
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ**

УДК 67.02+543.07

© Н. А. Есикова, Н. Н. Гермаш, А. А. Евстапов, 2020

**ОПЕРАТИВНОЕ ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОЧИПОВ
ДЛЯ ПЦР-АНАЛИЗА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ
В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Методами термоформования и герметизации специальными пленками для ПЦР изготовлены микрочипы из поликарбоната и полипропилена. Работоспособность микрочипов продемонстрирована путем проведения ПЦР-РВ на тест-объекте. Полученные микрочипы из поликарбоната и полипропилена выдерживают хранение при отрицательных температурах (-40°C).

Кл. сл.: микрочип, термопласт, поликарбонат, полипропилен, полимерная цепная реакция в реальном времени, оптическое детектирование

ВВЕДЕНИЕ

Анализы, основанные на проведении полимерной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), находят применение в медицине, криминалистике, контроле качества продуктов питания и др. Переход на микрочиповый формат позволяет автоматизировать анализ и уменьшить влияние человеческого фактора на его результаты. Целью данной работы являлось исследование возможности оперативного изготовления микрочипов для проведения ПЦР-РВ анализа из твердых пластиков предпочтительно с использованием материалов отечественного производства.

Для изготовления микрочипа нужно сформировать в материале открытые структуры и герметизировать их. Формирование реакционных камер микронных размеров в твердом пластике может быть проведено методами термоформования и лазерной микрообработки. Основным недостатком первого метода является потребность в мастер-форме и зависимость разрешения получаемых отливок от ее качества. Лазерная микрообработка — прямой метод получения структуры в пластике и металлах. Разрешение зависит от характеристик используемого лазера, материала, режима обработки и составляет от ~ 1 мкм и более. Однако для получения множества одинаковых реплик лазерными методами необходимы регулярный контроль и настройка оптической системы, корректировка режимов. Отметим, что данный метод может успешно применяться при получении металлической мастер-формы для последующего термоформования различных пластиков.

Для герметизации термоформованных микрочипов часто применяется термическая сварка [1,

2], поскольку для нее не требуется сложного оборудования и получаемые структуры могут быть полностью из одного материала. Однако в случае плоских камер большой площади данный метод либо приводит к существенной деформации структур, либо прочность соединения недостаточна и существует возможность разъединения деталей (например, при ударном воздействии).

В последние годы появились работы, в которых герметизация чипов/картриджей производилась благодаря использованию полимерных пленок с адгезионным слоем. Например, в [3] рассмотрена применимость пленок с активируемым давлением адгезивом ARcare 92712, ARcare 90445, ARcare 90106 из полиэстера с акрилатным адгезивом различной толщины и ARseal 90880 из полипропилена с силиконовым адгезивом. Авторы [4] исследовали герметизацию чипов из разных материалов, предназначенных для генерации капель и проведения ПЦР, пленкой ThermalSealRTS™ (Excel-Scientific). Особенностью применения данного метода для ПЦР-микрочипов является постоянный контакт реакционной смеси с адгезионным слоем пленки при многократном нагреве до $90\text{--}95^{\circ}\text{C}$.

Так же представляется интересным рассмотрение метода ультразвуковой сварки [5]. Однако для его применения требуется дорогостоящее оборудование, позволяющее производить тонкую настройку под различные материалы и топологии, и соответствующая оснастка.

Поэтому для достижения цели поставлены следующие задачи: 1) термоформование топологии камер в поликарбонате и полипропилене мастер-формы, изготовленной методом лазерного микроформования; 2) герметизация полученных

микрочипов коммерческими пленками для проведения ПЦР, представляющими из себя полимерную пленку с тонким адгезивным слоем (соединение должно обеспечивать силу связывания, выдерживающую возникающее в камерах при термоциклировании давление, и не ингибировать реакцию); 3) исследование светопропускания и фоновой флуоресценции микрочипов, поскольку предполагается детектирование ПЦР-РВ оптическими методами; 4) изучение свойств поверхности камер микрочипов (методом лежащей капли), поскольку они влияют на образование пузырьков воздуха при термоциклировании; 5) апробация микрочипов при проведении в них ПЦР-РВ.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОЧИПОВ

Для создания микрочипов выбрано два вида пластика: полипропилен (ПП) и поликарбонат (ПК). Они обладают высокой термостойкостью, хорошим светопропусканием в видимой части спектра. ПП более устойчив к кислотам и раство-

рителям, чем ПК, и обладает меньшей сорбцией воды (0.01–0.1 % против 0.23 % для ПК [6]). Исследованы марки отечественных производителей: ПК Novattro (SafPlast, Россия) и ПП PP 4445S (ТУ 20.16.51-136-05766801-2015 (ПАО Нижнекамскнефтехим, Россия)). Топология микрочипа (рис. 1), представляющая из себя 3 камеры с подводящими каналами, была получена методом термопрессования в гидравлическом прессе ММ-100 (MTDI, Корея) на одной мастер-форме из нержавеющей стали, изготовленной методом лазерной микрообработки.

