

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 57.081.22, 57.081.23

Аналитические ферментативные реакции в микрофлюидных чипах

© 2016 К.А. ЛУКЪЯНЕНКО¹, И.А. ДЕНИСОВ^{1,*}, А.С. ЯКИМОВ¹, Е.Н. ЕСИМБЕКОВА^{1,2}, К.И. БЕЛОУСОВ³, А.С. БУКАТИН¹, И.В. КУХТЕВИЧ¹, В.В. СОРОКИН¹, А.А. ЕВСТРАПОВ^{3,4}, П.И. БЕЛОБРОВ^{1,2}

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Институт биофизики, Сибирское отделение Российской академии наук, Красноярск

³Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург

⁴Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: d.ivan.krsk@gmail.com

Резюме — Предложен и апробирован ряд подходов, позволяющих осуществить перенос энзиматических реакций в функциональные элементы микрофлюидных чипов на примере биферментной биолуминесцентной реакции с участием ферментов NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы и люциферазы. Измерение каталитической активности этих ферментов (под влиянием загрязняющих веществ) является основой метода ферментативного биотестирования различных жидкостей. Было установлено, что для повышения воспроизводимости измерений все компоненты реакции необходимо размещать в одной камере чипа. Использование крахмального геля в качестве носителя для иммобилизации и подложки из желатина в реакторе чипа позволяет сохранять активность ферментов в ходе герметизации чипов при комнатной температуре. Показано, что для повышения эффективности анализа компоненты реакции необходимо активно перемешивать в реакторе микрофлюидного чипа. По результатам проведенных исследований предложен прототип микрофлюидного чипа на основе ферментативной биолуминесцентной реакции, который характеризуется пределом обнаружения сульфата меди 3 мкМ, что соответствует чувствительности традиционных lux-биосенсоров на основе живых клеток. При этом время анализа сокращается до 1 мин, а сам анализ может быть выполнен лицами, не имеющими специальных лабораторных навыков.

Ключевые слова: биолуминесценция, люцифераза, микрофлюидика, микрофлюидный чип, ферментативное биотестирование.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-5-69-76

Analytical Enzymatic Reactions in Microfluidic Systems

© 2016 K.A. LUKYANENKO¹, I.A. DENISOV^{1,*}, A.S. YAKIMOV¹, E.N. ESIMBEKOVA^{1,2}, K.I. BELOUSOV³, A.S. BUKATIN¹, I.V. KUKHTEVICH¹, V.V. SOROKIN¹, A.A. EVSTRAPOV^{3,4}, and P.I. BELOBROV^{1,2}

¹The Siberian Federal University, Krasnoyarsk Russia

²The Institute for Biophysics, Russ. Acad. Sci., Siberian Branch, Krasnoyarsk Russia

³The ITMO University, St.-Petersburg Russia

⁴The Institute for Analytical Instruments, St.-Petersburg Russia

*e-mail: d.ivan.krsk@gmail.com

Abstract — An approach to transfer enzyme reactions into the functional elements of the microfluidic chip has been suggested. It was developed and evaluated using the bienzyme bioluminescent reaction with the NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and luciferase enzymes. The assessment of the catalytic activity of these enzymes is the basis of the enzymatic bioassay of various liquids. It was found out that all components of the reaction should be placed in one reaction chamber of microfluidic chip to increase the reproducibility of measurements. The use of starch gel as a carrier for immobilization and gelatin scaffold allowed to preserve the enzyme activity during the room-temperature sealing of the chips. To improve the efficiency of the analysis, it is necessary to use the active mixing of a sample in the reaction chamber of the chip. The results of the study permit to suggest a prototype of a microfluidic chip based on enzyme bioluminescent reaction for the bioassay with the detection limit of copper sulfate of 3 mM, which is in consent with the traditional lux-biosensors based on living cells. Moreover, the analysis time was reduced up to 1 min, and the procedure could be performed by staff without special laboratory skills.

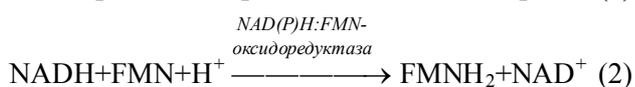
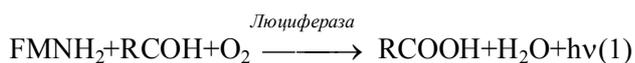
Key words: bioluminescence, enzymatic bioassay, luciferase, microfluidics, microfluidic system.

Список сокращений: ПММА — полиметилметакрилат; EC₅₀ — эффективная концентрация действующего вещества, вызывающая снижение люминесцентной активности биферментной системы на 50%; EDC — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; FMNH₂ — флавиномононуклеотид восстановленный; NAD(P)H — никотинамидадениндинуклеотид(фосфат) восстановленный.

