

УДК 57.088; 572.2

© О. С. Антонова, Г. Е. Рудницкая, А. Н. Тупик,
А. Л. Буляница, А. А. Евстапов, В. Е. Курочкин

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ: ПРИБОРНАЯ И МЕТОДИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ. ОБЗОР АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

В обзоре обсуждаются современные методы и техники молекулярного анализа, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проведено сопоставление различных методов ПЦР и сравнение их основных аналитических характеристик (чувствительность, специфичность, воспроизводимость и т. д.). Одной из определяющих тенденций развития приборно-аппаратного комплекса для методов ПЦР является применение микрочиповых технологий, позволяющих обеспечить высокую автоматизацию аналитических процедур и достигнуть высокой чувствительности обнаружения искомого аналита. В работе представлены и обсуждены математические модели основных процессов ПЦР. Рассмотрены некоторые актуальные методики медицинской диагностики.

Кл. сл.: полимеразная цепная реакция, цифровая ПЦР, эмульсионная ПЦР, твердофазная ПЦР, метод молекулярных колоний, микрочиповые технологии

ВВЕДЕНИЕ

Процесс проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) был впервые описан Нобелевским лауреатом Кэри Маллисом в 1983 г. [1], что впоследствии привело к эффективному решению множества актуальных биологических задач. Например, использование обратной транскрипции (ОТ) вместе с ПЦР позволило выявлять крайне малые количества специфических РНК транскриптов. Их количественный анализ стал возможным с развитием конкурентной ОТ-ПЦР с внутренним стандартом [2]. При этом ампликоны либо помечались радиоактивными дезоксирибонуклеотидными основаниями, либо применялось окрашивание продуктов ПЦР в геле этидий бромидом или SYBR Green I. Количество материала определялось сравнением с сигналом ДНК-стандарта заданной концентрации [3].

Развитием ПЦР стало создание метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), при котором непрерывно осуществляется измерение флуоресценции амплифицируемой смеси во время проведения термоциклирования. Количественная ПЦР-РВ дополнительно требует перевода флуоресцентных сигналов в числовую форму. Методы ПЦР непрерывно совершенствовались, что привело к появлению новых, более точных и чувствительных методов, которые рассматриваются в данном обзоре.

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ (ПЦР-РВ)

В 1996 г. Applied Biosystems сделали ПЦР-РВ общедоступной технологией [4], выпустив на рынок 7700 прибор. Количественная ПЦР-РВ стала самым точным и чувствительным методом обнаружения и количественного определения нуклеиновых кислот. Ее проведение позволило осуществлять прямое детектирование нужного участка ДНК, что избавило от таких проблем классической ПЦР, как разработка гелей, перенос ДНК на мембрану, радиоактивное мечение пробы. Основные оставшиеся методические проблемы — это выбор стандартов, нормализация образцов и методология расчетов.

Ключевым звеном в проведении ПЦР-РВ является термостабильная ДНК-полимераза. Наиболее часто используется фермент из *Thermus aquaticus*, или Taq. При проведении ПЦР применяется синтезированная Taq и фермент с горячим стартом. Схемы активации и ингибирования активности полимеразы детально описаны, например, в [3].

Все современные приборы для проведения ПЦР-РВ основаны на принципе детектирования флуоресцентного сигнала, величина которого пропорциональна количеству амплифицируемого продукта. Применяют три типа красителей: 1 — краситель-донор (флуоресцентный сигнал наблюдается в течение всего анализа); 2 — акцептор, или гаситель люминесценции, отвечающий за гашение сигнала от донора; 3 — пассивный рефе-

ренный краситель (для нормировки сигналов от разных лунок).

Самым часто используемым является флуоресцентный краситель 6-FAM (6-карбоксиволуоресцеин). Он возбуждается при длине волны 488 нм, легко связывается с олигонуклеотидами и обеспечивает высокую интенсивность сигнала. Поэтому под анализ с его использованием адаптированы многие приборы. Также применяют SYBR Green I, который при связывании с двухцепочечной ДНК вызывает увеличение флуоресценции. Самым первым гасителем флуоресценции, используемым с 6-FAM, был TAMRA [3]. Наиболее широко распространенный референсный краситель — ROX.

При амплификации образца детектируемый флуоресцентный сигнал может состоять из четырех последовательных участков: 1 — базовая линия (сигнал не превышает предела детектирования прибора); 2 — экспоненциальная амплификация; 3 — линейная фаза роста и 4 — плато. Продолжительность участка 2 зависит от концентрации ДНК и от качества реагентов. При идеальной реакции с каждой ДНК-мишени в образце за цикл амплифицируются 2 молекулы [3]. В линейной фазе (участок 3) эффективность амплификации снижается (чаще всего после 40 циклов). Снижение эффективности можно объяснить образованием веществ, приводящих к расщеплению продуктов амплификации, либо денатурацией ДНК полимеразы.

Главными преимуществами ПЦР-РВ по сравнению с классической ПЦР в геле являются высокая чувствительность, специфичность и универсальность. Чувствительность ПЦР-РВ составляет 10–100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов 10^3 – 10^5 клеток). При этом не требуется выделения и выращивания культуры возбудителя, унифицированы методы обработки биоматериала и детектирования продуктов и автоматизирован процесс, благодаря чему полное время анализа снижается до 4–5 ч. В случае классической ПЦР чувствительность метода значительно ниже и лимитируется чувствительностью красителя к окрашиванию ДНК и РНК в геле. Например, краситель GelStar в 5–10 раз более чувствителен к окрашиванию, чем этидий бромид, и позволяет определять всего 20 пг двухцепочечной ДНК или 3 нг РНК. Недостатком классической ПЦР являются оценка результатов по конечной точке, необходимость процедуры электрофореза при регистрации результатов с помощью УФ-просвечивания, лазерных сканеров или специальных ридеров.

Метод ПЦР обладает высочайшей специфичностью, превышающей 99 %, что объясняется достаточностью определения только уникального фрагмента нуклеотидной последовательности, характерного исключительно для данного возбудителя

или гена, что исключает перекрестные реакции антигенов.

Проведенная в зарубежных исследовательских центрах оценка чувствительности различных методов диагностики показала, что "быстрые", или экспресс-тесты, имеют чувствительность 40–60 %, ИФА — 50–70 %, прямая иммунофлуоресценция (ПИФ) — 55–75 %, культуральное исследование — 60–80 %, а ПЦР — от 90 до 100 % [5]. В работе [6] показано, что ПЦР-РВ продемонстрировала чувствительность 90 %, специфичность 80,3 %, прогностическую значимость отрицательного результата 98,9 % и прогностическую значимость положительного результата 28 % при определении стрептококков группы В.

При количественной ПЦР теоретически возможно проводить одновременную амплификацию нескольких участков ДНК, но большинство приборов для ПЦР-РВ поддерживают не больше 4 флуорофоров из-за ограничения по спектральному разрешению. Также сочетание праймеров и зондов для нескольких реакций в одной пробе приводит к непредсказуемому изменению термодинамической эффективности и химической кинетики.

ЦИФРОВАЯ ПЦР

Цифровая ПЦР (ЦПЦР) — альтернативный количественный метод анализа, при котором многочисленные ПЦР проводятся в разных образцах, полученных разбавлением исходной пробы до средней концентрации 1 молекула/образец [7]. Затем эти единичные молекулы амплифицируют. Исходное количество молекул ДНК с высокой точностью определяется по соотношению положительных и отрицательных реакций. Оценивание базируется на гипотезе о разведении пробы в соответствии с законом Пуассона, параметр которого равен отношению (число частиц)/(число образцов). Одно из преимуществ ЦПЦР по сравнению с ПЦР-РВ состоит в том, что результат анализа не зависит от эффективности реакции. ЦПЦР используется, как правило, в сложных исследованиях, где молекул ДНК-мишени значительно меньше всех остальных компонентов, например при редких мутациях. В идеале чувствительность ЦПЦР ограничивается только числом независимых амплификаций.

Концепция ЦПЦР была разработана в 1992 г. [8]. Ее развитие шло по пути использования капилляров, гелей, аффинных поверхностей, частиц и несмешиваемых жидкостей [9] и флуоресцентного детектирования результата прямо в капиллярах [10].

Вогельштейн и Кинцлер разработали методику для количественного определения мутаций в гене KRAS [7], реализовав на 96-луночном пропилено-

вом планшете с объемом лунки 7 мкл принцип предельных разведений и метод флуоресцентных TaqMan-зондов [8, 10]. Амплификацию проводили по схеме: на первом этапе — 60 циклов, на втором — еще 10–15 циклов асимметричной ПЦР с использованием флуоресцентных зондов, и получали ответ в бинарном коде: "Да" (положительная реакция)/ "Нет" (отрицательная реакция). Поэтому авторы и назвали такой способ цифровым. Отношение положительных и отрицательных реакций определяло количество ДНК-мишеней в исходном образце. В [11] описана схема оценивания исходного количества мишеней, которая базируется на распределении Бернулли и его приближениях (распределениях Пуассона и Гаусса).

Таким образом, цифровая ПЦР — это количественная ПЦР с регистрацией результата амплификации по конечной точке. Ее преимущества: не требует калибровки и использования стандартов и не зависит от эффективности процесса амплификации. Главное ограничение метода связано с высокой трудоемкостью при выполнении сотен и тысяч реакций, требующихся для анализа каждого образца. Характеристики можно улучшить при использовании специальных эмульсионных частиц [12].

ЦПЦР является самым многообещающим методом для диагностики рака [13], для количественного определения патогенов в низкой концентрации, редких генетических последовательностей, экспрессии генов в одной клетке и для клональной амплификации при идентификации и секвенировании набора последовательностей нуклеиновых кислот. Кроме того, ЦПЦР используется для анализа гетерогенности метилирования [14]. ЦПЦР используют также для определения рецессивных моногенных заболеваний, когда у плода и у матери мутация одинакова [15].

