print]
47. Cook W. A proposal for warming rooms by the steam of boiling water conveyed in pipes along the walls: and a method of preventing ships from leaking, whose bottoms are eaten by the worms. // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 1744. V. 43 No 476. P.370-372. DOI: 10.1098/rstl.1744.0079
48. Cooke KL, Frenzer P, Tucker SJ, Crawford PC, Kirk SK, Levy JK. Rapid diagnosis of *Babesia gibsoni* by Point-of-Need Testing by insulated isothermal PCR in dogs at high risk of infection. // *J Vet Intern Med.* 2018. V.32(1). P.232-235. doi: 10.1111/jvim.15033
49. Daly J., Davies M. A natural convection DNA amplifier // *Proc. 4th International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels, 2006.* Paper No. ICNMM2006-96244. P. 39-44. doi:10.1115/ICNMM2006-96244
50. Davies M., Daly J., Dalton T. QPCR analysis apparatus. // *US Patent Application Publication No 2015/0165440 A1.* Jun. 18, 2015
51. Duwensee H., Mix M., Stubbe M., Gimsa J., Adler M., Flechsig G.U. Electrochemical product detection of an asymmetric convective polymerase chain reaction // *Biosens Bioelectron.* 2009. V. 25. N. 2. P. 400-405. DOI: 10.1016/j.bios.2009.07.025
52. Go YY, Kim YS, Cheon S, Nam S, Ku KB, Kim M, Cho NH, Park H, Alison Lee PY, Lin YC, Tsai YL, Thomas Wang HT, Balasuriya UBR. Evaluation and clinical validation of two field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR assays for the detection of the middle east respiratory syndrome-Coronavirus. // *J Mol Diagn.* 2017. V.19(6). P.817-827. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.06.007
53. Go YY, Rajapakse RPVJ, Kularatne SAM, Lee PA, Ku KB, Nam S, Chou PH, Tsai YL, Liu YL, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. A pan-dengue virus reverse transcription-insulated isothermal PCR assay intended for Point-of-Need Diagnosis of dengue virus infection by use of the POCKIT Nucleic Acid Analyzer. // *J Clin Microbiol.* 2016. V.54(6). P.1528-1535. doi: 10.1128/JCM.00225-16
54. Fauve S. Henri Bénard and pattern-forming instabilities. // *Comptes Rendus Physique.* 2017. V. 18(9-10). P. 531-543. DOI: 10.1016/j.crhy.2017.11.002
55. Grodzka P.G., Bannister T.C. Heat flow and convection demonstration experiments aboard Apollo 14 // *Science.* 1972. V. 176. N. 4034. P. 506-508. DOI: 10.1126/science.176.4034.506
56. Grodzka P.G., Bannister T.C. Heat flow and convection experiments aboard Apollo 17 // *Science.* 1975. V. 187. N. 4172. P. 165-167. DOI: 10.1126/science.187.4172.165
57. Heap D.M., Herrmann M.G., Wittwer C.T. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring // *Biotechniques.* 2000. V. 29. P. 1006-1012. DOI: 10.2144/00295st01
58. Hennig M., Braun D. Convective polymerase chain reaction around micro immersion heater // *Applied Physics Letters.* 2005. V. 87. P. 183901-1-183901-3. DOI: 10.1063/1.2051787
59. Hsieh Y.F., Lee D.S., Chen P.H., Liao S.K., Yeh S.H., Chen P.J., Yang A.S. A real-time convective PCR machine in a capillary tube instrumented with a CCD-based fluorometer // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013. V. 183. P. 434-440. DOI: 10.1016/j.snb.2013.04.003
60. Hsieh Y.-F., Yang A.-Sh., Chen Ch.-W., Liao Sh.-K., Tseng L.-Y., Chen P.-H. A new swappable fluidic module for applications of capillary convective polymerase chain reaction // *IEEE International Conference on Automation Science and Engineering (CASE).* 2012. PP. 900-903.
61. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof // *US Patent No 9,573,134 B2.* Feb. 21, 2017.
62. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof // *US Patent No 10,086,374 B2.* Oct. 2, 2018.
63. Hwang H.J. Two-stage thermal convection apparatus and uses thereof // *US Patent No 10,086,375 B2.* Oct. 2, 2018.
64. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase // *US Patent No 7,488,595 B2.* Feb. 10, 2009.
65. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase // *US Patent No 9,346,055 B2.* May 24, 2016.
66. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection // *US Patent No 7,628,961 B2.* Dec. 8, 2009a.
67. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection // *US Patent No 8,053,215 B2.* Nov. 8, 2011.
68. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid

- sequences by using thermal convection // US Patent No 9,765,376 B2. Sep. 19, 2017.
69. Jeffreys H. The stability of a layer of fluid heated below // *Philosophical Magazine*. 1926. V. 2. P. 833-844. DOI: 10.1080/14786442608564114
 70. Jeffreys H. Some cases of instability in fluid motion. // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. 1928. V. 118. No 779. P.195-208. DOI: 10.1098/rspa.1928.0045
 71. Karched M., Furgang D., Sawalha N., Fine D.H. Rapid identification of oral isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* obtained from humans and primates by an ultrafast super convection based polymerase chain reaction // *J. Microbiol. Methods*. 2012. V.89. P. 71-75. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.01.016
 72. Kim S.J., Wang F., Burns M.A., Kurabayashi K. Temperature-programmed natural convection for micromixing and biochemical reaction in a single microfluidic chamber // *Anal. Chem*. 2009. V.81(11). P.4510-4516. DOI: 10.1021/ac900512x
 73. Kim TH, Hwang HJ, Kim JH. Development of a novel, rapid multiplex polymerase chain reaction assay for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium using ultra-fast convection polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis*. 2017. V.14(10). P.580-586. doi: 10.1089/fpd.2017.2290
 74. Kim TH, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast on-site molecular detection of foodborne pathogens using a combination of convection polymerase chain reaction and nucleic acid lateral flow immunoassay. *Foodborne Pathog Dis*. 2018. Oct 11. doi: 10.1089/fpd.2018.2500. [Epub ahead of print]
 75. Kim TH, Song K, Hwang HJ, Kim JH. Effect of tris(2-carboxyethyl)phosphine and tertiary butyl alcohol on the performance of convection polymerase chain reaction. *Mol Biol Rep*. 2018a. Nov 27. doi: 10.1007/s11033-018-4519-7. [Epub ahead of print]
 76. Krishnan M., Agrawal N., Burns M.A., Ugaz V.M. Reactions and fluidics in miniaturized natural convection systems // *Anal. Chem*. 2004. V.76. P.6254-6265. DOI: 10.1021/ac049323u
 77. Krishnan M., Ugaz V., Burns M. Methods of performing biochemical reactions in a convective flow fluid // US Patent No 7,537,890 B2. May 26, 2009
 78. Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. PCR in a Rayleigh-Benard convection cell // *Science*. 2002. V.298. P.793. DOI: 10.1126/science.298.5594.793
 79. Kuo HC, Lo DY, Chen CL, Tsai YL, Ping JF, Lee CH, Lee PA, Chang HG. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device. // *Poult Sci*. 2017. V.96(1). P.35-41. DOI: 10.3382/ps/pew228
 80. Lauterbach SE, Nelson SN, Nolting JM, Trujillo JD, Richt JA, Bowman AS. Evaluation of a field-deployable insulated isothermal polymerase chain reaction Nucleic Acid Analyzer for Influenza A virus detection at swine exhibitions. // *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018. doi: 10.1089/vbz.2018.2345 [Epub ahead of print]
 81. Lee J., Kulla E., Chauhan A., Tripathi A. Taylor dispersion in polymerase chain reaction in a microchannel // *Phys. Fluids* 2008. V. 20. 093601. DOI: 10.1063/1.2973819
 82. Lee Y-S., Kuk K., Oh Y-S., Shih S-H., Kim M-S. Polymer chain reaction apparatus using Marangoni convection and polymer chain reaction method using the same // US Patent Application Publication No 2006/0216725 A1. Sep. 28, 2006.
