

УДК 57.088: 572.2: 532.6

© Г. Е. Рудницкая, А. А. Евстапов

МИКРОЧИПОВЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ. Ч. 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПЦР; КОНСТРУКЦИЯ И МАТЕРИАЛЫ МИКРОЧИПОВ (Обзор)

Рассмотрены основные принципы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обсуждены особенности гомогенных методов ПЦР в реальном времени. Изложены вопросы формирования аналитического сигнала в ходе реакции. Обсуждены преимущества и недостатки реализации ПЦР на микрочипе. Рассмотрены устройства для ПЦР со стационарными и проточными реакционными камерами. Проведен общий анализ материалов, применяемых в конструкциях микрочипов для ПЦР. Рассмотрены основные проблемы, возникающие при использовании наиболее распространенных материалов.

ВВЕДЕНИЕ

В современной клинико-диагностической лабораторной практике успешно применяются методы ДНК/РНК-диагностики, среди которых, безусловно, первое место занимает полимеразная цепная реакция (ПЦР). В начале 1970-х годов норвежский ученый Кьелл Клеппе (Kjell Kleppe) высказал идею о том, что можно амплифицировать ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК — синтетических праймеров [1]. Но только в 1983 г. Кэри Б. Мюллису (Kary B. Mullis) (Нобелевскому лауреату по химии 1993 г.) удалось разработать метод амплификации ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.

На текущий момент, кроме медицинской диагностики, ПЦР применяется в криминалистике, в научных исследованиях при клонировании генов, секвенировании ДНК, при генетическом анализе, анализе особо опасных инфекций, обнаружении генетически модифицированных продуктов и т. п. [2–4].

1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПЦР

ПЦР представляет собой процесс контролируемого "молекулярного копирования" определенного участка ДНК *in vitro*, позволяющий нарабатывать (амплифицировать) сколь угодно большое число интересующих последовательностей ДНК.

Для проведения ПЦР обычно требуются следующие компоненты (рис. 1, а):

- *анализируемый образец* — ДНК-матрица, содержащая участок ДНК, который требуется амплифицировать;

- *праймеры* — парные искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 звеньев, комплементарные концевым участкам изучаемого фрагмента ДНК; играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации; правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы; после гибридизации матрицы с праймером (отжиг) последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы; важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер—матрица, которая определяется как температура, при которой праймер присоединился к половине возможных сайтов связывания;

- *термостабильная ДНК-полимераза* — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК; фермент достраивает с 3'-конца вторую цепь ДНК согласно принципу комплементарности;

- *дезоксинуклеотидтрифосфаты* ($dATP$, $dTTP$, $dGTP$ и $dCTP$) — материал, необходимый для достраивания второй цепи ДНК;

- *буферный раствор* — создающий оптимальные условия для реакции (рН, ионная сила раствора).

ПЦР — это циклический процесс (рис. 1, б, в). Обычно каждый цикл амплификации состоит из трех этапов.

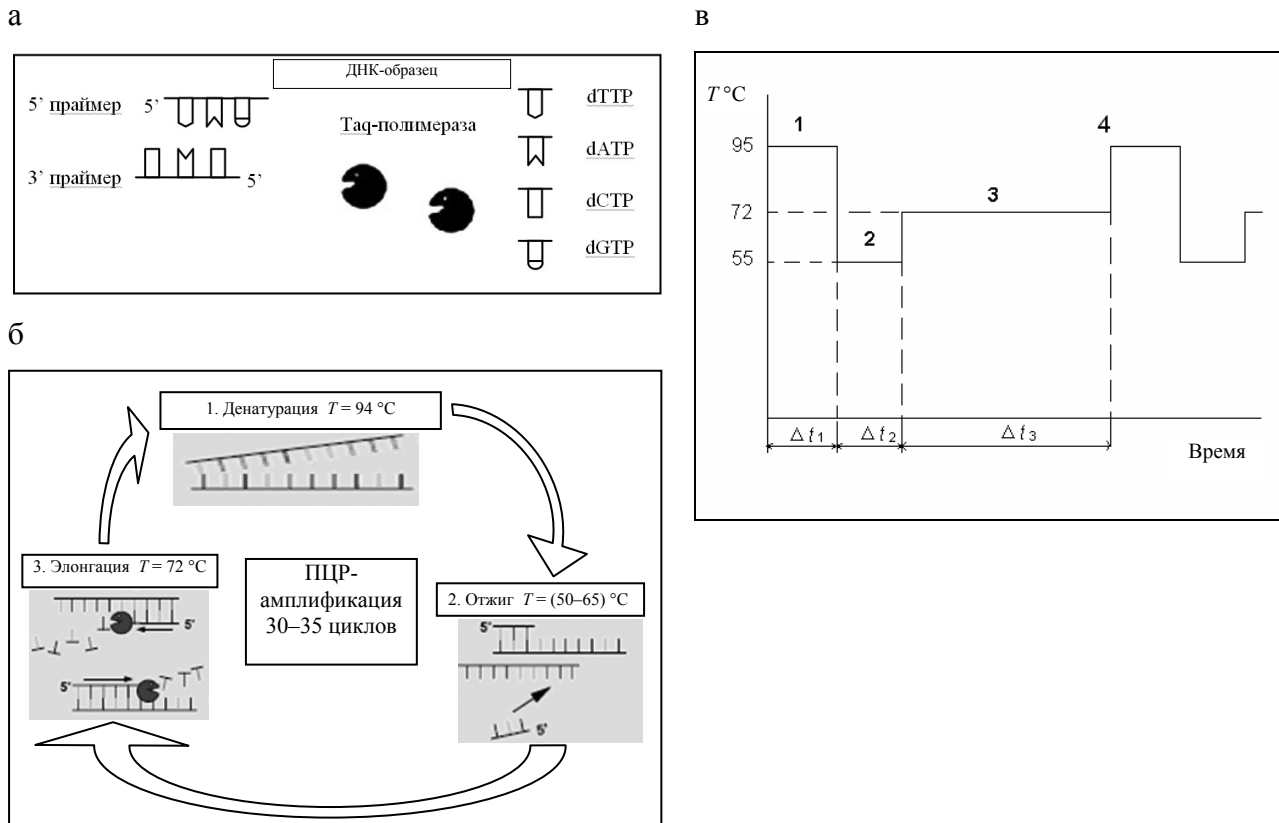


Рис. 1. Компоненты ПЦР-смеси (а), этапы ПЦР (б) и соответствующая им трехстадийная термоциклограмма (в): 1 — денатурация, 2 — отжиг, 3 — элонгация, 4 — конец первого цикла

1) На первом этапе происходит денатурация (denaturation) ДНК-мишени. Для этого реакционную смесь нагревают до $92-95^\circ\text{C}$, в результате чего нарушаются водородные связи между цепями ДНК и двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул (рис. 1, б (1)). Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение нескольких минут для полной денатурации матрицы и праймеров (*горячий старт*), что позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.

2) На втором этапе при понижении температуры праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени (рис. 1, б (2)). Этот процесс носит название "отжиг" (annealing) и происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина — цитозин. При отжиге формируются участки ДНК, которые будут копироваться. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на $4-5^\circ\text{C}$ ниже их температуры плавления. Время стадии отжига ($0.5-2$) мин. Неправильный выбор температуры

отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

3) На третьем этапе температуру реакционной смеси доводят до оптимума работы фермента ДНК-полимеразы, которая достраивает праймеры, присоединяя к ним нуклеотиды (рис. 1, б (3)). Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы. Этот этап называется элонгацией (elongation). Температура элонгации зависит от полимеразы, а время элонгации определяется как типом полимеразы, так и длиной амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов проводят дополнительную стадию *финальной элонгации* ($7-10$ мин), чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (рис. 1, б). Это позволяет нарабатывать нужное количество продукта реакции (ограниченного праймерами).

В первоначальном варианте метода после каждого цикла нагрев—охлаждение в реакционную смесь добавлялась ДНК-полимераза, т. к. она быстро инактивировалась при высокой температуре. Позднее метод был изменен за счет использования ДНК-полимеразы из термофильных бактерий, которая могла выдерживать множество циклов реакций [5]. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа Taq-полимеразой. Недостатком этой полимеразы является высокая вероятность внесения ошибочного нуклеотида, т. к. у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5' экзонуклеазная активность). Таким механизмом обладают Pfu-полимераза и Pwo-полимераза, выделенные из архей *Pyrococcus furiosus* и *Pyrococcus woesei*, что уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость их работы (процессивность) ниже, чем у Taq-полимеразы. В настоящее время применяют смеси Taq и Pfu, чтобы добиться высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования.

При обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований, а с помощью смеси различных полимераз с использованием добавок и при определенных условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20–40 тысяч пар нуклеотидов.

Простая ПЦР не пригодна для идентификации РНК, т. к. Taq-полимераза не способна катализировать синтез ДНК на матрице РНК. Был разработан метод обратной транскриптазы (reverse transcriptase, RT) ПЦР, в котором используется дополнительный фермент — РНК-зависимая ДНК-полимераза. Реакция, катализируемая этим ферментом, приводит к образованию однонитевых фрагментов ДНК, используемых в дальнейшем в амплификации Taq-полимеразой. Используется также и другая полимеразы — Tth-полимераза (выделенная из термофила *Thermus thermophilus*), которая в присутствии ионов марганца катализирует синтез на РНК однонитевой комплементарной ДНК.

Дальнейшим развитием метода ПЦР явилось создание мультипраймерной (мультиплексорной) ПЦР. В этой реакции осуществляется одновременная амплификация нескольких ДНК-матриц в одной реакционной среде с использованием нескольких пар праймеров, что позволяет проводить скрининг сразу по нескольким инфекционным возбудителям, определять одновременно наличие в биопробе комплекса факторов вирулентности и резистентности к антибактериальным и противовирусным препаратам и т. д. Известны и другие разновидности методов, основанных на ПЦР, например "гнездовая" ПЦР (*Nested PCR*), *In Situ PCR*, метод молекулярных колоний (*Polony-PCR Colony*) [6] и др.

