

УДК 621.79.024

**ОБРАБОТКА ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛЯННЫХ МИКРОЧИПОВ
ПОСЛЕ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ****А.А. Евстапов, А.Н. Тупик**

В статье обсуждаются проблемы, возникающие при реализации полимеразной цепной реакции (ПЦР) на микрочипах. Приведены результаты, полученные при использовании хромовой смеси, 1 %-го раствора гипохлорита натрия, смеси концентрированной серной кислоты с перекисью водорода (3:1) и буферного раствора TE для обработки поверхности реакционной камеры после проведения ПЦР. Экспериментально подтверждено, что хромовая смесь и раствор гипохлорита натрия применимы для очистки поверхности стеклянного микрочипа.

Ключевые слова: микрочип, поверхность, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение

В современной практической медицине все большее внимание уделяется методам ДНК-диагностики, среди которых наиболее распространенным и известным является метод амплификации ДНК – полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР позволяет увеличить число копий определенных фрагментов ДНК в искусственных условиях, что значительно упрощает изучение генного материала. Применение ПЦР особенно эффективно при обнаружении трудно культивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов, анализе исходно малого количества генного материала, анализе особо опасных инфекций. ПЦР применяется в научных исследованиях при клонировании и секвенировании ДНК, в криминалистике и судебной медицине («генетические отпечатки пальцев», установление отцовства), при определении генетически модифицированных продуктов, исследовании ископаемых останков живых существ и т.п.

Метод ПЦР основан на применении специального термостабильного фермента ДНК-полимеразы, выделенного из бактерий, живущих в горячих источниках. Этот фермент способен наращивать короткие цепочки ДНК (называемые праймерами), если они связаны с более длинной «матричной» цепью ДНК [1].

Для проведения ПЦР необходимо нагревать реакционную смесь согласно специальному циклическому температурному режиму, который задает условия протекания процессов копирования фрагментов ДНК. Под действием последовательных изменений температуры двухцепочные молекулы ДНК расплетаются (денатурация), к ним присоединяются праймеры (процесс носит название «отжиг»), после чего полимераза начинает достраивать вторую цепь ДНК из мономеров (элонгация) [2]. В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз), и на каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Техническая реализация ПЦР

Для проведения ПЦР производится коммерческое оборудование, ориентированное на выполнение реакции в полимерных пробирках (объемом от 0,2 до 0,5 мл) или планшетах (96 и 384 луночные планшеты с максимальным объемом одной лунки 40 и 300 мкл соответственно) [3]. Однако наиболее перспективным является реализация ПЦР на основе миниатюрных устройств – микрочипов. Достоинствами микрочиповых систем являются: значительное сокращение объема реакционной смеси; малые габариты приборов; возможность создания автоматизированных микросистем, объединяющих все стадии анализа (подготовка пробы, амплификация и последующий компонентный

анализ) на базе одного чипа. Уменьшение объема реакционной смеси (до нанолитров) позволяет повысить скорость изменения температуры в растворе, что сокращает продолжительность ПЦР. Применение портативных автоматизированных микроаналитических систем наиболее выгодно при анализе токсичных и особо опасных биологических веществ, для создания систем экспресс-анализа и др.

В настоящее время существует два основных подхода к реализации ПЦР на микрочипе [4]. В первом случае изменение температуры происходит за счет последовательного нагрева и охлаждения реакционной смеси в стационарной микрокамере. Оригинальной модификацией этого подхода является проведение ПЦР в так называемой виртуальной камере, когда капля реакционной смеси инкапсулирована в небольшом объеме минерального масла [5]. Это приводит к значительному сокращению нагреваемого объема, что позволяет существенно увеличить скорость ПЦР. Недостатком данной системы является проницаемость масляной оболочки для компонентов смеси и большая вероятность перекрестного переноса анализируемых образцов (контаминация). Другой подход заключается в разделении микрочипа на области, в которых поддерживается постоянная температура, при этом реакционная смесь движется по микроканалам из одной области в другую и нагревается, проходя соответствующие температурные зоны. Нагрев жидкости в канале происходит гораздо быстрее, чем в стационарной камере [6]. Однако в этом случае необходимы вспомогательные устройства для создания стабильных регулируемых высокоскоростных потоков в каналах.