 83. Li Z., Zhao Y., Zhang D., Zhuang S., Yamaguchi Y. The development of a portable buoyancy-driven PCR system and its evaluation by capillary electrophoresis // *Sens. Actuat. B: Chem*. 2016. V. 230. P. 779-784. DOI: 10.1016/j.snb.2016.02.143
 84. Lin YH, Lin YJ, Chang TD, Hong LL, Chen TY, Chang PF. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4. // *PLoS One*. 2016. V.11(7). e0159681. doi: 10.1371/journal.pone.0159681
 85. Liu T-H., Wen K-H., Jiang P-S., Huang J-L., Chen T-H. Convective polymerase chain reaction apparatus and optical detecting method thereof. // US Patent Application Publication No 2018/0104696 A1. Apr. 19, 2018
 86. Lord Rayleigh O.M. F.R.S. On convection current in horizontal layer of fluid, when the higher temperature is on the under side // *Philosophical Magazine*. 1916. V. 32. N. 192. P. 529-546. DOI: 10.1080/14786441608635602
 87. Lung O., Pasick J., Fisher M., Buchanan C., Erickson A., Ambagala A. Insulated isothermal reverse transcriptase PCR (iiRT-PCR) for rapid and sensitive detection of classical swine fever virus // *Transbound Emerg Dis*. 2016. V.63(5). e395-402. doi: 10.1111/tbed.12318
 88. Lung O, Reimer SA, Goater CP. User-friendly Taqman probe coupled-insulated isothermal PCR (iiPCR) for rapid detection of emerging *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) in western tiger salamanders (*Ambystoma mavortium*) on a compact, portable

- instrument. // *J Virol Methods*. 2017. V.249. P.21-24. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.08.008
89. Malmquist M. Homogenizing of small-volume mixtures by centrifugation and heating // US Patent No 6,783,993 B1. Aug. 31, 2004
90. Marangoni C. Sull'espansione delle gocce di un liquido galleggiante sulla superficie di altro liquido. 1865. Pavia. Tipografia dei Fratelli Fusi. 66 P.
91. Mårtensson G, Skote M, Malmqvist M, Falk M, Asp A, Svanvik N, Johansson A. Rapid PCR amplification of DNA utilizing Coriolis effects. // *Eur Biophys J*. 2006. V.35(6). P.453-458. DOI: 10.1007/s00249-006-0052-z
92. Mast C.B., Braun D. Thermal trap for DNA replication // *Phys Rev Lett*. 2010. V. 104. N. 18. P. 188102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.188102
93. Moiseev K.V., Volkova E.V., Uрманчев S.F. Effect of convection on polymerase chain reaction in a closed cell // *Procedia IUTAM*. V. 8. 2013. P. 172-175. DOI: 10.1016/j.piutam.2013.04.022
94. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Chaotically accelerated biochemistry in microscale convective flows // 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 2010. P. 2126-2128.
95. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Chaotically accelerated polymerase chain reaction by microscale Rayleigh-Bénard convection // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. P. 3048-3052. doi: 10.1002/anie.201004217
96. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Rapid PCR thermocycling using microscale thermal convection // *J. Vis. Exp.* 2011a. V. 5. pii: 2366. DOI: 10.3791/2366
97. Muddu R., Ugaz V.M., Hassan Y.A. Three dimensional simulation of Rayleigh-Bénard convection for rapid microscale polymerase chain reaction // Proc. ASME Fluids Engineering Division Summer Conference. 2009. DOI: 10.1115/FEDSM2009-78119
98. Nield D.A. Surface tension and buoyancy effects in cellular convection // *Journal of Fluid Mechanics*. 1964. V. 19. Issue 03. P. 341-352. DOI: 10.1017/S0022112064000763
99. Normand C., Pomeau Y. Convective instability: A physicist's approach // *Rev. Mod. Phys.* 1977. V. 49. N. 3. P. 581-624. DOI: 10.1103/RevModPhys.49.581
100. Northrup M.A., Mariella, Jr. R.P., Carrano A.V., Balch J.W. Silicon-based sleeve devices for chemical reactions // US Patent No 5,589,136. Dec. 31, 1996
101. Pal R., Yang M., Lin R., Johnson B.N., Srivastava N., Razzacki S.Z., Chomistek K.J., Heldsinger D.C., Haque R.M., Ugaz V.M., Thwar P.K., Chen Z., Alfano K., Yim M.B., Krishnan M., Fuller A.O., Larson R.G., Burke D.T., Burns M.A. An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses // *Lab Chip*. 2005. V.5. P.1024-1032. DOI: 10.1039/b505994a
102. Pearson J.R.A. On convection cells induced by surface tension // *Journal of Fluid Mechanics*. 1958. V. 4(5). P. 489-500. DOI: 10.1017/S0022112058000616
103. Priye A., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Education: DNA replication using microscale natural convection // *Lab Chip*. 2012. V.12. P.4946-4954. DOI: 10.1039/c2lc40760d
104. Priye A., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Microscale chaotic advection enables robust convective DNA replication // *Anal. Chem.* 2013. V.85. P.10536-10541. DOI: 10.1021/ac402611s
105. Priye A., Ugaz V.M. DNA-to-go: A portable smartphone-enabled PCR assay platform // 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2014, P. 2011-2013.
106. Priye A., Ugaz V.M. Convective PCR thermocycling with smartphone-based detection: A versatile platform for rapid, inexpensive, and robust mobile diagnostics // *Microfluidic Methods for Molecular Biology*, Springer International Publishing, 2016. Lu C., Verbridge S. (eds). P. 55-69. DOI: 10.1007/978-3-319-30019-1_3
107. Priye A., Ugaz V.M. Smartphone-enabled detection strategies for portable PCR-based diagnostics // *Methods Mol Biol.* 2017. V. 1571. P. 251-266. DOI: 10.1007/978-1-4939-6848-0_16
108. Priye A, Wong S, Bi Y, Carpio M, Chang J, Coen M, Cope D, Harris J, Johnson J, Keller A, Lim R, Lu S, Millard A, Pangelinan A, Patel N, Smith L, Chan K, Ugaz VM. Lab-on-a-drone: Toward pinpoint deployment of smartphone-enabled nucleic acid-based diagnostics for mobile health care. *Anal Chem.* 2016. V.88(9). P.4651-4660. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04153
109. van der Poel E.P., Stevens R.J.A.M., Lohse D. Comparison between two- and three-dimensional Rayleigh-Bénard convection // *J. Fluid Mechanics*. 2013. V. 736 .P. 177-194. DOI: 10.1017/jfm.2013.488
110. Qiu X., Ge S., Gao P., Li K., Yang Y., Zhang S., Ye X., Xia N., Qian S. A low-cost and fast real-time PCR system based on capillary convection // *SLAS Technol.* 2017. V. 22. P. 13-17. DOI: 10.1177/2211068216652847
111. Qiu X., Ge S., Gao P., Li K., Yang S., Zhang S., Ye X., Xia N., Qian S. A smartphone-based point-of-care diagnosis of H1N1 with microfluidic convection PCR // *Microsystem Technologies*.

- 2017a. V. 23. P. 2951-2956. DOI: 10.1007/s00542-016-2979-z
112. Qiu X, Zhang S, Mei L, Wu D, Guo Q, Li K, Ge S, Ye X, Xia N, Mauk MG. Characterization and analysis of real-time capillary convective PCR toward commercialization. *Biomicrofluidics*. 2017b. V.11(2). 024103. doi: 10.1063/1.4977841
113. Ruggiero VJ, Benitez OJ, Tsai YL, Lee PA, Tsai CF, Lin YC, Chang HG, Wang HT, Bartlett P. On-site detection of bovine leukemia virus by a field-deployable automatic nucleic extraction plus insulated isothermal polymerase chain reaction system. // *J Virol Methods*. 2018. V.259. P.116-121. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.06.008
114. Saito M., Kiriya Y., Yamanaka K., Tamiya E. Development of the POCT-oriented PCR device driven by centrifugation assisted thermal convection // 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2013. Paper/437_0976
115. Saito M., Kiriya Y., Tamiya E. Thermal convection generating chip and liquid measuring device. // US Patent Application Publication No 2017/0189873 A1. Jul. 6, 2017
116. Saito M., Takahashi K., Kiriya Y., Espulgar W.V., Aso H., Sekiya T., Tanaka Y., Sawazumi T., Furui S., Tamiya E. Centrifugation-controlled thermal convection and its application to rapid microfluidic polymerase chain reaction devices // *Anal. Chem*. 2017. V. 89. P. 12797-12804. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03107
117. Saito M., Tamiya E. Thermal convection generating chip, thermal convection generating device, and thermal convection generating method. // US Patent Application Publication No 2016/0214112 A1. Jul. 28, 2016
118. Schmidt R.J., Milverton S.W. On the instability of a fluid when heated from below // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1935. V. 152. N. 877. P. 586-594. DOI: 10.1098/rspa.1935.0209
119. Scriven L.E., Sternling C.V. The Marangoni effects // *Nature*. 1960. V. 187. P. 186-188. DOI: 10.1038/187186a0
120. Shu B, Zhang C, Xing D. A sample-to-answer, real-time convective polymerase chain reaction system for point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2017. V.97. P.360-368. doi: 10.1016/j.bios.2017.06.014
121. Soltan MA, Tsai YL, Lee PA, Tsai CF, Chang HG, Wang HT, Wilkes RP. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. // *J Virol Methods*. 2016. V.235. P.99-104. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.05.006
122. Song KY, Hwang HJ, Kim JH. Data for the optimization of conditions for meat species identification using ultra-fast multiplex direct-convection PCR. *Data Brief*. 2017. V.16. P.15-18. doi: 10.1016/j.dib.2017.11.004
123. Song KY, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications. *Food Chem*. 2017. V.229. P.341-346. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.085
124. Su C., Teng P-H., Jeng C-C. Method for steadying thermal convection flow field in solution during thermal convective polymerase chain reaction. // US Patent Application Publication No 2016/0244810 A1. Aug. 25, 2016
125. Takahashi K., Saito M., Espulgar W.V., Yamamoto N., Akeda Y., Tomono K., Tamiya E. Rapid drug-resistant gene detection device for bedside monitoring by centrifugal convective PCR // 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2016, P. 1212-1213.
