

УДК 543.426; 543.94; 543.865/.867

© М. Н. Сляднев, В. А. Казаков, М. В. Лаврова,
А. А. Ганеев, Л. Н. Москвин

МИКРОЧИПОВАЯ МУЛЬТИРЕАКТОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Статья посвящена разработке и оптимизации мультуреакторной микрочиповой системы для биохимического анализа с управлением температурными режимами с помощью Пельтье-элементов и с флуоресцентным детектором на основе ПЗС-матрицы и светодиода. Приведены результаты оптимизации топологии ячеек ввода проб микрочипа и оптимизированные условия модификации поверхности микрочипа для одновременного ввода нескольких проб, причем при объеме каждого микрореактора 250 нл для проведения реакции требуется всего 3–5 мкл смеси. Также получены характеристики режимов работы системы термоциклирования и поддержания температуры в микрореакторах. Подобраны условия пассивации поверхности микрореакторов для предотвращения ингибирования биохимических реакций. Продемонстрированы возможности созданной системы на примере проведения ПЦР в режиме реального времени в микрореакторах чипа и показано, что при начальном содержании целевой ДНК в пробе $\sim 10^4$ копий для получения положительной идентификации требуется всего 14 мин. Показано, что созданная система позволяет регистрировать кинетику биохимической реакции взаимодействия катехоламинов с красителем NBD-F, и приведены результаты изучения реакции дериватизации катехоламинов с образованием флуоресцирующих продуктов в микрореакторах чипа в зависимости от pH реакционной смеси и температуры.

ВВЕДЕНИЕ

Современная биохимическая и медицинская диагностика развивается по пути увеличения чувствительности и селективности анализа сложных проб, повышения экспрессности, производительности и достоверности анализа. Интегрированные микрочиповые системы привлекают повышенный интерес благодаря своим уникальным характеристикам по ускорению биохимических реакций, снижению расхода реагентов, уменьшению размеров аппаратуры, и повышению производительности анализа [1–5]. В настоящее время ведется активная разработка и применение новых микрочиповых систем для осуществления биохимических, энзиматических и иммуноферментных реакций [6, 7], реакций ДНК-гибридизации [8], полимеразно-цепной реакции (ПЦР) [9–12], разделения полиолигонуклеотидов и белков методом микроканального электрофореза (ЭФ) [13–14], что позволяет подойти к созданию нового класса микрочиповой аппаратуры, предназначенной для внедрения в медицинскую и лабораторную практику.

В области биохимического анализа существует множество приложений, когда необходимо точно поддерживать температуру образца, изменять ее определенным образом и при этом детектировать целевые продукты реакции. Как правило, большинство биохимических реакций требует не только поддержания определенной температуры, но и нередко термоциклирования, т. е. последователь-

ного нагрева и охлаждения образцов. Причем превышение заданного уровня может привести к необратимому разрушению реакционных компонентов, а неточная установка температуры или температурные неоднородности в реакторе — привести к невоспроизводимым и ненадежным результатам [15]. Одним из преимуществ применения микрочиповых систем для биохимических методов анализа является высокая скорость нагрева и охлаждения анализируемой смеси, возможность интегрирования как нагревательных элементов, так и термодатчиков непосредственно в микрофлюидном чипе [16].

Особый интерес подобные системы представляют для анализа молекул ДНК методом ПЦР, который используется в медицинской практике для диагностики различных заболеваний (таких как туберкулез, вирусный гепатит, инфекций, передающихся половым путем, онкологических и генных заболеваний), а также в научных исследованиях, таких как определение генома человека и идентификация личности [17]. При этом необходимость в быстрой идентификации ДНК вирусных и бактериальных инфекций требует развития все более экспрессных методов ПЦР-анализа.

Подобный микрочиповый биохимический анализатор с возможностью быстрого управления температурой микрореакторов может быть применен и для проведения других реакций, в частности энзиматических [6, 18] и иммуноферментных реакций [8, 19].

Настоящая статья посвящена разработке и оптимизации мультиреакторной микрочиповой системы для биохимического анализа с управлением температурными режимами с помощью Пельтье-элементов и с флуоресцентным детектором на основе ПЗС-матрицы и светодиода. Приведены результаты оптимизации топологии портов ввода микрочипа и системы ввода нескольких проб в микрореакторы, а также полученные характеристики режимов работы системы термоциклирования. Оптимизированы условия модификации поверхности микрочипа для ввода проб и для предотвращения ингибирования биохимических реакций. Продемонстрированы возможности созданной системы на примере проведения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в микрореакторах чипа, а также приведены результаты изучения кинетики дериватизации катехоламинов с образованием флуоресцирующих продуктов в микрореакторах чипа в зависимости от pH реакционной смеси и температуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворы и реактивы

Для проведения ПЦР использовали набор реагентов, в котором контрольным образцом является плазмида рUC-18 со вставкой фрагмента ядерной ДНК человека (Синтол). Приготовление реакционной смеси производили в ламинарном ПЦР-боксе (ЗАО "Ламинарные системы") по протоколу, рекомендуемому производителем. Общий объем приготавливаемой ПЦР-смеси составлял 50 мкл и содержал: 1×ПЦР-буфер, 0.25 мМ ДНТФ, 2.5 мМ MgCl₂, 0.25 пмоль/мкл смеси праймеров, 0.05 Е/мкл ДНК полимеразы, 100× раствор SYBR Green I (BioRad), 5×10⁵ копий/мкл контрольной ДНК. Объем пробы, вносимый в каждый микрореактор, составлял 3.5–5 мкл на каждый порт ввода. Протокол термоциклирования ПЦР-смеси на стандартном оборудовании в полипропиленовых пробирках, рекомендуемый производителем: прогрев 90 с при 95 °С, а затем 45 циклов: 95 °С — 15 с, 61 °С — 50 с.

