

УДК 543.545.002.56

© Б. Г. Беленький, В. Е. Курочкин

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ И МИКРОФЛЮИДНЫЕ ЧИП-АНАЛИЗАТОРЫ.

I. ПРИБОРЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

В серии из двух статей изложен современный взгляд на метод капиллярного электрофореза, его место среди других методов аналитической химии, в частности в сравнении с жидкостной хроматографией. Рассмотрены его наиболее эффективные приборные реализации: от приборов серии "Нанофор" до микрочипов. В первой статье рассмотрены приборы классической реализации метода высокоэффективного капиллярного электрофореза (ВЭКЭ), их применение. Эволюция метода к приборам мультикапиллярного электрофореза, стимулированная проблемой расшифровки кода ДНК. Сделан обзор методов секвенирования.

ВВЕДЕНИЕ. ДВА ФОРМАТА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Приборы капиллярного электрофореза (КЭ) существуют в двух форматах, основанных на использовании: 1) гибких кварцевых капилляров (собственно приборы высокоэффективного капиллярного электрофореза — ВЭКЭ) и 2) каналлизированных пластин (микрофлюидные чип-анализаторы — МФЧА). Приборы ВЭКЭ — это, безусловно, лабораторные приборы, в МФЧА — приоритет переносных карманных приборов. По техническим возможностям изготовления приборы ВЭКЭ более доступны. Сравним особенности и практические возможности этих приборных форматов капиллярного электрофореза (см. табл. 1).

Как видно из табл. 1, если МФЧА — недорогой высокочувствительный малогабаритный (карманный) прибор массового применения, т.е. это — lab-on-a-chip с АМД и ЛИФД, то ВЭКЭ — это лабораторный автоматизированный высокопроизводительный прибор КЭ средней стоимости с высокочувствительными МС (ESI), СФД и ЛИФД (аббревиатуры см. в примечании к табл. 1). Правильный выбор способа реализации КЭ: ВЭКЭ или МФЧА — определяет эффект его применения.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Аналитическое применение ВЭКЭ во многом подобно высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — оба прибора универсальные и предназначены для массового анализа. Поэтому эти приборы нуждаются в квалифицированном сравнении. Приборы ВЭКЭ по сравнению с ВЭЖХ

отличаются более высокой чувствительностью и производительностью. Особенности ВЭКЭ, как видно из табл. 2, являются: меньшая сложность (и стоимость), большая эффективность и меньшая селективность (если исключить электроосмотическую хроматографию — ЭОХ).

Очевидно, что ВЭЖХ и ВЭКЭ взаимно дополнительны. Последняя новация ВЭКЭ — использование для сепарации электроосмотической хроматографии с колонками, заполненными монолитным сорбентом, у которого межфазовое равновесие определяется конвективным массопереносом (монолитная капиллярная электроосмотическая хроматография — МКЭОХ), которая в десятки раз эффективнее ее классического аналога — ЭОХ в колонках, упакованных гранулированным сорбентом.

Еще одна особенность приборов ВЭКЭ — их конструктивная (оптическая) схема юстируется вдоль двух осей: а) детектора, включая зону детектирования капилляра в кассете, и б) системы жидкостного термостатирования кассеты с капилляром. Подобная юстировка может быть выполнена в интегрированном приборе только с использованием в конструкции оптоволоконных связей, которые окажутся полезными и для сокращения размеров оптических детекторов, и для удобства их замены.

УНИФИЦИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКС ПРИБОРОВ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА "НАНОФОР 01" И "НАНОФОР 02"

В 1999–2001 гг. в Институте аналитического приборостроения РАН разработан комплекс приборов высокоэффективного капиллярного электрофореза серии "Нанофор".

"Нанофор 01" (рис. 1) — прибор ВЭКЭ с высокочувствительным СФД. Предназначен для рутинного биохимического и экологического анализа с прямым и косвенным СФ-детектированием.

Табл. 1. Сравнение классического капиллярного (ВЭКЭ) и чип-электрофореза (МФЧА)

№ п/п	Спецификация	ВЭКЭ	МФЧА
1	Число капилляров	До 100	До 100
2	Детекторы	СФД, ЛИФД, МС (ESI)	АМД, ЛИФД
3	Реализуемые виды ВЭКЭ	Все	Все
4	Концентрация аналитических элементов на ед. площади	Средняя	Высокая (lab-on-a-chip)
5	Система ввода пробы	Позиционер	Крестообразная
6	Объем пробы	5 нл	20 пл
7	Возможность группового изготовления	Нет	Да
8	Стоимость разработки	Средняя	Низкая
9	Стоимость изготовления	Большая	Малая
10	Автоматизация	Высокая	"
11	Размер прибора	Средний	Карманный (АМД), средний (ЛИФД)
12	Стоимость прибора	Высокая	Низкая (АМД), средняя (ЛИФД)

Примечание. СФД — спектрофотометрический детектор, АМД — амперометрический детектор, ЛИФД — лазер-индуцируемый флуоресцентный детектор, МС (ESI) — масс-спектрометрический детектор с электроспрей-ионизацией

Табл. 2. Сравнение ВЭКЭ и ВЭЖХ

Характеристика	ВЭКЭ	ВЭЖХ
1	2	3
А. Аналитические и метрологические параметры		
А1. Эффективность: резкое увеличение эффективности (в 10–20 раз)	+	—
А2. Пиковая емкость: больше, чем у сравниваемого (в 10–15 раз)	+	—
А3. Скорость анализа: выше, чем у сравниваемого, в 10 раз	+	—
А4. Производительность (пик./с): выше, чем у сравниваемого, в 10 раз (у мультicanaльного — в 100 раз)	+	—
А5. Воспроизводимость анализа: лучше, чем у сравниваемого (в 3–5 раз)	—	+

Табл. 2 (продолжение)

1	2	3
А6. Точность анализа: лучше, чем у сравниваемого (в 5–10 раз)	—	+
А7. Предельно малая детектируемая концентрация (сравнительно с конкурентным методом): с СФД — преимущество в 20 раз (10^{-8} М сравнительно с 2×10^{-7} М) с ЛИФВ — преимущество в 10–100 раз (10^{-13} М сравнительно с 10^{-12} М)	+ +	— —
А8. Селективность лучше, чем у сравниваемого: неэлектролиты, белки полиэлектролиты (ДНК)	— +	+ —
А9. Возможность препаративного разделения (микропрепаративное фракционирование)	—	+
А10. Универсальность: анализ гидрофильных неэлектролитов, полимеров анализ электролитов, полиэлектролитов, биополимеров	— +	+ —
А11. Возможность стыковки on line с масс-спектрометром: MS—ES MALDI	+ —	+ +
Б. Технические параметры		
Б1. Линейная конфигурация прибора	+	+
Б2. Ввод проб: более точный, чем у сравниваемого (в 10 раз) более простой (низкое давление)	— +	+ —
Б3. Побудитель движения: микронасос (ΔP) — дороже, лучшая точность и воспроизводимость (в 5 раз) градиент электрополя (ΔE) — менее точно, но проще, значительно дешевле, возможность суперпроизводительного анализа с использованием мультикапилляров	— +	+ —
Б4. Оптимальный объем детектирования, σ_V (пл, in column)*	< 47	< 1.6
Б5. Оптимальная оптическая длина детектирования, d_c (мкм, in column)*	24	2.8
В. Экономические параметры		
В1. Цена прибора, \$	40 тыс.	50 тыс.
В2. Стоимость годичной эксплуатации (% цены прибора)	2 %	> 30 %
В3. Требования к квалификации оператора более высокие	+	—

