
**Материалы научного семинара
МИКРОЧИПОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

УДК 543.42; 543.94; 543.545; 57.08

ã М. Н. Сляднев, М. В. Лаврова, М. А. Еркин,
Д. В. Новолоцкий, А. В. Крисько, А. А. Ганеев

**МОДИФИЦИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ МИКРОРЕАКТОРОВ
МИКРОФЛЮИДНОГО ЧИПА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Статья посвящена оптимизации микрофлюидной аналитической системы (МФАС), предназначенной для осуществления полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в стекляннo-кремниевом микрочипе, содержащем 16 микрореакторов объемом 1.3 мкл каждый. Приведены оценки методов модифицирования поверхности микрореакторов и доказано, что предложенное полимерное покрытие на основе полиметилметоксисилоксана позволяет предотвратить ингибирование ПЦР. Предложенная методика модифицирования позволила создать высокий контактный угол смачивания кремниевой поверхности водой и значительно снизить время подготовки микрочипа к анализу. Проведенные оценки показали, что созданная мультиреакторная ПЦР-МФАС позволяет осуществлять определение ДНК методом ПЦР-РВ с эффективностью, равной теоретическому пределу.

ВВЕДЕНИЕ

Микрофлюидные аналитические системы (МФАС) приобретают большую актуальность в области аналитической химии благодаря своим уникальным характеристикам. МФАС широко используют для интеграции нескольких стадий анализа в едином устройстве, для ускорения аналитических операций за счет высоких тепловых и массовых градиентов и для снижения объемов дорогостоящих реагентов [1–7]. Сейчас уже существует много экспериментальных МФАС для самых различных целей [9–12], однако одной из наиболее часто решаемых при помощи МФАС задач, относящейся к области биоаналитической химии, является реализация полимеразно-цепной реакции (ПЦР) [13–15]. Интерес к созданию ПЦР-МФАС связан с возможностью значительного увеличения скоростей нагрева/охлаждения реакционной смеси, что в свою очередь приводит к росту экспрессности анализа и снижению вероятности протекания побочных реакций [16] по сравнению со стандартным инерционным ПЦР-оборудованием. Снижение расхода дорогостоящих реагентов за счет МФАС позволяет снизить стоимость единичного анализа.

К достоинствам МФАС относят высокое соотношение площади поверхности к объему (SVR), что является ключевым фактором при проведении многих аналитических процессов. Однако большее SVR приводит к инактивации компонентов ПЦР-смеси, что в конечном итоге приводит к ин-

гибированию ПЦР. В зависимости от выбора материала микрочипа ингибирование ПЦР вызывается не только большим SVR, но и ингибиторным влиянием материала микрочипа [15, 17]. Наибольшее ингибиторное влияние на ПЦР имеет кремний — материал, высокий коэффициент теплопроводности которого делает его привлекательным для создания ПЦР-МФАС. В литературе уделяют большое внимание созданию различных вариантов модифицирующих покрытий внутренней поверхности микрореакторов [15, 17–20].

Отметим, что большинство исследователей не продемонстрировали влияния типа модифицирующего покрытия на эффективность протекания реакции, которую можно оценить только при детектировании продуктов ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Метод ПЦР-РВ имеет уникальное преимущество по сравнению с гель-электрофорезом или методом конечной точки — возможность количественной оценки начальной концентрации ДНК в пробе по кинетической кривой ПЦР [21]. После получения кинетических кривых ПЦР и оценки величин пороговых циклов (C_t) становится возможным определение эффективности реакции.

Настоящая статья посвящена выявлению сорбирующегося компонента реакции при использовании различных типов модифицирующих покрытий, оценке влияния типа модифицирующего покрытия на величину порогового цикла реакции, оценке эффективности ПЦР, полученных при проведении реакции в микрореакторах созданного

микрочипа; разработке и оптимизации мультиреакторной микрофлюидной системы для определения ДНК методом ПЦР-РВ и сравнению достигнутых характеристик созданной ПЦР-МФАС со стандартным ПЦР-РВ оборудованием.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Топология ПЦР-микрочипа

Предложенный нами ранее стеклянно-кремниевый ПЦР-микрочип характеризовался: небольшим количеством микрореакторов (9 микрореакторов); наличием гидродинамической связи между микрореакторами, что приводило к перемешиванию проб при проведении термоциклирования; большими линейными размерами входных и выходных отверстий, что приводило к частичному испарению проб при термоциклировании; низкой эффективностью использования всего объема пробы (5 %) [22, 23], что при малой концентрации ДНК в пробе приводило к ложноположительным результатам анализа; перепадом глубин между микрореактором и каналом, что приводило к образованию пузырьков воздуха при вводе проб в микрореакторы. На основании выявленных ограничений в настоящей работе разработали новую топологию стеклянно-кремниевого микрочипа (см. рис. 1, а).