Для проведения химической модификации поверхности микрочипа использовались: 50 % (по объему) раствор дихлордиметилсилана (DCDMS) в безводном толуоле; 20 % (по весу) раствор хлордиметилоктадецилсилана (CDMOS) (ACROS Organics) в безводном толуоле. Методика модификации поверхности ячеек ввода проб и микрореакторов детально описана в [20]. Также для пассивации использовался водный раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA, Диалат) — 0.5 мкг/мкл в конечной ПЦР-смеси.

Для вспомогательных работ использовались: этиловый спирт, декан, гептан эталонный,

о-ксилол, полидиметилметилсоксановая жидкость высокой вязкости (10 000 сП); все реактивы отечественного производства, квалификации не ниже "х.ч.". Перед проведением ПЦР эти реактивы фильтровались через мембранный фильтр (ФМ АЦ-1,2, диаметр пор ~1.2 мкм) и подвергались обработке УФ-лампой в ПЦР-боксе.

Для проведения дериватизации катехоламинов использовали растворы 4-фтор-7-нитро-2,1,3-бензоксодиазола, NBD-F (Molecular Probes) в безводном ректифицированном ацетонитриле ($C_{\text{NBD-F}} = 3.55$, или 13.7 мМ). Растворы готовили растворением точной навески реагента в 1 мл ацетонитрила и использовали в течение рабочего дня.

Исходные концентрированные растворы норадреналина ($C_{\text{NA}} = 1.080 \times 10^{-3}$ М), адреналина ($C_{\text{A}} = 1.88 \times 10^{-3}$ М) и дофамина ($C_{\text{DA}} = 2.030 \times 10^{-3}$ М) готовили растворением точных навесок катехоламинов в бидистиллированной воде. Растворы хранили при +4 °С и использовали в течение двух дней. Рабочие растворы катехоламинов готовили перед измерениями разбавлением исходных 12 мМ боратным буферным раствором (pH 7.5, 8.0, 8.5, 9.0). При проведении измерений концентрация норадреналина в рабочих растворах находилась в диапазоне $5 \times 10^{-6} \div 4 \times 10^{-5}$ М; адреналина — в диапазоне $5 \times 10^{-6} \div 5 \times 10^{-5}$ М; дофамина — в диапазоне $5 \times 10^{-6} \div 3 \times 10^{-5}$ М.

Экспериментальная установка

Топология разработанного микрочипа, его габаритные размеры и геометрия порта ввода пробы показаны на рис. 1. Микроканалы и микрореакторы были изготовлены методом анизотропного химического травления кремниевых пластин, толщиной 380 мкм (МИЭТ). Ширина микроканалов составила 170–200 мкм, а глубина 120–140 мкм (рис. 1, а). Вскрытие сквозного отверстия для доступа к каналам производили с обратной стороны кремниевой пластины. Площадь каждой из ячеек ввода составляла 2.0 × 2.0 мм, при глубине травления до 200 мкм (рис. 1, б). Расстояние между входными отверстиями было задано 4.5 мм, что соответствует формату стандартного планшета на 384 лунки. Как показано на рис. 1, в зоне термоциклирования каналы, постепенно уширяясь, образуют микрореакторы с размерами 1.5 × 1.0 мм и глубиной 200 мкм каждый. Объем микрореакторов составил 250 нл. Выходные каналы микрореакторов объединены в общий выходной канал, который соединен с выходным отверстием. После травления к кремниевой пластине со стороны микрореакторов и каналов припекали покровную пластину стекла Ругех толщиной 1 мм.

Микрочиповая система состоит из трех основных блоков: системы возбуждения и детектирования флуоресцентного излучения, блока ввода проб

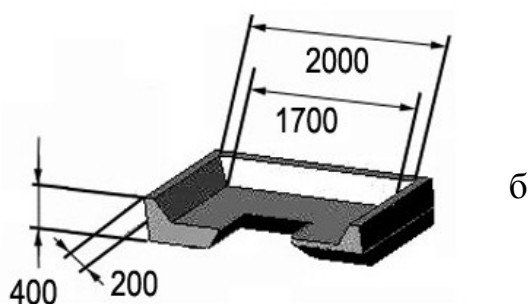
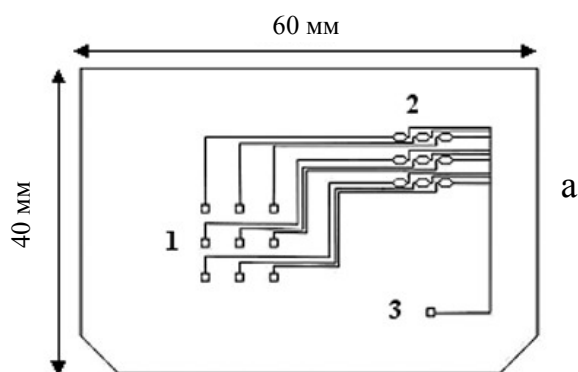


Рис. 1. Стеклокремниевый микрочип: а — топология; б — разрез ячейки ввода (размеры указаны в мкм). 1 — зона 9-ти портов ввода; 2 — зона 9-ти микрореакторов (зона термостатирования); 3 — выходной канал и отверстие

и системы поддержания и контроля температуры.