Существующие лабораторные методики определения ряда токсичных веществ предполагают использование довольно значительных объемов реакционной смеси (более 1 мл). Создание соответствующих микрочипов позволило бы значительно уменьшить объем тестируемой пробы (до 20 мкл), сократить расход дорогостоящих реагентов и автоматизировать процесс анализа.

При разработке портативных биосенсоров [1] на микрофлюидных платформах [2—4] актуальной задачей является микромасштабное преобразование биохимических аналитических реакций. Трудности такого преобразования связаны с тем, что течение аналитической реакции в камере объемом менее 100 мкл в значительной степени зависит от начального положения реагентов, а также эффективности и скорости перемешивания их малых объемов. Кроме того, необходимо учитывать возможное взаимодействие биологических молекул и клеток с материалами, используемыми для изготовления чипов [5, 6], а также с органическими растворителями, применяемыми для герметизации каналов и реакционных камер [7].

В данной работе предложен подход к решению указанных проблем на примере использования одноразовых микрофлюидных чипов для ферментативного биолюминесцентного тестирования жидких проб на наличие токсичного вещества (медного купороса), которое определяют по его влиянию на параметры биолюминесценции цепи сопряженных реакций, катализируемых NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой (реакции (1) и (2)) [8]:



Люцифераза катализирует окисление альдегидов с излучением света в сине-зеленой области спектра (1). Для обеспечения люциферазы восстановленным флавиномононуклеотидом (FMNH₂) применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией (2), катализируемой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой [9].

Цель работы состояла в определении условий миниатюризации и автоматизации методики ферментативного биотестирования жидких проб. Для этого требовалось разработать микрофлюидные чипы, позволяющие обеспечить интенсивность люминесценции биферментной реакции и погрешность ее измерения, сходные по значению с характеристиками, присущими используемым лабораторным методикам [10].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для изготовления чипов использовали полиметилметакрилат (ПММА) марки Novattro («СафПласт», Россия); для герметизации микрочипов применяли ацетон марки «ос.ч.» 9-5 (ЗАО «Вектон», Россия) и 1,2-дихлорэтан («ч.д.а», ЗАО «Союзхимпром», Россия).

Для изготовления биологического модуля использовали лиофилизованные препараты высокоочищенных ферментов, произведенные в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции ИБФ СО РАН (Россия). Один флакон препарата содержал 0,5 мг люциферазы *Photobacterium leiognathi* (КФ 1.14.14.3) из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и 0,18 ед. активности NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы *Vibrio fischeri* (КФ 1.5.1.29). Для приготовления растворов ферментов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер (Fluka, Швеция), pH 7,0. Также применяли следующие реактивы: никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH, CHEBI:16908) (Gerbu, Германия); флавиномононуклеотид (FMN, CHEBI:17621) (Serva, Германия); миристиновый альдегид (C₁₄H₂₈O, CHEBI:84067) (Merck, Германия); картофельный крахмал и желатин из свиной шкуры (Sigma-Aldrich, США); MES-буфер: 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота («Хеликон», Россия); 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид хлорид (EDC) (Interchim, Франция).

Расчеты движения потоков и диффузии FMN в микроканалах проводили с использованием программы COMSOL Multiphysics (COMSOL, Швеция). Для этого решали систему уравнений Навье—Стокса при моделировании скоростного профиля жидкости, уравнение Фика для расчета конвективного и диффузионного переноса и уравнение Нойеса—Уитни для определения потока растворимого вещества на границе растворения.

Микрофлюидные чипы изготавливали методом фрезерования на станке Modela MDX-20 (Roland, Япония).

Ковалентную модификацию поверхности реакционной камеры чипа производили следующим образом: обрабатывали поверхность раствором NaOH (ООО «АльфаХим», Россия), промывали 0,1 М MES-буфером, обрабатывали в течение 3 ч 0,5 М раствором EDC. Затем вновь промывали 0,1 М MES-буфером, наносили раствор 3%-ного крахмального геля и EDC, выдерживали в течение 18 ч и промывали последовательно 0,1 М MES-буфером и дистиллированной водой.

Для обеспечения стабилизации ферментов использовали технологию иммобилизации биологических компонентов в крахмальном геле [10, 11].

Для этого 20 мл 3,15%-ной суспензии крахмала медленно нагревали и кипятили в течение 2 мин, охлаждали до температуры 25°, а затем последовательно вносили люциферазу, NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу, NADH и миристиновый альдегид. Суспензию перемешивали с помощью вакуумного смесителя («Аверон», Россия) и часть ее переносили на предварительно подготовленную поверхность чипов, а другую часть помещали на фторопластовую пленку толщиной 0,2 мм («Ф-сервис», Россия) для получения крахмальных дисков. Чипы и диски высушивали в течение 24 ч при температуре 8°, после чего чипы герметизировали. Герметизацию микрофлюидных чипов осуществляли путем введения в контакт двух пластин из ПММА под давлением ~ 30 кг/см². Одна из пластин содержала все функциональные структуры, а другая была предварительно обработана 1,2-дихлорэтаном (ЗАО «Союзхимпром», Россия).