Микроструктуры в ПЦР-чипах изготовлены методом анизотропного химического травления кремниевых пластин (ЗАО "Светлана-полупроводники", Россия). Ширина микроканалов составила 280 мкм, а глубина 200 мкм. Размеры каждо-

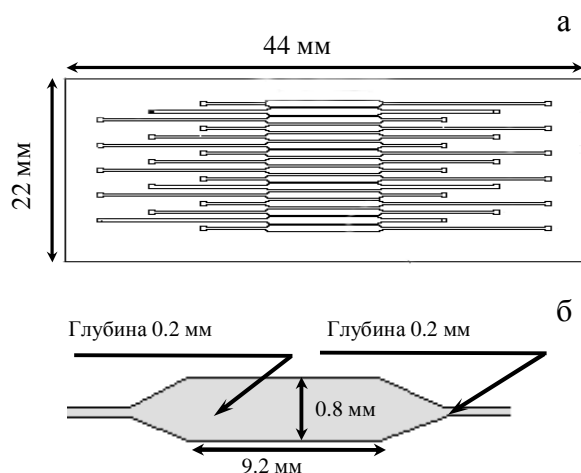


Рис. 1. Микрофлюидный ПЦР-микрочип.
а — топология микрофлюидного ПЦР-чипа;
б — форма и размеры микрореактора микрочипа

го из входных отверстий — 0.5×0.5 мм при глубине травления до 200 мкм. Как показано на рис. 1, б, каналы, постепенно уширяясь, образуют микрореакторы с размерами 9.2×0.8 мм и глубиной 200 мкм каждый. Объем микрореакторов составил 1.3 мкл; таким образом, эффективность использования пробы достигла 40 %. Все 16 микрореакторов гидродинамически независимы, что элиминирует перемешивание проб при термоциклировании и предотвращает образование пузырьков воздуха при вводе проб в микрореакторы. Линейные размеры микрочипа составили 22×44 мм, что позволило значительно снизить стоимость кремниевой заготовки.

Ввод проб в ПЦР-микрочип осуществляли при помощи специально разработанной системы, которая состояла из поликарбонатной накладки с последовательно присоединенным к ней пластиковым наконечником с фильтром и резиновой грушей. Разрезание, создаваемое на выходных отверстиях, позволило экспрессно вводить пробы (3 мкл) в микрореакторы микрочипа.

Герметизацию микрочипа осуществляли при помощи полиолефиновой самоклеющейся пленки (Abgene), приклею которую проводили после удаления избытков проб на входных и выходных отверстиях при помощи безворсовой салфетки.

Установка для проведения ПЦР-реакции в режиме реального времени на микрофлюидном чипе

Установка состояла из двух систем: системы термоциклирования и системы флуоресцентного детектирования.

Система флуоресцентного детектирования, в которой применена эпифлуоресцентная оптическая схема, аналогична детально описанной ранее [22, 23], за исключением детектора. В качестве детектора излучения была выбрана цифровая ПЗС-камера (прибор с зарядовой связью (ПЗС), MultiBlue Biotech CCD, Perkin Elmer) на основе ПЗС-матрицы с диагональю 1/3 дюйма (КАИ-0340, Kodak). Квантовая эффективность выбранной матрицы составляет 54 % на 500 нм. Размер ПЗС-матрицы составляет 4.74×3.55 мм, число активных пикселей — 640×480 .

Предел обнаружения системы флуоресцентного детектирования по буферному раствору флуоресцеина составил 5×10^{-9} М, что сравнимо с чувствительностью системы детектирования стандартного ПЦР-РВ оборудования [24]. Такая высокая чувствительность связана с отсутствием фоновой флуоресценции материала микрочипа по сравнению с полимерным материалом пластиковой пробирки стандартного оборудования.

Программа обработки результатов аналогична описанной ранее [22, 23], за исключением введения

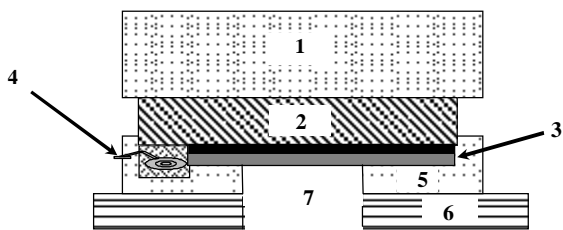


Рис. 2. Система термоциклирования.
1 — радиатор, 2 — элемент Пельтье, 3 — ПЦР-микрочип, 4 — термодатчик, 5 — картридж микрочипа, 6 — пластиковая платформа, 7 — окно для детектирования

нормирующего кадра для устранения неоднородностей засветки на детектируемой площади. Полученные результирующие значения аналитических сигналов использовали для построения кинетической кривой ПЦР в координатах "интенсивность флуоресценции—число циклов" и оценки основного параметра кинетической кривой ПЦР — величины порогового цикла, оценка которого производилась по максимуму второй производной от кривой ПЦР, аппроксимированной функцией сигмоидного типа [25].