Система флуоресцентного детектирования аналогична описанной в статье [21], за исключением используемой камеры. В качестве детектора флуоресцентного излучения была выбрана камера (Electron-Optronic) на основе термоэлектрически охлаждаемой ПЗС-матрицы (до -10°C). Камера обеспечивает цифровую передачу изображения в ПЭВМ с разрядностью 12 бит при разрешении изображения 752×582 пикселей, а также управление режимами камеры (температурой, экспозицией 0.16–5 с, усилением сигнала) через последовательный порт. Программа обработки изображения производит усреднение нескольких кадров, полученных с камеры, вычитание фонового кадра, а затем по заранее созданной маске вычисляет среднее значение интенсивности для каждого микрореактора по всем пикселям, относящимся к нему. Полученные интенсивности использовались в качестве аналитического сигнала как для построения ПЦР-кривых в координатах "интенсивность флуоресценции"—"число циклов" и нахождения поро-

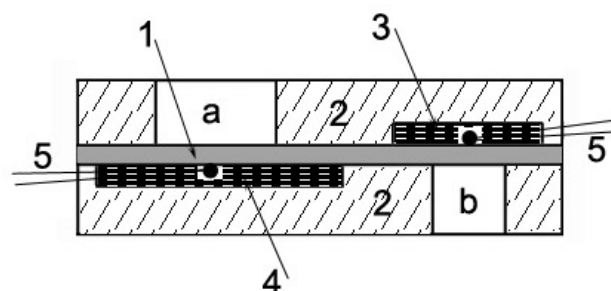


Рис. 2. Система нагрева и контроля температуры микрочипа. 1 — микрочип, 2 — пластиковый держатель, 3 — верхний пельтье-элемент, 4 — нижний пельтье-элемент, 5 — термопары. Зона а — ячейки ввода пробы, зона б — микрореакторы

гового цикла (при котором происходит превышение аналитического сигнала от ПЦР-продукта над пороговым значением), так и для изучения кинетических зависимостей и оптимизации реакции катехоламинов с NBD-F.

В созданной системе термостатирования и контроля температуры микрочип нагревался с помощью двух пельтье-элементов (Криотерм). Верхний пельтье-элемент размером 2×2 см располагался над зоной 9-ти микрореакторов со стороны кремниевой пластины микрочипа; нижний пельтье-элемент размером 3×3 см располагался со стороны стеклянной пластины микрочипа в 5 мм от крайнего ряда микрореакторов. Оба пельтье-элемента закреплены в пластиковый держатель (рис. 2), который состоял из верхней и нижней частей, механически прижимаемых друг к другу. Микрочип помещали на нижнюю часть держателя стеклянной стороной вниз, причем микрореакторы находились на оптической оси системы детектирования, после чего сверху прижимали верхнюю часть держателя. Контроль температуры осуществляли с помощью 2 термопар К-типа (RS Company) с толщиной спая ~ 200 мкм. Термопары размещались на обращенной к поверхности чипа стороне каждого пельтье-элемента. Калибровку термопар проводили с использованием платиновых термодатчиков, а во время работы постоянно вводили поправку на температуру холодного спая термопар, чтобы учесть изменение его температуры в процессе работы установки, при этом точность измерения температуры составляла 0.2°C . Сигналы от термопар подавались на контроллер, который по PID-алгоритму управлял мощностью пельтье-элементов при помощи специально разработанной программы, выполняющей заданный протокол термостатирования (для ПЦР) или термостатирования (для биохимических реакций). В режиме термостатирования при переходе от высокой

температуры к низкой пельтье-элементы обратимо включались в режим охлаждения.

Ввод проб осуществлялся шприцевым насосом [21], который с помощью тайгонового шланга и микрофлюидного фитинга соединялся с выходным отверстием микрочипа [20]. После предварительного заполнения микрореакторов деканом с помощью дозатора последовательно помещали в каждую ячейку ввода 3.5–5 мкл смеси, и пробы вводились в микрореакторы с помощью шприцевого насоса, работающего в режиме откачки со скоростью 1–2 мкл/с. После ввода проб проводилась герметизация чипа для предотвращения испарения жидкости, используя полидиметилсилоксановую жидкость и пластины силиконовой резины, которые механически прижимались к микрочипу в зонах ввода образцов и выходного отверстия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ ДНК методом ПЦР в режиме реального времени

Существующие на данный момент классические методы проведения ПЦР в полипропиленовых пробирках, нагреваемых контактным способом, характеризуются длительной процедурой полного анализа (2–4 часа), что связано с большой термической массой нагреваемых и охлаждаемых блоков. Малая скорость изменения температуры во время цикла амплификации не только увеличивает общее время анализа, но и может приводить к появлению продуктов побочных реакций и уменьшению выхода целевого продукта, т. е. к ложноположительным и ложноотрицательным результатам. При этом для классической методики ПЦР, в которой проводится разделение размноженных фрагментов ДНК с помощью метода гель-электрофореза с флуоресцентным детектированием [12, 22], и который выполняется за дополнительные 1–1.5 часа и требует использования ручных операций по переносу проб, увеличивается вероятность ошибки оператора и кросс-контаминации образцов.

Одним из путей сокращения времени термоциклирования является проведение ПЦР в микрореакторах микрочипов, термическая масса которых на 2–3 порядка меньше по сравнению с нагревательными блоками, применяемыми в стандартном оборудовании [16].

Дополнительно: использование метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), при котором увеличение количества флуоресцирующих продуктов реакции регистрируется непосредственно во время реакции, позволяет еще больше повысить экспрессность анализа [23]. В подобном варианте ПЦР время, затрачиваемое на получение результата (т. е. на заключение о присутствии или

отсутствии в пробе анализируемых ДНК-фрагментов), будет определяться только временем термоциклирования до достижения порогового значения аналитического сигнала. При этом обеспечиваются условия, препятствующие прямому контакту продуктов ПЦР с оператором, и минимизируется риск кросс-контаминации.