126. Thomson J. On certain curious motions observable at the surfaces of wine and other alcoholic liquors // *Philosophical Magazine*. 1855. V.10. P.330-333.
127. Thomson J. On a changing tessellated structure in certain liquids // *Proceedings of the Philosophical Society of Glasgow*. 1882. V. 13. P. 464-468.
128. Tsai Y.L., Wang H.T., Chang H.F., Tsai C.F., Lin C.K., Teng P.H., Su C., Jeng C.C., Lee P.Y. Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection // *PLoS One*. 2012. V. 7. N. 9. e45278. doi: 10.1371/journal.pone.0045278
129. Tsai Y.L., Lin Y.C., Chou P.H., Teng P.H., Lee P.Y. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions // *J Virol Methods*. 2012a. V. 181. N. 1. P. 134-137. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.01.017
130. Tsai Y.L., Wang H.C., Lo C.F., Tang-Nelson K., Lightner D., Ou B.R., Hour A.L., Tsai C.F., Yen C.C., Chang H.F., Teng P.H., Lee P.Y. Validation of a commercial insulated isothermal PCR-based POCKIT test for rapid and easy detection of white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei* // *PLoS One*. 2014. V. 9. N. 3. e90545. doi: 10.1371/journal.pone.0090545
131. Tsai JJ, Liu LT, Lin PC, Tsai CY, Chou PH, Tsai YL, Chang HG, Lee PA. Validation of the POCKIT dengue virus reagent set for rapid detection of dengue virus in human serum on a field-

- deployable PCR system. // *J Clin Microbiol.* 2018. V.56(5). pii: e01865-17. doi: 10.1128/JCM.01865-17
132. Tsen H.Y., Shih C.M., Teng P.H., Chen H.Y., Lin C.W., Chiou C.S., Wang H.T., Chang H.F., Chung T.Y., Lee P.Y., Chiang Y.C. Detection of Salmonella in chicken meat by insulated isothermal PCR // *J Food Prot.* 2013. V. 76. N. 8. P. 1322-1329. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-553
133. Tung HY, Wang SH, Chiang YC, Tsai MS. Rapid screening of roundup ready soybean in food samples by a hand-held PCR device. // *Food Sci Biotechnol.* 2016. V.25(4). P.1101-1107. doi: 10.1007/s10068-016-0177-5
134. Ugaz V.M., Agrawal N. Portable buoyancy driven PCR thermocycler. // US Patent Application Publication No 2008/0176292 A1. Jul. 24, 2008
135. Ugaz V.M., Krishnan M. Novel convective flow based approaches for high-throughput PCR thermocycling // *Journal of the Association for Laboratory Automation.* 2004. V. 9. N. 5. P. 318-323. DOI: 10.1016/j.jala.2004.08.003
136. Ugaz V, Priye A, Hassan YA. DNA to go: A do-it-yourself PCR thermocycler lab. Conference: The 119th ASEE Annual Conference & Exposition American society for engineering education ASEE. 2012. DOI: 10.13140/RG.2.1.4925.8649
137. Varley C. Circulation in oil of turpentine, spirit of wine & c. *Transactions of the Society, Instituted at London, for the Encouragement of Arts, Manufactures, and Commerce.* 1836. V. 50. P. 190-191.
138. Vissani MA, Tordoya MS, Tsai YL, Lee PA, Shen YH, Lee FC, Wang HT, Parreño V, Barrandeguy M. On-site detection of equid alphaherpesvirus 3 in perineal and genital swabs of mares and stallions. // *J Virol Methods.* 2018. V.257. P.29-32. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.04.002
139. Volkovisky V. Etude des tourbillons thermo convectifs dans les liquides; préface de M.H.Bénard. Publications scientifiques et techniques du Ministère de l'Air, 151. Blondel la Rougery, Paris. 1939. 97 P.
140. Wang WK, Gubler DJ. Potential Point-of-Care Testing for dengue virus in the field. // *J Clin Microbiol.* 2018. V.56(5). pii: e00203-18. doi: 10.1128/JCM.00203-18
141. Wang S., Wang W. Kinetic characteristics of continuous flow polymerase chain reaction chip: A numerical investigation // *Sci. China Technol. Sci.* 2010. V. 53. PP. 1967-1972. DOI: 10.1007/s11431-010-3096-3
142. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953. V. 171(4356). P. 737-738. doi: 10.1038/171737a0
143. Watson J.D., Crick F.H.C. Genetic implication of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953a. V. 171(4361). P. 964-967. doi: 10.1038/171964b0
144. Wesfreid J.E. Scientific Biography of Henri Bénard (1874–1939). In: *Dynamics of Spatio-Temporal Cellular Structures.* Mutabazi I., Wesfreid J.E., Guyon E. (Eds.) Springer. 2006. P.9-37. DOI: 10.1007/978-0-387-25111-0_2
145. Wesfreid J.E. A century of fluid mechanics: 1870–1970 / Un siècle de mécanique des fluides : 1870–1970. Henri Bénard: Thermal convection and vortex shedding. *Comptes Rendus Mécanique.* 2017. V. 345, No 7. P. 446-466. DOI: 10.1016/j.crme.2017.06.006
146. Wheeler E.K., Benett W., Stratton P., Richards J., Chen A., Christian A., Ness K.D., Ortega J., Li L.G., Weisgraber T.H., Goodson K., Milanovich F. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler // *Anal Chem.* 2004. V. 76. N. 14. P. 4011-4016. DOI: 10.1021/ac034941g
147. Wilkes RP, Anis E, Dunbar D, Lee PA, Tsai YL, Lee FC, Chang HG, Wang HT, Graham EM. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. // *J Feline Med Surg.* 2018. V.20(4). P.362-369. doi: 10.1177/1098612X17712847
148. Wilkes RP, Kania SA, Tsai YL, Lee PY, Chang HH, Ma LJ, Chang HF, Wang HT. Rapid and sensitive detection of Feline immunodeficiency virus using an insulated isothermal PCR-based assay with a point-of-need PCR detection platform. // *J Vet Diagn Invest.* 2015. V.27(4). P.510-515. doi: 10.1177/1040638715593597
149. Wilkes RP, Lee PY, Tsai YL, Tsai CF, Chang HH, Chang HF, Wang HT. An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need. // *J Virol Methods.* 2015. V.220. P.35-38. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.007
150. Wilkes R.P., Tsai Y.L., Lee P.Y., Lee F.C., Chang H.F., Wang H.T. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by one-tube reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction // *BMC Vet Res.* 2014. V. 10. P. 213-221. doi: 10.1186/s12917-014-0213-8
151. Wu P-Y., Ho L-C., Chang J-J., Tzeng K-C., Deng W-L., Lin Y-H. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (TiPCR) for the detection of Acidovorax citrulli, the bacterial pathogen of watermelon fruit blotch. *European Journal of Plant Pathology.* 2017. V.147(4). P.869–875. DOI: 10.1007/s10658-016-1054-z
152. Yao D.J., Chen J.R., Ju W.T. Micro-Rayleigh-Bénard convection polymerase chain reaction

- systems // *J Micro/Nanolith. MEMS MOEMS*. 2007. V. 6. N. 4. P. 043007-1-043007-9. DOI: 10.1117/1.2805452
153. Yariv E., Ben-Dov G., Dorfman K.D. Polymerase chain reaction in natural convection systems: A convection-diffusion-reaction model // *Europhys. Letters*. 2005. V. 75. N. 6. P. 1008-1014. DOI: 10.1209/epl/i2005-10171-6
154. Zhang C., Xing D. Parallel DNA amplification by convective polymerase chain reaction with various annealing temperatures on a thermal gradient device // *Anal Biochem*. 2009. V. 387. N. 1. P. 102-112. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.017
155. Zhang J, Tsai YL, Lee PY, Chen Q, Zhang Y, Chiang CJ, Shen YH, Li FC, Chang HF, Gauger PC, Harmon KM, Wang HT. Evaluation of two singleplex reverse transcription-insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PCR test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus. // *J Virol Methods*. 2016. V.234. P.34-42. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.016
156. Zhang S., Lin Y., Wang J., Wang P., Chen J., Xue M., He S., Zhou W., Xu F., Liu P., Chen P., Ge S., Xia N. A convenient nucleic acid test on the basis of the capillary convective PCR for the on-site detection of enterovirus 71 // *J Mol Diagn*. 2014. V. 16. N. 4. P. 452-458. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.002