Примечание. *Оптимальные значения в пп. Б4 и Б5 приведены для $N = 100.000$ т.т., времени анализа $t = 1$ мин

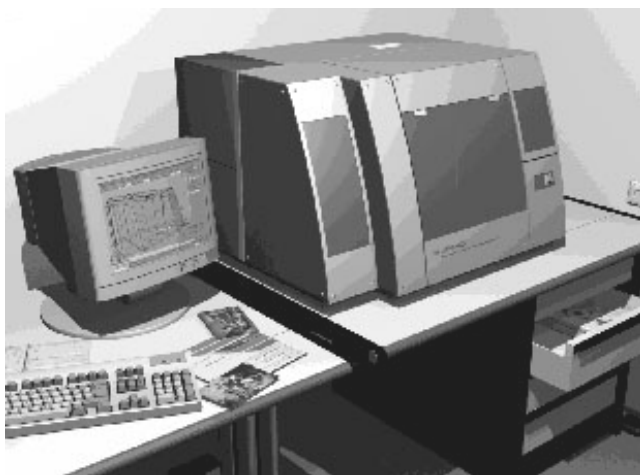


Рис. 1. Прибор ВЭКЭ "Нанофор 01"

Прибор найдет применение: в медицине (в том числе анализе белков сыворотки крови; диагностике диабета (определение гликозил-гемоглобина, микроальбуминурии); в криминалистической экспертизе; при анализе пищевых продуктов; в исследованиях и разработках химии и тонкой химической технологии, физико-химической биологии и биотехнологии.

"Нанофор 02" — прибор ВЭКЭ с ЛИФД. Он предназначен для разделения и количественного следового анализа сложных смесей с флуоресцентным и иммунным детектированием. Разработка выполнена по Государственному контракту с Министерством промышленности, науки и технологий РФ в рамках программы "Научное приборостроение". Руководитель работы д. т. н., проф. В.Е. Курочкин, научный консультант лауреат Госпремии РФ 1996 г. д. х. н., проф. Б.Г. Беленький

Приборы "Нанофор" снабжены магазином проб со стандартным 96-ячеечным планшетом с пробами и 24-ячеечным магазином с рабочими растворами. Предусмотрена возможность локального охлаждения планшета с пробой до температуры + 4 °С. Разделение пробы производится в гибком кварцевом капилляре, заполненном буферным раствором, при наложении продольного напряжения до 30 кВ с последующим детектированием по поглощению УФ-излучения или ЛИФ-детектором.

Ввод пробы в сепарационный капилляр автоматизирован. С помощью программируемого позиционера проба выбирается из 96-ячеечного микропланшета и вводится в капилляр, термостатированный в кассете контактным способом с помощью элементов Пельтье, используя один из трех методов:

- 1) наложением высокого напряжения (электромиграцией);
- 2) гидростатическим разрежением в заземленном электродном сосуде или
- 3) избыточным давлением в высоковольтном электродном сосуде.

Особенности приборов "Нанофор"

СФ-детектор. Область детектирования: 190–700 нм. Используется 30 Вт дейтериевая лампа ДС30. Зеркальный монохроматор обеспечивает устойчивое, независимое от длины волны, фокусное расстояние в центре капилляра. Кремниевый микросхемный фотоприемник обладает чувствительностью 10^{-15} А и диапазоном линейности 10^6 (до 10^{-10}) А.

ЛИФ-детектор. Для возбуждения флуоресценции используется твердотельный малогабаритный лазер YAG (Nd), $\lambda = 473$ нм, мощностью 10 Вт. ФЭУ работает в режиме счета фотонов. Излучение лазера при измерении флуоресценции отсекается сменными интерференционными светофильтрами или нутч-фильтром.

Магазин проб (позиционер). Для хранения проб используется стандартный 96-ячеечный микропланшет, размещенный на платформе прецизионного позиционера с программируемым перемещением. Бесшумность работы позиционера обеспечивается специально разработанной системой электропитания шаговых двигателей. Осуществляется локальное термостатирование микропланшета с пробой при температуре + 4 °С.

Источник высокого напряжения. Для электрофореза (электроосмоса) и электромиграционного ввода пробы приборы "Нанофор" снабжены управляемым и переключаемым (на стороне низкого напряжения) двухполярным (\pm) высоковольтным стабилизированным (± 0.02 %) источником напряжения (1–30 кВ). В целях электробезопасности высоковольтный источник работает в режиме стабилизатора мощности. Электроизоляция высоковольтного источника, кабелей и соединений рассчитана и испытана на напряжение 50 кВ.

Снабжение сжатым воздухом. Приборы "Нанофор" снабжены системой для подачи очищенного сжатого воздуха под давлением до 1 мПа (± 0.01 мПа) для ввода пробы, промывания и заполнения капилляров буферным раствором, их силовой матрицей. (Возможно и использование сжатого воздуха со стабилизированным давлением 10 ± 0.01 мПа для капиллярной, например гидродинамической жидкостной хроматографии). Система сжатого воздуха включает: воздушный компрессор, баллон сжатого воздуха (ресивер), устройство очистки воздуха (грубый и тонкий фильтры), электромагнитный клапан, редуктор, манометры.

Табл. 3. Основные технические характеристики приборов "Нанофор"

Спецификация	Нанофор 01	Нанофор 02
СФ-детектор	Спектрофотометрический. Диапазон длин волн 190–700 нм ($\Delta\lambda = 10$ нм). Флуктуационный шум $2 \cdot 10^{-5}$ е.о.п. Дрейф $2 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ час	—
ЛИФ-детектор	—	Лазер-индуцируемая флюоресценция ($\lambda = 473$ нм). Мощность излучения до 10 мВт. Предел детектирования 10^{-11} М флюоресцеина. Дрейф не более 1 % в час
Стабилизированный источник высокого напряжения	Напряжение ± 30 кВ. Ток 1–150 мкА. Нестабильность не более 0.02 %	Напряжение ± 30 кВ. Ток 1–150 мкА. Нестабильность не более 0.02 %
Капилляры из плавленного кварца, в т.ч. с модифицированной внутренней поверхностью	Внутренний диаметр 10–80 мкм. Наружный диаметр 360 мкм. Длина не более 1000 мм	Внутренний диаметр 10–80 мкм. Наружный диаметр 360 мкм. Длина не более 1000 мм
Система сжатого воздуха, пневмокомпрессор: для ввода пробы, промывания и заполнения капилляров	$P = 1 \pm 0.01$ мПа	$P = 1 \pm 0.01$ мПа
Ввод пробы	Электромиграционный, гидростатический, под давлением	Электромиграционный, гидростатический, под давлением
Автоматизация на основе формального описания алгоритмов работы прибора в рамках теории конечных автоматов	Гибкая система программирования работы прибора	Гибкая система программирования работы прибора
Термостатирование (контактное элементами Пельтье)	Микропланшет с пробами при $+4$ °С. Капилляр (в кассете) при 10–50 °С	Микропланшет с пробами при $+4$ °С. Капилляр (в кассете) при 10–50 °С
Обработка информации по программе "Мультихром-электрофорез" фирмы "Амперсенд"	Возможность обработки за один сеанс 96-луночного микропланшета проб	Возможность обработки за один сеанс 96-луночного микропланшета проб
Размеры, масса, энергопотребление	840 × 700 × 600 мм, 85 кг, 400 Вт	840 × 700 × 600 мм, 85 кг, 400 Вт

Автоматизация, обработка информации. Приборы "Нанофор" позволяют реализовать различные варианты пробоподготовки, ввода пробы, КЭ,

а также вспомогательные функции, к которым относятся сервисные: кондиционирование капилляров, тестирование узлов.