К недостаткам метода ЦПЦР относится необходимость проведения нескольких ПЦР для одного образца, что требует автоматизации. Однако сейчас разрабатываются технологии с применением микрофлюидных чипов [16], варианты ПЦР в эмульсии [12, 17] и различные методики для параллельного секвенирования [18]. По-видимому, этот метод в перспективе будет задействован для повседневной диагностики.

Нынешние варианты ЦПЦР проводятся преимущественно в микро- или нанофлюидных устройствах с объемом реакционной смеси до нескольких нанолитров. В 2006 г. фирма Fluidigm [19] представила первую коммерческую систему, основанную на интегрированных микрожидкостных устройствах (чипах). Фирма выпускает прибор BioMark HD, в котором замена чипов позволяет провести как ПЦР-РВ, так и ЦПЦР.

Идеальная система для проведения ЦПЦР [20] должна иметь бесконечно большое количество реакционных камер с нанолитровыми (и меньшими)

объемами, в которых проводят амплификацию одной ДНК-мишени со 100 % эффективностью и надежным детектированием. На практике — это микропланшеты на 96, 384 или 1526 лунок; статические или динамические микрочиповые системы. Уменьшение объемов реакционных камер позволяет удешевить анализ из-за экономии дорогостоящих реактивов (Taq-полимераза, праймеры, зонды и др.), а также теоретически снижает риск контаминации посторонней ДНК. В 2010 г. корпорация Life Technologies [21] выпустила линию продуктов ЦПЦР для системы OpenArray. В марте 2010 г. была запатентована ЦПЦР в эмульсии. Фирма QuantaLife [22] планирует представить эту технологию в 2011 г.

Увеличение числа реакционных камер системы для ЦПЦР приводит к снижению предела детектирования, что повышает чувствительность метода. Так, для стандартного 96-луночного планшета теоретический предел чувствительности $< 1\%$, а для планшета с 1536 лунками он менее 0.1% [7]. В работе [15] показано, что при ЦПЦР воспроизводимые результаты секвенирования можно получить из наногаммовых количеств генетического материала. Сравнение воспроизводимости результатов, полученных методами ЦПЦР и ПЦР-РВ для 12 образцов в 6–8 повторах показало: коэффициент вариации для ЦПЦР равен $CV = 11.8 \pm 1.5\%$, что примерно вдвое меньше, чем для ПЦР-РВ ($CV = 21.2 \pm 2.6\%$). В работе [23] авторы проводили сравнение результатов количественного определения ДНК плода в плазме матери методами ЦПЦР и ПЦР-РВ. Коэффициенты вариации для ЦПЦР и ПЦР-РВ определены, как 16 и 49 % соответственно. В [24] сравнивались чувствительности ЦПЦР и классической ПЦР при определении метилированной ДНК (25 пг) в присутствии неметилированной ДНК (50 нг) при 20 повторах с использованием технологии MethyLight. Чувствительности классической ПЦР и ЦПЦР составили 20 и 85 %.

ЦИФРОВАЯ ПЦР В ЭМУЛЬСИИ

Принцип эмульсионной ПЦР или ЭМПЦР (см., например, [25]) заключается в следующем. Раствор ДНК вводят в смесь минеральных масел с таким расчетом, чтобы каждая молекула ДНК оказалась в собственном пузырьке (объеме масла). Капли стабильны даже при высокой температуре и служат в качестве реакционных сосудов для проведения амплификации. Этот подход позволяет минимизировать потери отдельных исходных матриц. Результаты амплификации регистрируются так же, как и в случае ЦПЦР. Существуют различные технические решения как для подготовки библиотек фрагментов, так и для других этапов —

энзиматических реакций, визуализации и компьютерной регистрации сигнала, хранения и обработки данных. Фирма QuantaLife (США) [22] предложила метод Droplet Digital PCR (DDPCR), или капельной цифровой ПЦР. Фирма разработала генератор водно-масляной эмульсии, производящий за 1 мин 20 000 капель объемом 1 нл каждая. Капли распределяются по ячейкам 96-луночного планшета для проведения ПЦР.

ПЦР в водно-масляной эмульсии предполагает проведение миллионов отдельных микрореакций. Чтобы перевести ЭмПЦР в цифровой вид, Вогельштейном был создан метод BEAMing (частицы, эмульсия, амплификация и магнит) [13, 26]. BEAMing (рис. 1) используется для детектирования и относительной оценки изменения последовательностей, таких как однонуклеотидный полиморфизм (SNP), и мутаций [16, 26]. Образцы, содержащие менее 1 мкл ДНК, предварительно амплифицируются. Магнитные частицы, ковалентно связанные со стрептавидином, покрываются биотинилированными праймерами, и проводится ПЦР в эмульсии. После амплификации каждая капля содержит частицу, покрытую тысячами копий той единственной ДНК-мишени. Затем эти частицы

могут быть выделены с помощью магнита или центрифугированием.

Эмульсионная цифровая ПЦР может стать мощным инструментом высокопроизводительного генетического анализа, поскольку с ее помощью возможно выполнение целого массива независимых параллельных одномолекулярных ПЦР для разбавленных, распределенных статистически по маленьким каплям и диспергированным в масляной фазе мишеней [25].

ТВЕРДОФАЗНАЯ ПЦР

Двумя независимыми группами Бинга в 1996 г. и Адесси в 2000 г. была разработана концепция твердофазной амплификации [27]. Праймеры с 5'-конца прикрепляют к твердой поверхности (предметное стекло, кварц, полистироловые шарики и т. п.), что не позволяет им свободно диффундировать в растворе. При этом праймеры покрывают поверхность плотным ковром (плотность $\sim 10^{11}$ штук/мм² соответствует расстоянию ~ 5 –10 нм и коррелирует с длиной праймера [27]). Используя химию ПЦР и режим термоциклирования,

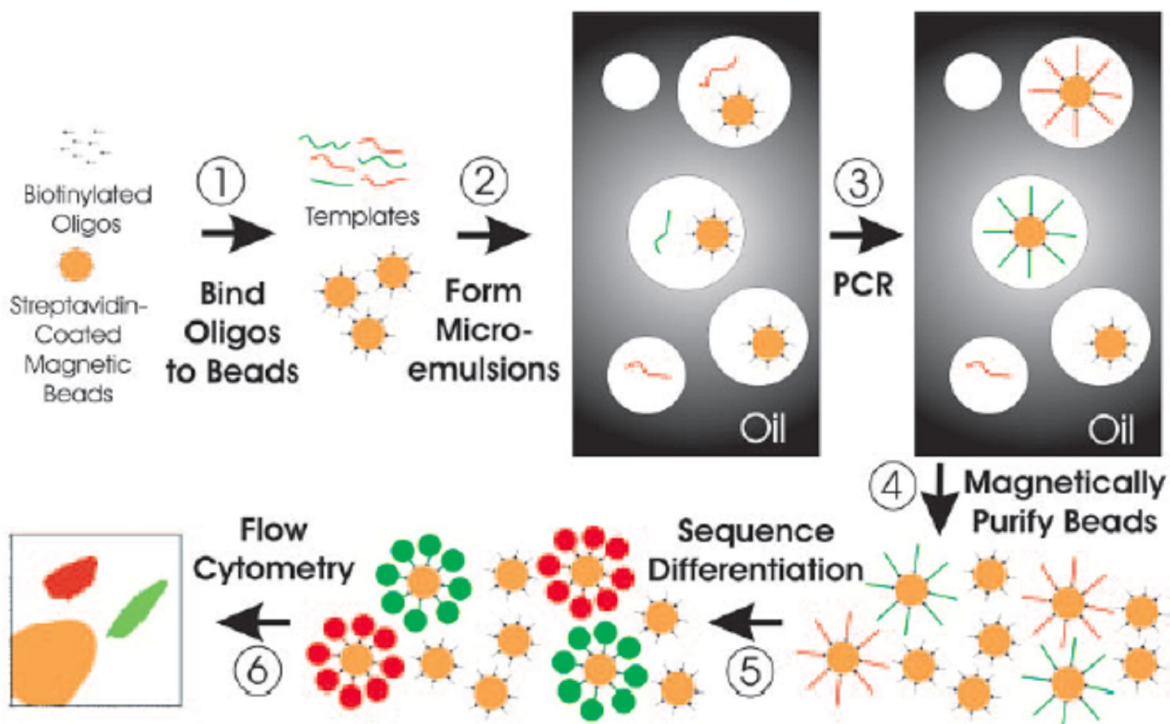


Рис. 1. Метод BEAMing [13]. Описание рисунка в тексте

можно провести амплификацию ДНК-мишени с закрепленными на поверхности праймерами. Однако в отличие от ПЦР в растворе копии остаются привитыми на поверхности и всегда находятся в непосредственной близости от исходной молекулы. В результате амплификации образуются очень плотные ДНК-колонии.

Амплификация осуществляется по двум механизмам [28]. Свободно диффундирующая ДНК-мишень может быть захвачена праймером, закрепленным на поверхности, и копируется полимеразой. Эту стадию назвали "межфазной амплификацией". При этом копии привязаны к поверхности, а исходная ДНК-молекула возвращается в раствор после стадии отжига. После того как на поверхности появились прикрепленные копии, начинает работать второй механизм: свободный конец пришитой копии гибридизуется с праймером, закрепленным на поверхности, по принципу комплементарности, и начинается стадия элонгации. В этом случае "поверхностной амплификации" обе молекулы ДНК пришиты к поверхности. В результате твердофазная ПЦР приводит к росту колоний молекул, закрепленных на поверхности и локализованных в одном месте. Это свойство может быть использовано при разработке микрочиповых устройств.