Формование камер микрочипов проводилось следующим образом: а) пластины ПК толщиной 1 мм и размером 25 × 38 мм выдерживались при температуре 190 °С под давлением 30 кг/см² в течение 1000 с; б) гранулы ПП весом 1.5 или 2 г выдерживались сначала 5 мин при температуре 190 °С, после чего на 400 с подавалось давление 60 кг/см².

После формования производился отжиг деталей в течение 2 ч при 200 °С. Результаты измерений геометрических параметров представлены в табл. 1.

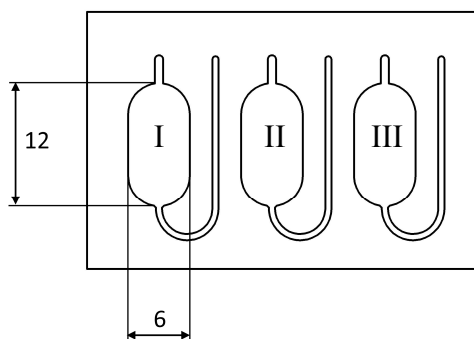


Рис. 1. Изображение топологии микрочипа с нумерацией реакционных камер. Размеры на рис. даны в мм

Табл. 1. Оценка размеров полученных микрочипов

Материал	Число измерений (микрочипов)	Толщина микрочипов, мкм	Глубина камеры I, мкм	Глубина камеры II, мкм	Глубина камеры III, мкм
ПП (1.5 г)	41	688 ±68	305 ±7	291 ±7	302 ±7
ПП (1.5 г) после отжига	6	734 ±42	302 ±8	290 ±9	297 ±5
ПП (2 г)	8	958 ±63	310 ±8	299 ±8	306 ±5
ПП (2 г) после отжига	8	968 ±65	310 ±8	296 ±9	306 ±5
ПК	36	1000 ±20	308 ±25	291 ±20	312 ±26
ПК после отжига	10	1014 ±13	308 ±4	287 ±16	306 ±7

Глубина камер оценивалась как разница толщин микрочипа и дна. После отжига происходило их незначительное увеличение. Центральная камера микрочипов из обоих пластиков менее глубокая, чем боковые, что объясняется разной удаленностью камер от краев чипа (т.е. разными давлением и температурным распределением). В связи с большой площадью камер глубина вносит существенный вклад в вариацию объема. Поэтому детали из ПП с разницей в глубине камер на одном микрочипе до 14 мкм предпочтительней для дальнейшего использования, чем детали из ПК с разницей глубин до 21 мкм (табл. 1).

Детали, получаемые из 1.5 г ПП, при нагреве деформировались, поэтому с целью придания конструкции большей жесткости вес исходного материала для формования был увеличен до 2 г.

Для герметизации микрочипов протестированы варианты коммерческих пленок для ПЦР: "ThermalSealRT™" (Excel Scientific), "Adhesive PCR Seal" (Sarstedt), "PCR firm Adhesive" (Eppendorf) и "Пленки для ПЦР плашек полимерные" P-500 (ООО "ПКФ Современные технологии"). Изначально качество герметизации оценивалось визуально по целостности структуры (например, адгезив пленки "ThermalSealRT™" заполняет структуру при надавливании) и по наличию расклеенных зон вокруг камер после нагрева до 90 °С. По результатам оценок были выбраны 3 вида микрочипов: из ПК, герметизированный пленками P-500 и "PCR firm Adhesive" фирмы Eppendorf (далее ПК + P-500 и ПК + Epp) и из ПП с пленкой P-500 (далее ПП + P-500).

Также герметичность микрочипов проверялась при заполнении дегазированной дистиллированной водой и термоциклировании (40–50 циклов, 60–95 °С) на приборе Swift Max Pro (Esco Micro Pte Ltd, Таиланд). После этого контролировалось изменение массы микрочипа. Оно составило (1.6 ± 0.4) % от веса воды для микрочипов (ПК + P-500), (3.0 ± 0.4) % для (ПП + P-500) и (2.4 ± 0.4) % для (ПК + Epp) (по 6–9 микрочипам). В процессе термоциклирования произошло растяжение и отслоение пленки (не более 0.5 мм), вызвавшее увеличение объема камер, что может быть связано как с колебанием давления жидкости при нагреве и охлаждении, так и с разностью коэффициентов термического расширения материалов микрочипа.