Несмотря на активные исследования в области микрочиповых систем ПЦР, до сих пор остается ряд нерешенных вопросов, таких как модификация поверхности микрореакторов для предотвращения сорбции компонентов реакционной смеси и предотвращения ингибирования реакции [22–25], ввод пробы в микрореакторы чипа [10] и, кроме того, по нашим данным, пока не была продемонстрирована микрочиповая система, способная выполнить ПЦР для нескольких образцов на одном микрочипе с детектированием ДНК-фрагментов в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР в микрореакторах чипа нами были использованы стеклянно-кремниевые микрочипы, так как именно это сочетание материалов дает возможность увеличить скорость нагрева (высокие коэффициенты теплопроводности кремния) и проводить флуоресцентное детектирование целевого продукта в режиме реального времени сквозь оптически прозрачное стекло. При разработке топологии микрочипа были приняты меры для устранения возможного взаимного перемешивания в зоне ввода проб. Конфигурация ячеек зоны ввода создавалась из расчета возможности введения до 10 мкл пробы в каждую ячейку. Оптимальная геометрия ячейки зоны ввода показана на рис. 1, б; в подобной ячейке площадь резервуара, в который помещается проба, увеличена по отношению к площади отверстия доступа к микроканалу, что препятствует растеканию пробы даже при больших объемах вводимой жидкости [20]. Кроме того, для достижения большей устойчивости капель на поверхности ячеек ввода была проведена химическая модификация поверхности кремния растворами DCDMS и CDMOS. В результате была получена гидрофобная поверхность с контактным углом смачивания 85–90° (система вода/кремний/воздух), что значительно превышает контактный угол необработанного кремния (45–50°) [20]. Положительный эффект от гидрофобизации поверхности позволяет вводить большие объемы проб (до 8 мкл на ячейку), практически исключив возможность их взаимного перемешивания, как показано на вставке в рис. 3 (а, б), до и после проведения модификации.

В экспериментах с микрочипами, заполненными раствором родамина-В с помощью метода бесконтактного измерения температуры по тушению флуоресценции красителя [18], были установлены характерные скорости нагрева и охлаждения раствора в микрореакторах; они составили: 7.2 °C/с

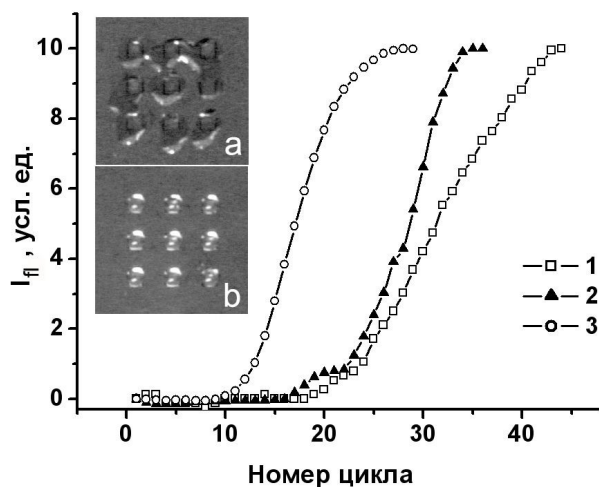


Рис. 3. Кривые ПЦР-РВ для разных способов модификации поверхности: 1 — CDMOS, BSA на поверхности микрореактора; 2 — CDMOS, BSA в ПЦР смеси; 3 — CDMOS и DCDMS, BSA в ПЦР-смеси

и 4.5 °C/c соответственно. Экспериментально также было получено, что значение температуры, измеренной с помощью термопары, помещенной на активной стороне верхнего пельтье-элемента, хорошо коррелирует со значением температуры, измеренной бесконтактным способом, что связано с высокими коэффициентами теплопроводности кремния. Такие характеристики обусловлены высокой теплопроводностью кремния и малой термической массой нагреваемого микрочипа [18, 26], а малая глубина микрореактора (200 мкм) позволяет быстро выровнять термические градиенты [15, 27]. Полученные высокие скорости проведения процессов термоциклирования способствуют повышению специфичности ПЦР за счет снижения вероятности возникновения побочных продуктов реакции во время перехода между температурными уровнями [27] и позволяют уменьшить время проведения ПЦР до 15–25 минут при времени одиночного цикла ~60 с. Отметим, что дальнейшее повышение скоростей термоциклирования до 20–40 °C/c возможно при изготовлении чипа, интегрированного с нагревательными элементами и термодатчиками [28].

Основываясь на полученных результатах, был оптимизирован температурный протокол для проведения ПЦР в микрочипе, который отличается от рекомендуемого производителем по времени удержания температуры на каждом этапе ПЦР. Оптимальным был признан протокол: прогрев — 90 с при 95 °C, термоциклы 95 °C — 5 с, 61 °C — 30 с, т. е. общее время, затрачиваемое на термо-

циклирование, сокращается в 2 раза по сравнению со стандартным протоколом. Сравнительные эксперименты показали, что уменьшение времени по сравнению с рекомендованными режимами не сказывается на эффективности реакции, что, по-видимому, связано с высокой однородностью температуры в микрореакторе и более быстрым достижением такой однородности по сравнению с пробирочным вариантом ПЦР.

Используя оптимизированный протокол, в микрочиповой системе была проведена оптимизация методики пассивации поверхности микрореакторов для предотвращения необратимой сорбции компонентов ПЦР-смеси и деактивации фермента полимеразы. Известно, что при переходе от обычных макросистем к микрочиповым системам многократно увеличивается отношение (SVR) площади поверхности к объему [22], и вклад поверхностных явлений значительно возрастает; например, в микрореакторе $SVR_{chip} = 88 \text{ см}^{-1}$, в то время как для обычных полипропиленовых пробирок $SVR_{com} = 10 \text{ см}^{-1}$. Для предотвращения сорбции использовали комбинацию статической и динамической пассивации [16]. Как показали первоначальные исследования, при отсутствии модификации поверхности не наблюдается возрастания флуоресценции в микрореакторе даже после 50 циклов проведения ПЦР, что говорит об ингибировании реакции. В дальнейшем, были проведены ПЦР-эксперименты в микрочипах, предварительно модифицированных силанизирующими агентами CDMOS и DCDMS или раствором BSA, а в ПЦР смесь был введен динамический пассиватор BSA ($C = 0.5 \text{ мкг/мл}$).