Система термоциклирования несколько изменена по сравнению с предложенной ранее [22, 23]. В оптимизированной системе термоциклирования (см. рис. 2) использовали элемент Пельтье, который механически прижимается к микрочипу в зоне микрореакторов со стороны кремниевой подложки. Размеры выбранного нагревательного модуля были обусловлены размерами зоны микрореакторов ПЦР-микрочипа — 22×10 мм. Тепловая мощность элемента Пельтье составила 22 Вт при максимальной силе тока в 8.5 А и напряжении в 4.8 В.

Контроль температуры активной стороны элемента Пельтье осуществляли при помощи платиновых термодатчиков (JUMO, GmbH & Co), предварительную калибровку которых осуществляли по показаниям ртутного термометра. Абсолютная погрешность измерения температуры (T , °C) в диапазоне от -200 °C до +400 °C при помощи выбранных термодатчиков составляет $\pm(0.15 + 0.002 \times |T|)$ °C, время отклика — 16 мс, что является достаточным для измерения температуры при высоких скоростях термоциклирования. Управление мощностью, подаваемой на элемент Пельтье, и считывание показаний термодатчика осуществляли при помощи пропорционального интегрально-дифференциального алгоритма регулирования.

В системе термоциклирования создали пластиковый картридж (см. рис. 2), который спроектиро-

вали с учетом минимального теплоотвода от микрочипа в пластиковую подложку. Скорости нагревания/охлаждения созданной системы термоциклирования составили 8.7 °C/с и 7.8 °C/с соответственно (в диапазоне от 60 до 95 °C, в интервале от 5 до 95 % от амплитуды перехода). Увеличение скоростей нагревания/охлаждения по сравнению с предложенной ранее системой [23] произошло благодаря минимальному отводу тепла через покровную пластину микрочипа в пластиковую платформу нагревательной системы и благодаря снижению линейных размеров микрочипа.

Растворы и реактивы

Для проведения ПЦР использовали тест-систему "35S", в которой контрольным образцом является плазмиды pUC-18 со вставкой целевого фрагмента длиной 130 п. о. (ЗАО "Синтол"). Приготовление смеси ПЦР проводили в ламинарном ПЦР-боксе (ЗАО "Ламинарные системы"). Общий объем однократно приготавливаемой ПЦР-смеси составлял 25 мкл и содержал: 1×ПЦР-буфер с 10× раствором SYBR Green I, 12.5 мМ дНТФ, 125 мМ MgCl₂, 6.25 пкмоль смеси праймеров, 2.5 Е Taq ДНК-полимеразы. Концентрацию ДНК в ПЦР-смеси варьировали от 2×10^5 до 2 копий/мкл. При проведении экспериментов по выявлению сорбирующегося компонента готовили ПЦР-смеси, в которых отсутствовали или ДНК и праймеры ("ДНК(-)"), или Taq ДНК-полимераза ("ПОЛИ(-)"), или все три перечисленных компонента ("ДНК(-); ПОЛИ(-)"). При детектировании кинетических кривых ПЦР с использованием специфичного зонда с флуорофором FAM и тушителем флуоресценции BHQ1 (далее зонд FAM) использовали ПЦР-буфер, не содержащий SYBR Green I, и добавляли в 25 мкл смеси зонд FAM, так что его содержание в смеси ПЦР составляло 2.5 пкмоль. Использовали режим амплификации смеси ПЦР, рекомендуемый производителем: прогревание — 90 с при 95 °C, а затем 50 циклов из интервалов при 95 °C — 15 с и при 60 °C — 40 с.

Для проведения статического модифицирования использовали 50 %-й раствор диметилдихлорсилана (Si(CH₃)₂Cl₂, ACROS Organics) в сухом толуоле и полиметилметоксисилоксан (ПММС, CH₃[Si(OCH₃)(CH₃-O)]_m-Si(CH₃)₃, Пента-Север). Для вспомогательных работ использовали концентрированные HNO₃ и H₂SO₄, H₂O₂, толуол, хлороформ, ацетон. Все реактивы отечественного производства, квалификации "ОСЧ". Для динамической пассивации использовали буферный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА, Fermentas) — 5 мкг/мкл в смеси ПЦР.

Для детектирования продуктов ПЦР методом гель-электрофореза использовали агарозу (Sigma Aldrich) и TAE-буфер (40 мМ Tris-буфер, 1 мМ

ЭДТА, pH = 7.6, Sigma Chemical Co.). Из прошедших термоциклирование смесей ПЦР отбирали по 15 мкл аликвот, которые после смешения с 5 мкл бромфенолового синего (Fermentas) помещали в лунки на геле. Для определения величины намноженного фрагмента использовали стандартный маркер молекулярного веса ("Low range DNA marker", Fermentas).

Дополнительное оборудование и установка для детектирования продуктов реакции методом гель-электрофореза

Для проведения экспериментов по выявлению сорбирующегося компонента смеси ПЦР использовали ПЦР-амплификатор ("Терцик", ЗАО "ДНК-Технология"), пластиковую ванну для горизонтального гель-электрофореза (НПФ "Литех") с блоком питания и специально разработанную установку для детектирования результатов гель-электрофореза. Все компоненты созданной установки, за исключением объектива (Fujinon, фокусное расстояние — 25 мм, относительная апертура — 1.4) и двухкоординатного столика, аналогичны компонентам, использованным при создании установки для флуоресцентного детектирования. Используемый двухкоординатный столик позволил перемещать пластину агарозного геля относительно детектора флуоресцентного излучения для получения отдельных кадров изображения. После получения отдельных изображений проводили их совмещение в программе Adobe Photoshop, ориентируясь на положение входных лунок на агарозном геле.

