

УДК 577.113;578.7;579.61:616-078

МЕТОД АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО РЕАЛИЗАЦИЯ В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ

© 2011 г. Д. Д. Мамаев, Д. А. Ходаков, Е. И. Дементьева, И. В. Филатов, Д. А. Юрасов,
А. И. Черепанов, В. А. Василюков, О. В. Смолдовская, Д. В. Зименков, Д. А. Грядунов,
В. М. Михайлович, А. С. Заседателев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991

e-mail: grad@biochip.ru

Поступила в редакцию 5.06.2010 г.

Разработаны метод и устройство для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. Метод включает разрушение бактериальных клеток и/или вирусных частиц (комбинированный ферментативный и химический лизис) и последующую экстракцию с очисткой нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте. Процедура осуществляется в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму контакт исследователя с потенциально инфекционным образцом и, как следствие, снижает риск заражения персонала. Модуль включает резервуары с лиофилизированными компонентами лизирующих и промывочного буферов; микроколону с твердофазным сорбентом; резервуары, содержащие воду, спирт и водно-спиртовые смеси для растворения сухих компонентов буферов, промывки микроколони и элюции нуклеиновых кислот; микроканалы и клапаны, необходимые для перемещения жидкостей внутри модуля. Модуль помещается в блок управления, осуществляющий подачу давления, нагрев, перемешивание реагентов и перемещение растворов в резервуарах модуля. Устройство способно выполнять эффективное выделение и очистку нуклеиновых кислот за 40 мин, а полученные препараты могут быть использованы непосредственно для проведения ПЦР и анализа с использованием биочипов.

Подавляющее большинство современных методов молекулярной диагностики основано на анализе специфических последовательностей нуклеиновых кислот (НК). Первой стадией молекулярно-генетических исследований является выделение нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) из биологического материала: животных и растительных клеток, тканей, физиологических жидкостей (кровь, слюна и др.), а также из образцов почвы, воды, пищевых продуктов. В условиях интенсивного развития молекулярно-диагностических подходов изменились и современные требования к лабораторным методам выделения НК. Больше внимания стало уделяться возможности автоматизации процесса и применения универсальных методических протоколов выделения и очистки НК. К существенным требованиям относятся длительность и трудоемкость процедуры подготовки пробы для анализа, количество одновременно обрабатываемых проб, качество и количественный выход получаемых препаратов НК, а также безопасность выполнения процедуры персоналом исследовательских и медицинских лабораторий.

В настоящее время выделение и очистка НК из клинического материала в большинстве исследовательских лабораторий проводится вручную. К недостаткам такого подхода можно отнести трудоемкость, вероятность кросс-контаминации исследуемых образцов, а также высокий риск заражения персонала при работе с патогенными микроорганиз-

мами. По этой причине существует острая потребность в создании автоматизированных устройств для выделения и очистки нуклеиновых кислот, соответствующих современным требованиям.

Классические лабораторные методы выделения ДНК и РНК описаны, например, в [1–3]. Обработка образца для выделения нуклеиновых кислот включает разрушение клеток (мембран, клеточных стенок или вирусного капсида), денатурацию нуклеопротеиновых комплексов, удаление белков и иных примесных соединений. Наиболее широкое распространение получили методы с использованием твердофазных сорбентов, к которым относятся ионообменные смолы, кремниевые матрицы, силикагели, кварцевые и стеклянные частицы и волокна, диатомит, цеолиты и др. [5]. Твердофазные носители позволяют осуществить полную или частичную автоматизацию процедуры выделения и очистки, например, частицы стекла или кварца, система золь–гель [5, 6], а также носители в виде пористых монолитных матриц на основе кремния и различных полимеров с большой площадью поверхности и контролируемым размером пор [7, 8].

В последние годы наиболее популярным методом выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов становится способ с использованием магнитных частиц — магнитных микросфер, на поверхности которых иммобилизованы ли-

ганды для связывания биологических молекул [9–12]. Магнитные частицы с адсорбированными на них нуклеиновыми кислотами осаждаются под действием магнитного поля. Магнитные частицы получают на основе оксида железа, циркония, различных полимеров, пористых стекол и др. Увеличение сорбционной емкости частиц достигается путем модификации их поверхности.

Все большее распространение в мире получают миниатюрные устройства, которые включают все необходимое для проведения достаточно сложных биохимических анализов. Это так называемые аналитические микросистемы (micro total analysis systems, μ TAS), микрофлюидные устройства различного формата: кассеты, микрочипы, мини-диски и др., и “лаборатории-на-чипе и CD-дисках” [13–16]. Микрофлюидные системы содержат сеть микроканалов диаметром 100 мкм и менее, через которые пропускаются биологические образцы и растворы реагентов, а также резервуары, в которых проводится разделение компонентов, очистка, концентрирование и другие процедуры. В состав микрофлюидных систем входят также перемешивающие устройства, микродозаторы, микронасосы, фильтры и др. Описаны экспериментальные микрофлюидные устройства, в которых проводится выделение ДНК и ее амплификация, а в некоторых аппаратах также и последующая детекция [17–19].

Рядом крупных зарубежных компаний разработаны и выпущены в продажу сложные роботизированные системы, выполняющие выделение и очистку НК из биологических образцов в автоматическом режиме, например, приборы KingFisher (“Thermo Electron”, США), MagNA Pure LC и Cobas (“Roche Diagnostics”, Германия), BioRobot и QIASymphony (“Qiagen”, Германия), Maxwell System (“Promega”, США), Quickgene (“FujiFilm”, Япония). В большинстве устройств используется принцип сорбции нуклеиновых кислот на магнитных микросферах и, как правило, все устройства воспроизводят протокол “ручного” выделения ДНК и РНК, включая последовательное перемещение пробирок и многоканальное дозирование реагентов с использованием роботов [20]. Стоимость таких приборов составляет несколько миллионов рублей, себестоимость подготовки образца для последующего анализа остается достаточно высокой.

Несмотря на то, что в России рынок молекулярной диагностики быстро развивается, отечественные аналоги автоматизированных систем для выделения НК в настоящее время полностью отсутствуют.

Цель работы – создание унифицированной процедуры, позволяющей автоматизировать выделение и очистку НК из клеток, бактерий и вирусных частиц, а также устройства на основе оригинальных микрофлюидных модулей, которое бы выгодно отличалось от существующих аналогов простотой и безопасностью проведения анализа, высоким выходом продукта и невысокой стоимостью.