На первом цикле амплификации возможна только реализация межфазного механизма, что позволяет получить ДНК-мишени, прикрепленные к поверхности через праймеры. Далее также возможна и поверхностная амплификация. Однако, когда эти процессы проходят параллельно, доминирует межфазный механизм [27]. Для проведения поверхностной амплификации исходную реакционную смесь надо удалять и заменять раствором, не содержащим ДНК-мишени. Целью поверхностной амплификации является получение новых одноцепочечных молекул ДНК, привязанных к поверхности вблизи от исходной цепи. В итоге поверхность покрывается копиями обеих цепей исходных ДНК-мишеней в виде колоний, количество которых зависит от числа мишеней, связавшихся с праймерами во время первого цикла. Однако смена температур при амплификации может приводить к удалению праймеров с поверхности. За 28 циклов потеря связь с поверхностью могут до 50 % праймеров [27]. Это относится к недостаткам твердофазного метода, поскольку приводит к снижению выхода ПЦР и перемешиванию колоний [27].

Твердофазный метод проведения ПЦР используют для секвенирования и обнаружения аллельных вариаций генов.

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОЛОНИЙ

Основное отличие метода молекулярных колоний (ММК) от классической ПЦР заключается в

том, что анализ проводится не в жидкой, а в иммобилизованной гелеобразной среде, например в тонком слое полиакриламидного геля. Пористая структура геля затрудняет диффузию крупных макромолекул, но не влияет на диффузию субстратов реакции, позволяя осуществить ПЦР. Во время амплификации копии каждой молекулы-мишени (ампликоны) скапливаются вокруг исходной молекулы, образуя так называемые молекулярные колонии. Если исходная концентрация молекулы-мишени мала, то, скорее всего, колонии в геле будут пространственно разделены. Так как практически каждая колония происходит из одной молекулы ДНК-мишени, то регистрация молекулярных колоний позволяет обнаруживать, подсчитывать и идентифицировать одиночные способные к размножению молекулы ДНК. Количество молекулярных колоний совпадает с числом ДНК-мишеней, находящихся в нанесенном на гель образце.

Впервые ММК был использован сотрудниками лаборатории А.Б. Четверина (ИБ РАН, г. Пущино) для регистрации колоний РНК в агарозном геле [29]. Авторы "выращивали" колонии РНК с помощью Q-репликазы для обнаружения единичных молекул нуклеиновых кислот. Тогда же в развитие работы было предложено выращивать колонии ДНК.

В отличие от изотермической Q-репликационной реакции в методе ПЦР реакционная среда подвергается периодическому нагреву, поэтому вместо агарозы для получения молекулярных колоний ДНК было предложено проводить ПЦР в более термоустойчивом полиакриламидном геле [30–34]. Первоначально предполагалось полимеризовать гель в присутствии всех компонентов ПЦР. Со временем авторы усовершенствовали методику, разделив стадии полимеризации и амплификации, что позволило очистить гели от растворимых компонентов и возможных загрязнений, а также сохранить активность ДНК-полимеразы при ПЦР [35, 36]. Гели толщиной 400 мкм отливали в лунках диаметром 14 мм в предметном стекле, вымачивали в воде для удаления всех растворимых веществ, автоклавировали и высушивали. Сухой гель восстанавливали до исходного объема раствором реакционной смеси (дНТФ, праймеры, полимеразы, ДНК-мишень), герметизировали и помещали в амплификатор. В этом случае полностью сохранялась активность ДНК-полимеразы и уничтожались молекулы чужеродной ДНК, которые могли попасть в гель [35, 36]. Объем одной лунки с гелем составлял 65 мкл, и расход реактивов был сопоставим с ПЦР в пробирке объемом 50 мкл. Реакцию провели в таком же режиме термоциклирования, что и классическую ПЦР, но с увеличением длительности стадии отжига на 10–20 с [37].

Для осуществления регистрации молекулярной колонии необходимо, чтобы она содержала

до миллиарда копий исходной молекулы. Размер одной колонии может варьироваться от одного до нескольких сотен микрометров, что определяется эффективностью ПЦР, количеством циклов амплификации, размерами размножаемых фрагментов ДНК и характеристиками геля [37].

Молекулярные колонии можно обнаружить с помощью окрашивания геля интеркалирующими красителями, например SYBR Green I [38]. Однако существенным недостатком такого способа является окрашивание как специфических продуктов амплификации, так и неспецифических (димеры праймеров, чужеродные ДНК-мишени).

Изначально молекулярные колонии переносили на нейлоновую мембрану путем промокания (блотинга) геля и проводили гибридизацию с радиоактивно мечеными зондами с короткоживущими радиоактивными изотопами ^{32}P , ^{35}P и ^{35}S [36, 39, 40]. Позднее авторы продемонстрировали, что колонии можно обнаружить посредством гибридизации на нейлоновых мембранах с флуоресцентными зондами [41, 42]. К достоинствам этого метода регистрации относится возможность получения нескольких реплик с одной лунки, т. к. при одном блотинге на мембрану переносится около 10 % (около 10^7) молекул ДНК [43]. Гибридизация мембраны с несколькими флуоресцентными зондами позволяет получить информацию о гибридизации каждого из зондов, если их спектральные характеристики различаются достаточно для избирательной регистрации флуоресценции каждого из них. Этот способ может применяться для обнаружения разных частей химерных молекул, например маркеров лейкоза [42]; для регистрации нескольких ДНК-мишеней при условии, что зонды различаются нуклеотидными последовательностями и флуорофорами; для определения вариантов последовательности одной мишени, в частности однонуклеотидного полиморфизма (SNP).

В работе [44] авторы предлагают способ регистрации роста молекулярных колоний в реальном времени с помощью "гомогенных" систем детекции, включающих интеркалирующие красители, гибридизационные зонды или их различные комбинации. Наивысшую чувствительность получили при использовании пары зондов, которые гибридизуются рядом друг с другом. На сближенных концах таких зондов находятся флуорофоры, между которыми возможен резонансный перенос энергии (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Обнаруживать молекулярные колонии можно с помощью "molecular beacons" — зондов с комплементарными концевыми последовательностями. В этом случае используется олигонуклеотидный зонд в форме шпильки, несущий на сближенных концах флуорофор и группу, которая тушит его флуоресценцию, когда зонд свободен. Уровень флуоресценции нарастает, когда зонд вытягивается в результате гибридизации с ДНК-мишенью. С помощью асимметричного варианта ПЦР чувствительность детектирования можно существенно повысить. Концентрации праймеров подбираются таким образом, чтобы амплифицировалось больше тех цепей, которые комплементарны зондам. В этом случае молекулярные колонии флуоресцируют значительно ярче [44], т. к. образуется избыток одноцепочечных ампликонов, которые более доступны для гибридизации с зондами (рис. 2).

В работах [36, 43, 46] указано, что ММК позволяет выявить 1 молекулу ДНК или 2 молекулы РНК. Меньший процент выявления молекул РНК отражает выход стадии обратной транскрипции. При этом число колоний всегда пропорционально числу посеянных мишеней, что позволяет определить исходный титр. Данные [36] иллюстрируют

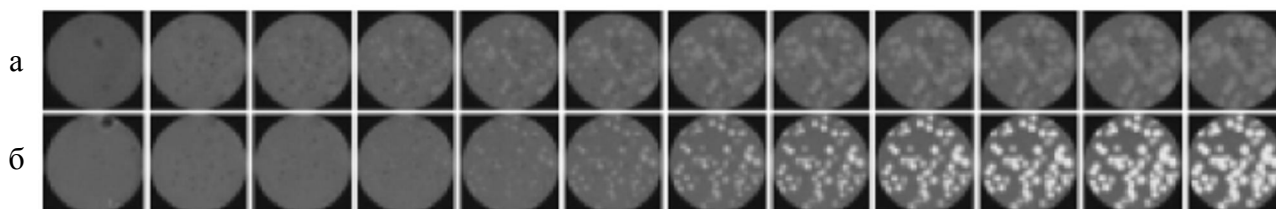


Рис. 2. Изображения молекулярных колоний [45].

Колонии получены с помощью а — симметричной ПЦР, б — асимметричной ПЦР

отсутствие конкуренции в ММК при размножении сразу нескольких мишеней. Это важно при проведении мультиплексной ПЦР. Например, 300 молекул РНК вируса СПИД (HIV-1 RNA) размножали одновременно с ДНК вируса гепатита Б (HBV DNA), начальное количество которой составляло от нуля до миллиарда молекул. Результаты свидетельствуют, что число и интенсивность колоний одной мишени (HIV-1) не зависят от присутствия в том же геле в миллионы раз больше колоний другой мишени (HBV). Авторы считают, что полное отсутствие конкуренции между мишенями доказывает очень высокую разрешающую способность полиакриламидного геля. В терминах цифровой ПЦР используемый гель диаметром 14 мм эквивалентен по разрешающей способности ПЦР-планшету с миллиардом лунок [37].

ММК позволяет проводить одновременное обнаружение нескольких мишеней, что было продемонстрировано в работе [46]. При использовании модельного образца из донорской крови объемом 100 мкл, в который либо не добавили мишень, либо добавили 150 молекул HIV-1 РНК и 50 молекул HBV ДНК, в серии из 7 экспериментов в виде колоний выявлено 78 ± 18 молекул HIV-1 РНК и 53 ± 11 молекул HBV ДНК.

ММК исключает конкуренцию размножению мишени со стороны неспецифического синтеза ДНК. В работе [36] описывается проведение ПЦР в акриламидном геле для модельного образца, приготовленного на основе 100 мкл донорской крови с добавлением известного числа молекул ДНК вируса гепатита Б. Результаты из этой работы представлены на рис. 3. Показано, что число выращенных колоний в пределах статистического разброса соответствует числу добавленных в кровь молекул мишени. Авторы отмечают, что ММК позволяет снизить предел детекции ДНК-содержащих вирусов в крови до абсолютного ми-

нимума — одной молекулы, что в 500 раз точнее результата, который может показать современная ПЦР-диагностика.

