

УДК 577.2.08

Хеликаза-зависимая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот на микрофлюидном чипе

© 2018 А.Н. ТУПИК^{1,*}, Г.Е. РУДНИЦКАЯ¹, Т.А. ЛУКАШЕНКО¹, А.А. ЕВСТРАПОВ^{1,2}

¹Институт аналитического приборостроения, Российская академия наук, Санкт-Петербург 190103

²Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург 197101

*e-mail: tunix@yandex.ru

Поступила 29.06.2018 г.

Принята в печать 29.08.2018 г.

Описаны механизмы проведения хеликаза-зависимой изотермической амплификации *in vitro* и устройства для обнаружения ДНК возбудителей различных заболеваний, в настоящее время используемые за рубежом, в основе работы которых заложен описанный метод. Основным элементом таких систем является микрофлюидный чип, в котором зачастую содержатся необходимые реагенты. Создание микрочипов – это первый шаг к разработке комплексной диагностической системы, также включающей регистрирующее и нагревательное устройства. Продемонстрированы предварительные результаты по разработке прототипов отечественных микрофлюидных чипов и оборудования для проведения амплификации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: хеликаза-зависимая амплификация, полимеразная цепная реакция, изотермическая амплификация, микрофлюидный чип, «point of care testing»

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-77-85

Методы амплификации нуклеиновых кислот являются важным инструментом, позволяющим значительно повысить чувствительность молекулярно-генетического анализа. Наиболее популярной технологией амплификации на сегодняшний день является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Амплификация на основе ПЦР требует высокоточного оборудования для термоциклирования, что не во всех случаях подходит для повседневной клинической практики и диагностики в условиях ограниченных ресурсов.

В последнее время наиболее востребованными становятся системы «point of care testing» (PoC-тесты), позволяющие осуществлять диагно-

стическое экспресс-тестирование на месте события или непосредственно на месте забора клинического материала. Как правило, такие тесты проводятся персоналом, не имеющим специальной квалификации, или даже самими больными. Также считается, что термин «PoC» можно отнести к любому лабораторному исследованию, проводимому за пределами лаборатории [1]. Основное преимущество подобных систем – сокращение времени, необходимого на исследование, и возможность повсеместного использования. Это позволяет оперативно принимать решения по госпитализации, лечению и выписке больных. Возможность проведения тестирования

Список сокращений: АНК-4 – анализатор нуклеиновых кислот для микрочипов; ДМК – детектор молекулярных колоний; ОК – отрицательный контроль; ПДМС – полидиметилсилоксан; ПММА – полиметилметакрилат; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детектированием в реальном времени; HDA – helicase-dependent amplification, хеликаза-зависимая амплификация, SYBR Green и Eva Green – интеркалирующие красители для неспецифичной системы детектирования результатов амплификации; tHDA – хеликаза-зависимая амплификация с термостабильной хеликазой; TaqMan – технология амплификации с применением разрушаемых меченных зондов для специфичной системы детектирования результатов в режиме реального времени.

вдали от медицинских учреждений (в сочетании с дистанционной интернет-диагностикой по результатам тестирования) позволяет охватить врачебной практикой и труднодоступные регионы.

Все это стимулирует развитие новых молекулярно-биологических методов. В течение двух последних десятилетий быстро развивались методы изотермической амплификации [2, 3], что связано с достижениями генной инженерии и лучшим пониманием процессов репликации нуклеиновых кислот. Важное различие между ПЦР и изотермической амплификацией – температурные режимы проведения реакции. Технологии изотермической амплификации нуклеиновых кислот работают при одной оптимальной температуре, что приводит к более простым, дешевым и надежным техническим решениям для конструкций приборов, которые хорошо подходят для использования при оперативной диагностике. При изотермической амплификации в качестве нагревательных средств могут быть применены водяная баня, резистивные нагреватели или использована теплота экзотермических химических реакций [4].

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот становятся перспективной альтернативой ПЦР и значительно упрощают реализацию методов амплификации в портативных диагностических приборах и аналитическом оборудовании.

Хеликаза-зависимая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Метод хеликаза-зависимой изотермической амплификации (Helicase-dependent amplification, HDA) ДНК *in vitro* был предложен в 2004 г. М. Винсентом, с соавт. [5] и воспроизводит механизм репликации ДНК *in vivo*.

Участвующий в реакции фермент хеликаза при температуре 37 °С расплетает двунитевые молекулы ДНК, разрывая водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями. Использование этого фермента позволяет исключить стадию высокотемпературной (90–95 °С) денатурации, которая требуется для проведения ПЦР, а значит, и потребность в специальном нагревательном оборудовании (термоциклере). Присутствие в реакционной смеси белка MutL стимулирует активность хеликазы, а белок, связывающийся с одноцепочечными ДНК (single-stranded binding (SSB) protein), предотвращает регибридизацию уже «расплетенных» хеликазой молекул. Специфические праймеры отжигаются со свободными одностранными молекулами ДНК, а

ДНК-полимераза удлиняет их, синтезируя новые двунитевые цепи ДНК-мишени ([6], рис. S1, *дополнительный материал*). При этом сохраняется экспоненциальный рост продукта реакции. Хеликаза может снова действовать на вновь синтезированные дуплексы, расплетая их, и цикл повторяется.

