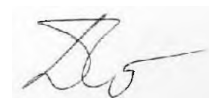


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК (ИАП РАН)

На правах рукописи



Петров Дмитрий Григорьевич

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЕТОДИК АВТОМАТИЗИРОВАННОГО
ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ

Специальность:

1.3.2 – Приборы и методы экспериментальной физики

Кандидатская диссертация

Научный руководитель:
Доктор технических наук, профессор
Курочкин Владимир Ефимович

Санкт-Петербург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР РАБОТ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ НК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОБ.....	14
1.1 Методы выделения нуклеиновых кислот.....	15
1.2 Выбор объекта для выделения НК.....	22
1.3 Лизис проб для выделения НК.....	24
1.3.1 Сложные пробы для выделения НК.....	26
1.4 Влияние температуры на выделение нуклеиновых кислот	28
1.5 Акустическое воздействие на выделение нуклеиновых кислот.....	29
1.6 Современные автоматизированные системы для выделения НК.....	40
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА И КАРТРИДЖ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НК.....	58
2.1 Принцип работы и блок-схема экспериментальной установки.....	58
2.2 Одноразовый картридж для экспериментальной установки.....	60
2.2.1 Выбор материалов для картриджа экспериментальной установки.....	66
2.3 Внешний вид и принцип работы экспериментальной установки.....	69
2.3.1 Методика автоматического выделения НК.....	71
2.4 Программное обеспечение экспериментальной установки.....	73
3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
3.1 Анализ режимов работы установки обеспечивающих высокоэффективное выделение НК.....	79
3.2 Исследование влияния различной температуры на эффективность выделения НК.....	84
3.3 Исследование эффективности выделения НК под воздействием ультразвука мегагерцового диапазона на пробу во время сорбции.....	89
3.4 Апробация способа проточного концентрирования НК под УЗ воздействием	111
3.5 Заключение к экспериментальным исследованиям.....	118
4 ОБОБЩЕНИЕ И ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	121
4.1 Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК).....	123
5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	130
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	132

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяются следующие определения и сокращения:

В	- вольт;
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота;
РНК	- рибонуклеиновая кислота;
ИЗ	- инфекционные заболевания;
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения;
ПО	- программное обеспечение;
ТЗ	- техническое задание;
НК	- нуклеиновые кислоты;
ОКР	- опытно-конструкторская работа;
НИР	- научно-исследовательская работа;
НК	- нуклеиновая кислота;
ПЦР	- полимеразная цепная реакция;
ПЦР-РВ	- полимеразная цепная реакция в реальном времени;
КОЕ	- колониобразующие единицы;
УЗ	- ультразвук;
УФ	- ультрафиолет;
С[НК]	- концентрация нуклеиновой кислоты;
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота;
SDS	- лаурилсульфат натрия.
мин.	- минута
I _{US}	- интенсивность ультразвука
КВНК	- комплекс для выделения нуклеиновых кислот

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Молекулярные методы анализа нуклеиновых кислот (НК), такие как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ), являются самыми распространёнными способами обнаружения, идентификации и/или количественного определения вирусов и бактерий в клинических образцах, пищевых продуктах, образцах окружающей среды, при проведении археологических и судебных исследований. В процессе многолетней практики применения методов ПЦР для анализа различных проб многократно подтверждена определяющая роль подготовки образцов перед молекулярно-генетическим анализом.

В настоящее время широкое распространение получили методы выделения нуклеиновых кислот (НК) на твердофазных сорбентах: стекловолоконных мембранах и магнитных сорбентах. Во многом популярность этих методов обусловлена их простотой, доступностью и отсутствием токсичных реагентов. Как следствие, на основе таких методов создан ряд серийно выпускаемых приборов для автоматизированной пробоподготовки НК. Сам процесс выделения и очистки НК состоит из одних и тех же стадий – сорбции НК, промывки (для удаления компонентов, мешающих ПЦР), сушки сорбента от остатков промывочного реагента и элюирования НК в раствор для анализа. От результата каждой из этих стадий зависит эффективность всей процедуры пробоподготовки (т.е. количество и качество очищенных НК, необходимое для получения достоверного результата анализа).

Многообразие природы и состава анализируемых проб, содержащих разные виды и количества примесей, ингибирующих ПЦР-РВ, обуславливает необходимость подбора условий проведения каждой стадии пробоподготовки.

Таким образом, представляется актуальной разработка автоматизированной программируемой установки, позволяющей экспериментально моделировать, оценивать и изучать каждую из стадий выделения НК (сорбцию, промывку,

сушку и элюирование), оценивать их совместимость и соответствие требованиям к качеству и количеству выделяемого генетического материала. Такая установка упрощает и ускоряет процесс создания или адаптации методик (протоколов) автоматического выделения НК. Кроме того, становится возможным оценить границы применимости каждой методики для анализа определённого вида проб, при изменении составов реагентов. Это позволяет создавать опытные образцы автоматизированных приборов с предсказуемыми границами применимости и, при необходимости, модифицировать уже существующие методики, добиваясь повышения их эффективности. Для удобства работы, а также для улучшения воспроизводимости выделения НК на созданной установке, необходимо разработать программное обеспечение (ПО), позволяющее управлять функциональными узлами и элементами установки с целью изменения режимов выделения НК.

подавляющая часть приборов и систем для автоматизированного выделения НК построена на базе стандартных планшетов и одноразовых картриджей. «Планшетная» реализация выделения НК имеет преимущества перед «картриджной» в производительности и стоимости одного выделения. Среди недостатков в основном выделяются сложность защиты от контаминации образцов и, как правило, достаточно малое разнообразие видов обрабатываемых проб (например, только клинические образцы такие как кровь, моча, плазма и др.). В экспериментальной работе предпочтение было отдано реализации выделения НК из жидких проб на картридже, так как в исследовательских задачах не требуется большая производительность, а необходима высокая степень защиты от контаминации образцов.

Одним из направлений работы являлось создание дополнительных модулей для разработанной установки, позволяющих повысить эффективность выделения НК с помощью температурного или ультразвукового (УЗ) воздействий на сорбцию НК, при выделении из модельных растворов, и определения оптимальных параметров этих воздействий. Модельная проба – это водный раствор ДНК *M.tuberculosis*, объект выбран не случайно, так как помимо

высокой изученности данной плазмиды она характеризуется высокой стабильностью при хранении.

В работе апробирован способ проточного выделения НК под воздействием ультразвука (УЗ). Определены условия удерживания магнитных частиц в потоке, а также параметры системы позволяющие осуществлять смену реагентов необходимых для выделения НК. Полученные данные свидетельствуют о возможности повышения эффективности выделения НК с помощью многократного пропускания пробы через удерживаемый в потоке под воздействием УЗ магнитный сорбент. Результаты по апробации способа проточного концентрирования сформулированы в виде перспективного предложения для разработки методик и приборов для выделения НК из жидких проб большого объёма (в перспективе до 1 л).

Разработанная экспериментальная установка имеет самостоятельное значение и в то же время является необходимым инструментом для успешного проектирования (модернизации) автоматизированных систем пробоподготовки и анализа НК.

Цель работы:

Разработка установки для создания и модификации методик автоматизированного выделения нуклеиновых кислот на твердой фазе.

Указанная цель достигается путём решения следующих задач:

1. Создание экспериментальной установки для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб.
2. Анализ и определение режимов работы установки (скорости дозирования и параметров перемешивания реагентов, длительности взаимодействия реагентов) обеспечивающих эффективное выделение НК.
3. Исследование влияния температуры и воздействия ультразвука на эффективность выделения НК.
4. Оценка эффективности способа проточного концентрирования НК под воздействием УЗ на магнитном сорбенте с определением условий удержания

сорбента в потоке, обеспечивающих повышение степени концентрирования в сравнении не проточным способом выделением.

5. Создание протоколов автоматического выделения НК с использованием разработанной установки и оценка их работоспособности в серийно выпускаемом приборе для выделения нуклеиновых кислот.

Научная новизна:

1. Впервые показано влияние изменения длительности отдельных стадий выделения НК в автоматическом режиме на результат всей пробоподготовки.

2. Впервые создана экспериментальная установка, позволяющая проводить выделение НК под воздействием УЗ (с частотой 2,65 МГц) в диапазоне интенсивностей от 1,2 до 3,0 Вт/см², обеспечивающая эффективность выделения выше 85% без применения температурного воздействия.

3. Показан способ двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК с применением проточного метода выделения на магнитном сорбенте под воздействием УЗ.

Практическая значимость:

1. Созданная установка позволяет определять и изменять параметры выделения НК на картридже в автоматическом режиме, такие как:

- скорость дозирования (до 3 мл/сек) и количество реагентов необходимых для выделения НК из проб объемом до 5 мл;
- температуру в диапазоне от комнатной до 90°C;
- величину УЗ воздействия от 1,2 до 3,0 Вт/см² с частотой 2,65 МГц;
- длительность различных стадий выделения НК.

Это позволяет создавать новые или увеличивать эффективность действующих методик автоматизированного выделения НК из жидких проб на картриджах.

2. Показано, что управление параметрами выделения НК из модельных проб, такими как: длительность стадий, расход и интенсивность перемешивания реагентов, интенсивность температурного и ультразвукового воздействий на

различные стадии позволяет спрогнозировать результативность выделения в целом и достичь более, чем 90% – ный выход ДНК.

3. Показан способ проточного выделения НК под воздействием УЗ из модельных проб объемом 10 мл, который позволяет достичь двадцатикратного увеличения степени концентрирования НК в элюате, в сравнении с непроточным выделением НК из такой же пробы, тем самым обеспечивается увеличение репрезентативности пробы.

4. Результаты работы успешно применены при разработке новых и повышении эффективности действующих методик выделения НК на Комплексе для выделения нуклеиновых кислот, при выборе условий и режимов автоматического выделения НК.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эффективность выделения плазмиды из модельной пробы на магнитном сорбенте достигает 75% при длительности сорбции в течение 1 минуты и нагревании пробы до 70°C. При дальнейшем повышении температуры эффективность выделения снижается.

2. Ультразвуковое воздействие с частотой 2,65 МГц во время сорбции в диапазоне интенсивностей от 1,8 до 2,2 Вт/см² в течение 1-5 минут обеспечивает эффективность выделения НК из модельного образца с средним 80%.

3. Выделение НК из модельной пробы проточным способом под воздействием УЗ из пробы объемом 10 мл, со скоростью пропускания 1 мл/мин через магнитные частицы размером от 10 до 100 мкм, удерживаемые УЗ с частотой 2,65 МГц и интенсивностью 2,0 Вт/см², двадцатикратно повышает концентрацию НК в элюате, по сравнению со стационарным режимом выделения.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались и обсуждались на пяти международных конференциях (Армия 2018, Армия 2019, Армия 2020, Армия 2021, Экобалтика), 2-х всероссийских с международным участием (Физика-А

2018, Физика-А 2019), а также на межучрежденческих конференциях, проводимых Минобороны России.

Результаты экспериментальных исследований легли в основу создания методики выделения НК с помощью одноразовых картриджей в Комплексе КВНК, востребованном Государственным заказчиком, который с 2015 года принят на снабжение Минобороны России (Приказ МО РФ № 839). Отдельные результаты нашли отражение в отчётах по НИР, проводимых в лаборатории «Методов и приборов иммунного и генетического анализа» ИАП РАН.

Методы исследования и оценка достоверности результатов

В работе использованы следующие методы исследования и анализа:

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, метод электрофоретического анализа НК, методы статистической обработки экспериментальных данных. Основными научными методами, используемыми в диссертации, являются общенаучные (сравнение, анализ, синтез, индукция, дедукция, экспериментальные исследования).

Степень достоверности подтверждается публикациями в рецензируемых журналах перечня ВАК и Scopus, а также применением поверенных средств измерения: объёмов жидкости, времени, температуры, концентрации НК.

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 работах. Из них 6 статей ВАК и 3 статьи индексируемые в базе данных Scopus и Web of science.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка использованных источников. Работа содержит 148 страниц машинописного текста, 12 таблиц и 35 рисунков. Список использованных источников включает 147 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследований, защищаемые положения, отражены структура, объём и содержание диссертации.

Первая глава диссертации посвящена аналитическому обзору работ по различным способам и методиками выделения НК, в том числе с применением коммерческих автоматизированных приборов и систем.

Отмечено, что наиболее распространёнными пробами для выделения НК являются клинические образцы, а наиболее сложными представляются пробы окружающей среды, так как они могут содержать широкое разнообразие видов примесей.

Эффективность методики выделения НК на твердофазных сорбентах определяется характеристиками процессов сорбции-десорбции, прямо зависящих от интенсивности массообменных процессов. В работе представлен анализ литературных данных по изучению способов интенсификации таких процессов при выделении биологических молекул, включая НК. Также представлены результаты литературного обзора по приборам и методам выделения НК из проб большого объема.

В заключительной части литературного обзора представлены наиболее распространённые серийно выпускаемые автоматизированные приборы для выделения нуклеиновых кислот, представлены фотографии, схемы и краткое описание приборов, а также их основные недостатки и преимущества перед другими приборами.

Сформулирована цель работы и решаемые задачи.

Во второй главе сформулированы основные требования к созданной установке, и изложен путь реализации этих требований, включая экспериментальную оценку материалов картриджа для выделения нуклеиновых кислот. В разделе 2.1 приведен принцип построения экспериментальной установки, представленный в виде блок-схемы функциональных модулей.

Функционирование установки осуществляется согласно заданной последовательности команд, сформированных в рабочий протокол, передаваемый с ПЭВМ. Командами задают значения параметров движения шаговых двигателей, за счёт чего происходит: дозирование и перемещение реагентов между ячейками; переключение позиций, каждая из которых

соответствует своей ячейке; перемещение магнита к рабочей ячейке и от неё. Нагрев и поддержание температуры рабочей ячейки осуществляется с помощью термостата, параметры работы которого также заданы в протоколе. В разделе 2.2 обоснован выбор материалов для картриджа экспериментальной установки.

В разделе 2.3 изложен принцип работы созданной установки, перечень команд и алгоритм взаимодействия оператора с экспериментальной установкой с помощью созданного ПО. Таким образом, обработка пробы в соответствии с заданным протоколом работы установки позволяет в автоматическом режиме выделять НК.

В третьей главе приведены результаты экспериментальных исследований по определению количества жидких реагентов, и условий для их качественного перемешивания, времени инкубирования на различных стадиях выделения (раздел 3.1), обеспечивающие выделение НК в автоматическом режиме.

В разделе 3.2 представлены результаты исследований по определению зависимости эффективности выделения НК из модельных проб от температуры в диапазоне от 20°C до 90°C на стадии сорбции. В разделе 3.3 представлены результаты зависимости эффективности выделения НК из модельных проб от УЗ воздействия, с частотой 2,65 МГц в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см².

Также в разделе 3.3 описан принцип работы УЗ модуля входящего в состав экспериментальной установки, который состоит в воздействии УЗ на частоте 2,65 МГц, с заданными оператором значениями интенсивности, на пробу при пропускании через силикатную мембрану (а) или кювету с магнитным сорбентом, во время стадии сорбции. Приведены результаты экспериментов для проверки сохранности структуры ДНК в модельной пробе под воздействием УЗ.

В разделе 3.4 представлены результаты экспериментальной работы по апробации проточного концентрирования НК под воздействием УЗ из различных проб, включая описание соответствующей установки.

На созданной установке показана возможность концентрирования НК из различных проб объёмом 3 и 10 мл. Экспериментально показано, что способ проточного выделения НК при трёхкратном пропускании модельной пробы

через удерживаемый под воздействием УЗ сорбент, способен обеспечить двадцатикратное повышение концентрации НК в элюате, в сравнении со стационарным выделением НК из такой же пробы.

В заключении к главе 3 сформулированы методические рекомендации по созданию высокоэффективных методик автоматизированного выделения НК из жидких проб с помощью картриджей и проточного концентрирования.

В четвёртой главе представлен Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК). Созданный Комплекс обеспечивает выделение НК из жидких проб с помощью одноразовых картриджей, содержащих необходимые реагенты. Комплекс способен одновременно обеспечить обработку 4 образцов. В результате выделения очищенный препарат содержащий НК можно анализировать молекулярными методами, такими как ПЦР-РВ.

Созданная установка позволила разработать методику функционирования Комплекса, для воспроизводимого автоматизированного выделения НК из таких проб как: проточная вода, слюна, плазма, смывы почв.

В заключении представлены результаты, главным из которых является разработанная экспериментальная установка для создания и модификации методик автоматизированного выделения НК на твердой фазе.

Созданная установка в совокупности с ПО и картриджем для выделения НК позволяет разрабатывать новые и модифицировать действующие методики автоматизированного выделения НК из жидких образцов объёмом до 5 мл (объём ячейки созданного картриджа) Создание новой методики пробоподготовки реализуется путём оптимизации параметров, а именно: длительности стадий выделения НК; количества промывок сорбента; скоростей дозирования (расхода) реагентов внутри картриджа; температуры и УЗ воздействия. Это позволяет создавать новые высокоэффективные методики автоматизированного выделения НК на магнитном сорбенте или стекловолоконной мембране.

1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР РАБОТ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ НК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОБ

В настоящее время генетический анализ проб получил широкое распространение в медицине, биологии, сельском хозяйстве, экологическом мониторинге. Необходимость обработки большого количества проб обуславливает создание технических устройств, обеспечивающих пробоподготовку и анализ генетического материала в автоматическом режиме. При этом из-за широкого разнообразия видов проб (кровь, плазма, вода, слюна, мокрота, смывы почвы) производители автоматических станций и устройств пробоподготовки НК ориентируются на определённые виды пробы, чтобы обеспечить оптимальный алгоритм (методику) пробоподготовки ДНК/РНК, что существенно сокращает область применения данной техники. Растущее количество различных способов и приборов для пробоподготовки НК к анализу и, одновременно, постепенно выявляемые недостатки при расширении применения для анализа реальных проб разного типа наглядно показывают, что задача совершенствования приборов и методов не теряет своей актуальности.

При создании (совершенствовании) современных систем пробоподготовки НК следует провести натурное моделирование функциональных узлов, при этом разработка методики функционирования автоматизированного устройства обуславливает необходимость натурного моделирования всей установки в целом, с возможностью задания параметров работы в широком диапазоне.

На первом этапе целесообразно отталкиваться от известных методик выделения нуклеиновых кислот. При этом, следует уточнить содержание и использование некоторых терминов в англоязычной литературе по примеру автора [1]: выделение (separation, или isolation) подразумевает отделение НК от другого материала клеток или образца, тогда как термин очистка (purification) относится к удалению веществ, ингибирующих последующий анализ (чаще ПЦР) (в англоязычной литературе термины "extraction", "isolation", "separation", "purification" применяют попеременно, часто подразумевая их равноценность

[12]: например, термин "extraction" может использоваться для описания всего процесса выделения НК (включающего стадию очистки).