МЕТОДИКА

Реагенты и ферменты. В работе использовали лизоцим, гуанидингидрохлорид, гуанидинтиоцианат, *N*-лаурилсаркозинат натрия, тритон X-100, ЭДТА, буферы TE, воду, не содержащую нуклеаз (“Sigma”, США), протеиназу К (“Ambion”, США), молекулярные маркеры ДНК “GeneRuler™ High Range DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва) и PUC 19/MSP I “Силекс”, Россия), наборы для выделения РНК “RNeasy Mini” (“Qiagen”, Германия) и “Genomic DNA Purification Kit” (“Fermentas”, Литва), “ToTALLY RNA” (“Ambion”, США), стекловолокнистые фильтры серии GF: GF/B, GF/C, GF/D (“Whatman”, Германия), силикагель G-60 (“Merck”, Германия), термостабильную “HotTaq” ДНК-полимеразу “Силекс”, Россия), набор для проведения обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР “One-step RT-PCR kit” (“Qiagen”, Германия).

Олигонуклеотиды. Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ABI-394 DNA/RNA synthesizer (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (комплекс “Gilson”, Франция). Олигонуклеотиды для иммобилизации в гелевых элементах биочипа содержали спейсер со свободной аминогруппой, введенной в процессе синтеза с использованием 5'-Amino-Modifier C6 (“Glen Research”, США).

Гидрогелевые биочипы. Биочипы изготавливали согласно ранее опубликованному протоколу [21]. Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры и олигонуклеотидные зонды, наносили на пластиковую поверхность с помощью робота, с целью получения ячеек полусферической формы диаметром 600 мкм, отстоящих друг от друга на расстояние 300 мкм.

Выбор твердофазного носителя и условий экстракции нуклеиновых кислот. Для отработки процедуры выделения и очистки НК изготавливали микроколонки, в которые помещали твердофазные носители: водную суспензию силикагеля G60 (5 мкл) помещали в полипропиленовый цилиндр высотой 8 мм, диаметром 1.5 мм, либо два слоя стекловолокнистых фильтров GF (диаметром 7 мм) помещали в полипропиленовые цилиндры диаметром 8 мм. К лизату биологического образца (100–500 мкл) добавляли этанол и полученную смесь наносили на колонку с сорбентом. Колонку промывали смесью этанола (50 об. %) с 0.15 М трис-НСl буфером, pH 8.0, содержащим 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорида, и затем 80%-ным этанолом, высушивали в токе воздуха, и элюировали нуклеиновые кислоты водой или TE-буфером (10 mM трис-НСl, pH 7.5; 1 mM ЭДТА, pH 8.0).

Сменные микрофлюидные модули для выделения и очистки нуклеиновых кислот (рис. 1, 2). Основную рабочую платформу и верхнюю и нижнюю крышки модулей изготавливали методом литья из химически инертных полимерных материалов, не сорбирующих нуклеиновые кислоты, например, полипропи-

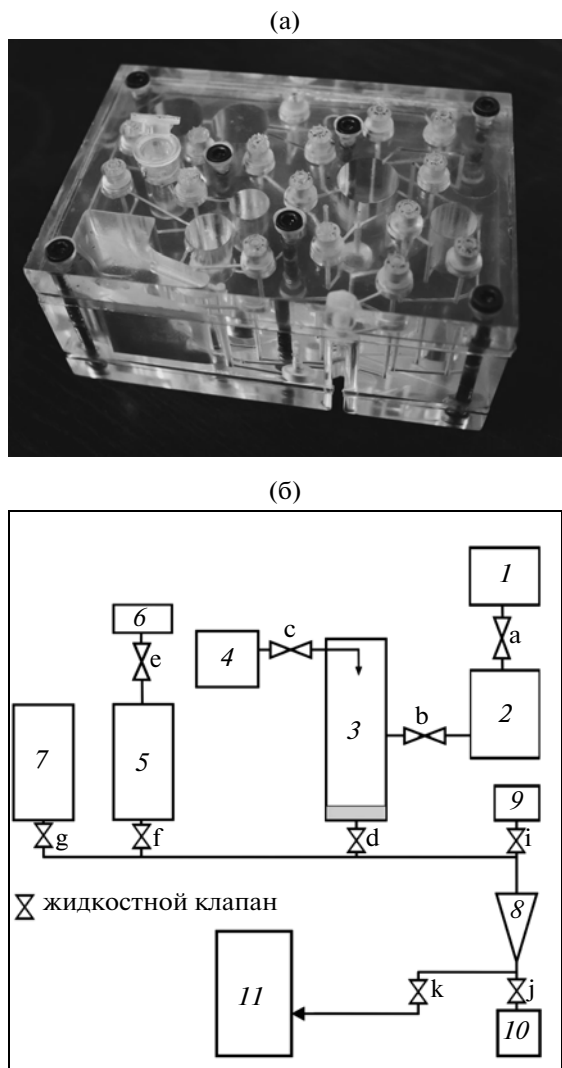


Рис. 1. Внешний вид (а) и принципиальная схема (б) сменного микрофлюидного модуля для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот: 1 – приемная камера для образца, 2 – резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 1-го лизирующего буфера, 3 – резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 2-го лизирующего буфера, 4 – резервуар, содержащий 96%-ный этанол для добавления к лизату биологического образца, 5 – резервуар с лиофилизованной смесью промывочного буфера, 6 – резервуар со смесью этанол–вода (1 : 1, об.) для растворения лиофилизованной смеси промывочного буфера, 7 – резервуар, содержащий 80%-ный этанол для промывки микроколони с твердофазным сорбентом, 8 – микроколонка с твердофазным сорбентом, 9 – резервуар с раствором для элюции нуклеиновых кислот с микроколони, 10 – резервуар для сбора очищенного продукта, 11 – резервуар для сбора отходов, а–к – клапаны, регулирующие перемещение жидкостных реакционных смесей и реагентов в резервуарах и каналах модуля.

