
**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

ЭКСПРЕССНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Статья посвящена оптимизации условий протекания полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в микрофлюидной аналитической системе. Проведено сравнение способов оценки температуры внутри микрореакторов и доказано, что контактный способ оценки температуры позволяет адекватно отразить температуру, достигаемую внутри микрореакторов микрофлюидного чипа. Проведена оптимизация режимов амплификации и показано, что сокращение времени поддержания температуры на стадиях термоциклирования позволяет значительно сократить время анализа без уменьшения чувствительности и значительного падения эффективности ПЦР. Показано, что определение 5 копий ДНК в микрореакторе составляет всего 18 мин.

ВВЕДЕНИЕ

Существующие классические методы определения ДНК при помощи ПЦР характеризуются большими временными затратами из-за низких скоростей нагрева и охлаждения реакционной смеси. На стандартном оборудовании процедура определения ДНК методом ПЦР характеризуется низкой экспрессностью: низкая скорость термоциклирования обусловлена пониженной теплопроводностью стенок полипропиленовой пробирки. Использование больших объемов реагентов для проведения ПЦР приводит к медленному и неравномерному прогреву реакционной смеси [1–3]. Низкие скорости нагрева и охлаждения не только увеличивают время анализа, но и приводят к снижению селективности ПЦР [1–5].

Современные приборы для проведения ПЦР развиваются по пути увеличения скоростей нагрева и охлаждения реакционной смеси за счет уменьшения объема реакторов и использования материалов с высокими коэффициентами теплопроводности. Эффективным решением существующих задач является разработка и применение микрофлюидных технологий [6]. Малый объем реакторов, малое расстояние, на которое требуется осуществить перенос тепла, и высокое соотношение площади поверхности реактора к его объему позволяют усилить теплообмен между микрочипом и реакционной смесью и, таким образом, достичь высоких скоростей термоциклирования и равномерности прогрева реакционной смеси. Все это позволяет значительно увеличить экспрессность анализа. Значительное увеличение экспрессности определения ДНК достигается пра-

вильным определением оптимума времени, затрачиваемого на поддержание температуры на каждой стадии термоцикла, с учетом изменения эффективности реакции [7–10].

При разработке системы с высокими скоростями термоциклирования встают такие задачи, как адекватная оценка температуры внутри реакторов в процессе термоциклирования и адаптация режима термоциклирования ПЦР в микрофлюидной системе с целью уменьшения времени анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальная установка и топология микрочипа

Для осуществления экспериментов использована экспериментальная установка, подробно описанная в предыдущей работе [6]. В качестве нагревательного элемента использовали элемент Пельтье размерами 15×30 мм и мощностью 22 Вт. ПЦР проводили в стеклянно-кремниевом микрочипе с 16 реакторами объемом 1.3 мкл, поверхность которых модифицировали сочетанием динамического и статического пассиваторов — бычьего сывороточного альбумина и диметилдихлорсилана соответственно [6, 11–15]. Для улучшения механического контакта между микрочипом и элементом Пельтье использовали минеральное масло (MP Biomedicals, Германия).

Изменение мощности, подаваемой на элемент Пельтье и считывание показаний термодатчиков осуществляли при помощи пропорционально-интегрально-дифференциального алгоритма (ПИД).

Задание значений коэффициентов передачи, интегрирования и дифференцирования [7–8, 16–18] позволяет достичь желаемых скоростей нагрева и охлаждения.

Для оценки температуры внутри реактора в процессе термоциклирования создали специальное устройство — термочип: микрочип с закрепленным платиновым термодатчиком. Для этого в стеклянной покровной пластине микрочипа над реактором изготовили прямоугольное отверстие. Через это отверстие вводили термодатчик (длина 10 мм, \varnothing 0.95 мм, время отклика 16 мс (JUMO, GmbH & Co., Германия)). Фиксацию и герметизацию термодатчика в микрореакторе проводили при помощи теплопроводящего клея. Калибровку показаний термочипа осуществляли по показаниям ртутного термометра (PGW 007, Labortherm-N, Германия).

