Проточная ячейка для выделения ДНК

© Д.Г. Петров, И.Е. Антифеев, М.В. Зайцева, Н.Н. Гермаш, К.А. Симонова

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: dimoon88@mail.ru

Поступило в Редакцию 3 мая 2025 г.
В окончательной редакции 23 июня 2025 г.
Принято к публикации 24 июня 2025 г.

Пробоподготовка ДНК перед исследованием является рутинным процессом. Однако при работе с пробами, содержащими малое количество целевого продукта, или с пробами большого объема (объем пробы более 5 ml) возникает большое количество рисков и ошибок, обусловленных человеческим фактором. Исключить человеческий фактор удается только при создании полностью автоматического прибора. В основе перспективного прибора может лежать проточная камера или ячейка, что имеет ряд преимуществ перед системами на замкнутых объемах. Представлены результаты экспериментального исследования, где показана модификация ячейки, обеспечивающая выделение нуклеиновых кислот выше 80 %, что достаточно для достоверного результата полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Ключевые слова: ДНК, проточные системы, пробоподготовка, выделение, очистка, концентрирование.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.18.61085.7993

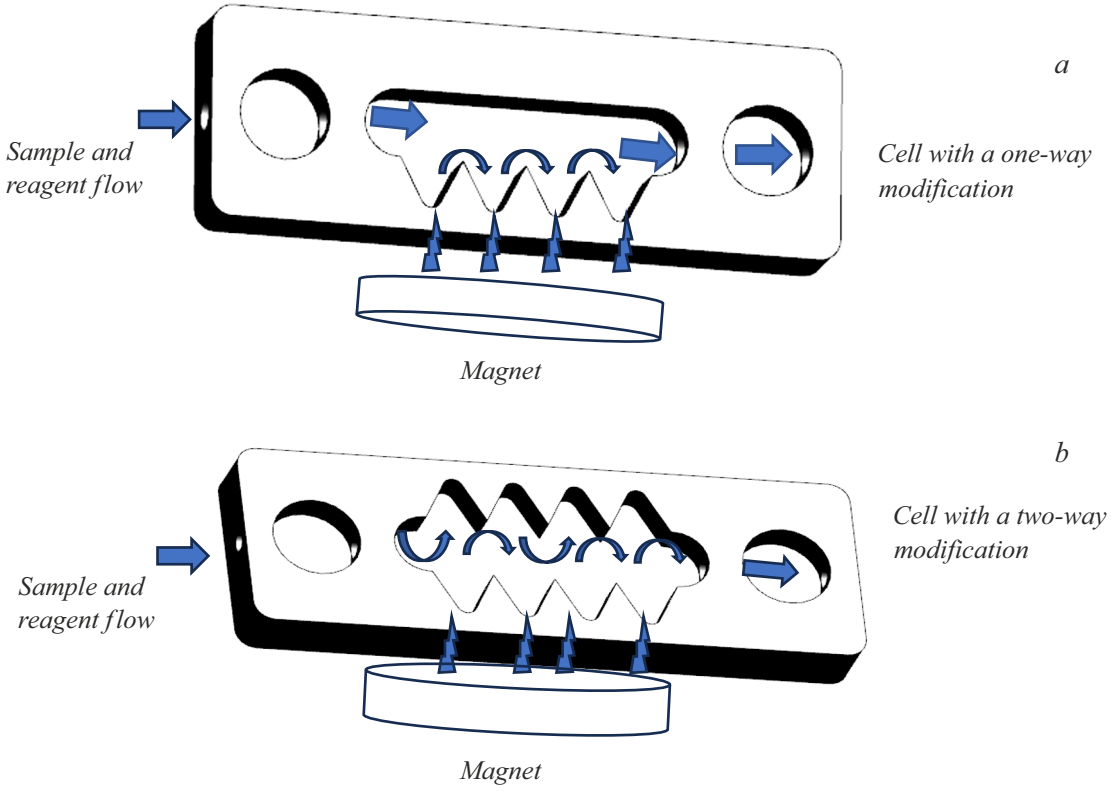
Пробы объема, превышающего 1–2 ml, чаще всего используются при анализе образцов окружающей среды, а также в тех случаях, когда количество целевого продукта находится вблизи или за пределами порога чувствительности методов последующего анализа. Предельная чувствительность метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) составляет 1–10 молекул на 1 μl. При необходимости проанализировать весь объем поступившей пробы лаборант неизбежно приходит к необходимости дублировать пробоподготовку, что существенно влияет на достоверность дальнейшего анализа, поскольку человеческий фактор является одним из самых значимых при проведении потоковых исследований образцов [1]. Как следствие, возникают потери целевого продукта, в случае с анализом нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) это часто приводит к ложноотрицательным результатам всего анализа, поскольку такие методы, как ПЦР-РВ, высокочувствительны и реагируют на изменение количества анализируемой ДНК/РНК [2].

