

14.3

Микрочиповые устройства для амплификации нуклеиновых кислот

© Я.С. Посмитная,^{1,2} А.Л. Буляница,^{1,3} А.Н. Тупик,¹ Г.Е. Рудницкая,¹ Н.А. Есикова,¹ Т.А. Лукашенко,¹
А.И. Цымбалов,¹ А.А. Евстрапов^{1,2}

¹ Институт аналитического приборостроения РАН,
190103 Санкт-Петербург, Россия

² Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: antbulyan@yandex.ru

(Поступило в Редакцию 24 декабря 2017 г.)

Рассмотрены основные требования к микрочиповым устройствам для амплификации нуклеиновых кислот на основе полимеразной цепной реакции, а также изотермической амплификации, и обсуждены результаты апробации устройств из разных материалов посредством обнаружения малых количеств молекул нуклеиновых кислот в пробе методом молекулярных колоний. Приведены количественные оценки равномерности распределения молекулярных колоний по реакционной камере устройства. Обсуждены перспективы использования микрочиповых устройств для методов молекулярной диагностики.

DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46428.2610

Для молекулярной диагностики и генетических исследований широко используются методы амплификации нуклеиновых кислот (полимеразная цепная реакция (ПЦР), геликазо-зависимая, петлевая изотермическая амплификация и др.), ориентированные на решение задач воспроизводимого обнаружения целевых последовательностей ДНК, что актуально для ранней диагностики инфекционных, генетических, онкологических заболеваний [1–3]. Применение микрочиповых технологий позволяет создавать миниатюрные устройства для решения биологических и медицинских задач [4–6], в том числе при реализации методов, трудновыполнимых в макромасштабе, например методы предельных разбавлений [7], молекулярных колоний [8], „капельной“ микрофлюидики [9]. Для создания таких устройств необходимы комплексные исследования, включающие выбор материала для микрочипа, определение способов физико-химической обработки, адаптация существующих технологий изготовления и герметизации микроструктур для получения воспроизводимых характеристик, а также апробация изготовленных устройств.

В ИАП РАН разработаны и изготовлены микрочиповые устройства из стеклянных и полимерных материалов для проведения ПЦР в жидкости и в среде акриламидного геля (метод молекулярных колоний), реализации метода „капельной“ микрофлюидики для изотермической амплификации. Устройства изготавливались с применением технологий: фотолитографии и кислотного травления (стеклянные материалы) [10], лазерной микрообработки (полиметилметакрилат марки ТОСП, Россия) [11], „мягкой“ литографии (полидиметилсилоксан Sylgard®-184, США) [12].

Оборудование, используемое для апробации микрочиповых устройств, было разработано в ИАП РАН. В экспериментах применялись наборы специфичных прайме-

ров и флуоресцентных зондов („ДНК-Синтез“, Россия), реакционная смесь для ПЦР („Синтол“, Россия) и проба, содержащая кДНК онкомаркера цитокератина-19, полученная методом обратной транскрипции [13]. При проведении ПЦР в полимерных микрочипах построена градуировочная зависимость для оценки концентрации проб, по своим характеристикам сопоставимая с результатами, полученными на анализаторе нуклеиновых кислот (АНК-32) [14].

Метод молекулярных колоний (ММК) заключается в проведении ПЦР в гелевой среде, что затрудняет диффузию синтезируемых фрагментов ДНК, которые, скапливаясь вокруг исходной мишени, образуют так называемые „колонии“ [15]. Преимущества ММК — возможность работы с предельно малыми количествами нуклеиновых кислот и регистрация результатов простым счетом колоний. Для апробации микрочиповых устройств для ММК исходную пробу кДНК цитокератина-19, концентрация которой была определена на АНК-32 методом ПЦР в режиме реального времени (150 ± 16 copies/ μ l, число повторов эксперимента $n = 4$), разбавляли буферным раствором в 5 и 15 раз и добавляли в реакционную смесь из расчета по 1 μ l пробы на одну камеру микрочипа. Объем одной реакционной камеры стеклянного микрочипового устройства для ММК (см. рисунок, а) составлял 31 μ l, диаметр 14 mm. Перед экспериментом гель в камере восстанавливали путем пропитывания вышеупомянутой смесью, вводимой в каждую камеру дозатором через входные отверстия. В качестве метки применяли пару флуоресцентных зондов, при амплификации гибридизирующихся в непосредственной близости друг от друга, что делает возможным флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) между красителем-донором и красителем-акцептором. Амплификацию проводили на

