

УДК 543.42;543.94;543.545;57.08

МИКРОЧИПОВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В МИКРОРЕАКТОРАХ РЕАКТИВАМИ

© 2011 г. Д. В. Наволоцкий*, **, А. В. Перчик*, И. А. Маркьянов**,
А. А. Ганев*, **, М. Н. Сляднев*, **

*Группа компаний “Люмэкс”, Санкт-Петербург, Россия, 192029

**Научно-исследовательский институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия, 192029

e-mail: perec@lumex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Разработана и оптимизирована микрочиповая аналитическая система, использующая кремниевый чип с иммобилизованными в микрореакторах тест-системами для мультиплексного анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Предложена методика иммобилизации ПЦР-компонентов тест-системы, выбран стабилизатор и проведена оптимизация состава реакционной смеси для достижения долговременной стабильности микрочипа. Проведена оптимизация подготовки проб с использованием магнитного сорбента и показано, что при содержании целевой ДНК в пробе 2.6×10^4 копий/мл для получения положительной идентификации требуется 60 мин, включая время, затраченное на пробоподготовку модельных проб. Продемонстрированы возможности созданной системы на примере анализа в микрочипе проб с различным содержанием ДНК, достигнуты низкие абсолютные пределы обнаружения (20 копий ДНК в микрореакторе) и высокая воспроизводимость анализа.

При разработке современных методов биоаналитической химии и медицинской диагностики постоянно ставятся задачи анализа новых объектов и определения новых соединений. Одновременно растут требования к производительности, чувствительности, селективности и быстрдействию аналитических систем. В настоящее время внимание исследователей обращено на разработку и применение микрочиповых технологий, которые позволяют создавать миниатюрные и портативные анализаторы, реализовать экспрессный и полностью автоматизированный анализ [1–3].

Существующие методы анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются длительными из-за низких скоростей нагрева и охлаждения при термоциклировании, дорогостоящими из-за высокой стоимости реактивов и сложными из-за большого числа операций, которые нужно осуществлять при проведении анализа и пробоподготовки [4]. Микрочиповые системы анализа методом ПЦР лишены этих недостатков, т.к. позволяют достичь высоких скоростей термоциклирования, увеличить быстрдействие анализа и снизить потребление реактивов [1–3].

Практически важной задачей является снижение количества операций при проведении анализа и требований к условиям хранения реактивов. Одним из вариантов решения этих задач является иммобили-

зация компонентов реакции на поверхности микрореакторов. Иммобилизация праймеров позволяет унифицировать приготовление реакционной смеси, если требуется проводить анализ одной пробы на наличие нескольких генов. В работе [4] в микрореакторах чипа были иммобилизованы различные праймеры для ПЦР, стабилизированные полиэтиленгликолем. Использование технологии лиофилизации позволяет иммобилизовать в микрореакторе полимеразу, наиболее требовательный к условиям хранения реактив. Таким образом, становится возможным хранение и транспортировка микрочипов с лиофилизированным ферментом при комнатной температуре (18–25°C) [5]. Для стабилизации ДНК-полимеразы и смеси четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов применяют желатин, бычий сывороточный альбумин, сульфат аммония или неионные детергенты (Тритон X-100, Твин 20) [5, 6]. Для сохранения активности ДНК-полимеразы предпочтительными являются полиолы, т.к. они являются не только стабилизаторами, но и седиментирующими агентами [6].

Таким образом, создание микрочиповой аналитической системы с иммобилизованными олигонуклеотидами и ферментами позволит объединить такие значимые преимущества, как высокая скорость анализа, свойственная микрочиповым системам, а также надежность и простота работы, свойственная классическим методикам.

Цель работы – разработка микрочиповой аналитической системы для проведения мультиплексного анализа ДНК (проведение нескольких реакций в одном микрореакторе) методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием микрочипа, содержащего иммобилизованные в микрореакторах компоненты реакционной смеси.

МЕТОДИКА

Экспериментальные установки и топология микрочипа. Использовали микрочип, изготовленный из пластин кремния толщиной 600 мкм и содержащий 16 микрореакторов размером $2 \times 2 \times 0.4$ мм с объемом 2 мкл. Микрочип был изготовлен аналогично технологии, описанной в работах [7, 8], микрореакторы были изготовлены по технологии жидкостного анизотропного травления [9] с последующим нанесением слоя оксида кремния толщиной 150 ± 20 нм.

