

УДК 57.088: 577.2

© В. Е. Курочкин, А. А. Евстрапов, А. Л. Буляница, Г. Е. Рудницкая,
Т. А. Лукашенко, А. Н. Тупик, А. И. Цымбалов

РАЗРАБОТКА МИКРОЧИПОВЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР В ГЕЛЕ

Одним из современных и востребованных методов молекулярной диагностики является проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) в геле, имеющее ряд преимуществ по сравнению с традиционной реализацией ПЦР в жидкости. Для его осуществления разработаны и созданы макетные образцы микрочиповых устройств (картриджей-микрочипов) с полиакриламидным гелем в реакционной камере, обладающие требуемыми физико-химическими (в т. ч. оптическими) характеристиками. В статье обсуждаются особенности изготовления таких устройств.

Кл. сл.: полимеразная цепная реакция, микрочиповое устройство, картридж-микрочип, фотолитография, кислотное травление

ВВЕДЕНИЕ

Одним из современных методов молекулярной биологии является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). На сегодняшний день ПЦР-анализ — самый быстрый, точный и широко распространенный метод молекулярной диагностики в лабораторной практике [1, 2]. Основы реализации полимеразной цепной реакции были разработаны американским ученым Кэри Мюллисом в 1983 г. Первые сообщения по практическому ее применению появились в 1985 г. В 1993 г. Мюллис за открытие метода ПЦР был удостоен Нобелевской премии. С тех пор число публикаций, посвященных ПЦР как методу исследования, занимает одно из первых мест наряду с работами, в которых применяются автоматическое определение нуклеотидной последовательности (секвенирование ДНК) или гибридизационные технологии. Появились новые разновидности амплификационных технологий, например лигазная цепная реакция, "гнездовая" ПЦР (Nested PCR), мультиплексная ПЦР и т. д. [3]. Для жидкостной ПЦР выпускаются коммерческие приборы и системы: амплификаторы (термоциклеры), приборы для проведения ПЦР и регистрации результатов реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Обычно ПЦР в таких приборах осуществляется в полипропиленовых пробирках (объем 0.2–1.5 мл) или планшетах. Кроме увеличения числа копий ДНК (этот процесс называется амплификацией) ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с генетическим материалом (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК и др.) и поэтому широко используется в биологической и медицинской практике, для научных исследований и биотехно-

логических применений. В частности, применение ПЦР эффективно при диагностике заболеваний (наследственных, инфекционных), для определения устойчивости к химиопрепаратам, для установления отцовства, для клонирования генов, введения мутаций, выделения новых генов.

С развитием технологий микроэлектроники появились работы по постановке ПЦР на специально созданных миниатюрных устройствах — микрочипах. В микрочипах формируются реакционные камеры, характеризующиеся высоким соотношением площади поверхности к объему, что делает возможным осуществлять быстрый и эффективный теплообмен. При этом существенное влияние на ход ПЦР оказывают свойства поверхности реактора. Первыми работами в области создания систем для ПЦР на микрочиповой платформе являются работы Криски (L.J. Kricka, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania) [4, 5], а к пионерским работам по коммерческому использованию микрочиповых технологий для амплификации нуклеиновых кислот следует отнести работы Норттрапа (M.A. Northrup) с соавторами, в которых была показана возможность скоростной постановки ПЦР на микрочипе [6, 7]. Норттрап стал основателем компании Microfluidic Systems Inc. (MFSI), президентом которой он является в настоящее время. Компания обладает патентами и специализируется на производстве автоматизированных систем анализа биологических проб, в том числе для обнаружения и идентификации различных патогенов в воздушной среде. В основе разработок лежат автоматизированные микрофлюидные технологии и методы ПЦР.