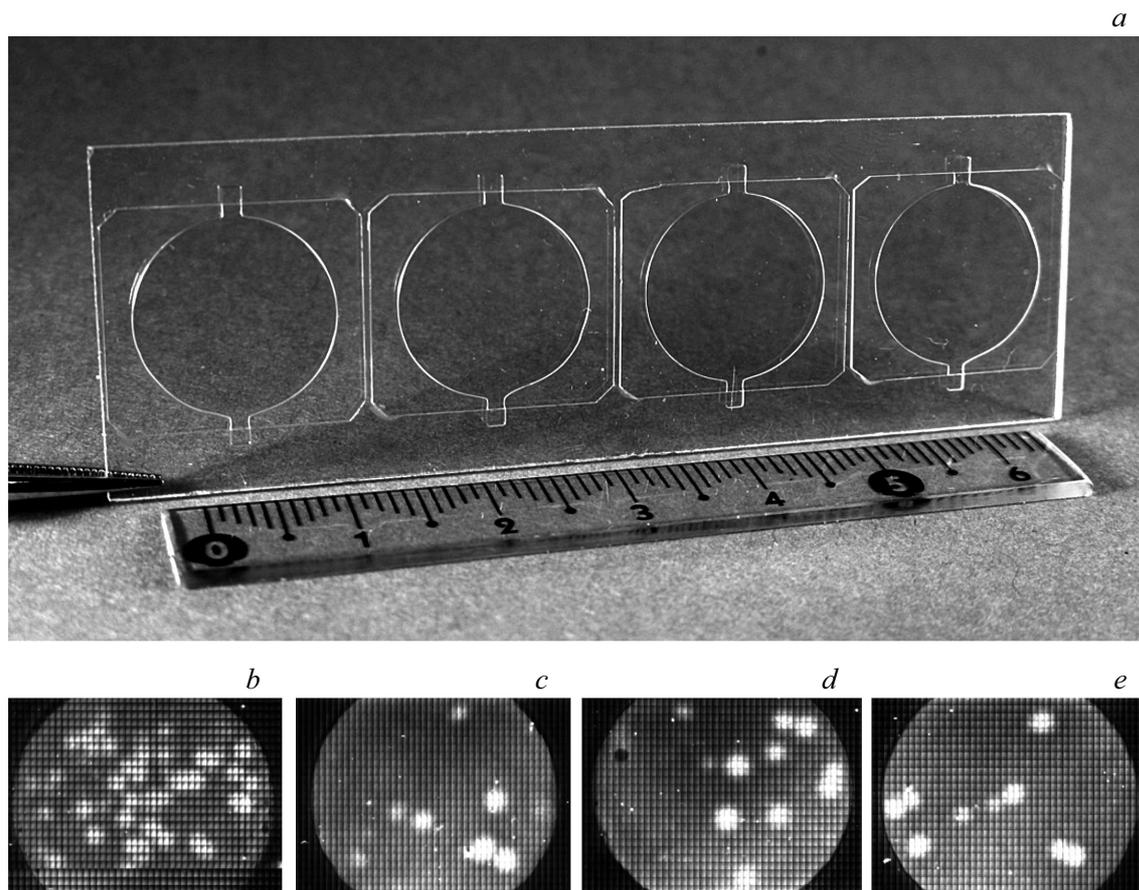


Рис. 1. Стеклоное микрочиповое устройство с четырьмя реакционными камерами для ММК (*a*). Изображения молекулярных колоний кДНК цитокератина-19, полученные в стеклоном микрочиповом устройстве: при разбавлении исходной пробы в 5 раз (*b*); при разбавлении исходной пробы в 15 раз (*c-d*).