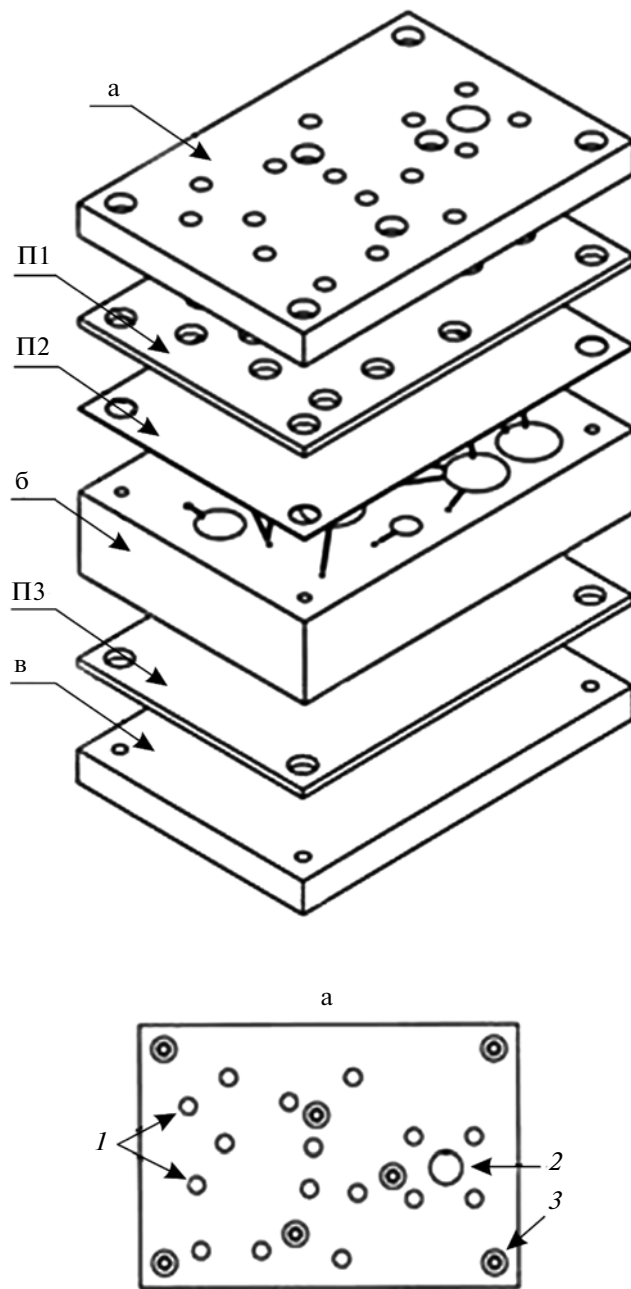


Рис. 2. Конструктивные элементы сменного микрофлюидного модуля (а, б, в): а – верхняя панель (крышка, вид сверху), полипропилен, 2 мм. На верхней панели расположены: 1 – отверстия для штоков соленоидов (16 шт.); 2 – отверстие для приемной камеры образца; 3 – отверстие для фиксирующих винтов; П1, П3 – прокладки, силикон, 2 мм; П2 – прокладка, полиэтилен, 50 мкм; б – основная рабочая платформа, полипропилен, 20 мм; в – нижняя панель (крышка), полипропилен, 7 мм.

лен, полистирол, полиметилметакрилат (оргстекло). Прокладки изготавливали из эластичных материалов, таких как силикон и полиэтилен. В работе ис-

пользовали микрофлюидные модули из полипропилена: основная рабочая платформа толщиной 20 мм, верхняя и нижняя панели (крышки) толщиной 7 мм

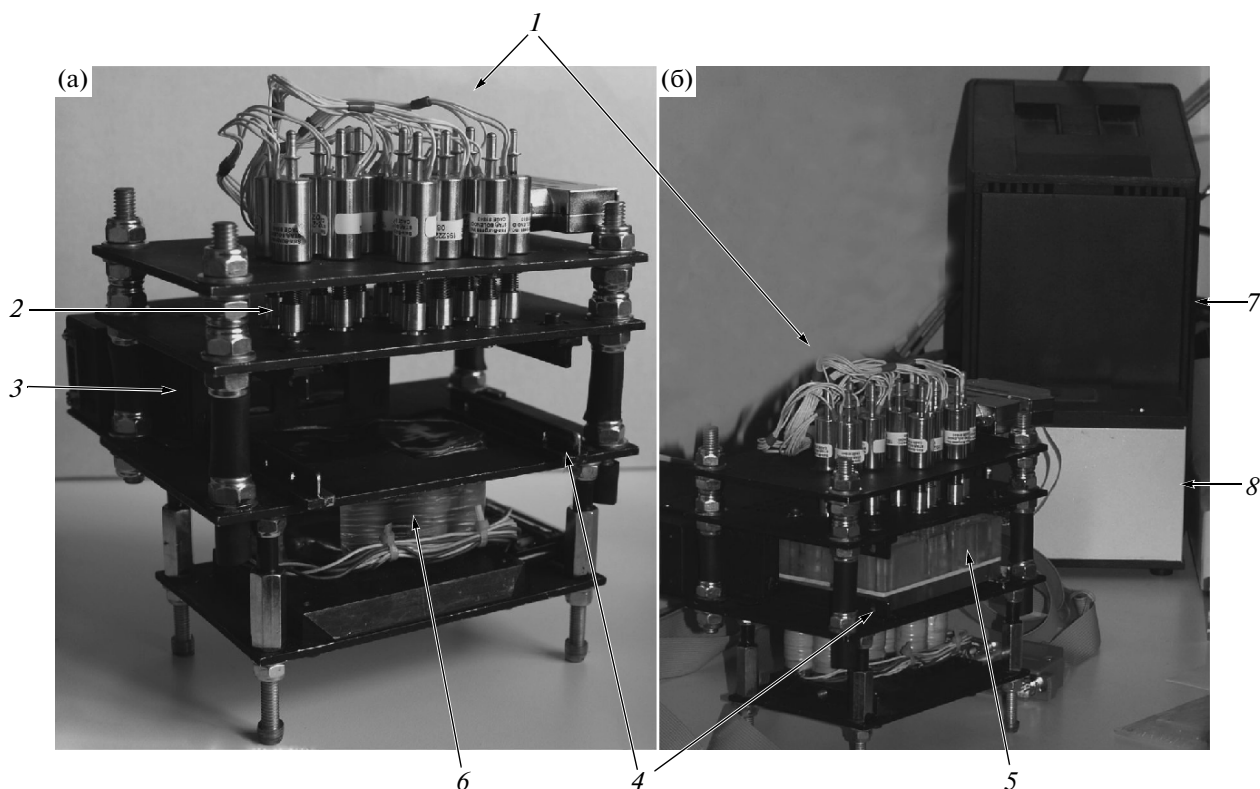


Рис. 3. Блок управления установки для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот (а – без микрофлюидного модуля, б – готовая к работе установка с помещенным в нее микрофлюидным модулем): 1 – блок соленоидов для управления клапанами микрофлюидного модуля, 2 – штоки соленоидов, 3 – блок нагревателей, 4 – направляющие салазки для помещения микрофлюидного модуля в блок управления, 5 – микрофлюидный модуль, 6 – блок электромагнитных мешалок, 7 – компрессор, 8 – блок электронного управления.

с прокладками из силикона “Пентэлэст Т4” (ООО “Пента-Юниор”, Россия) толщиной 2 мм и полиэтиленовой пленки универсальной толщиной 50 мкм. Элементы модуля были скреплены между собой с помощью винтов.

Подготовка микрофлюидного модуля к работе. В резервуар 2 микрофлюидного модуля объемом 1.0 мл (рис. 1б) помещали лиофилизованную смесь реагентов для приготовления 1-го лизирующего буфера, в резервуар 3 объемом 1.5 мл – лиофилизованную смесь реагентов для 2-го лизирующего буфера, в резервуар 5 объемом 1.0 мл – лиофилизованную смесь реагентов для промывочного буфера, содержащую хаотропный агент. В микроколонку помещали 5 мкл водной суспензии силикагеля G60 (твердофазный сорбент для связывания НК), колонку устанавливали в соответствующий резервуар 8. Резервуар 4 объемом 0.5 мл заполняли 96%-ным этанолом, резервуар 6 объемом 0.5 мл – смесью этанола и воды (1 : 1, об.), и резервуар 7 объемом 1.0 мл – 80%-ным этанолом, резервуар 9 объемом 0.2 мл – водой (или низкосолевым буфером, например, TE). Объем резервуара для сбора отходов составлял 5.0 мл.