Полученные в микрочиповой системе результаты ПЦР-РВ для разных способов пассивации поверхности микрореакторов представлены на рис. 3. Как видно из рисунка, при использовании сочетания CDMOS и BSA на поверхности микрореактора, пороговое значение (1.5) превышает на 25 цикле. При использовании CDMOS и BSA в ПЦР-смеси сигнал флуоресценции превышает пороговое значение на 25 цикле, а при комбинированной модификации DCDMS и CDMOS, BSA в ПЦР-смеси пороговое значение превышает уже на 14 цикле. Методы 1 и 2 дают близкие результаты, однако наибольшей эффективности ПЦР в микрочипе удалось достичь для метода 3. Подобные наблюдения связаны, по-видимому, с меньшей стабильностью и плотностью поверхностного слоя CDMOS и его вероятной деградацией в течение термоциклирования, в то время как DCDMS создает более устойчивое и плотное покрытие, что согласуется с данными работы [22]. В наших экспериментах сочетание статического пассивирования реагентами CDMOS и DCDMS с динамическим пассиватором BSA признано оптимальным для кремниевых микрореакторов.

Как видно из рис. 3, большие скорости термоденатурации, достигнутые на микрочипе, в сочетании с детектированием продуктов в режиме реального времени позволяют суммарно уменьшить время, затрачиваемое на проведение ПЦР в целом. Для детектирования фрагмента ядерной ДНК человека при начальном содержании целевой ДНК в пробе 10^4 копий на проведение ПЦР затрачивается всего 14 мин, что в 4–8 раз быстрее, чем по классическим ПЦР-методикам на стандартном оборудовании. Полученные пороговые циклы соизмеримы с результатами, получаемыми в подобных микрочиповых ПЦР-системах [29]. Также отметим, что, хотя необходимы дальнейшие эксперименты по снижению начальной концентрации ДНК в микрореакторе, видно, что созданная система обладает эффективностью, близкой к получаемой на стандартном ПЦР-оборудовании, и, следовательно, можно ожидать снижения начальной концентрации ДНК в 100–1000 раз.

Оптимизация условий проведения дериватизации катехоламинов с реагентом NBD-F

Катехоламины (КА) являются в организме человека гормонами надпочечников. Они играют важную роль в процессе обмена веществ в организме человека, регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, функции гладкой мускулатуры, свертывании крови, регуляции острых адаптивных реакций организма. Наибольшее биологическое значение среди них имеют три соединения: дофамин, норадреналин, адреналин, — которые по своему химическому строению являются предшественниками друг друга в процессе их биосинтеза в организме человека [30].

Определение концентрации КА и их метаболитов в биологических образцах является актуальной задачей и имеет важное практическое значение для клинической диагностики таких заболеваний, как феохромоцитомы, нейроblastомы, ганглиомы и др. [31]. Наиболее часто для определения КА используют иммунологические методы или высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ) с УФ, флуоресцентным, электрохимическим или масс-спектрометрическим детектированием [31–37].

При определении КА методом ВЭЖХ (КЭ) с флуоресцентным детектированием требуется проведение пред- или постколоночной стадии дериватизации для образования флуоресцирующих аналитов. КА образуют флуоресцирующие продукты с рядом реагентов, при этом, как правило, наблюдается синяя флуоресценция аналитов [38–39]. Однако при взаимодействии КА с NBD-F образуются продукты, максимум флуоресценции которых приходится на зеленую область спектра (515–

540 нм), а в качестве источников возбуждения можно применять светодиоды, излучающие в области 450–490 нм [32], или лазеры, например широко распространенный аргоновый лазер ($\lambda_{em} = 488$ нм). Реагент NBD-F [40], помимо применения для анализа КА, используют для предколоночной дериватизации аминокислот [41], белков [42], пептидов [43]. К недостаткам этого высокочувствительного группового реагента можно отнести: протекание конкурирующей реакции гидролиза в щелочной среде с образованием флуоресцирующего соединения, достаточно медленную кинетику взаимодействия реагента с реакционными гидроксидными и аминными группами определяемых соединений, а также относительную дороговизну этого соединения. Поэтому с точки зрения расхода малых количеств реагента нам представлялось привлекательным оптимизировать проведение дериватизации КА в микрореакторах чипа (рис. 1), для которого объем вводимой пробы составляет всего несколько микролитров. Целью данного этапа работы являлось изучение и оптимизация условий протекания реакции NBD-F с КА, используя созданную микрочиповую систему с флуоресцентным детектированием.

Дофамин (DA), норадреналин (NA) и адреналин (A) взаимодействуют с реагентом NBD-F по аминной группе и двум гидроксигруппам пирокатехина с образованием продуктов, квантовый выход флуоресценции которых в ацетонитриле составляет соответственно 0.1475 (DA), 0.4116 (NA) и 0.2016 (A) [32]. Поэтому наиболее привлекательным представлялось проводить оптимизацию условий протекания дериватизации на примере взаимодействия NBD-F с NA.

В ходе проведения анализа реакционную водно-ацетонитрильную смесь готовили непосредственно перед проведением измерений смешиванием равных объемов свежеприготовленного боратного буферного раствора NA и свежеприготовленного ацетонитрильного раствора NBD-F на минисекционированной центрифуге. Объем распыляемой на поверхность микрочипа реакционной смеси для ввода в микрореакторы при проведении измерений составлял 4 мкл/реактор. Время экспозиции кадра изображения установки флуоресцентного детектирования находилось в диапазоне 0.16–0.48 с.

Реакция взаимодействия КА с NBD-F по своему механизму относится к реакциям нуклеофильного замещения (S_N2). При этом, исходя из значений констант кислотной диссоциации КА по различным функциональным группам [44], молекулы КА становятся способными к нуклеофильной атаке молекул NBD-F при pH среды выше 7.