макете термоциклера с плоской нагревательной поверхностью по следующей программе — прогрев при 95°C в течение 300 с, затем 45 циклов рабочего режима: 95°C в течение 6 с, 60°C в течение 60 с. Регистрация образовавшихся колоний осуществлялась по флуоресценции красителя-акцептора на макете прибора ДМК-1 (ИАП РАН, Россия). В соответствии с разбавлением было зарегистрировано 31 ± 7 ($n = 3$) и 10 ± 3 ($n = 9$) молекулярных колоний.

Отбор 1/5 и 1/15 частей пробы математически моделируется вероятностной схемой Бернулли. Интегральные характеристики близки к нормальному закону с математическими ожиданиями и стандартными отклонениями (σ) 30 и 4.90 для первого варианта отбора и 10 и 3.06 для второго. Максимальное отклонение результатов эксперимента от математического ожидания порядка 1.6σ , что соответствует доверительной вероятности не менее 5%.

На рисунке, *b-e* представлены изображения реакционных камер микрочипа с различным числом (33, 7, 10, 9) идентифицированных молекулярных колоний. При этом характер их размещения, с точки зрения равномерности, также различен. Подход к формированию оценок равномерности размещения колоний по реакционной

камере описан в [16]. Предложенная мера равномерности относится к критериям согласия: сопоставляются распределения порядковых статистик (координат центра колоний) с теоретической моделью, базирующейся на гипотезе равномерности. Одной из мер равномерности (параметр W) будет отношение средней вероятности расположения колонии, соответствующей размещению колоний в реакционной камере, к вероятности наиболее вероятного расположения. Применение данного подхода к экспериментальным данным, представленным на рисунке, *b-e*, позволило рассчитать объективную количественную оценку достигнутой степени равномерности (см. таблицу). При этом в случае с большим количеством колоний (*b*) ограничились анализом расположения 10 колоний по краям камеры.

Отметим, что в случаях, когда число наблюдаемых колоний невелико, расчетная количественная оценка подтверждается и субъективным восприятием полученных изображений. Например, на рисунке, *d* расположение 10 колоний равномерно по координате Y (вертикальное направление) и расстоянию от центра камеры, и существенно неравномерно по координате X (горизонтальное направление). Количественные оценки равномерности распределения колоний, проведенные на стадии

Значения параметра W , соответствующие различным расположениям молекулярных колоний в реакционной камере (см. рисунок, $b-e$)

Расположение	Фрагмент b	Фрагмент c	Фрагмент d
По координате X	1/1.896	1/1.212	1/4.128
По координате Y	1/20.70	1/1.634	1/1.570
По расстоянию от центра r	1/75.53	1/2.260	1/1.709

экспериментальных исследований, позволяют выявить особенности режимов заполнения реакционных камер микрочиповых устройств для ММК.

ММК обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет применять традиционное оборудование молекулярно-диагностических лабораторий (флуоресцентные сканеры, термоциклеры), однако метод ориентирован на анализ малого числа проб и требует высокой квалификации персонала.

В методе „капельной“ микрофлюидики амплификация происходит в капле объемом несколько десятков μl , находящейся в инертной среде минерального масла. Поскольку исходная проба „разбивается“ на тысячи капель макроэмульсии, то для этого необходимо применение микрофлюидных устройств с генератором капель. Ключевыми задачами при реализации методов „капельной“ микрофлюидики являются: обеспечение стабильных свойств поверхности чипов, воспроизводимых размеров капель, достижение термостабильности эмульсий при температурном воздействии в соответствии с выбранной методикой (ПЦР или варианты изотермической амплификации).