Изначально система HDA была разработана для использования UvrD-хеликазы (~82 кДа) из *Escherichia coli*, которая могла расплести дуплексы ДНК с «тупыми» концами, не имеющими выступающих одноцепочечных участков, а также разрывать кольцевые молекулы ДНК. Однако эта первоначальная система UvrD-HDA не могла эффективно амплифицировать длинные последовательности ДНК-мишеней, т.к. UvrD-хеликаза имеет ограничения по скорости (20 пн/сек) и процессивности (<100 пн/связывание) [5]. Поэтому существующие HDA-протоколы для малого содержания мишени в пробе (<100 копий) предполагают, что длительность амплификации составляет 60–120 мин [7]. Причина низкой процессивности, как предполагают, в недостаточной координации хеликазы и полимеразы во время синтеза *in vitro*. Эффективная амплификация была возможна только для коротких фрагментов ДНК длиной в 70–120 пн.

Выделение термостабильной хеликазы *Tte-UvrD* из термофильных бактерий *Thermoplasma aerobacter tengcongensis* позволило проводить tHDA при температуре от 45 до 65 °С и без присутствия дополнительных белков MutL и SSB в реакционной смеси [8]. Были изучены стратегии повышения производительности, чувствительности и сокращения длительности реакции tHDA для малого содержания ДНК-мишени в пробе [7], что позволило модифицировать метод, выбрать ферменты и состав буферных сред, максимально имитирующих естественные условия в клетке. При данном подходе удалось сократить время анализа до ~20 мин. Использование хеликазы (особым образом сшитые хеликаза *Tte-UvrD* и *Bst*-полимераза), созданной компанией BioHelix (Массачусетс, США) увеличивает размер амплифицируемого фрагмента до 1500 пн [9]. Успешные работы по выделению, отбору и синтезу хеликаз способствовали увеличению скорости и процессивности реакции HDA, что сделало возможным проведение амплификации фрагментов ДНК размером до 2300 пн [6].

Простая схема реакции является главным преимуществом HDA над другими изотермическими методами амплификации. Нет необходимости

в стадии денатурации, а обнаружение РНК возможно проводить с помощью обратной транскрипции. Поэтому HDA имеет большой потенциал для использования в портативных диагностических устройствах на месте оказания медицинской помощи.

Реализация методов HDA в микрофлюидных чипах позволяет создавать миниатюрные устройства для решения широкого круга биологических и медицинских задач. Так, Андресен и соавт. [10] разработали метод твердофазной хеликаза-зависимой амплификации на микрочипе OnChip-HDA. Один из праймеров иммобилизовали на стеклянном субстрате, а второй, меченный флуорофором, входил в состав реакционной смеси. Хеликаза расплетала ДНК-мишени, а одонитевые ДНК были способны «отжигаться» на иммобилизованных праймерах. Затем полимеразы достраивала эту цепочку. Продолжительность амплификации составила 2 ч. Получаемые меченые продукты амплификации детектировали в режиме реального времени. Авторы сообщают, что предлагаемым методом были обнаружены 250 пг геномной ДНК *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* и 1 нг геномной ДНК *Neisseria gonorrhoeae*.

В работе [11] предлагалось использовать микрофлюидное устройство для проведения HDA с

негерметичными (открытыми) реакционными камерами. Предварительно, на этапе изготовления, в камеры вводили и высушивали реагенты (праймеры (рис. 1)).

Микрочип изготовлен из полидиметилсилоксана (ПДМС) методом мягкой литографии и с помощью тонкого слоя адгезива закреплен на стеклянном субстрате. В качестве адгезива использовали неотвержденный ПДМС. Для заполнения устройства требуется только одна операция ввода реакционной смеси, содержащей анализируемую пробу. В загрузочный канал микрочипа через входное отверстие смесь вводится при помощи дозатора. Распределение реакционной смеси по реакторам происходит за счет капиллярных сил, что является немаловажным для работ в полевых условиях или в условиях ограничения энергетических ресурсов.

На стадии загрузки реакционная смесь заполняет реакционные камеры и растворяет праймеры, а воздух удаляется через специальные клапаны для выпуска воздуха. Избыток реакционной смеси в загрузочном канале удаляется через сливной канал с адсорбирующей прокладкой (фильтровальная бумага Whatmann, GF/D), что позволяет изолировать растворы в реакционных камерах друг от друга и предотвратить перекрестное