При растворении лиофилизованных компонентов буферных растворов достигались следующие концентрации реагентов: 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 50 мг/мл лизоцима, pH 8.0 (1-ый лизирующий

буфер), 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 4.5 М гуанидингидрохлорида, 1 мг/мл протеиназы К, 0.5% *N*-лаурилсаркозината натрия, pH 6.5 (2-ой лизирующий буфер), 0.15 М трис-НСl, 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорида, pH 8.0 (промывочный буфер).

Для осуществления перемешивания растворов и реакционных смесей в процессе обработки образца в резервуары 2, 3 и 5 помещали магнитные мешалки – стальные стержни в тефлоновой оболочке.

Устройство для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Устройство состояло из микрофлюидного модуля, блока управления и компьютера с соответствующим программным обеспечением для управления процедурой выделения и очистки НК (рис. 3). Микрофлюидный модуль, содержащий необходимые реагенты и компоненты для обработки биологических образцов, помещали в блок управления. В состав блока управления входил блок соленоидов для управления клапанами модуля, штоки соленоидов, блок нагревателей, блок электромагнитных мешалок, компрессор и блок электронного управления.

Для подачи давления использовали мембранный либо плунжерный насос, способный создавать избыточное давление до 2 атм. В качестве электромагнитов, управляющих работой клапанов, использовали линейные соленоиды xEPM (“Saia Burgess”, Гонконг). Скорость регулировки потоков осуществ-

ляли регуляторами жидкостных потоков FR-DR150 с быстроразъемными соединениями либо FC-DR200...500 (встраиваемые) фирмы "Atoll" (США). В качестве нагревательных элементов применяли однокаскадные модули Пельтье (ЗАО "СКТБ "НОРД", Россия) размером 15 × 15 мм. Контроллер температуры представлял собой схему на основе датчика ТРК-02 (ООО "ТСФ", Россия).

Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили из культур грамположительных клеток *Bacillus thuringiensis* sp. Sotto TO 4001, грамотрицательных клеток *Escherichia coli* K12 и клеток *E. coli* K12, инфицированных бактериофагами MS2 или λ . Клетки (0.1–0.5 мл) помещали в приемную камеру сменного модуля, модуль устанавливали в блок управления, запускали программное обеспечение и проводили выделение нуклеиновых кислот в автоматическом режиме. Общее время выполнения процедуры составляло не более 40 мин.

В качестве метода сравнения использовали стандартную процедуру выделения и очистки ДНК, включающую лизис, экстракцию смесью фенол–хлороформ, переосаждение ДНК этанолом (центрифугирование при 18000 g). НК выделяли также по протоколам коммерческих производителей с использованием наборов "Genomic DNA Purification Kit" ("Fermentas", Литва), "ToTALLY RNA" ("Ambion", США) или "RNeasy Mini" ("Qiagen", Германия).

Эффективность выделения нуклеиновых кислот проверяли с помощью электрофоретического анализа в 1 или 2%-ном агарозном геле путем визуального сравнения интенсивности полос в дорожках, содержащих нуклеиновые кислоты, выделенные стандартным методом (в "ручном" режиме) и в автоматическом режиме с использованием сменного микрофлюидного модуля. Концентрацию выделенной ДНК измеряли по поглощению в УФ-диапазоне длин волн 220–320 нм с использованием спектрофотометра "Genesys 10 uv" ("Thermo Scientific", США).

Количественную оценку эффективности выделения НК проводили с использованием ПЦР с детекцией в режиме реального времени на приборе "iCycler iQ5" ("Bio-Rad", США) с праймерами, специфичными к геномам указанных выше бактерий и фагов. Реакционная смесь для проведения ПЦР (20 мкл) включала 5 ед. "HotTaq" ДНК-полимеразы ("Силекс", Россия), однократный ПЦР-буфер (70 мМ трис-НСl, рН 8.3, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂), 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ), 2 мкл однократного раствора SYBR-Green I ("Invitrogen", США) и 100 нМ каждого праймера.

ПЦР на биочипах. Реакцию проводили, как было описано ранее [22]. Биочип (рис. 4а) содержал 8 иммобилизованных праймеров, позволяющих проводить идентификацию *E. coli*, *B. thuringiensis*, *Salmonella typhimurium*, фагов λ и MS2. Для определения микроорганизмов использовали праймеры, комплементарные последовательностям видоспецифич-

ного полиморфизма генов 16S рРНК. Дополнительно, для повышения специфичности процедуры были сконструированы праймеры, специфичные к последовательности гена 23S рРНК *E. coli* и *B. thuringiensis*, а также к гену фимбриальной субъединицы *fimA* *S. typhimurium*. Последовательности праймеров для идентификации фагов λ и MS2 были комплементарны последовательностям участков гена терминазы и белка оболочки CP, соответственно. Биочип включал также 6 ячеек геля, не содержащих иммобилизованных праймеров (отрицательный контроль "NC", рис. 4а), используемых для вычисления фонового флуоресцентного сигнала I_{ref} . По окончании амплификации сигнал в ячейке считали достоверным, если он превышал I_{ref} не менее, чем в 2.0 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка унифицированной процедуры для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов в автоматическом режиме. При разработке процедуры выделения и очистки НК принималось во внимание то, что она должна удовлетворять следующим требованиям:

- все стадии обработки образца и выделения НК должны проводиться в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля;
- выделение ДНК и/или РНК должно производиться из биологических образцов различного типа, включая бактериальные клетки и вирусные частицы;
- выделение ДНК и РНК должно осуществляться с высоким выходом из образцов, содержащих 10⁴ и более клеток и/или вирусных частиц;
- микрофлюидные модули, содержащие реагенты для обработки образца, должны храниться в течение длительного времени (год и более).

Первой стадией обработки биологического образца является разрушение (лизис) клеточных стенок бактерий и оболочек вирусов с высвобождением НК. Для проведения ферментативного лизиса обычно используют такие ферменты, как лизоцим, субтилизин, протеиназа К. При химическом лизисе применяют солибилизирующие и дестабилизирующие агенты: поверхностно-активные вещества (ДДС, тритон X-100, N-лаурилсаркозинат натрия) и хаотропные агенты, например, гуанидинтиоцианат (гидрохлорид) или перхлорат натрия в концентрации 3–6 М [1–3].