Экспериментальная установка, состоящая из системы термоциклирования на основе элемента Пельтье и системы флуоресцентного детектирования на основе ПЗС-матрицы, аналогична ранее описанной [8] с несколькими дополнениями. Для оценки температуры внутри микрореакторов использовали ARX-модель [10], которая позволяет повысить точность управления температурой в микрореакторах. Система флуоресцентного детектирования позволяет регистрировать красители в двух спектральных диапазонах: канал 1 – 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), канал 2 – 6-карбоксихлорофлуоресцеин (HEX).

Обработку результатов ПЦР-РВ проводили при помощи программного обеспечения, разработанного нами для управления установкой и проведения расчетов. Количественную оценку порогового цикла C_t из полученных кривых ПЦР-РВ проводили по алгоритму определения максимума второй производной [11, 12].

В экспериментальной установке для лиофилизации реагентов осуществляли замораживание реактивов с помощью двухстадийного элемента Пельтье (“Криотерм”, Россия) и их высушивание при пониженном давлении. Корпус установки был выполнен из стеклянной воронки, присоединенной к вакуумному насосу SD-40 (“Varian”, Франция), с помощью которого создавали пониженное давление в системе, контролируемое по показаниям вакуумметра (МЗМ, Россия). Температуру при лиофилизации измеряли при помощи универсального измерителя TP530 (ООО “Измерительные технологии СПб”, Россия) с платиновым термодатчиком, закрепленным на элементе Пельтье.

Альтернативным лиофилизации методом иммобилизации реактивов является высушивание при нормальных климатических условиях в эксикаторе, заполненном безводным хлоридом кальция.

Смесь реактивов для иммобилизации объемом 2 мкл вводилась в микрореакторы микрочипа, который, в зависимости от вида высушивания, помещался либо в экспериментальную установку для лиофильной сушки, либо в эксикатор.

Реактивы. Для оптимизации состава иммобилизуемых реактивов использовали тест-систему 35S (ЗАО “Синтол”, Россия), в которой контрольным образцом являлась плазида pUC-18 со вставкой целевого фрагмента длиной 130 пар нуклеотидов. Приготовление реакционной смеси производили в ламинарном ПЦР-боксе (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия) по протоколу, рекомендуемому производителем. Общий объем приготавливаемой реакционной смеси составлял 50 мкл и содержал: 28 мкл деионизированной воды, 5 мкл $10 \times$ ПЦР-буфера Б, 5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 5 мкл дНТФ (2.5 мМ), 2 мкл смеси двух праймеров 35S (6.5 пкмоль/мкл каждого), 1 мкл зонда 35S (5 пкмоль/мкл), 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 3 мкл образца ДНК. Объем реакционной смеси, вносимый в каждый микрореактор, составлял 2 мкл.

При проведении оптимизации состава иммобилизованных реактивов использовали режим амплификации, рекомендуемый производителем тест-системы: прогрев 300 с при $95^\circ C$, а затем 45 циклов: $95^\circ C$ – 15 с, $61^\circ C$ – 30 с.

В качестве мультиплексной ПЦР тест-системы при анализе реальных объектов был использован набор реактивов “Фланк-ген” (НПФ “ДНК-Технология”, Россия) в составе и объемах, рекомендованных производителем, с измененным режимом амплификации: прогрев 90 с при $94^\circ C$, а затем 45 циклов: $94^\circ C$ – 1 с, $64^\circ C$ – 15 с.

Для лиофилизации реактивов в микрочипе в качестве стабилизатора использовались: глюкоза, сорбит, сахароза, маннит, гидроксиэтилцеллюлоза (“Fluka Bio Chemika”, Швейцария) и инулин (“Sigma”, США). Исходный раствор стабилизатора с концентрацией 172.4 мМ готовили растворением навески полиола в дистиллированной воде. Растворы хранили при $+4^\circ C$. Для проведения экспериментов использовали растворы с концентрацией 25, 35, 50, 75, 100 мМ, которые готовили разбавлением исходного раствора дистиллированной водой.

Ллиофилизация реактивов проводилась в экспериментальной установке при $35^\circ C$ и давлении 1.33×10^{-2} Па. При лиофилизации использовали реактивы тест-системы 35S, с добавлением раствора стабилизатора. Далее микрочип помещали в экспериментальную установку и инкубировали 1.5 ч. Для проведения ПЦР в каждый микрореактор с иммобилизованными реактивами добавляли по 2 мкл образца ДНК.