Характерной особенностью микроструктур является высокое соотношение площади поверхности к объему. Например, для канала микрофлюидного чипа отношение площадь/объем превышает 100. Поэтому при проведении исследований на микрочипе необходимо учитывать влияние поверхностных свойств материала на аналитический сигнал. При создании микрочипа для ПЦР большое значение уделяется теплопроводности и химической инертности материала реактора. Однако существующие методы обработки поверхности (пассивация нанесением специальных полимерных покрытий) и возможность создания гибридных микрочипов (из двух и более материалов) значительно расширяют диапазон применяемых материалов. Существенными факторами становятся стоимость изготовления, а также затраты на технологии создания и герметизации микроструктур.

Обычно микрочипы изготавливают из кремния, стекла или полимеров. Каждый из этих материалов обладает различными свойствами, следовательно, имеет свои достоинства и недостатки [2]. Коэффициент теплопроводности стекла ниже, чем у кремния, но его вполне достаточно для обеспечения быстрого изменения температуры. Кроме того, стекла являются оптически прозрачными диэлектриками, что позволяет использовать оптические методы детектирования и электрокинетические методы анализа. Поверхность стекла в меньшей степени ингибирует ПЦР по сравнению с кремнием, который необходимо предварительно обрабатывать.

Постановка задачи

На базе Института аналитического приборостроения РАН созданы прототипы чипов для ПЦР, представляющие собой герметично соединенные стеклянные пластины, в одной из которых сформированы отверстия (лунки) диаметром 2,5 мм. Герметизация микрочипа осуществлялась посредством термического связывания (спекания), обеспечивающего прочность и долговечность соединения, а также однородность состава поверхностного слоя микроструктур. Применение оптически прозрачных полимерных фотоотверждаемых композиций (ФОК) позволяет снизить трудоемкость процесса герметизации микрочипа, но в этом случае необходим подбор композиций, обеспечивающих биохимическую нейтральность полимера в процессе реакции.

Так как стеклянные микрочипы являются достаточно дорогостоящими изделиями, то предполагается их многократное использование при анализе. Это подразумевает необходимость обработки чипа после ПЦР. Поэтому важным является выбор эффективного метода очистки поверхности микрочипа от продуктов реакции.

Задачами исследования являлись: (1) отработка методики очистки поверхности стеклянных чипов от минерального масла; (2) удаление остатков реакционной смеси после проведения ПЦР; (3) выбор растворов, пригодных для очистки чипов, герметизированных ФОК.

Обычно для очистки поверхности чипа от минерального масла достаточно применения слабых растворов щелочи (мыльный раствор), что сочетается с последующей обработкой поверхности микрочипа более сильными химическими реагентами для удаления остатков биологических комплексов реакционной смеси.

Выбор процедур очистки реакционной камеры ПЦР от компонентов реакционной смеси зависит от применяемого материала и, в том числе, определяется способом герметизации микрочипа. Обычно для дезактивации фрагментов ДНК применяют прокалывание (нагрев выше 100°C), УФ облучение и обработку химическими растворами, разрушающими ДНК и органические соединения реакционной смеси. Облучение УФ является наиболее распространенным способом борьбы с загрязнениями в ПЦР-лабораториях. Рабочие поверхности и оборудование до и после работы с генным материалом подвергаются облучению ультрафиолетовыми лучами с максимумом излучения в области 260 нм [7]. Но применение УФ облучения для очистки микрочипов ограничено характеристиками применяемых материалов, так как не все стекла прозрачны в данном диапазоне. Денатурация ДНК посредством нагрева смеси выше 100°C осуществляется под давлением (автоклав). Однако при работе с микрочипами возникают трудности, связанные с реализацией стабильных конвекционных потоков жидкости в микроканалах чипа.