Во время очистки и выделения НК необходимо обратить особенное внимание на удаление ингибиторов ПЦР, так как их присутствие в очищенном препарате НК может значительно снизить результативность или заблокировать ПЦР, и, как следствие, может быть получен ложноотрицательный результат. В то же время большая чувствительность ПЦР является и ее уязвимым местом, поскольку она может приводить к ложноположительным результатам в случае загрязнения образца посторонними молекулами ДНК [13, 14]. Среди множества способов борьбы с ингибиторами следует выделить два: 1. Разбавление полученного раствора ДНК после выделения (очищенного препарата ДНК), в расчёте на снижение концентрации ингибитора до количеств не влияющих на течение ПЦР-РВ анализа; 2. Добавление в очищенный препарат ДНК большего количества полимеразы. Основными реагентами-ингибиторами являются этанол, ЭДТА, фенол, изопропанол, а также избыток KCl, NaCl и некоторых других солей, ионные детергенты, такие как деоксихолат натрия, саркосил и додецилсульфат натрия (SDS), которые должны удаляться перед амплификацией или их содержание должно быть снижено до приемлемых значений (в зависимости от типа полимеразы) [9].

1.1 Методы выделения нуклеиновых кислот

Методы выделения нуклеиновых кислот можно условно разделить на две группы – жидкофазные (где используются растворы реагентов и жидкая проба) и твердофазные (где осаждение НК происходит на твердофазном сорбенте).

Жидкофазные методы выделения НК

Классическим представителем жидкофазного метода является метод выделения НК из лизатов клеток с использованием смеси хлороформа и фенола. После смешивания растворов с последующим инкубированием происходит расслаивание с образованием двухфазной водно-органической системы: НК находятся в водной фазе, а денатурированный клеточный материал остаётся внутри органической фазы, отделяемой центрифугированием, что позволяет

отделять белки, липиды, углеводы, и осколки клеток (мембран) [9, 15]. С этой целью используется также смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт [15]; изоамиловый спирт добавляется для предотвращения вспенивания смеси при обработке на вортексе и для облегчения разделения органической и водной фазы [16].

Основными недостатками данных методов является необходимость центрифугирования, что сильно затрудняет автоматизацию процесса, и токсичность применяемых реагентов. Важно также учитывать, что некоторые реагенты, применяемые для выделения НК, могут ингибировать ПЦР. К таким ингибирующим веществам, вводимым в процессе обработки, относятся фенол, ЭДТА, хлорид натрия, хлорид лития, этанол, изопропиловый спирт [17, 18]. Фенол ингибирует реакцию ПЦР и должен быть полностью удален из ДНК матрицы после очистки; кроме того, должны удаляться этанол и изопропанол, которые обычно используются для осаждения ДНК после обработки смесью фенола и хлороформа [19].

Следует учитывать также, что для успешного выполнения ПЦР необходимо поддержание строго определенных соотношений в ПЦР-смеси, изменение которых может приводить к ухудшению результатов анализа. Например, изменение концентрации ионов калия или введение ионов натрия могут нарушить ход амплификации, влияя и на активность ДНК полимеразы, и на условия отжига праймеров [20]. Это обстоятельство определяет повышенные требования к качеству очистки НК от остатков реагентов при использовании как жидкофазных, так и других методов выделения.

Созданный, нетоксичный реагент DNAzol[®], содержащий тиоционат гуанидина и смесь детергентов в готовой к использованию форме, быстро и эффективно выделяет ДНК из разных биологических образцов. Применение данного реагента позволяет выделять ДНК за 20-30 минут и получать геномную ДНК высокого качества [21, 22, 23].

Новым подходом к реализации жидкофазной экстракции является применение ионных жидкостей (ИЖ) [24]. В отличие от обычных

растворителей, ИЖ имеют низкие значения летучести, воспламеняемости и давления паров, долговременную температурную и химическую стабильность [24] и могут использоваться для быстрой экстракции ДНК из пищевых продуктов и грамотрицательных бактерий [25]. Используя этот подход, образцы инкубируют с ИЖ в течение нескольких минут при заданной температуре и далее могут использоваться для проведения реакций амплификации. Стабилизация экстрагированной ДНК ионными жидкостями позволяла даже сохранять экстрагированную ДНК при комнатной температуре до 20 дней без значительных потерь [25]. По мнению этих авторов, применение ИЖ может рассматриваться как один из перспективных подходов для быстрой и простой экстракции ДНК при диагностике в полевых условиях. В то же время на данной стадии развития и опробования этих методов ИЖ должны специфически выбираться и оцениваться для каждого целевого организма и матриц образцов, как это происходит при разработке любых новых методик.

Твердофазные методы выделения НК

Методы выделения НК с помощью твёрдой фазы можно подразделить на две группы – методы, в которых происходит связывание целевой НК твёрдой фазой или, напротив, сорбция примесей и ингибирующих веществ. Второй принцип метода выделения представлен в работе [26].

Большинство методов основано на сорбции НК твёрдой фазой, содержащей двуокись кремния, стеклянными частицами и магнитными сферами, покрытыми SiO_2 , в присутствии хаотропных солей (иодида натрия, перхлората натрия, тиоцианата гуанидина) [12, 16, 27, 28, 29, 30].

Связывание между НК и SiO_2 основано на экранированных межмолекулярных электростатических взаимодействиях, дегидратации поверхностей ДНК и SiO_2 и на формировании межмолекулярной водородной связи в контактном слое ДНК – SiO_2 [31]. Хаотропные соли дестабилизируют водородные связи, и гидрофобные взаимодействия, денатурируют белки (включая нуклеазы) и разрушают ассоциацию НК с водой, облегчая связывание ДНК с поверхностью SiO_2 , после чего примеси и загрязнения удаляют

промытием раствором, содержащим детергент и/или спирт (обычно этанол) [32].

В качестве твердой фазы при выделении НК могут использоваться также диатомитовая земля, анионообменные материалы и целлюлозные матрицы [15, 30].

На практике применение твердофазной экстракции проще чем выделение с помощью жидкофазных методов, однако количество выделенных НК может находиться в диапазоне 50-80% от исходного количества [9].

Такой разброс обусловлен неоднородностями проб, а главное тем, что каждый коммерческий набор реагентов, способный демонстрировать высокие проценты выхода ДНК/РНК в конкретном отдельном протоколе, при массовом использовании для пробоподготовки образцов разного качественного или количественного состава может иметь меньшую воспроизводимую эффективность. Возможными причинами этого эффекта являются влияние человеческого фактора при ручных методах выделения НК, различия в составах проб, отобранных даже из одного источника, или неадекватное применение методики.

Среди твердофазных методов стоит также отметить выделение с помощью ионообменной смолы Chelex [33, 34], часто используемой в области судебно-криминалистических исследований для экстракции ДНК из различных источников, таких как волосы, карточки с мазками крови и мазки из ротовой полости [30, 35]. Этот способ является быстрым, дешевым, имеет мало стадий манипулирования и в нем не используются опасные химические реагенты, однако его недостатком является неспособность эффективно удалять ПЦР ингибиторы из сложных образцов [30, 36], поэтому для удаления примесей и концентрирования ДНК применяют модифицированные протоколы на основе Chelex [36].

Твердофазный принцип может применяться в нескольких форматах, таких как картриджи, фильтры и парамагнитные сферы [37], в том числе, с использованием спин колонок, работающих под действием центробежных сил

[15, 17]. Парамагнитными сферами легко манипулировать с помощью магнита и, тем самым, избежать центрифугирования и ускорить стадии промывания [37].

Одним из самых важных преимуществ твердофазной экстракции, позволяющих автоматизировать процесс выделения НК, является отсутствие центрифугирования, так как используются закреплённые подложки (фильтры) с твёрдой фазой или сорбенты, обладающие магнитными свойствами; этим объясняется существование большого количества разнообразных автоматизированных станций и приборов для выделения НК, основанных на экстракции на твёрдой фазе.

Магнитная сепарация, как один из видов твердофазной экстракции НК, позволяет отделять компоненты клеточного лизата, которые ингибируют ДНК-полимеразу и ПЦР-реакцию, например полисахариды, фенольные компоненты, гумус [28], благодаря удерживанию магнитного сорбента при промывке. С точки зрения эффективности экстракции НК, методы на основе селективных мембран и магнитной сепарации равноценны, и применяются в зависимости от вида поступившей пробы.

Зачастую создание отдельного набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот на магнитном сорбенте, обусловлено особенностями пробы в которой находятся целевые НК, однако, эффективность выделения НК определяется по дальнейшему анализу, качественному и количественному. Таким образом недостаточно выделить нуклеиновые кислоты, немаловажно сохранить их пригодность для дальнейшего анализа, которая может быть существенно снижена из-за присутствия в элюате реагентов из набора для выделения [38].

Попытки оптимизации как качественного состава реагентов, так и их количества для однократного выделения ведутся постоянно и показывают, что подбор таких соотношений может существенно влиять на эффективность выделения нуклеиновых кислот [39]. При проведении подобных исследований чаще всего ориентируются на обработку проб одного вида или извлечение НК определённой принадлежности (геномной, тотальной, вирусной,

бактериальной). Выделение каждого вида НК имеет свои особенности, однако движение по пути оптимизации процесса выделения под отдельный вид проб и вид НК значительно сокращает применимость результатов таких исследований для расширения областей применения высокоэффективных методов выделения НК. Однако, оптимизированные или созданные специально методики выделения НК под отдельные виды проб и вид НК могут показывать результаты близкие к 100% эффективности выделения [40, 41].

Классификация различных современных методов выделения НК с обсуждением приоритетов требований, предъявляемых к методам, приведена в работах [9, 29].

К полуавтоматическим методам относят такие последовательности операций, где часть общего процесса выполняет человек (оператор), при этом стадия или несколько стадий реализуются с помощью приборов и устройств, которые осуществляют законченную операцию, в нашем случае это может быть: лизис и инактивация с перемешиванием, сорбция целевого продукта с перемешиванием, сушка твердофазного сорбента и элюция НК с его поверхности.

Для повышения воспроизводимости выделения НК на основе твердофазных методов применяют различные автоматизированные аппаратно-программные комплексы.

Автоматическое выделение НК с использованием таких комплексов имеет следующие достоинства: 1) снижение трудоёмкости и времени – позволяют обеспечить быстрое выделение ДНК/РНК из большого потока образцов за счет параллельной обработки; 2) низкий риск ошибок и перекрестной контаминации образцов – за счёт разделения образцов по отдельным рабочим ёмкостям; 3) высокая воспроизводимость процедуры выделения – чаще всего обусловлена относительно простой методикой выделения; 4) снижение контакта персонала с возбудителями заболеваний содержащимися в пробе – лизирующий реагент для магнитной экстракции не обладают высокой «летучестью»; 5) возможность включения в комплекс с другими этапами анализа (раскапывание образцов и

реагентов для проведения дальнейшего анализа, поддержка баз данных для учета образцов и результатов анализа).

К общим недостаткам большинства существующих автоматических комплексов можно отнести дороговизну оборудования и расходных материалов, а также, ограниченный перечень видов проб, обрабатываемых с использованием конкретного автоматического прибора.

Простота и эффективность применения силикатных сорбентов привела к официальному внедрению методик выделения НК на мембранных спин колонках в лабораторную практику.

Принцип выделения ДНК/РНК с использованием спин колонок с силикатными мембранами обеспечивает быстрый, удобный, нетоксичный метод с выходом чистой ДНК в интервале от 50% до 75%, причем методика, предположительно, работает лучше с фрагментами ДНК большими, чем 500 пар оснований, поскольку некоторые более короткие фрагменты могут необратимо связываться с мембраной [42]. В то же время по данным работы [43] при элюировании со спин колонок удаляется 90-95% ДНК, а 5-10% ДНК остаются в колонке в виде молекул ДНК и/или РНК, включенных в состав белков или фрагментов бактерий. Однако в последнее время, для автоматического выделения нуклеиновых кислот чаще используются магнитные частицы со стеклянным покрытием, так как позволяют более эффективно перемешивать пробу с сорбентом, что положительно сказывается на эффективности выделения.

Как уже отмечалось, связывание между НК и SiO_2 основано на экранированных межмолекулярных электростатических взаимодействиях, дегидратации поверхностей ДНК и SiO_2 и на формировании межмолекулярной водородной связи в контактном слое ДНК – SiO_2 [31]. Поэтому на величины адсорбции может влиять много факторов, таких как ионная сила, природа солей и буферных растворов, pH, температура, размер и конформация ДНК, а также характеристики адсорбента – пористость, размер пор, плотность функциональных групп и т.д. [44]. Влияние физико-химических характеристик растворов на адсорбцию в системе ДНК – SiO_2 в общем виде хорошо известно, и

оптимизация условий проводится при разработке каждой конкретной методики (коммерческого набора), тогда как влияние на адсорбцию внешних физических воздействий, таких как температурное и ультразвуковое, мало изучены. При этом они могут ключевым образом влиять на процессы массопереноса при выделении НК, что, в конечном счёте, и определяет эффективность всей процедуры очистки и концентрирования генетического материала.

Ввиду широкого спектра проб, содержащих нуклеиновые кислоты (биологические жидкости, останки биологических организмов, живые ткани, природная вода, почва), важно учитывать характеристики и примесный состав пробы. Несмотря на множество существующих способов борьбы с примесями, среди них нет универсального высокоэффективного метода, обеспечивающего удаление всех ингибиторов при выделении ДНК/РНК из поступивших проб. Для разработки такого метода или модификаций существующих решений стоит выбрать объект (целевую ДНК/РНК), который обладал бы рядом таких характеристик как: 1) был широко распространён и изучен, так как при разработке метода стоит исключить или учесть «нестабильное» поведение выделяемого вещества, чтобы не исказить конечный результат экспериментальной работы; 2) представлять практическую, социальную или биологическую значимость – это обстоятельство обеспечит актуальность разрабатываемых решений и возможность их внедрения; 3) обладать высокой стабильностью при длительном хранении.

1.2 Выбор объекта для выделения НК

Статистика распространения инфекционных заболеваний (ИЗ) показывает, что в странах с развитым здравоохранением, а в частности со средствами быстрого обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний удаётся контролировать и купировать возможные негативные последствия эпидемий.

Одним из самых распространённых инфекционных заболеваний в настоящее время является туберкулёз. До сих пор это ИЗ, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*, является основной причиной заболеваний и одной из

основных причин смерти во всем мире [44]. При этом диагностика на ранних стадиях этого заболевания затруднена ввиду сложности работы с пробами (чаще всего с мокротой) и необходимостью осуществлять длительные процедуры выявления подвидов туберкулёза (иногда до 7 дней), в течение которых потенциальный больной должен находиться на карантине, что приводит к значительному увеличению расходов на диагностику и предотвращение распространения этого опасного инфекционного заболевания. Ежегодно в мире заболевает около 8 млн. человек, а умирает от туберкулёза около 3 млн. человек, при этом эпидемиологическая ситуация в нашей стране за последние 3-5 лет значительно стабилизировалась и показатели заболеваемости находятся около 59,5 человек из 100 000 населения, что говорит о прямой зависимости уровня медицинского обеспечения населения и уровня развития средств и методов диагностики [45]. При этом ручная реализация выделения ДНК микобактерий туберкулёза является отправной точкой при разработке полуавтоматических и автоматических методов выделения, и её результаты необходимо учитывать при разработке технических и методических решений для высокоэффективного выделения НК. Актуальными образцами для анализа на содержание микобактерий туберкулёза является широкий спектр видов проб, так как данная бактерия характеризуется высокой способностью к длительному выживанию в объектах окружающей среды [46]. Таким образом, для разработки актуального метода выделения ДНК микобактерий туберкулёза необходимо анализировать различные пробы окружающей среды, такие как проточная вода, пробы почвы (смывы), соскобы с поверхности, при этом стоит отметить, что соскобы с поверхности и взятие образцов из растений в рамках наших задач очень близки к пробам почв, так как для осуществления забора пробы и работы с ней используются одинаковые методики, по переводу материала содержащего НК в жидкую фазу [47].

Чаще всего в качестве целевой НК для обнаружения микобактерий используют плазмиды, так как работа с ними менее трудна (нет необходимости разрушать структуры ядра и упаковки молекул ДНК микобактерий), а также

плазмида микобактерий туберкулёза хорошо изучена и исследована по ряду свойств, речь о которых пойдёт в данной работе позже (наиболее важны для данных исследований точка плавления плазмиды, и температура при которой она разрушается (фрагментируется)).

Таким образом, в качестве экспериментального образца объекта исследований была выбрана рекомбинантная плазмида pIS6110 микобактерий туберкулёза, так как является устойчивой при работе с ней, и хорошо исследована.

1.3 Лизис проб для выделения НК

После отбора проб окружающей среды, для последующего выделения НК требуется гомогенизация если проба представляет из себя биологическую ткань, клеточную культуру и др. Методы гомогенизации образцов подробно рассмотрены в работах [48,49]. Воздух, вода, почва, осадочные отложения и поверхности с биопленками могут быть расширенно объединены как образцы окружающей среды. Характерной чертой образцов окружающей среды является присутствие и биотических, и абиотических компонентов, причем первые представляют разнообразную коллекцию или сообщество микробов, животных и растений (в различной степени).

Таким образом, для выделения НК необходимо не просто провести процедуру лизиса, цель которого состоит в разрушении биологических структур и высвобождении нуклеиновых кислот, но и очистить пробу от абиотических компонентов. Абиотические компоненты могут быть представлены химическими соединениями и механическими примесями, этим обусловлено множество сопутствующих выделению НК приспособлений для предварительной фильтрации пробы перед лизисом [37,50].

Для лизиса клеток были разработаны самые различные методы, на выбор типа которых может влиять цель исследования (например, последующий анализ или создание метагеномной библиотеки бактерий), качество последующей очистки и тип анализируемой целевой молекулы. Существует небольшое

количество компаний, которые также разрабатывают оборудование (например, озвучивающие устройства и гомогенизаторы) и химические вещества (реагенты, ферменты и детергенты) для лизиса клеток, которые являются коммерчески доступными. Обзор существующих в настоящее время методов лизиса клеток в макро и микро масштабах представлен в работе [51]. Повышенное внимание к этой стадии подготовки пробы связано с тем, что для создания автоматизированных систем по принципу «образец на входе – ответ на выходе» (sample-in-answer-out) необходимы методы, которые не только легко автоматизируются и требуют минимального количества стадий дополнительной обработки пробы, но могут наиболее просто реализовываться в миниатюрном формате для конструирования портативных систем, а также легко совмещаются с последующими этапами выполнения анализа НК.