Активность полученных реагентов оценивали по величине максимальной интенсивности свечения I_{max} , выраженной в относительных единицах, на люминометре GloMax 20/20 (Promega, США) в режиме измерения кинетики. Остаточное свечение биферментной системы в присутствии различных концентраций медного купороса вычисляли по формуле $I_e/I_c \cdot 100\%$, где I_e и I_c — значения максимальной интенсивности свечения биферментной системы в присутствии медного купороса и в дистиллированной воде (контроль), соответственно. Степень воздействия медного купороса на активность биферментной системы в микрофлюидных чипах и крахмальных дисках оценивали по параметру EC_{50} , представляющему собой эффективную концентрацию действующего вещества, вызывающую снижение люминесцентной активности биферментной системы на 50%.

Для эффективного перемешивания пробы в реакционной камере чипа использовали электромеханическую мембрану диаметром 7 мм с амплитудой максимального отклонения 1 мм, что приводило к смещению 3 мкл жидкости в реакторе микрофлюидного чипа. Мембрана приводилась в движение с помощью программируемого источника переменного напряжения в диапазоне от -2 до 2 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведен выбор материала для изготовления микрофлюидных чипов, размеров и расположения микроструктур чипа и биологических компонентов с целью обеспечить высокую воспроизводимость измерений. Изучено влияние органических растворителей, используемых при герметизации чипов, на компоненты биолюминесцентной реакции; определен оптимальный способ размещения биологических компонентов в реакционной камере чипа; подобран режим перемешивания пробы в чипе и проведено сравнение чувствительности метода с использованием разработанного чипа и метода с применением иммобилизованного ферментного препарата в форме крахмальных дисков [8] к действию медного купороса.

Выбор материала и топологии микрофлюидного чипа, определение начального положения биологических компонентов

К материалам, используемым для изготовления чипов, предъявляется ряд требований: оптическая прозрачность для регистрации светового излучения реакции в чипе, возможность модификации поверхности для лучшей адгезии на ней биологических материалов и быстрого испытания различных вариантов чипов для исследований [12]. Важную роль также играет цена материала и возможность потенциального масштабирования производства. Сохранение активности ферментов в ходе герметизации микрочипов обеспечивает лишь проведение процесса при комнатной температуре (без нагревания). В силу данных требований в качестве материала для изготовления чипов был выбран полиметилметакрилат (ПММА).

На примере FMN была решена задача поиска начального положения биологических компонентов в микрофлюидном чипе для обеспечения воспроизводимости измерений. При разработке топологии чипа исходили из предположения о том, что наличие пассивного смесителя в виде серпантинного канала будет способствовать лучшему растворению FMN до его попадания в реактор чипа. Рассмотрены различные варианты топологии микрофлюидного чипа (рис. 1). Согласно

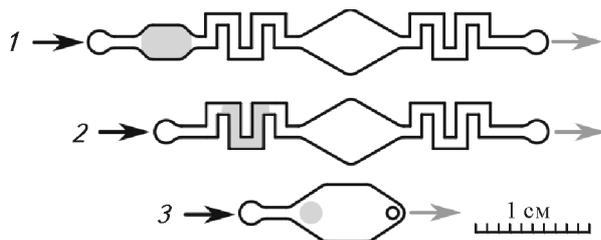


Рис. 1. Варианты топологии микрофлюидного чипа при размещении FMN (серое пятно) в отдельной камере (1), в серпантинном смесителе (2) и в реакторе (3). Черной стрелкой указан входной канал, серой — выходной.

Fig. 1. Variants of microfluidic chip topology when FMN (gray spot) is placed in an individual chamber (1), in a serpentine mixer (2), or in a reactor (3). Black arrow shows the input and gray arrow the output channel

первому варианту, FMN помещали в отдельную камеру, а перед и после реактора располагались серпантинные смесители. Второй вариант топологии отличался тем, что FMN помещали непосредственно в серпантинный смеситель, а согласно третьему варианту — в реактор чипа. Реакционная камера чипа имеет ромбовидную форму для уменьшения вероятности образования пузырей при протекании потока жидкости.

Поскольку интенсивность свечения биферментной реакции (1) и (2) зависит от локальной концентрации FMN, для получения воспроизводимого и стабильного биолюминесцентного сигнала чрезвычайно важным является равномерное распределение FMN в объеме реактора микрофлюидного чипа. Было проведено моделирование зависимости потока реагента через поперечное сечение реакционной камеры чипа от времени (рис. 2) для вариантов топологии 1 и 2 (см. рис.1).

Видно, что размещение FMN вне реактора микрофлюидного чипа (в камере или канале) приводит к тому, что скорость растворения FMN в значительной степени определяется скоростью потока (движения жидкости) при заборе пробы. В начале процесса растворения происходит увеличение потока FMN, связанное с его выходом в канал, а затем наступает спад, вызванный завершением растворения и началом вымывания вещества. Поскольку достижение воспроизводимой одинаковой скорости потока жидкости в каналах чипа в условиях реального эксперимента представляется затруднительным, размещение FMN вне реакционной камеры неизбежно приводит к снижению воспроизводимости результатов измерений.