Для стеклянных микрочипов выбор химических методов очистки является наиболее приемлемым. В лабораторной практике для дезактивации ДНК обычно применяют растворы на основе концентрированной серной кислоты, раствор гипохлорита натрия, хлорной извести, хлорамина, смесь метанола и соляной кислоты и др. [7]. В данной работе для очистки стеклянной поверхности микрочипов использовались химические растворы на основе концентрированной серной кислоты (раствор бихромата калия и смесь с перекисью водорода), а также раствор гипохлорита натрия и буферный раствор ТЕ.

Хромовая смесь (5 %-й раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте) является одним из лучших моющих средств, обладает сильным окислительным действием [8] и рекомендована для обработки стеклянных пробирок при работе с генным материалом [9]. Раствор концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 3:1 (подобные растворы носят название «пиранья») применяется для очищения поверхностей кварца и стекол от органических загрязнений [9].

Гипохлорит натрия (раствор натриевой соли хлорноватистой кислоты) в слабых концентрациях сохраняет окислительные свойства и бактерицидную активность и рекомендован для очистки загрязненных поверхностей в ПЦР-лабораториях [3]. Для исследований был выбран 1 %-й раствор гипохлорита натрия, который является наиболее стабильным и комфортным для практической работы.

Буферный раствор ТЕ (0,01 М трис-НСI pH 7,8; 0,01 М ЭДТА) используется при работе с генетическим материалом для удаления фрагментов ДНК со стеклянной поверхности [3].

Для проведения экспериментальных исследований была выбрана следующая последовательность операций: (1) проведение ПЦР в реакционной камере микрочипа с добавлением ДНК-мишени (положительный контроль), (2) очистка поверхности чипа

от органических компонентов при помощи выбранного химического средства, (3) проведение ПЦР без добавления ДНК (отрицательный контроль).

В работе использовали комплекты реактивов, предназначенные для проведения ПЦР в реальном времени (научно-производственная компания СИНТОЛ, г. Москва). Исходная концентрация ДНК-мишеней в реакционной смеси составляла 10^6 копий/мкл. С целью предотвращения испарения раствор в лунке покрывали небольшим количеством минерального масла (4 мкл). Циклический нагрев и регистрацию ПЦР проводили с помощью прототипа анализатора нуклеиновых кислот, разработанного для микрочипов (АНК-4а, ИАиП РАН), с флуоресцентным детектором (длины волны возбуждения 470, 530, 590 и 625 нм).

В процессе ПЦР в реакционной смеси образуются флуоресцентно-меченные копии заданного фрагмента ДНК, при этом изменение интенсивности флуоресценции в процессе циклического нагрева позволяет наблюдать накопление продукта реакции в режиме реального времени. Зависимость изменения интенсивности флуоресценции (F) при ПЦР в процессе циклического нагрева представлена на рис. 1 (положительный контроль), на ней можно выделить стадию инициации и экспоненциальную стадию. Накопление продукта реакции происходит в геометрической прогрессии, однако на начальных этапах аналитический сигнал значительно меньше фонового. На второй стадии наблюдается экспоненциальная зависимость интенсивности флуоресценции от количества циклов нагрева, что свидетельствует об увеличении продукта реакции – меченных флуоресцентным зондом фрагментов ДНК-мишени. После 35–40 циклов нагрева возможно появление третьей стадии – плато, для которой характерно слабое изменение аналитического сигнала.