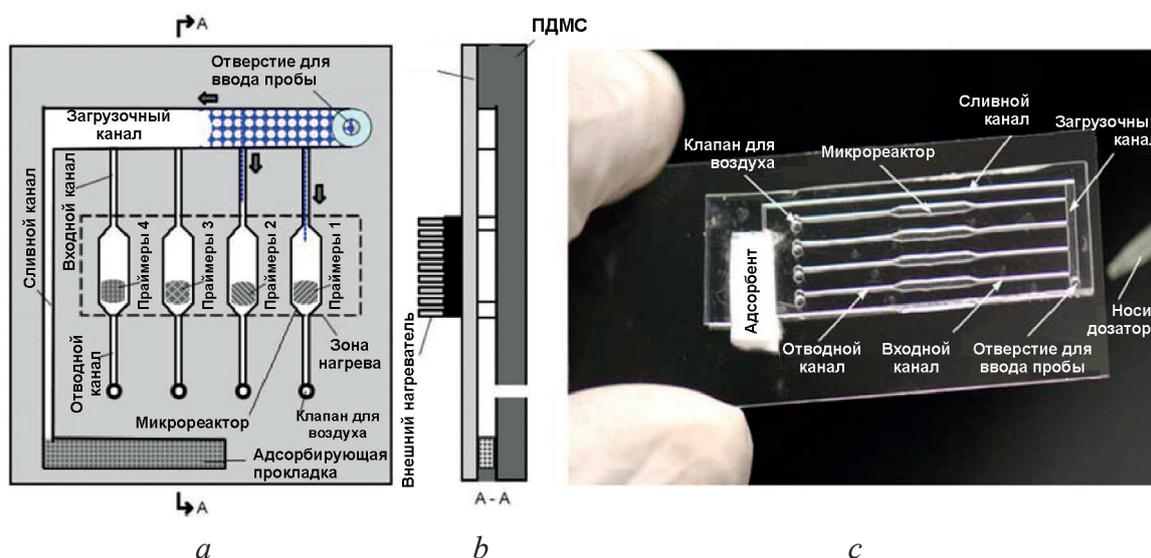


Рис. 1. Микрофлюидный чип для проведения хеликаза-зависимой амплификации. *a* – схематическое изображение микрореакторов и сети загрузки реагентов микрочипового устройства ПДМС-стекло для хеликаза-зависимой амплификации; *b* – поперечное сечение гибридного чипа ПДМС-стекло; *c* – фотография изготовленного микрочипового устройства (Перепечатано с разрешения Springer Nature: Springer [11])

Fig. 1. Microfluidic chip for helicase-dependent amplification. (a), schematic layout of microreactors and reagent loading network; (b), cross-sectional view of the PDMS-glass hybrid chip on a local thermoelectric heater; (c), photograph of the fabricated PDMS-glass microreactor for isothermal amplification process. (Reprinted by permission from Springer Nature: Springer [11])

загрязнение. При амплификации реакционные камеры микрочипа не герметизируют, а потери при испарении минимизируют за счет дизайна камер и качества их внутренней поверхности, а также локального нагрева исключительно области реакторов. Влияние отсутствия герметичности реакционных камер на эффективность ПЦР было изучено в работе [12]. Показано, что если объемы бридж-каналов составляют <10% общего объема реакционной камеры, то негерметичность камеры мало влияет на эффективность реакции.

Возможности микрофлюидного устройства продемонстрированы на примере амплификации BNI-1 фрагмента кДНК коронавируса – возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома (0,1 нг/мкл кДНК при 62 °С). В работе в одноразовом пластиковом картридже объединили процедуры выделения ДНК бактерий *E. coli* методом микро-твердофазной экстракции (micro solid phase extraction, μ SPE) и хеликаза-зависимой амплификации [13]. В качестве материала чипа использовались пленки из циклоолефиновых полимеров (COP, Zeon Chemicals, Луисвилл, Кентукки, США) толщиной 188 мкм. Микрофлюидный чип содержал четыре реакционные камеры по 25 мкл (три для проведения HDA и одну для отрицательного контроля), микроколонку для μ SPE (0,55×0,55×20 мм), камеру для перемешивания и систему управляющих клапанов (рис. 2).

До начала работы на микрочипе образец смешивают с лизирующим раствором и затем запускают на колонку μ SPE. ДНК пробы удерживается на колонке μ SPE, а продукты лизиса после операции по промывке колонки поступают в резервуар для сбора отходов. Во время этой стадии клапан 1 перекрывает доступ для растворов экстракции в камеру смешивания. После последней стадии промывки камера для отходов заполняется, и клапан 1 открывается, направляя элюированный раствор в смесительную камеру, которая содержит реагенты HDA. Смешивание элюированных ДНК и реагентов HDA происходит с помощью миниатюрной магнитной мешалки в камере (диаметром 10 мм и глубиной 2,5 мм). После полного смешивания три реакционные камеры последовательно заполняются раствором. На входе каждой из камер объемом 25 мкл расположен запирающий клапан, а на выходе – гидрофобный вентиль. Как только предыдущая камера полностью заполнена, клапан открывается, и реакционная смесь HDA заполняет следующую камеру. Захваченный воздух может выйти через гидрофобное отверстие, но жидкость остается в реакционной камере. Вентиляционные отверстия и клапаны герметизированы ПЦР-пленкой для предотвращения испарения. Авторами показана возможность детектирования менее 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) *E. coli* за 50 мин в режиме реального времени.