Количественная оценка и верификация полу-

ченного продукта ПЦР могут быть проведены разными методами. Наиболее эффективными и широко распространенными являются: электрофоретическое разделение ампликонов в агарозном или полиакриламидном гелях, гибридационные методы (мечение пробы, дот-блоттинг), непосредственное маркирование нуклеотидов или праймеров, иммунологические методы и исследование в реальном времени. В наиболее благоприятном случае продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены методом электрофореза после 30–35 циклов. Но т. к. на эффективность амплификации значительное влияние оказывает степень чистоты исходного образца, т. е. наличие в реакционной смеси тех или иных ингибиторов, от которых избавиться иногда бывает крайне сложно, иногда даже не удастся амплифицировать нужное количество мишеней, чтобы правильно оценить исходное количество ДНК.

В коммерческом оборудовании (амплификаторе) ПЦР выполняется одновременно в десятках полипропиленовых пробирок (объем каждой от 0.2 до 1.5 мл), размещенных в специальном устройстве, обеспечивающем необходимые циклы нагрева и охлаждения. Существующие устройства для проведения ПЦР характеризуются низкими скоростями нагрева и охлаждения реакционной смеси при термоциклировании, что значительно удлиняет время анализа и повышает вероятность синтеза нежелательных побочных продуктов. Объемы реакционной смеси достаточно велики, что приводит к высокой стоимости анализа. Поэтому возможность уменьшения времени амплификации и объемов пробы представляет большой интерес. Современные микро- и нанотехнологии, микроэлектронная и микрофлюидная техники позволяют успешно создавать микроустройства и компактные приборы для реализации всех стадий ПЦР [7–15]. К преимуществам таких приборов можно отнести портативность; возможность создания однородных температурных полей в рабочей смеси; высокие скорости нагрева/охлаждения при термоциклировании, позволяющие увеличить экспрессность определения; значительное снижение расхода реагентов и образцов; меньшее потребление энергии; возможность объединения с микросистемами полного анализа и др.

1.1. ПЦР в реальном времени

Развитие методов диагностики генетического материала на основе ПЦР связано с созданием методов с регистрацией продукта в реальном времени (*Real-Time PCR*) [16, 17]. Методы позволяют детектировать продукты амплификации в процессе реакции и осуществлять мониторинг кинетики накопления ампликонов. В качестве детекторов

в основном применяются высокочувствительные люминесцентные приборы, регистрирующие сигналы эмиссии флуоресцентных зондов. Большинство созданных методов основано на гибридизации искусственно синтезированных зондов с продуктами амплификации. Регистрируя интенсивность флуоресценции на каждом цикле амплификации можно осуществить количественную оценку накапливаемых копий. Коммерческие приборы для ПЦР в реальном времени содержат помимо устройств нагрева и охлаждения специальные детекторы, позволяющие регистрировать аналитический сигнал образца, помещенного в полимерные пробирки. Как правило, такие приборы позволяют одновременно проводить анализ множества образцов.

Гомогенные методы, использующие ПЦР, могут быть разделены на два основных типа: неспецифические и специфические методы, которые также различаются по способам генерации флуоресценции.

К неспецифическим методам относятся методы с применением *интеркалирующих флуоресцентных агентов*, флуоресценция которых возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК и аналогичные Amplifluor [18], Lux [19]. В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто используют Ethidium bromide или SYBR Green. В реакционную смесь, содержащую фермент, буфер, dNTPs, SYBR Green I и праймеры, вносится ДНК-матрица, а затем начинается процесс термоциклирования (рис. 2, а) [20]. В ходе реакции при образовании двойных спиралей SYBR Green I участвует в связывании, и его флуоресценция возрастает.

При уровне флуоресценции выше фоновой (превышающей пороговый цикл) осуществляется количественная оценка исходного продукта. Достоинством неспецифических методов является высокий уровень аналитического сигнала, общая методология при анализе различных проб. Существенным недостатком методов является их неспецифичность (например, интеркалирующие красители связываются с любой двуцепочечной ДНК). Тем не менее существуют способы устранения этого недостатка, например оптимизация реакционной смеси. Неспецифические гомогенные методы не подходят для диагностических применений из-за высокой вероятности ложных положительных реакций, вызванных праймерами и другими неспецифическими ампликонами.

В специфических методах используются меченые флуоресцентными агентами *олигонуклеотидные зонды*, комплементарные участку PCR-продукта (технологии *TaqMan*, *Molecular Beacons*, *LightCycler*, *Scorpions*, *Beacons*, *Eclipse* и др.).

Технология *TaqMan* ПЦР основана на использовании 5'-экзонуклеазной активности полимеразы (рис. 2, б). В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды (*probe*), комплементарные участку амплифицируемой области и меченые на 5'-конце флуоресцентным красителем (R), а на 3'-конце — фосфатной группой и тушителем флуоресценции (Q). Так как тушитель расположен близко к флуоресцентной метке, то вследствие ферстеровского переноса энергии флуоресценция отсутствует, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

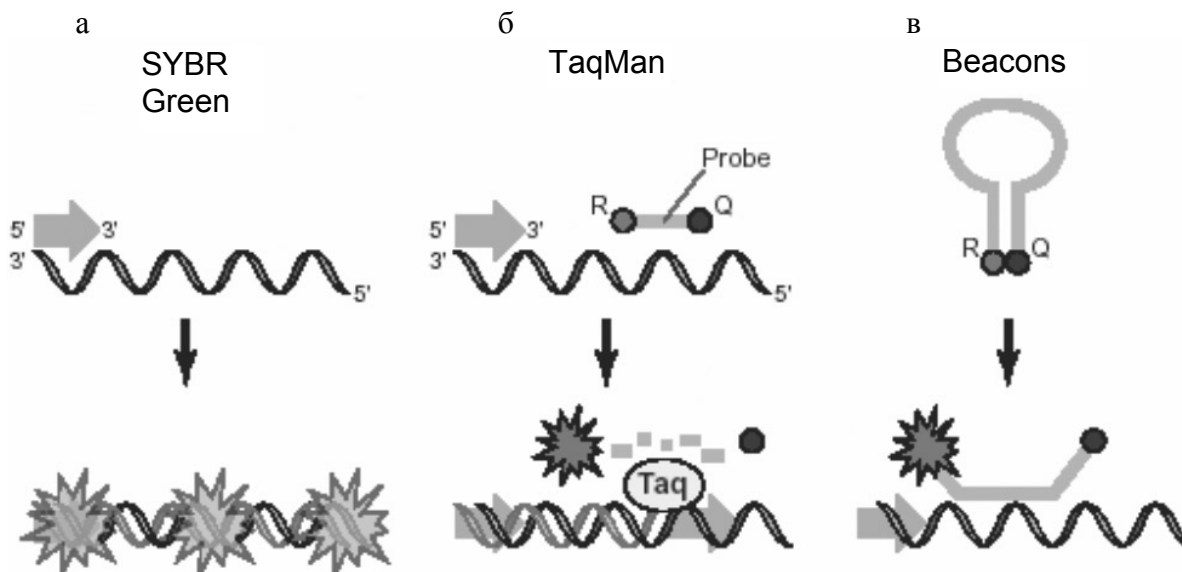


Рис. 2. Принципы действия SYBR Green I, TaqMan и Molecular Beacons в ПЦР [20]

При отжиге праймеров зонд связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибризованного с зондом, начинает расщеплять зонд за счет 5'-экзонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка пространственно отделяется от гасителя, и ее свечение может быть зарегистрировано. Чем больше ПЦР-продукта нарабатано, тем более интенсивной будет флуоресценция. Этот метод позволяет достигнуть высокого уровня аналитического сигнала, достаточно прост в применении, но имеет высокий уровень фона и не всегда позволяет различать близкие последовательности.

Особенностью технологии *Molecular Beacons* является то, что концы зонда (на которых находятся метка и тушитель флуоресценции) комплементарны друг другу. При температуре отжига праймеров они "схлопываются" и образуют замкнутую структуру типа "петли" таким образом, что зона комплементарности зонда с матрицей находится внутри петли (рис. 2, в), при этом обеспечивается тушение флуоресценции метки. При гибридизации зонда с матрицей вторичная структура разрушается, метка и тушитель расходятся в разные стороны, и возбужденная метка начинает флуоресцировать. Недостатком метода является относительно медленная кинетика процесса, приводящая к низкому уровню сигнала.

В методе *LightCycler* используется два флуоресцентно-меченых зонда. Принцип метода за-

ключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3'-конце первого зонда, ко второму флуорофору, находящемуся на 5'-конце второго зонда, который имеет место в том случае, когда расстояние между флуорофорами составляет $\sim(1-3)$ нуклеотида (рис. 3) [21]. При этом наблюдается изменение спектра и интенсивности флуоресценции, которые и являются аналитическим сигналом. Метод обладает высокой чувствительностью.

В методе *Scorpions* (рис. 4) используются бифункциональные молекулы, содержащие праймер, ковалентно связанный с элементом зонда, флуорофор и тушитель. В начальном состоянии тушитель гасит флуоресценцию метки. При проведении ПЦР тушитель и флуорофор пространственно разделяются, что приводит к возникновению флуоресценции. Особенности метода являются: высокое отношение сигнал/шум, превосходное разрешение последовательности, относительно простой, но достаточно долгий синтез зондов [22].

В зависимости от цели проведения ПЦР может быть осуществлена оптимизация процессов реакции, которая производится по следующим параметрам: а) температурный профиль реакции, б) временной профиль реакции, в) состав реакционной смеси.

Все вышеперечисленные методы вполне могут быть использованы в микрочиповом формате ПЦР.