ММК может повысить точность и надежность современных методов диагностики на ранних стадиях инфекционных и онкологических заболеваний. Разработана полная диагностическая процедура, включающая ММК, для выявления минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе [47]. Результаты показывают, что метод позволяет выявить около 50 % молекул мРНК AML1-ETO в клиническом образце. Авторы указывают, что чувствительность диагностики 10^{-7} – 10^{-8} (1 лейкозная клетка на фоне 10^7 – 10^8 здоровых лейкоцитов) многократно выше максимальной чувствительности других методов.

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНЫХ КОЛОНИЙ (ПОЛОНИЙ)

В 1999 г. Митра и Чёрч предложили метод "полоний" (полимеразных колоний) [38, 48]. Технологии ДНК-полоний были использованы для проведения параллельных и независимых ПЦР для 1000–10 000 молекул мишени в тонком слое полиакриламидного геля (~40 мкм), пришитого к стандартному предметному стеклу. Один из двух праймеров был привит к цепям полиакриламида с помощью акридитной группы. Полимеризацию акриламида проводили в растворе, который содержал все необходимые для проведения ПЦР компоненты. Стекло с гелем термоциклировали (~40 циклов ПЦР). Поскольку в гелевой матрице диффузия молекул затруднена, каждая исходная мишень образует пространственно локализованную сферическую колонию, в которой накапливается до 10^8 идентичных молекул.

Для определения параметров, влияющих на размер полоний, ПЦР проводили с использованием ДНК-мишеней длины 120, 234 и 514 пар оснований (п.о.) в гелях с 6, 10 и 15 % концентрациями акриламида. Было выявлено, что радиус полоний уменьшается с возрастанием размера мишени и увеличением концентрации акриламида в геле. Используя мишень размером 514 п.о. и 15 % акриламидный гель, авторы получили однородные полоний со средним радиусом (12.5 ± 0.29) мкм.

Метод полоний используют в анализе экспрессии генов [49], однонуклеотидного полиморфизма [50], при генотипировании [51] и секвенировании [48].

МИКРОЧИПОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Одной из тенденций развития современной аналитической техники является миниатюризация. Наиболее яркое воплощение этой тенденции про-

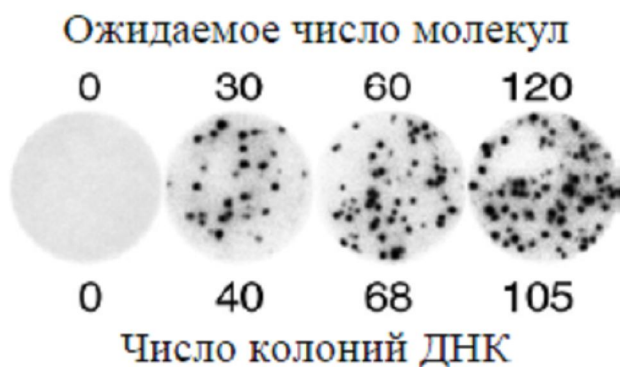


Рис. 3. Обнаружение молекул ДНК вируса гепатита Б в крови человека [36]

явилось в системах: "лаборатория на чипе" (Lab-on-a-Chip), или микроаналитических системах полного анализа (micro Total Analysis System) [52]. Основой таких систем является аналитический микрочип, на котором реализуются основные стадии определения искомого компонента. Развитие микрофлюидики привело к появлению приборов, в которых осуществлялось воспроизводимое управление нано- и пиколитровыми объемами жидкости [53]. Соответственно возникла возможность реализации новых методик анализа и создания приборов с отличными от макроаналогов техническими характеристиками. В первых микрофлюидных чипах (МФЧ) реализовывались главным образом методики электрофоретического разделения. Впоследствии стали создаваться микрочипы и для других методов анализа, в частности для ПЦР [54].

Микрочиповые устройства для ПЦР в реальном времени

В микрообъеме можно значительно ускорить нагрев и охлаждение реакционной смеси, что объясняет привлекательность применения микрочиповых технологий для методов ПЦР. В микрочип встраивают реакционные камеры с нагревательно-охлаждающими устройствами для обеспечения тепловых режимов амплификации (см., например, [55]). Так как ПЦР требует относительно чистых мишеней ДНК, то в микроканалы чипа можно встроить фильтры для очистки образца и элементы для извлечения и концентрирования ДНК [56–58].

Первыми работами в области создания систем для ПЦР на микрочиповой платформе являются работы Л. Криска [59]. Коммерческому использованию микрочиповых технологий для амплификации нуклеиновых кислот посвящены работы А. Нортрапа с соавторами [60, 61].

Современные технологии позволяют изготовить микрочипы с реакционной камерой для проведения ПЦР, характеризующейся высоким соотношением поверхности к объему, что делает возможным осуществлять быстрый и эффективный теплообмен. Микроустройства для проведения ПЦР можно классифицировать: по принципу и механизму нагревания реакционной смеси (прямое нагревание, нагрев смеси в потоке, конвективное нагревание, нагревание электромагнитным излучением) и способам транспортировки реакционной смеси (стационарные и проточные реакционные камеры) [62, 63]. В стационарных реакционных камерах температура меняется в течение каждого цикла амплификации. Применяются как однокамерные ПЦР-чипы [64, 65], так и мультикамерные чипы [66–70]. Ключевые проблемы функционирования таких систем — получение однородных управляемых температурных полей, предотвращение перекрестного переноса материала образцов

(контаминации) из соседних камер и модификация поверхности реакционной камеры для повышения эффективности реакции. Исследователи из Institute of Bioengineering and Nanotechnology (Singapore) предложили иной подход при создании камер для проб малого объема, используя специально организованную гидрофобную-олеофобную поверхность таким образом, чтобы капля ПЦР-смеси оказалась внутри другой капли большего объема, служащей в качестве реакционной камеры [71, 72]. Такие камеры получили название "виртуальных" камер.

Нагрев реакционной смеси может осуществляться с помощью лазеров, что значительно повышает быстродействие систем. Так, в [73] сообщается о высокоскоростной ПЦР-РВ на чашке Петри из полистирола. Нагрев капель смеси осуществляется инфракрасным лазером на длине волны 1460 нм. Нанолитровые капли ПЦР-смеси (водный раствор в масле) являются индивидуальными микрореакторами для амплификации. Разработанная техника контактной печати для создания большого массива капель одинакового размера и оптимизация мощности лазера позволили осуществить двухстадийную ПЦР-реакцию за короткий промежуток времени (40 циклов за 6 мин). Регистрация флуоресценции осуществлялась на платформе инвертированного микроскопа Nikon TE2000. Длина волны возбуждения — 480 нм, регистрации эмиссии — 520 нм (FAM).

В микрочипах с проточными (микрофлюидными) камерами амплификация происходит, когда реакционная смесь протекает по микроканалу через соответствующие температурные зоны. Такой чип для ПЦР был предложен Накано с сотрудниками в 1994 г. [74]. Проточные микрочипы совершенствовались [75, 76]. В отличие от микрочипов со стационарными камерами в микрофлюидных чипах тепловая инерция системы сведена к минимуму. Скорость изменения температуры зависит только от характеристик потока реакционной смеси и времени достижения термического равновесия. Сейчас коммерческие проточные микрофлюидные чипы из полимерных материалов выпускаются компанией Microfluidic ChipShop GmbH [77]. Проточный вариант имеет недостатки:

а) образование пузырьков воздуха в микроканалах снижает эффективность ПЦР;

б) управляемый давлением поток имеет параболический профиль, что приводит к размытию образца;

в) трудно регулировать и контролировать скорость перемещения реакционной смеси между различными температурными зонами. Для их преодоления используют различные приемы [78] или альтернативные подходы.

Накаяма и соавторы предлагают предотвращать

образование пузырьков воздуха, повышая вязкость путем ввода в канал масла перед загрузкой ПЦР-смеси [79]. Механизмы образования пузырьков в реакторах хорошо исследованы, например, в [80].

Высокое соотношение площади поверхности к объему для реакционных камер и каналов ПЦР-микрочипов приводит к возрастанию влияния взаимодействий между поверхностью и молекулами реакционной смеси на эффективность проведения реакции. Для успешного проведения ПЦР на микрочипе часто модифицируется внутренняя поверхность реакционной камеры или микроканала. Методы обработки поверхности могут быть квалифицированы как статические [68, 81] и динамические [68, 79].

Сейчас не существует мнения о том, какой объем камеры является минимальным для эффективного проведения ПЦР. Авторами [82] разработан микрофлюидный чип для выполнения 72 параллельных ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) для реакционной смеси объемом 450 пл. Устройство для проведения 3072 параллельных ОТ-ПЦР с объемом 33 нл описано в работе [68]. Матсубара с соавторами предложили интегрированное ПЦР-устройство из кремния с микрокамерами для объемов 40 нл [66]. В работе [72] авторы сообщают о ПЦР-системе с виртуальными реакционными камерами, в которых можно проводить амплификацию образца в реакционном объеме 100 нл, который покрыт минеральным маслом объемом 1 мкл. Группа Ландерса [83] разработала интегрированное с капиллярным электрофорезом ПЦР-устройство из стекла и ПДМС, в которое образец вводили под давлением, используя эластомерные клапаны, и проводили амплификацию в камерах объемом 280 нл. В работе [84] описывается система, где амплификация выполняется в капле объемом 10 пл, изолированной маслом. Хотя прослеживается тенденция уменьшения рабочего объема камер, но разрабатываются и используются варианты проведения ПЦР на чипе в сравнительно больших объемах (3 мкл и более). Например, группа Ли разработала несколько микрочиповых устройств для ПЦР с реакционными объемами от 10 мкл и выше [85, 86].

Одной из проблем, возникающих при реализации ПЦР в микрочиповом формате, является контаминация образца — попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Для чипов многократного использования требуется промывка после проведения амплификации органическими растворителями, концентрированными растворами неорганических кислот или растворами сильных детергентов. Также можно использовать различающиеся по степени гид-

рофильности покрытия внутренней поверхности камер и наружной поверхности чипа [66]. Другим способом предохранения образца является запечатывание камеры после загрузки образца специальной пленкой (например, полиолефиновой пленкой фирмы Sarstedt).