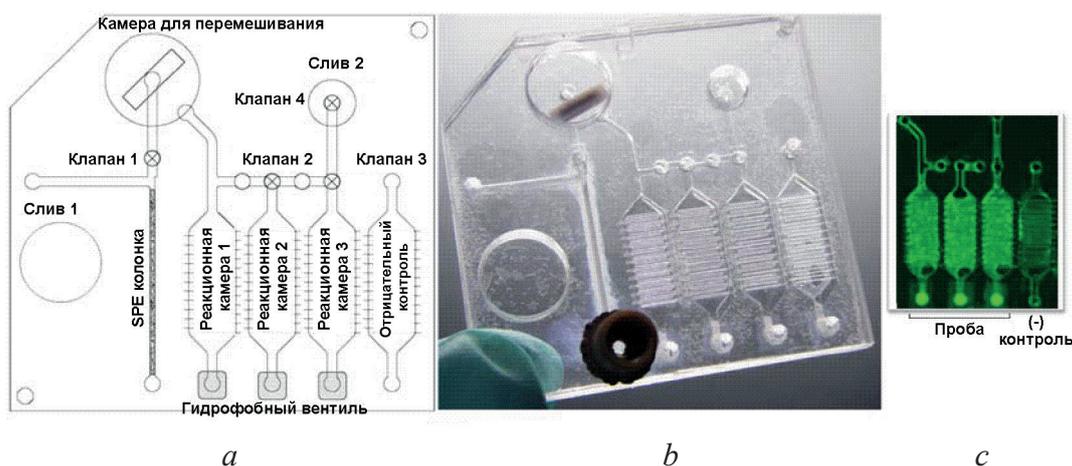


Рис. 2. Интегрированный микрофлюидный чип для выделения ДНК и проведения хеликаза-зависимой изотермической амплификации. *a* – схематическое изображение интегрированного одноразового устройства для выделения ДНК и проведения хеликаза-зависимой амплификации; *b* – фотография устройства; *c* – изображение устройства с положительной HDA реакцией в трех реакционных камерах и отрицательным контролем в четвертой. (Перепечатано с разрешения Springer Nature: Springer [13])

Fig. 2. Integrated microfluidic chip for both nucleic acid extraction and isothermal helicase-dependent amplification. (a), schematic layout of integrated disposable microfluidic device; (b), photograph of device; (c), positive HDA reactions in three reaction chambers and negative control water reaction in the fourth. (Reprinted by permission from Springer Nature: Springer [13])

Следует отметить, что уже имеются коммерчески доступные реагенты для проведения НДА и опубликовано множество работ по использованию их для обнаружения бактериальных и вирусных ДНК- и РНК-мишеней с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green и/или зонда TaqMan в стандартных микропробирках. Серийно выпускаются стандартизированные реагенты и исследовательские наборы компанией BioHelix, которая является разработчиком НДА. Также разработкой реагентной базы и тест-систем для проведения НДА занимается компания New England Biolabs (Массачусетс, США). Предлагаются тесты, например, на *Staphylococcus aureus* и *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Clostridium difficile*, HIV, Herpes Simplex, *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* и др. с детектированием при использовании BESt™-кассет. Основным элементом кассеты является мембранный носитель (тест-полоска) с иммобилизованными реагентами, которые при взаимодействии с продуктами амплификации образуют окрашенные специфические комплексы в виде полос [14–17]. Конструирование необходимых для проведения реакции праймеров возможно при использовании известных программ: PrimerQuest, Primer3 и др.

Цель настоящей работы – провести НДА в микрочиповых устройствах отечественного производства, изготовленных из стекла марки К8 и Ф1 (ГОСТ 3514-94) и полимерных материалов (ГОСП® (ГОСТ 17622-72, ТУ 2216-271-05757593-2001) и АCRYМА®72 (ТУ 2216-030-55856863-2004),

«ДОС», Дзержинск, Россия), и зарегистрировать результаты амплификации на приборах, разработанных в Институте аналитического приборостроения РАН. Проведение НДА в микрочиповых устройствах из эластомерных материалов было описано в работе [18].

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Оборудование, материалы и методы

Микрочиповое устройство представляет собой неразъемное клеевое соединение канализированной и защитной пластин, полученное с помощью фотоотверждаемых полимерных композиций. Микроструктуры (каналы и реакционные камеры) в стеклянных пластинах были сформированы методами фотолитографии и кислотного травления [19], а в пластинах из ПММА – методом лазерной микрообработки на промышленной установке SpeedyII (Trotec, Германия). Объем одной реакционной камеры составлял для полимерных микрочипов ~ 16 мкл, для устройств из стекла – 5 мкл (камера с круглым дном) и 2 мкл (камера канального типа) (рис. 3).