Выделение и очистку ДНК из зерен кукурузы проводили на основе набора реагентов для выделения ДНК “Magnetic DNA Prep 100” (“Компания Биоком”, Россия). В состав лизирующего раствора

было добавлено 5 мл 10%-ного раствора поливинилпирролидона ("Acros organic", США). Кроме того, в качестве дополнительного отмывочного раствора был введен ацетон ("НеваРеактив", Россия), а раствор ЭкстраГен™Е был заменен на элюирующий раствор (TE-буфер), содержащий 1 мМ трис-HCl и 0.1 мМ динатриевой соли ЭДТА ("Компания Хеликон", Россия), pH 8.0.

Методика выделения ДНК была оптимизирована по времени проведения отдельных стадий и скорректирована для расширения круга анализируемых объектов. Навеску пробы (размолотые кукурузные зерна) массой 25 мг вносили в лизирующий раствор и выдерживали при 80°C 5 мин. После нагрева пробу центрифугировали при 2500 g 30 с и супернатант добавляли в суспензию сорбента. Проводили сорбцию ДНК на магнитном сорбенте, супернатант удаляли и сорбент дважды промывали 1 мл раствора солевого буфера, а затем ацетоном. После удаления супернатанта осадок высушивали при комнатной температуре в течение 3 мин. Затем к высушенному осадку добавляли 50 мкл элюирующего раствора, инкубировали 10 мин при 80°C, периодически встряхивая. Далее супернатант переносили в микропробирку для последующего анализа методом ПЦР.

Для высушивания пробы в микрореакторах микрочипа 2 мкл пробы помещали в каждый микрореактор. Далее микрочип выдерживали при 80°C 3 мин до полного испарения жидкости в микрореакторах. При проведении ПЦР в каждый микрореактор с высушенной пробой добавляли реакционную смесь ПЦР-РВ однократной концентрации в объеме 2 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация состава реактивов для иммобилизованной тест-системы. При выборе оптимального стабилизатора на первом этапе критерием оценки являлся внешний вид иммобилизованной в микрореакторе смеси с содержанием различных стабилизаторов концентрацией 35 мМ. Высушенная смесь должна надежно удерживаться в микрореакторе и не должна образовывать кристаллический осадок. По окончании лиофилизации смесь, содержащая гидроксипропилцеллюлозу, образовывала белую рыхлую массу; содержащая инулин — плотную кристаллическую; а содержащая сахарозу — кристаллическую пористую. Смеси с остальными стабилизаторами образовывали прозрачные стекловидные массы. Внешний вид реактивов, высушенных на воздухе, был аналогичен лиофилизированным.

Сохранение свойств иммобилизованных реактивов определялось на основе сопоставления величин пороговых циклов (C_t), полученных при проведении ПЦР с растворами этих реактивов. Результаты ПЦР-анализа раствора, содержащего 10^6 копий ДНК/мкл, для иммобилизованных тест-систем с рядом полиолов воспроизводимы (при лиофильной

сушке: маннитол — 23.9 ± 0.6 ; трегалоза — 23.4 ± 0.5 ; сорбитол — 22.8 ± 0.9 ; глюкоза — 23.8 ± 0.1 ; при сушке на воздухе: маннитол — 24.8 ± 0.2 ; трегалоза — 24.0 ± 0.4 ; сорбитол — 24.9 ± 0.8 ; глюкоза — 24.0 ± 0.5) и согласуются с C_t растворов без стабилизаторов 23.8 ± 0.4 . Отметим, что значения пороговых циклов для ПЦР-кривых от лиофильно высушенных реактивов (23.7 ± 0.3) были меньше, чем для высушенных на воздухе (24.4 ± 0.2).

В дальнейших экспериментах использовали смеси, в состав которых входили сорбит, глюкоза, маннит и трегалоза, т.к. для них была получена наибольшая эффективность ПЦР, и, кроме того, при высушивании они образовывали стекловидную массу, которая прочно удерживалась на поверхности микрореактора.

При хранении микрочипов с иммобилизованными реактивами, содержащими все компоненты реакционной смеси, при 25°C наблюдалась полная потеря реакционной способности для всех использованных стабилизаторов уже через 21 сут, что может быть связано с деградацией ДНК-полимеразы. Присутствующие в высушиваемой смеси ионы Mg^{2+} и компоненты буфера могли приводить к протеканию неспецифических реакций в процессе высушивания или хранения [5, 6].