Большая свобода выбора последовательности операций при проведении эксперимента требует гибкой системы программирования алгоритмов работы прибора. Наиболее эффективный подход к решению этой задачи — формальное описание алгоритмов работы прибора "Нанофор" в рамках теории конечных автоматов. Алгоритм работы прибора представляют траекторией движения по графу состояний — граф-схемой алгоритма. По этой схеме микропроцессорный блок управления прибора реализует функции перехода и функции выхода. Функции перехода управляют всеми узлами прибора: узлом ввода проб (позиционером), высоковольтным источником, термостатом капилляра, пневмосистемой и, наконец, системой регистрации. Функции выхода — запуском системы регистрации экспериментальных данных. В "Нанофоре" используются только линейные граф-схемы, т.е. алгоритмы без точек ветвления.

Разработанная для "Нанофора" автоматизация обеспечивает возможность обработки за один сеанс стандартного 96-луночного микропланшета проб с временем пробоподготовки и ввода пробы до 20 мин и временем измерения до 3 ч. Это позволило разделить программное обеспечение на две части: измерение и обработку результатов. Измерительная часть представляет оригинальное программное обеспечение, позволяющее в удобной для пользователя форме создавать таблицы алгоритмов (методики) измерения, сохранять их в виде файла, ранее созданные методики, согласно реализуемой методике

запускать измерения, наблюдать электрофореграмму в реальном времени. При этом интерфейс пользователя выполнен в классическом стиле программирования под Windows и интуитивно понятен. Для обработки полученных электрофореграмм используется пакет программ "Мультихром-электрофорез" фирмы "Амперсенд", специально адаптированный для специфики задач КЭ.

Разработанное программное обеспечение позволяет пользователю применять имеющиеся методики проведения измерений, легко создавать новые методики, ориентированные на уникальный круг задач и ограниченные только возможностями "Нанофора".

Анализ, ввод пробы. С помощью автоматизированного позиционера проба выбирается в 96-ячеечном термостатированном микропланшете, размещенном на платформе позиционера, на которой также размещен планшет с сосудами для растворителя и буферного раствора, которые синхронно (обеспечивая непрерывный контакт капилляра с электродными сосудами) перемещаются совместно с микропланшетами. Проба автоматически вводится в капилляр, опущенный в электродные сосуды, одним из трех указанных выше способов.

Электрофоретическая сепарация, детектирование. Введенная в капилляр проба подвергается электрофорезу с детектированием "in column" разделенных компонентов. После завершения эксперимента капилляр автоматически приводится в исходное состояние по заданной программе.

Примеры электрофореграмм, полученных на "Нанофор 01" и "Нанофор 02"

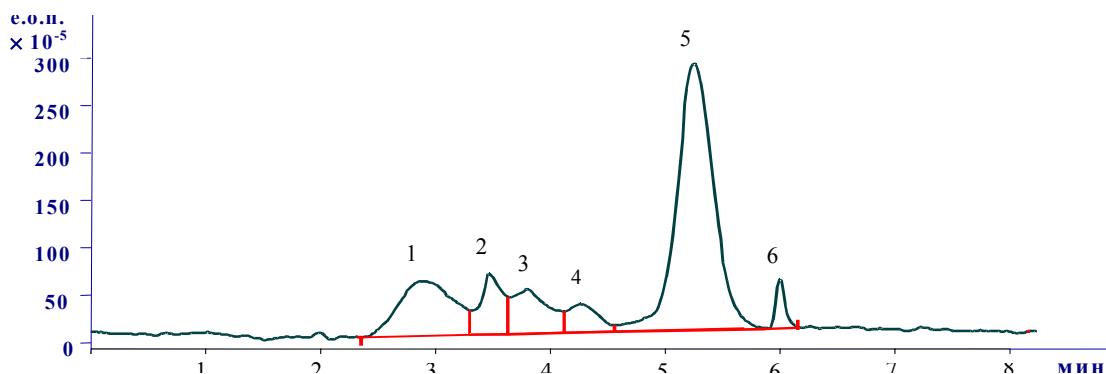


Рис. 2. Электрофореграмма белков сыворотки крови ("Нанофор 01").
 1 — γ -глобулин (15.35 %); 2 — β -глобулин (8.15 %); 3 — $\alpha 2$ -глобулин (9.3 %);
 4 — $\alpha 1$ -глобулин (4.9 %); 5 — альбумин (60 %); 6 — низкомолекулярная фракция (1.8 %)

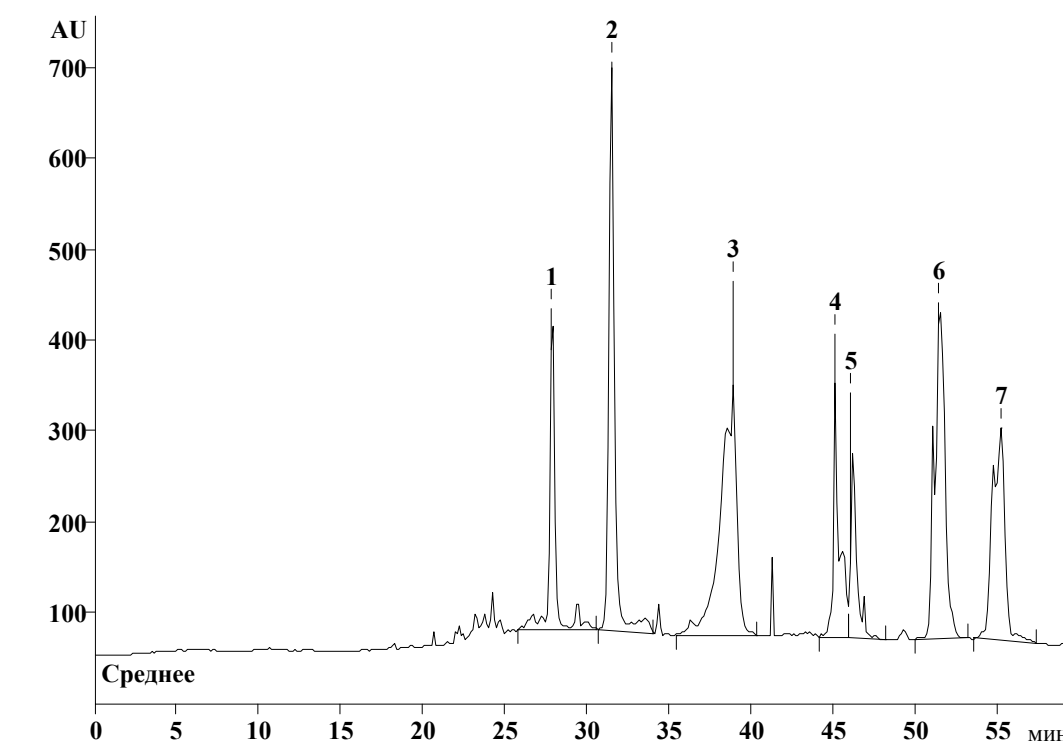


Рис. 3. Фракционирование фрагментов двухцепочечной ДНК ("Нанофор 02").
 Проба: фрагменты двухцепочечной ДНК. Длина фрагментов ДНК в порядке выхода пиков (1–7): 100, 130, 210, 290, 300, 350 и 390 пар нуклеотидов.
 Капилляр: длина 455 мм, диаметр 50 мкм, температура 20 °С, заполнен водным раствором линейного сополимера акрилмида и N,N-диметилакриламида.
 Буфер: 0.05 М трисборатный, pH = 8.3.
 Напряжение — 20 кВ. LIF-детектор. $\lambda_{\text{возб.}}$ — 473 нм