157. Zhang S., Xue M., Zhang J., Chen Q., Chen J., Wang Z., Zhou W., Chen P., Xia N., Ge S. A one-step dipstick assay for the on-site detection of nucleic acid // *Clin Biochem*. 2013. V. 46. N. 18. P. 1852-1856. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.013
158. Zhuo Z, Wang J, Chen W, Su X, Chen M, Fang M, He S, Zhang S, Ge S, Zhang J, Xia N. A rapid on-site assay for the detection of influenza A by capillary convective PCR. *Mol Diagn Ther*. 2018. V.22(2). P.225-234. doi: 10.1007/s40291-018-0320-5
159. Zimmermann C., Groll R. Experimental and numerical investigation of a Rayleigh-Bénard convection affected by Coriolis force // *J. Flow Control, Measurement & Visualization*. 2014. V. 2. P. 165-172. DOI: 10.4236/jfcmv.2014.24018
3. Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR. *Clin. Lab. Med.* 2007. V.27. P.215-223. DOI: 10.1016/j.cll.2007.01.004
4. Ahmed S.A., Cheah H., Ravichantar N., Gopinath S., Tang T.H. Evaluation of Palm PCR G1-12 System: a portable battery-operated PCR thermal cycler. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2016. V. 38. P. 343-348. DOI: 10.14456/sjst-psu.2016.46
5. Ajit S., Mithun P., Hemanth, Sesham B., Mohan K., Goel S. Towards rapid prototyped convective microfluidic DNA amplification platform. *Proc. SPIE 10061. Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XV*, 100610H. 2017. doi: 10.1117/12.2257843
6. Alexandersen J., Aage N., Andreassen C.S., Sigmund O. Topology optimisation for natural convection problems. *Int. J. Numer. Meth. Fluids*. 2014. V.76. P. 699-721. DOI: 10.1002/fld.3954
7. Allen J.W., Kenward M., Dorfman K.D. Coupled flow and reaction during natural convection PCR. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2009. V. 6. N. 1. P. 121-130. DOI: 10.1007/s10404-008-0312-6
8. Ambagala A, Fisher M, Goolia M, Nfon C, Furukawa-Stoffer T, Ortega Polo R, Lung O. Field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR (RT-iiPCR) assay for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. *Transbound Emerg Dis*. 2017. V.64(5). P.1610-1623. doi: 10.1111/tbed.12554
9. Ambagala A, Pahari S, Fisher M, Lee PA, Pasick J, Ostlund EN, Johnson DJ, Lung O. A rapid field-deployable reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction assay for sensitive and specific detection of bluetongue virus. *Transbound Emerg Dis*. 2017. V.64(2). P.476-486. doi: 10.1111/tbed.12388
10. Balasuriya U.B., Lee P.Y., Tiwari A., Skillman A., Nam B., Chambers T.M., Tsai Y.L., Ma L.J., Yang P.C., Chang H.F., Wang H.T. Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKIT™ Nucleic Acid Analyzer. *J Virol Methods*. 2014. V. 207. P. 66-72. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.016
11. Balasuriya UB, Lee PA, Tsai YL, Tsai CF, Shen YH, Chang HG, Skillman A, Wang HT, Pronost S, Zhang Y. Translation of a laboratory-validated equine herpesvirus-1 specific real-time PCR assay into an insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for point-of-need diagnosis using POCKIT™ nucleic acid analyzer. *J Virol Methods*. 2017. V.241. P.58-63. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.12.010

References

1. Agrawal N., Hassan Y.A., Ugaz V.M. A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007. V.46. P.4316-4319. DOI: 10.1002/anie.200700306
2. Agrawal N., Ugaz V.M. A buoyancy-driven compact thermocycler for rapid PCR. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 2006. V. 11. N. 4. P. 217-221. DOI: 10.1016/j.jala.2006.06.004

12. Benard H. Tourbillons cellulaires dans une nappe liquide. Premiere partie. Description generale des phenomenes. // *Revue Generale des Sciences Pures et Appliquees*. 1900. V. 11(23). P. 1261–1271.
13. Benard H. Tourbillons cellulaires dans une nappe liquide. Deuxieme partie. Procédes mecaniques et optiques d'examen. Lois numeriques des phenomenes. *Revue Generale des Sciences Pures et Appliquees*. 1900a. V.11(24). P.1309–1328.
14. Benard. H. Les tourbillons cellulaires dans une nappe liquide transportant de la chaleur par convection en régime permanent. *Annales de Chimie et de Physique*. 1901. V. 23. P. 62-144.
15. Bennett W.J., Richards J.B., Milanovich F.P. Convectively driven thermal-cycling. US Patent No 6,586,233 B2. Jul. 1, 2003
16. Block M.J. Surface tension as the cause of Bénard cells and surface deformation in a liquid film. *Nature*. 1956. V. 178. P. 650-651. DOI: 10.1038/178650a0
17. Braun D. PCR by thermal convection. *Modern Physics Letters B*. 2004. V. 18. N. 16. P. 775-784.
18. Braun D., Goddard N.L., Libchaber A. Exponential DNA replication by laminar convection. *Phys. Rev. Lett.* 2003. V.91. 158103-1-4. DOI: 10.1103/PhysRevLett.91.158103
19. Braun D., Libchaber A. Thermal force approach to molecular evolution. *Phys Biol*. 2004. V. 1. N. 1-2. P. 1-8. DOI: 10.1088/1478-3967/1/1/P01
20. Braun D., Mast C. Method and apparatus for amplifying nucleic acids sequences. European Patent Application. EP 2353716 A1. Aug 10, 2011
21. Braun D., Mast C. Method and apparatus for amplifying nucleic acids sequences. US Patent Application Publication No 2011/0195458 A1. Aug. 11, 2011
22. Brown S.C. Count Rumford discovers thermal convection. *Daedalus*. 1957. V.86(4). P.340-343.
23. Carossino M, Lee PY, Nam B, Skillman A, Shuck KM, Timoney PJ, Tsai YL, Ma LJ, Chang HF, Wang HT, Balasuriya UB. Development and evaluation of a reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction (RT-iiPCR) assay for detection of equine arteritis virus in equine semen and tissue samples using the POCKIT™ system. *J Virol Methods*. 2016. V.234. P.7-15. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.02.015
24. Carossino M, Li Y, Lee PA, Tsai CF, Chou PH, Williams D, Skillman A, Frank Cook R, Brown G, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. Evaluation of a field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR for rapid and sensitive on-site detection of Zika virus. *BMC Infect Dis*. 2017. V.17(1). P.778. doi: 10.1186/s12879-017-2852-4
25. Cerisier P., Jamond C., Pantaloni J., Charmet J.C. Déformation de la surface libre en convection de Bénard-Marangoni. *J. Phys. France*. 1984. V. 45. P.405-411. DOI: 10.1051/jphys:01984004503040500
26. Chang H.F., Tsai Y.L., Tsai C.F., Lin C.K., Lee P.Y., Teng P.H., Su C., Jeng C.C. A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR. *Biotechnol J*. 2012. V. 7. N. 5. P. 662-666. DOI: 10.1002/biot.201100453
27. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov.V.A. How to avoid the appearance of false-positive results in a polymerase chain reaction? *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2012. V.8(3). P.34-45. (In Russian)
28. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Vakhitov.V.A. Variations of machines for polymerase chain reaction. *Biomics*. 2011. V.2. P.85-98. (In Russian)
29. Chemeris D.A., Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A., Urmanceev S.F., Lebedev Yu.A. Convection polymerase chain reaction method. European Patent Application No EP 2 157 187 A2. Feb. 24, 2010
30. Chemeris D.A., Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A., Urmanceev S.F., Lebedev Yu.A. Sposob provedeniya polimeraznoy tsepnoy reaktsii s pomoshch'yu konveksii. Patent na izobretenie RF No 2413770 ot 10 marta 2011 g. (Method of polymerase chain reaction by convection – In Russian).