В 90-х годах в Институте белка РАН был разработан способ осуществления ПЦР не в жидкости, а в тонком слое полиакриламидного геля [8, 9]. Матрица геля затрудняет диффузию молекул ДНК, так что продукты амплификации остаются локализованными вблизи соответствующей ДНК-мишени. В результате реакции образуются колонии ДНК, каждая из которых выросла из единственной исходной молекулы. Матрица геля практически не влияет на диффузию более мелких молекул (нуклеозидтрифосфатов, олигонуклеотидных праймеров) и компонентов буфера, поэтому проведение реакции в геле не приводит к снижению скорости размножения нуклеиновых кислот. Размер колонии главным образом определяется размером ДНК-мишени и плотностью геля. Число молекул в колонии определяется эффективностью применяемой системы и числом циклов ПЦР. Варьируя эти параметры, можно создавать условия для выращивания колоний определенного размера. Регистрация колоний может осуществляться специальными детектирующими системами, например флуоресцентными сканерами. Использование этого метода позволяет обнаруживать, подсчитывать и идентифицировать одиночные молекулы ДНК. Так как размножаемые молекулы пространственно разделены в полимерной матрице, значительно снижается неспецифический синтез, вызванный ошибочной гибридизацией.

Известен другой вариант проведения ПЦР в геле, запатентованный Дж. Черчем (Church) [10], в котором один из праймеров пришит к полиакриламидной матрице. Он известен под названием метод "полоний" (полимеразных колоний).

В упомянутых методах гель для ПЦР отливают либо в лунках специально подготовленных стекол (диаметр лунки 14 мм, глубина 0.4 мм) [11], либо в специальных рамочных контейнерах размером 15×15 мм (фирма MJ Research), закрепленных на стеклах для оптической микроскопии [10]. Так, в работе [12] проба, объемом 19 мкл, наносилась на специальный слайд (Erie Scientific, Portsmouth). При этом использовались камеры Grace Bio-Labs (США) [13], а герметизация устройства перед ПЦР осуществлялась минеральным маслом. Указанные решения сейчас применяются только в исследовательских лабораториях.

Проблемами, затрудняющими развитие методов ПЦР в геле, являются отсутствие соответствующего приборного обеспечения и материалов, а именно: специальных детектирующих систем, вспомогательных устройств и микрочипов. В настоящее время исследователи применяют либо дорогостоящие системы детектирования, такие как конфокальные сканирующие микроскопы, либо специальные сканеры для биочипов. При этом процедуры термоциклирования и детектирования разнесены во времени и выполняются на разных

приборах. С другой стороны, наличие и доступность различных технологий, в том числе методов формирования микро- и наноструктур, позволяют изготовить практически любое устройство, ориентированное на решение задач создания и развития методик ПЦР-анализа в геле.

МИКРОЧИПОВОЕ УСТРОЙСТВО ДЛЯ ПЦР В ГЕЛЕ

Наиболее простой конструкцией для реализации ПЦР в геле является планарная конструкция, состоящая из подложки, в которой сформированы реакционные камеры и каналы для ввода пробы, герметично соединенной с защитной пластиной. В такой конструкции должны быть предусмотрены порты для ввода пробы, которые после заполнения устройства должны быть изолированы от внешней среды. Материалами для этого устройства могут быть кремний, стекло и полимеры. В кремниевых и стеклянных материалах реакционные камеры и каналы могут быть изготовлены методами фотолитографии и травления (кислотного или ионно-реактивного). Метод вытравливания микроструктур в кислоте является наиболее развитым и доступным для серийного применения, но имеет определенные ограничения на глубину получаемых структур (не более 200–250 мкм). Вытравливание глубоких каналов и реакторов занимает длительное время и приводит к неоднородности получаемых структур. В полимерных материалах требуемые микроструктуры могут быть сформированы методами прессования, что подразумевает использование точных и дорогостоящих матриц или мастер-форм. Положительным фактором является то, что стоимость полимерных материалов на порядок ниже стоимости стеклянных и кремниевых материалов, а поэтому полимерные изделия могут быть изделиями однократного применения. Но, с другой стороны, возникает проблема утилизации таких изделий после проведения анализов. Устройства из стеклянных и кремниевых материалов могут быть изготовлены как устройства многократного применения, но в этом случае должна быть предусмотрена возможность их разборки и последующей регенерации. Последнее подразумевает применение полимерных композиций, скотча или специальных адгезивов при герметизации микроканалов и реакторов.