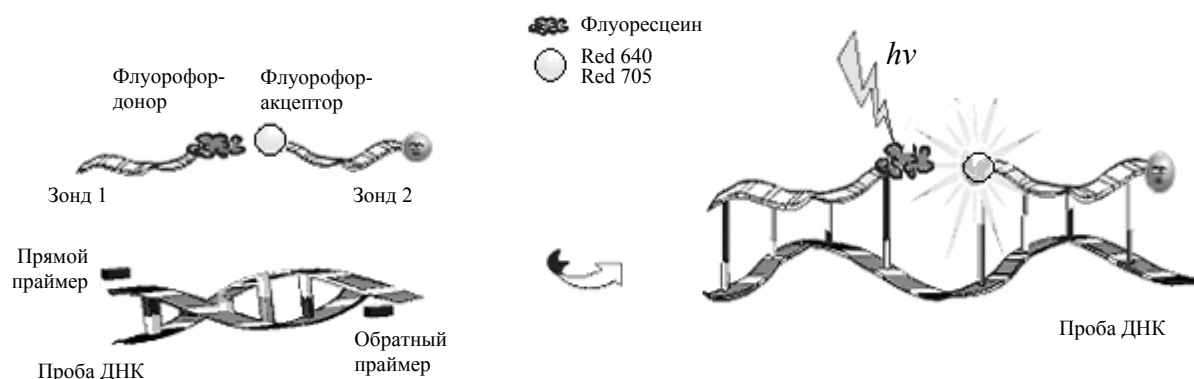


Рис. 3. Принцип LightCycler [21]

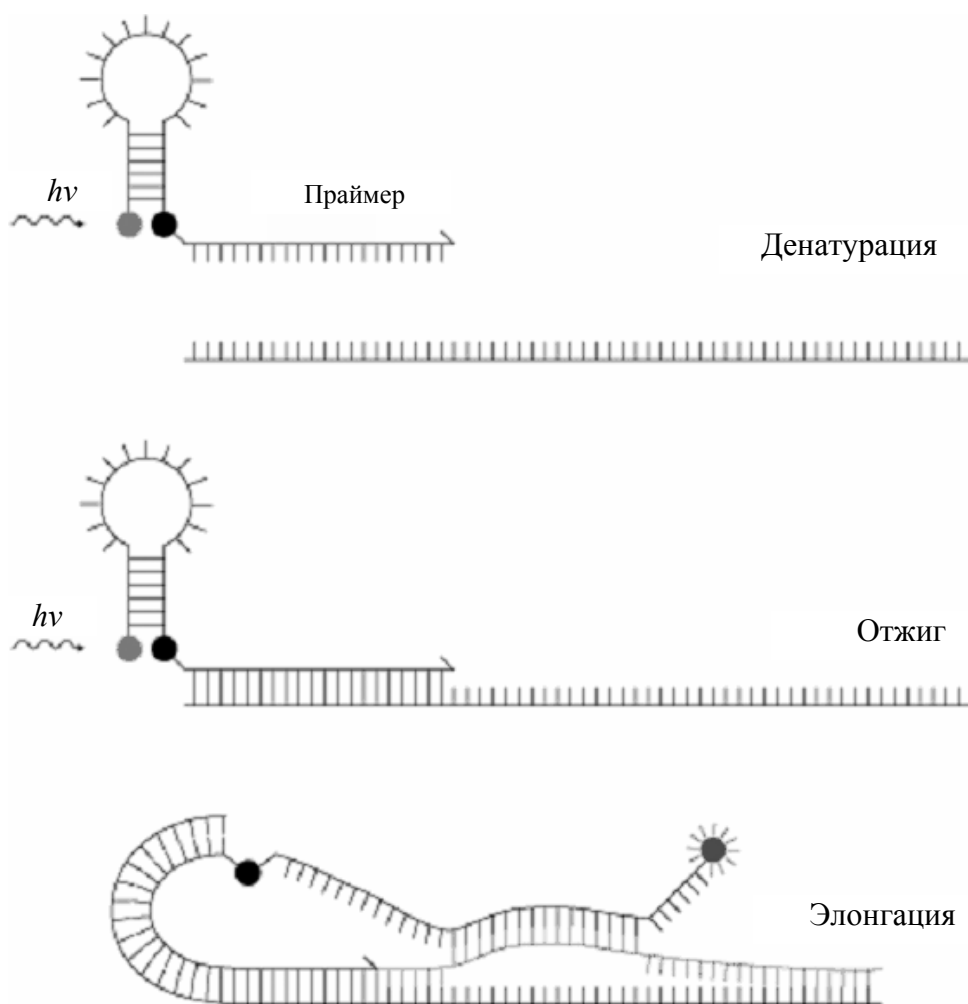


Рис. 4. Принцип метода Scorpions [23]

1.2. Аналитический сигнал ПЦР в реальном времени

ПЦР — биохимическая реакция, в ходе которой происходит образование продукта. Так как образование продукта реакции происходит циклически, то теоретическое количество получаемого продукта возрастает пропорционально 2^n , где n — число циклов реакции. Но в ходе ПЦР происходит истощение реагирующих компонентов, инактивация фермента и т. п. Поэтому в действительности эффективность цикла амплификации меньше 100 % (по некоторым данным — 78–98 %), а в присутствии ингибиторов реакции и того меньше. Фактически количество A специфического продукта может быть выражено уравнением

$$A = M(1 + E)^n,$$

где M — начальное количество ДНК-мишеней,

E — значение эффективности цикла реакции (амплификации).

Процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность падает, что связано с так называемым эффектом "плато".

Образование специфического продукта вызывает изменение аналитического сигнала (обычно интенсивности флуоресценции). Изменение интенсивности флуоресценции в процессе ПЦР характеризуется кинетической кривой флуоресценции (изменение флуоресценции в зависимости от количества циклов амплификации). В общем случае кривая имеет сигмовидную форму (рис. 5) и на ней можно выделить:

- 1) стадию инициации (ground phase, baseline),
- 2) экспоненциальную стадию (exponential phase),
- 3) плато (plateau phase).

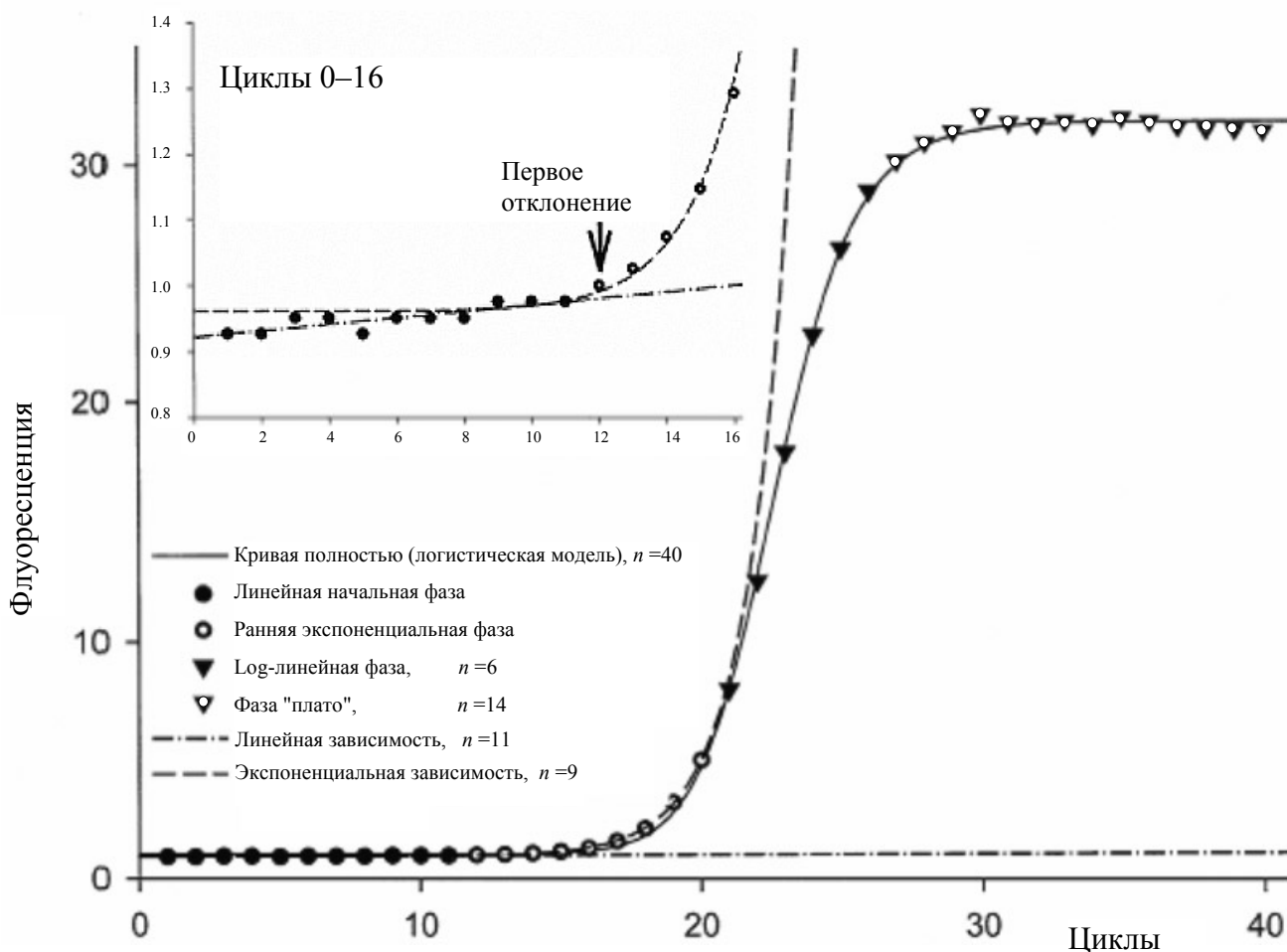


Рис. 5. Зависимость сигнала флуоресценции от количества циклов амплификации [24]

На первой стадии продукты реакции еще не детектируются, регистрируемый сигнал соответствует уровню наблюдаемого фона. В большинстве случаев этот сигнал может быть описан линейной зависимостью.

На второй стадии наблюдается экспоненциальная зависимость флуоресценции от количества циклов. В некоторых случаях она разбивается на две стадии — early exponential phase и log-linear phase [24]. Третий участок зависимости отражает стадию насыщения. Сигнал меняется слабо, иногда даже уменьшается.

Если на полученной экспериментальной зависимости выражены все три стадии, то это дополнительно может свидетельствовать о правильности измерений (анализа), хотя в некоторых случаях возможно отклонение формы кривой от сигмовидной (например, отсутствие стадии насыщения может проявляться при работе со сверхмалыми концентрациями субстрата).

Экспоненциальная стадия реакции может быть описана уравнением

$$P_n = P_0 \cdot E^n,$$

где P_n — количество образующихся молекул продукта (флуоресцирующих молекул) на n -цикле амплификации; P_0 — исходное количество молекул, содержащих амплифицируемый фрагмент; E — эффективность амплификации. В идеальных условиях $E = 2$, т. е. на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта. После логарифмирования уравнение может быть приведено к виду

$$n = -\log P_0 / \log E + \log P_n / \log E.$$

Если выбрать некоторый достоверно регистрируемый прибором уровень флуоресцентного сигнала P_C и определить, какому циклу ПЦР соответствует момент достижения заданного уровня, то можно найти *исходное* количество молекул, со-

державших амплифицируемый фрагмент. Пороговый цикл (threshold cycle, $C(T)$) определяется как цикл n_1 , на котором достигается заданный уровень индуцированной флуоресценции — пороговая флуоресценция $P_{C(T)}$:

$$n_1 = C(T) = -\log P_0 / \log E + \log P_{C(T)} / \log E. \quad (1)$$

Такой подход позволяет сравнивать количество исходных молекул в пробах, содержащих амплифицируемый фрагмент, при условиях одинаковой эффективности амплификации и постоянстве заданного уровня пороговой флуоресценции. Выбор уровня пороговой флуоресценции определяет чувствительность измерений. Поэтому этой процедуре уделяется особое внимание. Выбор порога может производиться по превышению над стандартным отклонением кинетической кривой или по второй производной кинетической кривой. Иногда выбор осуществляется методом экспертной оценки, но в этом случае он носит субъективный характер. Из уравнения (1) также следует, что результаты ПЦР с выбранными праймерами и стандартным разведением исходного материала должны ложиться на прямую в координатах $C(T) - \log P_0$ (рис. 6). Эффективность амплификации E можно определить из угла наклона прямой.