31. Chen P-J., Chen P-H., Chou W-P., Hsieh Y-F., Yeh S-H. Methods and apparatuses for convection polymerase chain reaction (PCR). US Patent No 8,187,813 B2. May 29, 2012
32. Chen P-J., Chen P-H., Chou W-P., Hsieh Y-F., Yeh S-H. Methods and apparatuses for convection polymerase chain reaction (PCR). US Patent No 9,126,201 B2. Sep. 8, 2015
33. Chen Z., Qian S., Abrams W.R., Malamud D., Bau H.H. Thermosiphon - based PCR reactor: experiment and modeling *Anal Chem*. 2004. V. 76. N. 13. P. 3707-3715. DOI: 10.1021/ac049914k
34. Chernyshev A.V., Medintsev S.F., Sochivko D.G., Atamasov N.V. Issledovanie rabochikh protsessov v amplifikatore DNK v tselyakh povysheniya vykhoda kolichestva produkta polimeraznoy tsepnoy reaktsii. *Vestnik MGTU im. N.E.Baumana. Seriya «Mashinostroenie»*. 2011. №S. S.138-149. (Investigation of working processes in DNA amplifier in order to increase the yield of the product of polymerase chain reaction – In Russian)
35. Chou W.P., Chen P.H., Miao M. Jr., Kuo L.S., Yeh S.H., Chen P.J. Rapid DNA amplification in a

- capillary tube by natural convection with a single isothermal heater. *Biotechniques*. 2011. V. 50(1):52-57. DOI: 10.2144/000113589
36. Chou W.-P., Lee Ch., Hsu Z.-J. 2, Lai M.-H., Kuo L.-Sh., Chen P.-H. Development of capillary loop convective polymerase chain reaction platform with real-time fluorescence detection. *Inventions*. 2017. V. 2. P. 3. DOI: 10.3390/inventions2010003
 37. Chua KH, Lee PC, Chai HC. Development of insulated isothermal PCR for rapid on-site malaria detection. *Malar J*. 2016. V.15. P.134. doi: 10.1186/s12936-016-1183-z
 38. Chung K.H., Choi Y.H., Jung M.Y. Natural convection PCR in a disposable polymer chip. *IEEE Sensors Conference*. 2009. P. 1217-1220. DOI: 10.1109/ICSENS.2009.5398367
 39. Chung K.H., Choi Y.H., Choi H.K., Kim J.T., Yu Y-J., Choi J.S., Youn D-H., Choi C-G. Convection-based realtime polymerase chain reaction (PCR) utilizing transparent graphene heaters. *SENSORS, 2014 IEEE*. DOI: 10.1109/ICSENS.2014.6985173
 40. Chung K-H., Lee D-S., Pyo H-B., Park S-H. Natural convection-driven PCR apparatus and method using disposable polymer chip. US Patent No 8,735,103 B2. May 27, 2014
 41. Chung K.H., Park S.H., Choi Y.H. A palmtop PCR system with a disposable polymer chip operated by the thermosiphon effect. *Lab Chip*. 2010. V. 10. N. 2. P. 202-210. DOI: 10.1039/b915022f
 42. Cook RF, Barrandeguy M, Lee PA, Tsai CF, Shen YH, Tsai YL, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. Rapid detection of equine infectious anaemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions. *Equine Vet J*. 2018. doi: 10.1111/evj.13032 [Epub ahead of print]
 43. Cook W. A proposal for warming rooms by the steam of boiling water conveyed in pipes along the walls: and a method of preventing ships from leaking, whose bottoms are eaten by the worms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1744. V. 43 No 476. P.370-372. DOI: 10.1098/rstl.1744.0079
 44. Cooke KL, Frenzer P, Tucker SJ, Crawford PC, Kirk SK, Levy JK. Rapid diagnosis of *Babesia gibsoni* by Point-of-Need Testing by insulated isothermal PCR in dogs at high risk of infection. *J Vet Intern Med*. 2018. V.32(1). P.232-235. doi: 10.1111/jvim.15033
 45. Daly J., Davies M. A natural convection DNA amplifier. *Proc. 4th International Conference on Nanochannels, Microchannels and Minichannels, 2006. Paper No. ICNMM2006-96244*. P. 39-44. doi:10.1115/ICNMM2006-96244
 46. Davies M., Daly J., Dalton T. QPCR analysis apparatus. US Patent Application Publication No 2015/0165440 A1. Jun. 18, 2015
 47. Duwensee H., Mix M., Stubbe M., Gimsa J., Adler M., Flechsig G.U. Electrochemical product detection of an asymmetric convective polymerase chain reaction. *Biosens Bioelectron*. 2009. V. 25. N. 2. P. 400-405. DOI: 10.1016/j.bios.2009.07.025
 48. Getling A.V. Formirovanie prostranstvennykh struktur konveksii Releya-Benara. *Uspekhi fizicheskikh nauk*. 1991. T. 161. N. 9. S. 1-80. (Formation of spatial structures of Rayleigh-Benard convection - In Russian)
 49. Go YY, Kim YS, Cheon S, Nam S, Ku KB, Kim M, Cho NH, Park H, Alison Lee PY, Lin YC, Tsai YL, Thomas Wang HT, Balasuriya UBR. Evaluation and clinical validation of two field-deployable reverse transcription-insulated isothermal PCR assays for the detection of the middle east respiratory syndrome-Coronavirus. *J Mol Diagn*. 2017. V.19(6). P.817-827. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.06.007
 50. Go YY, Rajapakse RPVJ, Kularatne SAM, Lee PA, Ku KB, Nam S, Chou PH, Tsai YL, Liu YL, Chang HG, Wang HT, Balasuriya UBR. A pan-dengue virus reverse transcription-insulated isothermal PCR assay intended for Point-of-Need Diagnosis of dengue virus infection by use of the POKKIT Nucleic Acid Analyzer. *J Clin Microbiol*. 2016. V.54(6). P.1528-1535. doi: 10.1128/JCM.00225-16
 51. Fauve S. Henri Bénard and pattern-forming instabilities. // *Comptes Rendus Physique*. 2017. V. 18(9-10). P. 531-543. DOI: 10.1016/j.crhy.2017.11.002
 52. Grodzka P.G., Bannister T.C. Heat flow and convection demonstration experiments aboard Apollo 14. *Science*. 1972. V. 176. N. 4034. P. 506-508. DOI: 10.1126/science.176.4034.506
 53. Grodzka P.G., Bannister T.C. Heat flow and convection experiments aboard Apollo 17. *Science*. 1975. V. 187. N. 4172. P. 165-167. DOI: 10.1126/science.187.4172.165
 54. Heap D.M., Herrmann M.G., Wittwer C.T. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring. *Biotechniques*. 2000. V. 29. P. 1006-1012. DOI: 10.2144/00295st01
 55. Hennig M., Braun D. Convective polymerase chain reaction around micro immersion heater. *Applied Physics Letters*. 2005. V. 87. P. 183901-1-183901-3. DOI: 10.1063/1.2051787
 56. Hsieh Y.F., Lee D.S., Chen P.H., Liao S.K., Yeh S.H., Chen P.J., Yang A.S. A real-time convective

- PCR machine in a capillary tube instrumented with a CCD-based fluorometer. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013. V. 183. P. 434-440. DOI: 10.1016/j.snb.2013.04.003
57. Hsieh Y.-F., Yang A.-Sh., Chen Ch.-W., Liao Sh.-K., Tseng L.-Y., Chen P.-H. A new swappable fluidic module for applications of capillary convective polymerase chain reaction. *IEEE International Conference on Automation Science and Engineering (CASE)*. 2012. P. 900-903.