Реактивы

Приготовление раствора родамина С

Исходный раствор родамина С (ЗАО "Вектон", Россия) с концентрацией 10^{-3} М готовили растворением точной навески красителя в дистиллированной воде с содержанием этанола 30 об. %. Растворы хранили в холодильнике при $+4$ °С в темноте и использовали в течение месяца. Для проведения экспериментов по бесконтактному измерению температуры использовали 10^{-5} М раствор родамина С, который готовили разбавлением исходного раствора 20 мМ боратным буферным раствором (рН 9.2). Растворы хранили в холодильнике при $+4$ °С в темноте и использовали в течение недели.

Приготовление растворов для ПЦР-анализа

Для проведения ПЦР использовали тест-систему "НСV" (ЗАО "Интерлабсервис", Россия), предназначенную для определения вируса гепатита С, с длиной амплифицируемого фрагмента 200 п. о. Приготовление смеси ПЦР проводили в ламинарном ПЦР-боксе (ЗАО "Ламинарные системы", Россия). Общий объем однократноготавливаемой ПЦР-смеси составлял 50 мкл. Состав тест-системы позволял варьировать только начальную концентрацию молекул ДНК в растворе. Для приготовления смеси необходимо смешать 15 мкл ПЦР-смеси 1 (зонд с флуорофором FAM и тушителем флуоресценции BHQ1, смесь праймеров), 10 мкл ПЦР-смеси 2 (ПЦР-буфер, дезокси-нуклеозидтрифосфаты, хлорид магния, бычий сывороточный альбумин), 1 мкл Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами (7 Е/мкл). В смесь добавляется 25 мкл положительного контрольного образца ДНК с концентрацией молекул ДНК, равной 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 1×10^3 , 4×10^2 , 80, 8 копий/мкл.

Режим амплификации, рекомендуемый производителем тест-системы, состоит из следующих

стадий: прогревание — 90 с при 95 °С, затем 50 циклов — 95 °С (20 с), 60 °С (40 с).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение температуры раствора внутри микрореакторов

Измерение температуры внутри микрореактора является нетривиальной задачей, т. к. использование даже миниатюрного измерительного датчика, например термодатчика, может внести погрешность из-за возникающего дополнительного теплоотвода. Для получения адекватной оценки температуры непосредственно из раствора внутри микрореактора использовали бесконтактный способ измерения температуры.

Бесконтактный способ основан на оценке температуры по изменению интенсивности флуоресценции буферного раствора родамина С в микрореакторе [19], т. к. показано, что квантовый выход флуоресценции родамина С зависит от температуры раствора, что позволяет связать интенсивность флуоресценции раствора родамина С и температуру, достигаемую в микрореакторе [19].

Для сравнения контактного и бесконтактного способов оценки температуры в микрореакторе использовали термочип, в один из реакторов которого был введен раствор родамина С. В ходе экспериментов получены зависимости температуры в микрореакторе от времени, полученные по показаниям термочипа и используемого флуоресцентного красителя (см. рис. 1).

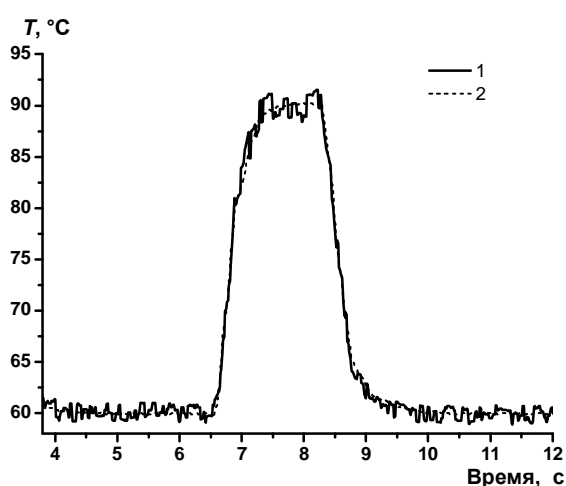


Рис. 1. Оценка динамики процессов термоциклирования.
1 — показания красителя, 2 — показания термочипа