При обработке данных ПЦР в реальном времени используют два подхода: а) метод "калибро-

вочного графика" (построение градуировочной зависимости) [25] и б) метод прямого сравнения данных. Методы определения эффективности амплификации, выбора порогового уровня и обработки данных ПЦР-анализа освещены в работах [26–35].

Для дополнительного контроля качества проведения ПЦР используют кривые плавления, которые определяются в диапазоне температур отжига—денатурации. Кривые позволяют выявить циклы, на которых появляются неспецифичные продукты. Кривые строятся и анализируются в координатах: скорость изменения интенсивности флуоресценции—температура [2, 36].

2. РЕАЛИЗАЦИЯ ПЦР НА МИКРОЧИПЕ

Как уже упоминалось ранее, возможность использования микрочиповых технологий позволяет создать новые устройства и приборы, обладающие рядом полезных преимуществ по сравнению с классическими приборами. Однако разработка и изготовление микрочиповых устройств связаны с целым рядом технических и методических проблем, которые решены в той или иной степени. Так, например, значительное уменьшение объемов анализируемой пробы приводит к существенному

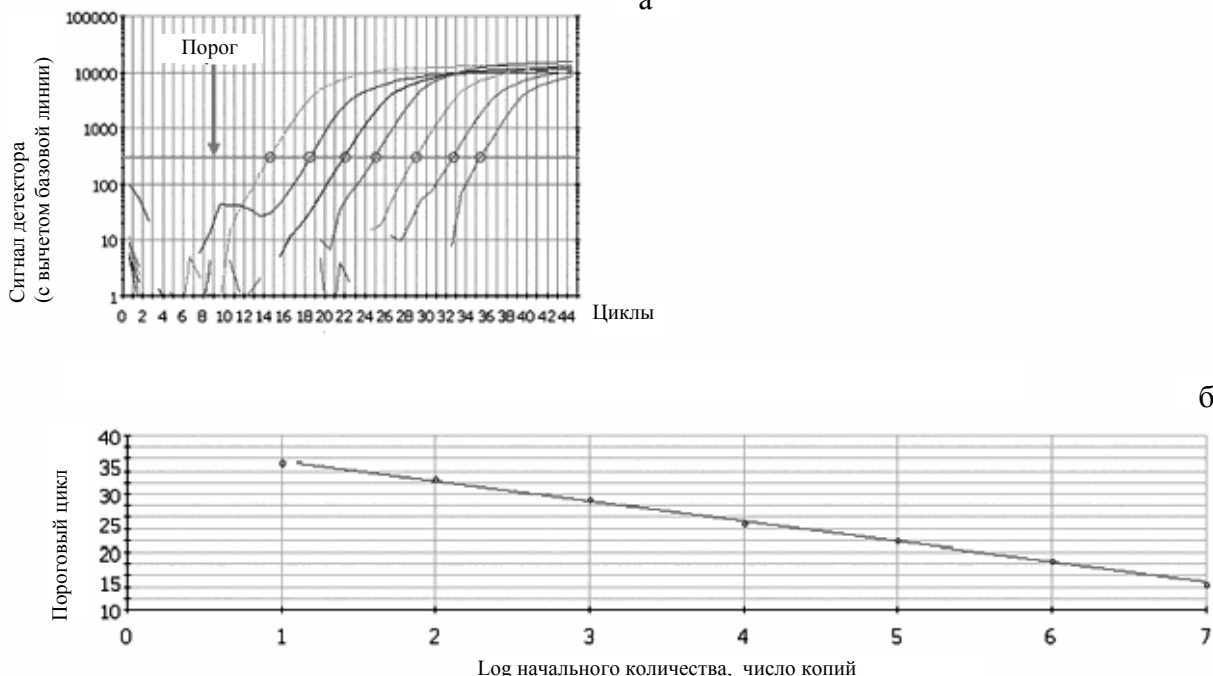


Рис. 6. Построение градуировочной зависимости по стандартным разведениям исходного образца [25]. а — сигнал детектора; б — построенная градуировочная зависимость: коэф. корреляции 0.999, наклон -3.488 , точка пересечения 39.204, аппроксимация $y = -3.488x + 39.204$

ухудшению соотношения сигнал/шум, к проблемам ввода пробы в реакционную камеру, влиянию поверхности реакционной камеры на ход реакции и т. д. Некоторые основные проблемы, возникающие при реализации ПЦР на микрочипе, будут рассмотрены ниже.

2.1. Архитектура и конструкции ПЦР-микрочипов

Используя микроструктуры (каналы, реакторы, сосуды), полученные методами микро- и нанотехнологий, для рабочих камер ПЦР-микрочипов удается получить высокое соотношение поверхность/объем, что делает возможным осуществлять быстрый и эффективный теплообмен. Однако при этом существенное влияние на ход ПЦР оказывают свойства поверхности реактора.

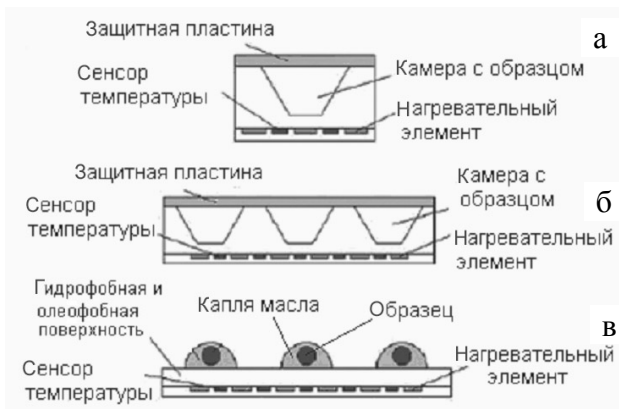


Рис. 7. Микроустройства для ПЦР со стационарными реакционными камерами [15]: а — однокамерное, б — многокамерное, в — с виртуальными камерами

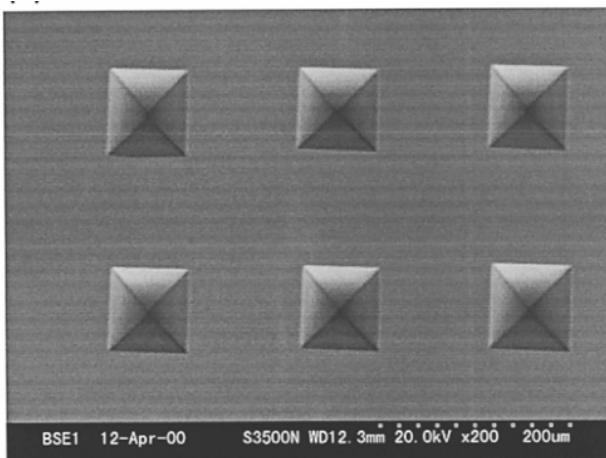


Рис. 8. Кремниевый мультикамерный микрочип со стационарными микрокамерами объемом 85 пл для ПЦР [37]

Микроустройства для проведения ПЦР условно можно разделить на несколько типов: по принципу и механизму нагревания реакционной смеси (прямое нагревание камеры, нагрев смеси в потоке, конвективное нагревание, нагревание электромагнитным (световым) излучением) и способам транспортировки реакционной смеси [38]. К первому типу относятся системы со стационарными реакционными камерами. Температура таких камер меняется в течение одного цикла амплификации. Первый ПЦР-чип, основанный на такой стационарной камере, был предложен Northrup и соавторами в 1993 г. (рис. 7, а) [39]. С тех пор этот формат широко копировался, дорабатывался и улучшался [40]. Чтобы повысить производительность, были разработаны мультикамерные ПЦР-чипы (рис. 7, б, и рис. 8) [41–43]. Пожалуй, самыми важными проблемами функционирования таких систем являются: получение однородных управляемых температурных полей и необходимость предотвращения перекрестного переноса материала образцов (контаминации) из соседних камер.

Neuzil и соавторы предложили совершенно иной подход при создании камер для проб малого объема, используя специально организованную гидрофобную/олеофобную поверхность таким образом, чтобы копия ПЦР-смеси оказалась внутри другой капли большего объема, служащей в качестве реакционной камеры [44, 45]. В этом случае каждую каплю ПЦР-образца, помещенную на такую поверхность, покрывали каплей минерального масла, создавая виртуальную реакционную камеру (рис. 7, в).