Для оптимизации условий протекания реакции проводили измерения интенсивности флуоресценции реакционной водно-ацетонитрильной смеси с разным значением pH и при различных темпера-

турах в микрореакторах чипа в зависимости от времени протекания реакции, как показано на вставке рис. 4, а. При этом учитывали вклад флуоресцирующего продукта гидролиза NBD-F (NBD-OH) в общий аналитический сигнал, который, как видно из вставки рис. 4, а (кривая 1), образовывался медленнее основного продукта (кривая 2).

На рис. 4, а показано изменение сигнала флуоресценции продуктов реакции (NBD-NA) в зависимости от pH реакционной среды для различных времен протекания реакции при комнатной температуре ($T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Как видно из рисунка, оптимальным по эффективности протекания реакции являлся диапазон pH от 8.3 до 8.6. При pH меньше 7.7 наблюдали значительное уменьшение выхода реакции, так как нуклеофильное замещение проходит эффективнее при более высоких pH; а при pH порядка 9.0 и выше происходило образование больших количеств NBD-OH и достаточно быстрое окисление NA в растворе кислородом воздуха. В области $\text{pH}>8$ подобные результаты в целом согласуются с данными работы [32], а уменьшение выхода реакции при $\text{pH}<8$, по-видимому, может быть связано с влиянием поверхности микрореактора на реакцию, например сорбция компонентов

реакции, которая может увеличиваться с понижением pH. Подобные эффекты наблюдались и для энзиматических реакций [6], и при проведении ПЦР (см. выше). По-видимому, требуется дальнейшее изучение этих эффектов, и пассивации поверхности, как и в случае с проведением ПЦР, должно быть уделено значительное внимание в рамках отдельного исследования.

На рис. 4, б показано изменение сигнала флуоресценции NBD-NA в зависимости от температуры смеси при pH реакционной среды 8.0. При этом микрочип, заполненный реакционной смесью и предварительно герметизированный для предотвращения испарения смеси, помещали на нагревательную платформу с поддержанием заданной температуры, как описано выше. Как видно из рисунка, повышение температуры от 20 до $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ способствовало ускорению протекания реакции. При этом значительное ускорение побочной реакции гидролиза NBD-F наблюдали при температуре порядка $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и выше. Оптимальным температурным режимом проведения реакции дериватизации NA, таким образом, была признана температура $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакция дериватизации в этих условиях практически полностью проходила за 3–4 минуты с момента смешивания растворов.

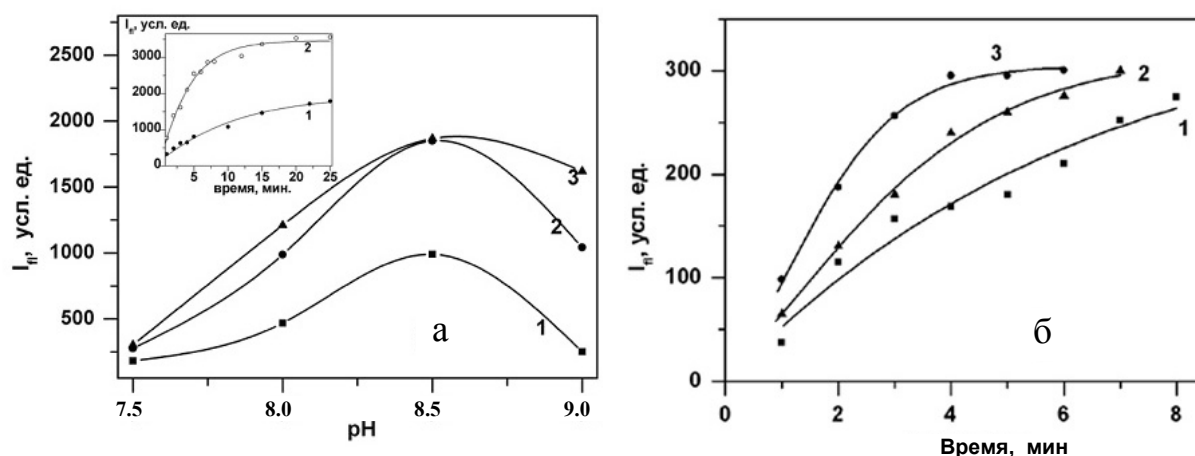


Рис. 4. Оптимизация условий протекания реакции норадреналина (NA) с 4-фтор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолом (NBD-F) в микрореакторах чипа в зависимости от pH (а) и от температуры (б). а: время реакции 1 — $t_R = 3$ мин, 2 — $t_R = 10$ мин, 3 — $t_R = 20$ мин; температура реакционной смеси $T_R = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вставка: зависимость аналитического сигнала от времени при $\text{pH} = 8.5$; кривая 1 — гидролиз NBD-F; кривая 2 — реакция взаимодействия NA с NBD-F при одновременном гидролизе NBD-F. б: температура реакционной смеси ($\text{pH} = 8.0$) 1 — $T_R = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 — $T_R = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 — $T_R = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакционная смесь: P1:P2=1:1 (V/V), P1 — 12 мМ боратный буферный раствор NA ($C_{\text{NA}} = 7.2 \times 10^{-5}$ М), P2 — 3.55 мМ ацетонитрильный раствор NBD-F