Для оптимизации состава иммобилизуемых реактивов проводили ряд экспериментов с использованием для иммобилизации смеси, из состава которых убрали а) хлорид магния, б) ДНК-полимеразу, в) буферный раствор и хлорид магния. Недостающие компоненты затем добавлялись вместе с раствором пробы. Потеря реакционной активности наблюдалась во всех иммобилизуемых смесях, в состав которых входили и буферный раствор и полимеразы. Иммобилизованные смеси, не содержащие в своем составе полимеразу, во время хранения при комнатной температуре сохраняли свои свойства в течение 36 сут при использовании в качестве стабилизатора глюкозы и трегалозы. Смеси, не содержащие в своем составе ионов магния и буферного раствора, сохраняли реакционную способность в течение 36 сут при использовании в качестве стабилизатора сорбита, трегалозы и маннита. При этом наблюдалось снижение реакционной способности иммобилизованных компонентов смеси, содержащих в качестве стабилизатора глюкозу.

Таким образом, в результате экспериментов был определен состав иммобилизованных реактивов и выбраны стабилизаторы. Иммобилизация праймеров привела к унификации приготовления растворов при определении нескольких генов, что позволило значительно снизить вероятность ошибки оператора, а иммобилизация полимеразы позволила избежать особых условий хранения.

Оценка длительности хранения иммобилизованных реактивов. Оценка длительности хранения микрочипа с иммобилизованными реактивами прово-

Таблица 1. Величины пороговых циклов (Ct) в зависимости от времени хранения микрочипа с иммобилизованными реактивами и вида стабилизатора*

Стабилизатор, 100 мМ	Вид сушки	Пороговые циклы при времени хранения, ч			
		0	24	88	170
Глюкоза	воздушная	23.9	—	—	—
	лиофильная	23.9	—	—	—
Маннит	воздушная	23.2	24.0	28.1	28.5
	лиофильная	23.8	23.7	23.8	24.3
Сорбит	воздушная	24.1	24.0	24.2	23.6
	лиофильная	23.8	23.4	23.6	23.8
Трегалоза	воздушная	23.7	24.4	24.1	23.8
	лиофильная	23.4	23.9	25.0	23.6

* Знак “—” указывает на полную потерю реакционной активности иммобилизованных реактивов.

Таблица 2. Величины пороговых циклов (Ct) и коэффициента b в зависимости от концентрации стабилизатора*

Стабилизатор	Концентрация стабилизатора, мМ	Высушено лиофильно		Высушено на воздухе	
		Ct , ед.	b	Ct , ед.	b
Сорбит	25	24.7	7.05	—	—
	50	24.5	8.06	30.9	7.76
	75	24.8	8.17	29.8	7.51
	100	24.2	9.68	26.0	9.93
Трегалоза	25	24.2	8.74	24.7	7.54
	50	23.8	9.37	24.3	8.07
	75	24.1	9.89	24.5	7.61
	100	24.2	10.04	24.8	9.75

* Знак “—” указывает на потерю реакционной активности иммобилизованных реактивов.

дидась на основе данных по искусственному старению. Микрочип с иммобилизованными в микрореакторах реактивами выдерживали при 50°C в течение 24, 88 и 170 ч, что соответствует 4 мес хранения при 20°C [13].

Полученные данные представлены в табл. 1. Компоненты иммобилизованной смеси, где в качестве стабилизатора выступала глюкоза, теряли реакционную активность уже после 24 ч. Иммобилизованные смеси, содержащие маннит, сохраняли реакционную активность только при их лиофилизации, тогда как при высушивании на воздухе наблюдалась потеря активности после 88 ч. Наилучшими показателями обладали смеси, содержащие в качестве стабилизатора сорбит и трегалозу.

Оптимизация концентрации стабилизаторов. Для оптимизации концентрации стабилизатора в экспериментах использовали растворы полиолов с концентрацией 25, 50, 75, 100 мМ. Перед проведением ПЦР-РВ все микрочипы с иммобилизованными реактивами выдерживали при 50°C в течение 170 ч.

Полученные данные представлены в табл. 2. При использовании в качестве стабилизатора сорбита наблюдалось увеличение значений Ct по сравнению с жидкой реакционной смесью без стабилизатора. Значения Ct иммобилизованных смесей, содержащих трегалозу, при исследуемых концентрациях сравнимы с жидкой реакционной смесью без стабилизатора, при этом наибольшая эффективность ПЦР наблюдалась при концентрации трегалозы 50–100 мМ.

Все реактивы, высушенные на воздухе, достигали порогового цикла несколько позже, чем лиофилизированные смеси, что согласуется с данными, полученными в предыдущих экспериментах. Угол наклона ПЦР-кривых в экспоненциальной фазе реакции (значения b , табл. 2), полученных при анализе высушенных на воздухе реактивов, меньше по сравнению с лиофилизированными. Угол наклона ПЦР-кривых был оценен методом наименьших квадратов при приближении четырехпараметрической логистической функцией [12]. Увеличение угла наклона

свидетельствовало о большей эффективности амплификации [14].