Для проведения ПЦР-РВ на стандартном оборудовании использовали анализатор нуклеиновых кислот (АНК-16, ИАиП).

Методики модифицирования поверхности микрореакторов

До модифицирования микрочипа в микрореакторы вводили смесь H_2SO_4 и H_2O_2 (3:1 по объему). Затем микрочип помещали в стакан, содержащий аналогичную смесь, и инкубировали 5 мин. Далее микрочип промывали порциями дистиллированной воды и сушили ацетоном.

Методика 1

Используя вакуумный насос, через микрочип прокачивали раствор ПММС (60 мкл) так, чтобы раствор модификатора покрывал зоны входных отверстий. Затем чип просушивали потоком воздуха и нагревали на плитке в течение 5 мин при 100 °С.

Методика 2

Сначала проводили модифицирование согласно методике 1. Затем в микрореакторы микрочипа вводили концентрированную HNO_3 , помещали

микрочип в термостойкую колбу, заполненную концентрированной HNO_3 , и кипятили микрочип 10 мин. Затем микрочип извлекали из колбы, промывали порциями дистиллированной воды и ацетона и сушили при 80 °С в течение 2–3 мин. Микрочип обрабатывали толуольным раствором $Si(CH_3)_2Cl_2$ путем ввода в микрореакторы так, чтобы порции раствора покрывали внешнюю кремниевую поверхность зоны входных отверстий. Инкубировали раствор модификатора внутри микрочипа 3 ч. Далее удаляли раствор модификатора, микрочип последовательно промывали порциями толуола, дистиллированной воды, ацетона и сушили на воздухе в течение 10 мин при 100 °С.

Методика 3

Микрочип обрабатывали толуольным раствором $Si(CH_3)_2Cl_2$ путем ввода в микрореакторы так, чтобы порции раствора покрывали внешнюю кремниевую поверхность зоны входных отверстий. Инкубировали раствор модификатора внутри микрочипа 3 ч. Затем раствор модификатора удаляли, микрочип последовательно промывали порциями толуола, дистиллированной воды, ацетона и сушили на воздухе в течение 10 мин при 100 °С.

Перед вводом смесей ПЦР в микрореакторы микрочипов проводили 10 мин УФ-облучение кремниевой поверхности микрочипов в ПЦР-боксе. При выявлении сорбирующегося компонента проводили 10 мин инкубирование смесей ПЦР в микрореакторах микрочипа, после чего смеси извлекали и проводили термоциклирование в амплификаторе "Терцик".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление сорбирующегося компонента ПЦР-смеси в зависимости от типа используемого модифицирующего покрытия и оценка влияния типа модифицирующего покрытия на величину порогового цикла ПЦР

Для проведения экспериментов по выявлению сорбирующегося компонента использовали ПЦР-микрочипы, модифицированные при помощи описанных выше методик 1 и 2, и микрочип, не прошедший модифицирование, и ПЦР-смеси: растворы "ДНК(-)", "ПОЛИ(-)" и "ДНК(-); ПОЛИ(-)". На рис. 3. представлена электрофореграмма, полученная после проведения гель-электрофореза, а в табл. 1 представлено описание проб на дорожках геля. Отметим, что в отсутствие статического модифицирования и при использовании методики 2 наблюдается сорбция Taq ДНК-полимеразы (рис. 3, дорожки 5 и 12). Кроме того, аналогичный эффект, но в несколько меньшей степени замечен и для остальных компонентов (рис. 3, дорожки 6, 7, 13, 14). В этом случае сорбирующимся

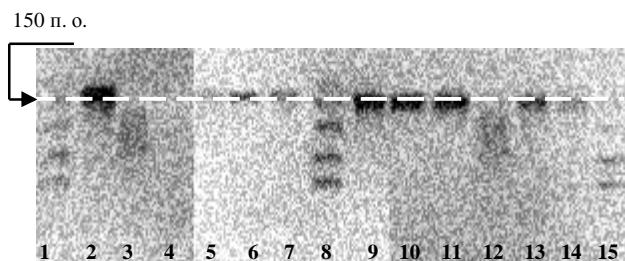


Рис. 3. Электрофореграмма, полученная при проведении экспериментов по выявлению сорбирующегося компонента

компонентом смеси ПЦР могут являться компоненты буфера. В случае взаимодействий ионов $Mg(II)$ с поверхностью активность Taq ДНК-полимеразы снижается, что results в уменьшении выхода ампликонов при проведении ПЦР [26]. При использовании методики 1 для модифицирования поверхности микрореакторов ПЦР-микрочипа (рис. 3, дорожки 9, 10, 11) ингибирование ПЦР минимально.