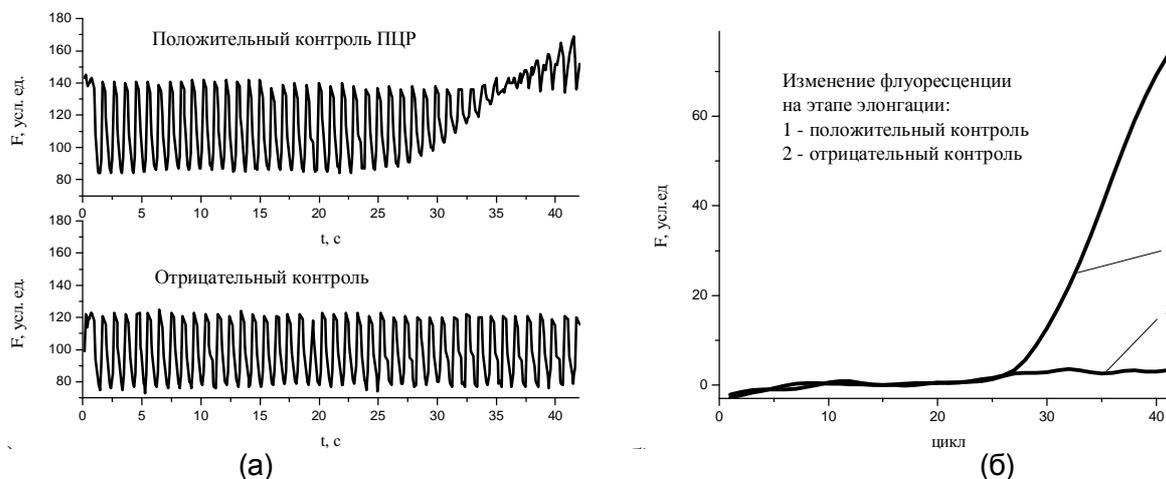


Рис. 1. (а) Экспериментально полученные зависимости интенсивности флуоресценции при циклическом нагреве реакционной смеси с фрагментом ДНК (положительный контроль) и без ДНК (отрицательный контроль). (б) Зависимость изменения флуоресценции (на этапе элонгации) от количества циклов ПЦР при положительном и отрицательном контролях

Результаты и обсуждение

Предварительные результаты показали, что при отрицательном контроле на микрочипе, промывом буферным раствором ТЕ, наблюдается экспоненциальное увеличение интенсивности флуоресценции на этапе элонгации, характерное для ПЦР. Можно предположить, что даже после обработки буферным раствором на стеклянной поверхности микрочипа присутствуют биологически активные комплексы. Следовательно, применения буферного раствора ТЕ недостаточно для очищения поверхности стеклянного чипа.

Стабильные и воспроизводимые результаты получены на микрочипе, обработанном хромовой смесью (рис. 2, зависимость 1). После 27-го цикла наблюдается изменение величины сигнала флуоресценции, что свидетельствует об увеличении количества анализируемых фрагментов ДНК.



Рис. 2. Нормированные графики зависимости изменения флуоресценции во времени при проведении ПЦР в микрочипах, обработанных разными химическими растворами: 1 – хромовой смесью; 2 – раствором гипохлорита натрия; 3 – смесью концентрированной серной кислоты и перекиси водорода («пиранья»)

Аналогичные результаты получены на стеклянном микрочипе, обработанном раствором гипохлорита натрия (рис. 2, зависимость 2).

Раствор концентрированной серной кислоты и перекиси водорода отчищает стеклянную поверхность микрочипа от органических загрязнений, что подтверждено отрицательным контролем. Однако наблюдается изменение характера зависимости интенсивности флуоресценции при проведении ПЦР (рис. 2, зависимость 3), что, по-видимому, означает влияние данной смеси на поверхностные свойства микрокамеры. В этом случае для получения однозначных выводов необходимо провести дополнительные исследования.

Полученные результаты свидетельствуют, что 5%-й раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте (хромовая смесь) и 1%-й раствор гипохлорита натрия можно использовать для удаления остатков реакционной смеси с поверхности стеклянных микрочипов, герметизированных методом термического связывания.