Существующие методы лизиса подразделяются на механические, к которым относят гомогенизаторы высокого давления и размалывание сферами, и немеханические. Последние, в свою очередь, условно подразделяются на физические методы (нагревание, осмотический шок, кавитация), химические методы (применение щелочи и детергентов) и биологические методы (с использованием ферментов). К физическим методам разрушения клеток относят размалывание (биение) сферами (beadbeating), растирание в ступке, замораживание – оттаивание или замораживание – кипячение, размалывание в жидком азоте, микроволновой тепловой шок, обработку ультразвуком. В работе [52] выделены две основные группы методов: химические/биологические методы и физические методы, а также отмечена возможность их сочетания. В работе [53] в качестве основных методов лизиса, применяемых в микрофлюидных системах, обсуждаются механический лизис, термический лизис, химический и электрический лизис, тогда как в работе [54] рассмотрены достоинства и недостатки двух основных групп методов – химических/биологических и физических методов лизиса. К преимуществу использования первой группы относят простоту выполнения и отсутствие сложного оборудования, минимальное энергопотребление или даже его

отсутствие, однако главными недостатками являются остатки реагентов, которые могут ингибировать процессы последующей амплификации при ПЦР и должны быть удалены в ходе дополнительных последующих стадий подготовки пробы.

Известно, что одна из проблем, возникающая при выборе адекватного метода лизиса клеток, возникает из-за значительных отличий в структурах клеточных мембран разных микроорганизмов [55].

Поэтому выбор того, какой метод лизиса использовать, является важным решением, который может ограничить, расширить или упростить приготовление НК [12], однако очень часто в литературе встречаются противоречивые суждения об эффективности применения и преимуществах того или иного метода. К наиболее простым по выполнению методам, не требующим специального (часто дорогостоящего) оборудования и/или использования дорогих реактивов можно отнести тепловой метод, метод осмотического шока и щелочной лизис.

В представленной диссертации выбор пал на температурный лизис, так как он является одним из самых распространённых и простых с точки зрения реализации при автоматизации выделения НК [54].

1.3.1 Сложные пробы для выделения НК

В работе [56] указывалось, что каждый тип анализируемых образцов приводит к своим собственным проблемам, которые в некоторой степени объясняют разнообразие методов, которые можно найти в литературе. К образцам, наиболее сложным для выделения нуклеиновых относят почвы, и, вероятно, поэтому еще 15 лет назад количество разработанных протоколов, созданных для выделения НК из таких образцов, было названо «обескураживающим» [57]. Эта чрезвычайная сложность является результатом множества взаимодействующих параметров, включающих текстуру и структуру почвы, содержание воды, рН, климатические изменения и активность биоты [49]. Кроме того, как отмечается в этой же работе, текстура и структура почвы

определяется, главным образом, песком, илом, глиной и содержанием органических веществ, причем искомые микроорганизмы неоднородно распределены внутри микроагрегатов и в макропорах снаружи микроагрегатов и сильно связываются с частицами почвы (включая глину).

Для улучшения извлечения ДНК были разработаны две основные стратегии, которые оценивались с точки зрения выхода, чистоты и неискаженного представления микробного многообразия: 1 - прямая экстракция НК из почвы с помощью *in situ* лизиса клеток с последующей очисткой ДНК; 2 - отделение бактерий от частиц почвы, за которым следует лизис клеток, а затем очистка ДНК [50]. Выбор метода – прямого или непрямого – зависит от ожидаемого результата: 1) прямые методы дают относительно большое количество ДНК с широким спектром микроорганизмов, присутствующих в почве; 2) непрямые методы применяются, когда требуется высокая чистота ДНК, которая имеет решающее значение для последующего анализа [57,58,59].

Метод лизиса, который выбирается и который зависит непосредственно от типа почвы, приведет к различной степени фрагментации ДНК и ее качества. Для того, чтобы удалить нежелательные загрязняющие вещества, дополнительные протоколы были разработаны и используются на различных стадиях выделения и очистки ДНК.

В случае образцов окружающей среды – из-за слишком большого количества переменчивых параметров – не существует универсального метода экстракции, и выбор метода экстракции, и его оптимизация должны выполняться индивидуально для каждой среды [60].

На настоящий момент, в подавляющем большинстве производимых (имеющихся на рынке) наборов, автономных устройств и приборов пробоподготовки в составе интегрированных систем, предназначенных для выделения и очистки НК из разных образцов, в качестве функциональных элементов используются спин колонки и магнитные частицы.

В данной диссертации, основная цель состоит в разработке экспериментальной установки, и оценке её работоспособности в соответствии с

подходом, позволяющим создавать и повышать эффективность методик для выделения НК в автоматическом режиме. В заключение к данному разделу следует отметить, что первоначальная методика выделения разрабатывается для моделей, и вероятнее всего потребует адаптации для работы с реальным образцом, при этом сохраняя закономерности, выявленные при её создании.

1.4 Влияние температуры на выделения нуклеиновых кислот

Как известно, повышение температуры приводит к увеличению интенсивности броуновского движения (теплового шума), что в свою очередь повышает скорость взаимной диффузии при смешивании например двух реагентов или равномерному распределению частиц суспензии по всему объёму растворителя, поэтому в большинстве методик во время сорбции НК на сорбенте рекомендуется повысить температуру до 50-70°C. При этом однозначных данных о зависимости эффективности сорбции ДНК/РНК от изменения температуры пробы в литературе нет [1].

К настоящему времени получен ряд данных по влиянию температуры на эффективность выделения ДНК/РНК, так, при изучении изотерм адсорбции сверхспирали ДНК рUC18 на частицах SiO₂ при 23 и 37°C установлено, что реакция связывания ДНК в 6 М растворе перхлората является при рН 8 «немного эндотермической», при значениях рН 7 является атермической, а при рН ниже 7 – «слегка экзотермической» [37]. После изучения адсорбции ДНК, выделенной из тимуса теленка, на морском песке аналитической степени чистоты при 3, 23, 37 и 50°C авторами [61] сделан вывод, что между степенью адсорбции и температурой корреляции нет. Изучение адсорбции ДНК на диатомите в Zn-форме в диапазоне 5 ÷ 35°C показало, что адсорбция максимальна при 5°C; при 15 и 25°C адсорбция немного уменьшается и резко снижается при 35°C [62].

При разработке микро-экстрактора ДНК определяли адсорбцию плацентарной ДНК на SiO₂ в интервале температур 25 ÷ 70°C в буфере в присутствии гуанидин хлорида [63]. Показано, что зависимость адсорбции от температуры имеет колоколообразную форму с максимумом при 50°C; изменение адсорбции при изменениях температуры объясняли

конформационными перестройками в молекуле ДНК [63]. (В целом эксперимент имел большие флуктуации результатов: значения отличались в среднем на 35% от средних значений [63]).

Метод выделения ДНК с помощью магнитных частиц, покрытых SiO_2 , применен к фрагментам λ -бактериофага в диапазоне температур от 5°C до 99°C [64]. Наибольший выход получен при 20°C . Наименьший выход ДНК наблюдали при 5°C , затем выход увеличивался (с максимумом при 20°C), после чего уменьшался вплоть до 60°C и далее опять увеличивался при 99°C (однако был меньше, чем при 20°C).

В работе [65] со ссылкой на литературные данные сообщается, что оптимальными условиями для проведения сорбции ДНК являются высокая ионная сила раствора, значения pH в интервале 3.5 – 6.5 (оптимум pH 5) и температура выше 37°C . Повышение температуры до 35°C и иногда до 80°C применяется в ВЭЖХ для улучшения массопереноса денатурированных олигонуклеотидов между стационарной и подвижной фазами, но имеет ограниченное применение в случае материалов на основе SiO_2 из-за растворения последней со временем [66].

Работ по систематическому исследованию температурных эффектов при динамическом режиме адсорбции ДНК на SiO_2 в широком диапазоне температур обнаружено не было, поэтому выяснение этой зависимости стало одним из приоритетных направлений экспериментальной работы.

1.5 Акустическое воздействие на выделение нуклеиновых кислот

Ещё с начала 80-х годов XX века в ИАП РАН, в кооперации с научными учреждениями СССР, проводились исследования по влиянию акустических полей на характеристики сорбционных процессов биологически активных молекул, отдельных клеток и неорганических соединений в жидкой среде [67,68]. С использованием различных режимов воздействия ультразвука на жидкую пробу, были продемонстрированы возможности создания высокоэффективных методик и способов для очистки, концентрирования и

фракционирования различных объектов – от отдельных химических веществ до клеток крови и биологических организмов [67,69]. Результаты данных исследований были обобщены во множестве научных отчетов и статей [67-75].

В настоящее время применение некоторых вспомогательных полей для твердофазной экстракции нуклеиновых кислот (НК), таких как магнитное, постоянное и переменное, температурное, привело к существенному увеличению скорости процесса и повышению его надёжности.

Известно, что начальные скорости адсорбции ДНК на различных гидрофобных и гидрофильных поверхностях контролируются процессами диффузии [76]. Поэтому для повышения эффективности выделения и концентрирования ДНК может быть использовано не только изменение температуры, но и эффекты, возникающие при действии ультразвука. Уникальной особенностью ультразвуковых полей является возникновение в озвучиваемых средах множества физических и химических эффектов, которые могут применяться с различными целями [77-81]. В частности, показано, что воздействие ультразвуковых колебаний на процесс диффузии в гетерогенных системах может изменять условия переноса веществ как в объеме раствора и диффузионном слое, так и в твердой пористой среде, и этот эффект должен зависеть от параметров диффузионной системы и звукового поля [82]. Возникновение же акустических микропотоков на границах раздела фаз в ультразвуковом поле приводит к существенному уменьшению толщины, диффузионного слоя [82].

Так, например, при проведении гетерогенного метода иммуноанализа с использованием 15 мкм иммуносорбента в 3 МГц ультразвуковом поле стоячей волны установлено, что в результате ускоренного массообмена, обусловленного акустическими течениями вблизи шариков иммуносорбента, чувствительность метода увеличивается в $2 \div 100$ раз в зависимости от типа иммуноактивного объекта [74].

Показано, что терапевтический ультразвук (1 МГц) увеличивает коэффициенты диффузии при трансдермальном транспорте лекарств в 15 раз, но

не оказывает существенного влияния на коэффициент распределения [83]. В работе [84] сообщается, что применение акустического течения Шлихтинга, создаваемого в стоячей волне при очень малых фазовых модуляциях, позволяет улучшить диффузию металлов через пограничный слой к электроду в электрохимических процессах значительно лучше, чем любые другие методы перемешивания. Акустические микротечения со скоростью около 1 мм/с, создаваемые в 1.64 МГц стоячей волне в коротких (полуволновых) резонаторах, предложено применять для увеличения чувствительности сенсоров токсичности на основе сфероидов гепатоцитов, удерживаемых в узлах давления ультразвукового поля в статическом режиме [85].

В работе [86] обоснован и целенаправленно использован акустический метод для создания вихревых потоков Рэлея в микроканалах ферментного проточного многоканального микрореактора с иммобилизованным на стенках трипсином. В условиях ~ 6 МГц поля стоячей волны возникал поперечный акустический вихревой поток, увеличивающий перемешивание и конвективный транспорт, в результате чего эффективность реактора возрастала на 15 – 20%. По мнению авторов [86], микро вихри переводили движение субстрата из быстрого проточного режима в параболический профиль потока, обеспечивая доставку субстрата к поверхности катализатора.

В работах [87,88] подробно изучена и продемонстрирована возможность применения фокусированного 1.5 МГц акустического поля для создания на гетерогенной границе течений Шлихтинга со скоростями не меньше 4 мм/с, которые достаточны для эффективной интенсификации массообменных процессов на этой границе (на примере процессов контролируемого роста монокристаллов соли). Показано, что использование фокусированного поля при условиях, обеспечивающих значительный поперечный градиент поля и достаточную интенсивность, позволяет обеспечить локальное действие на процесс массообмена на границе и его пространственный контроль, например, с помощью сканирования фокусной областью поверхности мишени.

Однако работы по исследованию возможности применения ультразвуковых полей для выделения и/или ускорения и/или увеличения адсорбции ДНК, по имеющейся у нас информации, носят единичный характер.

Например, в работе [89] был предложен прямой метод концентрирования ДНК (плазмидный вектор pUC18 ДНК с 2686 парами оснований) с помощью акустической радиационной силы. Создание некавитирующего поля ультразвуковой стоячей волны при частоте 380 кГц в камере, содержащей смесь водных растворов с 70% этанолом в присутствии NaCl, приводило к образованию крупных кластеров ДНК в узлах давления.

Фирмой ProkumaTechnologiesLtd (Великобритания) запатентовано применение ультразвука в комплексном методе экстракции и очистки биологических клеток, в частности, перед анализом методом ПЦР таких материалов, как кровь или почва [90]. Метод основан на удерживании и агрегировании клеток в одном или нескольких узлах акустического давления и вымывании потоком жидкости загрязняющих веществ и ингибиторов, содержащихся в пробе и затрудняющих проведение последующей реакции ПЦР. Удержанные биочастицы далее могут подвергаться лизису с помощью химических или ферментных препаратов или ультразвука, как в отсутствие, так и в присутствии активированных частиц (двуокиси кремния, керамических или стеклянных частиц и т.д.). В последнем случае ускорение извлечения ДНК с помощью частиц (1 ÷ 50 мкм) достигается с помощью акустического течения.

В швейцарском федеральном технологическом институте целью пилотного проекта является использование ультразвукового манипулирования частицами для связывания (концентрирования) молекул ДНК из раствора с помощью маленьких сфер двуокиси кремния; сообщается, что в ходе предварительных исследований получены результаты, доказывающие правильность концепции, и поставлена задача систематического изучения пределов применимости этого подхода [91].

Таким образом, одна из задач, решаемых при подготовке диссертации, состояла в сравнительном исследовании влияния температуры и

фокусированного ультразвукового поля на эффективность процесса сорбции НК при использовании коммерческого набора для выделения нуклеиновых кислот с помощью спин колонок и магнитных частиц.

Выделение, концентрирование и очистка НК из больших объемов растворов макро- и микро-методами

Результаты ПЦР анализа при диагностике инфекционных заболеваний и мониторинге окружающей среды сильно зависят от присутствия ингибиторов в анализируемых пробах и от недостаточной чувствительности при анализе образцов с очень низкой концентрацией патогенов (целевой НК), приводящих к получению ложноотрицательных результатов при диагностике или при оценке безопасности окружающей среды или качества систем водоподготовки. Поэтому уже в конце 20-го века началось развитие принципов, технологий и методов, направленных на одновременное решение двух задач – очистки и концентрирования НК из проб с очень низкими концентрациями НК, содержащих вещества, которые могут потенциально ингибировать ПЦР.

Основными подходами для решения этих задач (увеличения эффективности выделения и очистки) явились:

- интенсификация процесса сорбции НК, достигаемая увеличением до максимума степени извлечения из конечного, порционно загружаемого, фиксированного объема проб с помощью активного перемешивания и многократного пропускания одного и того же объема пробы через сорбент (циклический режим);
- увеличение объема исследуемой пробы в режиме периодической загрузки;
- организация протекания большого объема пробы через сорбент;
- применение физических полей разной природы (поля температур, ультразвукового поля).

Примером реализации первого направления является технология TruTip[®], которая основана на применении пористой монолитной связывающей матрицы (TruTip[®]), подстраиваемой по геометрии и вводимой в одноразовые наконечники

пипеток с объемами от 1.0 до 5.0 мл [92,93]. Благодаря погружению пористого монолита внутрь наконечника пипетки обратное давление жидкости уменьшается, что позволяет регулировать поток с помощью вытягивания раствора пробы пипеткой. Эта особенность позволяет значительно упрощать процесс экстракции и оборудование (аппаратуру), необходимые для очистки НК из трудных типов образцов. Геометрия и пористость монолита обеспечивает достаточную емкость связывания НК при объемах образца от 1,0 мл до 5.0 мл.

Метод TruTip[®] стал основой новой автоматизированной платформы для экстракции ДНК/РНК из разных клинических образцов – TruTip[®] Automated Sample Prep Workstation (Akonni Biosystems, USA) [93].

В то же время для широкого применения такого устройства необходим массовый выпуск соответствующих пористых сорбентов со стандартизированными и одинаковыми физико-химическими и механическими свойствами и плотной подгонкой к внутренним поверхностям наконечников, что, вероятно, является непростой задачей.

Проточные режимы первоначально разрабатывались для выделения и концентрирования различных клеток, в первую очередь, бактериальных. Особое внимание в этом случае было уделено созданию микрофлюидных проточных систем вследствие микрообъемов реакционных камер, а позднее и при концентрировании и очистке НК [95-98].

Задача масштабирования процессов выделения клеток, белков и нуклеиновых кислот из больших объемов растворов для увеличения выделяемых количеств этих веществ начала решаться в конце 20-го века и привела к появлению новых методов и устройств, являющихся альтернативой традиционным методам жидкофазной и твердофазной колоночной экстракции. Так, в работе [99] была описана разработанная простая процедура для твердофазной экстракции, основанная на использовании магнитных или намагничиваемых адсорбентов и названная этими авторами магнитной твердофазной экстракцией (МТФЭ). В этой процедуре магнитный адсорбент добавляется к раствору или суспензии, содержащей целевой анализ, анализ адсорбируется на магнитном адсорбенте, и

затем адсорбент с адсорбированным анализом извлекают из суспензии с помощью магнитного сепаратора, после чего анализ элюируют из извлеченного адсорбента и анализируют. Для выделения магнитных комплексов из больших объемов суспензий (вплоть до объемов 500-1000 мл) могут использовать плоские магнитные сепараторы [100].

Высокоградиентные магнитные сепараторы лабораторного масштаба (HGMS) содержали маленькие колонки, свободно упакованные тонкой сеткой из нержавеющей стали (магнитного класса) или маленькими стальными шариками, расположенными между полюсами сильных постоянных магнитов или электромагнитов. Магнитно–меченые структуры проходят через колонку, захватываются и удерживаются внутри стальной матрицы, а после удаления колонки из магнитного поля захваченные структуры высвобождаются под действием потока и обычно применяемой мягкой вибрации [100].

На рынке уже имелись несколько систем для высокопроизводительного выделения нуклеиновых кислот и белков. Сепараторные платформы, имевшиеся в то время на рынке, выпускались, например, такими фирмами как Qiagen (США) – серии приборов BioRobot и BioSprint, Tecan (Япония) – прибор Te-MagS и Thermo Electron Corporation (США) – приборы KingFisher.