Таким образом, микрочиповые технологии для ПЦР позволяют: значительно уменьшить объем требуемых реагентов; существенно увеличить скорость нагрева (охлаждения) реакционной камеры и сократить время анализа; реализовать возможность проведения амплификации во множестве реакционных камер одновременно, тем самым увеличив производительность определений; и в некоторых случаях — повысить чувствительность. Тем не менее микрочиповые технологии для ПЦР-РВ не позволяют избавиться от общего недостатка метода — необходимости градуировки для точных измерений.

Микрочиповые технологии для ЦПЦР

Принципиально новым подходом явилось создание методов "цифровой" ПЦР (ЦПЦР), позволяющих осуществить количественное определение исходного материала сразу в цифровом виде. При этом информационный сигнал может быть представлен в виде "цифрового" изображения, обработка которого дает возможность получить численное значение, связанное с исходной концентрацией молекул. Отметим следующие преимущества ЦПЦР по сравнению с ПЦР-РВ:

- а) не требует градуировочных зависимостей и использования дорогостоящих стандартов;
- б) позволяет проводить прямое определение числа молекул в пробе;
- в) эффективность ПЦР мало влияет на получаемый результат;
- г) используются сверхмалые объемы исходной пробы;
- д) обладает более высокой (на уровне отдельных молекул) чувствительностью определения.

В простейшем виде метод ЦПЦР был реализован в стационарных камерах на стандартных микротитрационных планшетах. Для детектирования результатов применялись высокочувствительные коммерческие системы, например Mx3005P (или Mx3000P) QPCR System (Agilent Technology) [87]. Эти системы позволяют осуществить анализ экспрессии генов, оценить уровень метилирования ДНК, провести SNP-генотипирование, обнаружить патогены и т. д. Существенными недостатками такого подхода являлись чрезвычайно высокая трудоемкость измерений и большое количество исследуемой пробы (до 25 мкл в каждой ячейке микротитрационного планшета), поэтому появились более прогрессивные системы на основе устройств с реакционными камерами гораздо меньших раз-

меров: "цифровыми" панелями, например Dynamic Array и Digital Array фирмы Fluidigm [18], микрофлюидными устройствами (например, устройство с техникой SlipChip [88]) и др. В этих устройствах эффекты микрофлюидики используются при загрузке пробы. В процессе термоциклирования движения пробы и реакционных смесей не осуществляются, и эти устройства можно отнести к системам со стационарными реакционными камерами.

Новое поколение приборов для секвенирования ДНК на основе "454", "Solexa" и SOLiD-платформ требует абсолютной калибровки числа молекул. Это требование имеет два неприятных последствия. Во-первых, для подготовки библиотеки необходимо большое количество пробы (до нескольких микрограмм), что ограничивает область применимости прибора. Например, при секвенировании древних, судебно-медицинских и клинических образцов количество исходных ДНК ограничено. Во-вторых, каждая библиотека требует титрования в процессе секвенирования, тем самым увеличивая расходы и снижая производительность секвенирования. В работе [15] демонстрируется использование ЦПЦР для создания точных библиотек секвенирования для платформ "454" и "Solexa" из нанogramмовых количеств исходного материала, без дорогостоящего и трудоемкого титрования. Авторы считают, что их исследование является первой работой, показавшей успешные результаты при уменьшении количества исходного образца более чем в 1000 раз без предварительной амплификации. ЦПЦР позволяет проводить абсолютное количественное секвенирование библиотек, устраняет неопределенности, связанные с применением стандартных кривых (в количественной ПЦР-РВ), имеет коэффициент вариации ~10 %, что является достаточным условием секвенирования без титрования.

Методы ЦПЦР в настоящее время реализованы в коммерческих приборах, например Fluidigm BioMark™ Real-Time PCR и Fluidigm EP1™ end point PCR [18]. Первый прибор предназначен для анализа экспрессии генов, высокоскоростного SNP-генотипирования, подсчета числа копий генов, быстрого приготовления библиотек при секвенировании. В устройстве используются специально созданные аналитические микрочипы (Dynamic Array 48.48 и 96.96 и Digital Array).

Методы и техника ЦПЦР постоянно совершенствуются. Так, в статье [88] описывается оригинальный метод SlipChip для выполнения цифровой ПЦР в простом и недорогом микрофлюидном формате. Использована техника скольжения двух пластин, позволяющая осуществить загрузку в лунки (1280 лунок) проб объемом 2.6 нл для амплификации. После проведения ПЦР наличие нуклеиновых кислот определяется по сигналу флуоресценции. Авторами была продемонстрирована

возможность проведения ЦПЦР на геномной ДНК стафилококка.

Цифровая микрофлюидика — перспективная платформа для цифровой ПЦР

В "цифровой" микрофлюидике может быть реализована концепция "раздробленных" химических реакций, протекающих в закрытых емкостях (микрокаплях). Эта концепция перспективна для применения в тех случаях, когда каждая капля содержит все ингредиенты для эксперимента. Возможность варьирования объема капель позволяет вводить в них не только молекулы, но и отдельные биологические объекты, в том числе клетки, бактерии, вирусы. Наиболее коммерчески успешным применением микрокапель является эмульсионная ПЦР, например, в секвенаторе Genome Sequencer FLX (Roche), использующем технологию пиросеквенирования 454 Life Sciences Corporation и метод SOLiD (ABI).

В большинстве публикаций, описывающих эксперименты в проточной капельной микрофлюидике, сообщается о характерных частотах формирования капли, находящихся в диапазоне от 0.1 до 2 кГц. Это хорошо подходит для изучения ферментативных реакций, протекающих в каплях, или для использования при скрининге, например, клеток. Увеличение частоты формирования капель, возможно, в будущем позволит получить системы, которые будут совместимы по производительности с современными цитометрами.

Интенсивные исследования микрокапель в микрофлюидике в течение последних 5 лет привели к созданию целого ряда методов для формирования, слияния и сортировки мелких капель. Для подробного ознакомления с технологическими и инженерными особенностями методов следует рекомендовать обзоры [89–92]. Конечно, для реализации сложных биохимических методов анализа или экспериментов требуется высокий уровень интеграции функциональных элементов в микрочиповые устройства. Но весьма важным является то, что микрокапельные системы обладают уникальными возможностями для дискретных экспериментов и все процессы, протекающие в каплях, могут быть полностью контролируемыми.

Образование капель с помощью Т-образных каналов [93–95] или устройств для фокусировки потока [96] — два устоявшихся метода формирования монодисперсных (< 1–3 % дисперсности) капель с частотой до 10 кГц. Формирование монодисперсных капель с использованием струй является сложной задачей, но можно выбрать параметры потока и размеры канала так, чтобы всегда достигалась абсолютная неустойчивость, что приведет к контролируемому распаду [97]. Еще один способ образования капель из струи — ввод до-

полнительных элементов в канал. При стабильной струе в месте сужения канала происходит внутренний разрыв жидкости на капли [98].

Первоначально на микрофлюидном чипе для ПЦР при термоциклировании осуществлялось нагревание/охлаждение всего чипа [99], что занимало больше времени, чем необходимо для изменения температуры внутри реактора или капли. Далее появились варианты конструкций, в которых температура поддерживается в локальной области чипа, а капли проходят через отдельные температурные зоны (змеевик [100] или радиальная конструкция [101]). Как и в случае классической ПЦР-РВ, необходим точный контроль температуры в каждой капле. В отличие от обычной микрофлюидики "оболочка" капли защищает полимеразу и ДНК-матрицу от взаимодействия со стенками канала, что предотвращает инактивацию полимеразы и перекрестное загрязнение образцов [102].

В ЦПЦР количество капель, в которых происходит амплификация (что соответствует наличию в них ДНК-матрицы), коррелирует с количеством ДНК в исходном образце. Чем больше число капель (экспериментов), тем с более высокой достоверностью можно определить исходную концентрацию. При детектировании регистрируется только факт амплификации ДНК [7]. Считается, что такая информация более надежна, чем определение концентрации ДНК по кинетическим зависимостям.

Хотя методы цифровой микрофлюидики еще не реализованы в коммерческих системах для ЦПЦР из-за ряда технических и методических проблем, ожидается, что эти методы позволят получить более точные и надежные результаты при измерениях. Методы "цифровой" микрофлюидики являются перспективной основой для создания приборов для ЦПЦР следующего поколения, т. к. позволяют реализовать новые методы и подходы при анализе пробы. В частности, в процессе исследования с пробой, находящейся в дискретном изолированном объеме, можно осуществлять различные действия: вводить реагенты, разбивать пробу на отдельные элементы (капли) меньшего объема или осуществлять слияние капель и т. д. Однако методы "цифровой" микрофлюидики требуют создания интегрированных микрофлюидных систем, что усложняет конструкцию микрочипа и приводит к повышению его стоимости.

АНАЛИЗ БАЗОВЫХ ПОЛОЖЕНИЙ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ПРОЦЕССОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПЦР-РВ, ММК, ЦПЦР И АЛГОРИТМОВ ОБРАБОТКИ ИНФОРМАТИВНЫХ СИГНАЛОВ

Описанию теоретических основ и практической реализации ПЦР, включая и ПЦР-РВ, посвящено

множество работ как зарубежных (начиная с конца 1980-х годов) [103], так и отечественных [104–107]. Концепция практической реализации ПЦР изложена в статье [103] и в ряде предшествующих работ более частного характера [105–107]. Одно из направлений исследования связано с разработкой способов (моделей) базовых физико-химических процессов, происходящих в приборах и отдельных устройствах. Построение адекватных математических моделей позволит, во-первых, перейти от реальных экспериментов к вычислительным (имитационным моделям) и, во-вторых, эффективно решить задачи оптимизации конструкций или/и режимов анализа.