После герметизации микрочипы были обработаны 70 % этиловым спиртом для стерилизации, промыты дистиллированной водой и высушены при 40 °С.

Поскольку одной из проблем при оптическом детектировании является образование в камерах пузырьков воздуха при термоциклировании, на которое оказывают влияние свойства поверхности

материала, то был измерен угол смачивания ПП и ПК. Для ПП он составил 82 ± 2° после термоформования, 84 ± 2° — после отжига и 87 ± 2° — после промывки; для ПК получены значения 76 ± 1°, 76 ± 3° и 82 ± 1° соответственно ($n = 6$).

Исследована возможность хранения чипов при отрицательных температурах. Для этого микрочипы выдерживались в течение 2 ч при –40 °С, после чего их герметичность проверялась при термоциклировании. Все три варианта чипов (по 3 штуки каждого вида) выдержали испытание.

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОЧИПОВ

Так как микрочипы предназначены для амплификации нуклеиновых кислот с оптическим детектированием, то были изучены светопропускание и флуоресценция полученной конструкции. Микрочипы заполнялись дистиллированной водой, а спектры регистрировались на спектрофотометре (Hitachi U-3410) и спектрофлуориметре (Hitachi F-4010).

На рис. 2 приведены усредненные по 6 образцам зависимости светопропускания для каждого вида микрочипов. Для микрочипов из ПК зависимость близка к линейной в спектральном диапазоне от 430 до 850 нм. Причем светопропускание на 490 нм составляет 70 %, в то время как для ПП это значение достигается лишь на 585 нм. На длинах волн 610 нм и выше светопропускание ПП практически совпадает с ПК. Использование разных пленок не оказывает влияния на светопропускание микрочипов.

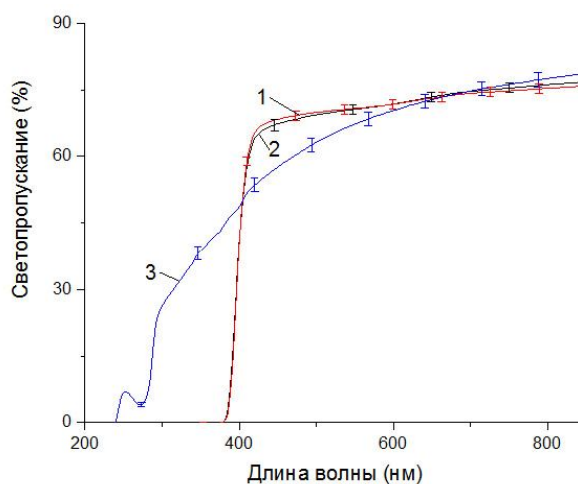


Рис. 2. Усредненные спектральные зависимости светопропускания микрочипов и со средним отклонением ($n = 6$).

1 — ПК + P-500; 2 — ПК + Epp; 3 — ПП + P-500

Табл. 2. Интенсивность фоновой флуоресценции микрочипов (в отн. ед.)

Тип микрочипа	Возбуждение 490 нм, флуоресценция 520 нм (FAM)	Возбуждение 520 нм, флуоресценция 550 нм (R6G)	Возбуждение 580 нм, флуоресценция 610 нм (ROX)	Возбуждение 645 нм, флуоресценция 670 нм (Cy5)
ПК + Ерр	12.3 ±2.4	14.0 ±2.9	18.5 ±3.8	19.0 ±4.0
ПК + P-500	8.3 ±0.5	9.6 ±0.6	13.3 ±0.8	14.2 ±0.9
ПП + P-500	10.5 ±2.2	12.3 ±1.3	17.2 ±1.7	18.5 ±1.8

Как известно, полимеры обладают собственной флуоресценцией, что может влиять на результаты измерения. В табл. 2 приведены значения фоновой флуоресценции (в отн. ед.) чипов, усредненные по 6 образцам, для длин волн возбуждения/эмиссии красителей FAM, R6G, ROX, Cy5. Ширина щели сканирования 5 нм, скорость 120 нм/мин.