Отметим, что лиофилизация требует использования специализированного оборудования, что снижает технологичность изготовления микрочипов с иммобилизованными реактивами, в то время как высушивание на воздухе позволяет упростить процесс производства микрочипов.

Для оценки аналитических характеристик микрочипа с иммобилизованными реактивами использовали высушенный на воздухе микрочип с оптимизированной тест-системой, содержащей все компоненты реакционной смеси, кроме ионов магния, и буферного раствора с концентрацией стабилизатора трегалозы 100 мМ. На рис. 1 представлена градуировочная зависимость, полученная при использовании изготовленного таким образом микрочипа.

Полученное значение эффективности реакции E составило 92%, что обеспечивает низкую относительную погрешность при определении ДНК, которая не превышала 12% по серии измерений проб с концентрацией ДНК в диапазоне $4 \times 10^2 - 4 \times 10^5$ копий/мкл.

Оптимизация методики пробоподготовки. Существует ряд методик выделения и очистки нуклеиновых кислот из различных образцов [11, 15–17]. Однако большинство существующих методов требует длительных стадий центрифугирования и громоздкой аппаратуры. Нами был выбран метод магнитной сепарации сорбента, основанный на использовании в качестве сорбента магнитных частиц, содержащих наночастицы оксида железа и обладающих суперпарамагнитными свойствами [18]. Метод привлекателен простотой исполнения и технологичностью, по сравнению с центрифугированием магнитная сепарация быстра и легка в применении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования, а также, может быть эффективно автоматизирована [19].

В методику пробоподготовки, рекомендованную производителем, были внесены некоторые изменения. Из-за высокого отношения объема вводимой пробы к общему объему реакционной смеси возрастают требования к чистоте выделяемой ДНК. Для устранения влияния гуминовых кислот, содержащихся в почве и зерне, потребовалось добавление 5 мг поливинилпирролидона [20, 21]. Более качественное выделение и очистка ДНК позволяют расширить область применения данной методики для выделения ДНК микроорганизмов из объектов окружающей среды [22, 23]. Введение ацетона позволило сохранить дисперсность сорбента после стадий отмывок и тем самым увеличить эффективность элюции ДНК.

Эффективность выделения ДНК была оценена путем сравнения значений Ct раствора положительного контроля, соответствующего концентрации 10 копий ДНК/мкл, и такого же раствора, прошедшего пробоподготовку. Так как при пробоподготов-

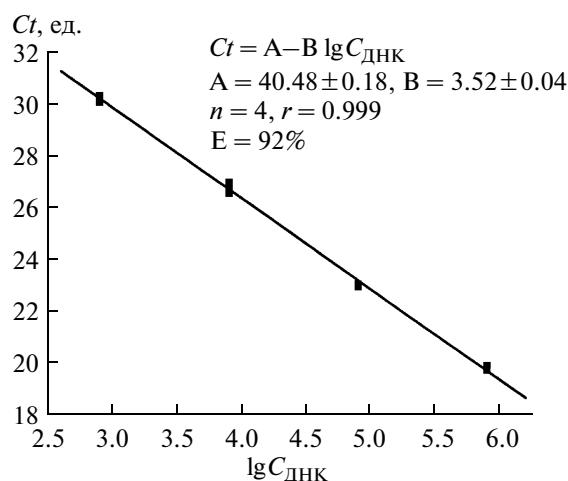


Рис. 1. Градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР в микрочипе с высушенной оптимизированной тест-системой.

ке происходит 20-кратное уменьшение объема раствора пробы, то при 100%-ной эффективности выделения ДНК это привело бы к различию пороговых циклов ПЦР-кривых от этих проб на 4.3 цикла. Однако на практике разница значений составила 3.5 цикла, что говорит о достижении не менее 56% выделения ДНК. Подобная полнота выделения для низких содержаний ДНК может быть оценена как достаточная для большинства практических приложений при анализе генетически модифицированных организмов (ГМО) [24].

Предложенная методика пробоподготовки позволила провести выделение ДНК и очистку нескольких проб от примесей за 40 мин, что сопоставимо с временем проведения ПЦР-РВ в микрочиповой аналитической системе и не лимитирует постановку анализа в лаборатории в течение дня. При использовании ускоренного режима амплификации в микрочиповой аналитической системе на проведение 45 циклов затрачивается 20 мин. Таким образом, общее время, затраченное на пробоподготовку и ПЦР-анализ полученных проб при использовании иммобилизованных в микрореакторах реактивов, не превышало 60 мин, что хорошо коррелирует со временем анализа для подобных микрочиповых систем с объемом микрореактора 2–4 мкл [25, 26], и значительно быстрее, чем при использовании коммерческих ПЦР-анализаторов.