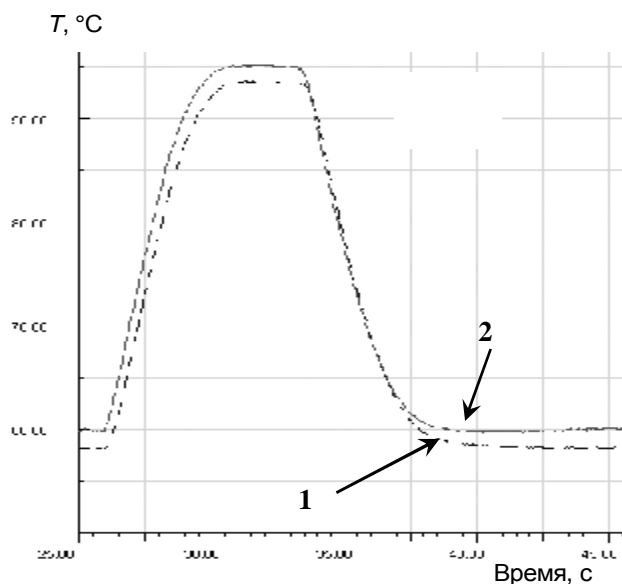


Рис. 2. Оценка показателей термоциклирования.
1 — показания термодатчика, 2 — показания термочипа

мости, сложности практической реализации и большой погрешности определения температуры, связанной с уменьшением отношения сигнал/шум из-за низких значений экспозиции детектора, необходимых для оценки динамики термоциклирования.

Использование термочипа позволяет осуществить постоянное измерение температуры внутри реакторов, однако для проведения ПЦР и одновременного управления температурными режимами требуется интеграция термодатчика в один из реакторов в микрочипе и проведение калибровки. Устранение указанных недостатков возможно за счет интеграции на активную поверхность элемента Пельтье термодатчика, показания которого будут использоваться для управления температурными режимами. Полученные зависимости показаний термочипа и термодатчика на активной поверхности элемента Пельтье в процессе термоциклирования представлены на рис. 2.

Из-за краевых эффектов на поверхности элемента Пельтье, показания термодатчика несколько занижены по сравнению с показаниями термочипа. Однако разница между ними остается постоянной, что позволяет скорректировать режим амплификации.

Оптимизация режима термоциклирования

Режим термоциклирования, используемый для проведения ПЦР, оптимизирован производителем для выполнения ПЦР-анализа на стандартном оборудовании, которое характеризуется неоднородным распределением температуры внутри полипропиленовой пробирки [9]. Большая

Полученные динамические показатели термоциклирования хорошо коррелируют между собой. Следовательно, контактный способ оценки температуры объективно отражает динамику термоциклирования. Однако использование бесконтактного способа непрактично из-за необходимости предварительного построения градуировочной зависи-

Табл. 1. Оценка эффективности реакции и времени достижения порогового цикла в зависимости от используемого режима амплификации и исходной концентрации ДНК

Номер	$t_{ц}, c$	Время, затрачиваемое на один цикл, c	Время достижения C_t [мин] в зависимости от $N_{ДНК}^{исх}$ [копий/мкл]					E
			2×10^4	2×10^3	200	40	4	
1	60 (20+40)	72	27.4	31.8	35.3	38.5	43.3	1.99
2	25 (5+20)	36	13.9	16.1	18.1	19.9	21.8	1.99
3	13 (3+10)	24	9.3	10.8	12.2	13.3	14.8	1.90
4	8 (3+5)	19	7.5	8.7	10.2	11.2	—	1.72
5	3 (1+2)	14	5.7	6.9	7.8	8.7	—	1.61

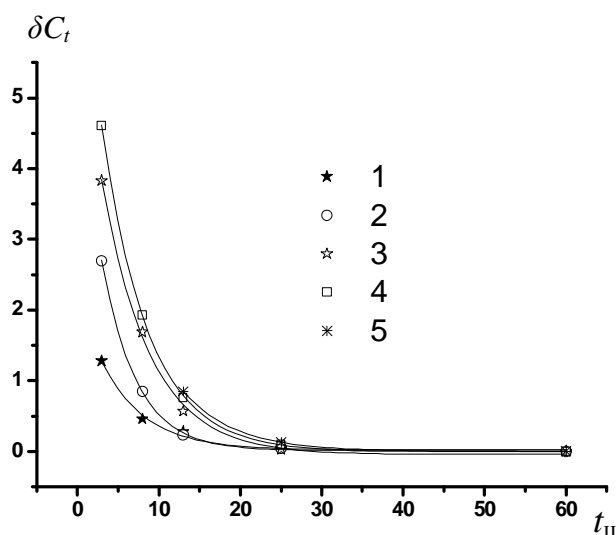


Рис. 3. Изменение величины порогового цикла (δC_t) в зависимости от времени удержания температуры (t_c), затрачиваемого на каждый цикл при проведении ПЦР согласно стандартному и ускоренным режимам амплификации.