Таким образом, наиболее подходящей топологией чипа является вариант, в котором FMN располагается в реакционной камере чипа (3 на рис. 1). В данном варианте предусмотрено также наличие выходного канала, расположенного непосредственно над реакционной камерой. Таким способом обеспечивается свободный доступ кислорода — одного из субстратов биолюминесцентной системы — в реактор.

Герметизация микрофлюидных чипов

В работе использован метод низкотемпературной герметизации двух пластин ПММА при помощи органического растворителя. Преимуществом низкотемпературной герметизации является предотвращение повреждений размещенных в чипе биологических компонентов, которые наблюдаются при проведении высокотемпературного процесса. Однако и в ходе низкотемпературной герметизации биологические компоненты

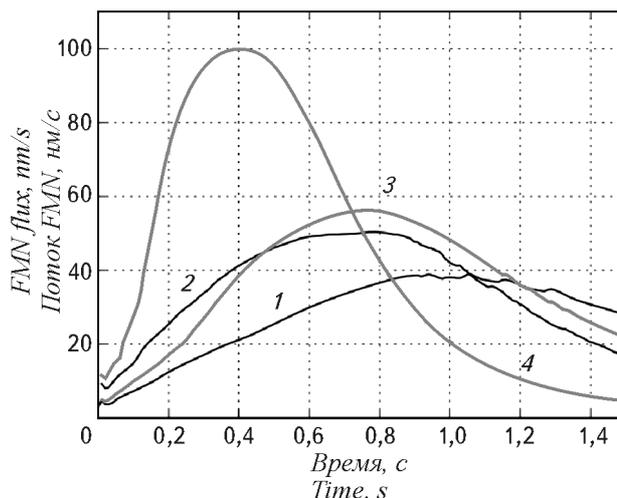


Рис 2. Зависимость потока растворенного FMN, проходящего через поперечное сечение камеры чипа при различной скорости движения жидкости (v). Черные кривые — FMN в камере, серые — FMN в канале: 1 — $v = 0,04$ м/с; 2 — $v = 0,08$ м/с; 3 — $v = 0,04$ м/с; 4 — $v = 0,08$ м/с

Fig. 2. Dependency of dissolved FMN flux through the cross section of a chip reaction chamber on time at various flux rates (v). Black curves, FMN is in a chamber; gray curve, FMN is in a channel: (1) — $v = 0.04$ m/s; (2) — $v = 0.08$ m/s; (3) — $v = 0.04$ m/s; (4) — $v = 0.08$ m/s

могут подвергаться негативному воздействию паров растворителя.

Для защиты от воздействия органических растворителей используемые в работе биологические компоненты (ферменты и субстраты) были предварительно иммобилизованы в крахмальном геле и высушены. Была проведена оценка воздействия двух растворителей (аcetона и 1,2-дихлорэтана) на активность иммобилизованных в крахмальном геле компонентов биолюминесцентной системы. Для этого на крахмальные диски с иммобилизованными ферментами наносили по 50 мкл неразбавленного acetона или 1,2-дихлорэтана и высушивали в течение 3 мин при температуре 25°.

Было показано, что в сравнении с контрольными образцами (без обработки растворителями) acetон и 1,2-дихлорэтан не оказывают статистически значимого воздействия на NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу, бактериальную люциферазу, NADH и миристиновый альдегид, если эти компоненты находятся в высушенном крахмальном геле.

Иммобилизация биологических компонентов в реакционной камере чипа

Иммобилизованные в крахмальном геле компоненты биолюминесцентной системы (ферменты, NADH и альдегид) вносили в реакционную камеру чипа, высушивали в течение 24 ч при

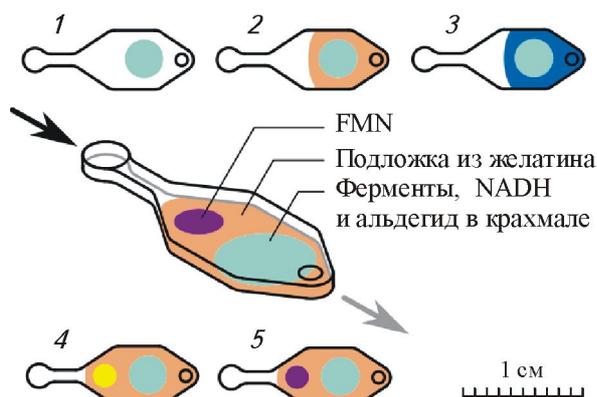


Рис. 3. Выбранные на основе численного моделирования варианты размещения биологических компонентов в чипе с разной обработкой поверхности: 1 — 1 М водно-спиртовым раствором NaOH в течение 18 ч; 2 — NaOH с последующим нанесением на поверхность реактора подложки в виде 1%-ного желатинового геля; 3 — ковалентная модификация с помощью водно-спиртового раствора NaOH, MES-буфера, раствора этилендиамина и EDC с последующим нанесением на поверхность реактора подложки в виде 3%-ного крахмального геля; 4 — то же, что и в 2, плюс нанесение капли водного раствора FMN на поверхность камеры; 5 — то же, что и в 2, плюс нанесение FMN, иммобилизованного в крахмальном геле. Черная стрелка — входной канал, серая — выходной