Получили развитие и методы магнитной аффинной сепарации, применявшиеся в молекулярной биологии для выделения нуклеиновых кислот (и РНК, и ДНК) и олигонуклеотидов. Специфичные олигонуклеотиды, иммобилизованные на магнитных частицах, связываются со специфичными (определенными) центрами целевых нуклеиновых кислот и затем выделяются с помощью магнитов. Выделенные нуклеиновые кислоты могут быть элюированы из сфер и использоваться для последующих применений [101].

Применение иммуномагнитной сепарации в качестве метода концентрирования было использовано во многих процедурах выделения в микробиологии. Сообщалось об уменьшении времени детектирования для бактерий, отравляющих пищу, как и о клиническом выделении патогенных бактерий в крови и образцах фекалий. Предполагалось, что разработки с

использованием сочетания процедур иммуномагнитной сепарации, гнездовой ПЦР и колориметрической визуализации ДНК (DIANA) сделают возможным полную автоматизацию аналитического процесса [102].

Отмечая огромное количество и многообразие систем, имевшихся на рынке в самом начале 2000-х годов, автор обзора [28] делает вывод, что все еще не были созданы реальные системы для очистки больших объемов образцов в масштабе литров.

Вариант процесса выделения НК с помощью магнитных частиц, аналогичный применению проточных сепараторов, рассмотренному выше, разрабатывается в настоящее время для крупномасштабного применения при очистке мРНК для получения вакцин [103]. По этому протоколу после лизиса клеток получают комплексы РНК с магнитными сферами, функционализированными oligo(dT), которые выделяют с использованием магнитного поля. После этого примеси удаляют на стадиях промывания, и элюирование мРНК может быть инициировано повышением температуры. Для уменьшения времени, необходимого для очистки большего количества мРНК вакцины, необходимого для клинических испытаний, применим вариант высокоградиентной магнитной сепарации (HGMS), при котором магнитные сферы селективно удерживаются в проточной сепарационной камере, содержащей специальную фильтрующую матрицу («магнитный фильтр»). Разработана и изготовлена одноразовая сепарационная камера, изготовленная с помощью 3D-печати. Камера протестирована с использованием суспензии частиц Dynabeads MyOne с oligo(dT)-функциональными группами, нагруженных синтетической мРНК. Установлено, что эти 1-мкм магнитные частицы удерживаются в количестве более 99.39% при объемных скоростях потока вплоть до 150 мл/мин^{-1} ; при объемных скоростях потока ниже 50 мл/мин^{-1} , масса удерживаемых частиц составляет больше 99.99%.

Для предотвращения возможной агломерации частиц в магнитном поле и для деагломерации проводили ультразвуковую обработку суспензии перед каждым опытом по магнитной сепарации, гарантирующую сохранение первоначального

распределения частиц по размерам. Для этой цели использовали частоту ультразвука 20 кГц.

Принцип магнитного фильтра предложен в работе [104] для аналитического применения и, по оценке авторов разработки, пригоден для выделения и концентрирования НК из маленьких или больших объемов образцов. Продемонстрирована полезность метода на примере экстракции туберкулезной ДНК из мокроты и мочи с эффективностью 10 и 90%, которая сопоставима с результатами, полученными в параллельных опытах с коммерческими наборами (10-17% и 70-96% соответственно). Преимуществом этого метода ручной экстракции является сохранение ~100% захвата частиц при скоростях потока вплоть до значений 45 мл/мин⁻¹ и вязкости до значений 55 сП, что доказано экспериментально. Эти данные свидетельствуют о возможности применения предложенного метода для экстракции НК из широкого многообразия типов образцов, в том числе, в полевых условиях. Для доказательства правильности принципов использованы объемы образцов 100 мкл, проверена работоспособность метода при объемах проб до 3 мл. Кроме того, метод показал хорошие результаты при сравнительных испытаниях шести методов с использованием слепых проб [105].

Подробный обзор микрофлюидных систем, созданных в начале 2000-х годов на основе твердофазной экстракции и предназначенных для очистки ДНК, представлен в работе [106]. Рассмотрены результаты работ с использованием таких твердых фаз, как сферы двуокиси кремния, золь-гель системы или ионообменные смолы, которые легко упаковываются внутрь микроустройств для создания слоев или колонок для очистки ДНК.

Примерами, опровергающим часто высказываемое мнение об ограничениях микрофлюидных систем, вызванных низкими скоростями потока и маленькими объемами проб, является ряд работ, опубликованных после публикации обзора [106], и свидетельствующих о возможности извлечения и очистки НК из больших объемов реальных сред (10 мл) при достаточно высоких скоростях потока. Авторами [107] представлен полностью автоматизированный модуль

очистки ДНК, состоящий из микрочипа и системы последовательного инъекционного анализа. Модуль разработан для использования внутри автономных приборов, которые проводят непрерывный мониторинг окружающей среды на присутствие биологических опасных агентов. В чипе имеется эллиптический проточный канал, содержащий стержни, покрытые двуокисью кремния; он может использоваться повторно после обработки гипохлоритом натрия для предотвращения контаминации. Экспериментально показано, что устройство способно извлекать и очищать геномную ДНК *Bacillus anthracis* из искусственно инфицированных образцов аэрозоля окружающей среды с последующим анализом методом количественной ПЦР.

В работе исследовано влияние различных параметров на характеристики экстракции, включая скорость потока, входной объем образца и элюируемый объем, влияние осколков клеток, полученных после лизиса *B. anthracis*. Автоматическая процедура экстракции проверялась с использованием 100-мкл водных растворов с внесенной геномной ДНК *B. anthracis* по традиционной схеме: экстракция в присутствии тиоцианата гуанидина, промывание этанолом, элюирование ДНК при 80°C. Изучение влияния входного объема на коэффициент концентрирования показало, что при обработке 10 мл образца достигается коэффициент концентрирования ~80; общее время процесса составляет ~20 мин при скорости потока 100 мкл s⁻¹. Диапазон тестируемых значений (массы вещества на входе) составляет от 0.32 to 320 пг, что эквивалентно диапазону значений от 50 до 5 × 10⁴ копий.

В работе [108] представлен новый метод магнитной экстракции, разработанный с использованием 3D печати и магнитных частиц двуокиси кремния для экстракции целевой ДНК из большого объема реального образца (10 мл молока) в сочетании с микрофлюидной ПЦР для быстрого обнаружения бактерий *Salmonella Typhimurium*. Выделение ДНК проводили в змеевидном канале чипа, в котором формировались цепи магнитных сфер двуокиси кремния под действием однородного магнитного поля, создаваемого двумя

концентрическими полукруглыми магнитами. Формирование таких цепей, по мнению этих авторов, улучшало захват молекул ДНК из протекающего раствора.

Экспериментально установлено, что эффективность экстракции ДНК составляет более 90% и нижний предел обнаружения бактерии *Salmonella* составлял 10^2 КОЕ·мл⁻¹. Оптимальной скоростью потока является 0.25 мл·мин⁻¹.

Также следует отметить оригинальный подход, предложенный в 1998 году в работе [109] и основанный на использовании всех преимуществ магнитных частиц для увеличения чувствительности анализа – возможности применения одних и тех же частиц, сначала для концентрирования бактерий и затем для последующего выделения НК. Такой метод может быть очень полезен для осуществления экологического мониторинга.

Этот подход, в сущности, реализован в работе [110], в которой сообщается о (3D)-напечатанной миллифлюидной платформе, которая позволяет осуществлять предварительное концентрирование бактерий и очистку геномной ДНК (gDNA) для улучшения детектирования целевых патогенов в образцах крови. Устройство может быть применено для предварительного концентрирования патогенов магнитными наночастицами, конъюгированными с антителами, и последующей экстракции ДНК с использованием магнитных сфер двуокиси кремния. Результаты экспериментов показывают, что на платформе можно предварительно сконцентрировать очень низкие концентрации (1–1000 КОЕ) бактерии *Escherichia coli* O157:H7 и экстрагировать ее геномную ДНК из 10 мл буфера и 10% крови в течение 30 минут. Рабочие характеристики платформы проверены при детектировании всего 1 КОЕ of *E. coli* O157:H7 в 10% крови с использованием или ПЦР с последующим гель электрофорезом или количественной ПЦР.

Таким образом, представленный обзор работ показывает, что в настоящее время существуют и разрабатываются многообразные подходы для повышения эффективности выделения и очистки НК. Кроме того, в результате целенаправленных исследований появляется возможность применения микрофлюидных систем, основанных на разных принципах, для выделения и

очистки НК из реальных образцов объемом 10 мл в проточном режиме с достаточно высокими скоростями. Более того, о большом потенциале микрофлюидных систем свидетельствует приведенный в обзоре пример создания полностью автоматизированного микрофлюидного модуля с высокими рабочими характеристиками.

Перспективность проточных вариантов выделения НК во многом обусловлена необходимостью работы с пробами с низкой концентрацией НК. Комплексное решение задач по определению наиболее эффективных способов выделения нуклеиновых кислот позволило сформировать ряд требований к техническим характеристикам устройств для автоматизации данного процесса.

1.6 Современные автоматизированные системы для выделения НК

Анализ современного состояния развития автоматизированных комплексов и систем для выделения НК показал, что их можно разделить на несколько групп в зависимости от технических решений, используемых в них:

- по организации обработки образцов, где системы могут реализовывать разделенные потоки, когда каждый образец обрабатывается в изолированном блоке, исключающем контакт с окружающей средой и другими образцами, и обработку в общем потоке, при котором образцы находятся в контакте с окружающей средой на протяжении процесса выделения;

- по применяемым расходным материалам, где системы разделяются на закрытые, в которых применяются специальные расходные материалы - специализированные картриджи и на открытые, в которых используются широко распространенные расходные материалы (пробирки, колонки, и др.) и реагенты.

Системы с разделенными потоками обработки жидкости являются закрытыми, поскольку в них применяют специальные картриджи, позволяющие осуществлять различные этапы выделения. Такие системы обычно обладают более компактным строением и удобны в обслуживании. Важнейшим преимуществом этих систем является отсутствие контакта образцов друг с другом и с окружающей средой, что исключает возможность перекрестной

контаминации в процессе выделения и снижает требования к организации рабочего пространства. Также значительно снижается риск загрязнения реагентов, которые уже находятся в картриджах и не требуют ручной подготовки. Кроме того, такие системы требуют относительно простых подготовительных процедур и небольших временных затрат на подготовку к работе.

В связи с необходимостью создания специализированных расходных материалов, а также невысокой производительностью выделения с помощью картриджей, по-прежнему актуальны автоматизированные приборы планшетного типа; характерные представители таких коммерчески выпускаемых приборов будут представлены ниже.

Японская компания KuraboBiomedical разработала прибор QuickGene-810, представленный на рисунке 1.1, прибор также производится в Северной Америке компанией AutoGen. Для выделения НК используется технология QuickGene, схема которой представлена на рисунке 1.2. Выделение осуществляется на ультратонкой полимерной мембране, позволяющей выделять РНК или ДНК с высокой концентрацией, подходящей для широкого спектра дальнейших манипуляций. QuickGene-810 обрабатывает 8 образцов за 10 минут. В системе имеются протоколы работы для экстракции РНК из крови, клеток и тканей и протоколы для извлечения ДНК из крови, клеток и тканей [111].

Выделенные продукты могут в дальнейшем использоваться для проведения ПЦР-РВ анализа. Данный прибор можно отнести к представителям планшетного типа, так как забор реагентов для последующих выделений происходит из общих установленных объёмов, то есть выделение требует подготовки, связанной с отдельными операциями установки (заправки реагентов).

Адсорбция нуклеиновых кислот происходит в пористой мембране толщиной 80 мкм. Из-за адсорбционных и десорбционных свойств мембраны НК можно выделить при низком давлении и без применения центрифугирования, механизм проиллюстрирован на рисунке 1.1 [111].



Рисунок 1.1 – Выделение ДНК из крови по технологии AutoGen [111]

Проницаемая пористая мембрана толщиной 80 мкм сорбирует НК в среде гидрофобных растворителей, отделяя их от белков и липидов. НК из-за их гидрофильных свойств сорбируются на мембрану, а липиды и белки являются относительно гидрофобными и могут просачиваться через мембрану.

По сравнению со стекловолокном пористая пленка обеспечивает выделение НК за более короткие сроки. Сравнительные фото мембран представлены на рисунке 1.2.

Время выделения НК на приборе QuickGene-810 составляет 6 – 15 минут в зависимости от выбранного протокола. Доступные образцы для выделения НК ограничиваются клиническими образцами (кровь, лимфа, мокрота). Размер прибора составляет 450*335*400 мм, при массе в 21 кг, таким образом, прибор может быть размещён непосредственно на рабочем месте лаборанта и в вытяжном шкафу или на столе. **Основным недостатком** предлагаемой системы является возможность работы только с чистыми образцами, с минимальным присутствием мешающих примесей, что существенно сказывается на применимости данного прибора для выделения НК из широкого спектра проб. Среди **преимуществ** следует отметить сравнительно невысокую стоимость

однократного выделения и время выделения, что в среднем в 1,5-2,5 раза меньше, чем на аналогичных устройствах.

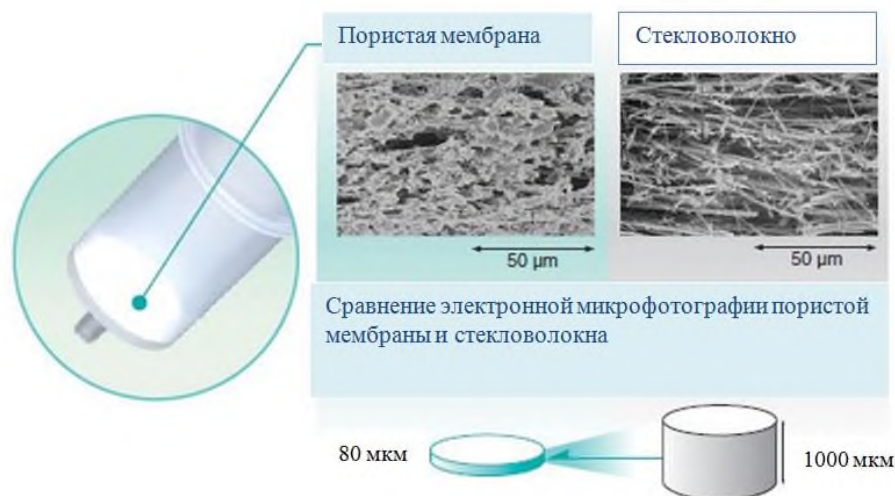


Рисунок 1.2 – Сравнение электронной микрофотографии пористой мембраны и стекловолокна [111]

Прибор для автоматического выделения НК BioRobot EZ1 производится компанией QIAGEN(Германия). BioRobot EZ1 может производить выделение одновременно шести образцов за 20 мин. [112]. Для получения большего количества образцов используют модифицированные BioRobots, такие как M48 или M96. Они основаны на одной и той же технологии – выделение на силикатно-магнитных частицах MagAttract.

Время выделения НК на приборе BioRobot EZ1 составляет 20-30 минут в зависимости от выбранного протокола. Доступные образцы для выделения НК не ограничиваются клиническими образцами, также выделять НК возможно из образцов ткани и некоторых образцов окружающей среды (например, вода из природных водоёмов). Размер прибора составляет 320*540*500 мм при массе в 25,8 кг, таким образом, прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием. **Недостатком** данного прибора является высокая степень возможной контаминации, так как в приборе не организованы отдельные потоки жидкостей, что создаёт угрозу при техническом сбое – контаминирование (загрязнение) всей системы. Среди **преимуществ** следует отметить возможность обработки большого потока проб за короткое время

(около 20 минут), что в совокупности с большой производительностью особенно актуально в диагностических медицинских лабораториях и клинической практике.

Следующий прибор для автоматического выделения НК немецкого производства GenoXtract [113].

GenoXtract может автоматически выделять НК из различных образцов. Благодаря многоканальной системе пипетирования данный прибор может одновременно обрабатывать до 12 образцов. Выделение ДНК/РНК основано на магнитной сепарации, схема которой представлена на рисунке 1.3. В качестве проб могут обрабатываться образцы мокроты, крови, сыворотки, мазков или клеточных гранул. Все необходимые реагенты запаяны в одноразовые картриджи. В приборе имеется интегрированный нагревательный блок для нагрева пробы до 100°C, что обеспечивает термостатирование при выделении НК. Ультрафиолетовая лампа используется для инактивации пробы и может быть дополнительно включена после окончания выделения.

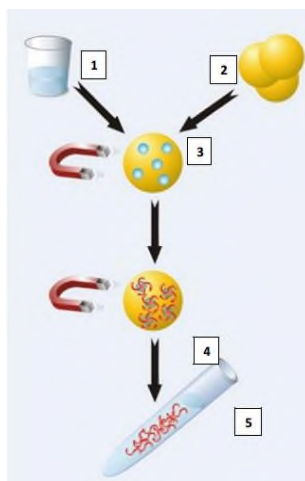


Рисунок 1.3 – Выделение НК на магнитной частице, где 1 – смешивание пробы со специальным буфером для лизиса и сорбции НК, 2 – смешивание пробы с магнитными частицами, 3 – промывка сорбента при его удерживании в магнитном поле, 4 – десорбция НК с поверхности сорбента в элюирующем буфере [113]

Время выделения НК на приборе GenoXtract составляет 35-43 мин (в зависимости от протокола работы). Доступные образцы для выделения НК ограничиваются клиническими образцами. Размер прибора составляет 445*465*445 мм, при массе в 23 кг, таким образом прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием.

Одним из **недостатков** GenoXtract является низкий выход (низкая степень концентрирования) нуклеиновых кислот при работе с пробами с низкой концентрацией НК. Среди **преимуществ** следует выделить производительность – до 12 образцов одновременно, а также наличие нагревательного блока, что существенно расширяет возможности по обработке различных образцов для выделения НК.

Компания PerkinElmer из США выпустила автоматизированную систему для выделения НК – Chemagic MSM I Instrument, в основе работы которой лежит запатентованная технология M-PVA Magnetic Beads [114-116].

Процесс выделения на Chemagic MSM I Instrument происходит следующим образом: в начале работы протокола выделения, стержни закрепляются в наконечники, чтобы защитить их от загрязнения через пробу или покоящиеся частицы, далее стержни отпускают в емкость с магнитными частицами. Далее включают электромагнит, и магнитные частицы притягиваются к стержню, после чего стержни с магнитными частицами опускают в раствор образца. После того, как электромагнит выключают, частицы спадают со стержней и связываются с ДНК. После связывания электромагнит снова включают, и ДНК, связанная с частицами, притягивается к стержням. Далее следует несколько процедур промывки, которые повторяются несколько раз в соответствии с протоколом. Элюирование НК на следующем этапе происходит так же, как и на предыдущих этапах [114].