Отдельной задачей является модификация поверхности реакционных камер с целью пришивки геля. Способы модификации зависят от применяемых материалов, а также от свойств используемого геля.

При создании экспериментальных образцов микрочиповых устройств для ПЦР в геле был выбран вариант устройства, состоящего из трех ка-

мер — для проведения реакций в исследуемом образце, а также положительного и отрицательного контроля. Формат (размеры) устройства (25×75 мм, толщина — до 1.9 мм) был выбран исходя из возможности регистрации результатов проведенных реакций на сканерах для биочипов. Такая привязка размеров к специальным системам детектирования не позволяет создать достаточно удобного для эксплуатации устройства. В качестве материала выбрано стекло марки К8 как наиболее дешевое и доступное для экспериментальных работ. Высокая теплопроводность стекла и его относительно малая толщина (1 мм) позволяют реализовать быстрый нагрев и охлаждение, а оптические характеристики (хорошее светопропускание и малая собственная флуоресценция (рис. 1)) — использовать для флуоресцентного детектирования. В работе приводится и обсуждается конструкция микрочипов, имеющая достаточно простую топологию.

Реакционная камера и каналы ввода пробы были

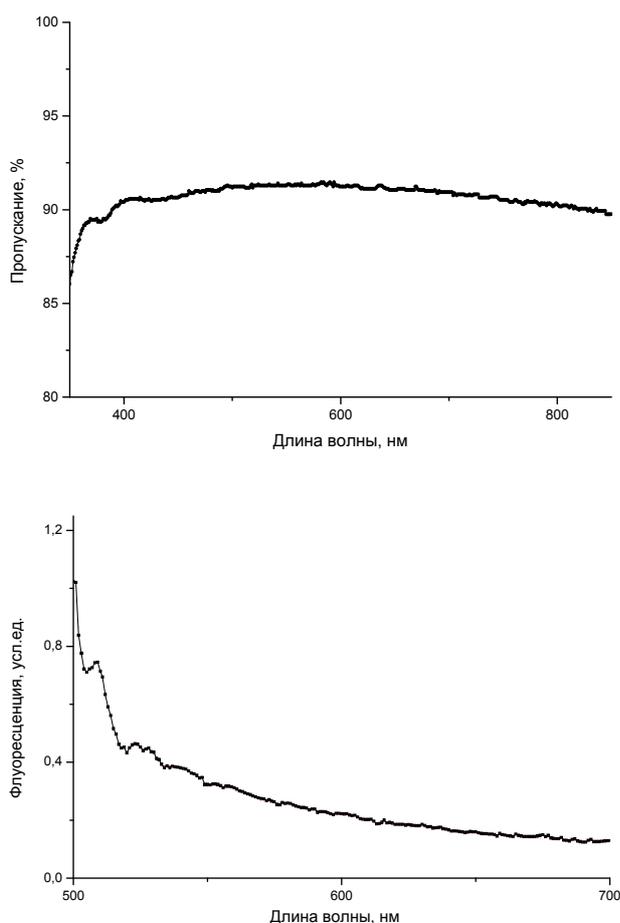


Рис. 1. Спектры светопропускания (а) и флуоресценции (б) (при возбуждении на длине волны 488 нм) стеклянной пластины с реакционными камерами