Fig. 3. Selected by digital modeling variants of biological components location in chips with different surface treatment: (1), 1 M NaOH water-ethanol solution, for 18 h; (2), NaOH with following application of 1% gelatin gel scaffold (orange) on the reactor surface; (3), covalent modification with NaOH water-ethanol solution, MES buffer, ethylene diamine solution and EDC with following application of 3% starch gel as a carrier on the reactor surface; (4), same as (2) plus application of a drop of FMN aqueous solution; and (5), same as (2) plus application of FMN immobilized in starch gel. Black and gray arrow shows the input and output channels, respectively

температуре 8° и определяли их активность в биолюминесцентной реакции. Показано, что наличие примесей и добавок в ПММА приводит в результате высушивания иммобилизованных биологических компонентов к уменьшению интенсивности биолюминесцентного сигнала и увеличению погрешности измерений.

Для предотвращения негативного воздействия примесей ПММА на иммобилизованные компоненты, а также для лучшей адгезии компонентов к поверхности чипа были изучены различные варианты размещения биологических компонентов в сочетании с различными способами обработки поверхности микрофлюидных чипов (рис. 3). На данном этапе исследования FMN добавляли в реакционную камеру извне в виде раствора.

На рис. 4 представлены результаты измерения интенсивности люминесценции биферментной системы в полученных чипах при различной обработке их поверхности. Видно, что при исполь-

зовании желатиновой подложки (рис. 4, 3) наблюдается наиболее высокая максимальная интенсивность люминесценции и наименьшее стандартное отклонение полученных результатов. Подобный способ защиты биологических компонентов традиционно используют при разработке чипов на основе клеток [13]. Кроме того, из рис. 4 следует, что герметизация чипов приводит к снижению интенсивности свечения, что может быть связано с ограничением доступа кислорода в реактор чипа.

Была также исследована интенсивность люминесценции при использовании FMN внутри реакционной камеры в качестве водного раствора, нанесенного на поверхность камеры (см. рис. 3, 4), или в виде компонента, иммобилизованного в крахмальном геле с последующим высушиванием при 8° (рис. 3, 5). Для того, чтобы избежать взаимодействия FMN и ПММА под влиянием паров растворителя при герметизации, на поверхность камеры чипа перед нанесением FMN предварительно помещали подложку из 1%-ного желатинового геля.

При нанесении FMN в виде водного раствора достигалась более высокая интенсивность свечения биферментной системы. Однако при использовании иммобилизованного FMN увеличивается время хранения реагента без потери активности (данные не приведены). Поэтому в дальнейших экспери-

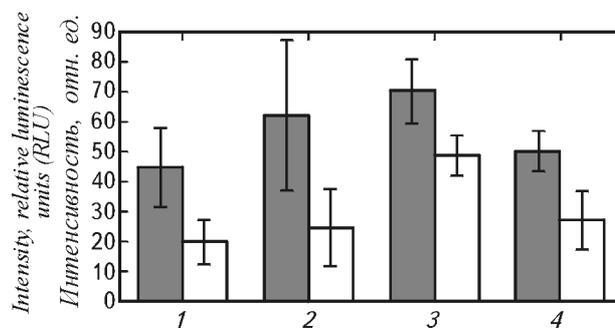


Рис. 4. Значения максимальной интенсивности светового излучения в чипах негерметизированных (серые столбики), герметизированных (белые столбики) с различной обработкой поверхности: 1 — без обработки (контроль); 2 — обработка 1 М раствором NaOH в течение 18 ч; 3 — обработка 1 М раствором NaOH с последующим нанесением желатинового геля; 4 — обработка 1 М раствором NaOH и нанесение крахмала путем ковалентной модификации поверхности (см. также подпись к рис. 3, 3)

Fig. 4. Maximum intensity of luminescence in chips (sealed, gray bars, and unsealed, white bars) with different surface treatment: (1), without treatment (control); (2), treated with 1 M NaOH for 18 h; (3), treated with 1 M NaOH with following application of gelatin scaffold; and (4), treated with 1 M NaOH and covalently modified (see also legend to Fig. 3, 3)

ментах на поверхность реактора чипа наносили FMN, иммобилизованный в крахмальном геле.