В связи с непрактичностью приготовления реакционных смесей объемом 2 мкл нами предложено два варианта проведения анализа. При использовании микрочипов с иммобилизованными реактивами в анализируемую пробу добавляли недостающие компоненты, буферный раствор и раствор хлорида магния. Далее эта проба вводилась в микрореактор. Если необходимо проводить определение в пробе содержания нескольких генов, то проба вводится в

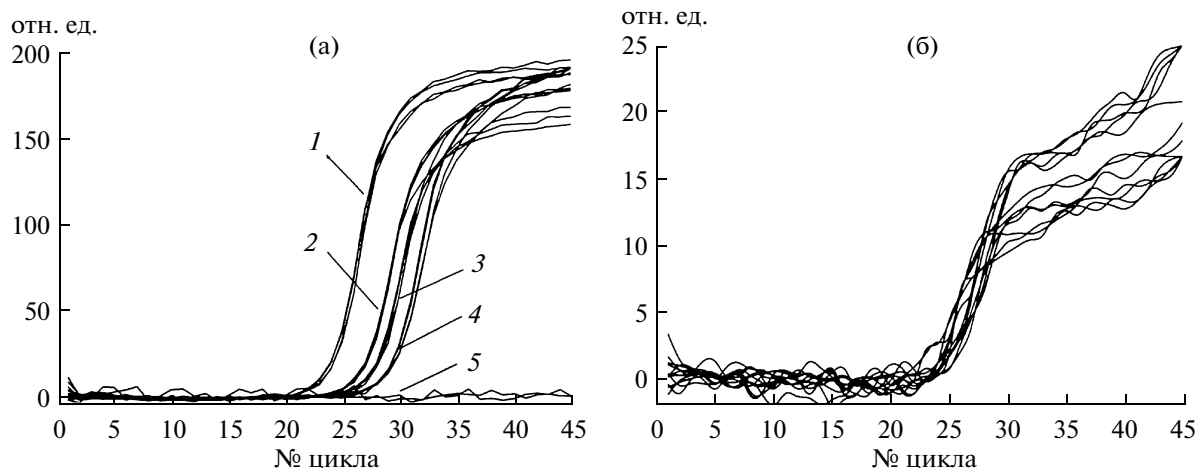


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции (отн. ед.) номера цикла в каналах FAM (а), HEX (б). ПЦР-анализ растворов после пробоподготовки с положительным контрольным образцом тест-системы “Фланк-ген” с концентрацией: 1 – 10^6 ; 2 – 1.6×10^5 ; 3 – 6.4×10^4 ; 4 – 2.6×10^4 копий ДНК в 1 мл; 5 – отрицательный контроль.

несколько микрореакторов, в которых иммобилизованы соответствующие праймеры. Если же число анализируемых проб больше, чем число интересующих генов, то нами рекомендуется использовать микрочипы без иммобилизованных реактивов. В этом случае анализируемые пробы после пробоподготовки высушивают в микрореакторе при 80°C , а затем в микрореактор добавляют все компоненты реакционной смеси. Таким образом, при анализе можно использовать заранее приготовленные реакционные смеси на интересующий ген и расходовать их по мере необходимости.

Для оценки аналитических характеристик оптимизированной методики пробоподготовки и микрочиповой аналитической системы ПЦР-РВ готовили серию последовательных разбавлений до получения

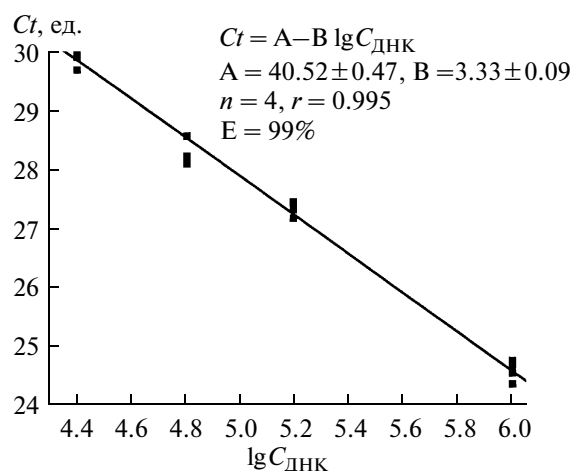


Рис. 3. Градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР в микрочипе после пробоподготовки с серией последовательных разбавлений.