Ко второму типу ПЦР-чипов относятся проточные микрофлюидные чипы, в которых амплификация происходит, когда реакционная смесь прокачивается по микроканалу через соответствующие температурные зоны. Один из таких проточных вариантов чипов для проведения ПЦР, основанный на использовании микроканала, проходящего через три различные температурные ванны, был предложен Nakano с соавторами в 1994 г. (рис. 9, а) [46]. Усовершенствованный вариант конструкции проточного микрофлюидного чипа приведен на рис. 10 [47]. В 1998 г. Корр с соавторами сообщили о микрофлюидном ПЦР-чипе с серпантинным каналом, который проходит через три термостабильных блока (рис. 9, б) [48]. В отличие от ПЦР-микрочипов со стационарными камерами в микрофлюидных ПЦР-чипах тепловая инерция системы сведена к минимуму, т. к. определяющей является термическая масса ПЦР-смеси. Время изменения температуры зависит только от скорости потока реакционной смеси и времени достижения термического равновесия. Созданию стабильных во времени и высокоскоростных потоков жидкости уделяется особое внимание. Применение насосов, как правило, шприцевых, приводит

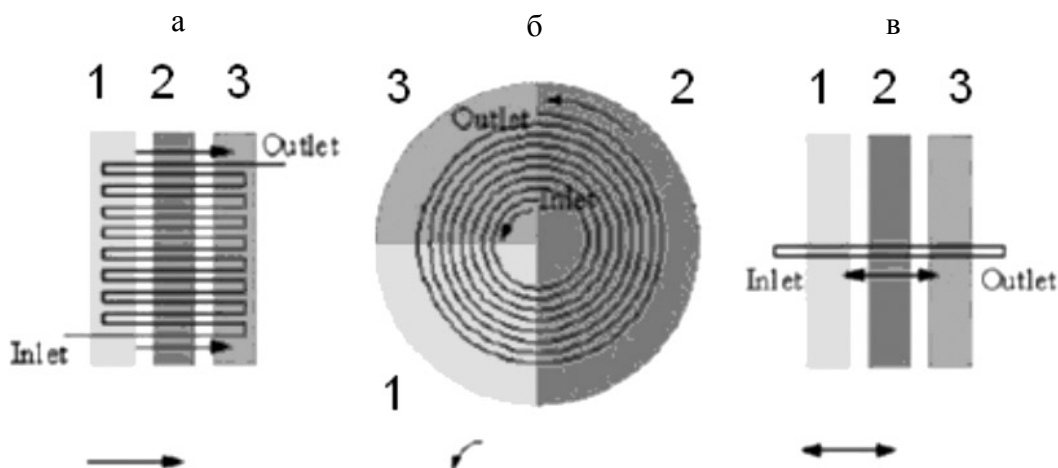


Рис. 9. Варианты проточных микрофлюидных чипов для ПЦР [15]. Образец последовательно проходит через три температурные зоны: 1 — денатурации, 2 — элонгации, 3 — отжига. Стрелки указывают направление движения пробы. Inlet, Outlet обозначены соответственно точки ввода и вывода пробы

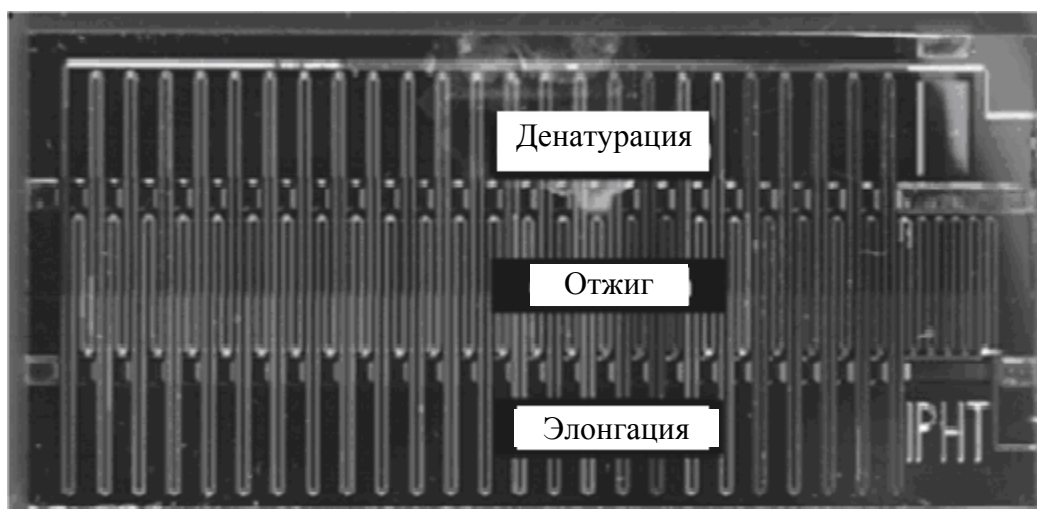


Рис. 10. Проточный микрофлюидный чип для ПЦР [47]. Поток с пробой проходит через три температурные зоны 25 циклов

к удорожанию систем. Поэтому предпринимаются усилия по созданию доступных и простых микроустройств, формирующих потоки. Примером подобных разработок являются "феррофлюидные" микрочипы для ПЦР, в которых жидкость, содержащая магнитные частицы, под действием магнитного поля продвигает ПЦР-смесь через три температурных зоны [49]; микромембранные перистальтические насосы для движения капелек смеси [50]; микрочипы с электрокинетическим управлением потоком [51]. Проточный вариант ПЦР имеет ряд недостатков: образование пузырьков воздуха в микроканалах неблагоприятно влия-

ет на ход ПЦР; управляемый давлением поток имеет параболический профиль, что приводит к размытию образца; скорость, с которой реакционная смесь перемещается между различными температурными зонами, достаточно трудно регулировать и контролировать. Для преодоления этих недостатков используют различные приемы [52], а иногда альтернативные подходы. Так, например, Накаюма с соавторами предлагают предотвращать образование пузырьков воздуха в микроканалах путем ввода капли вязкого масла непосредственно перед загрузкой ПЦР-смеси [53]. В работах [54, 55] исследованы механизмы образования

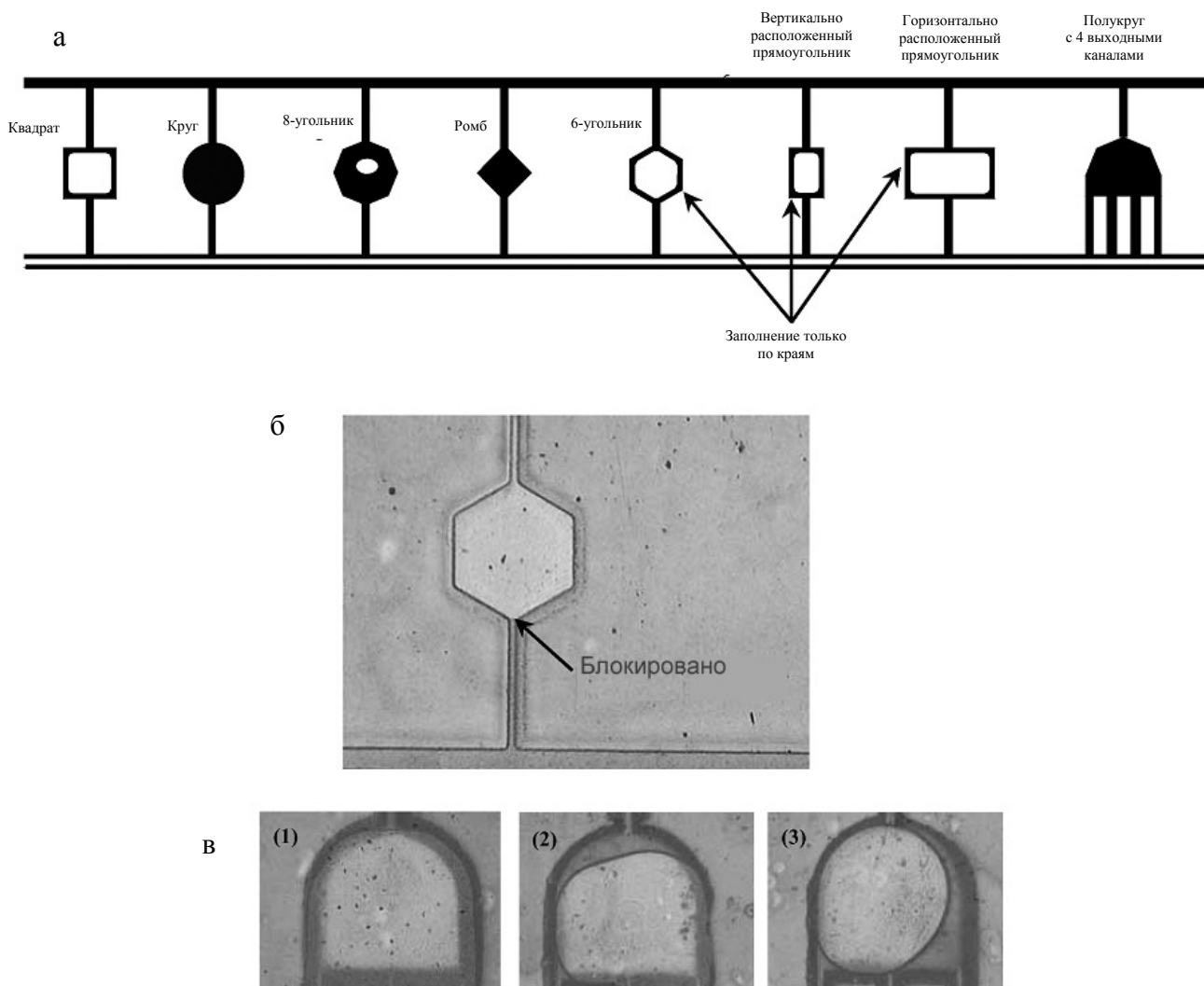


Рис. 11. Загрузка образцов пробы [55].

а — влияние формы микрореакторов на заполнение пробой; темный цвет указывает на область, заполненную образцом; микрореакторы с формами квадрата, шестиугольника, прямоугольника только частично заполнены в области около боковых стенок.

б — неудачная загрузка образца: образец заполнил камеру, но не заполнил канал; это обусловлено малыми размерами канала и недостаточной гидрофильностью поверхности.

в — видеоснимки жидкости, загружающейся в реакционную камеру

пузырьков в микрореакторах с разной геометрией и подводными каналами (рис. 11), выполненных в полидиметилсилоксане и стекле, а также предложены некоторые способы подавления этого эффекта. Многообещающими являются так называемые методы "цифровой микрофлюидики" (digital microfluidics), которыми осуществляется формирование пузырьков ПЦР-смеси и их транспортировка через термические зоны [56]. В проточных ПЦР-микрочипах с каналами в виде спирали или серпантина трудно реализовать одновременную

амплификацию большого числа проб, т. к. это значительно усложняет архитектуру и конструкцию чипа [57]. В работах [58–60] авторы предлагают микрочип с линейным каналом, по которому поток циклически прокачивается в прямом и обратном направлениях, каждый раз проходя через три температурные зоны (рис. 9, в). Это позволяет осуществлять одновременно параллельную амплификацию множества проб.

Итак, на текущий момент времени наиболее перспективными архитектурами и конструкциями

микрочипов для ПЦР, позволяющими достигнуть высоких скоростей нагрева и охлаждения в мультиреакторных системах, являются конструкции, использующие виртуальные стационарные реакционные камеры и проточные системы с "цифровой микрофлюидикой".