Меньшая интенсивность свечения биферментной системы при использовании в конструкции чипа иммобилизованного FMN объясняется, по-видимому, необходимостью дополнительного времени для освобождения FMN из крахмального геля и последующего равномерного распределения его по реакционной камере. С целью снижения времени, необходимого для диффузии FMN из крахмального геля, а также обеспечения равномерного распределения вещества в реакторе были использованы методы активного перемешивания пробы в чипе.

Выбор режима перемешивания пробы

Определение условий, обеспечивающих равномерное распределение FMN внутри реактора чипа, проводили с использованием численного моделирования. При решении двумерной задачи для используемой геометрии чипа (см. рис. 1, 3) были получены значения дисперсии концентрации FMN в реакционной камере для синусоидных и прямоугольных колебаний потока жидкости с амплитудой 3 мкл и 4 мкл (рис. 5).

Было выявлено, что при частоте больше 10 Гц характер потоков при перемешивании меняется, что приводит к уменьшению эффективности этого процесса. Прямоугольный сигнал с постоянной частотой показал худшее смешивание (большую дисперсию, см. 10 Гц, 3 мкл, прямоугольный сигнал на рис. 5), однако, и использование переменной частоты обеспечило то же значение дисперсии, что и при синусоидном сигнале (см. рис. 5). Таким образом, переменная частота сигнала позволяет повысить эффективность перемешивания за один период колебаний, поскольку при ее использовании те же значения дисперсии, что и при частоте 10 Гц, достигаются при средней частоте 5 Гц. Повышение амплитуды колебаний до 4 мкл при использовании данного режима позволяет достичь к 3-й секунде значения дисперсии концентрации в реакционной камере, равного $0,0001 \cdot 10^{-4}$.

Адекватность результатов моделирования была проверена экспериментально. Активное перемешивание было организовано за счет периодических механических колебаний мембраны, которая подсоединялась к входному отверстию чипа после ввода пробы. Частота колебаний равномерно возрастала за 3 с от 1 Гц до 10 Гц. Такой режим перемешивания позволил обеспечить наиболее равномерную концентрацию FMN в реакционной камере чипа. Экспериментальная проверка показала, что интенсивность сигнала люми-

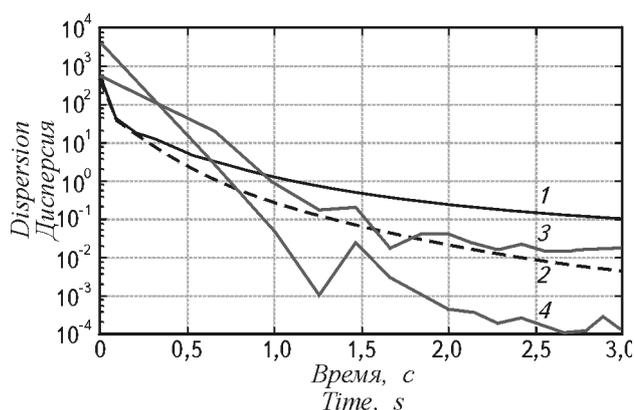


Рис. 5. Дисперсия распределения FMN в камере микрофлюидного чипа при двумерном моделировании, различной форме сигнала и амплитуде колебаний жидкости: сплошные линии — прямоугольный сигнал, пунктирная линия — синусоидный сигнал; черные кривые — постоянная частота колебаний 10 Гц, серые кривые — переменная частота колебаний 1—10 Гц. 1—3 — амплитуда колебаний жидкости 3 мкл, 4 — амплитуда колебаний жидкости 4 мкл

Fig. 5. Dispersion of FMN distribution in microfluidic chip chamber during bidimensional modeling at various signal shapes and amplitudes of liquid oscillation. Solid lines, square signal; broken line, sinusoidal signal. Black curves, constant oscillation frequency of 10 Hz; gray curves, variable oscillation frequency 1—10 Hz. (1)—(3), liquid oscillation amplitude of 3 μ L; and (4), liquid oscillation amplitude of 4 μ L

несценции при выбранном режиме перемешивания повышается в несколько раз (рис. 6), стандартное отклонение снижается до уровня 25% (рис. 7), а кинетика кривой принимает вид, характерный для реакции в лабораторной кювете.

Эффективность режима перемешивания, описанного выше, объясняется тем, что при меньших частотах колебаний жидкости профиль скоростей движения жидкости имеет параболическую форму, вследствие чего FMN на начальных циклах колебаний мембраны более равномерно распределяется по всей области реакционной камеры (рис. 6, b), чем при частоте колебаний, превышающей 10 Гц. Затем с увеличением частоты и интенсивности импульсов происходит окончательное перемешивание.

Биотестирование разработанных микрофлюидных чипов и режимов их функционирования

Было проведено сравнение чувствительности сконструированных чипов и исходной биферментной реакции *in vitro* к воздействию медного купороса, используемого в качестве модельного токсиканта (см. рис. 7).