Табл. 4. Воспроизводимость* параметров пиков бензойной кислоты на приборе "Нанофор 01"

Номер эксперимента	Ввод пробы								
	давлением			электрокинетический			гидростатический		
	$t_{\text{вых}}$ (мин)	высота пика	площадь пика	$t_{\text{вых}}$ (мин)	высота пика	площадь пика	$t_{\text{вых}}$ (мин)	высота пика	площадь пика
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	8.73	64.44	0.887	8.43	82.27	1.23	9.32	88.71	1.44
2	8.7	64.35	0.89	8.37	82.34	1.18	9.28	87.34	1.26
3	8.67	63.49	0.807	8.41	80.92	1.29	9.23	86.17	1.39
4	8.73	63.02	0.827	8.45	81.67	1.17	9.26	88.32	1.42
5	8.65	62.84	0.867	8.61	83.54	1.25	9.24	86.95	1.37
6	8.63	63.03	0.903	8.53	83.06	1.2	9.33	86.23	1.52
7	8.63	63.8	0.864	8.59	82.76	1.21	9.35	87.34	1.36

Табл. 4 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
8	8.72	64.91	0.879	8.61	81.23	1.23	9.34	87.01	1.43
9	8.78	64.34	0.873	8.64	82.39	1.19	9.37	88.07	1.39
10	8.83	63.36	0.903	8.55	82.21	1.22	9.41	88.14	1.43
Среднее значение	8.71	63.76	0.870	8.52	82.24	1.22	9.31	87.43	1.40

Примечание. *Условия эксперимента: напряжение — 20 кВ, температура термостатирования — 25 °С, $\lambda_{\text{дет.}} = 225$ нм.

Аналогичные результаты по воспроизводимости получены по пику флюоресцеина на приборе "Нанофор 02" при следующих условиях: напряжение — 15 кВ, температура термостатирования — 25 °С, $\lambda_{\text{возб.}} = 473$ нм, флюоресценция — $\lambda_{\text{дет.}} = 500\text{--}540$ нм

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВЭКЭ

Аналитическая биохимия

Задачами, решаемыми средствами ВЭКЭ в этой области, являются: анализ катехоламинов; изучение биохимии единичной клетки; составление пептидных карт; разделение пептидных смесей; анализ пептидных фракций ВЭЖХ; идентификация аминокислот и других биохимических маркеров; анализ витаминов и гормонов; анализ катионов и анионов в биологических жидкостях; фракционирование и идентификация белков и энзимов; определение размеров рестрикционных фрагментов ДНК (генотипирование); идентификация и определение чистоты синтетических олигонуклеотидов; исследование их фармакокинетики; анализ смесей олиго- и полинуклеотидов — определение нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование).

Фармацевтический анализ

Для целей фармацевтики с помощью ВЭКЭ производят анализ синтетических медикаментов, стероидных и других гормонов, антибиотиков, витаминов, готовых лекарственных форм, изучение фармакокинетики, определение хиральной чистоты медикаментов.

Экологический анализ

Применение приборов ВЭКЭ в экологии обеспечивает анализ пестицидов, ПАВ, промышленных и природных экотоксикантов, неорганических и органических катионов и анионов, солей тяжелых металлов.

Экспертиза пищевых продуктов

Приборы ВЭКЭ в пищевой отрасли: анализ органических кислот и неорганических катионов в напитках, определение пищевых добавок и красителей, содержания пестицидов, микотоксинов, солей тяжелых металлов.

Криминалистическая экспертиза

Решаемые с помощью приборов ВЭКЭ задачи: генетическая идентификация личности, обнаружение наркотиков, токсинов, взрывчатых веществ.

МУЛЬТИКАПИЛЛЯРНЫЙ (СВЕРХПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ) ВЭКЭ

ВЭКЭ открывает возможность резкого увеличения производительности за счет одновременного использования нескольких (до 100) сепарационных капилляров (мультикапиллярный электрофорез, МКЭ), который сыграл выдающуюся роль в раскрытии человеческого генома.

Человеческий геном включает более трех миллиардов пар оснований. Последовательное расположение четырех оснований — аденина (А), цитозина (С), гуанина (G) и тимина (Т) — в ДНК определяет генетический код индивидуума и неценным для понимания химических основ жизни, наследственных болезней и их терапии, идентификации индивидуумов. Цель проекта "Геном человека" состоит в определении и расшифровке информации, записанной в виде нуклеотидной последовательности [1, 1a]. Ее определение

(секвенирование ДНК) является выдающимся аналитическим измерением современности. Проект "Геном человека" стимулировал разработку ряда новых аналитических приборов, методов и реагентов для анализа нуклеиновых кислот. Один из них — прибор, который стал основным для секвенирования ДНК — прибор мультикапиллярного электрофореза, особо удобный для анализа нуклеотидной последовательности ДНК, т. е. заполненные гелем (полимерной ситовой матрицей) капилляры обеспечивают быстрый, высокопроизводительный анализ размеров олиго- и полинуклеотидов — основную операцию секвенирования. При этом обеспечивается возможность автоматического перезаполнения капилляров ситовой матрицей и ввода пробы. Все эти вопросы также рассматриваются в этом обзоре. Использование ВЭКЭ для секвенирования ДНК началось в 1990 г., когда за ~80 мин было получено разделение в сшитом геле олиго- и полинуклеотидов размером до 350 оснований [2–4]. За последние десять лет в этой области достигнут внушительный прогресс, в результате которого, используя перезаполняемые капилляры с линейным полиакриламидным гелем, за 80 мин определяется последовательность более чем в 1000 оснований [5]. Секвенирование ДНК с использованием одного капилляра [2–5] аналогично использованию одной трассы в блочном гель-электрофорезе. Здесь, несмотря на высокую скорость разделения, полная производительность анализа низкая. Таким образом, встала задача одновременного выполнения ЭФ и детектирования на многих капиллярах. В 1992 г. Mathies и Huang разработали подход, получивший название мультикапиллярного электрофореза — Capillary array electrophoresis (CAE), для параллельного секвенирования многих проб ДНК [6]. Эти авторы сконструировали конфокальный флуоресцентный сканер и продемонстрировали с его помощью возможность секвенирования ДНК с определением размеров олиго- и полинуклеотидов одновременно в 25 параллельных капиллярах [7]. МКЭ — прибор этой конструкции, но уже с 96 капиллярами [8]. Он активно используется в центрах исследования генома и в фармацевтических компаниях, проводящих крупномасштабные секвенирование и генотипирование ДНК. Эффективность использования приборов МКЭ для высокопроизводительного секвенирования иллюстрируется недавним сообщением о завершении проекта "Геном человека" [9], во многом ставшего возможным благодаря использованию технологии МКЭ [10].