1 — $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} = 2 \times 10^4$ копий/мкл; 2 — $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} = 2 \times 10^3$ копий/мкл; 3 — $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} = 200$ копий/мкл; 4 — $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} = 40$ копий/мкл; 5 — $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}} = 4$ копий/мкл

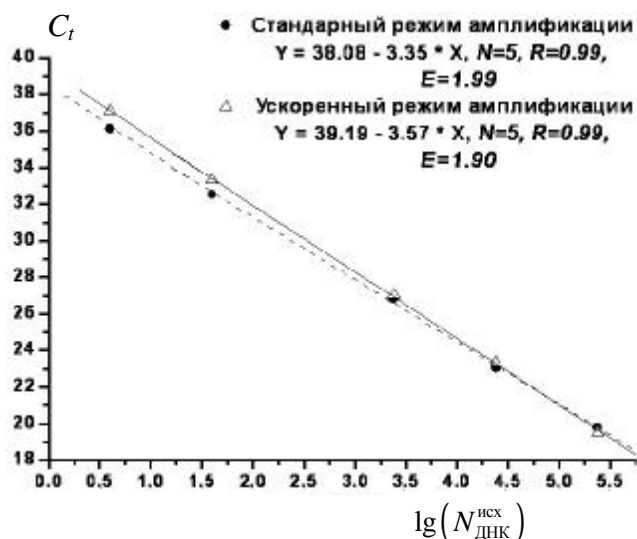


Рис. 4. Градуировочные графики, полученные при проведении ПЦР в микрочипе согласно стандартному и ускоренному режимам амплификации

равномерность прогрева реакционной смеси в микрофлюидных системах связана с малым объемом реакторов и высокими коэффициентами

Табл. 2. Анализ стандартных образцов (СО)

Сравниваемые величины	Номер СО	
	1	2
Паспортное значение $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$ в СО, копий/мкл	200	500
Полученная $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$ [копий/мкл] (стандартный режим амплификации), $n = 5$, $P = 0.95$	210 ± 30	495 ± 71
Полученная $N_{\text{ДНК}}^{\text{исх}}$ [копий/мкл] (ускоренный режим амплификации), $n = 5$, $P = 0.95$	220 ± 38	508 ± 75

теплопроводности материала. Это позволяет предположить, что сокращение времени поддержания температуры на стадиях термоциклирования не приведет к значительному изменению эффективности ПЦР.

В работах [7–9] показано, что общее время анализа можно сократить за счет сокращения времени поддержания постоянной температуры на стадиях термоциклирования. При этом необходимо обеспечить оптимальное соотношение времени и чувствительности анализа. Чувствительность анализа определяется количеством детектируемых молекул ДНК, что в свою очередь определяется эффективностью реакции.

Измененные режимы термоциклирования (см. табл. 1) отличались от стандартного режима временем поддержания температур на стадиях денатурации, отжига праймеров и элонгации.

Для оценки чувствительности анализа с использованием ускоренных режимов амплификации проводили эксперименты с использованием серии растворов с различной начальной концентрацией ДНК.

При проведении экспериментов оценивали разницу между величинами пороговых циклов C_t , полученных по стандартному и одному из ускоренных режимов амплификации (см. рис. 3). Как видно из представленных данных, при уменьшении времени поддержания температуры значение δC_t увеличивается, однако время его достижения уменьшается. При значительном уменьшении времени поддержания температуры уменьшается эффективность ПЦР (см. табл. 1). Уменьшение порогового цикла при малой начальной концентрации ДНК при сокращении времени поддержания температуры происходит вследствие кинетических ограничений, из-за которых ДНК-полимераза не успевает достроить ампликон соответствующей

длины. Режим, позволяющий достичь пороговый цикл при минимальной концентрации, был признан оптимальным. Время определения 5 копий ДНК в микрореакторе составило всего 18 мин, а эффективность реакции при этом достигла 1.90, что находится на допустимом уровне.