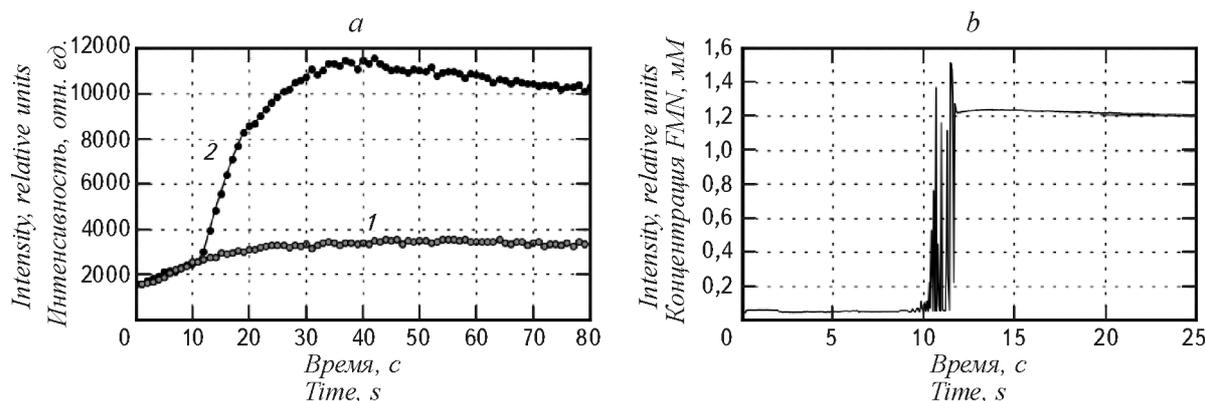


Рис. 6. Характеристики процесса перемешивания (включается на 10-й секунде) в реакторе микрочипа при использовании режима периодических механических колебаний мембраны: *a* — кинетика люминесценции без перемешивания (кривая 1) и с выбранным режимом перемешивания (кривая 2); *b* — концентрация FMN в области иммобилизованных в крахмальном геле компонентов биолюминесцентной системы

Fig. 6. Characteristics of mixing in the microchip reactor (switched on at the 10th second) by periodical mechanical membrane oscillations: (a), kinetics of luminescence with (curve 2) or without (curve 1) selected regime of mixing; (b), FMN concentration in the area of starch gel-immobilized components of the bioluminescent system

Установлено, что для микрофлюидных чипов EC_{50} при анализе медного купороса составляет 15 мкМ, а для крахмальных дисков — 3,5 мкМ. Результаты эксперимента показали, что предел обнаружения медного купороса для обеих систем составляет 3 мкМ. Эти данные свидетельствуют о сохранении достаточно высокого уровня чувствительности биферментной системы после иммобилизации всех биологических компонентов в микрофлюидном чипе.

Предел обнаружения медного купороса для предложенной тест-системы (3 мкМ) приближается по значению к пределу обнаружения классических lux-биосенсоров на основе живых клеток, применяемых для определения концентрации тя-

желых металлов в пробе (~ 1 мкМ) [14, 15]. Однако преимуществом использования микрофлюидных чипов является сокращение времени исследования с 3—5 ч [14, 15] до 1 мин, что позволит проводить анализ большого числа проб за короткое время. Более того, благодаря используемой технологии иммобилизации биологических компонентов в геле в пластиковом чипе срок хранения реагентов в рабочем состоянии достигает одного года.

Таким образом, реализованные в данной работе подходы к переносу ферментативных реакций в микрофлюидные чипы позволили уменьшить стандартное отклонение измерений биолюминесценции до 25%. Применение желатина в виде подложки в реакторе чипа обеспечивает сохранение высокой активности биологических компонентов при иммобилизации в чипе и последующем хранении. Чтобы протекание реакции не зависело от скорости потоков при заполнении чипа пробой, реагенты необходимо иммобилизовать в гелях, замедляющих их выход в раствор, и размещать их в одном реакторе. Для ферментативных реакций рекомендуется использовать активное перемешивание, которое обеспечивает наиболее близкое к однородному распределение реагентов в реакционной камере чипа и способствует более быстрому освобождению субстратов из матриц. При иммобилизации биферментной системы в чипе ее чувствительность сохраняется на уровне, характерном для свободных ферментов, биологические компоненты приобретают дополнительную защиту от механических воздействий, а сам анализ может быть выполнен лицами, не обладающими специальными лабораторными навыками.