На последнем этапе стержни автоматически удаляются из емкостей вместе с магнитными частицами; схема описанной методики представлена на рисунке 1.4.

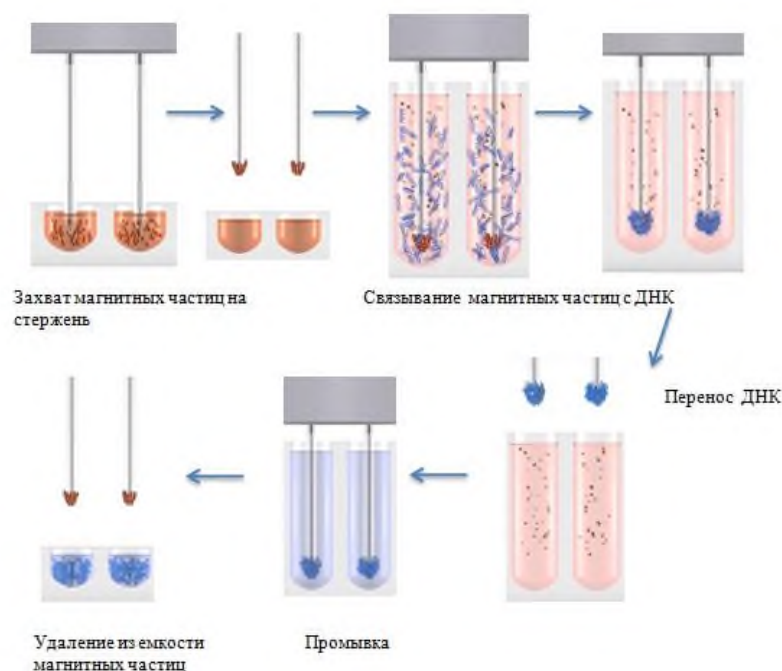


Рисунок 1.4 – Схема реализации методики выделения НК на приборе Chemagic MSM I Instrument [114]

Chemagic MSM I Instrument может применяться для получения НК из различных клинических образцов. Одновременно может происходить обработка до 12 образцов объемом от 10 мкл до 600 мкл. Время выделения НК составляет менее 15 мин [116]. Размер прибора составляет 800*800*900 мм, при массе в 140 кг, таким образом, прибор может быть размещён в лаборатории при подготовленном отдельном месте стационарного базирования.

Среди **недостатков** следует отметить небольшой объём пробы для анализа, что негативно может сказываться на представительности пробы, если речь идёт о пробах окружающей среды, а также высокую стоимость выделения за счёт использования специализированных магнитных частиц. Среди **преимуществ** стоит отметить время выделения, которое составляет менее 20 минут.

Компания Roche Applied Science (Швейцария) разработала серию приборов для быстрого автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот и подготовки реакционных смесей для ПЦР, выпускаемых под названием MagNaPure LC 2.0 [117].

Система MagNa Pure LC[®] 2.0 — роботизированная система для выделения и очистки нуклеиновых кислот из различных типов образцов с помощью магнитных частиц, а также для подготовки ПЦР-смесей.

Система позволяет:

- за один раз обрабатывать до 32 образцов;
- выделять НК из различных объемов пробы от 20 до 1000 мкл;
- получать очищенный препарат НК в объеме от 25 до 200 мкл;
- проводить подготовку (раскапывание) ПЦР-смесей после выделения и очистки НК для последующего ПЦР-анализа в пробирках для любых ПЦР-приборов, в т.ч. пробирки в стрипах для 96-луночных планшетов, пробирки для приборов роторного типа.

Время выделения НК на приборе MagNa Pure LC 2.0 составляет 60-180 мин (в зависимости от протокола работы). Размер прибора составляет 1080*770*910 мм, при массе в 170 кг, таким образом, прибор может быть размещён в лаборатории при подготовленном отдельном месте стационарного базирования.

Недостатком данного прибора является низкая степень защиты от контаминации, так как данная система построена по планшетному принципу, и существует вероятность загрязнения образцов, расположенных рядом в планшете для обработки проб. Среди **преимуществ** стоит отметить, что данная система позволяет осуществить автоматическую подготовку к дальнейшему ПЦР анализу, что экономит время, а также снижает влияние человеческого фактора.

Система MagCore HF 16 (48), производства RBC Bioscience, Тайвань – это роботизированная система для выделения и очистки НК из различных типов образцов, основанная на адсорбции ДНК/РНК на магнитных частицах MagCore. Выделение НК с помощью MagCore возможно из таких объектов как кровь, клеточные культуры, биологические жидкости, ткани, растения [119].

Прибор содержит установленные протоколы и оптимизированные наборы для выделения НК из различных типов образцов. Выделение НК основано на магнитной сепарации частицами MagCore, которые покрыты целлюлозой.

Технология на основе MagCore подходит для всех клинических образцов, в том числе формалин-фиксированных, парафин-фиксированных препаратов.

MagCoreHF48 (существуют модификации на 16 образцов) может производить обработку от 1 до 48 образцов, содержащих вирусную, геномную ДНК/ РНК. Объем очищенного препарата может быть 60, 100, 150, 200 мкл, а объем пробы соответственно 200, 400, 1200, 2400 мкл. Работа прибора обеспечивает выход ДНК в количестве от 6 мкг из 200 мкл цельной крови (максимально до 25 мкг ДНК). Время выделения НК занимает от 30 до 45 мин. Также прибор оснащен УФ стерилизацией.

Время выделения НК на приборе MagCore HF 48 составляет 30-70 мин (в зависимости от протокола работы). Доступные образцы для выделения НК не ограничиваются клиническими образцами, также могут быть обработаны различные биологические жидкости. Размер прибора составляет 660*550*680 мм, при массе в 70 кг, таким образом прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием.

Среди **преимуществ** следует отметить широкий спектр наборов реагентов, позволяющих эффективно выделять НК из различных образцов, а среди **недостатков** – сравнительно высокую стоимость выделения НК из одного образца, так как специализированные реагенты не отличаются высокой доступностью.

Система QIAasymphony SP, которая производится компанией QIAGEN (Германия), представляет собой автоматизированную систему для пробоподготовки и выделения НК [119,120]. QIAasymphony SP позволяет выделять НК из вирусов и бактерий, находящихся в различных биологических образцах (плазма, сыворотка или спинномозговая жидкость, мокрота дыхательных путей, моча).

Метод выделения основан на использовании технологии магнитных частиц и включает в себя первичную пробоподготовку, связывание образца, промывку и элюирование.

Основные характеристики данного прибора:

- производительность составляет 96 образцов в партиях по 24 образца, возможность обработки каждой партии по индивидуальному протоколу;
- объем исходного образца может варьировать от 100 до 1000 мкл;
- объём очищенного препарата НК составляет 30-500 мкл.

Время выделения НК на приборе QIASymphony SP составляет 30-120 мин (в зависимости от протокола работы). Размер прибора составляет 1280*1030*730 мм при массе в 175 кг, таким образом, прибор может быть размещён в лаборатории, при подготовленном отдельном месте стационарного базирования.

Основным **преимуществом** данной системы является производительность и широкий охват видов проб, а также возможность выделения образцов по различным протоколам одновременно, что позволяет проводить параллельную обработку различных по виду проб. Среди **недостатков** стоит отметить длительное время выделения, которое – с учётом подготовительных стадий – может быть более 90 минут.

В Германии компания AnalytikJena выпустила автоматизированную систему для пробоподготовки и выделения НК - InnuPure[®] C16 [121].

Система может выделять НК из бактерий, вирусов, а также тканей человека, животных и растений, также существует возможность обработки судебно-медицинских образцов и приготовленную пищу. Система обеспечивает процедуры концентрирования для внеклеточных молекул НК и позволяет проводить бисульфитное превращение для эпигенетических анализов. Магнитные и парамагнитные частицы действуют как твердая фаза для связывания НК. На приборе можно выделить РНК или ДНК из 16 образцов одновременно.

Время выделения НК на приборе InnuPure® C16 составляет 45-75 мин (в зависимости от протокола работы). Доступные образцы для выделения НК ограничиваются клиническими образцами. Размер прибора составляет 400*545*550 мм, при массе в 30 кг, таким образом, прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием.

Данная система построена по планшетному принципу, что, с одной стороны, может указывать на её основной **недостаток**, а именно, низкую степень защиты от контаминации, с другой стороны **преимуществом** такой системы можно назвать компактность и высокую производительность в сравнении с системами картриджного типа.

Американская компания Cepheid выпустила систему GeneXpert (II, IV)®, представленную на рисунке 1.5, предназначенную для проведения диагностики *in vitro* и выполняющую автоматизированную подготовку образцов, амплификацию НК и определение искомой последовательности в простых или сложных образцах с использованием метода ПЦР-РВ. Для работы системы используются одноразовые картриджи [122], содержащие все необходимые реагенты для выделения НК и проведения ПЦР. Разрушение клеток бактерий происходит с помощью ультразвука килогерцового диапазона.



Рисунок 1.5 – Система GeneXpert IV, GeneXpert II [122]

Одноразовые картриджи, представленные на рисунке 1.6, содержат предварительно загруженные химические реагенты, которые необходимы для подготовки образца. Конструкция картриджей позволяет исключить возможность контаминации или случайного выброса содержимого в

окружающую среду. Образец и реагенты не вступают в контакт с рабочими частями прибора. Система GeneXpert позволяет обрабатывать за одно исследование до 12 уникальных последовательностей НК, с использованием шестиканальной оптики при флуоресцентной детекции.

Время получения результата выделения и анализа ПЦР-РВ варьируется от 30 минут до 2 часов в зависимости от протокола исследуемого образца.



Рисунок 1.6– Одноразовый картридж GeneXpert [122]

Система GeneXpert, в части выделения, является наиболее близкой к разработанному Комплексу КВНК, при создании которого были использованы научные наработки, представленные в данной диссертации.

Время выделения НК на приборе GeneXpert составляет 45-65 мин (в зависимости от протокола работы). Доступные образцы для выделения НК ограничиваются клиническими образцами. Размер прибора составляет 110*320*350 мм, при массе в 8 кг (двухканальная модификация), таким образом, прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим

оборудованием, а размещение непосредственно вблизи больного возможно благодаря существованию двухканальной версии.

Среди **недостатков** GeneXpert можно отметить высокую стоимость картриджа, следовательно, стоимость выделения и анализа одного образца.

Такое построение приводит к тому, что под каждый вид возбудителя необходимо создавать свой картридж, что при анализе образцов окружающей среды может приводить к значительным затратам. Среди **преимуществ** – простоту работы с системой и её компактность, так как она содержит все необходимые для выделения и анализа реагенты, а также работает в полностью автоматическом режиме.

Индийская компания HiMedia Laboratories Pvt. Limited выпустила прибор INSTA NX для выделения НК в автоматическом режиме [123] из различных образцов объёмом до 600 мкл. Принцип работы схож с системой из США Chemagic MSM I Instrument и состоит в выделении НК на магнитном сорбенте, который удерживается с помощью специализированных стержней внутри пробирки с пробой при смене реагента. Компании HiMedia Laboratories Pvt. Limited удалось реализовать прибор в компактном виде, позволяющем размещение его в небольших лабораториях и непосредственной близости к больному. Существуют две модификации устройства обеспечивающие обработку 32 и 64 образцов одновременно.

Время выделения НК на приборе INSTA NX составляет 30-60 мин (в зависимости от протокола работы). Доступные образцы для выделения НК не ограничиваются клиническими образцами, а могут включать: пищевые образцы (смесь пряностей/приправ, порошковое молоко, фруктовые соки, цельное молоко, шоколад, вода, ткань цыплят); ветеринарные образцы; образцы некоторых растений; смешанные образцы. Размер прибора составляет 400*470*450 мм, при массе в 25 кг (для прибора позволяющего обработку 32 образцов одновременно), таким образом, прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием.

Среди **недостатков** следует отметить низкую степень защиты от кросс контаминации, так как система планшетного типа, а также высокую стоимость выделения за счёт использования специализированных магнитных частиц. Среди **преимуществ** стоит отметить высокую производительность и широкий охват видов проб.

Немецкая компания Qiagen разработала систему для выделения НК из образцов окружающей среды DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® DNA isolation kit. Система специализирована на обработку проб с высоким содержанием механических примесей и гуминовых кислот [124]. Объём образцов составляет до 100 мкл, прибор позволяет обрабатывать одновременно до 24 образцов.

Время выделения НК на приборе DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® DNA isolation kit составляет 30-45 мин (в зависимости от протокола работы). Размер прибора составляет 500*670*650 мм, при массе в 35 кг, таким образом, прибор может быть размещён непосредственно в лаборатории с другим оборудованием,

Среди **недостатков** следует отметить низкую степень защиты от кросс контаминации, так как система планшетного типа. Среди **преимуществ** стоит отметить высокую производительность и возможность работы с пробами, содержащими большое количество примесей, включая гуминовые кислоты.

Компания Biomerieux выпустила мультиплексную ПЦР-систему FILMARRAY (США). Она объединяет подготовку образца, амплификацию, обнаружение и анализ НК [125,126].

Необработанный биологический или клинический образец подвергают очистке НК, обратной транскрипции, ПЦР. Реактивы находятся в специальном картридже, что минимизирует риск контаминации.

Система FILMARRAY позволяет проводить одновременное тестирование пробы на содержание бактерий, вирусов, дрожжей, паразитов и/или антимикробных резистентных генов. Она предназначена для использования с комплексными панелями, каждая из которых предлагает тестирование наборов патогенов, такими как респираторные вирусы и бактерии, желудочно-кишечные

патогены, включая вирусы, бактерии и простейшие, которые вызывают инфекционную диарею [125,126].

Анализ образца происходит таким образом: в прибор FILMARRAY вставляют пакет (чистую ячейку), и вводят водный раствор вместе с образцом. Вода и проба смешиваются в реакционном объеме. Вакуум в пакете гарантирует, что необходимый объем водного раствора и пробы втягивается, поэтому здесь не требуется пипетирование. Время обработки образца составляет около 1 часа.

В закрытых реакционных объемах FILMARRAY хранятся все необходимые реагенты для лизиса клеток, выделения и очистки НК, амплификации и детекции, схематическое изображение картриджа представлено на рисунке 1.7. Мультиплексная ПЦР FilmArray использует всю НК, выделенную из поступившей пробы, амплификация позволяет специфически обнаруживать НК с чувствительностью, характерной для ПЦР небольшого объема.

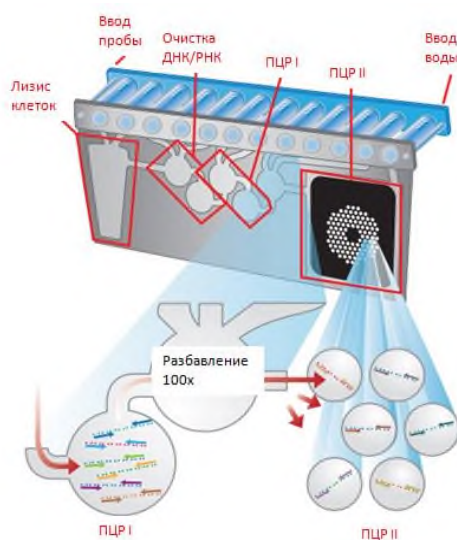


Рисунок 1.7 – Картридж системы FILMARRAY [125]

Основным **недостатком** описанной системы является низкая производительность, поскольку происходит обработка только одного образца за 1 час времени. Среди **преимуществ** следует отметить, что также, как и в системе GeneXpert происходит полный цикл пробоподготовки и анализа НК в автоматическом режиме.

Способов классификации систем выделения НК может быть несколько, для наглядности, на рисунке 1.8, представлена классификация по типу исполнения реакционного модуля (планшет или картридж).

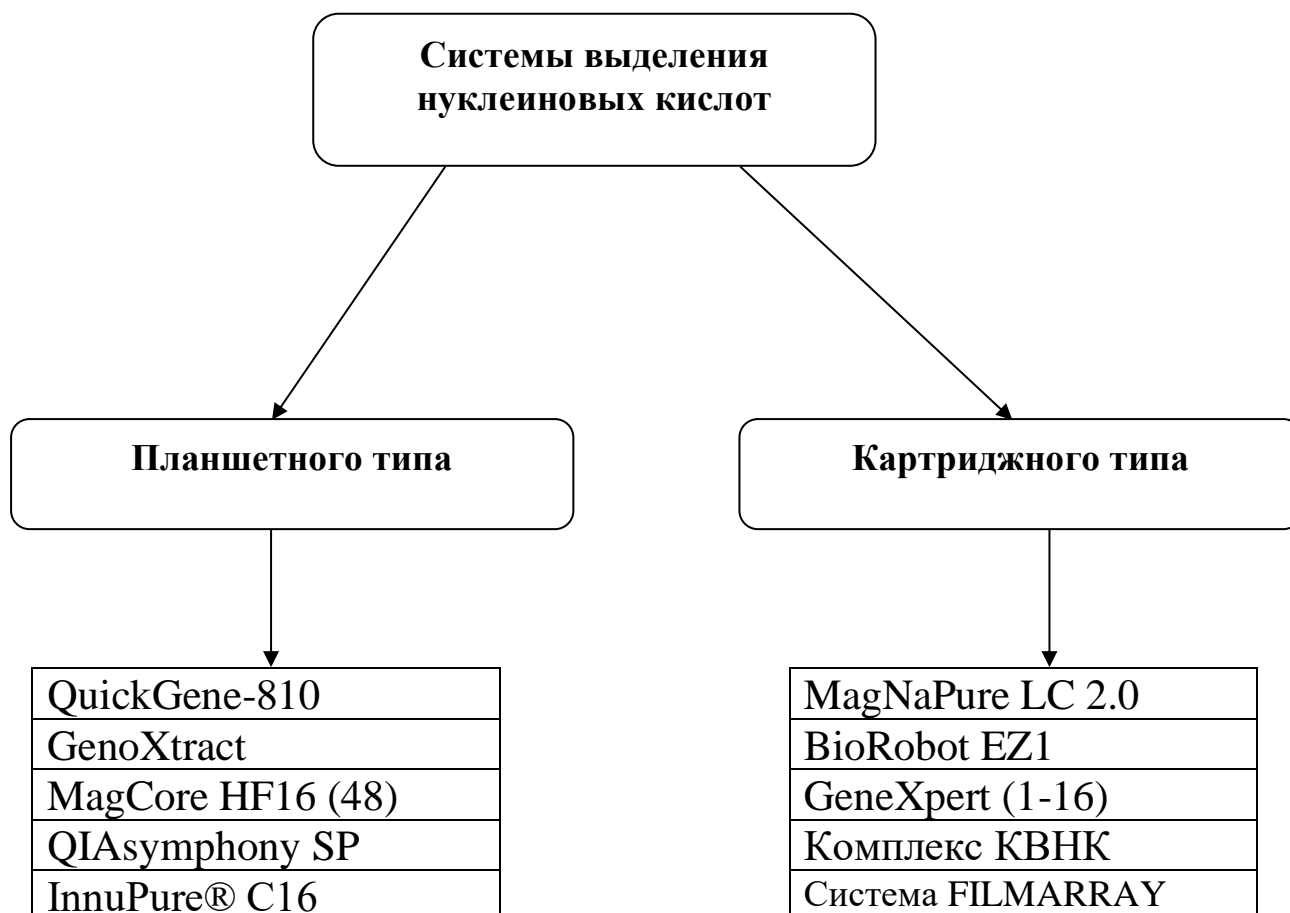


Рисунок 1.8 – Классификация основных серийно выпускаемых приборов для выделения и анализа НК

Анализируя описанные системы, представленные в классификации, можно сделать несколько выводов:

- в большинстве случаев системы реализованы на магнитной сепарации, при этом нет серийно выпускаемых систем автоматизированного выделения НК, в основе которых лежит жидкофазная экстракция;
- виды обрабатываемых проб для планшетных систем в основном ограничены клиническими образцами;

- отличия в производительности систем, как правило, обусловлены типом системы – планшетным или картриджным, более производительными являются планшетные системы, при этом время на реализацию одного выделения (независимо от количества образцов) лежит в диапазоне от 20 до 60 минут, часто, меньшее время выделения, как правило, характеризует менее универсальные системы с точки зрения разновидности образцов;

- наличие термостатирования является преимуществом, так как влияет на эффективность процессов выделения, позволяет выделять ДНК/РНК из биологических жидкостей насыщенных белками (сыворотка, плазма);

- в подавляющем большинстве указанных планшетных систем есть процедура переноса пробы, что требует дополнительную защиту и создание (включение в состав) дополнительных устройств таких как: УФ лампы, каплеулавливатели, что удорожает систему.