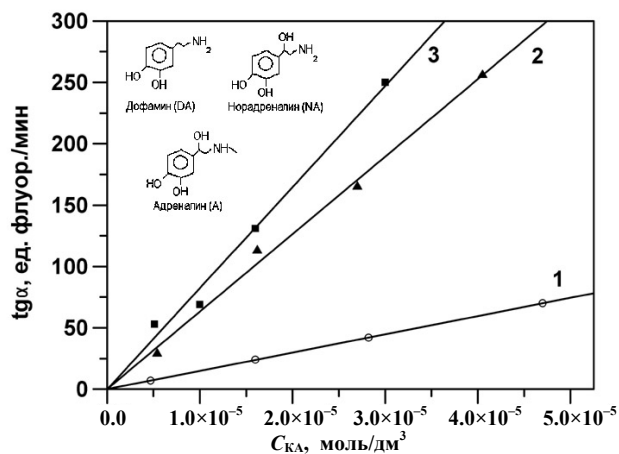


Рис. 5. Калибровочные зависимости скорости возрастания аналитического сигнала от концентрации катехоламина в растворе (метод тангенсов) в микрореакторах чипа: 1 — адреналин, 2 — норадреналин, 3 — дофамин. Условия проведения реакции: температура $T_R = 22^\circ\text{C}$, время $t_R = 2$ мин, pH 8.5. Реакционная смесь: P1:P2 = 1:1 (V/V); P1 — 12 мМ боратный буферный раствор катехоламина; P2 — 13.7 мМ ацетонитрильный раствор NBD-F

На рис. 5 показана зависимость скорости образования флуоресцирующих продуктов дериватизации NA, A и DA от их концентрации в реакционной смеси в начальный момент времени (2 минуты с момента смешивания растворов). Реакцию дериватизации в микрореакторах чипа проводили при температуре $T_R = 22^\circ\text{C}$ и pH смеси 8.5. Калибровочные зависимости были построены по методу нахождения тангенсов углов наклона по данным кинетических измерений интенсивностей флуоресценции продуктов NBD-A, NBD-NA и NBD-DA за вычетом вклада сигнала от гидролиза NBD-F. При этом для всех рабочих концентраций A, NA и DA в смеси зависимость аналитического сигнала от времени носила линейный характер (для $t_R = 2$ мин). Как видно из рисунка, флуоресцентный сигнал при реакции NBD-F с различными КА возрастает с разной скоростью. По углу наклона построенных зависимостей и с учетом значений квантовых выходов флуоресценции продуктов NBD-A, NBD-NA и NBD-DA [32, 45] можно сделать оценки скоростей взаимодействия A, NA и DA с реагентом NBD-F. На основании полученных результатов: DA реагировал с NBD-F быстрее, чем NA, в 3 раза и быстрее, чем A, в 7 раз. Наблюдаемые различия в скоростях можно объяснить химическим строением молекул КА: по-

видимому, адреналин медленнее вступает в реакцию из-за наличия метильного заместителя у аминогруппы, а NA реагирует медленнее DA из-за наличия OH-группы в этой цепи, как видно из структур, представленных на рис. 5. Как показано в работе [32], именно взаимодействие NBD-F с аминогруппой приводит к образованию флуоресцирующего продукта, в то время как реакция по пирокатехиновым гидроксигруппам катехоламинов дает нефлуоресцирующие соединения.

В целом, с помощью созданной установки проведена оптимизация протекания реакции КА с NBD-F в микрореакторах чипа и показана возможность использования подобной системы для биохимического анализа по кинетике образования целевого продукта даже при протекании побочных реакций.

ВЫВОДЫ

Разработана и создана биоаналитическая система, позволяющая проводить температурно-контролируемые биохимические реакции с одновременным детектированием в 9-реакторном стеклянно-кремниевом микрочипе. Была проведена оптимизация топологии ячеек ввода микрочипа и создана система одновременного ввода нескольких проб; причем при объеме каждого микрореактора 250 нл для проведения реакций требуется всего 3–5 мкл смеси. Созданная система флуоресцентного детектирования на основе охлаждаемой ПЗС-матрицы позволяет регистрировать как динамику ПЦР, используя интеркалирующий краситель SYBR Green, так и кинетику биохимической реакции взаимодействия КА с красителем NBD-F.

Высокие скорости термоциклирования и малый температурный градиент в микрореакторах чипа привели в результате к успешному проведению ПЦР при времени, затрачиваемом на один термоцикл, всего 60 секунд. В работе показано, что при использовании в качестве статического пассиватора сочетания CDMOS и DCDMS и динамического пассиватора BSA можно предотвратить сорбцию компонентов смеси и эффективно провести ПЦР при начальном содержании целевой ДНК в пробе 10^4 копий; при этом для получения положительного результата затрачивается всего 14 мин.