В случае модифицирования поверхности

$Si(CH_3)_2Cl_2$ поверхность покрывается модификатором неравномерно, несмотря на создание аморфного окисла кремния после окисления полимерного покрытия из ПММС, т. к. силанольные группы на созданной поверхности неоднородно распределены. Кроме того, $Si(CH_3)_2Cl_2$ образует только частично сшитое полимерное покрытие (см. рис. 4, а). В отличие от модифицирования поверхности при помощи $Si(CH_3)_2Cl_2$ методика 1, основанная на использовании ПММС, позволяет получить плотно сшитое полимерное покрытие, что позволяет полностью предотвратить контакт между кремниевой поверхностью микрореакторов и смесью ПЦР, что results в предотвращении ингибирования смеси ПЦР (см. рис. 4, б). Ранее показано [27], что наилучшим вариантом модифицирования поверхности является полидиметилсилоксан (ПДМС, Пента-Север), однако применение ПММС позволяет получить химически привитое покрытие, что увеличивает степень надежности покрытия.

Отметим, что проведенный эксперимент позволил качественно оценить используемые методики модифицирования и без использования дорогостоящих микрочипов сделать выбор в пользу наиболее перспективных методик.

Табл. 1. Способы модифицирования микрочипов и описание проб на дорожках электрофореграммы (к рис. 3)

№ дорожки	Методика модифицирования и модифицирующее покрытие	Описание пробы
1	Микрочип отсутствует	Ладдер
2	”	К(+)
3	”	К(-)
4	”	К(-) (без Taq ДНК-полимеразы)
5	Нет модифицирования	"ДНК(-)"
6		"ПОЛИ(-)"
7		"ДНК(-); ПОЛИ(-)"
8	Микрочип отсутствует	Ладдер
9	Методика 1: $CH_3-[Si(OCH_3)(CH_3)-O]_m-Si(CH_3)_3$	"ДНК(-)"
10		"ПОЛИ(-)"
11		"ДНК(-); ПОЛИ(-)"
12	Методика 2: $Si(CH_3)_2Cl_2$ после окисления, $CH_3-[Si(OCH_3)(CH_3)-O]_m-Si(CH_3)_3$	"ДНК(-)"
13		"ПОЛИ(-)"
14		"ДНК(-); ПОЛИ(-)"
15		Микрочип отсутствует

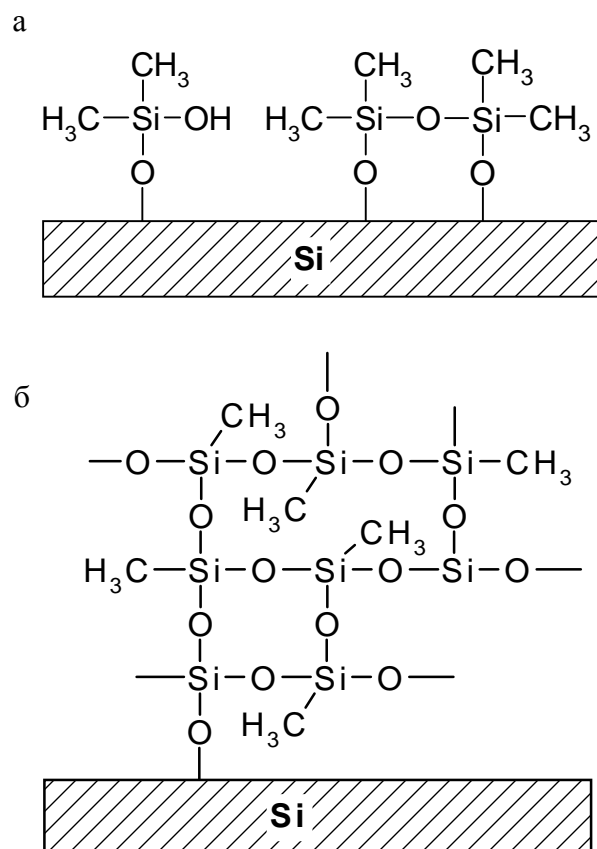


Рис. 4. Модифицированная поверхность кремния. а — модификатор $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$; б — модификатор полиметилметоксисилоксан

Табл. 2. Значения C_t , полученные при проведении ПЦР в микрореакторах ПЦР-микрочипа с использованием различных методик модифицирования поверхности

Модифицирующее покрытие и методика модифицирования	C_t , $n = 5$	S_r [%], $n = 5$
Методика 1: $\text{CH}_3\text{-}[\text{Si}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)\text{-O}]_m\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$	20.35	0.19
Методика 2: $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ после окисления $\text{CH}_3\text{-}[\text{Si}(\text{OCH}_3)(\text{CH}_3)\text{-O}]_m\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$	21.91	0.40
Методика 3: $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$	21.57	0.29

Однако электрофореграммы не отражают влияния типа используемого полимерного покрытия на величину порогового цикла ПЦР, поэтому для дальнейших экспериментов по выбору оптималь-

ной методики модифицирования проводили ПЦР в микрореакторах ПЦР-микрочипов.