Наблюдается влияние используемой для герметизации пленки на сигнал: у микрочипов (ПК + Ерр) флуоресценция выше, чем у (ПК + P-500). Флуоресценция ПП микрочипов выше, чем у ПК с той же пленкой. Поскольку исследование проведено в относительных единицах, то для сравнения измерена интенсивность флуоресценции раствора FITC концентрацией 10^{-5} М в камерах микрочипа (ПП + P-500). Она составила 2686.5 отн. ед., что на 2 порядка выше фоновой флуоресценции микрочипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

Проверка работоспособности изготовленных микрочипов осуществлена при проведении ПЦР-РВ ДНК, выделенных вручную из *E.coli*. Для этого использовались наборы реагентов "М-сорб-ООМ" для выделения ДНК и РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды и "ПЦР-Микс", праймеры и метки. Все реагенты предоставлены ООО "Синтол" (Москва).

Измерения проводились на специально созданном макете, обеспечивающем режим термоциклирования для проведения ПЦР-РВ (возбуждение на длине волны 490 нм и регистрация на 520 нм). Камеры микрочипов заполнялись реакционной смесью с добавлением выделенных нуклеиновых кислот. Микрочип размещался на нагревательном элементе пленкой вниз. Для сравнения проведена амплификация той же смеси с пробой в пробирках на АНК-48 (ИАП РАН, СПб.).

Полученные зависимости нормировались от 0 до 1. Линейные участки плато до 24-го цикла и роста сигнала от 27-го до 30-го циклов аппрок-

симировались прямой. Значение порогового цикла составило: 26.1 ± 0.4 для микрочипов (ПК + Ерр), 26.4 ± 0.6 — для (ПК + P-500), 27.0 ± 0.4 — для (ПП + P-500) и 26.6 ± 0.1 — для пробирок в АНК-48. После термоциклирования пленка микрочипа (ПК + Ерр) была существенно деформирована во всех камерах, что не оказало влияния на результат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Апробирован метод оперативного изготовления микрочипов для проведения ПЦР-РВ. Камеры с подводящими каналами получены методом термоформования поликарбоната Novattro (SafPlast, Россия) и из полипропилена PP 4445S (ТУ 20.16.51-136-05766801-2015, ПАО Нижнекамскнефтехим, Россия). Установлено что в связи с разной удаленностью камер от краев мастер-формы, их глубина на одном и том же чипе варьируется. Для ПП разброс глубин как на одном микрочипе, так и между микрочипами оказался меньше, чем из ПК.

Для герметизации микрочипов исследованы коммерческие пленки для ПЦР и выбраны две, обеспечивающие сохранность топологии и герметичность при термическом режиме: "PCR firm Adhesive" (Eppendorf) и "Пленки для ПЦР плашек полимерные" P-500 (ООО "ПКФ Современные технологии"). Получено 3 вида микрочипов: (ПК + Ерр), (ПК + P-500) и (ПП + P-500) и проверено влияние отрицательных температур на герметичность соединения пластика с пленкой. Все 3 вида микрочипов выдержали термоциклирование после 2 ч нахождения при -40 °С.

Исследовано влияние отжига пластин после формования и промывки микрочипов 70 % этиловым спиртом на угол смачиваемости пластиков. Существенного влияния не обнаружено, изменение угла не превышает 6° .

Оптические свойства (светопропускание и интенсивность фоновой флуоресценции) полученных

микрочипов позволяют работать с красителями, нашедшими широкое распространение при оптическом детектировании ПЦР (FAM, ROX, R6G, Cy5). Пленка "PCR firm Adhesive" (Eppendorf) вносит небольшой вклад в флуоресценцию микрочипа, однако величина сигнала для микрочипов (ПК + Epp) не превышает аналогичную для (ПП + P-500). Минимальные значения получены для микрочипов (ПК + P-500).