Решением данной проблемы может являться создание проточного метода выделения, очистки и концентрирования нуклеиновых кислот, который позволяет эффективно (более 80 % от исходного количества) выделять ДНК из проб более 1 ml, при этом обеспечивая степень концентрирования, достаточную для достоверного анализа методом ПЦР-РВ — одним из наиболее чувствительных в современных условиях, т. е. более одной молекулы целевого продукта на 1 μl [3].

Ключевым элементом такой проточной системы становится модифицированная ячейка, в которой из пробы удерживаются молекулы ДНК/РНК, при пропускании через модифицированный сорбентом или фильтром участок ячейки. Таким образом обеспечивается выделение целевого продукта, при этом необходим подбор условий эффективного процесса выделения при проточном концентрировании. Для создания такой проточной ячейки было проанализировано несколько вариантов геометрии канала, через который пропускается проба. Схемы проточных ячеек представлены на рисунке. При этом в литературе проточные ячейки для концентрирования целевого продукта в основном встречаются в задачах по аналитической химии [4]. При решении задач по концентрированию ДНК, как правило, используют различные одноразовые картриджи, в которых объем входной пробы также ограничен [5].

На представленных схемах показаны ячейки для обеспечения высокой степени концентрирования ДНК/РНК. Ячейка изготовлена из полидиметилсилоксана (ПДМС), возможно изготовление ячейки из таких материалов, как полипропилен, поликарбонат и др., которые обладают стойкостью к реагентам для выделения нуклеиновых кислот (изопропиловый спирт, гуанидин тиоционат). ПДМС удобен для быстрого макетирования и тиражирования изделий методом термоформования [6,7].

Перед постановкой экспериментов по определению эффективности выделения ДНК на проточной ячейке необходимо было подобрать форму проточного канала, который позволяет удерживать магнитный сорбент при скорости пропускания пробы 1 ml/min, а для этого определить (подобрать) геометрический размер и форму неровностей одной или двух стенок ячейки, к которым прилегает магнит для удержания магнитного сорбента. При подаче пробы и последующих реагентов модификация геометрии стенки обеспечивает степень перемешивания, прямо влияющую на эффективность выделения. Был проанализирован вариант с переменой направления движения жидкости при проходе через ячейку. Экспериментальные данные не подтвердили возрастания эффективности выделения, что кажется очевидным, при интенсификации массообменных процессов. В таблице представлены результаты измерений эффективности выделения нуклеиновых кислот при скорости пропускания



Схемы проточных ячеек. *a* — ячейка с односторонней модификацией, *b* — ячейка с двусторонней модификацией.

через проточную ячейку 1 ml/min. Представлены также данные, в которых при сохранении геометрических размеров модифицированной стенки проточной ячейки было изменено расстояние между стенками, т. е. увеличен размер основного свободного канала ячейки. В стенках проточного канала ячейки создавали неровности в виде треугольников с высотой 2 и 3 mm, как показано на рисунке. Линейный размер ячейки был постоянным (длина 15 mm, ширина 8 mm). Расстояние между стенками (ширина канала) 2 mm в немодифицированной части, 5 и 7 mm в модифицированной части. Высота канала 2, 3 и 5 mm. Основной целью экспериментальной части исследования было определить разницу в эффективности выделения ДНК в ячейках с разной модификацией стенок при одинаковых скоростях пропускания пробы и таким образом установить наиболее эффективную конфигурацию ячейки.