растворов с концентрациями 1×10^6 , 1.6×10^5 , 6.4×10^4 , 2.6×10^4 копий ДНК/мл, которые проходили пробоподготовку и ПЦР-анализ. Концентрацию растворов выбирали, исходя из того, что в 25 мг кукурузных зерен содержится 2.755 мкг ДНК [24], что соответствует 10^6 копий геномной ДНК [27]. При условии наличия в зернах 0.9% компонентов ГМО (предел содержания ГМО, выше которого необходима маркировка товаров) содержание ДНК в микрореакторах микрочипа будет составлять 180 копий ДНК, что достаточно для проведения ПЦР.

Полученные результаты приведены на рис. 2. На канале регистрации FAM наблюдался рост интенсивности флуоресценции красителя, соответствующего специфичному зонду для всех кривых, кроме отрицательного контрольного образца. На канале регистрации HEX наблюдался рост флуоресценции красителя зонда внутреннего контрольного образца, что свидетельствует об отсутствии ингибирования ПЦР в данных пробах и позволяет интерпретировать отрицательный результат на канале FAM как достоверный.

На рис. 3 представлена градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР-РВ анализа проб с различной концентрацией ДНК. Эффективность ПЦР близка к теоретическому пределу ($E = 99\%$), что свидетельствовало об отсутствии ингибирования в растворе пробы после проведения пробоподготовки, о высокой точности поддержания температуры в микрореакторах чипа системой термодетектирования, о качестве модификации поверхности микрореакторов и стабильности системы детектирования [28]. По оценке из градуировочной зависимости диапазон определяемых концентраций ДНК, содержащей искомый фрагмент гена ГМО, составил 3 порядка, а минимальное содержание ДНК в исходной пробе, приводящее к положитель-

ному детектированию, составило 10^3 копий ДНК в 1 мл, что соответствует 20 копиям ДНК в микрореакторе. Отметим, что высокая чувствительность и эффективность ПЦР получены при проведении мультиплексной ПЦР-РВ в условиях быстрого режима термоциклирования, т.е. при сокращении времени удержания на заданной температуре, что является демонстрацией преимуществ микрочиповой системы перед традиционным оборудованием.

В настоящей работе оптимизирована реакционная смесь для иммобилизации в микрореакторы микрочипа. Оптимальным составом обладает смесь, содержащая дНТФ, праймеры и ДНК-полимеразу в растворе стабилизатора. В результате было найдено, что для долговременного хранения при комнатной температуре можно использовать сорбит в концентрации 100 мМ при лиофилизации смеси или трегалозу в концентрации 25–100 мМ при лиофильной сушке и трегалозу в концентрации 100 мМ при сушке на воздухе.

Отметим, что сушка на воздухе экономически более выгодна и привлекательна для широкомасштабного производства микрочипов, т.к. не требует громоздкого оборудования для лиофилизации и больших энергетических затрат при высушивании. При анализе созданных иммобилизованных реактивов получена высокая эффективность ПЦР ($E = 92\%$).

Полученные аналитические характеристики метода при использовании иммобилизованных в микрореакторах тест-систем сравнимы с таковыми при использовании жидких реактивов ($E = 99\%$), что позволяет применять иммобилизованную тест-систему вместе с предлагаемой модификацией методики пробоподготовки и достичь высокой аналитической чувствительности обнаружения ДНК в исходных пробах. Кроме того, проведенная оптимизация методики пробоподготовки и высокое быстроедействие микрочиповой аналитической системы позволили сократить время полного ПЦР-анализа до 60 мин, что в среднем на 70 мин быстрее, чем для стандартного оборудования и методик. При использовании иммобилизованных в микрореакторах тест-систем достигнуто существенное (в 16 раз) сокращение расхода реактивов и снижение количества операций при приготовлении растворов.