Изотермическую хеликаза-зависимую амплификацию выполняли, используя набор реагентов IsoAmp II Universal tHDA Kit (BioHelix) по инструкции производителя. Оценку работоспособности микрофлюидных устройств проводили с праймерами и мишенью положительного контроля, входившего в комплект набора IsoAmp II. Праймеры, NGF3 (прямой) и NGR3 (обратный), использовали при конечной концентрации 75 нМ

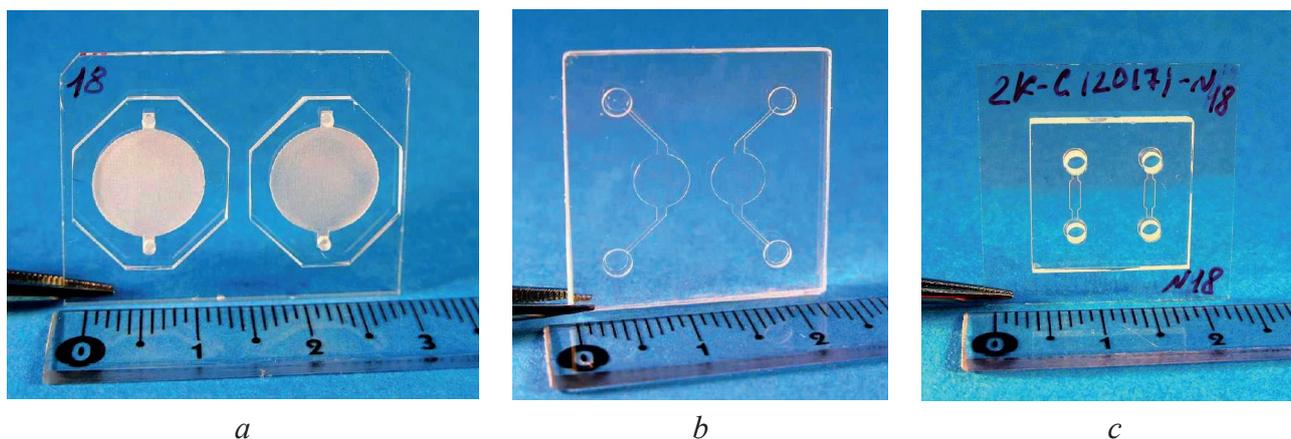


Рис. 3. Изготовленные микрочиповые устройства. *a* – чип из ПММА (24×32) мм, объем реакционной камеры ~ 16 мкл; *b* – чип из стекла К8 (24×24) мм, объем реакционной камеры с круглым дном ~ 5 мкл; *c* – чип из стекла К8 (15×15) мм, объем реакционной камеры канального типа ~ 2 мкл

Fig. 3. Various fabricated microchip devices: (a), PMMA (24 × 32) mm, reaction chamber of ~ 16 μL; (b), K8 glass (24 × 24) mm, reaction chamber (round-bottomed) of ~ 5 μL; (c), K8 glass (15 × 15) mm, reaction chambers (channel-type) of ~ 2 μL

каждого с добавлением 1 нг контрольной матрицы pCNG1 для получения 50 мкл реакционной смеси, содержащей интеркалирующий краситель Eva Green (20 X, Biotium, США).

В каждом микрочиповом устройстве одну реакционную камеру заполняли подготовленной смесью для хеликазы-зависимой амплификации, вторую камеру оставляли для отрицательного контроля (дистиллированная вода). Жидкость вводили во входные лунки с помощью дозатора. Реакционные камеры микрочипов заполнялись под действием капиллярных сил. Для предотвращения испарения реакционного раствора входную и выходную лунки наполняли минеральным маслом (MP Biomedicals, Франция).

Регистрация результатов

Регистрировали результаты амплификации как в режиме реального времени, так и по конечной точке. Амплификацию проводили при температуре 65 °С на прототипе анализатора нуклеиновых кислот для микрочипов АНК-4 (ИАП РАН, Россия) с твердотельным нагревателем и регистрацией сигнала флуоресценции в режиме реального времени с возбуждением на длинах волн: 485, 530, 580 и 630 нм (рис. S2a, *дополнительный материал*).

Два микрочипа одновременно устанавливали на нагревающую поверхность так, чтобы сигнал флуоресценции от раствора в реакционных камерах регистрировался оптической системой прибора. Сканирование реакционных ка-

мер микрочипов после амплификации и анализ результатов амплификации (регистрация по конечной точке) проводили на прототипе детектора молекулярных колоний (ДМК, ИАП РАН, Россия) (рис. S2b, *дополнительный материал*). Детектирование проводили с применением лазерного источника с длиной волны возбуждения 473 нм. При этом регистрация сигнала флуоресценции осуществлялась в диапазоне 515–535 нм. В процессе сканирования выбранной области производилась регистрация большого числа изображений отдельных полей зрения (460×350 мкм), после объединения и обработки которых получали интегральное изображение области анализа (пространственное разрешение в поле зрения – не более 1 мкм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение микрочипового устройства из стекла с устройством из полимерного материала

Результаты экспериментов по проведению хеликазы-зависимой амплификации на микрочиповых устройствах с регистрацией в реальном времени показаны на рис. 4. По мере накопления продукта амплификации наблюдается монотонное возрастание флуоресценции, выходящее на постоянную величину (плато). В устройствах из стекла и полимерных материалов продолжительность выхода на плато различается, при этом меньше времени (<50 мин) требуется при амплификации в микрочипе из стекла. Это можно