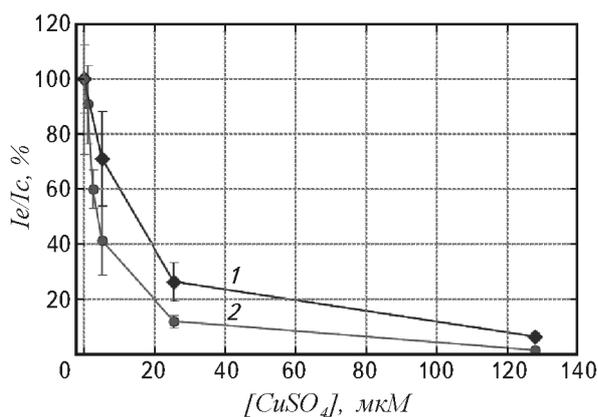


Рис. 7. Влияние медного купороса ($CuSO_4$) на интенсивность биолюминесценции ферментативной реакции в микрофлюидных чипах (1) и в пробирке с ферментами, иммобилизованными в крахмальных дисках (2)

Fig. 7. Effect of bluestone ($CuSO_4$) on intensity of enzymatic bioluminescent reaction in microfluidic chips (1) and in a tube with enzymes immobilized on starch disks (2)

Проведенные исследования являются основой для создания полностью автономного оптического биосенсора для проведения анализа жидких проб в экологической и медицинской практике.

Благодарности

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 15-19-10041).

Acknowledgements

The investigation was supported by the Grant of the Russian Science Foundation (Project 15-19-10041).

Поступила в редакцию 26.05.2016 Received May 26, 2016
Принята в печать 05.08.2016 Accepted August 05, 2016

ЛИТЕРАТУРА

- Gubala V., Harris L.F., Ricco A.J., *et al.* Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chem.* 2012, 84(2), 487—515.
- Jung W., Han J., Choi J., *et al.* Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. *Microelectronic Engineering.* 2015, 132, 46—57.
- Danielmark S.H. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1153—1182.
- Evstrapov A.A. Microfluidic chips for biological and medical research. *Russ. J. General Chem.* 2012, 82(12), 2132—2145.
- Ning R., Wang F., and Lin L. Biomaterial-based microfluidics for cell culture and analysis. *Trends Anal. Chem.* 2016, 80, 255—265.
- Midwoud P.M., Janse A., Merema M.T., *et al.* Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal. Chem.* 2012, 84(9), 3938—3944.
- Temiz Y., Lovchik R.D., Kaigala G.V., *et al.* Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelec. Eng.* 2015, 132, 156—175.
- Kratasyuk V.A., and Esimbekova E.N. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2015, 18(10), 952—959.
- Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* (Singapore, Republic of Singapore), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2012, 470.
- Bezrukikh A.E., Esimbekova E.N., Nemtseva E.N., *et al.* Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria {NADH:FMN—oxidoreductase—luciferase. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2014, 406(23), 5743—5747.
- Lonshakova-Mukina V.I., Esimbekova E.N., and Kratasyuk V.A. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors. *Sens. Actuat. B: Chem.* 2015, 213, 244—247.
- Guckenberger D.J., de Groot T.E., Wan A.M.D., *et al.* Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab. Chip.* 2015, 15(11), 2364—2378.
- Chung B.G., Lee K., Khademhosseini A., *et al.* Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering. *Lab. Chip.* 2012, 12(1), 45—59.
- Leth, S., Maltoni S., Simkus R., *et al.* Engineered bacteria based biosensors for monitoring bioavailable heavy metals. *Electroanalysis.* 2002, 14(1), 35—42.
- Hakkila K., Green T., Leskinen P., *et al.* Detection of bioavailable heavy metals in EILATox -Oregon samples using whole-cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips. *Appl. Toxicol.* 2004, 24(5), 333—342.

К.А. Лукьяненко,
аспирант, инженер,
К.А. Lukyanenko,
PhD student, engineer,
e-mail: Kirill.lukyanenko@gmail.com

И.А. Денисов,
научный сотрудник,
I.A. Denisov,
Research Associate,
e-mail: d.ivan.krsk@gmail.com

А.С. Якимов,
аспирант,
A.S. Yakimov,
PhD student,
e-mail: asyakimov@gmail.com

Е.Н. Есимбекова,
К. б. н., доцент, научный сотрудник,
E.N. Esimbekova
PhD, Assistant professor, Research Associate
e-mail: esimbekova@ya.ru

К.И. Белоусов,
Аспирант, инженер,
K.I. Belousov,
PhD student, engineer,
e-mail: belousov_k.i@mail.ru

А.С. Букатин,
К. ф.-м. н., старший научный сотрудник,
A.S. Bukatin,
Ph.D., Senior Researcher,
e-mail: antbuk.fiztek@gmail.com

И.В. Кухтевич,
К. т. н., старший научный сотрудник,
I.V. Kukhtevich,
Ph.D., Senior Researcher,
e-mail: ba@inbox.ru

В.В. Сорокин,
Исполнитель проекта РНФ-3,
V.V. Sorokin,
Project RNF-3 performer,
e-mail: _amalgama@mail.ru

А.А. Евстратов,
Д. т. н., зав. Лабораторией,
A.A.Evstrapov,
Dr. Sc., Head of Laboratory,
e-mail: anatolyevs@gmail.com

П.И. Белобров,
Д. ф.-м.н., профессор,
P.I. Belobrov,
Dr. Sc., Professor,
e-mail: peter.belobrov@gmail.com