Как видно из представленных данных, наибольшую эффективность удается достичь при использовании ячейки с двусторонней модификацией при высоте модификации 3 mm.

Этот результат свидетельствует о возможности применения такой проточной ячейки при создании приборов, обеспечивающих пробоподготовку ДНК в проточном режиме.

При работе ячейка располагается горизонтально, при этом магнит прилегает к модифицированной стенке. Для каждого значения, представленного в таблице, был взят средний результат из трех повторов. Погрешность каждого выделения не превышала 5 %, что соизмеримо с погрешностью при работе с лабораторным дозатором. Если сопоставить ячейки с односторонней и двусторонней модификациями, то лучший результат показывает ячейка с двусторонней модификацией, так как при сопоставлении соответствующих каналов обнаруживает наибольшую эффективность. При этом представленные схематические изображения потока жидкости показывают некоторую идеальную модель, с учетом использования при выделении растворов с различными свойствами распределение потоков по ячейке будет изменяться, сохраняя при этом основные признаки при изменении высоты канала. Данные получены при моделировании с помощью программы COMSOL Multiphysics.

Эффективность выделения нуклеиновых кислот (в %) при скорости пропускания жидкости через проточную ячейку 1 ml/min

Модификация ячейки	Высота канала					
	2 mm		3 mm		5 mm	
	Высота модификации					
	3 mm	2 mm	3 mm	2 mm	3 mm	2 mm
Односторонняя	53	57	78	75	56	48
Двусторонняя	64	69	81	79	67	62

В настоящих исследованиях использовалась клеточная проба *E.coli*, выращенная на питательной среде, т. е. имеющая лабораторное происхождение.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] М.В. Зайцева, И.Е. Антифеев, Д.Г. Петров, Н.А. Есикова, Е.Д. Макарова, Письма в ЖТФ, **49** (23), 32 (2023). DOI: 10.61011/PJTF.2023.23.56847.176A [M.V. Zaitseva, I.E. Antifeev, D.G. Petrov, N.A. Esikova, E.D. Makarova, Tech. Phys. Lett., **49** (12), 28 (2023). DOI: 10.61011/TPL.2023.12.57577.176A].

[2] Д.Г. Петров, Р.Х. Дженлода, И.Е. Антифеев, Е.Д. Макарова, В.Е. Курочкин, В сб. *Тр. Междунар. науч.-техн. конф. „Современные технологии научного приборостроения и информационно-измерительных систем“* (Научно-технологический центр уникального приборостроения РАН, М., 2023), с. 160–162.

[3] Е.Ю. Нестерова, Ю.Д. Дворецкая, М.В. Грязнова, М.И. Гладких, М.Ю. Сыромятников, Н.Н. Старкова, В.Н. Попов, Сорбционные и хроматографические процессы, **20** (6), 782 (2020). DOI: 10.17308/sorpchrom.2020.20/3146

[4] А.Л. Москвин, Е.А. Мухина, Журн. аналит. химии, **58** (7), 710 (2003). [A.L. Moskvin, E.A. Mukhina, J. Anal. Chem., **58** (7), 632 (2003). DOI: 10.1023/A:1024713432172].

[5] М.С. Тихвинский, А.А. Воробьев, Я.А. Кибирев, Г.С. Усенко, А.И. Козлов, С.Г. Исупов, Вестн. войск РХБ защиты, **5** (3), 236 (2021). DOI: 10.35825/2587-5728-2021-5-3-236-246

[6] Д.Г. Петров, Е.Д. Макарова, Н.Н. Гермаш, И.Е. Антифеев, Науч. приборостроение, **29** (4), 28 (2019). DOI: 10.18358/np-29-4-i2850

[7] D.G. Petrov, I.E. Antifeev, N.N. Germash, E.D. Makarova, J. Phys.: Conf. Ser., **1400** (3), 033023 (2019). DOI: 10.1088/1742-6596/1400/3/033023