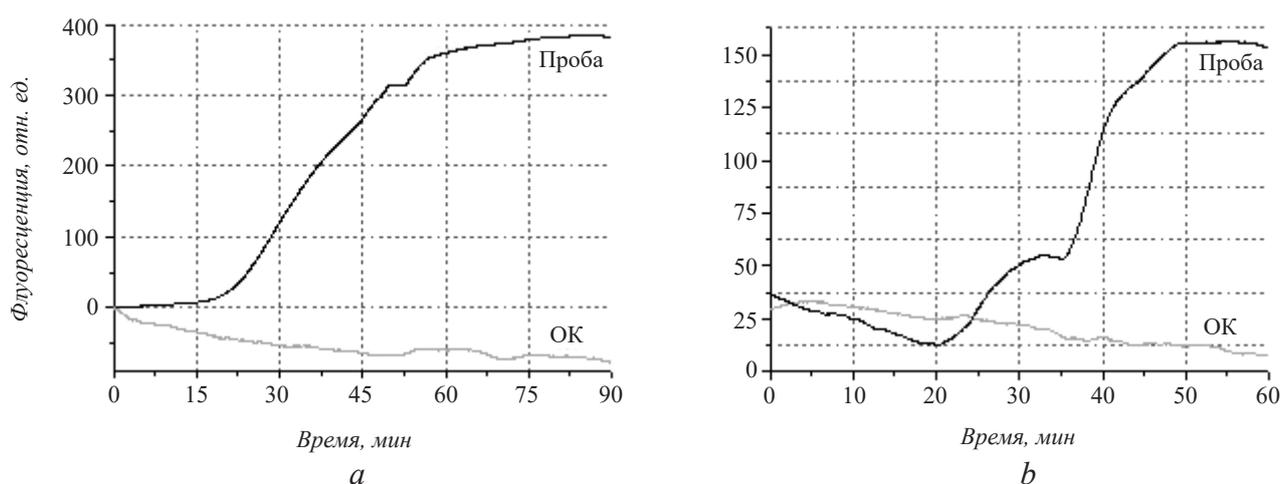


Рис. 4. Графики накопления продуктов хеликазы-зависимой амплификации в режиме реального времени на микрочиповых устройствах: *a* – из полиметилметакрилата; *b* – из стекла с камерами канального типа. ОК – отрицательный контроль

Fig. 4. Plots for accumulation of real-time helicase-dependent amplification products on various microchips: (a), polymethylmethacrylate; (b), glass with channel-type chambers. Sample designates sample with target DNA; OK is negative control

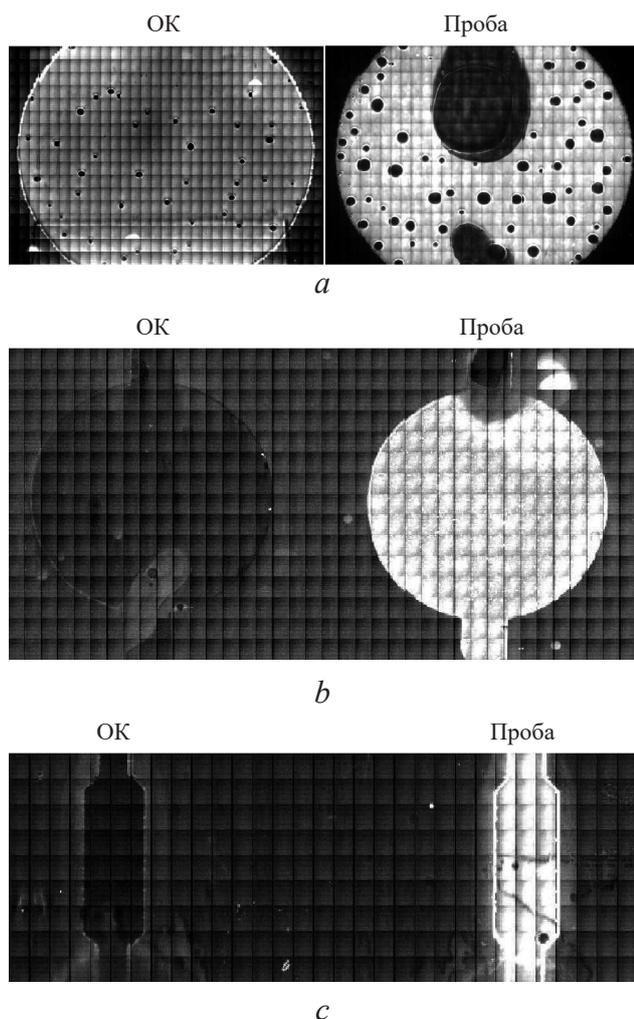


Рис. 5. Сканирование реакционных камер микрочиповых устройств после проведения НДА: *a* – чип из ПММА; *b* – чип из стекла К8, реакционные камеры с круглым дном; *c* – чип из стекла К8, реакционные камеры канального типа. «Проба» – ДНК-мишень, ОК – отрицательный контроль