Поскольку выделение ДНК и РНК должно производиться из биологических образцов, имеющих различное строение (бактериальные клетки и вирусные частицы), нами был выбран комбинированный двухстадийный ферментативный и химический лизис. Первая стадия лизиса заключалась в обработке образца лизоцимом в концентрации 50 мг/мл, который гидролизует компоненты бактериальных клеточных стенок (пептидогликаны). Вторую стадию лизиса проводили в растворе, содержащем протеиназу К, хаотропный агент и детергент. Протеиназа К

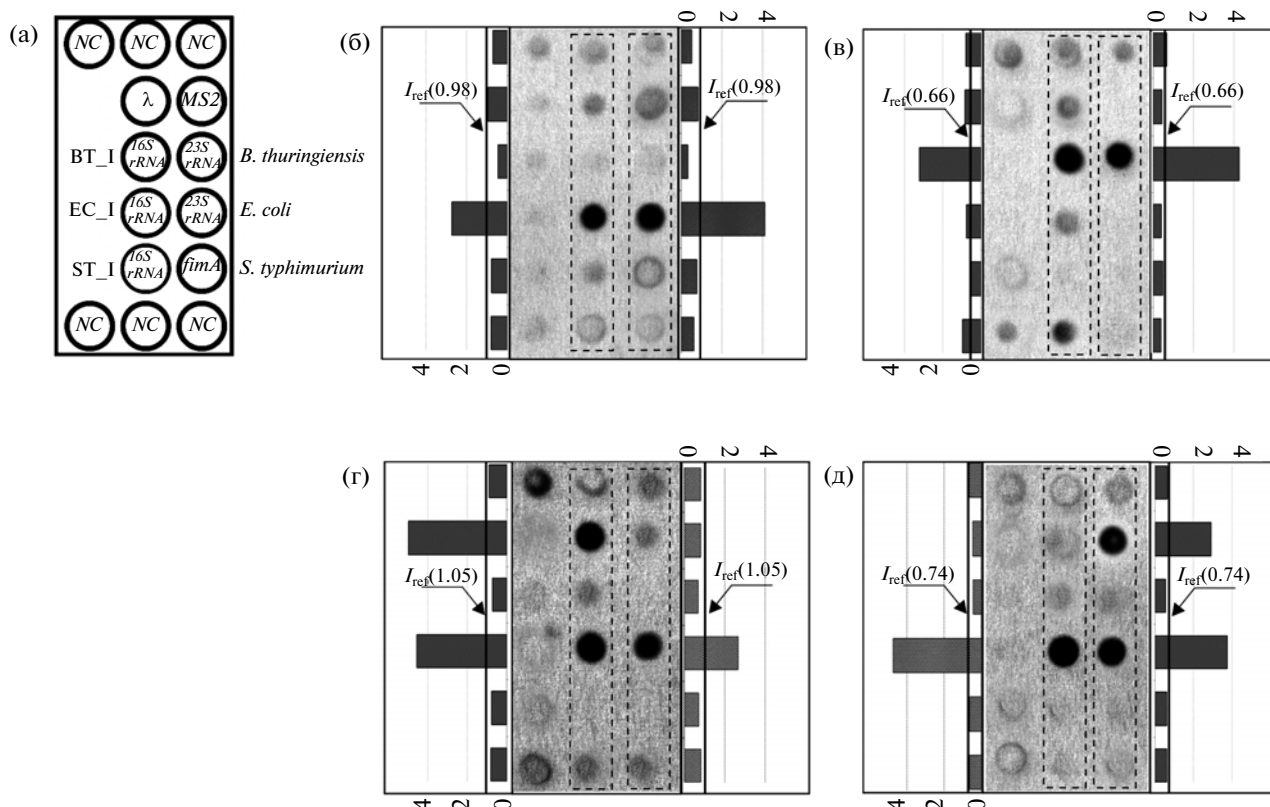


Рис. 4. Результаты проведения мультиплексной ПЦР на биочипе с использованием бактериальных и фаговых нуклеиновых кислот, выделенных в микрофлюидных модулях (а) и схема биочипа для проведения ПЦР (б–д). Флуоресцентные картины биочипов и гистограммы нормированных сигналов правого и левого столбцов ячеек (обведены пунктирной линией), содержащих иммобилизованные праймеры, после проведения ПЦР с НК из клеток *E. coli* (б); *B. thuringiensis* (в); *E. coli*, инфицированных фагом λ (г); *E. coli*, инфицированных фагом MS2 (д). Фоновое значение сигнала I_{ref} показано на гистограммах сплошной линией.

гидролизует белки, расщепляя пептидные связи, быстро инактивирует экзонуклеазы, а хаотропный агент способствует разрушению мембран и капсидных оболочек, в основном, за счет разрушения водородных связей и ослабления гидрофобных взаимодействий (солубилизации водонерастворимых молекул). Кроме того, присутствие хаотропного агента в высокой концентрации является необходимым условием сорбции НК на силикагелевых носителях на последующем этапе выделения и очистки.

Условия проведения двухстадийного лизиса были отработаны при проведении экспериментов с клетками *E. coli* и *B. thuringiensis*, а также с клетками *E. coli*, инфицированными бактериофагами MS2 или λ . Первую стадию лизиса проводили при 37°C – температуре, оптимальной для действия лизоцима, на второй стадии температуру повышали до 60°, чтобы избежать выпадения кристаллов гуанидингидрохлорида из раствора. Таким образом, быстрое и эффективное разрушение клеточных мембран и оболочек вирусов достигалось при проведении лизиса в следующих условиях:

– первая стадия – инкубация образца в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА и 50 мг/мл лизоцима, pH 8.0, в течение 10 мин при 37°C и перемешивании;

– вторая стадия – инкубация образца в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, 4.5 М гуанидингидрохлорида, 1 мг/мл протеиназы К, 0.5% *N*-лаурилсаркозината натрия, pH 6.5, в течение 10 мин при 60°C и перемешивании.

Для получения высокоочищенного препарата НК был выбран метод экстракции НК на твердофазном сорбенте. Твердофазная экстракция НК является предпочтительным методом, так как, помимо простоты и скорости выполнения, данная процедура легко адаптируется в формат микрофлюидной системы. Для проведения сорбции нами были испытаны стекловолоконистые фильтры серии GF и силикагель G-60 (данные не представлены). В экспериментах использовали лизаты бактериальных клеток и/или фаговых частиц, полученные после описанной выше процедуры двухстадийного лизиса.

Эффективная экстракция как ДНК, так и РНК на твердофазном носителе достигалась только в присутствии этанола в сорбционном буферном растворе. В отсутствие этанола происходила сорбция и последующая элюция только ДНК (но не РНК). Концентрация этанола 30 об. % оказалась оптимальной для эффективного выделения и очистки ДНК и РНК из лизата на данных носителях.