Амплификатор ДНК в общем случае состоит из теплового блока (носитель, рабочее тело, преобразователь энергии, теплообменное устройство, теплоноситель, побудитель расхода) и микропроцессорной системы управления. Последняя должна обеспечивать многоступенчатый температурный режим с быстрыми переключениями на каждом из 10–40 циклов. В работе [104] представлен также обзор различных типов применяемых элементов теплового блока.

Основной физический процесс в амплификаторах — конвективный массоперенос в различных элементах теплового блока при наличии источника (реакционного) члена. В рамках математической физики подобные уравнения параболического типа, как правило, решаются методом Фурье (разделения переменных). Особенностью является необходимость введения тензора теплопроводности, т. к. теплопроводность в различных направлениях может быть разной. Для каждого элемента приведены в явном виде уравнение энергии, движения и неразрывности с соответствующими граничными условиями. Наиболее распространены для уравнений неразрывности и движения условия 1-го рода (прилипание к жесткой стенке), т. к. скорости движения невелики. Для уравнений энергии в основном встречаются два вида граничных условий: 3-го рода (ньютоновский поток тепла) и 5-го рода ("склейка" потоков).

Математическая модель, описывающая динамику роста количества продуктов ПЦР-РВ, строится на основе следующего ключевого положения: реакция идет в замкнутом объеме (например, в пробирке, непроницаемой для вещества). Аналитическая информация определяется, исходя из общего количества ДНК в реакционной камере. В этом случае динамика количества ДНК может рассматриваться, как популяционный процесс в замкнутой системе из-за отсутствия дополнительных (внешних) ресурсов для ее развития. В равной мере у популяции нет возможностей для расширения границ или перехода какой-либо ее части в другой ареал. При таких свойствах требуется учет важного питательного ресурса. Предположим, что мак-

симальная численность популяции, которая может существовать при имеющихся питательных ресурсах — x^* . По мере приближения численности популяции к предельной x^* скорость роста ее численности должна убывать. Т. е. $dx/dt = \alpha \cdot x \cdot (x^* - x)$, или, переходя к собственному времени популяции, $dx/d\tau = x \cdot (x^* - x)$ [108]. Начальную численность полагаем равной x_0 . Это дифференциальное уравнение — уравнение логистического роста (Ферхюльста) — является частным случаем уравнения Бернулли. Решение этого уравнения:

$$x(\tau) = \frac{x_0 \cdot x^*}{x_0 + (x^* - x_0) \cdot \exp(-x^* \cdot \tau)}. \quad (1)$$

Построив график решения $x(\tau)$, нетрудно заметить, что на кривых выделяются три стадии. А. Экспоненциальный рост (при $x \ll x^*$). Б. Близкий к линейному рост (при $x \approx 0.5 x^*$). В. Участок насыщения (при $x \approx x^*$).

Альтернативная математическая модель описывает динамику накопления ПЦР-продукта также по 3-этапной схеме: отсутствие увеличения количества продукта на первых циклах, экспоненциальный рост до цикла n_k и последующее резкое скачкообразное снижение коэффициента накопления (коэффициента, характеризующего качество ПЦР-процесса) f [109]. Однако аппроксимация этой схемы, по-видимому, возможна и с помощью уравнения логистического роста, т. к. качественные тенденции (практическое отсутствие роста изначально, экспоненциальный рост и процесс типа насыщения — резкое убывание f) полностью соответствуют динамике (1).

Основные модификации уравнения Ферхюльста, преимущественно относящиеся к биофизическим приложениям, осуществляются следующими путями.

а) Ввод времени задержки t^* : $dx(t)/dt = f[x(t-t^*)]$. Такой подход реализован в экологической модели Хатчинсона.

б) Ввод "стока" или квоты вылова (модель экологической катастрофы по Арнольду): $dx/dt = \lambda x(x^* - x) - c$ или $dx/dt = \lambda x(x^* - x) - cx$ [110].

в) Введение трофической функции (ограничение эффективности в окрестности стадии насыщения), или модель Холлинга—Теннера: $dx/dt = rx(1 - x/x^*) - \mu x / (D + x)$. В частности, уравнение Михаэлиса—Ментен по-существу использует трофическую функцию, где роль слагаемого D играет характерная концентрация насыщения [111].

Теоретические предпосылки к использованию уравнения Ферхюльста для моделирования дина-

мики продуктов ПЦР по крайней мере не противоречат базовым принципам реализации ПЦР-РВ, а представленные модификации позволят учесть эффекты, связанные со снижением эффективности химических реакций при расходовании реагентов.

Из множества работ, посвященных математическим моделям амплификации ДНК в гелевых средах, следует выделить зарубежные работы (группа Чёрча) и отечественное направление, в первую очередь связанное с работами коллектива, руководимого чл.-кор. РАН А.Б. Четверным. Теоретической основой для математического моделирования послужили классические работы [45, 112]. При этом предложенная в [112] математическая модель самоорганизации молекулярной колонии учитывает принцип Тьюринга "нелинейная реакция—диффузия". Модель описывает пространственно-временное распределение концентраций компонентов: свободные (диффундирующие) праймеры (Q) и свободные (диффундирующие) цепочки (S), образуемые ими комплексы QS — одного или двух видов каждого из трех вышеуказанных компонентов, и представляет собой систему дифференциальных уравнений второго порядка в частных производных, которые нетрудно решить с помощью неявных конечно-разностных схем.

Мы полагаем, что перспективным направлением работ по математическому моделированию амплификации ДНК в гелевых средах являются исследования, связанные с возможными модификациями базовой модели Чёрча [112], а именно:

1. Описание химических реакций на заключительной стадии цикла можно упростить: задать, что образованное соединение (QS) успевает практически полностью удвоиться и далее полностью разложиться на (Q) и (S). Таким образом, исходное количество продукта (QS), равное 1, превращается в $(1+E)$ (QS), где E — эффективность. (Эффективность может определяться, в частности, константой скорости реакции и временем соответствующей стадии цикла). Т. е. для этой стадии нет необходимости писать системы дифференциальных уравнений для компонентов.

2. В явном виде можно добавить ингибирующую реакцию $k^2 S^2$, вследствие которой E монотонно падает с ростом концентрации S . Как отмечалось в [45], ингибирование может происходить из-за накопления пирофосфата. Указанное слагаемое можно считать "имитатором" данного химического процесса. В то же время Чёрч говорит о пренебрежимо малом эффекте ингибирования.

3. В [112] изменение коэффициента диффузии реагентов из-за нагрева/охлаждения (от 62 до 94 °C) не учитывается. Коэффициент диффузии

в приближении Стокса—Эйнштейна $D = \frac{kT}{3\pi\mu d^*}$ [113], где коэффициент динамической вязкости μ экспоненциально зависит от абсолютной температуры. В [114] для водоподобной среды эта зависимость аппроксимирована

$$2.761 \cdot \exp(1713/T) \cdot 10^{-6} \text{ кг/(с·м)},$$

где T — абсолютная температура (в К). Данные [115] для температуры $T = 288$ К расходятся с [114] примерно на 7%. Аналогичные оценки (например, в [116]) отличаются лишь коэффициентом в экспоненциальном множителе (от 1600 до 2400). Ориентируясь на представленную аппроксимацию, отношение коэффициентов диффузии при 94 и 62 °С превысит 1.43. Следовательно, изменения D значительны, что следует учесть в модели. Таким образом, имеются основания для модернизации классических моделей ММК [45, 112].

Динамика процесса образования колоний (зависимость $P = P(r, t)$) может быть описана системой (системами) дифференциальных уравнений, содержащих блоки вида

$$\begin{aligned} \frac{\partial S}{\partial t} &= -k^1 QS - k^2 S^2 + D_s \Delta_r S, \\ \frac{\partial Q}{\partial t} &= -k^1 QS + D_Q \Delta_r Q, \\ \frac{dP}{dt} &= 2k^1 QS. \end{aligned} \quad (2)$$

Здесь $\Delta_r(\dots) = \frac{\partial(r\partial(\dots))}{r\partial r^2} = \frac{\partial(\dots)}{r\partial r} + \frac{\partial^2(\dots)}{\partial r^2}$ — радиальная составляющая оператора Лапласа в цилиндрической системе координат.

Подбор соотношений исходных концентраций реагентов, коэффициентов диффузии и констант скоростей химических реакций, входящих в (2) в качестве коэффициентов уравнений, учитывает ряд рекомендаций и оценок, предложенных в работах [38, 116, 117]. В частности, учтены формулы пересчета констант скорости реакции для аналогичных цепочек ДНК с другим числом оснований. Кроме того, приведенная средняя эффективность ПЦР 70% [117] позволяет оценить модельную константу скорости ингибирующей реакции. Эта оценка не совпадает с аппроксимацией [112], в соответствии с которой вплоть до 23-го цикла наблюдается экспоненциальный рост количества ДНК по закону 1.995^n . Правда, в [112] строится кусочно-линейная аппроксимация от 1 до 90 цикла со "склеивкой" обоих участков на 23-м цикле.

При малой диффузии реагентов и при практически неисчерпаемых праймерах рост количества

ДНК адекватно описывается кривой логистического роста (1). Концентрация насыщения (предельная концентрация) однозначно определяется начальной концентрацией праймеров и константами скоростей реакции. Оцениванию параметров кривой логистического роста была посвящена работа [118, 119]. Эта схема, пренебрегающая диффузией компонентов и расходом праймеров, может рассматриваться в качестве тестовой для расчетной программы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие и совершенствование методов ПЦР привело к появлению новых высокочувствительных и специфичных методов анализа, позволяющих получать непосредственную оценку исходного числа амплифицируемых молекул. Эти методы получили название методов ЦПЦР. К ним следует отнести: а) непосредственно методы ЦПЦР, в которых используется техника предельного разбавления исходной пробы с оценкой получаемых сигналов на основании закона Пуассона; б) методы ПЦР в эмульсиях; в) методы твердофазной ПЦР; г) метод молекулярных колоний; д) метод полимерных колоний (полоний).