При постановке ПЦР в микрореакторах микрочипа использовали 3 описанных выше методики модифицирования поверхности. При проведении экспериментов использовали ПЦР-смеси, содержащие неспецифичный интеркалятор SYBR Green I. Концентрация ДНК при проведении экспериментов составила 2×10^5 копий/мкл. Полученные значения величин в зависимости от методики пассивации приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, минимальное значение C_t , т. е. минимальное ингибирование ПЦР, достигается при использовании методики 1. Из приведенных данных в табл. 2 можно заметить, что относительное стандартное отклонение S_r значений порогового цикла в случае использования методики 1 составляет минимальную величину, что говорит о воспроизводимости нанесения модифицирующего полимерного покрытия.

Также было отмечено, что методика 1 способствует значительному увеличению гидрофобных свойств поверхности входных отверстий микрочипа по сравнению с использованием методики 3 [22, 23], что позволяет предотвратить растекание и перемешивание проб при вводе в микрореакторы. Контактный угол смачивания (θ) кремниевой поверхности водой на входных отверстиях микрочипа при использовании методики 1 составил $130\text{--}134^\circ$, в то время как при использовании методики 3 контактный угол смачивания составил величину порядка $85\text{--}90^\circ$.

Время модифицирования поверхности при помощи методики 1 составляет не более 10 мин, что позволяет значительно сократить время подготовки микрочипа к анализу по сравнению с методиками модифицирования, предложенными в литературе [20, 28].

Сравнение параметров ПЦР-кривых, полученных на микрочипе и на стандартном оборудовании

На рис. 5, а представлены кривые ПЦР, полученные в ПЦР-микрочипе и на стандартном оборудовании для различных начальных концентраций ДНК в пробе, а в табл. 3. представлены соответствующие значения величин пороговых циклов для различных исходных концентраций ДНК ($N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$).

Отметим, что полученные значения C_t для ПЦР-кривых, полученных на АНК и в микрореакторах микрочипа, различаются: значения пороговых циклов для стандартного оборудования несколько больше, чем для кривых ПЦР, полученных в микрочипе, что связано с незначительной сорбцией зондов на внутреннюю поверхность микрореакторов. Такая гипотеза возникла вследствие незначительного падения интенсивности

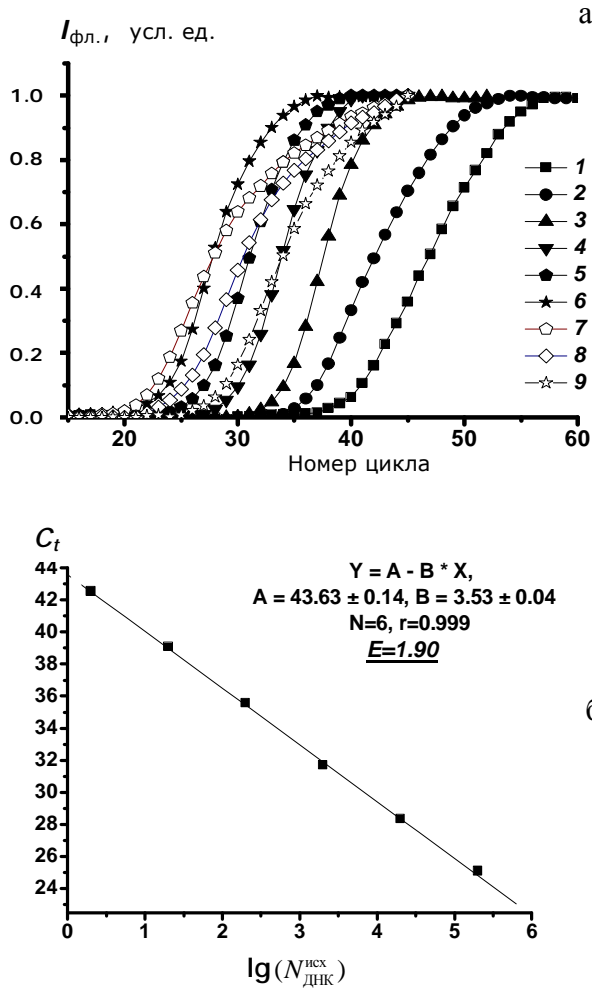


Рис. 5. Сравнение параметров кривых ПЦР, полученных в микрочипе и на стандартном оборудовании.
 ПЦР-кривые (а):
 1 — ПЦР-микрочип, 2 копий/мкл; 2 — ПЦР-микрочип, 20 копий/мкл; 3 — ПЦР-микрочип, $2 \cdot 10^2$ копий/мкл; 4 — ПЦР микрочип, $2 \cdot 10^3$ копий/мкл; 5 — ПЦР-микрочип, $2 \cdot 10^4$ копий/мкл; 6 — ПЦР-микрочип, $2 \cdot 10^5$ копий/мкл; 7 — АНК, $2 \cdot 10^5$ копий/мкл; 8 — АНК, $2 \cdot 10^4$ копий/мкл; 9 — АНК, $2 \cdot 10^3$ копий/мкл.
 Градуировочная зависимость (б), полученная в микрореакторах ПЦР-микрочипа

флуоресценции (5–7% от исходного значения) на стадии инициации реакции. По-видимому, именно сорбция зондов приводит к несколько более позднему достижению порогового цикла. Важно отметить, что определение пороговых циклов для всех кривых ПЦР проводилось в идентичных условиях, т. е. по максимуму второй производной от кривой ПЦР.