Из всех исследуемых сорбентов наиболее подходящим оказался силикагель G-60, позволяющий количественно сорбировать и десорбировать с микроколоники 10^3 и более геном-эквивалентов ДНК и РНК. Для удаления соединений, неспецифически связавшихся с сорбентом, колонку с силикагелем и сорбированными на нем НК последовательно промывали смесью буфера, содержащего 0.15 М трис-НСl, 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорид, рН 8.0, с этанолом (до 50%) и далее – 80%-ным этанолом. При такой промывке нерастворимые в этаноле нуклеиновые кислоты оставались связанными с сорбентом. Элюцию нуклеиновых кислот проводили низкосолевым буфером (ТЕ-буфер) или водой. Процедура селективной экстракции НК в колонке с силикагелем занимала не более 10 мин.

Таким образом, для выделения и очистки НК бактериальных клеток и/или фаговых (вирусных) частиц была разработана унифицированная процедура, включающая двухстадийный лизис с последующей твердофазной сорбцией–десорбцией НК на колонке, содержащей силикагель.

Хранение реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот внутри микрофлюидного модуля. Общей проблемой для всех разработчиков микрофлюидных систем, в которых происходят химические и биохимические реакции и растворение реагентов и реакционных смесей, является хранение реагентов внутри устройств [23, 24]. Данная проблема была решена нами следующим образом. Необходимые для обработки образца растворы, которые помещают в резервуары модуля, содержат ферменты для проведения лизиса (лизоцим и протеиназа К), буферы для лизиса и промывки с высокой концентрацией хаотропного агента (гуанидингидрохлорид в концентрации 3 М и выше). Для того, чтобы избежать потери активности ферментов, готовые к работе модули с реагентами должны храниться при температуре не выше 10°C , однако при этих условиях происходит кристаллизация хаотропного агента. Чтобы исключить инактивацию ферментов и кристаллизацию солей нами предложено хранить реагенты для приготовления лизирующих буферов и промывочного буфера в виде лиофилизованных смесей. Таким образом, в одних резервуарах микрофлюидного модуля содержатся сухие реагенты, а в других – их растворители – водно-спиртовые смеси, которые также можно хранить в течение длительного времени. Растворение сухих смесей происходит в ходе процедуры выделения и очистки. Растворение лиофилизованных компонентов 1-го лизирующего буфера, содержащего лизоцим, происходит при введении жидкого биологического образца в соответствующий резервуар, а растворителем компонентов 2-го лизирующего буфера, содержащего гуанидингидрохлорид, протеиназу К и *N*-лаурилсаркозинат натрия, является реакционная смесь после прохождения первой стадии лизиса. Использование буферов в виде сухих реакционных смесей в составе микрофлюидного модуля позволяет осуществлять его хранение при температуре от $+4$ до $+8^{\circ}\text{C}$ в течение

не менее 6 мес без снижения активности какого-либо реакционного компонента.

Сменный микрофлюидный модуль для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. Принципиальная схема и фотография модуля, который содержит резервуары со всеми необходимыми реагентами для лизиса клеток, микроорганизмов и вирусных частиц, очистки и элюции нуклеиновых кислот, микроканалы и клапаны, приведены на рис. 1.

Микрофлюидный модуль состоит из нескольких конструктивных элементов (рис. 2). Резервуары для хранения реакционных смесей и растворителей, обработки образца, микроколоники и каналы сформированы внутри основной рабочей платформы. Модуль закрывается верхней и нижней крышками (панелями) через эластичные прокладки. На верхней панели расположены 16 отверстий для штоков соле-ноидов, отверстие для приемной камеры образца, семь отверстий для фиксирующих винтов (рис. 2). Линейные размеры модуля (длина \times ширина \times высота) составляли $94 \times 64 \times 40$ мм.

Перемещение реакционных смесей и реагентов в резервуарах модуля осуществлялось подачей давления в соответствующие резервуары с помощью компрессора по системе каналов и клапанов (клапаны а–к на рис. 1б), выполненных с использованием эластичных прокладок модуля. Необходимое избыточное давление составляло 1.5–2.0 атм. Открытие и закрытие клапанов, регулирующих перемещение реакционных смесей и реагентов в каналах и резервуарах модуля, подача давления в резервуары модуля, нагревание и перемешивание реакционных смесей происходило с помощью устройств, входящих в состав блока управления.

Модуль рассчитан на обработку 100–500 мкл биологического образца. Процедура выделения и очистки нуклеиновых кислот внутри микрофлюидного модуля состояла из следующих этапов:

Первая стадия лизиса. Биологический образец помещали в приемную камеру 1 с помощью пипетки или любого дозирующего устройства. При открытии клапана (остальные клапаны закрыты) образец поступал в резервуар 2, содержащий лиофилизованные компоненты 1 лизирующего буфера. В резервуаре 2 одновременно происходило растворение компонентов реакционной смеси 1-го лизирующего буфера и первая стадия лизиса, причем растворителем для сухой смеси буфера являлся сам жидкий биологический образец. Первая стадия лизиса проводилась при интенсивном перемешивании и нагревании до 37°C в течение 10 мин.

Вторая стадия лизиса. Через открытый клапан б (остальные клапаны закрыты) реакционная смесь после первой стадии лизиса поступала в резервуар 3, содержащий лиофилизованную смесь 2-го лизирующего буфера. Растворение сухой смеси 2-го лизирующего буфера и вторая стадия лизиса происходили одновременно, а растворителем для сухой смеси являлась реакционная смесь после первой стадии лизиса. Вторая стадия лизиса проводилась также

при интенсивном перемешивании и нагревании до 60°C в течение 10 мин.

Подготовка промывочного буфера. Одновременно с проведением второй стадии лизиса водно-спиртовая смесь из резервуара 6 поступала в резервуар 5, содержащий сухую реакционную смесь буфера для промывки твердофазного сорбента (клапан e открыт, клапан f закрыт). Растворение сухой смеси буфера проводилось при интенсивном перемешивании.

Создание оптимальных условий связывания нуклеиновых кислот с твердофазным сорбентом. В резервуар 3 с лизатом биологического образца после второй стадии лизиса добавляли этанол из резервуара 4 до концентрации 30 об. % (клапан c открыт, остальные клапаны закрыты).

Сорбция нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте. Реакционная смесь из резервуара 3 поступала на микроколону 8 с силикагелем G-60. Нуклеиновые кислоты сорбировались на силикагеле, а вещества, не связанные с сорбентом, удалялись в резервуар для сбора отходов II (клапаны d и k открыты, остальные закрыты).

Отмывка твердофазного сорбента. На микроколону 8 подавался промывочный буфер из резервуара 5 и затем 80%-ный этанол из резервуара 7. Растворы после промывки поступали в резервуар для сбора отходов II (открывались клапаны f, k и клапаны g, k соответственно).