Основными принципами совершенствования методов ПЦР являются: а) переход от жидких сред к гелям, эмульсиям, твердой фазе (стекла, полимеры); б) переход к многокомпонентному анализу, как за счет введения различных красителей, так и за счет параллельного проведения множества реакций; в) повышение экспрессности определения за счет проточных систем и/или миниатюризации реакционного объема, что значительно уменьшает время анализа; г) миниатюризация, которая обеспечивает существенную экономию пробы и реагентов; д) использование микрочиповых технологий, обеспечивающих не только возможность миниатюризации прибора, но и максимальной автоматизации и контроля всех стадий анализа; е) использование высокопроизводительных вычислительных технологий, позволяющих повысить надежность количественного анализа.

Оценка адекватности математических моделей базовых процессов и их модификаций, соответствующих различным способам осуществления анализа на основе ПЦР, способствует проведению вычислительных экспериментов (имитационного моделирования), что позволит апробировать и впоследствии оптимизировать режимы и условия анализа.

Методы ЦПЦР обладают определенными преимуществами по сравнению с ПЦР-РВ, среди которых необходимо выделить следующие: а) не требует использования дорогостоящих стандартов и построения градуировочных зависимостей;

б) позволяет проводить прямое определение числа молекул в пробе; в) эффективность ПЦР практически не влияет на получаемый результат; г) обладают более высокой (на уровне отдельных молекул) чувствительностью определения. Методы ЦПЦР имеют хорошую перспективу для коммерциализации; так, в настоящее время несколько зарубежных фирм выпускают оборудование и реагенты для проведения ЦПЦР.

Благодарности

Исследования проведены

– в рамках Государственного контракта с ФМБА РФ № 86.619.11.6 "Теоретическое и экспериментальное сравнение аналитических характеристик метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и цифровой ПЦР" и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Фундаментальные науки — медицине" (проект "Картриджи-микрочипы для метода молекулярных колоний");

– при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг." при выполнении НИР по лоту (шифр 2011-1.2-512-073) "Разработка макетов аппаратно-программных комплексов для лабораторной и функциональной диагностики" по теме "Разработка макета аппаратно-программного комплекса для лабораторной и функциональной диагностики широкого спектра признаков методом полимеразной цепной реакции в реальном времени" (шифр заявки 2011-1.2-512-073-110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mullis K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction // *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 1990. V. 48. P. 579–582.
- Vu H.L., Troubetzkoy S., Nguyen H.H. et al. A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by (RT)-PCR and a new mathematical model for data analysis // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28, N 7. e18.
- Dorak M.T. (ed.). Real-time PCR. Advanced Methods Series. Oxford (UK): Taylor & Francis, 2006. 572 p.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR // *Genome Res.* 1996. V. 6. P. 986–994.
- Грабович М.Ю. Современные методы микробиологических исследований. Практическое учебно-методическое пособие для вузов. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2007. 69 с.
- Natarajan G., Johnson Y.R., Zhang F. et al. Real-time polymerase chain reaction for the rapid detection of group B streptococcal colonization in neonates // *Pediatrics*. 2006. V. 118, N 1. P. 14–22.
- Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96, N 16. P. 9236–9241.
- Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J. et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution // *Biotechniques*. 1992. V. 13, N 3. P. 444–449.
- URL: (<http://www.cytomix.com/>).
- Kalinina O., Brown J., Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection // *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25, N 10. P. 1999–2004.
- Dube S., Qin J., Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device // *PLoS ONE*. 2008. V. 33, N 8. e2876.
- Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K.W., Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100, N 15. P. 8817–8822.
- Pohl G., Shih I.-M. Principle and applications of digital PCR // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2004. V. 4. P. 41–47.
- Mikeska T., Candiloro I.L., Dobrovic A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation // *Epigenomics*. 2010. V. 2, N 4. P. 561–573.
- White R.A., Blainey P.C., Fan C.H., Quake S.R. Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing // *BMC Genomics*. 2009. V. 10, N 116. P. 1–12.
- Warren L., Bryder D., Weissman I.L., Quake S.R. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 17807–17812.
- Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 16368–16373.
- Margulies M., Egholm M., Altman W.E. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // *Nature (Lond.)*. 2005. V. 437. P. 376–380.
- URL: (<http://www.fluidigm.com/biomark-system.html>).
- McCaughan F., Dear P.H. Single-molecule genomics // *Journal of Pathology*. 2010. V. 220. P. 297–306.
- URL: (<http://www.lifetechnologies.com/>).
- URL: (<http://www.quantalife.com/>).
- Lun F.M., Chiu R.W., Chan K.C. et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* 2008. V. 54, N 10. P. 1664–1672.
- Weisenberger D.J., Trinh B.N., Campan M. et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight // *Nucleic Acids Research*. 2008. V. 36, N 14. P. 4689–4698.
- Zimmermann B.G., Gril S., Holzgreve W. et al. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? // *Prenat. Diagn.* 2008. V. 28. P. 1087–1093.
- Diehl F., Li M., He Y., Kinzler K.W. et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions // *Nature methods*. 2006. V. 3, N 7. P. 551–559.
- Adessi C., Matton G., Ayala G. et al. Solid phase amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. e87.
- Mercier J.-F., Slater G.W., Mayer P. Solid phase DNA amplification: a simple Monte Carlo lattice model // *Biophysical Journal*. 2003. V. 85, N 4. P. 2075–2086.
- Chetverin A.B., Chetverina H.V., Munishkin A.V. On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q β replicase // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 222. P. 3–9.

30. Патент РФ № 2048522, 20.11.95.
31. Патент США № 5616478, 04.01.97.
32. Патент РФ № 2114175, 27.06.98.
33. Патент США № 5958698, 09.28.99.
34. Патент США № 6001568, 12.14.99.
35. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Точная диагностика с помощью молекулярных колоний // Молекулярная биология. 2002. Т. 36. С. 320–327.
36. Chetverina He.V., Samatov T.R., Ugarov, V.I., Chetverin A.B. Molecular colony diagnostics: Detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR // BioTechniques. 2002. V. 33. P. 150–156.
37. Четверина Е.В., Четверин А.Б. Нанокolonии: обнаружение, клонирование и анализ индивидуальных молекул // Успехи биол. химии. 2008. Т. 48. С. 3–64.
38. Mitra R.D., Church G.M. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. e34.
39. Chetverina He.V., Chetverin A.B. Cloning of RNA molecules in vitro // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 2349–2353.
40. Chetverin A.B., Chetverina He.V., Demidenko A.A., Ugarov V.I. // Cell. 1997. V. 88. P. 503–513.
41. Патент РФ № 2394915, 24.03.06.
42. Четверина Е.В., Кравченко А.В., Фалалеева М. В., Четверин А.Б. // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. С. 456–463.
43. Samatov T.R., Chetverina He.V., Chetverin A.B. Expressible molecular colonies // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. e145.
44. Samatov T.R., Chetverina He.V., Chetverin A.B. Real-time monitoring of DNA colonies growing in a polyacrylamide gel // Analyt. Biochem. 2006. V. 356. P. 300–302.
45. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Научные и практические приложения молекулярных колоний // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. С. 284–296.
46. Chetverina He.V., Falaleeva M.V., Chetverin A.B. Simultaneous assay of DNA and RNA targets in the whole blood using novel isolation procedure and molecular colony amplification // Analyt. Biochem. 2004. V. 334. P. 376–381.
47. Фалалеева М.В., Четверина Е.В., Кравченко А.В., Четверин А.Б. Применение нанокolonий для выявления минимальной остаточной болезни при лейкозе t(8;21) // Молекулярная биология. 2009. Т. 43, № 1. С. 180–189.
48. Mitra R.D., Shendure J., Olejnik J. et al. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies // Analytical Biochemistry. 2003. V. 320. P. 55–65.
49. Mikkilineni V., Mitra R.D., Merritt J. et al. Digital quantitative measurements of gene expression // Bio-technol. Bioeng. 2004. V. 86. P. 117–124.
50. Merritt J., DiTonno J.R., Mitra R.D. et al. Parallel competition analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing by a single base using polymerase colonies // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. e84.
51. Mitra R.D., Butty V.L., Shendure J. et al. Digital genotyping and haplotyping with polymerase colonies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 5926–5931.
52. Manz A., Graber N., Widmer H.M. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing // Sensors and Actuators B: Chemical. 1990. V. 1. P. 244–248.
53. Squires T., Quake S. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale // Reviews of modern physics. 2005. V. 77. P. 977–1007.
54. Zhang Y.H., Ozdemir P. Microfluidic DNA amplification – A review // Analytica Chimica Acta. 2009. V. 63, N 2. P. 115–125.
55. Wu J., Cao W., Wen W. et al. Polydimethylsiloxane microfluidic chip with integrated microheater and thermal sensor // Biomicrofluidics. 2009. V. 3. P. 012005 (7 pages).
56. Wolfe K.A., Breadmore M.C., Ferrance J.P. et al. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids // Electrophoresis. 2002. V. 23, N 5. P. 727–733.
57. Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G. et al. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples // Anal. Chem. 2003. V. 75, N 8. P. 1880–1886.
58. Paegel B.M., Yeung S.H., Mathies R.A. Microchip bio-processor for integrated nanovolume sample purification and DNA sequencing // Anal. Chem. 2002. V. 74, N 19. P. 5092–5098.
59. Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P. Chip PCR. I. Surface passivation of micro-fabricated silicon-glass chips for PCR // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24, N 2. P. 375–379.
60. Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T. DNA amplification in a microfabricated reaction chamber // Seventh International Conference on Solid State Sensors and Actuators "Transducers '93", Yokohama, Japan. IEEE, N.Y., 1993. P. 924–927.
61. 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.
62. 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.
63. Ong S.-E., Zhang S., Du H., Fu Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems // Frontiers in Bioscience. 2008. V. 13. P. 2757–2773.
64. Erill I., Campoy S., Rus J. et al. Development of a CMOS-compatible PCR chip: comparison of design and system strategies // J. Micromech. Microeng. 2004. V. 14. P. 1558–1568.
65. Gulliksen A., Solli L., Karlsen F. et al. Real-time nucleic acid sequencebased amplification in nanoliter volumes // Anal. Chem. 2004. V. 76, N 1. P. 9–14.
66. Matsubara Y., Kerman K., Kobayashi M. et al. Micro-chamber array based DNA quantification and specific sequence detection from a single copy via PCR in nanoliter volumes // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 20. P. 1482–1490.
67. 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.
68. Morrison T., Hurley J., Garcia J. et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR // Nucleic Acids Research. 2006. V. 34, N 18. e123.
69. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В. и др.