Результаты проведения ПЦР-РВ на примере нуклеиновых кислот, выделенных из *E.coli* вручную, продемонстрировали работоспособность полученных микрочипов. Значения пороговых циклов для всех трех видов микрочипов близки друг к другу и к значениям, полученным на АНК-48.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin Z., Zou H., Sun L. Polycarbonate nanofluidic chip fabrication technique by hot embossing and thermal bonding // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2018. Vol. 18, no. 4. P. 2530–2535. DOI: 10.1166/jnn.2018.14341
2. Tsao C.-W., De Voe D.L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics // *Microfluid Nanofluid.* 2009. Vol. 6. P. 1–16. DOI: 10.1007/s10404-008-0361-x
3. Kratz S.R.A., Eilenberger C., Schuller P., Bachmann B., Spitz S., Ertl P., Rothbauer M. Characterization of four functional biocompatible pressure-sensitive adhesives for rapid prototyping of cell-based lab-on-a-chip and organ-on-a-chip systems // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, no. 1. 9287. DOI: 10.1038/s41598-019-45633-x
4. Serra M., Pereiro I., Yamada A., Viovy J.-L., Descroix S., Ferraro D. A simple and low-cost chip bonding solution for high pressure, high temperature and biological applications // *Lab Chip.* 2017. Vol. 17. P. 629–634. DOI: 10.1039/C6LC01319H
5. Sackmann J., Burlage K., Gerhardy C., Memering B., Liao S., Schomburg W.K. Review on ultrasonic fabrication of polymer micro devices // *Ultrasonics.* 2015. Vol. 56. P. 189–200. DOI: 10.1016/j.ultras.2014.08.007
6. Gencturk E., Mutlu S., Ulgen K.O. Advances in microfluidic devices made from thermoplastics used in cell biology and analyses // *Biomicrofluidics.* 2017. Vol. 11, no. 5. 051502. DOI: 10.1063/1.4998604

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Контакты: Есикова Надежда Александровна,
elpis-san@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 26.10.2020

RAPID FABRICATION OF MICROCHIPS FOR PCR ANALYSIS FROM POLYMER MATERIALS IN THE LABORATORY CONDITIONS

N. A. Esikova, N. N. Germash, A. A. Evstrapov

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

Polycarbonate and polypropylene microchips were made by thermoforming and sealed by special PCR films. The aim of this work was to study the possibility of promptly manufacturing microchips for performing RT-PCR analysis. Microchips are made of hard plastics, preferably using domestically produced materials. Therefore, to achieve the goal, the following tasks were set: 1) thermoforming the topology of the chambers in polycarbonate and polypropylene master mold made by laser microforming; 2) sealing the obtained microchips with commercial films for PCR, which are polymer films with a thin adhesive layer (the connection should provide a binding force, holding the pressure arising in the chambers during thermal cycling, and not inhibiting the reaction); 3) study of light transmission and background fluorescence of microchips, since it is supposed to detect PCR-RT by optical methods; 4) study of the properties of the surface of the chambers of microchips (by the recumbent drop method), since they affect the formation of air bubbles during thermal cycling; 5) approbation of microchips when performing PCR-RT in them.

The efficiency of microchips was demonstrated by conducting PCR-RT on a test object. The obtaining microchips made of polycarbonate and polypropylene could withstand storage at negative temperatures (–40 °C).

Keywords: microchip, thermoplastic, polycarbonate, polypropylene, polymerase chain reaction in real time, optical detection

REFERENCES

1. Yin Z., Zou H., Sun L. Polycarbonate nanofluidic chip fabrication technique by hot embossing and thermal bonding. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2018, vol. 18, no. 4, pp. 2530–2535. DOI: 10.1166/jnn.2018.14341
2. Tsao C.-W., De Voe D.L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluid Nanofluid.*, 2009, vol. 6, pp. 1–16. DOI: 10.1007/s10404-008-0361-x
3. Kratz S.R.A., Eilenberger C., Schuller P., Bachmann B., Spitz S., Ertl P., Rothbauer M. Characterization of four functional biocompatible pressure-sensitive adhesives for rapid prototyping of cell-based lab-on-a-chip and organ-on-a-chip systems. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1. 9287. DOI: 10.1038/s41598-019-45633-x
4. Serra M., Pereiro I., Yamada A., Viovy J.-L., Descroix S., Ferraro D. A simple and low-cost chip bonding solution for high pressure, high temperature and biological applications. *Lab Chip*, 2017, vol. 17. pp. 629–634. DOI: 10.1039/C6LC01319H
5. Sackmann J., Burlage K., Gerhardy C., Memering B., Liao S., Schomburg W.K. Review on ultrasonic fabrication of polymer micro devices. *Ultrasonics*, 2015, vol. 56. pp. 189–200. DOI: 10.1016/j.ultras.2014.08.007
6. Gencturk E., Mutlu S., Ulgen K.O. Advances in microfluidic devices made from thermoplastics used in cell biology and analyses. *Biomicrofluidics*, 2017. vol. 11, no. 5. 051502. DOI: 10.1063/1.4998604

Contacts: *Esikova Nadezhda Aleksandrovna*,
elpis-san@yandex.ru

Article received by the editorial office on 26.10.2020