Системы детектирования в МКЭ

Все капилляры МКЭ должны освещаться с допустимой (фотодеструкция!) мощностью, и сигнал генерируемой в них флуоресценции должен де-

тектироваться с высокой чувствительностью и точностью. К настоящему времени разработаны подходы, в которых используются технологии сканирования линейки капилляров или получается ее изображение. При сканировании линейка капилляров или детектор движутся вдоль оси сканирования, перпендикулярной оси капилляров. Схема четырехцветного планарного конфокального флуориметра для МКЭ [11] обеспечивает высокую чувствительность при использовании высокоапертурного объектива. При этом фоновая флуоресценция и рассеяние света поверхностью капилляров минимизируются путем конфокального разделения. Для оптического возбуждения при $\lambda = 488$ нм используется излучение 3–4 мВт аргонового лазера. Линейка капилляров помещена на специальную платформу, которая перемещается при помощи шагового двигателя со скоростью 1 см/с перпендикулярно оси электрофореза. Детектирование производится с частотой 2 Гц. Для этой системы продемонстрированы высокая чувствительность и хорошее отношение сигнал/шум, поскольку используются оптимальная мощность лазера и частота сканирования, обеспечивающие детектирование большинства молекул ДНК, разделяющихся в КЭ [12]. Флуоресценция собирается с помощью дихроичных светоделителей и нескольких узкополосных светофильтров, отсекающих рассеянное лазерное излучение; разделяется на четыре канала детектирования и фокусируется на ФЭУ. При использовании в МКЭ 96-капиллярного сканера, автоматического нанесения пробы и заполнения капилляра ситовой матрицей суммарное время секвенирования более чем 500 оснований составляет менее двух часов. Можно было ожидать, что в 96-капиллярном электрофорезе при равной мощности лазера будет наблюдаться 96-кратное уменьшение сигнала по сравнению с одним капилляром. Это предположение, однако, не учитывает влияния фотодеструкции на отношение сигнал/шум и влияния высокой частоты сканирования в приборах МКЭ [12]. Время миграции 300-нуклеотидного фрагмента ДНК,двигающегося через зону детектирования, составляет ~8 с. Следовательно, при частоте сканирования 3 Гц полоса фрагмента ДНК успевает детектироваться 24 раза. В этих условиях при зоне детектирования диаметром 20 мкм и мощности лазера 3–4 мВт обнаруживается 60 % молекул, что является оптимальным для этого сканера. Альтернативный прибор МКЭ основан на детектировании изображения облучаемой зоны капилляров с помощью ПЗС-матрицы [13]. В этом случае происходит освещение капилляров, помещенных одним концом в проточную электрофоретическую ячейку, при помощи оптического волокна [14]. В подобной системе все капилляры освещаются одновременно, однако фокусирование излучения лазера на капиллярах с использованием оптоволо-

конного делителя требует мощного лазера. Должна применяться также линза большого диаметра, чтобы собрать флуоресценцию на достаточном удалении от линейки капилляров, что приводит к уменьшению апертуры. Такая система детектирования более чувствительна к рассеянию лазерного излучения по сравнению с конфокальным сканером, т. к. ее пространственная фильтрация ограничена. Однако ПЗС-система детектирования лишена движущихся частей и может обеспечить 100 % детектирование флуоресцирующих молекул в рабочем цикле. В системе детектирования "on column", разработанной Ueno и Yeung, 50 мВт луч лазера с помощью плосковыпуклой астигматической линзы фокусируется под углом 45° на линейке капилляров. Освещенная область линейки капилляров через линзу диаметром 50 мм изображается на ПЗС-матрице. На этой установке выполнено одновременное разделение 11 фрагментов ДНК в 100 капиллярах [13]. В этой системе предел детектирования зависит от положения капилляров в пучке из-за гауссова распределения интенсивности излучения в сфокусированном лазерном пучке, поскольку "внеосевое" освещение может сильно рассеиваться.

Другой подход, использующий волоконную оптику, разработан Quesada и Zhang [14]. Здесь флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК освещаются в восьмиканальном пучке, а флуоресценция собирается двумя перпендикулярно расположенными к капиллярам восьми волоконными световодами и отображается на спектрографе, который параллельно показывает полные спектры флуоресценции из восьми капилляров. Низкоапертурное освещение и высокоапертурный оптоволоконный сбор флуоресценции позволяют достичь пикомольных пределов детектирования. Хотя эти результаты кажутся внушительными, необходимо разработать более эффективные соединения оптического волокна с капилляром, чтобы применить этот подход для большего числа капилляров. Целью, которую ставили авторы описанных систем, являлось увеличение масштаба МКЭ до 96 капилляров. Недавно разработан вращающийся конфокальный сканер, позволяющий легко преодолеть 96-капиллярный барьер. В этой системе объектив микроскопа и система зеркал, вращающиеся внутри кольца капилляров, возбуждают флуорофоры и собирают флуоресценцию из каждого капилляра. Таким образом более 1000 капилляров могут быть установлены вокруг кольца диаметром 100 мм и детектироваться одновременно. В установке подобного типа, состоящей из 128 параллельных капилляров, сигналы из каждого капилляра представляются в виде четырех смежных трасс четырех различных цветов, характерных для каждого основания. Последовательности оснований в каждом капилляре выравниваются

по времени. Этим путем была определена последовательность нуклеотидов 314–323 в ДНК M13mp18. Однако в 15 из 128 капилляров результат был неудачным, но более 300 оснований легко прочитывались в 80 % остальных капилляров. Подобный сканер с 1000 капилляров может обеспечить производительность в полмиллиона оснований (> 500 kb) за один анализ при длине прочтения фрагментов ДНК длиной в 500 оснований.

Проточная (sheathflow) измерительная ячейка для мультикапиллярного электрофореза

Наиболее эффективное детектирование в мультикапиллярном электрофорезе обеспечивает предложенная Kambara с сотрудниками [10] футлярная (sheathflow) измерительная электрофоретическая ячейка, состоящая из трех последовательно расположенных частей: 1) заполненной гелем линейки капилляров, 2) свободной от геля проточной оптической ячейки и 3) свободных от геля капилляров. Фрагменты ДНК элюируют из заполненной гелем линейки капилляров в проточную ячейку и удаляются из нее через полые капилляры. Возбуждение флуоресценции обеспечивается аргоновым ионным лазером ($\lambda = 488$ нм) и YAG-лазером ($\lambda = 532$ нм), лучи которых направлены по длинной оси проточной ячейки. Сигналы флуоресценции из всех капилляров в области проточной ячейки изображаются на ПЗС-матрице. Поскольку проба облущается в свободной от геля оптической ячейке [10], эта система характеризуется низкими фоновой флуоресценцией и рассеянием света за счет устранения влияния стенок капилляров в области радиации, которые рассеивают и преломляют возбуждающее излучение лазера. Таким образом, маршрут электрофореза включает верхние и нижние капиллярные линейки, между которыми расположена заполненная буферным раствором проточная ячейка. Верхняя капиллярная линейка состоит из 20 капилляров с гелем, установленных с 0.5 мм интервалами. При этом внутренний (i.d.) и наружный (o.d.) диаметры капиллярных трубок соответственно составляют 0.1 и 0.2 мм. Нижняя капиллярная линейка состоит из 20 полых капиллярных трубок (i.d.= 0.2, o.d.= 0.3). Капиллярные линейки выравниваются с точностью до 1 мм так, чтобы оси верхних и нижних капилляров совпадали. Буферный раствор вытекает из проточной ячейки через нижние капилляры, образуя в проточной ячейке утопленные (футлярные — sheathflow — виртуальные капилляры) в зоне между верхними и нижними капиллярами, из которых элюируемые из верхней капиллярной линейки фрагменты ДНК перемещаются вместе с потоком буферного раствора (футлярным потоком) в капилляры нижней линейки.