Табл. 3. Оценка величины порогового цикла (C_t) кинетических кривых ПЦР, полученных в микро-реакторах микрочипа и на АНК-16 при различной исходной концентрации ДНК ($N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$) в пробе

ПЦР-устройство	$N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$, копий/мкл	C_t , $n = 5$	S_r [%], $n = 5$
АНК-16	$2 \cdot 10^5$	24.55	0.09
	$2 \cdot 10^4$	27.85	0.11
	$2 \cdot 10^3$	30.83	0.12
ПЦР-микрочип	$2 \cdot 10^5$	25.35	0.18
	$2 \cdot 10^4$	28.35	0.20
	$2 \cdot 10^3$	31.50	0.20
	$2 \cdot 10^2$	35.40	0.29
	20	39.11	0.37
	2	42.61	0.62

Относительное стандартное отклонение S_r для значений C_t , полученных в микрочипе, значительно меньше 1 %, что позволяет говорить о том, что в интервале исходных концентраций ДНК от $2 \cdot 10^5$ до 20 копий/мкл величина относительного стандартного отклонения по концентрации составит от 1.5 до 20 %, что связано с логарифмической градуировочной зависимостью. Полученные погрешности находятся на уровне допустимых при проведении количественного ПЦР-РВ анализа [21].

Большой угол наклона, достигнутый для ПЦР-кривых в микрочипе, связан с тем, что малый объем микрореакторов микрочипа минимизирует температурные неоднородности и ускоряет массоперенос по сравнению с полипропиленовыми пробирками, что отражается на эффективности протекания реакции [29]. На ранних этапах амплификации эффективности ПЦР для АНК и микрочиповой системы равны, а на более поздних этапах амплификации происходит более эффективное протекание ПЦР в микрочипе по сравнению со стандартным оборудованием [29]. При построении градуировочных графиков в координатах $\lg(N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}})$ — C_t с использованием значений пороговых циклов для начальных концентраций ДНК, равных $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$ и $2 \cdot 10^3$ копий/мкл, эффективность ПЦР в микрореакторах микрочипа и на стандартном оборудовании оказалась равна теоретическому пределу — 2, что говорит об устранении ингибирования ПЦР в микрореакторах микрочипа. В случае малых исходных концентраций ДНК угол наклона ПЦР-кривых (см. рис. 5, а), полученных в микрочипе, несколько уменьшается, что связано с инги-

бированием Таq ДНК-полимеразы при проведении большого количества термоциклов.