 58. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof. US Patent No 9,573,134 B2. Feb. 21, 2017.
 59. Hwang H.J. Three-stage thermal convection apparatus and uses thereof. US Patent No 10,086,374 B2. Oct. 2, 2018.
 60. Hwang H.J. Two-stage thermal convection apparatus and uses thereof. US Patent No 10,086,375 B2. Oct. 2, 2018.
 61. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase. US Patent No 7,488,595 B2. Feb. 10, 2009.
 62. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase. US Patent No 9,346,055 B2. May 24, 2016.
 63. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection. US Patent No 7,628,961 B2. Dec. 8, 2009a.
 64. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection. US Patent No 8,053,215 B2. Nov. 8, 2011.
 65. Hwang H.J., Kim J.H., Jeong K. Method and apparatus for amplification of nucleic acid sequences by using thermal convection. US Patent No 9,765,376 B2. Sep. 19, 2017.
 66. Jeffreys H. The stability of a layer of fluid heated below. *Philosophical Magazine*. 1926. V. 2. P. 833-844. DOI: 10.1080/14786442608564114
 67. Jeffreys H. Some cases of instability in fluid motion. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. 1928. V. 118. No 779. P.195-208. DOI: 10.1098/rspa.1928.0045
 68. Karched M., Furgang D., Sawalha N., Fine D.H. Rapid identification of oral isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* obtained from humans and primates by an ultrafast super convection based polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods*. 2012. V.89. P. 71-75. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.01.016
 69. Kim S.J., Wang F., Burns M.A., Kurabayashi K. Temperature-programmed natural convection for micromixing and biochemical reaction in a single microfluidic chamber. *Anal. Chem*. 2009. V.81(11). P.4510-4516. DOI: 10.1021/ac900512x
 70. Kim TH, Hwang HJ, Kim JH. Development of a novel, rapid multiplex polymerase chain reaction assay for the detection and differentiation of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium using ultra-fast convection polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis*. 2017. V.14(10). P.580-586. doi: 10.1089/fpd.2017.2290
 71. Kim TH, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast on-site molecular detection of foodborne pathogens using a combination of convection polymerase chain reaction and nucleic acid lateral flow immunoassay. *Foodborne Pathog Dis*. 2018. Oct 11. doi: 10.1089/fpd.2018.2500. [Epub ahead of print]
 72. Kim TH, Song K, Hwang HJ, Kim JH. Effect of tris(2-carboxyethyl)phosphine and tertiary butyl alcohol on the performance of convection polymerase chain reaction. *Mol Biol Rep*. 2018a. Nov 27. doi: 10.1007/s11033-018-4519-7. [Epub ahead of print]
 73. Krishnan M., Agrawal N., Burns M.A., Ugaz V.M. Reactions and fluidics in miniaturized natural convection systems. *Anal. Chem*. 2004. V.76. P.6254-6265. DOI: 10.1021/ac049323u
 74. Krishnan M., Ugaz V., Burns M. Methods of performing biochemical reactions in a convective flow fluid. US Patent No 7,537,890 B2. May 26, 2009
 75. Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. PCR in a Rayleigh-Benard convection cell. *Science*. 2002. V.298. P.793. DOI: 10.1126/science.298.5594.793
 76. Kuo HC, Lo DY, Chen CL, Tsai YL, Ping JF, Lee CH, Lee PA, Chang HG. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device. *Poult Sci*. 2017. V.96(1). P.35-41. DOI: 10.3382/ps/pew228
 77. Lauterbach SE, Nelson SN, Nolting JM, Trujillo JD, Richt JA, Bowman AS. Evaluation of a field-deployable insulated isothermal polymerase chain reaction Nucleic Acid Analyzer for Influenza A virus detection at swine exhibitions. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018. doi: 10.1089/vbz.2018.2345 [Epub ahead of print]
 78. Lee J., Kulla E., Chauhan A., Tripathi A. Taylor dispersion in polymerase chain reaction in a microchannel // *Phys. Fluids* 2008. V. 20. 093601. DOI: 10.1063/1.2973819
 79. Lee Y.-S., Kuk K., Oh Y.-S., Shih S.-H., Kim M.-S. Polymer chain reaction apparatus using

- Marangoni convection and polymer chain reaction method using the same. US Patent Application Publication No 2006/0216725 A1. Sep. 28, 2006.
80. Li Z., Zhao Y., Zhang D., Zhuang S., Yamaguchi Y. The development of a portable buoyancy-driven PCR system and its evaluation by capillary electrophoresis. *Sens. Actuat. B: Chem.* 2016. V. 230. P. 779-784. DOI: 10.1016/j.snb.2016.02.143
 81. Lin YH, Lin YJ, Chang TD, Hong LL, Chen TY, Chang PF. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4. *PLoS One.* 2016. V.11(7). e0159681. doi: 10.1371/journal.pone.0159681
 82. Liu T-H., Wen K-H., Jiang P-S., Huang J-L., Chen T-H. Convective polymerase chain reaction apparatus and optical detecting method thereof. US Patent Application Publication No 2018/0104696 A1. Apr. 19, 2018
 83. Lord Rayleigh O.M. F.R.S. On convection current in horizontal layer of fluid, when the higher temperature is on the under side. *Philosophical Magazine.* 1916. V. 32. N. 192. P. 529-546. DOI: 10.1080/14786441608635602
 84. Lung O., Pasick J., Fisher M., Buchanan C., Erickson A., Ambagala A. Insulated isothermal reverse transcriptase PCR (iiRT-PCR) for rapid and sensitive detection of classical swine fever virus. *Transbound Emerg Dis.* 2016. V.63(5). e395-402. doi: 10.1111/tbed.12318
 85. Lung O, Reimer SA, Goater CP. User-friendly Taqman probe coupled-insulated isothermal PCR (iiPCR) for rapid detection of emerging *Ambystoma tigrinum* virus (ATV) in western tiger salamanders (*Ambystoma mavortium*) on a compact, portable instrument. *J Virol Methods.* 2017. V.249. P.21-24. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.08.008
 86. Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov.V.A., Chemeris A.V. Mikrozhidkostnaya polimeraznaya tsepnaya reaktsiya. *Vestnik Bashkirskogo universiteta.* 2013. T. 18(3). P. 698-704. (Microfluidic polymerase chain reaction – In Russian)
 87. Malmquist M. Homogenizing of small-volume mixtures by centrifugation and heating. US Patent No 6,783,993 B1. Aug. 31, 2004
 88. Marangoni C. Sull'espansione delle gocce di un liquido galleggiante sulla superficie di altro liquido. 1865. Pavia. Tipografia dei Fratelli Fusi. 66 P.
 89. Mårtensson G, Skote M, Malmqvist M, Falk M, Asp A, Svanvik N, Johansson A. Rapid PCR amplification of DNA utilizing Coriolis effects. *Eur Biophys J.* 2006. V.35(6). P.453-458. DOI: 10.1007/s00249-006-0052-z
 90. Mast C.B., Braun D. Thermal trap for DNA replication. *Phys Rev Lett.* 2010. V. 104. N. 18. P. 188102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.104.188102
 91. Moiseev K.V. Vliyanie rezhimov konveksii na polimeraznuyu tsepnuyu reaktsiyu v kvadratnoy polosti. *Proceedings of the Mavlyutov Institute of Mechanics.* 2010. V. 9(2). P.86-89. DOI: 10.21662/uim2012.2.055 (Effect of convection regimes on polymerase chain reaction in a square cavity - In Russian)
 92. Moiseev K.V., Volkova E.V., Urmanceev S.F. Effect of convection on polymerase chain reaction in a closed cell. *Procedia IUTAM.* V. 8. 2013. P. 172-175. DOI: 10.1016/j.piutam.2013.04.022
 93. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Chaotically accelerated biochemistry in microscale convective flows. *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences.* 2010. P. 2126-2128.