Фрагменты ДНК в области sheathflow в зоне

на 0.5 мм ниже конца верхних капиллярных трубок освещаются излучением лазера. Цилиндрическая линза собирает лазер-возбужденную флюоресценцию и проецирует ее на двумерный детектор (охлаждаемую ПЗС-камеру, соединенную с усилителем яркости изображения). Длина наблюдаемой области может меняться от 20 до 120 мм путем изменения расстояния между облучаемой областью и ПЗС-камерой (типичная длина капиллярной линейки 40 мм). Чувствительность детектирования может быть увеличена, если использовать более узкие капилляры и детектор с высоким пространственным разрешением. Узкие промежутки между капиллярами предпочтительнее для детектирования, т. к. общая флюоресценция, собираемая цилиндрической линзой или сканирующей системой обратно пропорциональна длине области измерения. Одновременное освещение всех капилляров и цилиндрическая линзовая система обеспечивают эффективный сбор флюоресценции, достаточный для обнаружения следовых количеств ДНК. Это, как и высокая производительность, особенно важно при секвенировании ДНК. Последняя задача требует многих параллельных путей миграции (капилляров) и быстрого электрофореза. В описанной системе нет движущихся частей и время получения данных может быть уменьшено до 0.1 с на один нуклеотид.

Прогресс в увеличении чувствительности ВЭКЭ позволит в будущем детектировать в капиллярной линейке даже единичные молекулы.

ПРИМЕНЕНИЕ МКЭ В АНАЛИЗЕ ДНК

Секвенирование ДНК

Для секвенирования ДНК используются разные методы, включая primer walking undirectional detection and shot gun sequencing [15, 16]. Shot gun sequencing становится наиболее популярным методом для крупномасштабного секвенирования ДНК, поскольку он наиболее рентабелен и легко автоматизируется. В одном из вариантов этого метода ДНК извлекается из клетки, ~ 50 kb фрагменты ДНК клонируются в космиды, которые затем статистически расщепляются либо ферментативно, либо путем ультразвуковой обработки до фрагментов длиной 2–4 kb. Эти фрагменты очищаются, субклонированы в векторы, такие как M13 или pUC19, и включаются в *E. coli*. После выращивания клетки выделяют двухцепочечную или одноцепочечную ДНК и секвенируют их, используя метод ферментативного секвенирования (используя ДНК-полимеразу) со статистическим блокированием роста ДНК-цепи в результате включения дидезоксинуклеотидов (терминаторов) [17]. В разработанном Сэнжером методе секвени-

рования ДНК используются четыре праймера [18] с разными флюоресцентными метками и соответственно четыре терминатора [19]. В автоматизированных вариантах этого метода проба нагревается для денатурации до 95 °С. Затем температуру снижают до 50–60 °С с целью отжечь 5' флюоресцентно-меченый праймер. С помощью термостойкой ДНК-полимеразы формируется комплекс секвенируемой матрицы с 3' концом флюоресцентно-меченого праймера и при 70 °С производится ферментативное наращивание ДНК путем последовательного включения дидезоксинуклеотидов, комплементарных основаниям ДНК — матрицы (полимеразная цепная реакция, ПЦР). Рост меченой цепи останавливается после включения в цепь дидезоксинуклеотида. Соотношение дезокси- и дидезоксинуклеотидов выбирается таким, чтобы обеспечивалось статистическое включение последних в растущую цепь ДНК. Таким образом, копируемые удлиненные фрагменты — сэнжеровские копии ДНК представляют непрерывный статистический набор олиго- и полинуклеотидов с одинаковыми концевыми нуклеотидами, представляющими заданный терминирующий дидезоксинуклеотид. При этом флюоресценция красителя на 5' конце праймера соответствует выбранному терминатору. Получаемые таким образом фрагменты ДНК (ПЦР-копии) имеют длину до 500 оснований и более, причем скорость ферментативного включения составляет несколько сот оснований в секунду. Производится 30–40 циклов ПЦР на той же матрице ДНК, в результате которых количество флюоресцентно-меченых фрагментов ДНК многократно увеличивается. Последующие циклы реализуются периодическим нагреванием реакционной смеси до 95 °С, отжигом ДНК с праймером — чтобы отделить растущие фрагменты от матрицы, и сопровождаются ростом цепи. Далее содержимое всех сосудов с ПЦР-продуктами объединяют, ДНК осаждают этиловым спиртом, чтобы, освободив ПЦР-продукты от избытка реагентов и соли, подготовить образец для электрофоретической инъекции.

Флюоресцентные метки

Изначально используемые для секвенирования флюоресцентно-меченые праймеры [18] не обладали одинаково высокой молярной абсорбцией при одной длине волны возбуждения. Для компенсации этого многие системы детектирования МКЭ-секвенаторов использовали или две длины волны возбуждения [3, 10, 20], или альтернативные стратегии кодирования оснований [7, 20–22], перспективность которых не отрицается. Однако наиболее простое решение этой проблемы состоит в использовании эффекта резонансного переноса энергии (РПЭ) между флюорофорами: донором

и акцептором. Это было продемонстрировано на примере праймеров, содержащих общий краситель: донор на 5' конце и краситель-акцептор на расстоянии 8–10 нуклеотидов от 5' конца [23, 24]. Энергия, полученная молекулой донора при поглощении кванта на длине $\lambda = 488$ нм, безызлучательно переносится на молекулу акцептора, которая флуоресцирует на характеристичной для терминатора длине волны, отличной от таковой у красителя-донора. Номенклатура используемых РПЭ-красителей обозначается аббревиатурой D—N—A, в которой D — донор, A — акцептор, а N — число нуклеотидов между D и A. Обычно в качестве донора выступает карбоксифлуоресцеин, а акцепторами являются производные родамина: R110, R6G, TAMRA и ROX. При возбуждении $\lambda = 488$ нм праймеры с РПЭ имеют в 2–14 раз более высокую интенсивность флуоресценции, чем праймеры, меченные одинарным красителем [23]. Было показано преимущество цианиновых красителей в качестве общего донора в РПЭ-праймерах [25]. Из-за высокой молярной абсорбции цианинов по сравнению с флуоресцеином интенсивность флуоресценции РПЭ-праймеров в 24 раза выше таковой у меченых одинарным красителем. Наряду с этим у цианинов меньшее спектральное перекрывание. Использование родаминовых производных в качестве четырех акцепторных флуорофоров минимизирует разницу электрофоретических подвижностей у протяженных фрагментов ДНК [25]. Более высокие интенсивности сигналов праймеров обеспечивают большую длину прочтения последовательностей ДНК и большую точность соотношения оснований. Все это позволяет уменьшать массу ДНК, используемую для проведения реакций секвенирования [11, 23–26]. Было продемонстрировано использование РПЭ-праймеров для определения размеров коротких тандемов [27], что, в частности, использовалось для диагностики рака [28], и разработки новой стратегии кодирования оснований для секвенирования ДНК [29]. Опираясь на разработку РПЭ-праймеров, были созданы некоторые альтернативные варианты РПЭ-красителей, так называемые блочные РПЭ-красители, в которых молекулы донора и акцептора соединены через молекулу-линкер, обеспечивающую наибольший перенос резонансной энергии. Их успешное использование как для мечения праймеров, так и терминаторов с дальнейшим проведением реакций секвенирования было продемонстрировано в работах [25, 30–33].