Таким образом, разработанная микрочиповая аналитическая система мультиплексного ПЦР-анализа с иммобилизованными реактивами позволяет значительно сократить трудозатраты оператора и стоимость расходных материалов, а также увеличить скорость за счет использования микрочипа и надежность анализа за счет одновременного определения в каждом микрореакторе искомого участка ДНК и внутреннего контрольного образца (ВКО). Дальнейшие работы по развитию созданной микрочиповой системы должны быть сфокусированы на разработке микрочипов, содержащих иммобилизованные реактивы для нескольких целевых генов,

содержащихся в ГМО, и на их приложении к качественному и количественному анализу реальных образцов с высоким быстродействием и производительностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weigl B.H., Bardell R.L., Cabrera C.R. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2003. V. 55. P. 349–377.
2. Dittrich P.S., Tachikawa K., Manz A. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 3887.
3. Zhang C., Xing D. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4223–4237.
4. Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S.E., Horowitz D., Dixon J.M., Brennan C.J.H. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 18. P. 123.
5. Патент РФ. 2004. № 2259401 С1.
6. Патент США. 2000. № 6,153,412.
7. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Казаков В.А., Ганеев А.А. // *Журнал аналитической химии.* 2008. Т. 63. № 2. С. 210–217.
8. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А. // *Научное приборостроение.* 2007. Т. 17. № 3. С. 16–24.
9. Paul C.H.L. *Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and Discovery.* Chromatographic Science Series. V. 94. Boca Raton: CRC Press, 2006. 504 p.
10. Ljung L., Glad T. *Modeling of Dynamic Systems.* N.-Y.: PTR Prentice Hall, 1994. 361 p.
11. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.
12. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Michael W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. № 20. P. 122.
13. Seydack M. // *Springer Ser. Fluoresc.* 2008. V. 6. P. 401–428.
14. Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M. // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. P. 2053–2056.
15. McPherson M.J., Mooler S.G. *PCR.* Oxford: BIOS Scientific Publ. 2000. p. 276.
16. Sachse K., Frey J. // *Methods in Mol. Biol.* V. 216. Totowa, N.-Y.: Humana Press Inc, 2002. 324 p.
17. Pelt-Verkuil E., Belkum A., Hays J.P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.* Netherlands: Springer Sci., 2008. 323 p.
18. Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K.S., Homes E., Ugelstad J., Uhlen M. // *Clinical Microbiol. Rev.* 1994. V. 7. № 1. P. 43–54.
19. Berensmeier S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. P. 495–504
20. Gray J.P., Herwig R.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. № 11. P. 4049–4059.
21. LeBreton M., Morton P., Larade K., Harland B., Clair T., Campbell D. // *Hydrobiologia.* 2000. V. 438. № 1. P. 91–97.
22. Kuske C.R., Banton K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., Jackson P.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. № 7. P. 2463–2472.

23. Saikaly P.E., Barlaz M.A., Francis L. de los Reyes III // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 20. P. 6557–6565.
24. Trapmann S., Catalani P., Conneely P., Contreras M., Corbisier P., Ganschberg D., Gloria S., Linsinger T., Zeleny R., Schimmel K. The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of Bt-176 Maize. Luxembourg: Official Publ. Eur. Comm., 2004. 13 p.
25. Consolandi C., Severgnini M., Frosini A., Caramenti G., De Fazio M., Ferrara F., Zocco A., Fischetti A., Palmieri M., De Bellis G. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 353. № 2. P. 191–197.
26. Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. // *Lab Chip.* 2006. V. 6. P. 886–895.
27. Arumuganathan K., Earle E.D. // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1991. V. 9. P. 208–218.
28. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А. // *Научное приборостроение.* 2007. Т. 17. № 3. С. 25–30.

Microarray Analytic System for Multiplex Analysis by Real-time Polymerase Chain Reaction with Reagents Immobilized in Microreactors

D. V. Navolotskii^{a, b}, A. V. Perchik^a, I. A. Mark'yanov^b, A. A. Ganeev^{a, b}, and M. N. Slyadnev^{a, b}

^a Lumex Group of Companies, St. Petersburg, Russia 192029

^b St. Petersburg State University Institute of Chemistry, St. Petersburg, Russia, 192029

e-mail: perez@lumex.ru

Received May 12, 2010

Abstract—A microarray analytic system that uses a silicon chip with immobilized in microreactor test-system for multiplex analysis of DNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed and optimized. We suggested the method of immobilization of PCR-components of a test-system, chose the stabilizer, and conducted the optimization of the composition of reaction mixture to achieve permanent stability of a microarray. We conducted optimization of preparation of samples using magnetic sorbent and indicated that, with 2.6×10^4 copies/ml, 60 min are necessary to obtain positive identification including time for preparation of model probes. The abilities of the the created system were demonstrated on the example of microarray analysis of samples with different content of DNA, low absolute limits of identification (20 DNA copies in microreactor), and high reproducibility of the analysis.

Сдано в набор 26.10.2010 г.	Подписано к печати 11.01.2011 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 16.0	Уч.-изд. л. 16.0
	Тираж 137 экз.	Зак. 1130

Учредители: Российская академия наук,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Российская академия наук. Издатель "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6