- Микрочиповая мультиреакторная система для биохимического анализа // Научное приборостроение. 2005. Т. 15, № 2. С. 41–50.
70. *Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Арнаутов В.А. и др.* Мультиплексная аналитическая система для определения ДНК методом ПЦР в реальном времени // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 1. С. 10–20
 71. *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.
 72. *Neuzil P., Zhang C.Y., Pipper J., Oh S., Zhuo L.* Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. e77.
 73. *Kim H., Vishniakou S., Faris G.W.* Petri dish PCR: laser-heated reactions in nanoliter droplet arrays // *Lab Chip.* 2009. V. 9. P. 1230–1235.
 74. *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.
 75. *Kopp M.U., de Mello A.J., Manz A.* Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip // *Science.* 1998. V. 280. P. 1046–1048.
 76. *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.
 77. URL: (www.microfluidic-chipshop.com/).
 78. *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.
 79. *Nakayama T., Kurosawa Y., Furuji S. et al.* Circumventing air bubbles in microfluidic systems and quantitative continuous-flow PCR applications // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. P. 1327–1333.
 80. *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. Micromech. Microeng.* 2007. V. 17. P. 2055–2064.
 81. *Zou Z.Q., Chen X., Jin Q.H. et al.* A novel miniaturized PCR multi-reactor array fabricated using flip-chip bonding techniques // *J. Micromech. Microeng.* 2005. V. 15. P. 1476–1481.
 82. *Marcus J.S., Anderson W.F., Quake S.R.* Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 956–958.
 83. *Easley C.J., Karlinsey J.M., Landers J.P.* On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation // *Lab Chip.* 2006. V. 6. P. 601–610.
 84. *Beer N.R., Hindson B.J., Wheeler E.K. et al.* On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets // *Anal. Chem.* 2007. V. 79, N 22. P. 8471–8475.
 85. *Huang F.C., Liao C.S., Lee G.B.* An integrated microfluidic chip for DNA/RNA amplification, electrophoresis separation and on-line optical detection // *Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 3297–3305.
 86. *Chang Y.H., Lee G.B., Huang F.C. et al.* Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics // *Biomed. Microdevices.* 2006. V. 8. P. 215–225.
 87. URL: (<http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductData&PageID=356>).
 88. *Shen F., Du W., Kreutz J.E. et al.* Digital PCR on a SlipChip // *Lab. Chip.* 2010. V. 10. P. 2666–2672.
 89. *Teh S.-Y., Lin R., Hung L.-H., Lee A.P.* Droplet microfluidics // *Lab. Chip.* 2008. V. 8. P. 198–220.
 90. *Kim P., Kwon K.W., Park M.C. et al.* Soft lithography for microfluidics: a review // *Biochip Journal.* 2008. V. 2, N 1. P. 1–11.
 91. *Guenther A., Jensen K.F.* Multiphase microfluidics: from flow characteristics to materials and chemical synthesis // *Lab. Chip.* 2006. V. 6. P. 1487–1503.
 92. *West J., Becker M., Tombrink S., Manz A.* Micro total analysis systems: latest achievements // *Anal. Chem.* 2008. V. 80, N 12. P. 4403–4419.
 93. *Thorsen T., Roberts R.W., Arnold F.H., Quake S.R.* Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device // *Phys. Rev. Lett.* 2001. V. 86, N 18. P. 4163–4166.
 94. *Nisisako T., Torii T., Higuchi T.* Droplet formation in a microchannel network // *Lab. Chip.* 2002. V. 2, N 1. P. 24–26.
 95. *Link D.R., Anna S.L., Weitz D.A., Stone H.A.* Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices // *Phys. Rev. Lett.* 2004. V. 92. P. 054503. (4 pages).
 96. *Anna Sh.L., Bontoux N., Stone H.A.* Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels // *Appl. Phys. Lett.* 2003. V. 82. P. 364. (3 pages).
 97. *Utada A.S., Fernandez-Nieves A., Gordillo J.M., Weitz D.A.* Absolute instability of a liquid jet in a co-flowing stream // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 100. P. 014502.
 98. *Humphry K.J., Ajdari A., Fernandez-Nieves A. et al.* Suppression of instabilities in multiphase flow by geometric confinement // *Phys. Rev. E.* 2009. V. 79, N 5. P. 056310. (5 pages).
 99. *Beer N.R., Hindson B.J., Wheeler E.K. et al.* On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets // *Anal. Chem.* 2007. V. 79, N 22. P. 8471–8475.
 100. *Kiss M.M., Ortoleva-Donnelly L., Beer N.R. et al.* High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets // *Anal. Chem.* 2008. V. 80, N 23. P. 8975–8981.
 101. *Schaerli Y., Wootton R.C., Robinson T. et al.* Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 302–306.
 102. *de Mello A.J.* DNA amplification: does "small" really mean "efficient"? // *Lab Chip.* 2001. V. 1. P. 24N–29N.
 103. *Nuovo G.J., Gallery F., MacConnel K., Lane B.* Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR) — amplified hepatitis C cDNA // *Amer. J. Surg. Pathol.* 1993. V. 17. P. 683–690.
 104. *Чернышев А.В., Белова О.В.* Разработка обобщенной структурной схемы и концептуальной модели расчета амплификаторов ДНК // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 2. С. 58–65.
 105. *Чернышев А.В., Друца В.Л.* Проблемы создания оборудования для медицинской ПЦР-диагностики // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. Т. 12. С. 18.
 106. *Чернышев А.В.* Основы теории расчета электро-

- пневмомеханического оборудования для анализа ДНК // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 1. С. 53–65.
107. Чернышев А.В., Крутиков А.А., Демиков К.Е. и др. Разработка математической модели пневматической системы термостабилизации // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 1. С. 94–106.
108. Verhulst P.F. // Nouveaux memoires de l'Academie royale des sciences et belles-letters de Bruxelles. 1845. V. 18. P. 1.
109. Чернышев А.В. Создание теории рабочих процессов, методов расчета и разработка оборудования для ПЦР-диагностики. Автореф. дис. ... доктора техн. наук, М.: МГТУ (МВТУ им. Баумана), 2006. 38 с.
110. Арнольд В.И. Дифференциальные уравнения. М.: Наука, 1984.
111. Рубин А.Б. Лекции по биофизике: Учеб. пособие, М.: Изд-во МГУ, 1998. (С. 36–38).
112. Aach J., Church G.M. Mathematical models of diffusion-constrained polymerase chain reactions: basis of high-throughput nucleic acid assays and simple self-organizing systems // J. of Theoretical Biology. 2004. V. 228. P. 31–46.
113. Франк-Каменецкий Д.А. Диффузия и теплопередача в химической кинетике. М.: Наука, 1967. 492 с.
114. Xuan X., Sinton D., Li D. Thermal end effects on electroosmotic flow in capillary // Int. J. of Heat and Mass transfer. 2004. V. 47. P. 3145–3157.
115. Sharp K.V., Adrian R.J., Santiago J.G., Molho J.I. Liquid flows in microchannels (Chapter 6) // The MEMS handbook / Eds M. Gad-el-Hak. Boca Raton, London, N.Y., Washington, CRC Press LLC, 2002.
116. Буляница А.Л. Математическое моделирование в микрофлюидике: основные положения // Научное приборостроение. 2005. Т. 15, № 2. С. 51–66.
117. Cha R.S., Thilly W.G. Specificity, efficiency and fidelity of PCR // PCR primers. A laboratory manual / Eds Diffenbach C.W., Dveksler G.S. Cold Spring Harbor, N.Y.: CSHL Press, 1995. P. 37–51.
118. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч. 1. Оптимизация условий оценивания при наличии аддитивной случайной помехи // Научное приборостроение. 2009. Т. 19, № 3. С. 3–11.
119. Буляница А.Л. Методы оценивания параметров кривой логистического роста. Ч. 2. Оценивание и компенсация систематической погрешности измерения. Сопоставление двух различных форм математической модели логистического роста // Научное приборостроение. 2009. Т. 19, № 3. С. 12–20.

Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург (Антонова О.С., Рудницкая Г.Е.,
Тупик А.Н., Буляница А.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е.)

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
г. Санкт-Петербург (Антонова О.С.)

Контакты: Антонова Ольга Сергеевна,
salomeya@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 11.10.2011.

POLYMERASE CHAIN REACTION: DEVICES AND METHODS. A SYSTEMATIC REVIEW OF LITERATURE

O. S. Antonova^{1,2}, G. E. Rudnitskaya¹, A. N. Tupik¹, A. L. Bulyanitsa¹,
A. A. Evstrapov¹, V. E. Kurochkin¹

¹Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg

²Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint-Petersburg

PCR-based analysis techniques and method are discussed. The focus of this paper is on the comparison of different methods of PCR implementation (e.g. classical PCR, qPCR and digital PCR) and their analytical characteristics (sensitivity, specificity, reproducibility and others). One of the most crucial tendencies of development PCR-based devices is microchip technologies. They can provide a high automation level of analytical manipulations and a high level of detection sensitivity. The mathematical models of PCR basic processes are presented in the paper. Also, we discuss some current methods of medical diagnostics.

Keywords: polymerase chain reaction, digital PCR, emulsion PCR, solid-phase PCR, molecular colonies method, microchip technologies