Ситовая матрица

Для капиллярного электрофореза при секвенировании ДНК первоначально использовались сшитые полиакриламидные гели (ПААГ) [2–4]. Разделяющая способность геля зависит от его порис-

тости, которая, в свою очередь, зависит от молекулярной массы и концентрации мономера и сшивающего агента. К сожалению, ограниченный срок службы подобных гелей, недостаточная воспроизводимость полимеризации и неустойчивость полимерной матрицы в капиллярах первоначально сдерживали использование ВЭКЭ для секвенирования ДНК.

Чтобы автоматизировать ВЭКЭ-секвенирование ДНК и увеличить срок службы капиллярных колонок, была разработана перезаживаемая ситовая матрица, позволяющая освобождать капилляры от геля и восстанавливать их после каждого разделения. Перезаживаемая ситовая матрица должна обладать малой вязкостью и высокой сепарационной эффективностью. Для минимизирования электроосмотического потока (ЭОП) в большинстве случаев требуется модификация стенок капилляра. Предложены многочисленные перезаживаемые ситовые матрицы, включая линейный полиакриламид (ЛПАА, LPA [34]), полидиметилакриламид (ПДМАА, PDMA [35]), полиэтиленоксид (ПЭО, PEO [36]), гидроксипропилцеллюлозу (ГЭЦ, HEC) и поливинилпирролидон (ПВП, PVP [37]). Причем маловязкие полимерные растворы (< 100 Па·с) типа PDMA и PVP обеспечивают однонуклеотидное разрешение, необходимое для секвенирования ДНК, при этом нековалентно связанные со стенкой капилляра полимеры подавляют взаимодействие с ней ДНК и ЭОП. Эти полимеры имеют умеренную разделяющую эффективность, обеспечивая секвенирование ДНК размером до 500–600 оснований за ~ 2 ч.

Полимеры с умеренной вязкостью (1000–5000 Па·с), включая PEO, HEC и перезаживаемый LPA, могут использоваться с немодифицированными полыми капиллярами, но требуют предварительную кислотную обработку поверхности капилляров перед каждым электрофоретическим пробегом [38]. Однонуклеотидное разделение до ~ 300 оснований было достигнуто при использовании смешанных PEO-матриц [21]. Как LPA, так и HEC требуют модификации стенок капилляров для подавления ЭОП и достижения высокой эффективности разделения. Было достигнуто однонуклеотидное разделение до 600 оснований за ~ 70 мин при использовании в качестве матрицы HEC. Достигнут прогресс и в разработке перезаживаемых LPA ситовых матриц [5, 34]. Полимеризация LPA зависит от чистоты мономера, содержания кислорода и температуры. 2 %-е длинноцепочечные LPA-гели в капиллярах, покрытых поливиниловым спиртом, использовались для разделения более чем 1000 оснований за 80 мин при 60 °С. Эти гели могут легко закачиваться в капилляр под давлением ~ 1.3 мПа и, таким образом, обладают всеми свойствами, необходимыми для секвенирования ДНК.

Была произведена оценка эффективности LPA, HES, и смеси PEO, и HES при секвенировании ДНК в идентичных условиях разделения с одинаковыми образцами ДНК и системами детектирования [1]. Перезаполняемый LPA обеспечил за самое короткое время самую большую длину прочтения (1000 оснований) по сравнению с 600 основаниями в HES и < 300 оснований в смеси HES—PEO. Перезаполняемый LPA перспективен для крупномасштабных проектов секвенирования, которые требуют больших длин прочтения и высокоэффективного разделения. Чтение длинной последовательности уменьшает число необходимых реакций секвенирования и вследствие этого уменьшает расход реагентов, в конечном счете снижая стоимость секвенирования ДНК.

Очистка и нанесение пробы

Реакции секвенирования ДНК выполняются в буферных растворах высокой концентрации (250 мМ Трис-НСl, 12.5 мМ MgCl₂), необходимых для эффективной работы ДНК-полимеразы. Однако высокие концентрации соли осложняют широко используемую в ВЭКЭ электрокинетическую инъекцию. Поэтому пробы после проведения реакций секвенирования ДНК осаждают этанолом. Однако эта операция оставляет неопределенное количество соли в пробах. Отсюда возникает необходимость в усовершенствовании методов очистки проб. Группа Каргера недавно разработала метод, использующий полисульфоновые ультрафильтрационные мембраны и центрифугируемые колонки для удаления матрицы и соли из продуктов реакции ферментативного секвенирования [39]. Этот метод улучшает воспроизводимость нанесения пробы, обеспечивая 10–50 кратное увеличение количества наносимой пробы. Однако для разработки высокопроизводительной системы секвенирования с использованием этого метода требуется автоматизация двух стадий: центрифугирования и фильтрации. Были также разработаны как часть интегральных систем МКЭ методы очистки проб ДНК, включающие жидкостную ионообменную [40] и эксклюзионную [41, 42] хроматографии. Поскольку используемые для этих целей колонки имели длину ~30 см и требовали для эффективной работы специальных клапанов и насосов, затруднялась интеграция этих методов с высокопроизводительными системами МКЭ. Процесс нанесения ДНК-проб в капилляры осложняется и потому, что объем пробы, необходимый для контакта с капилляром, составляет несколько микролитров, хотя только небольшая доля (< 0.1 %) этого количества фактически попадает в капилляр. Отсюда очевидна необходимость разработки новых методов эффективной низкообъемной очистки пробы и ее инъекции в прибор МКЭ

с целью полной автоматизации и уменьшения стоимости МКЭ-секвенирования.

Применение

Оценивалась эффективность систем и методов МКЭ для высокопроизводительного секвенирования реальных образцов ДНК. Так Kheternal с сотрудниками оптимизировали конфокальный МКЭ-сканер, РПЭ-праймеры и методы секвенирования для определения нуклеотидной последовательности митохондриальной (mt) ДНК [12]. Каждый из 12 мотивов гипервариабельной области 1 (HVR D) человеческой (mt) ДНК из популяции Сьерра-Леоне (Западная Африка) секвенировался с однонуклеотидным разрешением всех 500 фрагментов. Нуклеотидная последовательность определялась с 99 %-й точностью. Этот эксперимент секвенирования используется как тест для МКЭ-сканера и РПЭ-праймеров. Mathies использовал планарные МКЭ-сканеры, перезаполняемую LPA-матрицу и РПЭ-праймеры для секвенирования генов *Apaabaena*. Удалось путем секвенирования и сборки шести фрагментов, отсекуировать более 250 000 оснований. Mathies'ом коммерчески разработана оптимизированная 96-капиллярная версия МКЭ, предложенная для секвенирования ДНК. Например, проект shot gun секвенирования полного микробного генома *Candida albicans* был завершен с использованием МКЭ с перезаполняемой LPA-матрицей и РПЭ-праймерами. При этом большинство длин ДНК составляло 550 оснований, которые прочитывались за 90 мин. Полная читаемость, которая определялась как процент матриц с прочитываемыми последовательностями, составляла 88 %. Таким образом, показано, что МКЭ системы обеспечивают автоматизированное, высокоскоростное, высокопроизводительное секвенирование ДНК.