Элюция нуклеиновых кислот с микроколони. Нуклеиновые кислоты элюировали с твердофазного сорбента пропуская раствор для элюции (вода или низкосолевого ТЕ-буфер) из резервуара 9 (клапаны i, j открыты, остальные закрыты). Очищенный препарат поступал в резервуар для сбора продукта 10. Выходной порт модуля совместим со стандартной микропробиркой объемом 0.2 мл, которую можно использовать для проведения ПЦР. Весь процесс выделения и очистки с момента введения образца занимал не более 40 мин.

Устройство для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Устройство для выделения и очистки нуклеиновых кислот в автоматическом режиме включает микрофлюидный модуль и блок управления (рис. 3). Микрофлюидный модуль содержит только резервуары с реагентами и клапаны для коммутации газожидкостных потоков, в то время как все необходимые управляющие устройства, осуществляющие подачу давления, перемещение реакционных смесей и реагентов в резервуарах модуля, нагрев и перемешивание, размещены в блоке управления. Для перемешивания растворов в резервуарах модуля, где это необходимо, в основании резервуаров имеются ниши для магнитных мешалников (стальные стержни в тефлоновой оболочке).

Готовый к работе модуль устанавливают в блок управления. Биологический образец помещают в приемную камеру модуля и далее все стадии лизиса клеток, микроорганизмов и вирусных частиц, очистки и элюции нуклеиновых кислот осуществляются последовательно в резервуарах модуля, изолированных от внешней среды. Процесс обработки

биологического образца с использованием данного устройства управляется компьютером с соответствующим программным обеспечением.

Ввод сменного микрофлюидного модуля в блок управления происходит вдоль верхних и нижних направляющих салазок (рис. 3), которые обеспечивают его точное позиционирование. Коммутация воздушных и жидкостных потоков в модуле осуществляется 16 клапанами с электрическим управлением. После помещения модуля в блок управления и срабатывания запорного механизма модуль занимает положение, при котором штоки всех 16 соленоидов оказываются точно над соответствующими запорными головками клапанов модуля.

В качестве компрессора используется мембранный насос, способный создавать необходимое избыточное давление воздуха (1.5–2.0 атм). Нагревание резервуаров модуля, в которых происходит лизис и растворение сухих реакционных смесей буферов, осуществляется элементами Пельтье, расположенными под гнездом установки сменного модуля в блоке управления; там же установлены магнитные устройства для перемешивания растворов и реакционных смесей. Для общего управления элементами Пельтье, клапанами, перемешивающими устройствами и др. разработан единый микропроцессорный блок.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот в автоматическом режиме с использованием микрофлюидного модуля. Разработанное устройство на основе микрофлюидных модулей позволяет проводить в автоматическом режиме эффективное выделение как ДНК, так и РНК из бактерий и/или вирусных (фаговых) частиц (рис. 5). Количественную оценку автоматизированного выделения НК из разведений культур клеток в сравнении со стандартными методами проводили с использованием метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты амплификации фрагмента генома фага λ с ДНК фага в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E. coli*, инфицированных фагом (10^8 – 10^2 в 1 мл исходного образца) представлены на рис. 6. Концентрации препаратов ДНК, выделенных автоматизированным и стандартным методом из культур, содержащих 10^4 – 10^8 КОЕ/мл, отличались не более чем на 20%.

Воспроизводимость разработанной процедуры оценивали посредством внесения 0.1 мл культуры клеток *E. coli* (10^8 КОЕ/мл) в приемную камеру модуля и проведением выделения НК в автоматическом режиме. Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически. Выделение проводили последовательно с использованием 20 модулей из одного образца ночной культуры *E. coli*. Как свидетельствуют результаты, приведенные в таблице, разница в выходе и концентрации ДНК при выделении в микрофлюидном модуле не превысила 15%.

Препараты бактериальных и фаговых НК, выделенные с использованием разработанного устройства, были использованы в качестве матриц в мульт-

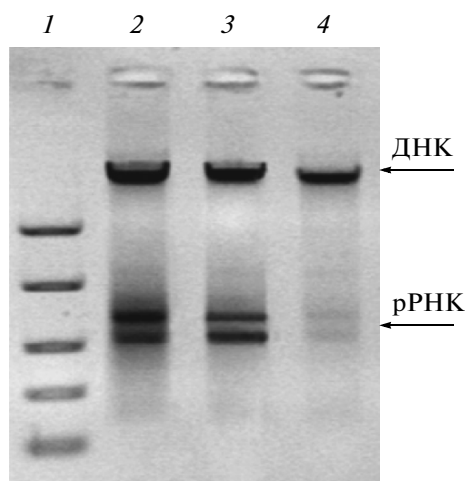


Рис. 5. Результаты выделения НК с использованием микрофлюидного модуля и стандартных методов выделения: 1 – молекулярный маркер “FastRuler Medium Range”; 2 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) с использованием микрофлюидного модуля; 3 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) стандартным методом лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией и переосаждением НК этанолом, 4 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) с помощью набора реагентов для выделения геномной ДНК “Genomic DNA Purification Kit”.

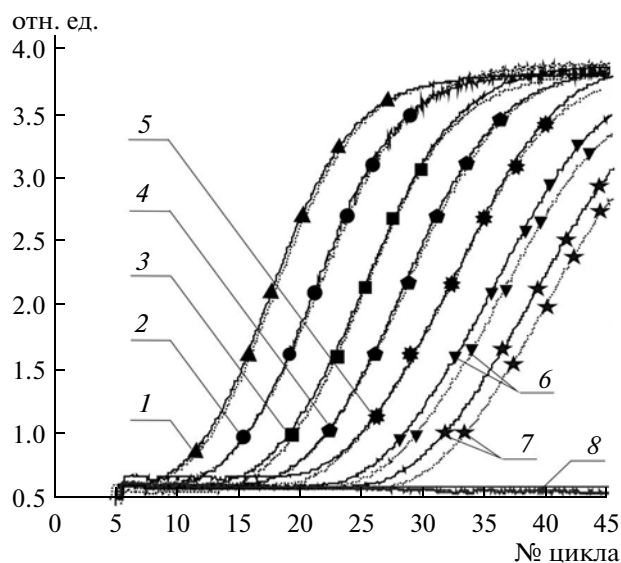


Рис. 6. Результаты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени с ДНК фага λ в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E. coli*, инфицированных фагом (10^8 – 10^2 в 1 мл исходного образца), с использованием стандартного метода выделения (сплошная линия) и микрофлюидных модулей (прерывистая точечная линия). Кривые получены при различных разведениях клеток: 1 – 10^8 , 2 – 10^7 , 3 – 10^6 , 4 – 10^5 , 5 – 10^4 , 6 – 10^3 , 7 – 10^2 кл./мл, 8 – отрицательный контроль реакции.