 94. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Chaotically accelerated polymerase chain reaction by microscale Rayleigh-Bénard convection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. P. 3048-3052. doi: 10.1002/anie.201004217
 95. Muddu R., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Rapid PCR thermocycling using microscale thermal convection. *J. Vis. Exp.* 2011a. V. 5. pii: 2366. DOI: 10.3791/2366
 96. Muddu R., Ugaz V.M., Hassan Y.A. Three dimensional simulation of Rayleigh-Bénard convection for rapid microscale polymerase chain reaction. *Proc. ASME Fluids Engineering Division Summer Conference.* 2009. DOI: 10.1115/FEDSM2009-78119
 97. Nield D.A. Surface tension and buoyancy effects in cellular convection. *Journal of Fluid Mechanics.* 1964. V. 19(3). P. 341-352. DOI: 10.1017/S0022112064000763
 98. Normand C., Pomeau Y. Convective instability: A physicist's approach. *Rev. Mod. Phys.* 1977. V. 49. N. 3. P. 581-624. DOI: 10.1103/RevModPhys.49.581
 99. Northrup M.A., Mariella, Jr. R.P., Carrano A.V., Balch J.W. Silicon-based sleeve devices for chemical reactions. US Patent No 5,589,136. Dec. 31, 1996
 100. Pal R., Yang M., Lin R., Johnson B.N., Srivastava N., Razzacki S.Z., Chomistek K.J., Heldsinger D.C., Haque R.M., Ugaz V.M., Thwar P.K., Chen Z., Alfano K., Yim M.B., Krishnan M., Fuller A.O., Larson R.G., Burke D.T., Burns M.A. An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses. *Lab Chip.* 2005. V.5. P.1024-1032. DOI: 10.1039/b505994a

101. Pearson J.R.A. On convection cells induced by surface tension. *Journal of Fluid Mechanics*. 1958. V. 4(5). P. 489-500. DOI: 10.1017/S0022112058000616
102. Priye A., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Education: DNA replication using microscale natural convection. *Lab Chip*. 2012. V.12. P.4946-4954. DOI: 10.1039/c2lc40760d
103. Priye A., Hassan Y.A., Ugaz V.M. Microscale chaotic advection enables robust convective DNA replication. *Anal. Chem*. 2013. V.85. P.10536-10541. DOI: 10.1021/ac402611s
104. Priye A., Ugaz V.M. DNA-to-go: A portable smartphone-enabled PCR assay platform. *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2014*, P. 2011-2013.
105. Priye A., Ugaz V.M. Convective PCR thermocycling with smartphone-based detection: A versatile platform for rapid, inexpensive, and robust mobile diagnostics. *Microfluidic Methods for Molecular Biology*, Springer International Publishing, 2016. Lu C., Verbridge S. (eds). P. 55-69. DOI: 10.1007/978-3-319-30019-1_3
106. Priye A., Ugaz V.M. Smartphone-enabled detection strategies for portable PCR-based diagnostics. *Methods Mol Biol*. 2017. V. 1571. P. 251-266. DOI: 10.1007/978-1-4939-6848-0_16
107. Priye A, Wong S, Bi Y, Carpio M, Chang J, Coen M, Cope D, Harris J, Johnson J, Keller A, Lim R, Lu S, Millard A, Pangelinan A, Patel N, Smith L, Chan K, Ugaz VM. Lab-on-a-drone: Toward pinpoint deployment of smartphone-enabled nucleic acid-based diagnostics for mobile health care. *Anal Chem*. 2016. V.88(9). P.4651-4660. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04153
108. van der Poel E.P., Stevens R.J.A.M., Lohse D. Comparison between two- and three-dimensional Rayleigh-Bénard convection. *J. Fluid Mechanics*. 2013. V. 736 .P. 177-194. DOI: 10.1017/jfm.2013.488
109. Qiu X., Ge S., Gao P., Li K., Yang Y., Zhang S., Ye X., Xia N., Qian S. A low-cost and fast real-time PCR system based on capillary convection. *SLAS Technol*. 2017. V. 22. P. 13-17. DOI: 10.1177/2211068216652847
110. Qiu X., Ge S., Gao P., Li K., Yang S., Zhang S., Ye X., Xia N., Qian S. A smartphone-based point-of-care diagnosis of H1N1 with microfluidic convection PCR. *Microsystem Technologies*. 2017a. V. 23. P. 2951-2956. DOI: 10.1007/s00542-016-2979-z
111. Qiu X, Zhang S, Mei L, Wu D, Guo Q, Li K, Ge S, Ye X, Xia N, Mauk MG. Characterization and analysis of real-time capillary convective PCR toward commercialization. *Biomicrofluidics*. 2017b. V.11(2). 024103. doi: 10.1063/1.4977841
112. Ruggiero VJ, Benitez OJ, Tsai YL, Lee PA, Tsai CF, Lin YC, Chang HG, Wang HT, Bartlett P. On-site detection of bovine leukemia virus by a field-deployable automatic nucleic extraction plus insulated isothermal polymerase chain reaction system. *J Virol Methods*. 2018. V.259. P.116-121. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.06.008
113. Saito M., Kiriyama Y., Yamanaka K., Tamiya E. Development of the POCT-oriented PCR device driven by centrifugation assisted thermal convection. *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2013. Paper/437_0976
114. Saito M., Kiriyama Y., Tamiya E. Thermal convection generating chip and liquid measuring device. US Patent Application Publication No 2017/0189873 A1. Jul. 6, 2017
115. Saito M., Takahashi K., Kiriyama Y., Espulgar W.V., Aso H., Sekiya T., Tanaka Y., Sawazumi T., Furui S., Tamiya E. Centrifugation-controlled thermal convection and its application to rapid microfluidic polymerase chain reaction devices. *Anal. Chem*. 2017. V. 89. P. 12797-12804. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03107
116. Saito M., Tamiya E. Thermal convection generating chip, thermal convection generating device, and thermal convection generating method. US Patent Application Publication No 2016/0214112 A1. Jul. 28, 2016
117. Schmidt R.J., Milverton S.W. On the instability of a fluid when heated from below. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1935. V. 152. N. 877. P. 586-594. DOI: 10.1098/rspa.1935.0209
118. Scriven L.E., Sternling C.V. The Marangoni effects. *Nature*. 1960. V. 187. P. 186-188. DOI: 10.1038/187186a0
119. Shu B, Zhang C, Xing D. A sample-to-answer, real-time convective polymerase chain reaction system for point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2017. V.97. P.360-368. doi: 10.1016/j.bios.2017.06.014
120. Soltan MA, Tsai YL, Lee PA, Tsai CF, Chang HG, Wang HT, Wilkes RP. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *J Virol Methods*. 2016. V.235. P.99-104. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.05.006
121. Song KY, Hwang HJ, Kim JH. Data for the optimization of conditions for meat species identification using ultra-fast multiplex direct-

- convection PCR. *Data Brief*. 2017. V.16. P.15-18. doi: 10.1016/j.dib.2017.11.004
122. Song KY, Hwang HJ, Kim JH. Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications. *Food Chem*. 2017. V.229. P.341-346. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.085
123. Su C., Teng P-H., Jeng C-C. Method for steadying thermal convection flow field in solution during thermal convective polymerase chain reaction. US Patent Application Publication No 2016/0244810 A1. Aug. 25, 2016
124. Takahashi K., Saito M., Espulgar W.V., Yamamoto N., Akeda Y., Tomono K., Tamiya E. Rapid drug-resistant gene detection device for bedside monitoring by centrifugal convective PCR. *20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2016*, P. 1212-1213.
125. Thomson J. On certain curious motions observable at the surfaces of wine and other alcoholic liquors. *Philosophical Magazine*. 1855. V.10. P.330-333.
126. Thomson J. On a changing tessellated structure in certain liquids. *Proceedings of the Philosophical Society of Glasgow*. 1882. V. 13. P. 464-468.