Fig. 5. Scanning of reaction chambers after HDA of various microchip devices: (a), polymethylmethacrylate; (b), glass with round reaction chambers; (c), glass with channel-type reaction chambers. Sample designates sample with target DNA, ОК is negative control

объяснить более эффективным проведением НДА, качественным теплообменом за счет меньшего реакционного объема и лучшей теплопроводности стекла по сравнению с ПММА. Уровень сигнала флуоресценции для реакции в полимерном устройстве выше ~ в 2,5 раза, чем в стеклянном, т.к. глубина реакционной камеры полимерного чипа 200 мкм, а стеклянного в 2 раза меньше – 100 мкм. Отметим, что собственная флуоресценция ПММА не оказывает существенного влияния на уровень сигнала.

На рис. 5 приведены изображения реакционных камер микрочиповых устройств после проведения НДА (регистрация по конечной точке) с флуоресцирующими продуктами амплификации. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. Образование в реакционных камерах из ПММА пузырьков воздуха связано с шероховатостью поверхности, которая появляется при использовании технологии лазерной микрообработки для изготовления структур в полимерной подложке.

На рис. 6 диаграмма уровня флуоресценции продуктов хеликазы-зависимой амплификации для трех типов микрочиповых устройств. Более высокий уровень сигнала флуоресценции был получен в случае использования чипа из ПММА с реакционной камерой большего объема, чем у стеклянных микрочипов.

Экспериментальные результаты позволяют сделать вывод о пригодности изготовленных стеклянных и полимерных микрочиповых устройств для проведения хеликазы-зависимой амплификации. В стеклянных микрочипах реакция проходит более эффективно по сравнению с ПММА, однако использование полимерных материалов и высокопроизводительных технологий (лазерная микрообработка) позволит снизить конечную стоимость микрочипов при серийном производстве. Для дальнейшей работы перспективным является объединение этапов пробоподготовки и амплификации

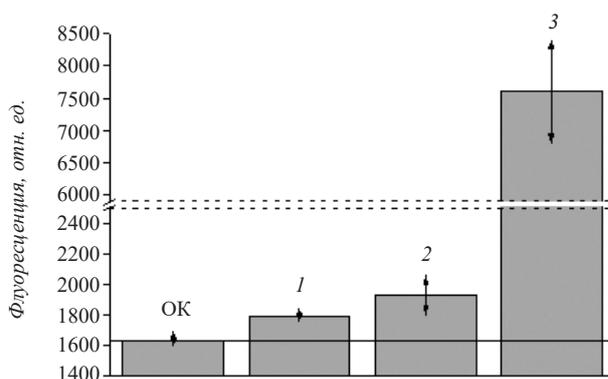


Рис. 6. Уровень сигнала флуоресценции в зависимости от результатов хеликазы-зависимой амплификации нуклеиновых кислот (по конечной точке) на микрочиповых устройствах из стекла (1 – камера с круглым дном, 2 – камера канального типа) и ПММА (3). ОК – отрицательный контроль

Fig. 6. Fluorescence signal of helicase-dependent amplification (end-point detection) from various microchips: 1 – glass with round reaction chambers, 2 – glass with channel-type reaction chambers, 3 – polymethylmethacrylate. ОК – negative control

на одном микрочиповом устройстве и предварительная иммобилизация необходимых компонентов реакции внутри реакционной камеры, что упростит процедуру подготовки устройства к работе. Пример исследования по разработке способов хранения компонентов ферментативной реакции внутри микрочипа из ПММА описан в работе [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

HDA – новая технология изотермической амплификации, в которой этап тепловой денатурации для разделения двухцепочечных ДНК исключается за счет использования хеликаз, способных разрушать водородные связи. Простота схемы реакции и ее проведения делают хеликаза-зависимую амплификацию универсальным и удобным в применении тестом.

Простота метода имеет большое значение при разработке миниатюрных автоматизированных устройств с точки зрения производства и затрат. Для выполнения HDA с детектированием в реальном времени на микрочиповом устройстве требуется специальный детектор (возможно использование приборов ПЦР-РВ) и нагреватель с плоской поверхностью. Детектирование результатов по конечной точке осуществляется на любом сканере, в том числе биочипов. Для нагревания микроустройств до температуры проведения реакции (обычно 65 °С) возможно использование водяной бани или термостата.

В настоящей работе реализована постановка хеликаза-зависимой амплификации на микрочиповых устройствах из стекла и ПММА с использованием прототипов детектора молекулярных колоний (ИАП РАН) и анализатора нуклеиновых кислот для микрочипов АНК-4 (ИАП РАН). В микрочиповых устройствах продукты амплификации успешно регистрировали как в режиме реального времени, так и по конечной точке. Для дальнейшей работы перспективным является объединение этапов пробоподготовки и амплификации на одном микрочиповом устройстве и предварительная иммобилизация необходимых компонентов реакции внутри реакционной камеры.

Работа была выполнена при финансировании в рамках государственного задания № 007-00229-18-00.