Перспективы

Главное направление оптимизации МКЭ-технологии — увеличение точности и скорости секвенирования. В связи с этим отмечается, что МКЭ-системы имеют фундаментальные ограничения. Во-первых, — в числе капилляров: с увеличением линейки ее труднее изготовить и с ней работать. Во-вторых, — в эффективности нанесения пробы. Можно полагать, что эти и другие проблемы разрешатся путем перехода к микрофлюидным системам МКЭ. Woolley и Mathies впервые продемонстрировали микрочип-секвенирование ДНК в пределах 200 оснований за 10 мин с использованием сшитого ПААГ [26]. С тех пор достигнуто разделение более чем 400 оснований за 15 мин. Разделение олиго- и полинуклеотидов при одноцветном секвенировании [43] и четырехцветном секвенировании было выполнено за 20 мин в капилляре длиной 7 см, при этом прочитывалось

больше 600 оснований [44]. Качество разделения при секвенировании на микрофлюидных устройствах быстро приближается к получаемому с использованием стандартной капиллярной системы. Этот быстрый переход в новое качество произошел потому, что крестообразный канал ввода пробы позволяет наносить малые концентрированные пробы с уменьшенным содержанием соли путем адсорбционного взаимодействия ДНК с матрицей геля. Это достижение вместе с продемонстрированной недавно чип-МКЭ-системой (Mathies) показало возможность анализировать до 96 образцов на единичном 100 мм микрочипе [45] представляет путь к дальнейшему увеличению скорости и производительности МКЭ при секвенировании ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kheterpal I., Mathies R.A.* // *Analytical Chemistry News*. 1999. V. 1. P. 31A–37A.
- 1a. *Collins F. et al.* // *Science*. 1998. P. 282, 682–689.
2. *Swerdlow H., Gesteland R.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 1415–1419.
3. *Luckey J.A. et al.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 4417–4421.
4. *Cohen A.S., Najarian D.R., Karger B.L.* // *J. Chromatogr.* 1990. V. 516. P. 49–60.
5. *Carrilho E. et al.* // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 3305–3313.
6. *Mathies R.A., Huang X.C.* // *Nature*. London, 1992. V. 359. P. 167–169.
7. *Huang X.C., Quesada M. A., Mathies R.A.* // *Anal. Chem.* 1992. V. 64. P. 2149–2154.
8. *Marsh M. et al.* // *Capillary Electrophoresis*. 1997. V. 4. P. 83–89.
9. *Venter J.C. et al.* // *Science*. 1998. V. 280. P. 1540–1542.
10. *Takahashi, S. et al.* // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1021–1026.
11. *Kheterpal I. et al.* // *Electrophoresis*. 1996. V. 27, N 12. P. 1852–1859.
12. *Mathies R.A., Peck K., Stryer L.* // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 1786–1791.
13. *Ueno K., Yeung E.S.* // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1424–1431.
14. *Quesada M.A., Zhang S.* // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. P. 1841–1851.
15. *Adams M.D., Fields C., Venter C.J.* *Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques*. San Diego: Academic Press, 1994.
16. *Hunkapiller T., Kaiser R.J., Koop B.F., Hood L.* // *Science*. 1991. V. 254. P. 59–67.
17. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977. V. 74. P. 5463–5467.
18. *Smith L.M. et al.* // *Nature*. 1986. V. 321. P. 674–679.
19. *Prober J.M. et al.* // *Science* 1987. V. 238. P. 336–341.
20. *Swerdlow H. et al.* // *Anal. Chem.* 1991. V. 63. P. 2835–2841.
21. *Li Q., Yeung E.S.* // *Appl. Spectrosc.* 1995. V. 49. P. 1528–1533.
22. *Williams D.C., Soper S.A.* // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3427–3432.
23. *Ju J. et al.* // *Anal. Biochem.* 1995. V. 231. P. 131–140.
24. *Ju J., Glazer A.N., Mathies R. A.* // *Nature Medicine*. 1996. V. 2. P. 246–249.
25. *Hung S.-C., Mathies R. A., Glazer A.N.* // *Anal. Biochem.* 1997. V. 252. P. 78–88.
26. *Woolley A.T., Mathies R.A.* // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 3676–3680.
27. *Wang, Y. et al.* // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 1197–1203.
28. *Wang Y. et al.* // *Electrophoresis*. 1997. V. 18. P. 1742–1749.
29. *Kheterpal I.U.L., Speed T.P., Mathies R.A.* // *Electrophoresis*. 1998. V. 9. P. 1403–1414.
30. *Metzker M.L., Lu J., Gibbs A.R.* // *Science*. 1996. V. 272. P. 1420–22.
31. *Lee L.G. et al.* // *Nucl. Acids Res.* 1997, V. 25. P. 2816–2822.
32. *Rosenblum B.B. et al.* // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4500–4504.
33. *Hung S.-C., Mathies R.A., Glazer A.N.* // *Anal. Biochem.* 1998. V. 255. P. 32–38.
34. *Ruiz-Martinez M.C. et al.* // *Anal. Chem.* 1993. V. 65. P. 2851–2858.
35. *Madabhushi R. S.* // *Electrophoresis*. 1998. V. 19. P. 224–230.
36. *Fung E.N., Yeung E.S.* // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 1913–1919.
37. *Gao Q., Yeung E.S.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 1382–1388.
38. *Ruiz-Martinez M.C. et al.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 1516–1527.
39. *Swerdlow H., Jones B.J., Wittwer C.T.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 848–855.
40. *Tan H., Yeung E.S.* // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. P. 664–674.
41. *Tan H., Yeung E.S.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 4044–4053.
42. *Schmalzing D. et al.* // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 2303–2310.
43. *Liu S., Shi Y., Ja W.W., Mathies R.A.* // *Anal. Chem.* 1999. V. 71. P. 566–573.
44. *Simpson P.C. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. V. 95. P. 2256–2261.
45. *Scherer J.R., Kheterpal I., Radhakrishnan A., Ja W.W., Mathies R.A.* // *Electrophoresis*. 1999. N 7. P. 1508–1517.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Материал поступил в редакцию 12.08.2002.

**HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS
AND MICROFLUIDIC CHIP-ANALYZERS.
I. INSTRUMENTS FOR HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY
ELECTROPHORESIS**

B. G. Belenkii, V. E. Kurochkin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

This two-part paper outlines the present approach to the method of capillary electrophoresis and its place among other methods of analytical chemistry, in particular, as compared to liquid chromatography. The most efficient instrumental embodiments of capillary electrophoresis are considered: from the Nanofor series instruments to microchips. The first part is devoted to classical realizations of high-performance capillary electrophoresis (HPCE), their applications, evolution of the method toward multicapillary electrophoresis stimulated by the problem of DNA decoding. An overview of sequencing techniques is given.