Преимуществом аналитических систем на микрочиповых устройствах перед традиционными методами амплификации являются: меньший расход реактивов, возможность сочетания различных методов анализа, уменьшение длительности исследования (анализа) пробы, перспективы полной автоматизации и контроля выполнения основных операций на всех стадиях анализа. Становится возможным создание миниатюрных систем экспресс-анализа химических и биологических проб, которые подходят для использования в условиях ограниченных ресурсов, в том числе вне исследовательских лабораторий.

Список литературы

- [1] Устинова В.В., Смирнова Т.Г., Варламов Д.А., Андриевская И.Ю., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94. Вып. 9. С. 80–87. DOI: 10.21292/2075-1230-2016-94-9-80-87
- [2] Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вербенко В.Н. // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62. Вып. 6. С. 359–362. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-6-359-362
- [3] Абуева А.И., Ткаченко Г.А., Бондарева О.С. // Молекулярная медицина. 2017. Т. 15. Вып. 5. С. 24–30.
- [4] Ahrberg C.D., Manz A., Chung B.G. // Lab. Chip. 2016. Vol. 16. P. 3866–3884. DOI: 10.1039/c6lc00984k
- [5] Ahmad F., Hashsham S.A. // Anal. Chim. Acta. 2012. Vol. 733. P. 1–15. DOI: 10.1016/j.aca.2012.04.031
- [6] Su W., Gao X., Jiang L., Qin J. // J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1377. P. 13–26. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.041
- [7] Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A. // Biotechniques. 1992. Vol. 13. N 3. P. 444–449. PMID:1389177
- [8] Пат. 2048522. РФ. Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления. А.Б. Четверин, Е.В. Четверина. 1995. Бюл. № 32.
- [9] Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J., Bright L.J., Lucero M.Y., Hiddessen A.L., Legler T.C., Kitano T.K., Hodel M.R., Petersen J.F., Wyatt P.W., Steenblock E.R., Shah P.H., Bousse L.J., Troup C.B., Mellen J.C., Wittmann D.K., Erndt N.G., Cauley T.H., Koehler R.T., So A.P., Dube S., Rose K.A., Montesclaros L., Wang S.L., Stumbo D.P., Hodges S.P., Romine S., Milanovich F.P., White H.E., Regan J.F., Karlin-Neumann G.A., Hindson C.M., Saxonov S., Colston B.W. // Anal. Chem. 2011. Vol. 83. P. 8604–8610. DOI: 10.1021/ac202028g
- [10] Евстапов А.А., Лукашенко Т.А., Рудницкая Г.Е., Буляница А.Л., Курочкин В.Е., Гусев В.С., Иванов О.Г., Беркутова И.Ф., Савицкая А.А. // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. Вып. 2. С. 27–43.
- [11] Евстапов А.А., Лукашенко Т.А., Горный С.Г., Юдин К.В. // Научное приборостроение. 2005. Т. 15. Вып. 2. С. 72–81.
- [12] Игнатчик М.М., Посмитная Я.С., Евстапов А.А. // Научное приборостроение. 2016. Т. 26. Вып. 1. С. 41–46.
- [13] Буляница А.Л., Евстапов А.А., Есикова Н.А., Посмитная Я.С., Цымбалов А.И., Лукашенко Т.А., Тупик А.Н., Рудницкая Г.Е. // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. Вып. 4. С. 77–85.
- [14] Автореф. канд. дис. Тупик А.Н. Разработка микрочипового устройства для проведения полимеразной цепной реакции в гелевой среде: 01.04.01; ИАП РАН. СПб, 2015. 20 с.
- [15] Четверина Е.В., Четверин А.Б. // Успехи биол. химии. 2008. Т. 48. С. 3–64. [Chetverina H.V., Chetverin A.B. // Biochemistry (Moscow). 2008. Vol. 73. N 13. P. 1361–1387. DOI:10.1134/S0006297908130014.]
- [16] Буляница А.Л., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н., Лукашенко Т.А., Цымбалов А.И., Евстапов А.А. // Научное приборостроение. 2014. Т. 24. Вып. 4. С. 3–12