Для оценки правильности предложенной экспрессной методики определения ДНК методом ПЦР-РВ в микрочипе использовали два стандартных образца ДНК, содержащих искомым фрагмент ДНК. Определение содержания молекул ДНК в пробах проводили на основании построения градуировочных зависимостей, представленных на рис. 4. Результаты анализа стандартных образцов приведены в табл. 2. Как видно из данных, представленных в таблице, полученные значения концентраций согласуются со значениями, заявленными в паспорте стандартов, что говорит о правильности разработанной методики.

ВЫВОДЫ

Проведена сравнительная оценка способов оценки температуры внутри микрореакторов микрочипа. Показано, что предложенный в настоящей работе контактный способ оценки температуры позволяет адекватно оценивать как абсолютные значения температур, так и динамические показатели термоциклирования.

Оптимизирован режим амплификации при незначительном уменьшении эффективности реакции, что позволило проводить определение ДНК на уровне малых концентраций. Время анализа пробы с исходной концентрацией ДНК на уровне 5 копий/микрореактор составило 18 мин, что в 4.5 раза быстрее, чем проведение анализа на стандартном оборудовании [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Термостат, программируемый для проведения ПЦР-анализа, четырехканальный ГП4-ПЦР-01-"Терцик". (www.dna-technology.ru).
2. Анализаторы нуклеиновых кислот АНК. (www.syntol.ru/productank.htm).
3. Specifications for MJ Mini Gradient Thermal Cycler. (www.biorad.com).
4. Nagai H., Murakami Y., Yokoyama K., Tamiya E. // Biosens. Bioelectron. 2001. V. 16. P. 1015–1019.

5. Malcov M., Naiman T., Yosef D.B., Carmon A., Mey-Raz N., Amit A., Vagman I., Yaron Y. // Reprod. Biomed. Online. 2007. V. 14, N 4. P. 515–521.
6. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Казаков В.А., Ганеев А.А. // ЖАХ. 2007. (В печати).
7. Kopp M.U., de Mello A.J., Manz A. // Science. 1998. V. 280. P. 1046–1048.
8. Morrison T., Hurley J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S.E., Horowitz D., Dixon J.M., Brennan C.J.M. // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34, N 18. e123.
9. Profi C., Rothschild M.A., Schneider P.M. // International Congress Serie. 2006. V. 1288. P. 645–647.
10. Kopf-Sill Anne R. US Patent. 2001. 09/943.070.
11. Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24, N 2. P. 380–385.
12. Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24, N 2. P. 375–379.
13. Felbel J., Bieber I., Pipper J., Köhler J.M. // Chem. Eng. J. 2004. V. 101. P. 333–338.
14. Lee, T.M.H., Hsing I.M., Lao A.I.K., Carles M.C. // Anal. Chem. 2000. V. 72. P. 4242–4247.
15. Liu R.H., Yang J., Lenigk R., Bonanno J., Grodzinski P. // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 1824–1831.
16. Chaudhari A.M., Woudenberg T.M., Albin M., Goodson K.E. // J. Microelectromech. Syst. 1998. V. 7, N 4. P. 345–355.
17. Lee G.B., Lin C.H., Huang F.C., Liao C.S., Lee C.Y., Chen S.H. // IEEE. MEMS. 2003. P. 423–426.
18. Curcio M., Roeraade J. // Anal. Chem. 2003. V. 75, N 1. P. 1–7.
19. Coppeta J., Rogers C. // Experimentals in Fluids. 1998. V. 25, N 1. P. 1–15.

Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет (Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Новолюцкий 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.

RAPID DNA DETECTION BY THE REAL-TIME POLIMERASE CHAIN REACTION

**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 concerns the optimization of conditions of Real-Time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) taking place in a microfluidic analytical system. We have compared the methods for estimating the temperature inside the microreactors and proved that the contact method provides adequate estimates of temperature achieved inside the microfluidic chip microreactors. Optimization of the amplification regime has been carried out; it has been proved that reduction of the temperature duration at the termocycling stages allows one to decrease considerably the analysis time without losses in sensitivity and also without drastic reduction of the PCR efficiency. The paper demonstrates that the time necessary to pick up 5 copies of DNA molecules is 18 minutes only.