Таким образом, наиболее востребованной системой, при нынешних условиях развития технологий, будет являться система выделения НК в автоматическом режиме за 30-50 минут, имеющая высокую степень защиты от кросс-контаминации образцов, обладающая производительностью не менее 4 образцов за цикл (с учётом производительности выделения ручным способом, за указанное время удаётся выделить в среднем 4 образца) обработки, или имеющая возможность к увеличению производительности по аналогии с системой GeneXpert (Cepheid, США). Дополнительным преимуществом такой системы будет масса до 30-40 кг, так как будет возможно её размещение в мобильных лабораториях.

При дальнейшем анализе систем выделения НК ряд факторов указывает на необходимость уменьшения стоимости одного выделения, что определяет использование планшетной технологии. Однако, при необходимости работы «со сложными» образцами, в условиях низких и предельно низких концентраций НК в пробе, в условиях высокого содержания примесей в пробе, а также необходимостью использования системы в непосредственной близости к

объекту исследования большей востребованностью пользуются системы выделения НК на одноразовых картриджах.

Таким образом, проведенный анализ существующих приборных решений систем выделения НК, позволяет сформулировать основные задачи диссертационной работы:

1. Создание экспериментальной установки для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб.

2. Анализ и определение режимов работы установки (скорости дозирования и параметров перемешивания реагентов, длительности взаимодействия реагентов), обеспечивающих высокоэффективное выделение НК.

3. Исследование влияния температуры, и воздействия ультразвука на эффективность выделения НК.

4. Оценка эффективности способа проточного концентрирования НК под воздействием УЗ на магнитном сорбенте, с определением условий удержания сорбента в потоке, обеспечивающих повышение степени концентрирования в сравнении со стационарным выделением.

5. Создание протоколов автоматического выделения НК с использованием разработанной установки, и оценка их работоспособности в серийно выпускаемом приборе для выделения нуклеиновых кислот.

Выполнение вышеуказанных задач обеспечивает достижение цели диссертационной работы - Создание экспериментальной установки позволяющей управлять параметрами режимов автоматического выделения НК.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА И КАРТРИДЖ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НК

2.1 Принцип работы и блок схема экспериментальной установки

Используя мировой опыт в рамках решения сформулированных во введении к диссертационной работе задач, был выбран способ реализации выделения нуклеиновых кислот на базе одноразовых картриджей. Данный подход позволяет изолировать процесс выделения НК от влияния внешней среды. Даже при достаточно простом устройстве картриджа (описание и схема приведены в разделе 2.1.1) существует возможность обеспечения дозирования жидких реагентов при использовании модулей линейного перемещения таких как актуаторы и шаговые двигатели, с помощью которых возможно реализовать движение поршня по цилиндру. Задавая параметры работы шагового двигателя или актуатора, такие как количество оборотов и скорость вращения вала, возможно управлять скоростью перемещения жидких реагентов и их дозирования.

Ориентируясь на доступный и универсальный набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот, «М-сорб-ООМ», производства ООО «Синтол» (Россия), было принято решение о создании в картридже шести ячеек для жидких реагентов объемом до 5 мл так как максимальный суммарный объем смешиваемых реагентов находится в пределах 2 мл, согласно рекомендуемой методике выделения НК к набору реагентов. Увеличение объема ячеек до 5 мл обусловлено возможностью образования пены при перемешивании реагентов, а также необходимостью иметь пустой объем до 0,5 мл для полного удаления реагентов из каналов картриджа при перемещении реагентов между камерами. Всего в наборе реагентов «М-сорб-ООМ» 7 наименований, однако для повышения технологичности картриджа было принято решение не создавать больше 6 ячеек для реагентов на экспериментальном образце, так как при замене трёх промывочных растворов одним (все три являются этиловым спиртом разной концентрации) достаточно и 6 ячеек.

Для выделения НК на экспериментальной установке на силикатной мембране применяли набор реагентов К-сорб, производства ООО «Синтол», для этого в картридже предусмотрена полость для сорбирующего материала (силикатной мембраны из спин-колонки), при этом магнитный сорбент помещается непосредственно в ячейку (ячейка номер 4 рисунок 2.5б), для доступа к нему магнитного поля.

В наборе для выделения на стекловолоконной мембране используется один промывочный раствор, а для выделения на магнитном сорбенте в наборе предусмотрено 3 промывочных раствора. В экспериментальной части показано, что разница при использовании промывочных растворов трёх видов и одного (первого, этилового спирта 96%) минимальна на модельном образце, и прежде всего влияет на необходимость более тщательной сушки сорбента.

Блок-схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2.1, особенностью установки является подключаемый УЗ модуль пробоподготовки позволяющий воздействовать на устанавливаемую кювету объёмом до 5 мл, который подробно описан в разделе 3.3, схема представлена на рисунке 3.2

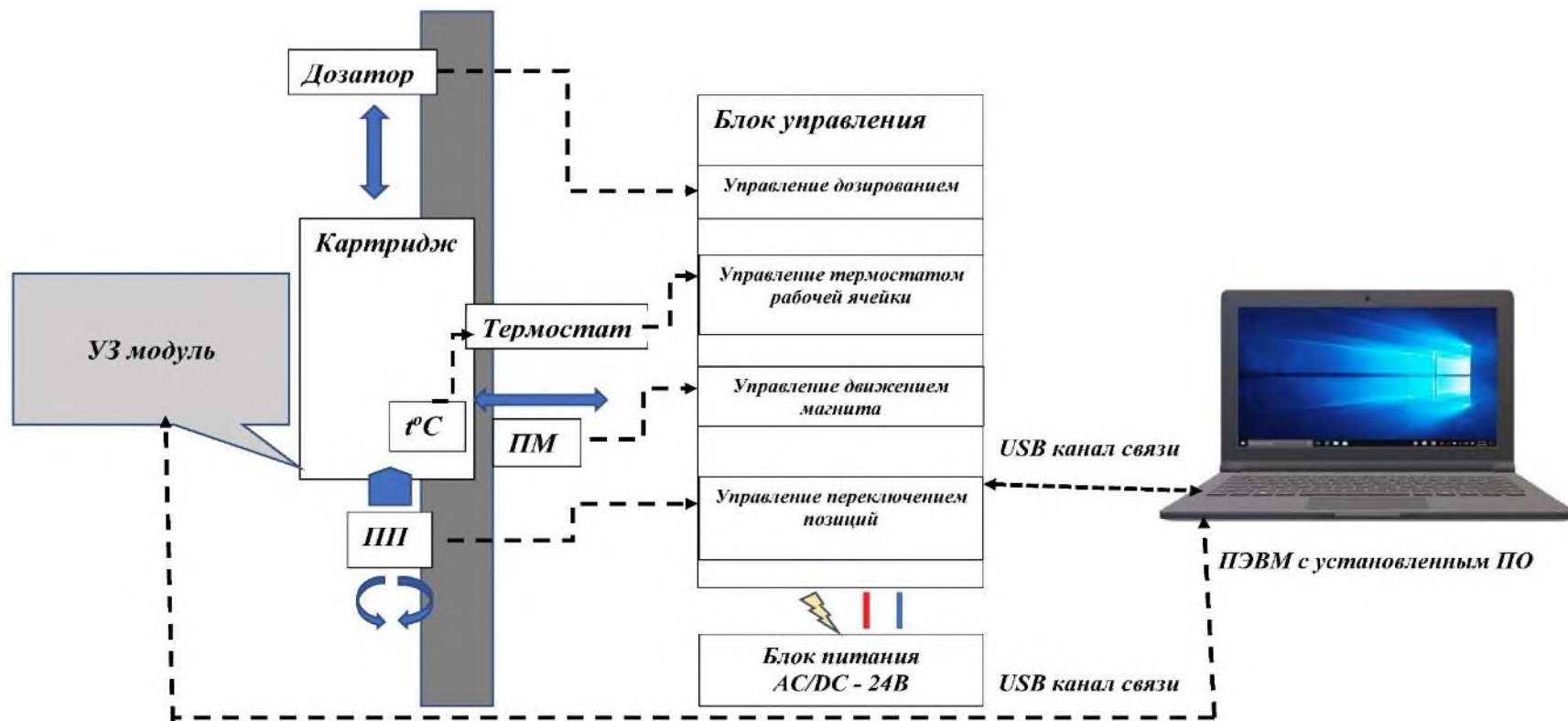


Рисунок 2.1 – Блок-схема экспериментальной установки, где *Дозатор* – привод обеспечивающий перемещение поршня картриджа с точностью 0,01 мм, *ПП* – привод переключателя обеспечивает вращение крана переключателя с точностью 0,9°, *ПМ*– привод магнита обеспечивает перемещение магнита к картриджу и от него с точностью 0,01 мм; t°C – датчик температуры, УЗ модуль (рисунок 3.2) – подключаемый модуль содержащий ячейку для сорбции НК при выделении в стационарном и проточном режимах

В качестве дозирующего устройства самым простым представляется использование шприцевого насоса, который был реализован посредством поршня перемещаемого по центральному цилиндру картриджа, в соответствии с заданными командами. Задавая параметры работы шагового двигателя или актуатора линейного перемещения, с закреплённым поршнем центрального цилиндра возможно управлять скоростью перемещения жидких реагентов и дозируемым количеством.

Для переключения сообщения ячеек с центральным цилиндром необходимо однозначно позиционировать кран-переключатель. Самым доступным в наших условиях являлось применение шагового двигателя, с закреплённым ключом однозначно позиционирующимся в картридже при его установке. Заданием количества шагов, соответствующих порядковому номеру ячейки, осуществлялось переключение позиций. Таким образом, 1 ячейка соответствовала 0 шагов, 2 ячейка – 60, 3 ячейка 120 шагов и так далее, то есть для нашей модели каждая из позиций ячейки отличается от предыдущей на 60°.

Для управления температурным режимом во время выделения необходимо подвести нагреватель как минимум к одной из ячеек картриджа, Так как максимальная температура нагрева пробы во время выделения не может быть более 95°C, то достаточно нагревателя относительно не большой мощности (в экспериментах было достаточно 50Вт), который будет разогреваться не более 3-5 минут.

Также для выделения НК на магнитном сорбенте с помощью одноразового картриджа необходимо обеспечить подведение магнита к одной из ячеек картриджа, причём эта же ячейка должна быть термостатируемой так как это необходимо при выделении НК в соответствии с реперной методикой.

Термостат реализован на элементе Пельтье, управление которым также осуществляется с помощью ПО, описание которого приведено в разделе 2.3.

2.2 Одноразовый картридж для экспериментальной установки

Как было отмечено ранее, картридж должен содержать не менее 6 ячеек, которые должны иметь выходные отверстия для заправки. Представляется целесообразным расположить их на равном удалении от центра, обеспечив возможность перекачки реагентов между ними. Таким образом, был спроектирован картридж похожий на револьверный барабан, в котором в центральной части располагается перекачивающий реагенты поршневой насос. На рисунке 2.2 представлен чертёж разреза первого варианта картриджа.

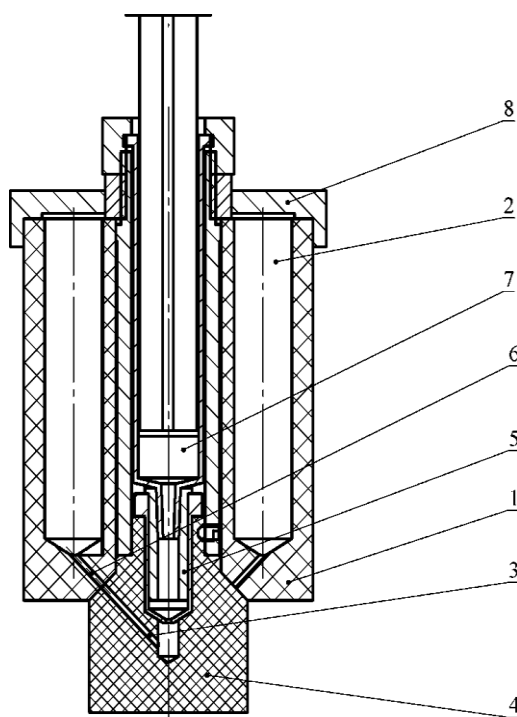


Рисунок 2.2 – Первый вариант одноразового картриджа, где 1 – корпус, 2 – емкости для реагентов, 3 – канал, 4 – кран, 5 – полость для сорбирующего материала (силикатная мембрана), 6 – канал, 7 – шприц, 8 – крышка

Особенностью конструкции картриджа является использование стандартных шприцов и коническое соединение крана с корпусом картриджа.

По результатам изготовления данной модели картриджа были выявлены следующие недостатки:

- сложность изготовления - требуется прецизионное изготовление сопрягаемых элементов крана и корпуса, а также постоянный прижим крана к корпусу;

- большие потери элюента, из-за большой длины каналов, соединяющих ёмкость с колонкой.

Для устранения выявленных недостатков разработана вторая конструкция картриджа, представленная на рисунке 2.3.

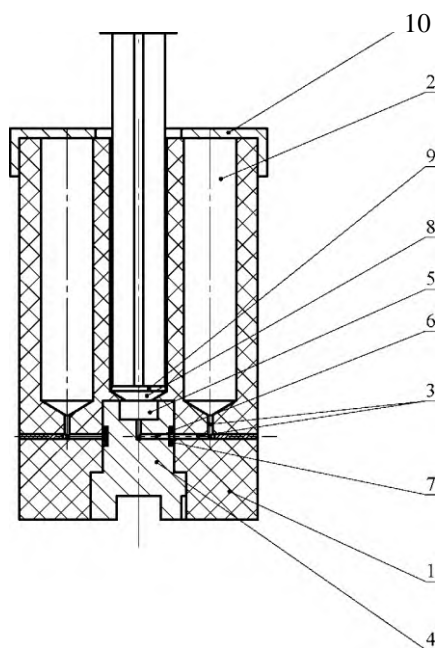


Рисунок 2.3 – Второй вариант картриджа, где 1 – корпус, 2 – ячейка для реагентов, 3 – каналы, 4 – кран-переключатель. 5 – полость для сорбирующего материала, 6 – канал, 7 - уплотнение, 8 – емкость, 9 – поршень, 10 - крышка

Особенностью данной конструкции является использование крана цилиндрической формы с вставкой 7 из материала, обладающего упругой деформацией (полиуретан, силикон и др.), обеспечивающей герметичность. Принудительного внешнего поджима при этом не требуется. Ёмкость 8, в которой перемещается поршень, вплотную соединяется с полостью 5 с сорбирующим материалом. В нижней части корпуса и крана выполнен сквозной паз, имеющий форму клина. Паз играет роль ключа, обеспечивающего начальное позиционирование и установку картриджа в блок выделения НК. Описанная конструкция была взята за основу при дальнейшей работе над картриджем.

Также особенностью данной конструкции является возможность её изготовления без применения литья, что значительно удешевляет процесс при малом количестве изделий. Всего за время экспериментальной работы было использовано порядка 40 таких картриджей, при необходимости их возможно отмыть и очистить от следов реагентов и нуклеиновых кислот и использовать повторно.

В качестве дозирующего устройства использовался поршень от шприца на 5 мл, который вставлялся в центральный цилиндр, при повороте крана-переключателя в заданную позицию открывалось сообщение между центральным цилиндром и одной из ячеек. По центральному цилиндру перемещался поршень, создавая разрежение или повышение давления в соответствующей ячейке, что приводило к перемещению жидкости из цилиндра в ячейку или наоборот. В нижней части были проделаны сквозные отверстия соответствующие ячейкам расположенным по радиусу, в центральной части произведена выборка под кран-переключатель, схема данного картриджа представлена на рисунке 2.4, на рисунке 2.5 представлены виды 3D моделей.