Для микрочипов, герметизированных с помощью фотоотверждаемых композиций (ФОК), не рекомендуется применение хромовой смеси, так как сильное окислительное действие концентрированной серной кислоты может привести к разгерметизации микрочипа. Раствор гипохлорита натрия при малых концентрациях в меньшей степени воздействует на поверхность полимерных материалов и подходит для очистки поверхности микрочипа от биологических загрязнений. Следовательно, можно рекомендовать 1%-й раствор гипохлорита натрия для очистки микрочипов, герметизированных ФОК.

Заключение

Сочетание физико-химических свойств (оптическая прозрачность, теплопроводность, химическая инертность) стекла делает его привлекательным для использования в качестве материала при создании микрочипов для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Так как стеклянные микрочипы являются достаточно дорогостоящими изделиями, то предполагается их многократное использование при анализе, что подразумевает необходимость эффективной очистки поверхности стекла от реакционной смеси после проведения реакции.

Для очистки реакционной камеры после проведения ПЦР на стеклянных микро-чипах поверхность обрабатывали следующими химическими средствами: 5%-м раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте (хромовая смесь), 1%-м раствором гипохлорита натрия, смесью концентрированной серной кислоты с перекисью водорода (3:1) и буферным раствором ТЕ. Выбрана следующая последовательность действий: (1) проведение ПЦР в реакционной камере микрочипа с добавлением фрагментов ДНК, (2) очистка поверхности чипа от минерального масла и органических компонентов реакционной смеси, (3) проведения ПЦР без ДНК-мишени.

Экспериментально подтверждено, что хромовая смесь и раствор гипохлорита натрия применимы для очистки поверхности стеклянных микрочипов.

Раствор гипохлорита натрия при малых концентрациях в меньшей степени воздействует на поверхность полимерных материалов и при этом подходит для очистки поверхности стеклянных микрочипа от биологических загрязнений. Следовательно, этот раствор можно рекомендовать для очистки микрочипов, герметизированных полимерными композициями.

Литература

1. Мюллис К. Необычная история о том, как родилась полимеразная цепная реакция // В мире науки. – 1990. – № 6. – С. 26–35.
2. Рудницкая Г.Е., Евстапов А.А, Микрочиповые устройства для полимеразной цепной реакции. Ч. 1. Основные принципы ПЦР; конструкция и материалы микрочипов // Научное приборостроение. – 2008. – Т. 18. – № 3. – С. 97–114.
3. Гипертекстовая база данных «Практическая молекулярная биология» / рук. Краснов А. – № 0220006875 в Госреестре баз данных [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://molbiol.edu.ru/index.html>, свободный.
4. Huikko K., Kostianen R., Kotiaho T. Introduction to micro-analytical systems: bioanalytical and pharmaceutical applications // European journal of pharmaceutical sciences. – 2003. – № 20. – P. 149–171.
5. Neuzil P., Pipper J., Hsieh T.M. Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost // Molecular BioSystems. – 2006. – № 2. – P. 292–298.
6. Zhang C., Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends // Nucleic Acids Research. – 2007. – V. 35. – № 13. – P. 4223–4237.
7. Антонов Б.И. Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения) №13–7–2/840 – М.: Минсельхозпрод РФ, 1997 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.mcsp.ru/base_gvc/vetzac/document/204.html, свободный.
8. Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Наука, 1964. – 400 с.
9. Zhuang G., Jin Q., Liu J., Cong H., Liu K., Zhao J., Yang M., Wang H A low temperature bonding of quartz microfluidic chip // Biomed Microdevices. – 2006. – № 8. – P. 255–261.

Евстапов Анатолий Александрович

– Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики, кандидат технических наук, доцент, an_evs@mail.ru

Тупик Александра Николаевна

– Институт аналитического приборостроения РАН, аспирант, tunix@yandex.ru