типлексной ПЦР на специализированном биочипе (рис. 4б–4д). Положительный сигнал амплификации в ячейке микрочипа, обусловленный формированием совершенных гибридных дуплексов между вновь образованным в результате амплификации продуктом, фланкированным свободным праймером из раствора, и достроенным специфичным иммобилизованным праймером, регистрировали за счет флуоресценции красителя SYBR Green I, связывающегося с двуцепочечной ДНК. Интенсивность флуоресцентного сигнала в ячейках с иммобилизованными праймерами, неспецифичными к последовательности анализируемой ДНК, во всех проведенных экспериментах превышала среднее фоновое значение I_{ref} не более, чем на 20%. В то же время в ячейках, содержащих специфические и, следовательно, достроенные праймеры, во всех экспериментах регистрировали достоверные, т.е. превышающие I_{ref} не менее, чем в 2.0 раза, сигналы, что позволило однозначно идентифицировать все анализируемые микроорганизмы и фаги.

Сконструированное устройство на основе микрофлюидного модуля позволяет проводить быстрое (до 40 мин) выделение нуклеиновых кислот из клеток микроорганизмов и/или вирусов в автоматическом режиме с низкими потерями. Процедура выделения и очистки осуществляется внутри картриджа, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму риск заражения персонала. Полученные препараты НК могут быть использованы в ампли-

фикации или гибридизации на биочипах для непосредственной идентификации инфекционного агента в исследуемом образце или для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Объединение в микрофлюидном модуле методик автоматизированного выделения НК и амплификации на гидрогелевых биочипах с детекцией в режиме реального времени приведет к созданию диагностического комплекса в формате “лаборатория-на-чипе”, в котором в единой целостной процедуре реализованы все стадии обработки биологического образца и многопараметрического генетического анализа с целью идентификации, количественного определения, обнаружения лекарственной устойчи-

Результаты автоматизированного выделения ДНК *E. coli* (10^8 КОЕ/мл, исходный объем образца – 0.1 мл) в микрофлюидных модулях (всего – 20 модулей)

Параметр	Выход ДНК, мкг	Объем элюирующего буфера, мкл	Концентрация, нг/мкл	$D_{260/280}$
Максимальное значение	5.5	97	77	1.85
Минимальное значение	4.9	81	65	1.78
Среднее значение	5.2	86	69	1.82
Стандартное отклонение	0.4	5	4	0.01

ности, оценки вирулентности различных биологических объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта с Министерством образования и науки РФ № 02.522.11.2019 и Программы Министерства энергетики США (IPP Grant Assistance Program), проект № RUS2-11036-МО-04.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Protocol Online: DNA Extraction & Purification: http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA/DNA_Extraction_Purification/index.html.
2. Sambrook J., Russel D.W. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. V. 1. Ch. 1, 2, 6, 7.
3. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. // *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed. Chichester: Wiley and Sons, 2002. 1512 p.
4. Tan S.C., Yiap B.C. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. 2009: 574398.
5. Wolfe K.A., Breadmore M.C., Ferrance J.P., Power M.E., Conroy J.F., Norris P.M., Landers J.P. // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 727–733.
6. Wu Q., Bienvenue J.M., Hassan B.J., Kwok Y.C., Giordano B.C., Norris P.M., Landers J.P., Ferrance J.P. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 5704–5710.
7. Bencina M., Podgornik A., Strancar A. // *J. Sep. Sci.* 2004. V. 27. P. 801–810.
8. Wen J., Legendre L.A., Bienvenue J.M., Landers J.P. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6472–6479.
9. Berensmeier S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. P. 495–504.
10. Siddiqui H., Nederbragt A.J., Jakobsen K.S. // *Clin. Biochem.* 2009. V. 42. P. 1128–1135.
11. Gijis M.A., Lacharme F., Lehmann U. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 1518–1563.
12. Huska D., Hubalek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnkova L., Havel L., Kizek R. // *Talanta*. 2009. V. 79. P. 402–411.
13. Whitesides G.M. // *Nature*. 2006. V. 442. P. 368–373.
14. Haeberle S., Zengerle R. // *Lab. Chip*. 2007. V. 7. P. 1094–1110.
15. Mark D., Haeberle S., Roth G., von Stetten F., Zengerle R. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 1153–1182.
16. Madou M., Zoval J., Jia G., Kido H., Kim J., Kim N. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006. V. 8. P. 601–628.
17. Mahalanabis M., Do J., Al-Muayad H., Zhang J.Y., Klapperich C.M. // *Biomed. Microdevices*. 2010. V. 12. P. 353–359.
18. Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. // *Lab. Chip*. 2006. V. 6. P. 886–895.
19. Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M.R., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N.T., Jones-Lopez E.C., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R.D., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M.D., Persing D.H., Alland D. // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. P. 229–237.
20. Dundas N., Leos N.K., Mitui M., Revell P., Rogers B.B. // *J. Mol. Diagn.* 2008. V. 10. P. 311–316.
21. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106.
22. Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. // *Biotechniques*. 2008. V. 44. P. 241–248.
23. Yobas L., Cheow L.F., Tang K.C., Yong S.E., Ong E.K., Wong L., Teo W.C., Ji H., Rafeah S., Yu C. // *Biomed. Microdevices*. 2009. V. 11. P. 1279–1288.
24. Hoffmann J., Mark D., Lutz S., Zengerle R., von Stetten F. // *Lab. Chip*. 2010. V. 10. P. 1480–1484.

Method for Automated Extraction and Purification of Nucleic Acids and Its Implementation in Microfluidic System

D. D. Mamaev, D. A. Khodakov, E. I. Dement'eva, I. V. Filatov, D. A. Yurasov,
A. I. Cherepanov, V. A. Vasiliskov, O. V. Smoldovskaya, D. V. Zimenkov,
D. A. Gryadunov, V. M. Mikhailovich, and A. S. Zasedatelev

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

e-mail: grad@biochip.ru

Received June 5, 2010

Abstract—A method and a microfluidic device for automated extraction and purification of nucleic acids from biological samples have been developed. The method involves disruption of bacterial cells and/or viral particles by combining enzymatic and chemical lysis procedures followed by solid-phase sorbent extraction and purification of nucleic acids. The procedure is carried out in an automated mode in a microfluidic module isolated from the outside environment, which minimizes contact of the researcher with potentially infectious samples and, consequently, decreases the risk of laboratory-acquired infections. The module includes reservoirs with lyophilized components for lysis and washing buffers; a microcolumn with a solid-phase sorbent; reservoirs containing water, ethanol, and water-ethanol buffer solutions for dissolving freeze-dried buffer components, rinsing the microcolumn, and eluting of nucleic acids; and microchannels and valves needed for directing fluids inside the module. The microfluidic module is placed into the control unit that delivers pressure, heats, mixes reagents, and flows solutions within the microfluidic module. The microfluidic system performs extraction and purification of nucleic acids with high efficiency in 40 min, and nucleic acids extracted can be directly used in PCR reaction and microarray assays.