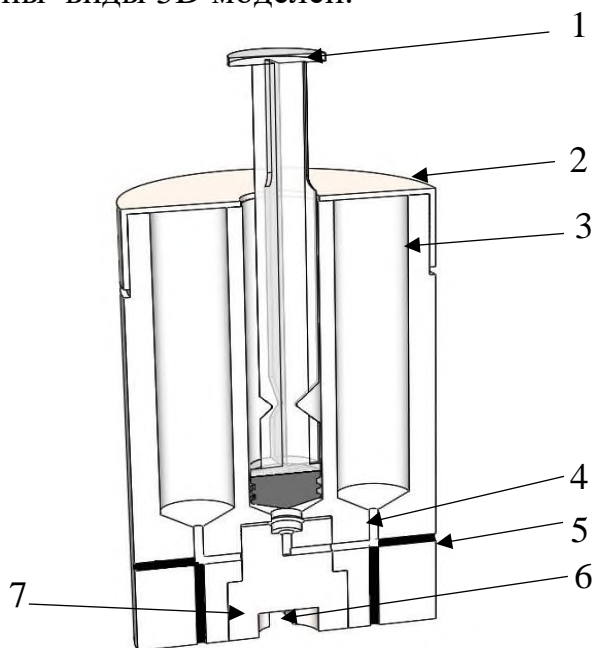


Рисунок 2.4 – Картридж, где 1 – поршень, 2 – крышка, 3 – ячейка для реагентов, 4 – внутренний канал. 5 – пластиковое уплотнение, 6 – выборка для позиционирования крана-переключателя, 7 – поворотный кран-переключатель

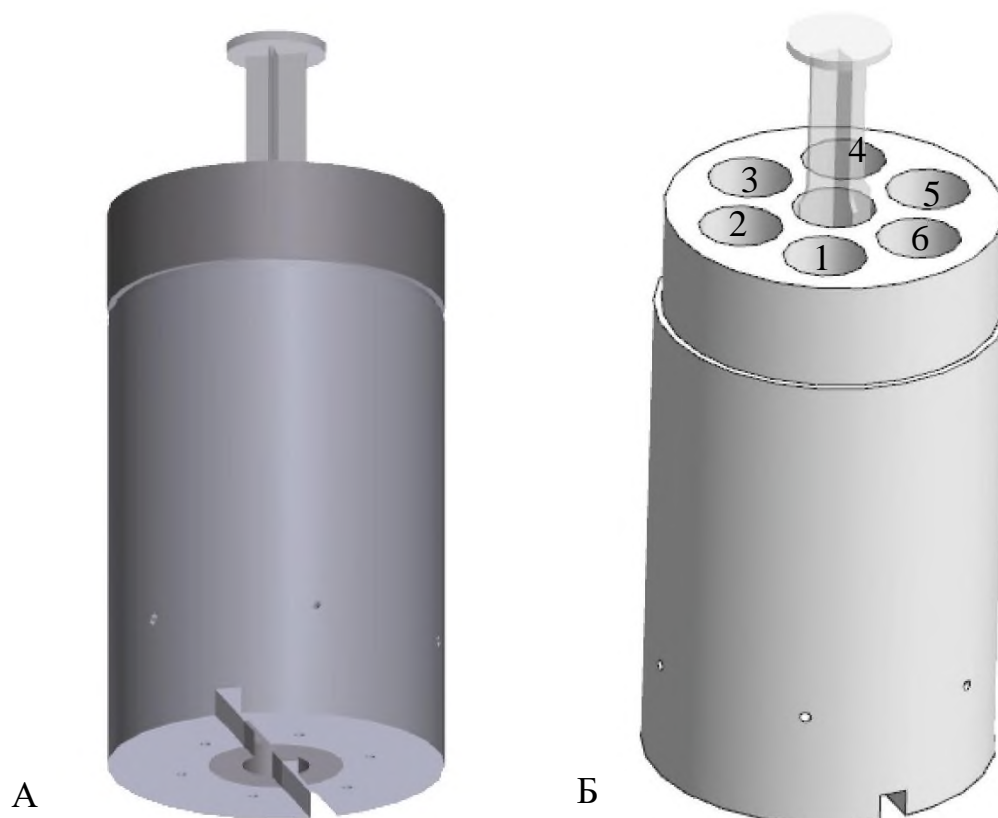


Рисунок 2.5 – 3D модели картриджа: А – вид картриджа в сборе; Б – вид картриджа без крышки

На рисунке 2.4 показаны пластиковые уплотнения, которые предназначены для перекрытия части каналов и формирования сообщения перпендикулярных каналов полученных при изготовлении картриджа, в результате сверления.

2.2.1 Выбор материалов для картриджа экспериментальной установки

В качестве материалов для изготовления макета рассматривались инертные и распространённые материалы, обрабатываемые механически или литьём в силикон (литьё при атмосферном давлении) такие как: фторопласт, кетрон reek 1000, полиуретан, полиацеталь, силикон (различные марки). Полиэтилен высокой плотности и полипропилен высокой плотности не рассматривались ввиду низкого качества доступного материала (наличие «включений в материал», его неоднородность).

Целью исследований явилась проверка сорбционной способности предложенных материалов по отношению к нуклеиновым кислотам (плазмиды *m.tuberculosis*), устойчивость к реагентам входящим в состав набора для выделения.

Проверка всех материалов на способность к сорбции НК проводилась по следующей схеме:

Готовили растворы плазмиды *m.tuberculosis* в концентрации $1,0 \cdot 10^3$ копий/мкл и $1,0 \cdot 10^5$ копий/мкл.

Помещали 200 мкл пробы каждой концентрации в 3 лунки, проделанные в брусках в исследуемом материале.

Накрывали данные образцы крышкой и оставляли на 3 часа при комнатной температуре.

После чего выливали из лунок растворы содержащие ДНК, добавляли 200 мкл элюирующего буфера из набора для выделения, и после перемешивания методом пипетирования, забирали на ПЦР-РВ анализ по 2 мкл из каждой лунки, каждого исследуемого материала. Определяли концентрацию нуклеиновых кислот С[НК] в отобранной жидкости в 3 повторах.

Данная серия экспериментов позволила оценить возможную сорбцию НК на исследуемом материале по смыву с поверхности. Результаты экспериментов приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Концентрация НК в смыве с образцов материала

Материал	С[НК] исходная копий/мкл	С[НК] (усреднённая) в смыве, n=3 копий/мкл	Выход, %
Фторопласт	$1,0 \cdot 10^3$	40	4
	$1,0 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^3$	1,2
Полиуретан	$1,0 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^2$	14
	$1,0 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^4$	11
Кетрон реек 1000	$1,0 \cdot 10^3$	62	6,2
	$1,0 \cdot 10^5$	$0,4 \cdot 10^4$	4
Полиацеталь	$1,0 \cdot 10^3$	28	2,8
	$1,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^3$	1,9
Силикон	$1,0 \cdot 10^3$	98	9,8
	$1,0 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^3$	1,7

Данные, приведенные в таблице 2.1 позволили сделать вывод о том, что исследованные материалы обладают низкой сорбционной способностью по отношению к НК и их применение для изготовления элементов картриджа не повлияет на эффективность выделения НК.

Дальнейший ряд экспериментов показал, что сочленение пар материалов: полиацеталь - кетрон реек 100, полиацеталь-полиуретан, полиуретан - кетрон реек 100; силикон-кетрон реек 100, силикон-полиуретан, полиацеталь - силикон не обеспечивают плавного скольжения. Эксперименты с нанесением силиконовой смазки на места сочленений, и нагревание собранных узлов до 65°C , с последующим остыванием до комнатной температуры приводит к «присыханию» материалов друг у другу, что обуславливает срыв при начале движения, что в свою очередь негативно влияет на точность позиционирования в представленной выше конструкции картриджа.

Напротив, сочленения исследуемых материалов с фторопластом показали, что данный материал может быть использован как универсальный для

изготовления одноразового картриджа, так как эффекта «присыхания» сочленяемых материалов друг-другу практически не наблюдалось, или он отсутствовал вовсе.

Для изготовления картриджа решено использовать фторопласт, так как из исследуемых материалов он обладает приемлемой сорбционной способностью по отношению к НК (сорбция практически отсутствует, результат сопоставим с погрешностью метода ПЦР-РВ анализа) и способен обеспечивать требуемые характеристики узлов трения.

В качестве материала упругого ключа вставляемого внутрь фторопластового «тела» картриджа, выбор был остановлен на полиуретане, так как технология литья полиуретана более распространена (литьё в силикон) и материал отечественного производства широко применяется для макетирования.

Так как состав используемых реагентов в составе набора для выделения НК накладывает ограничения на применение отдельных материалов для деталей картриджа, например, из оргстекла (из за присутствия изопропилового и этилового спиртов), и некоторых резин, а также требует устойчивости к высоким температурам (до 90°C), то перечень материалов был ограничен. Методом подбора наиболее доступных материалов, исходя из их физических и химических свойств выбор основного материала для картриджа был остановлен на Фторпласте-4, полипропилене высокого давления и полиэтилене высокого давления. Важным преимуществом этого материала служила возможность его механической обработки (таким образом были исключены образцы из полипропилена и расплавов квартопрена и др., по причине их плавления при обработке).

2.3 Внешний вид и принцип работы экспериментальной установки

По результатам проектирования и выбора материалов для установки были изготовлены одноразовые картриджи (схема на рисунке 2.4), и функциональные узлы обеспечивающие: перемещение поршня одноразового картриджа (погрешность $\pm 0,02$ мм), поворот крана переключателя в составе картриджа (погрешность поворота $\pm 1,1^\circ$), перемещение магнита к рабочей ячейке картриджа и обратно (погрешность $\pm 0,02$ мм).

Фото экспериментальной установки представлено на рисунке 2.6

Отладка показала, что возможно задавать скорости перемещения поршня дозатора со скоростью от 0,01 до 5 мм/сек, это в свою очередь позволяет обеспечить объём дозирования (расход) от 50 мкл/сек до 1000 мкл/сек. Скорость поворота крана переключателя – от $0,1^\circ$, до 120° за сек. Для реализации перемещения магнита был взят тот же узел, что и для поршневого насоса. Для экспериментальной работы использовали скорости дозирования от 100 мкл до 900 мкл/сек, так как этих скоростей было достаточно для автоматического выделения НК по методике близкой к ручному выделению, если ориентироваться на время отдельных операций дозирования реагентов в пробирках.

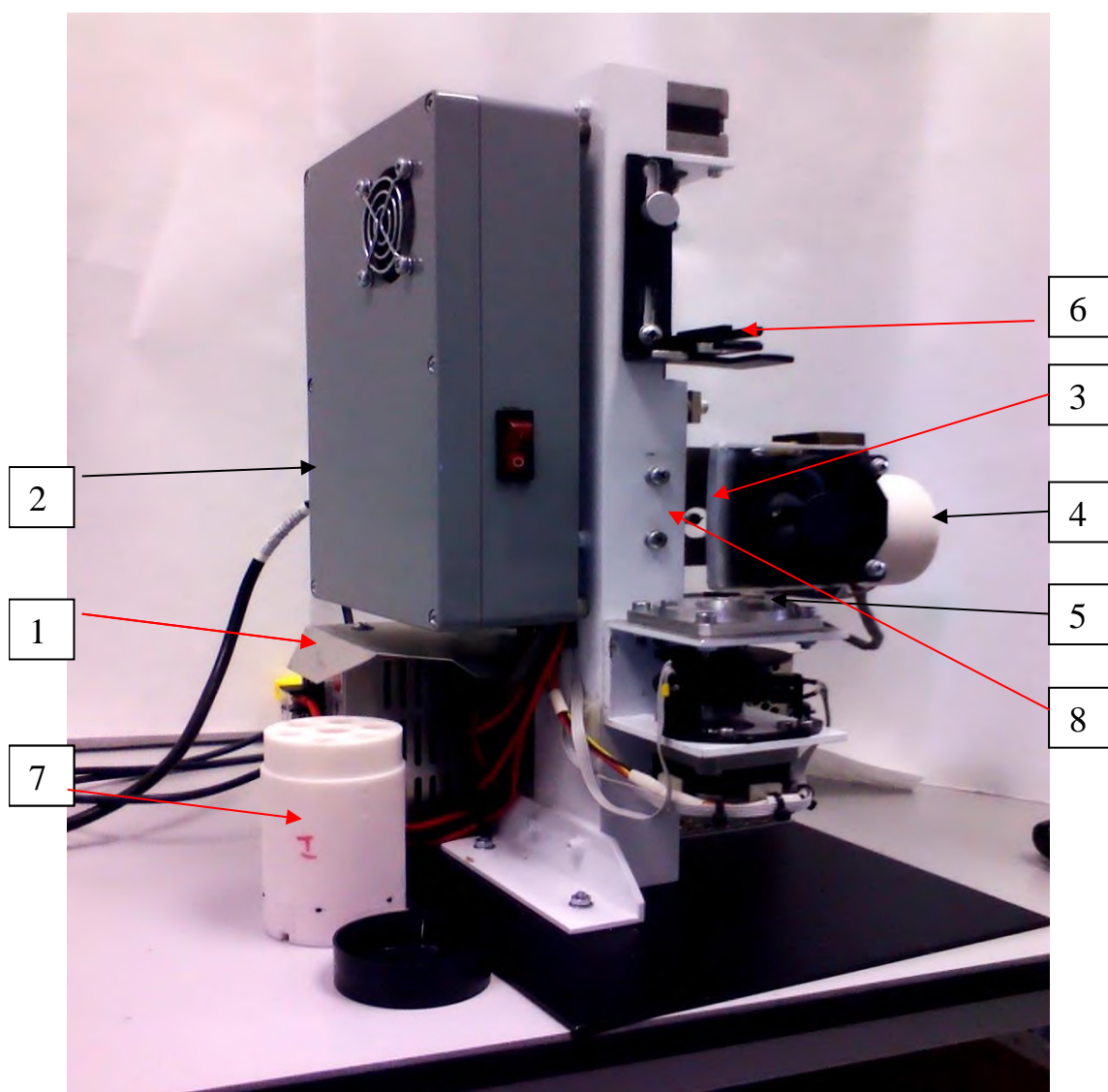


Рисунок 2.6 – Макет экспериментальной установки, где 1 – блок питания; 2 – блок электронных схем; 3 – магнит; 4 – термостат; 5 – кран-переключатель; 6 – фиксатор поршня; 7- одноразовый картридж; 8 – место установки картриджа

Созданный макет экспериментальной установки позволяет осуществлять автоматическое выделение НК, при этом в общем виде реализуется следующий алгоритм:

- проба помещается во входной отсек, содержащий лизирующий реагент, нагревается термостатом до заданной температуры и выдерживается при этой температуре заданное время, требуемое для лизиса и инактивации;

- лизат (лизирующий реагент + жидкая проба) перекачивается из входного в рабочий отсек, в котором смешивается с магнитными частицами и

осаждающим буфером, полученный раствор нагревается и перемешивается барботированием, НК сорбируются на магнитных частицах;

- магнитные частицы собираются при помощи подводимого к стенке рабочего отсека магнита, раствор удаляется во входной отсек;

- осадок магнитных частиц промывается промывочными растворами, при этом отработанные растворы удаляются в соответствующие отсеки из которых были взяты;

- осадок после промывок высушивается, НК растворяются в элюирующем буфере, полученный препарат НК перемещается в отсек для хранения элюирующего буфера, откуда после окончания процесса выделения забирается дозатором и поступает на анализ методом ПЦР-РВ.

Данная установка позволяет в свободном режиме управлять параметрами стадий выделения НК, а также прерывать процесс выделения в любой момент, и продолжать его с любой отдельной стадии.

2.3.1 Методика автоматического выделения НК

Для реализации автоматического выделения НК с помощью одноразового картриджа на первом этапе была разработана методика максимально близкая к рекомендуемой производителем реагентов для ручного выделения.

Заправка картриджа осуществлялась в соответствии с нумерацией ячеек представленных на рисунке 2.5 Б., также нумерация продублирована на рисунке 2.7 – «Схема алгоритма работы картриджа в общем виде».

Последовательность заправки:

1. Первая ячейка – 2 мл лизирующий реагент;
2. Вторая ячейка – 1,5 мл осаждающий реагент (изопропиловый спирт);
3. Третья ячейка – 2 мл промывочный реагент (этиловый спирт);
4. Четвёртая ячейка – 100 мкл магнитный сорбент (суспензия магнитных частиц);
5. Пятая ячейка - фильтровальная бумага;
6. Шестая ячейка – 300 мкл элюирующий реагент (1х ТЕ буфер);

После заправки картриджа необходимо в первую ячейку добавить 1 мл пробы и закрепить его на установочном месте.

Далее с помощью ПО, описанного в разделе 2.4, запустить протокол на выполнение.

При работе по заданному протоколу в общем случае реализуются следующие процессы (рисунок 2.7):

- лизис пробы при постоянном перемешивании барботированием;
- перенос лизата для сорбции НК на магнитных частицах;
- отмывка магнитных частиц от примесей;
- сушка магнитных частиц;
- десорбция НК в элюирующем растворе.

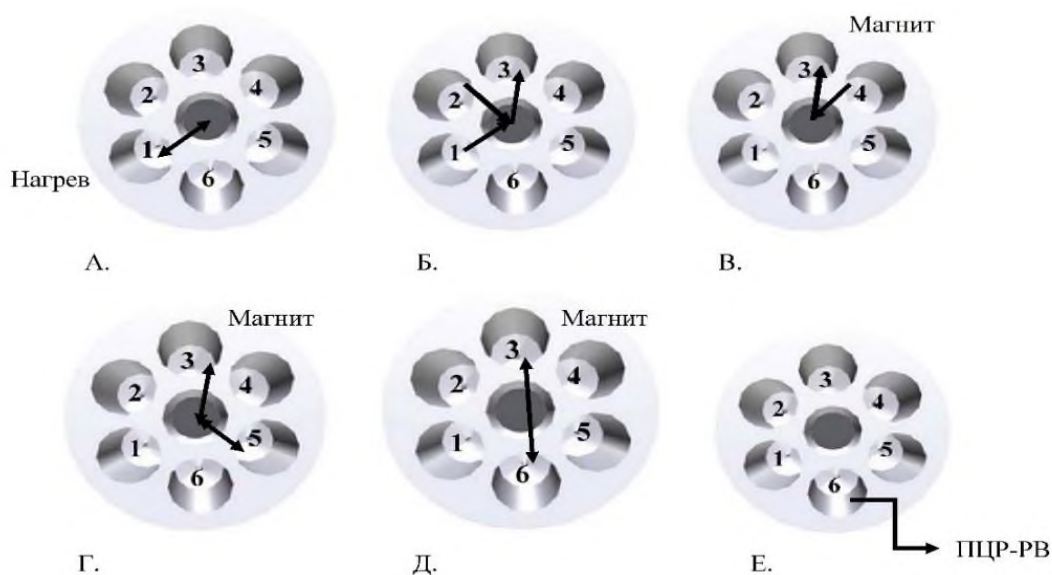


Рисунок 2 – Схема реализации обобщённой методики выделения НК на картридже в общем виде, где А - лизис пробы, нагрев до 70°C, в течение 15 мин, ячейка 1, Б – смешивание пробы с магнитным сорбентом из ячейки 2, сорбция НК, ячейка 3, В - отмывка сорбента от лизата, раствор из ячейки 4, Г - сушка сорбента от остатков промывочных растворов прокачкой воздуха из ячейки 5 и обратно, Д - добавление к сорбенту элюирующего буфера из ячейки 6, элюция при нагреве до 60°C, в течение 10 мин, Е - забор элюата НК на ПЦР-РВ механическим дозатором из ячейки 6

После окончания работы протокола выделения, необходимо осуществить забор очищенного препарата из 6-ой ячейки картриджа и поместить очищенный препарат в подготовленную пробирку 0,6-1,5 мл. Далее необходимо провести ПЦР-РВ анализ, определить концентрацию нуклеиновых кислот С[НК] в очищенном препарате.