На рис. 5, б представлена градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР в микрореакторах микрочипа. Как видно из приведенных данных, диапазон определяемых содержаний составил 6 порядков, а минимально обнаружимое количество молекул ДНК составило 1 копию/мкл при эффективности реакции, равной 1.90. При построении градуировочной зависимости эффективность ПЦР, определяемая по углу наклона полученной зависимости, зависит от значений пороговых циклов на уровне малых исходных концентраций ДНК в пробе, поэтому результирующая эффективность ПЦР, рассчитанная по градуировочной зависимости, составила величину меньше теоретического предела, что достигается и для стандартного оборудования.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе создана методика модифицирования поверхности микрореакторов, основанная на создании полимерного покрытия на поверхности кремния. Методика позволяет предотвратить ингибирование ПЦР в микрореакторах стекляннно-кремниевого микрочипа, создать высокий контактный угол смачивания кремниевой поверхности водой и значительно снизить время подготовки микрочипа к анализу. Выявлен преимущественно сорбирующийся компонент — Таq ДНК полимеразы. Проведенные оценки параметров ПЦР-кривых, полученных в микрочипе и на стандартном оборудовании, позволили показать, что созданная мультиреакторная ПЦР-МФАС позволяет осуществлять экспрессное определение ДНК методом ПЦР-РВ с эффективностью, аналогичной достигаемой на стандартном оборудовании. Созданная ПЦР-МФАС позволяет в 8 раз сократить расход дорогостоящих проб и реагентов, а все используемые компоненты разработанных методик ввода проб и герметизации отличаются высокой доступностью. Созданная ПЦР-МФАС может быть использована при создании нового микрочипового оборудования для биохимических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu R.H., Yang J., Lenigk R., Bonanno J., Grodzinski P. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76, N 7. P. 1824–1831.
2. Бельский Б.Г., Комяк Н.И., Курочкин В.Е., Евстапов А.А., Суханов В.Л. // *Научное приборостроение.* 2000. Т. 10, № 2. С. 3–13.
3. Бельский Б.Г. // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2001. № 3. С. 26–31.
4. Бельский Б.Г. // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2001. № 4. С. 25–34.
5. Paegel B.M., Blazej R.G., Mathies R.A. // *Current Opinion in Biotechnology.* 2003. V. 14, N 1. P. 42–50.
6. Surmeian M., Slyadnev M.N., Hisamoto H., Hibara A., Uchiyama K., Kitamori T. // *Anal. Chem.* 2002. V. 74, N 9. P. 2014–2020.
7. Gascoyne P., Satayavivad J., Ruchirawat M. // *Acta Tropica.* 2004. V. 89, N 3. P. 357–369.
8. Sato K., Hibara A., Tokeshi M., Hisamoto H., Kitamori T. // *Anal. Sci.* 2003. V. 19, N 1. P. 15–22.
9. Sato K., Tokeshi M., Odake T., Kimura H., Ooi T., Nakao M., Kitamori T. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72, N 6. P. 1144–1147.
10. Hansen C.L., Sommer M., Quake S.R. // *PNAS.* 2004. V. 101, N 40. P. 14431–14436.
11. Tan Y.-C., Fisher J.S., Lee A.I., Cristini V., Lee A.P. // *Lab Chip.* 2004. V. 4. P. 292–298.
12. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Макаров Е.Д., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. // *Научное приборостроение.* 2005. Т. 15, № 2. С. 11–20.
13. Liu J., Enzelberger M., Quake S. // *Electrophoresis.* 2002. V. 23, N 10. P. 1531–1536.
14. Kopp M.U., de Mello A.J., Manz A. // *Science.* 1998. V. 280. P. 1046.
15. Lee T.M.H., Hsing I.M., Lao A.I.K., Carles M.C. // *Anal. Chem.* 2000. V. 72, N 17. P. 4242–4247.
16. Zhang C., Xu J., Ma W., Zheng W. // *Biotechnology Advances.* 2006. V. 24, N 3. P. 243–284.
17. Krishnan M., Burke D.T., Burns M.A. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76, N 22. P. 6588–6593.
18. Shin Y.S., Cho K., Lim S.H., Chung S., Park S.J., Chung C., Han D.-C., Chang J.K. // *J. Micro-mech. Microeng.* 2003. V. 13, N 5. P. 768–775.
19. Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24, N 2. P. 380–385.
20. Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24, N 2. P. 375–379.
21. Vaerman J.L., Saussoy P., Ingargiola I. // *J. of Biological Regulators and Homeostatic Agents.* 2004. V. 18, N 2. P. 212–214.
22. Slyadnev M.N., Lavrova M.V., Kazakov V.A., Ganeev A.A., Moskvina L.N. // *Anal. Sci.* 2005. V. 21, N 4. P. 349–350.
23. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. // *Научное приборостроение.* 2005. Т. 15, № 2. С. 41–50.
24. Анализаторы нуклеиновых кислот АНК. (www.syntol.ru/productank.htm).
25. Tichopad A., Dilger M., Scharz G., Pfaffl M.W. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31, N 20. e122.
26. Lagally E.T., Soh H.T. // *Critical Reviews in solid state and materials sciences.* 2005. V. 30. P. 208–233.
27. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Каза-

- ков В.А., Крисько А.В., Ганеев А.А. // ЖАХ. 2007. В печати.
28. *Giordano B.C., Copeland E.R., Landers J.P.* // *Electrophoresis*. 2001. V. 22, N 2. P. 334–340.
29. *Profi C., Rothschild M.A., Schneider P.M.* // *International Congress Series*. 2006. V. 1288. P. 645–647.
- Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет (Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Erkin М.А., Новолоцкий Д.В., Ганеев А.А.)*
- НПФ АП "Люмэкс", Санкт-Петербург (Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Крисько А.В., Ганеев А.А.)*

Материал поступил в редакцию 6.06.2007.

SURFACE MODIFICATION OF MICROFLUIDIC CHIP MICROREACTORS FOR REAL-TIME PCR

**M. N. Slyadnev^{1,2}, M. V. Lavrova^{1,2}, M. A. Erkin¹, D. V. Novolozkii¹,
A. V. Krisko², A. A. Ganeev^{1,2}**

¹*Saint-Petersburg State University, Department of Chemistry*

²*"Lumex Ltd", Saint-Petersburg*

The paper is devoted to optimization of a microfluidic analytical system (MFAS) designed to perform polymerase chain reaction (Real-Time PCR) in a glass-silicon microchip comprising 16 microreactors 1.3 μ l each. We have evaluated various methods of surface modification and proved that polymethylmethoxysiloxane-based polymeric coating (PMMS) is the best one to prevent PCR inhibition. Using the proposed modification technique, we succeeded in obtaining large water wetting angles on silicon surface and also in reducing considerably the time of preparing the microchip for the analysis. The estimates obtained show that the multi-reactor PCR MFAS provides DNA detection by the Real-Time PCR method with the efficiency equal to the theoretically possible level.