2.2. Материалы для микрочипов

Большинство ПЦР-микрочипов изготавливают из кремния [61, 62], стекла [63] или в сочетании кремний—стекло [37]. В настоящее время наметилась устойчивая тенденция широкого применения полимерных материалов в конструкциях микрочипов для ПЦР. Наиболее применяемыми являются: полидиметилсилоксан (poly(dimethylsiloxane) PDMS), поликарбонат (polycarbonate, PC), полиметилметакрилат (poly(methyl methacrylate) PMMA), полиэтилентерефталат (poly(ethylene terephthalate) PET), полиимид (polyimide, PI), SU-8, parylene C (poly(paraxylene)) и т. д. Каждый материал обладает различными свойствами и поэтому имеет свои преимущества и недостатки.

Кремний. Основным преимуществом кремния является его высокая теплопроводность, что обеспечивает высокую скорость термоциклирования при амплификации. Способы обработки кремния хорошо известны (например, в микроэлектронной промышленности), а процессы изготовления изделий из кремния достаточно отработаны для того, чтобы получать любые сложные структуры микрометровых размеров с необходимой точностью. Например, методом фотолитографии и кислотного травления в кремниевых подложках могут быть сформированы структуры (каналы и реакторы) размером от нескольких до сотен микрометров, с шероховатостью около 50 нм. Более высокое разрешение можно получить, применяя методы ионно-реактивной обработки (разрешение до десятков нанометров). Герметизация каналов и реакторов обработанных кремниевых пластин может быть осуществлена термическим способом (температура от 200 до 700 °С) и методом анодного связывания (при напряжении 250–1500 В). Хорошо отработаны способы термического связывания кремний—стекло (пирекс). Но высокая теплопроводность ($\sim 163 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$) этого материала приводит к необходимости хорошей термоизоляции, что усложняет конструкцию микрочипа. Кроме того, чистый кремний ингибирует ПЦР [64]. Поэтому необходимо применять специальные меры по предотвращению ингибирования, например использовать специальные покрытия (силанизация поверхности и создание динамических покрытий) [65, 66]. Непрозрачность кремния накладывает ограничения на использование методов оптического детектирования, а его электропроводность затрудняет применение электрокинетических способов

разделения пробы в случае объединения процессов амплификации и электрофоретического разделения на одном чипе.

Методы оптического детектирования позволяют осуществлять высокочувствительное обнаружение и количественную оценку продуктов ПЦР непосредственно в процессе реакции, что является весьма привлекательным при создании аналитических приборов и систем. В этом случае используются прозрачные материалы, такие как стекло, кварц, полимеры.

Кварц и стекло. Эти материалы являются оптически прозрачными в достаточно широкой области спектра, что позволяет использовать практически оптические методы детектирования, в том числе и флуоресцентные методы. Обработка кварца несколько сложнее, чем стекла. Следует также отметить широкий ассортимент марок стекол, что дает возможность выбора материала с требуемыми свойствами. К тому же электроосмотические свойства кварца и стекла позволяют реализовать электрофоретические методы разделения пробы или продукта реакции в одной конструкции микрочипа. Технологии обработки кварца и стекол схожи с технологиями обработки кремния [67]. Коэффициент теплопроводности стекол ниже, чем кремния, и лежит в интервале ($0.51\text{--}1.28 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$), что вполне позволяет обеспечить высокоэффективный и быстрый процесс амплификации (см., например, [63]). Герметизация стеклянных микрочипов может быть осуществлена методами термического связывания (при температуре 500–1050 °С), анодного связывания (температура 70–500 °С, напряжение 50–1200 В) (рис. 12), склеивания полимерными композициями (в том числе и фотоотверждаемыми полимерами), методом глубокого оптического контакта (ГОК) и др. [68–72].

Встречаются конструкции гибридных чипов, в которых используются кремниевые пластины

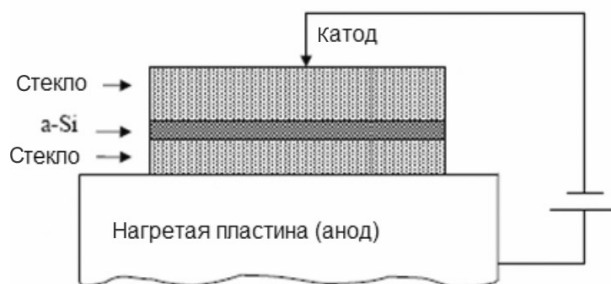


Рис. 12. Анодное связывание стеклянных пластин [73]

с микрореакторами и каналами, а в качестве защитной пластины используется стеклянная пластина, соединяемая с кремниевой методом анодного связывания. В таких конструкциях необходимой является обработка поверхности с целью предотвращения ингибирования [74, 75]. Существенным недостатком ПЦР-микрочипов как на основе кремния, так и на основе кварца и стекла является их высокая стоимость. Поэтому такие микрочипы обычно многократно используются после специальных методов очистки — регенерации. В случаях, когда необходимо однократное применение микрочипа, более целесообразным является использование полимерных материалов.

Полимеры. Полимерные материалы получили широкое распространение в приборостроении благодаря не только низкой себестоимости, но и простоте массового производства и относительно низкой его стоимости, что позволяет создавать одно-разовые чипы. Использование полимерных материалов упрощает процессы утилизации отработанных изделий. Для таких материалов разработано множество доступных технологий формирования микроструктур, которые можно разбить на следующие большие группы: методы прямого

изготовления (лазерная абляция, прецизионное микроизготовление, некоторые виды литографии, например стереолитография), методы изготовления с применением масок и шаблонов (плазменная обработка, рентгеновская литография, варианты лазерной абляции) и методы с использованием мастер-форм (горячее тиснение, инжекционное литье, формование, LIGA-технологии и т. д.) (рис. 13) [76–78].

Технологии обработки полимерных материалов позволяют формировать микроструктуры с различным разрешением. Некоторые основные характеристики методов приведены в таблице.

Более простыми являются и способы герметизации каналов и реакторов. Обычно используются способы термического связывания (но при более низких температурах, чем в случае кремниевых и стеклянных материалов), склеивание полимерными композициями (в том числе и фото- или термоотверждаемыми клеями), ламинирование, герметизация скотчами и др. Полимеры имеют более низкий, чем у стекла, коэффициент теплопроводности ($0.1-0.3 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ [79]), что, конечно же, оказывает влияние на скорости нагрева и охлаждения ПЦР-смеси.

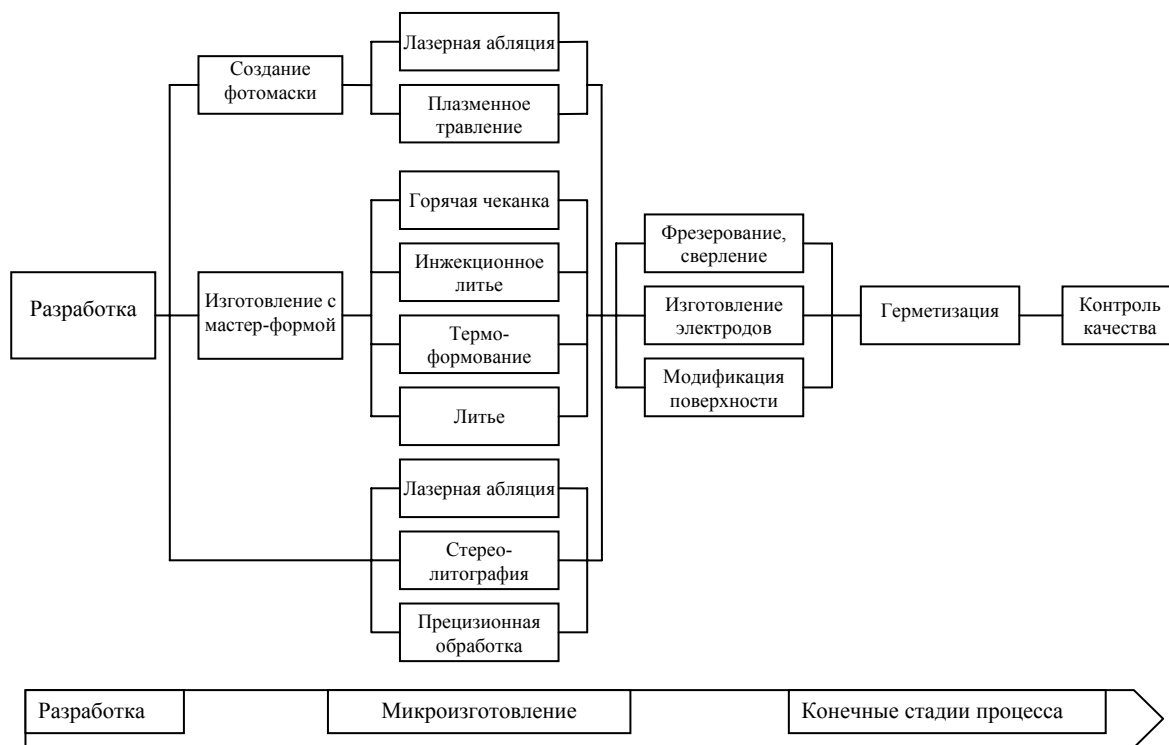


Рис. 13. Основные этапы и стадии формирования микроструктур в полимерах [77]

Размеры микроструктур в полимерных материалах, формируемые различными методами [80]

Метод	Толщина	Минимальный разрешаемый размер	Максимальное аспектное соотношение (глубина/ширина)	Нормальное аспектное соотношение
Контактная УФ-литография	До 1 мм	1 мкм	100 : 1	10 : 1
Рентгеновская литография	До нескольких мм	1 мкм	1000 : 1	20 : 1
Электронно-пучковая литография	Несколько мкм	10 нм	2 : 1	1 : 1
Лазерная абляция	До ~ 100 мкм	< 1 мкм	2 : 1	1 : 1
Гравировка	До ~ 100 мкм	Несколько мкм	20 : 1	1 : 1
Формование	До 1 мм	10 нм	10 : 1	2 : 1
Горячее тиснение	— » —	10 нм	10 : 1	2 : 1
Инжекционное литье	— » —	1 мкм	2 : 1	1 : 1

Полидиметилсилоксан (ПДМС) — (наиболее часто используется марка Sylgard) недорогой эластомерный материал, обладающий хорошей оптической прозрачностью и лучшей биосовместимостью, чем кремний. Устойчив к кислотам и щелочам. Коэффициент теплопроводности $0.17 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$. Способность адсорбировать компоненты реакционной ПЦР-смеси у ПДМС выражена в наименьшей степени по сравнению с другими материалами. Поэтому его используют для модификации поверхности кремния и стекла с целью исключения возможного ингибирующего действия этих материалов на ПЦР [81]. ПДМС позволяет создавать простые и дешевые чипы однократного применения [82]. Однако проницаемость ПДМС может привести к потерям биологического образца. Кроме того, на поверхности ПДМС из-за его гидрофобности могут образовываться пузырьки воздуха, адсорбироваться энзимы и элементы смеси. Адсорбционная способность может быть изменена путем добавления поливинилпирролидона (polyvinylpyrrolidone, PVP) в ПЦР-смесь [83]. А главный недостаток — пористость ПДМС — может быть устранен путем покрытия полимера пленкой парилена, имеющей низкую влагопроницаемость и долговременную температурную стабильность [84].