сформированы методом фотолитографии и кислотного травления. Для реализации фотолитографических процессов необходимы фотолитографические маски или фотошаблоны, которые на этапе экспонирования задают необходимую конфигурацию (рисунок) покрытия. Фотолитографические маски изготавливаются на стекле с высокой оптической однородностью и различаются покрытием: эмульсионные либо с покрытием из хрома или из окиси железа. Последние две разновидности более долговечны и используются в условиях серийного производства, эмульсионные фотошаблоны предназначены для выполнения разовых работ. На этапе разработки конструкции микрочипа создается топология чипа и разрабатывается фотошаблон, который присоединяется к заготовке (стеклянной пластине с нанесенным слоем хрома толщиной 100–200 нм и слоем фоторезиста). Затем осуществляется экспонирование под УФ-излучением. Далее следует стадия проявления, в результате которой формируется заданный фотошаблоном рисунок (топология) микрочипа. После промывки и сушки фоторезиста следует процесс травления маски, затем — снова промывка и химическое удаление фоторезиста. Полученная заготовка помещается в подогреваемую ванну, где осуществляется кислотное травление стекла. Поддержание выбранной температуры позволяет контролировать процесс травления и обеспечивает получение заданных размеров микроструктур. После травления снова следует промывка и подготовка поверхности для герметизации — связывания с защитной пластиной. Формирование реакционной камеры и подводных каналов в стеклянных подложках осуществлялось на ЗАО "Светлана-полупроводники" (Санкт-Петербург). В результате работ были получены заготовки для микрочипа, фотография которых представлена на рис. 2, а.

После отливки полиакриламидного геля в реакционных камерах осуществлялась герметизация — склеивание с защитной пластиной, в которой выполнены отверстия для ввода пробы. Ряд способов герметизации: с помощью скотча фирмы 3D (Великобритания), с использованием фотоотверждаемых композиций Rite Lock (Великобритания) и полидиметилсилоксана (ПДМС) Sylgard 184 (Corning, США) — были проверены на ингибирование ПЦР. Все эти способы и материалы являются вполне приемлемыми и дают хорошие результаты, но нами был выбран способ герметизации ПДМС, т. к. он позволяет создавать конструкции, которые впоследствии могут быть расклеены и подвергнуты химической или другой обработке с целью повторного использования. Эта процедура была апробирована при проведении исследований. Толщина пленки ПДМС при герметизации составляет 10–15 мкм. Фотография микрочипового устройства с гелем, подготовленного для анализа, приведена на рис. 2, б.

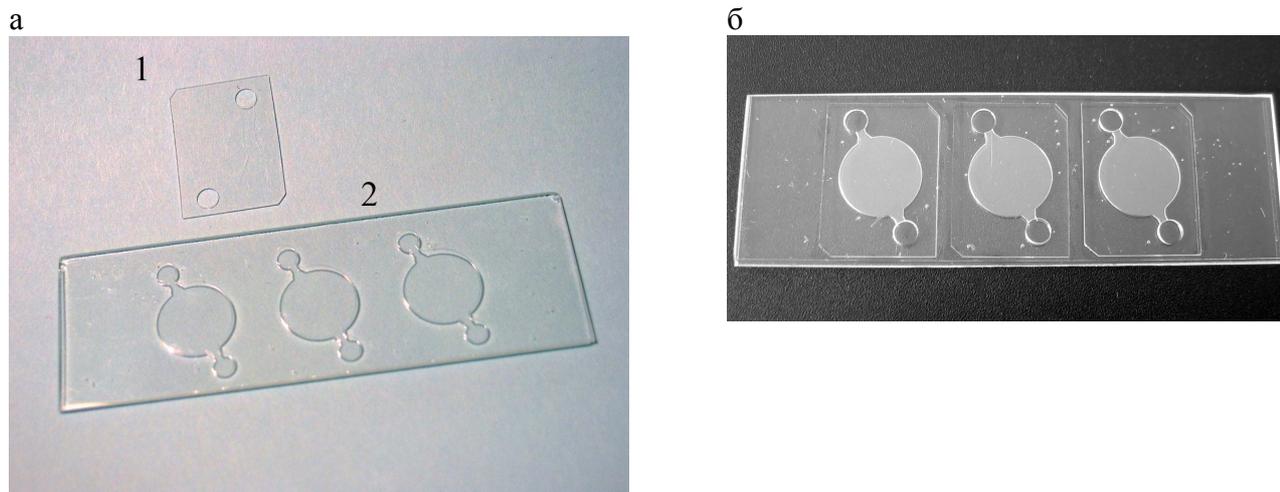


Рис. 2. Заготовки микрочипа (а) и смонтированный картридж-микрочип для ПЦР в геле (б).
1 — защитная пластина, 2 — пластина с реакционными камерами