127. Tsai Y.L., Wang H.T., Chang H.F., Tsai C.F., Lin C.K., Teng P.H., Su C., Jeng C.C., Lee P.Y. Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection. *PLoS One*. 2012. V. 7. N. 9. e45278. doi: 10.1371/journal.pone.0045278
128. Tsai Y.L., Lin Y.C., Chou P.H., Teng P.H., Lee P.Y. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions. *J Virol Methods*. 2012a. V. 181. N. 1. P. 134-137. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.01.017
129. Tsai Y.L., Wang H.C., Lo C.F., Tang-Nelson K., Lightner D., Ou B.R., Hour A.L., Tsai C.F., Yen C.C., Chang H.F., Teng P.H., Lee P.Y. Validation of a commercial insulated isothermal PCR-based POKKIT test for rapid and easy detection of white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One*. 2014. V. 9. N. 3. e90545. doi: 10.1371/journal.pone.0090545
130. Tsai JJ, Liu LT, Lin PC, Tsai CY, Chou PH, Tsai YL, Chang HG, Lee PA. Validation of the POKKIT dengue virus reagent set for rapid detection of dengue virus in human serum on a field-deployable PCR system. *J Clin Microbiol*. 2018. V.56(5). pii: e01865-17. doi: 10.1128/JCM.01865-17
131. Tsen H.Y., Shih C.M., Teng P.H., Chen H.Y., Lin C.W., Chiou C.S., Wang H.T., Chang H.F., Chung T.Y., Lee P.Y., Chiang Y.C. Detection of Salmonella in chicken meat by insulated isothermal PCR. *J Food Prot*. 2013. V. 76. N. 8. P. 1322-1329. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-553
132. Tung HY, Wang SH, Chiang YC, Tsai MS. Rapid screening of roundup ready soybean in food samples by a hand-held PCR device. *Food Sci Biotechnol*. 2016. V.25(4). P.1101-1107. doi: 10.1007/s10068-016-0177-5
133. Ugaz V.M., Agrawal N. Portable buoyancy driven PCR thermocycler. US Patent Application Publication No 2008/0176292 A1. Jul. 24, 2008
134. Ugaz V.M., Krishnan M. Novel convective flow based approaches for high-throughput PCR thermocycling. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 2004. V. 9. N. 5. P. 318-323. DOI: 10.1016/j.jala.2004.08.003
135. Ugaz V, Priye A, Hassan YA. DNA to go: A do-it-yourself PCR thermocycler lab. *Conference: The 119th ASEE Annual Conference & Exposition American society for engineering education ASEE*. 2012. DOI: 10.13140/RG.2.1.4925.8649
136. Varley C. Circulation in oil of turpentine, spirit of wine & c. *Transactions of the Society, Instituted at London, for the Encouragement of Arts, Manufactures, and Commerce*. 1836. V. 50. P. 190-191.
137. Vissani MA, Tordoya MS, Tsai YL, Lee PA, Shen YH, Lee FC, Wang HT, Parreño V, Barrandeguy M. On-site detection of equid alphaherpesvirus 3 in perineal and genital swabs of mares and stallions. *J Virol Methods*. 2018. V.257. P.29-32. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.04.002
138. Volkova E.V. Modelirovanie polimeraznoy tsepnoy reaksii v konvektivnoy yacheyke. *Proceedings of the Mavlyutov Institute of Mechanics*. 2010. V. 7. P. 83-89. (Modeling of polymerase chain reaction in a convective cell - In Russian)
139. Volkovisky V. Etude des tourbillons thermo convectifs dans les liquides; preface de M.H.Bénard. Publications scientifiques et techniques du Ministère de l'Air, 151. Blondel la Rougery, Paris. 1939. 97 P.
140. Wang WK, Gubler DJ. Potential Point-of-Care Testing for dengue virus in the field. *J Clin Microbiol*. 2018. V.56(5). pii: e00203-18. doi: 10.1128/JCM.00203-18
141. Wang S., Wang W. Kinetic characteristics of continuous flow polymerase chain reaction chip: A numerical investigation. *Sci. China Technol. Sci*. 2010. V. 53. PP. 1967-1972. DOI: 10.1007/s11431-010-3096-3
142. Watson J.D., Crick F.H.C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953. V. 171(4356). P. 737-738. doi: 10.1038/171737a0

143. Watson J.D., Crick F.H.C. Genetic implication of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1953a. V. 171(4361). P. 964-967. doi: 10.1038/171964b0
144. Wesfreid J.E. Scientific Biography of Henri Bénard (1874–1939). In: *Dynamics of Spatio-Temporal Cellular Structures*. Mutabazi I., Wesfreid J.E., Guyon E. (Eds.) Springer. 2006. P.9-37. DOI: 10.1007/978-0-387-25111-0_2
145. Wesfreid J.E. A century of fluid mechanics: 1870–1970 / Un siècle de mécanique des fluides : 1870–1970. Henri Bénard: Thermal convection and vortex shedding. *Comptes Rendus Mécanique*. 2017. V. 345, No 7. P. 446-466. DOI: 10.1016/j.crme.2017.06.006
146. Wheeler E.K., Benett W., Stratton P., Richards J., Chen A., Christian A., Ness K.D., Ortega J., Li L.G., Weisgraber T.H., Goodson K., Milanovich F. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cyler. *Anal Chem*. 2004. V. 76. N. 14. P. 4011-4016. DOI: 10.1021/ac034941g
147. Wilkes RP, Anis E, Dunbar D, Lee PA, Tsai YL, Lee FC, Chang HG, Wang HT, Graham EM. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. *J Feline Med Surg*. 2018. V.20(4). P.362-369. doi: 10.1177/1098612X17712847
148. Wilkes RP, Kania SA, Tsai YL, Lee PY, Chang HH, Ma LJ, Chang HF, Wang HT. Rapid and sensitive detection of Feline immunodeficiency virus using an insulated isothermal PCR-based assay with a point-of-need PCR detection platform. *J Vet Diagn Invest*. 2015. V.27(4). P.510-515. doi: 10.1177/1040638715593597
149. Wilkes RP, Lee PY, Tsai YL, Tsai CF, Chang HH, Chang HF, Wang HT. An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need. *J Virol Methods*. 2015. V.220. P.35-38. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.007
150. Wilkes R.P., Tsai Y.L., Lee P.Y., Lee F.C., Chang H.F., Wang H.T. Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by one-tube reverse transcription-insulated isothermal polymerase chain reaction. *BMC Vet Res*. 2014. V. 10. P. 213-221. doi: 10.1186/s12917-014-0213-8
151. Wu P-Y., Ho L-C., Chang J-J., Tzeng K-C., Deng W-L., Lin Y-H. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (TiPCR) for the detection of *Acidovorax citrulli*, the bacterial pathogen of watermelon fruit blotch. *European Journal of Plant Pathology*. 2017. V.147(4). P.869–875. DOI: 10.1007/s10658-016-1054-z
152. Yao D.J., Chen J.R., Ju W.T. Micro-Rayleigh-Bénard convection polymerase chain reaction systems. *J Micro/Nanolith. MEMS MOEMS*. 2007. V. 6. N. 4. P. 043007-1-043007-9. DOI: 10.1117/1.2805452
153. Yariv E., Ben-Dov G., Dorfman K.D. Polymerase chain reaction in natural convection systems: A convection-diffusion-reaction model. *Europhys. Letters*. 2005. V. 75. N. 6. P. 1008-1014. DOI: 10.1209/epl/i2005-10171-6
154. Zhang C., Xing D. Parallel DNA amplification by convective polymerase chain reaction with various annealing temperatures on a thermal gradient device. *Anal Biochem*. 2009. V. 387(1). P. 102-112. doi: 10.1016/j.ab.2009.01.017
155. Zhang J, Tsai YL, Lee PY, Chen Q, Zhang Y, Chiang CJ, Shen YH, Li FC, Chang HF, Gauger PC, Harmon KM, Wang HT. Evaluation of two singleplex reverse transcription-insulated isothermal PCR tests and a duplex real-time RT-PCR test for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus. *J Virol Methods*. 2016. V.234. P.34-42. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.03.016
156. Zhang S., Lin Y., Wang J., Wang P., Chen J., Xue M., He S., Zhou W., Xu F., Liu P., Chen P., Ge S., Xia N. A convenient nucleic acid test on the basis of the capillary convective PCR for the on-site detection of enterovirus 71. *J Mol Diagn*. 2014. V. 16. N. 4. P. 452-458. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.002
157. Zhang S., Xue M., Zhang J., Chen Q., Chen J., Wang Z., Zhou W., Chen P., Xia N., Ge S. A one-step dipstick assay for the on-site detection of nucleic acid. *Clin Biochem*. 2013. V. 46(18). P. 1852-1856. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.10.013
158. Zhuo Z, Wang J, Chen W, Su X, Chen M, Fang M, He S, Zhang S, Ge S, Zhang J, Xia N. A rapid on-site assay for the detection of influenza A by capillary convective PCR. *Mol Diagn Ther*. 2018. V.22(2). P.225-234. doi: 10.1007/s40291-018-0320-5
159. Zimmermann C., Groll R. Experimental and numerical investigation of a Rayleigh-Bénard convection affected by Coriolis force. *J. Flow Control, Measurement & Visualization*. 2014. V. 2. P. 165-172. DOI: 10.4236/jfcmv.2014.24018