Полиметилметакрилат (ПММА) (марки Perspex, Plexiglas, ТОСП и др.) обладает самой хорошей биосовместимостью. Адсорбция белков и ДНК на поверхность ПММА минимальна. Этот полимер оптически прозрачен, имеет меньшую собственную флуоресценцию, чем другие полимеры (например, поликарбонат). Хорошо поддается различным видам обработки. Например, методом лазерной абляции можно сформировать структу-

ры, пригодные для ПЦР-амплификации [85]. Однако низкая температура стеклования полиметилметакрилата $T_g = 85\text{--}105 \text{ }^\circ\text{C}$ приводит к ряду неудобств, препятствующих широкому применению таких чипов. Устойчив к кислотам, щелочам, маслам. Коэффициент теплопроводности ПММА $(0.16\text{--}0.24) \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ [86].

Поликарбонат (ПК) является наиболее привлекательным материалом для ПЦР-устройств (марки: Makrolon, Calibre, Lexan, Trirex). Он устойчив к спиртам и кислотам, имеет температуру стеклования $125\text{--}150 \text{ }^\circ\text{C}$, обладает хорошей прозрачностью в широком спектральном диапазоне. Коэффициент теплопроводности ПК — $0.19 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ [86]. Большой ассортимент марок ПК, различная их биосовместимость создают препятствия для широкого применения. Но тем не менее ПК успешно применяется для создания ПЦР-микрочипов [87–89].

Полимер SU-8 (IBM-Watson Research Center, Yorktown Height, USA), специально разработанный для микроэлектроники, в 1996 г. был адаптирован для применений в МЭМС (EPFL-Institute of Microsystems and IBM, Zurich). SU-8 — макромолекула, содержащая 8 эпоксидных групп, негативный фотополимер. Может быть толщиной до 2 мм. Методами стандартной УФ-литографии получено аспектное соотношение для формируемых структур (глубина/ширина) около 25. Может обрабатываться плазмо-химическими методами, химическим травлением и т. д. Устойчив к кислотам, щелочам, большинству растворителей. Температура стеклования $210 \text{ }^\circ\text{C}$. Этот материал нашел широкое применение при создании лабораторных уст-

ройств для микроаналитической техники, МЭМС и, в частности, для систем ПЦР [80, 90, 91].

В работе [92] изучены вопросы взаимодействия компонентов ПЦР-смеси с поверхностью некоторых полимерных материалов при разном времени реакции и различных площадях контактной поверхности. Наблюдались процессы адсорбции индивидуальных компонентов смеси, флуоресцентного маркера и ДНК на поверхность материалов, что оказывало влияние на ПЦР. Следовательно, необходимо проверять химическую совместимость применяемых материалов для реакционных камер и компонентов ПЦР-смеси.

Таким образом, в настоящее время самыми используемыми материалами при создании реакционных камер для ПЦР являются кремний и стекло, но эти материалы постепенно заменяются полимерными материалами и композициями, среди которых особо выделяются ПДМС, ПК и SU-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. Studies on Polynucleotides: XCVI. Repair Replications of Short Synthetic DNA's as Catalyzed by DNA Polymerases // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 56, N 2. P. 341–361.
2. Kaltenboeck B., Wang C. Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics // *Adv. in Clin. Chem.* 2002. V. 40. P. 219–259.
3. Brandner D.L. PCR-Based Detection of Genetically Modified Foods // *Tested studies for laboratory teaching* / Ed. M.A. O'Donnell. Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). 2002. V. 23. P. 69–84.
4. Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization / Ed. Ian M. Mackay. Caister Academic Press, 2007. 454 p.
5. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase // *Science*. 1988. V. 239. P. 487–491.
6. Четверина Е.В. Молекулярные колонии. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2007. 44 с.
7. Carles M.C., Sucher N.J. Polymerase Chain Reaction on Microchips // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 321. P. 131–140.
8. Zhang C., Xu J., Ma W., Zheng W. PCR Microfluidic Devices for DNA Amplification // *Biotechnol. Adv.* 2006. V. 24, N 3. P. 243–284.
9. Krishnan M., Namasivayam V., Lin R., et al. Microfabricated Reaction and Separation Systems // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. P. 92–98.
10. Schneegaß I., Köhler J.M. Flow-Through Polymerase Chain Reactions in Chip Thermocyclers // *Rev. Mol. Biotechnol.* 2001. V. 82, N 2. P. 101–121.
11. De Mello A.J. DNA Amplification: does 'Small' Really Mean 'Efficient'? // *Lab. Chip*. 2001. V. 1, N 2. P. 24N–29N.
12. Raymond M.Jr. MEMS for Bio-Assays // *Biomed. Microdevices*. 2002. V. 4, N 2. P. 77–87.
13. De Mello A.J. Microfluidics: DNA Amplification Moves on // *Nature*. 2003. V. 422. P. 28–29.
14. Kricka L.J., Wilding P. Microchip PCR // *Anal. BioAnal. Chem.* 2003. V. 377. P. 820–825.
15. Zhang C., Xing D. Miniaturized PCR Chips for Nucleic Acid Amplification and Analysis: Latest Advances and Future Trends // *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35, N 13. P. 4223–4237.
16. Wong M.L., Medrano J.F. Real-Time PCR for mRNA Quantitation // *BioTechniques*. 2005. V. 39, N 1. P. 75–85.
17. Klein D. Quantification Using Real-Time PCR Technology: Applications and Limitations // *Trends in Molecular Medicine*. 2002. V. 8, N 6. P. 257–260.
18. Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J. A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer // *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25, N 12. P. 2516–2521.
19. Lowe B. et al. Quantitation of Gene Expression in Neural Precursors by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Using Self-Quenched, Fluorogenic Primers // *Analytical Biochemistry*. 2003. V. 315, N 1. P. 95–105.
20. Walker N.J. A Technique Whose Time Has Come // *Science*. 2002. V. 296, N 5567. P. 557–559.
21. (<http://www.gensetoligos.com>).
22. Bustin S.A. Quantification of mRNA Using Real-time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems // *Journal of Molecular Endocrinology*. 2002. V. 29. P. 23–39.
23. (<http://probes.com/handbook/figures/0711.html>).
24. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W. Standardized Determination of Real-Time PCR Efficiency from a Single Reaction Set-Up // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31, N 20. e122.
25. (<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>).
26. Pecoud J., Jacob C. Statistical Estimations of PCR Amplification Rates. (<http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm>).
27. Hellemans J., Mortier G., Paeppe A., et al. qBase Relative Quantification Framework and Software for Management and Automated Analysis of Real-Time Quantitative PCR Data // *Genome Biology*. 2007. V. 8, N 2. R19.
28. Wong M.L., Medrano J.F. Real-Time PCR for mRNA Quantitation // *BioTechniques*. 2005. V. 39, N 1. P. 1–11.
29. Gentle A., Anastasopoulos F., McBrien N.A.

- High-Resolution Semi-Quantitative Real-Time PCR without the Use of a Standard Curve // *Bio-Techniques*. 2001. V. 31. P. 502–508.
30. Pfaffl M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. e45.
 31. Liu W., Saint D.A. A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics // *Anal. Biochem.* 2002. V. 302. P. 52–59.
 32. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR // *BioTechniques*. 2002. V. 32. P. 1372–1379.
 33. Marino J.H., Cook P., Miller K.S. Accurate and Statistically Verified Quantification of Relative mRNA Abundances Using SYBR Green I and Real-Time RT-PCR // *J. Immunol. Methods*. 2003. V. 283. P. 291–306.
 34. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative Expression Software Tool (REST) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. e36.
 35. Peirson S.N., Butler J.N., Foster R.G. Experimental Validation of Novel and Conventional Approaches to Quantitative Real-Time PCR Data Analysis // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. e73.
 36. (<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/melt.html>).
 37. Nagai H., Murakami Y., Morita Y., et al. Development of A Microchamber Array for Picoliter PCR // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 1043–1047.
 38. Yao D.-J., Chen J.-R. Micro Rayleigh-Benard Convection Polymerase Chain Reaction Chip // *Journal of Micro/Nanolithography. MEMS and MOEMS*. 2007. V. 6, N 4. 043007–043016.
 39. Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T. DNA Amplification in a Microfabricated Reaction Chamber // *Proceedings of the 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers'93)*. Yokohama, Japan. 7–10 June 1993. P. 924–926.
 40. Northrup M.A., Bennet B., Hadley D., et al. A Miniature Analytical Instrument for Nucleic Acids Based on Micromachined Silicon Reaction Chambers // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 918–922;
 41. Kaack R.M. PCR-Slide: A Modular and Cascadable Platform for DNA Sample Processing with Integrated Nanoliter Dosage. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Angewandte Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. 2005. 151 p.
 42. Dahl A., Sultan M., Jung A., et al. Quantitative PCR Based Expression Analysis on a Nanoliter Scale Using Polymer Nano-Well Chips // *Biomed. Microdevices*. 2007. V. 9. P. 307–314.
 43. Morrison T., Hurley J., Garcia J., et al. Nanoliter High Throughput Quantitative PCR // *Nucleic Acids Research*. 2006. V. 34, N 18. e123.
 44. Neuzil P., Pipper J., Hsieh T.M. Disposable Real-time MicroPCR Device: Lab-on-a-Chip at a Low cost // *Mol. BioSyst.* 2006. V. 2. P. 292–298.
 45. Neuzil P., Zhang C.Y., Pipper J., et al. Ultra Fast Miniaturized Real-Time PCR: 40 Cycles in Less than Six Minutes // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. e77.
 46. Nakano H., Matsuda K., Yohda M., et al. High-Speed Polymerase Chain Reaction in Constant Flow // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994. V. 58. P. 349–352.
 47. Schneegass I., Brautigam R., Kohler J.M. Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler // *Lab. Chip*. 2001. V. 1, N 1. P. 42–49.
 48. Kopp M.U., deMello A.J., Manz A. Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip // *Science*. 1998. V. 280. P. 1046–1048.
 49. Sun Y., Kwok Y.C., Nguyen N.T. A Circular Ferrofluid Driven Microchip for Rapid Polymerase Chain Reaction // *Lab. Chip*. 2007. V. 7. P. 1012–1017.
 50. Bu M., Husband B., Melvin T., et al. Fabrication of a Microfluidic Chip for PCR Applications // 14th MicroMechanics Europe Workshop 2003. 2–4 November 2003, Delft, the Netherlands.
 51. Gui L., Ren C.L. Numeric Simulation of Heat Transfer and Electrokinetic Flow in an Electroosmosis-Based Continuous Flow PCR Chip // *Anal. Chem.* 2006. V. 78, N 17. P. 6215–6222.
 52. Hashimoto M., Chen P.C., Mitchell M.W., et al. Rapid PCR in a Continuous Flow Device // *Lab. Chip*. 2004. V. 4, N 6. P. 638–645.
 53. Nakayama T., Kurosawa Y., Furui S., et al. Circumventing Air Bubbles in Microfluidic Systems and Quantitative Continuous-Flow PCR Applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. P. 1327–1333.
 54. Liu H.-B., Gong H.-Q., Ramalingam N., et al. Micro Air Bubble Formation and its Control During Polymerase Chain Reaction (PCR) in Polydimethylsiloxane (PDMS) Microreactors // *J. Microtech. Microeng.* 2007. V. 17. P. 2055–2064.
 55. Gong H.-Q., Ramalingam N., Chen L., et al. Microfluidic Handling of PCR Solution and DNA Amplification on a Reaction Chamber Array Biochip // *Biomed. Microdevices*. 2006. V. 8, N 2. P. 167–176.
 56. Chang Y.H., Lee G.B., Huang F.C., Chen Y.Y., Lin J.L. Integrated Polymerase Chain Reaction Chips Utilizing Digital Microfluidics // *Biomed. Microdevices*. 2006. V. 8, N 3. P. 215–225.
 57. Liu C.N., Toriello N.M., Mathies R.A. Multichannel PCR-CE Microdevice for Genetic Analysis //