Ввод пробы в реакционную камеру микрочипа осуществляется путем нанесения пробы в резервуар, образованный отверстием защитной пластины и каналом подложки. При этом капиллярные силы обеспечивают распространение пробы по каналу и выход ее в реакционную камеру, в которой находится гель. Гель при этом впитывает жидкость и набухает, занимая все пространство камеры. Ввод пробы, особенно если она обладает высокой вязкостью, может производиться с использованием специальных приспособлений, например с применением перистальтического насоса с низкой скоростью потока и специального устройства для микрочипов. При этом исключается возможность контаминации, т. к. используются сменные (или одноразовые) переходные уплотнители. Для предотвращения испарения пробы при термоциклировании в отверстия защитной пластины вносили минеральное масло.

Результаты предварительных испытаний свидетельствуют о возможности использования микрочиповых устройств для выращивания молекулярных колоний в реакционной камере с полиакриламидным гелем.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Фундаментальные науки — медицине", проект "Картриджи-микрочипы для метода молекулярных колоний".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Real-time PCR / Ed. M.T. Dorak. Taylor & Francis Group, 2006. 361 p.
2. Real-time PCR: Current technology and applications / Eds J. Logan, K. Edwards and N. Saunders, London, Caister Academic Press, 2009. 284 p.
3. URL: (http://en.wikipedia.org/wiki/Variants_of_PCR).
4. 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 Res.* 1996. V. 24, N 2. P. 375–379.
5. Cheng J., Waters L.C., Fortina P., et al. Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction and capillary electrophoretic analysis of human DNA on microchip-based devices // *Anal. Biochem.* 1998. V. 257, N 2. P. 101–116.
6. Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T. DNA amplification in a microfabricated reaction chamber // "Transducers '93", Seventh International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Yokohama, Japan. IEEE. NY, 1993. P. 924–927.
7. Woolley A.T., Hadley D., Landre P., et al. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device // *Anal. Chem.* 1996. V. 68, N 23. P. 4081–4086.
8. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. Патент РФ № 2048522. 1995.
9. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Способ клонирования нуклеиновых кислот. Патент РФ № 2114175. (1998).
10. Mitra R.D., Church G.M. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27, N 24. e34. P. 1–6.
11. Четверина Е.В., Кравченко А.В., Фалалеева М. В., Четверин А.Б. Экспресс-гибридизация молекулярных колоний с флуоресцентными зондами // *Биоорг. химия.* 2007. Т. 33, № 4. С. 456–463.
12. Rieger C., Poppino R., Sheridan R., et al. Polony analysis of gene expression in ES cells and blastocysts //

Nucleic Acids Res. 2007. V. 35, N 22. e151.
13. URL: (<http://www.gracebio.com/>).

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Контакты: *Евстратов Анатолий Александрович,*
an_evs@mail.ru

Материал поступил в редакцию 29.10.2010.

DESIGN OF MICROCHIP DEVICES FOR PCR IN GEL

**V. E. Kurochkin, A. A. Evstrapov, A. L. Bulyanitsa, G. E. Rudnitskaya,
T. A. Lukashenko, A. N. Tupik, A. I. Tsimbalov**

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The method of polymerase-chain reaction (PCR) in the gel is one of modern and relevant molecular diagnostic technique which has several advantages over classical PCR method in the liquid. To realize this method the prototypes of microchip devices (cartridges- microchip) with polyacrylamide gel in the reaction chamber were designed and created. They possess the appropriate physics and chemical characteristics (for example, optical). The article discusses the features of the manufacture of such microchips.

Keywords: polymerase-chain reaction, microchip device, cartridge-microchip, photolithography, acid-etching