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

ЛИТЕРАТУРА

1. Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А., Гончарова А.В. Технологии point of care в клинике неотложных состояний. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013, 58(7), 5–10.
2. Tröger V., Niemann K., Gärtig C., Kuhlmeier D. Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems. *J. Nanomed Nanotechnol.* 2015, 6(3), 1000282 (19p). doi: 10.4172/2157-7439.1000282
3. Deng H., Gao Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Analytica Chimica Acta*. 2015. 853, 30–45. doi: 10.1016/j.aca.2014.09.037
4. Buser J. R., Diesburg S., Singleton J. et al. Precision chemical heating for diagnostic devices. *Lab Chip*. 2015, 15 (23), 4423–4432. doi: 10.1039/C5LC01053E.
5. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.*, 2004, 5(8), 795–800. doi: 10.1038/sj.embor.7400200
6. Jeong Y.J., Park K., Kim D.E. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cell Mol. Life Sci.*, 2009, 66(20), 3325–3336. doi: 10.1007/s00018-009-0094-3
7. Tong Y., Lemieux B., Kong H. Multiple strategies to improve sensitivity, speed and robustness of isothermal nucleic acid amplification for rapid pathogen detection. *BMC Biotechnol.*, 2011, 11, 50. doi: 10.1186/1472-6750-11-50
8. An L., Tang W., Ranalli T.A., et al. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280(32), 28952–28958. doi: 10.1074/jbc.M503096200
9. Motré A., Li Y., Kong H. Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene*, 2008, 420(1), 17–22. doi: 10.1016/j.gene.2008.04.017
10. Andresen D., von Nickisch-Rosenegk M., Bier F.F. Helicase dependent OnChip-amplification and its use in multiplex pathogen detection. *Clin. Chim. Acta*, 2009, 403(1–2), 244–248. doi: 10.1016/j.cca.2009.03.021
11. Ramalingam N., San T., Kai T., et al. Microfluidic devices harboring unsealed reactors for real-time isothermal helicase-dependent amplification. *Microfluidics Nanofluidics*, 2009, 7(9), 325–336. doi: 10.1007/s10404-008-0378-1
12. Wang F., Yang M., Burns M.A. Microfabricated valveless devices for thermal bioreactions based on diffusion-limited evaporation. *Lab chip*, 2008, 8(1), 88–97. doi: 10.1039/B711770A
13. Mahalanabis M., Do J., Zhang J.Y., Klapperich C.M. An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. *Biomed. Microdevices*, 2010, 12(2), 353–359. doi: 10.1007/s10544-009-9391-8
14. Lemieux B., Li Y., Kong H., Tang Y.-W. Near instrument-free, simple molecular device for rapid detection of herpes simplex viruses. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2012, 12(5), 437–443. doi: 10.1586/ERM.12.34

15. Kim H.-L., Tong Y., Tang W., et al. A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Clin. Virol.*, 2011, 50(1), 26–30. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.006
16. Motré A., Kong R., Li Y. Improving isothermal DNA amplification speed for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods.*, 2011, 84(2), 343–345. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.002
17. Doseeva V., Forbes T., Wolff J., et al. Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, 71(4), 354–365. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.021
18. Posmitnaya Y.S., Rudnitskaya G.E., Tupik A.N., et al. Polymer -based microfluidic chips for isothermal amplification of nucleic acids. *JPCS*, 2017, 917, 042012 (5p). doi: 10.1088/1742-6596/917/4/042012
19. Евстрапов А.А., Лукашенко Т.А., Рудницкая Г.Е., и др. Микрофлюидные чипы из стеклянных материалов. *Научное приборостроение*, 2012, 22(2), 27–43.
20. Лукьяненко К.А., Денисов И.А., Якимов А.С., и др. Аналитические и ферментативные реакции в микрофлюидных чипах. *Биотехнология*, 2016, 32 (5), 69–76.

Helicase-Dependent Isothermal Amplification of Nucleic Acids on Microfluidic Array Chip

A.N. TUPIK^{1,*}, G.E RUDNITSKAYA¹, T.A. LUKASHENKO¹, and A.A. EVSTRAPOV^{1,2}

¹*Institute for Analytical Instrumentation (IAI), Russian Academy of Sciences, St. Petersburg 190103, Russia*

²*St. Petersburg National Research University for Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO University), St. Petersburg 197101, Russia*

*e-mail: tunix@yandex.ru

Received June 29 2018

Accepted August 29, 2018

Abstract—Mechanisms of the reaction of helicase-dependent isothermal *in vitro* amplification and existing foreign devices for the detection of DNAs of causes of various diseases using this method are described. A microfluidic array chip is a basic component of those systems often containing necessary reagents. The construction of microarray chips is a first step to the design of a diagnostic system that also includes recording and heating devices. Preliminary results of the development of domestic microfluidic array chips and equipment for the nucleic acid amplification are represented in this article.

Key words: helicase-dependent amplification, polymerase chain reaction, isothermal amplification, microfluidic array chip, point of care testing.

Acknowledgements—The work was financially supported in accordance with the State task № 007-00229-18-00.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-5-77-85