- Anal. Chem. 2006. V. 78, N 15. P. 5474–5479.
58. Wang W., Li Z.X., Luo R., Lu S.H., Xu A.D., Yang Y.J. Droplet-Based Micro Oscillating-Flow PCR Chip // *J. Micromech. Microeng.* 2005. V. 15. P. 1369–1377.
 59. Wang J., Chen Z.Y., et al. A Disposable Microfluidic Cassette for DNA Amplification and Detection // *Lab. Chip.* 2006. V. 6. P. 46–53.
 60. Münchow G., Dadić D., Doffing F., et al. Automated Chip-Based Device for Simple and Fast Nucleic Acid Amplification // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005. V. 5. P. 613–620.
 61. Schneegass I., Brautigam R., Kohler J.M. Miniaturized Flow-Through PCR with Different Template Types in a Silicon Chip Thermocycler // *Lab. Chip.* 2001. V. 1, N 1. P. 42–49.
 62. Weiping Y., Liqun D., Jing W., et al. Simulation and Experimental Study of PCR Chip Based on Silicon // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2005. V. 108, N 1-2. P. 695–699.
 63. Easley C.J., Legendre L.A., Landers J.P., Ferrance J.P. Rapid DNA Amplification in Glass Microdevices // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 339. P. 217–732.
 64. Wang W., Wang H.B., Li Z.X., Guo Z.Y. Silicon Inhibition Effects on the Polymerase Chain Reaction: a Real-Time Detection Approach // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006. V. 77, N 1. P. 28–34.
 65. Felbel J., Bieber I., Pipper J., Kohler J.M. Investigation on the Compatibility of Chemically Oxidized Silicon (SiOx)-surfaces for Applications towards Chip-Based Polymerase Chain Reaction // *Chemical Engineering Journal.* 2004. V. 101. P. 333–338.
 66. Christensen T.B., Pedersen C.M., Gröndahl K.G., et al. PCR Biocompatibility of Lab-on-a-Chip and MEMS Materials // *J. Micromech. Microeng.* 2007. V. 17. P. 1527–1532.
 67. Madou M.J. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturisation.* 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 2002. 752 p.
 68. Kutchoukov V.G., Laugere F., et al. Fabrication of Nanofluidic Devices Using Glass-to-Glass Anodic Bonding // *Sensors and Actuators, A: Physical.* 2004. V. 114, N 2-3. P. 521–527.
 69. Chen L., Luo G., Liu K., Ma J., Yao B., Yan Y., Wang Y. Bonding of Glass-Based Microfluidic Chips at Low- or Room-Temperature in Routine Laboratory // *Sensors and Actuators, B: Chemical.* 2006. V. 119, N 1. P. 335–344.
 70. Lee D.-J., Lee Y.-H., Jang J., Ju B.-K. Glass-to-Glass Electrostatic Bonding with Intermediate Amorphous Silicon Film for Vacuum Packaging of Microelectronics and its Application // *Sensors and Actuators, A: Physical.* 2001. V. 89, N 1-2. P. 43–48.
 71. Zhuang G., Jin Q., Liu J., et al. A Low Temperature Bonding of Quartz Microfluidic Chip for Serum Lipoproteins Analysis // *Biomedical Microdevices.* 2006. V. 8, N 3. P. 255–261.
 72. Wei J., Nai S.M.L., Wong C.K., Lee L.C. Glass-to-Glass Anodic bonding Process and Electrostatic Force // *Thin Solid Films.* 2004. V. 462-463. P. 487–491.
 73. Bhattacharya S. A Novel PCR Based DNA Microanalyzer System for Detection of Viral Genome. A Dissertation Doctor of Philosophy (Faculty of the Graduate School University of Missouri-Columbia). 2006. 137 p.
 74. Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. Chip PCR. I. Surface Passivation of Microfabricated Silicon-Glass Chips for PCR // *Nucleic Acids Research.* 1996. V. 24, N 2. P. 375–379.
 75. Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. Chip PCR. II. Investigation of Different PCR Amplification Systems in Microfabricated Silicon-Glass Chips // *Nucleic Acids Research.* 1996. V. 24, N 2. P. 380–385.
 76. Becker H., Locascio L.E. Polymer Microfluidic Devices // *Talanta.* 2002. V. 56. P. 267–287.
 77. Becker H., Gartner C. Polymer Microfabrication Technologies for Microfluidic Systems // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2008. V. 390, N 1. P. 89–111.
 78. Locascio L.E., Ross D.J., Howell P.B., Gaitan M. Fabrication of Polymer Microfluidic Systems by Hot Embossing and Laser Ablation // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 339. P. 37–46.
 79. Cook L.M., Stokowski S.E. Filter Materials. *Handbook of Laser Science and Technology.* V. IV: Optical Materials, part 2. 1995. CRC Press, Boca Raton, Fl. 151 p.
 80. Tuomikoski S. Fabrication of SU-8 Microstructures for Analytical Microfluidic Applications. Dissertation for the Degree of Doctor of Science in Technology. Helsinki University of Technology, Micro and Nanosciences Laboratory. 2007. 60 p.
 81. Nakayama T., Kurosawa Y., Furui S., et al. Circumventing Air Bubbles in Microfluidic Systems and Quantitative Continuous-Flow PCR Applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. P. 1327–1333.
 82. Xiang Q., Xu B., Fu R., Li D. Real Time PCR on Disposable PDMS Chip with a Miniaturized Thermal Cycler // *Biomed. Microdevices.* 2005. V. 7, N 4. P. 273–279.
 83. Kim J.A., Lee J.Y., Seong S., et al. Fabrication and Characterization of a PDMS–Glass Hybrid Continuous-Flow PCR Chip // *Biochemical Engineering Journal.* 2006. V. 29, N 1-2. P. 91–97.
 84. Shin Y.S., Cho K., Lim S.H., et al. PDMS-Based Micro PCR Chip with Parylene Coating // *J. Micromech. Microeng.* 2003. V. 13. P. 768–774.

85. Yao L., Liu B., Chen T., Liu S., Zuo T. Micro Flow-Through PCR in a PMMA Chip Fabricated by KrF Excimer Laser // *Biomed. Microdevices*. 2005. V. 7, N 3. P. 253–357.
86. Lytle J.D. *Handbook of Optics*. V. II. 1995, McGraw-Hill, New York.
87. Kaack R.M. PCR-Slide: A Modular and Cascadable Platform for DNA Sample Processing with Integrated Nanoliter Dosage. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultat für Angewandte Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau. 2005. 151 p.
88. Chen J., Wabuye M., Chen H., et al. Electrokinetically Synchronized Polymerase Chain Reaction Microchip Fabricated in Polycarbonate // *Anal. Chem.* 2005. V. 77, N 2. P. 658–666.
89. Liu Y., Ganser D., Schneider A., et al. Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis // *Anal. Chem.* 2001. V. 73, N 17. P. 4196–4201.
90. Tsai N.-C., Sue C.-Y. SU-8 Based Continuous-Flow RT-PCR Bio-Chips under High-Precision Temperature Control // *Biosensors and Bioelectronics*. 2006. V. 22, N 2. P. 313–317.
91. El-Ali J., Perch-Nielsen I.R., Poulsen C.R., et al. Simulation and Experimental Validation of a SU-8 Based PCR Thermocycler Chip with Integrated Heaters and Temperature Sensor // *Sensors and Actuators A*. 2004. V. 110, N 1-3. P. 3–10.
92. Gonzalez A., Grimes R., Walsh E.J., Dalton T., Davies M. Interaction of Quantitative PCR Components with Polymeric Surfaces // *Biomed. Microdevices*. 2007. V. 9. P. 261–266.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 15.04.2008.

MICROCHIP DEVICES FOR POLYMERASE CHAIN REACTION. P. 1. PCR MAIN PRINCIPLES; DESIGN AND MATERIALS OF MICROCHIPS (Review)

G. E. Rudnitskaya, A. A. Evstrapov

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The main principles of polymerase chain reaction (PCR) are considered. Features of the PCR homogeneous methods in real time are discussed. Questions of analytical signal formation during the reaction are stated. Advantages and lacks of PCR realization on a microchip are discussed. Devices for PCR with stationary and flowing reaction chambers are considered. General analysis of materials used in the construction of microchips for PCR is carried out. The main problems arising at use of the most widespread materials are considered.