Возможность точно управлять температурой в микрореакторах была использована для оптимизации протекания реакции КА с NBD-F в микрореакторах чипа, а одновременное детектирование продуктов реакции позволило изучить кинетику образования целевого продукта при протекании побочных реакций, что в перспективе может быть использовано для применения подобной системы в различных областях биохимического анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cheng J., Kricka L.J. // *TIBTECH*. 1999. V. 17. P. 465–468.
2. Huikko K., Kostianen R., Kotiaho T. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003. V. 20. P. 149–171.
3. Бельский Б.Г. // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 3. С. 26–31.
4. Бельский Б.Г. // Клиническая лабораторная диагностика. 2001. № 4. С. 25–37.
5. Сляднев М.Н. // Партнеры и конкуренты. 2003. № 6. С. 26.
6. Tanaka Y., Slyadnev M.N., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. // *J. Chromatography. A*. 2000. V. 894. P. 45–51.
7. Trau D., Lee T.M.H., Lao A.I.K., Lenigk R., Hsing I.-M., Ip N.Y., Carles M.C., Sucher N.J. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. P. 3168–3173.
8. Eteshola E., Balberg M. // *Biomedical Micro-devices*. 2004. V. 6, № 1. P. 7–9.
9. De Mello A.J. // *Nature*. 2003. V. 422. P. 28–29.
10. Giordano B.C., Ferrance J., Swedberg S., Huhmer A.F.R., Landers J.P. // *Analytical Biochemistry*. 2001. V. 291. P. 124–132.
11. Lagally E.T., Medintz I., Mathies R.A. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 565–570.
12. Nagai H., Murakami Y., Morita Y., Yokoyama K., Tamiya E. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 1043–1047.
13. Евстратов А.А., Буляница А.Л., Курочкин В.Е., Петряков А.О., Рудницкая Г.Е., Сальникова Т.А., Алексеев Я.И. // *Журнал аналитической химии*. 2004. Т. 59, № 6. С. 587–593.
14. Lacher N.A., de Rooij N.F., Verpoorte E., Lunte S.M. // *J. Chromatography*. 2003. V. 1004, N 1-2. P. 225–235.
15. Landers James P., Hunner A., Oda Robert P., Craighead James R. // US Patent Number US6413766 (B2), 02.07.2002.
16. Kricka L.J., Wilding P. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 820–825.
17. Mullis K.B., Ferre F., Gibbs R.A. (Eds.). *The polymerase Chain Reaction*. Boston (MA): Birkhauser, 1994. 550 p. (P. 14–37).
18. Slyadnev M.N., Tanaka Y., Tokeshi M., Kitamori T. // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 4037–4044.
19. Sato K., Hibara A., Tokeshi M., Hisamoto H., Kitamori T. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003. V. 55. P. 379–391.
20. Kazakov V.A., Lavrova M.V., Ganeev A.A., Slyadnev M.N. // *Anal. Sci.* 2005. V. 21, N 4. P. 293. (в печати).
21. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Щербяева М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. // *Журнал аналитической химии*. 2005. Т. 60, № 4. С. 357–367.
22. Felbel J., Beiber I., Pippner I., Kochler J.M. // *Chemical Engineering Journal*. 2004. V. 101. P. 333–338.
23. Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. // *Nucleic Acid Research*. 1996. V. 24, N 2. P. 380–385.
24. Lee T.M.H., Hsing I.-M., Lao A.I.K., Carles M.C. // *Analytical Chemistry*. 2000. V. 72. P. 4242–4247.
25. Khandurina J., McKnight T.E., Jacobsen S.C., Waters L.C., Foote R.S., Ramsey M.J. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 2995–3000.
26. Wolley A.T., Hadley D., Landre P., DeMello A., Mathies R.A., Northrup M.A. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 4081–4086.
27. Oda R.P., Strausbauch M.A., Huhmer A.F.R., Borson N., Jurrens S.R., Craighead J., Wettstein R.J., Eckloff B., Kline B., Landers J.P. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 4361–4368.
28. Yoon D.S., Lee Y.-S., Lee Y., Cho H.J., Sung S.W., Oh K.W., Cha J., Lim G. // *J. Micromech. Microeng.* 2002. V. 12. P. 813–823.
29. Ibrahim M.S., Loftis R.S., Jachrling P.B., Henschel E.A., Weedn V.W., Northrup M.A., Belgrader P. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 2013–2017.
30. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с.
31. Chen D.-C., Zhan D.-Z., Cheng C.-W., Liu A.-C., Chen C.-H. // *J. Chrom. B*. 2001. V. 750. P. 33–39.
32. Zhu X., Shaw P.N., Barrett D.A. // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 478. P. 259–269.
33. Volin P. // *J. Chrom. B*. 1994. V. 655. P. 121–126.
34. Карцова Л.А., Сидорова А.А., Казаков В.А., Бессонова Е.А., Яшин А.Я. // *Журнал аналитической химии*. 2004. Т. 59, № 8. С. 826–832.
35. Nohta H., Jeon H.K., Kai M., Ohkura Y. // *Anal. Sci.* 1993. V. 9. P. 53–59.
36. Peterson Z.D., Collins D.C., Bowerbank C.R., Lee M.L., Graves S.W. // *J. Chrom. B*. 2002. V. 776. P. 221–229.
37. Казаков В.А., Сляднев М.Н., Сидорова А.А., Карцова Л.А., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. // *Научное приборостроение*. 2004. Т. 14, № 1. С. 33–44.
38. Gilman S.D., Ewing A.G. // *Anal. Chem.* 1995. V. 67. P. 58–63.
39. Wei J., Gostkowski M., Gordon M.J., Shear J.B. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70, N 16. P. 3470–3475.
40. Imai K., Watanabe J. // *Anal. Chim. Acta*. 1981. V. 130. P. 377–382.
41. Hu S., Li C.H. // *J. Chromatogr. A*. 2000. V. 876. P. 183–187.
42. Wise E.T., Singh N., Hogan B.L. // *J. Chromatogr. A*. 1996. V. 746. P. 109–112.
43. Kanazawa H., Nagatsuka T., Miyazaki M.,

- Matsushima Y.* // J. Chromatogr. A. 1997. V. 763. P. 23–27.
44. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика / Перевод с англ. В.Л. Друцы и О.Н. Королевой. М., 1991. 539 с.
45. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Section 1.8: Reagents for Analysis of Low Molecular Weight Amines. Molecular Probes Company. (www.probes.com).

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет (Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н.)

НПФ АП "Люмэкс", Санкт-Петербург (Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А.)

Материал поступил в редакцию 21.03.2005.

MICROCHIP MULTIREACTOR SYSTEM FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS

**M. N. Slyadnev^{1,2}, V. A. Kazakov^{1,2}, M. V. Lavrova^{1,2},
A. A. Ganeev^{1,2}, L. N. Moskvin¹**

¹*St. Petersburg State University, Dept. of Chemistry*

²*Lumex Ltd., St. Petersburg*

This paper is concerned with development and optimization of a microchip system for biochemical analysis using a CCD-based fluorescent detector with temperature control of multiple samples in microreactors using Peltier elements. The topology of microchip injection ports was optimized along with the surface modification conditions to achieve simultaneous 3–5 μL samples introduction into microreactors of 250 nL. Surface passivation was performed to improve biocompatibility of the microreactors. Thermocycling characteristics of the system were obtained and the real-time PCR was performed in 14 minutes for 10^4 initial DNA copies. The system was capable to monitor the kinetics of the biochemical reaction of catecholamines with the fluorogenic dye NBD-F and optimization of reaction conditions (temperature, pH) was performed.