2.4 Программное обеспечение экспериментальной установки

Верхняя программа представляет диалоговое окно. После запуска ПО, необходимо установить связь с ПЭВМ, для этого в строке «Port», выбрать порт соответствующий данному устройству. Однократно нажать кнопку «Open/Close», так чтобы индикатор, слева от кнопки засветился светло-зелёным. На рисунке 2.8 представлен вид окна программы при установки связи.

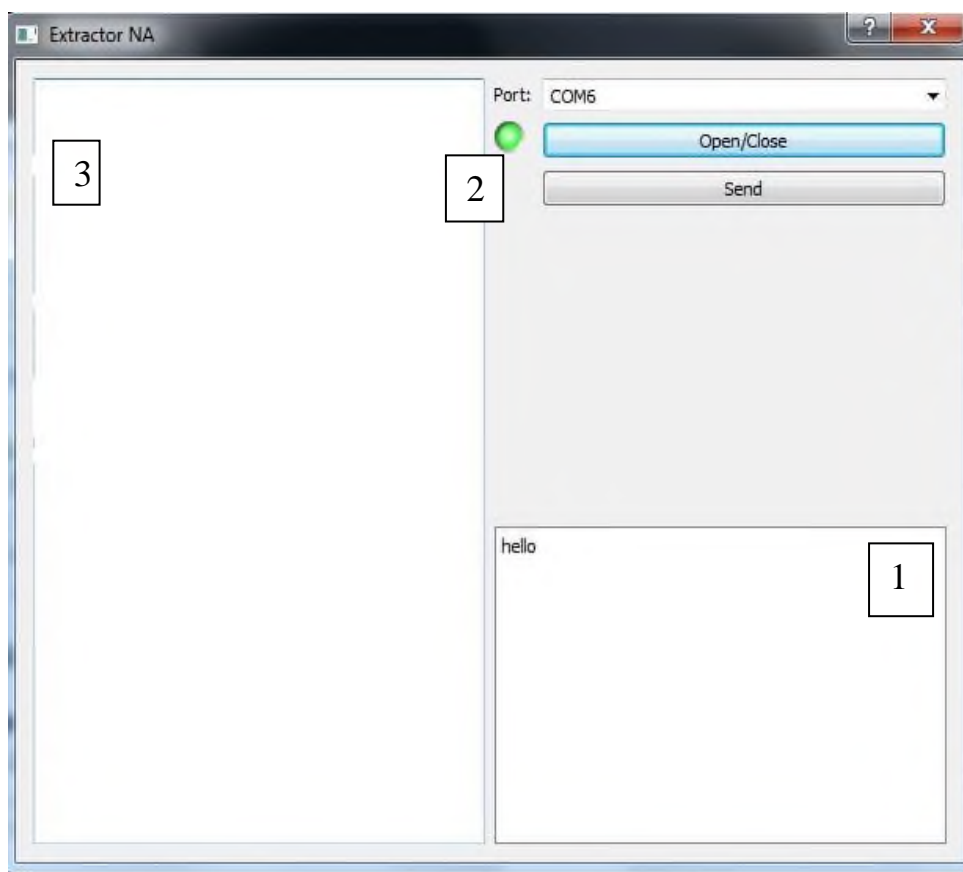


Рисунок 2.8 – Вид окна программы при запуске, где 1 – окно отчёта, 2 – индикатор порта связи. 3 – Рабочее окно

Запуск протокола работы

Для запуска протокола работы экспериментальной установки необходимо в рабочее окно программы ввести последовательность команд, каждую команду вводить с новой строки, перечень команд и их параметров указаны в таблице 2.1. Ниже приведён пример протокола, цель которого – проверка работоспособности экспериментальной установки и функционирования картриджа. Перед запуском тестового протокола картридж необходимо заправить дистиллированной водой.

```
start
turn 1
up 45 4
down 45 4
up 45 4
turn 3
mon
down 45 4
sound 10
moff
up 45 3
turn 4
down 45 4
ton 60 10
up 45 5
turn 6
down 45 4
end
```

После ввода команд, в окне программы нажать на кнопку «Send», расположенную над «окном отчёта». В случае ввода неправильной команды, с ошибкой в написании, в «окне отчёта» появиться надпись «line X», где X – номер строки, в которой допущена ошибка, её необходимо исправить и снова нажать «Send».

Работа термостата

Во время работы термостата в окне отчёта высвечивается текущая температура и температура, заданная в выполняемом протоколе, пример окна программы при работе термостата приведён на рисунке 2.9. Данные о температуре обновляются каждые 5 секунд, после выхода на режим высвечивается «ОК», после чего во время работы режима поддержания температуры высвечивается «work».

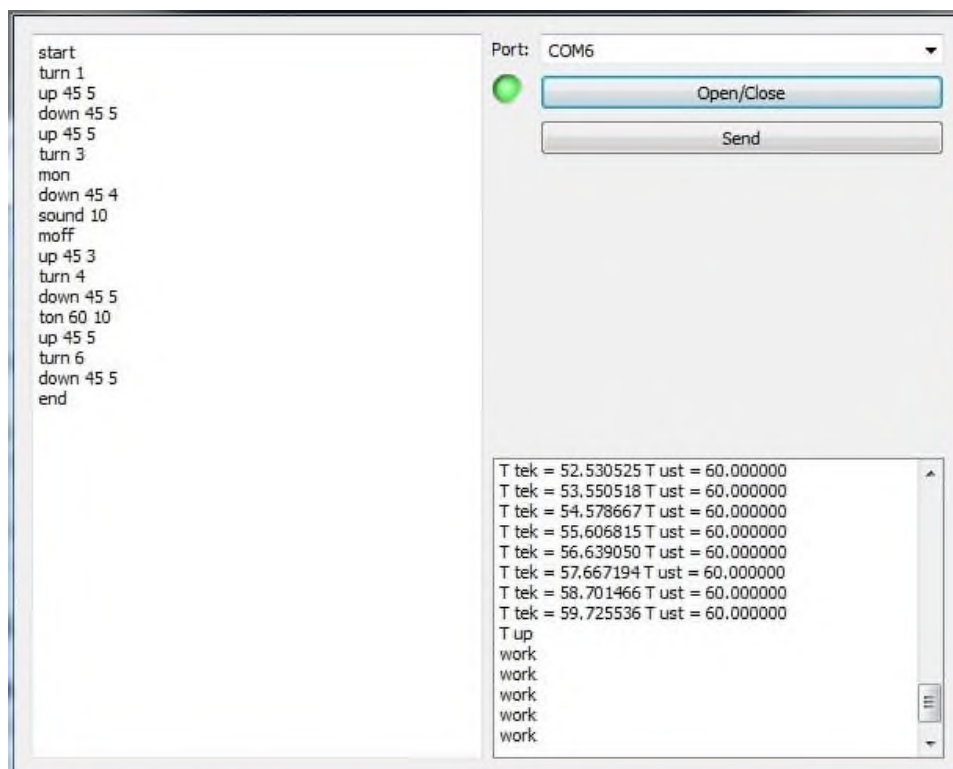


Рисунок 2.9 – Окно программы при работе термостата

После нагрева до заданной температуры и её поддержания в течении заданного времени, продолжается выполнение протокола в соответствии с последовательностью команд из рабочего окна.

Расшифровка параметров команд

Команды можно задавать произвольно в соответствии с таблицей 2.1

Таблица 2.1 – Перечень команд для первой версии программы

Команда	Назначение	Примечания
up 15 2.0	Управление скоростью (расходом) и объёмом дозирования реагентов	Поднятие поршня на 15 мм, со скоростью 2,0 мм/сек
down 15 3.0		Опускание поршня на 15 мм, со скоростью 3,0 мм/сек
ton 55 600	Управление Температурными режимами в ячейке картриджа	Установка и поддержание в термостате температуры 55°С в течение 600 секунд, далее охлаждение до 40°С, без поддержания режима
sound 120	Остановка работы протокола, для работы УЗ модуля	Включение режима паузы в течение 120 секунд
turn 2	Управление переключением между ячейками картриджа для смешивание реагентов	Поворот крана-переключателя в положение 2
start/end		Установка всех элементов в начальное положение
Mon	Управление режимами удерживания магнитного сорбента в ячейке картриджа	Приблизить магнит к ячейке картриджа
Moff		Удалить магнит от ячейки картриджа

После проведённых предварительных экспериментов был обнаружен ряд недостатков, для устранения которых была создана вторая версия ПО и заменён двигатель приводящий в движение верхний поршень (дозировующее устройство), для обеспечения точного дозирования был выбран двигатель Haydon Kerk 43M. В таблице 2.2 представлен перечень программ с пояснениями для второй версии программного обеспечения.

Таблица 2.2 – Перечень команд для второй версии программы

Команда	Назначение	Параметры, пояснения
Начало/Конец	Начало/конец рабочего протокола	Установка подвижных элементов в начальное/конечное положение, пригодное для установки/снятия картриджа
Позиция N	Управление переключением между ячейками картриджа для смешивания реагентов	Установка крана переключателя в позицию N
Терм1 T X	Управление температурными режимами в ячейке картриджа, включая длительность воздействия	Установка температуры термостата, где T - температура в градусах, X – время в секундах
Вверх/вниз S V	Управление скоростью (расходом) и объёмом дозирования реагентов	Установка поршня (подъём/опускание) на расстояние S со скоростью V*
Мвкл	Управление режимами удерживания магнитного сорбента в ячейке картриджа	Установка магнита вплотную к рабочей ячейке
Мвыкл		Установка магнита к исходной координате (минимальное влияние на картридж)
Повтор A B	Для повтора блока команд при циклическом воспроизведении	Повтор выполнения предыдущих A команд в количестве B раз
Ожидание X	Пауза в работе протокола для задания время экспозиции реагентов и регулирования длительности обменных процессов, а также для работы УЗ модуля	Остановка на X секунд

Таблица 2.3 – Перечень параметров задаваемых команд

Параметр, рабочий диапазон	Характеристика
Скорость движения поршня, 0,01 – 8	0-8 мм/сек
Вертикальное движение поршня 0,01-30	0-50 мм
Погрешность установки поршня	±0,02 мм
Поворот крана переключателя, 1- 6	0-360°
Движение магнита к ячейке, мвкл/мвкл	0-30 мм
Температура в термостатируемой ячейке, температура, время	20 °С - 90°С ±2 °С, 0 – 900 сек

Таким образом, протокол работы представляет из себя последовательность команд, изменяя параметры которых возможно управление:

- скоростями дозирования реагентов;
- режимами перемешивания реагентов (длительность и интенсивность);
- температурными режимами внутри ячейки картриджа;
- длительностью стадий выделения НК.

Управление УЗ воздействием осуществляется с помощью отдельного модуля, который подробно описан в разделе 3.3.

Таким образом, в результате проделанной работы по разработке установки, картриджа для выделения НК, и программного обеспечения позволяющего управление выделением НК была достигнута задача по созданию макета программируемого автоматизированного прибора для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб.

Ключевыми параметрами для работы созданной экспериментальной установки являются:

- скорость движения жидких реагентов внутри картриджа (скорость дозирования);
- число и интенсивность перемешиваний реагентов внутри камер картриджа, для обеспечения высокой эффективности процессов.
- длительность стадий выделения НК в картридже;
- количество промывок сорбента с НК от остатков лизирующего реагента.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование эффективности выделения НК при изменении длительности стадий выделения.

Для исследования зависимости эффективности выделения НК от длительности стадий, увеличивали продолжительность прохождения отдельной стадии выделения, при помощи команды «Ожидание X», где X – время в секундах.

Таким образом в общем виде рабочий протокол мог выглядеть так, где «Ожидание 30» соответствовало времени увеличения однократной операции:

Начало

Позиция 5

Вверх 30 5

Позиция 1

Вниз 30 5

Ожидание 30

Повтор 5 5

...

Конец

В приведенной части рабочего протокола происходит перемешивание содержимого ячейки 1 забранным из ячейки 5 воздухом (перемешивание барботированием), после каждого перемешивания выдерживается пауза 30 секунд, данная операция повторяется ещё 5 раз. В итоге время перемешивания составляет 180 секунд, плюс время требуемое на осуществление забора и прокачки воздуха, а также перемещения между ячейками.

Включая стадию перемешивания с паузой, можно управлять длительностью как отдельных операций (смена растворов и инкубирование внутри отдельной ячейки, например в случае промывки), так и продолжительностью всей стадии в целом.

Как уже было отмечено ранее выделение состоит из 5 стадий: лизиса, сорбции, отмывки сорбента, сушки, элюции.

Для стадии лизиса время равнялось 10 минутам, в соответствии с рекомендациями производителя реагентов (за данное время производитель гарантировал лизис пробы для последующего извлечения НК).

При изменении длительности одной из стадий, остальные оставляли без изменения, их длительность соответствовала протоколу обеспечивающему воспроизводимое выделения НК на экспериментальной установке с эффективностью не менее 90%. Такой протокол для модельного образца был отработан и принят за «реперный», в свою очередь его эффективность сравнивали с ручным выделением НК, также на модельном образце.

Стадия сорбции НК

Для стадии сорбции НК изменяли время инкубирования пробы с суспензией магнитных частиц, после лизиса.

В таблице 3.1 представлены результаты эффективности выделения НК из модельного образца при изменении длительности стадии сорбции, эксперимент проводился в трёх повторах, в таблице представлены средние значения.

Таблица 3.1 –Эффективность выделения НК при различной длительности стадии сорбции.

Время сорбции, мин.	C[НК] исходная копий/мкл	C[НК] выделенная копий/мкл	Выход НК, %
1	$1,0 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^4$	46
5	$1,0 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^4$	74
10	$1,0 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^4$	95

Таким образом, для выделения НК из модельного образца, в автоматизированном режиме, на экспериментальной установке следует установить длительность стадии сорбции в течении 10 минут.

Стадия отмывки сорбента

На стадии отмывки сорбента изменяли время инкубирования промывочного раствора с суспензией магнитных частиц, после сорбции.

Отмывку сорбента целесообразно осуществлять при помощи многократной смены промывочных растворов. Однократной отмывки не достаточно и это чаще всего приводит к ингибированию последующего анализа НК, это можно объяснить тем, что во время первой промывки, раствор реагента быстро насыщается остатками лизата, и сильно снижает свои «очищающие» характеристики. При контакте промывочного раствора с ранее отмытым сорбентом (вторая и последующие итерации) качество отмывки возрастает и не приводит к дальнейшему ингибированию анализа НК. Таким образом, далее речь идёт о двукратной отмывке, и соответственно длительности инкубирования каждой итерации в течении указанного времени.

В таблице 3.2. представлены результаты зависимости эффективности выделения ДНК из модельного образца при изменении длительности стадии промывки, эксперимент проводился в трёх повторах, в таблице представлены средние значения.

Таблица 3.2 –Эффективность выделения ДНК при различной длительности стадии отмывки.

Время отмывки, сек.	С[НК] исходная копий/мкл	С[НК] выделенная копий/мкл	Выход НК, %
15	$1,0 \cdot 10^5$	ингибирование*	-
30	$1,0 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^4$	90
60	$1,0 \cdot 10^5$	$9,2 \cdot 10^4$	92

*Ингибирование происходило ввиду недостаточной отмывки лизата от магнитного сорбента, на стадии элюции остатки лизата попадали в очищенный препарат и при ПЦР анализе подавляли реакцию амплификации.

Трёхкратная отмывка и более, не приводит к существенному улучшению результата выделения НК. При двукратной отмывке сорбента и длительностью

инкубирования каждой итерации 30 сек достигается такой же результат, как и при трёхкратной отмывке с инкубированием промывочного раствора и сорбента в течении 15 секунд, либо, не редко возникает ингибирование дальнейшего анализа НК. Это указывает на недостаточность отмывки сорбента при сокращении времени менее 30 секунд, даже при увеличении количества итераций смены промывочного раствора. Важно также учитывать, что длительность двукратной отмывки с длительностью инкубирования 30 секунд занимает практически столько же времени (разница менее 10 секунд), как трёхкратная с временем инкубирования промывочного раствора с сорбентом в течении 15 секунд.

Таким образом, для выделения НК из модельного образца следует использовать двухкратную отмывку с длительностью инкубирования промывочного реагента с сорбентом в течении 30 секунд.

Стадия сушки сорбента

Для стадии сушки сорбента изменяли время высушивания суспензии магнитных частиц от остатков промывочного буфера.

В таблице 3.3. представлены результаты зависимости эффективности выделения НК из модельного образца при изменении длительности стадии сушки сорбента, эксперимент проводился в трёх повторах, в таблице представлены средние значения. Сушка сорбента осуществлялась при помощи прокачивания воздуха из ячейки 4 (ячейка с магнитным сорбентом) в ячейку 5 (ячейка с фильтром), эта процедура повторялась в течении указанного в таблице 3.3 времени.

Таблица 3.3 – Эффективность выделения ДНК при различной длительности стадии сушки сорбента.

Время сушки, мин.	С[НК] исходная копий/мкл	С[НК] выделенная копий/мкл	Выход НК, %
1	$1,0 \cdot 10^5$	ингибирование*	-
5	$1,0 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^4$	85
10	$1,0 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^4$	95
15	$1,0 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^4$	40

*Ингибирование происходило ввиду недостаточного высушивания сорбента от остатков промывочного реагента, в следствии чего, на стадии элюции его остатки попадали в очищенный препарат и на ПЦР анализе подавляли реакцию амплификации.

Низкий выход НК (40 %) при 15 минутах сушки сорбента может быть объяснен слипанием магнитных частиц между собой в результате пересушивания магнитных частиц с НК, и как следствие низкой доступностью всех удерживаемых на поверхности сорбента НК для элюции.

Таким образом, для выделения НК из модельного образца, в автоматизированном режиме, на экспериментальной установке следует выполнять сушку сорбента после отмывки в течении 10 минут.

Стадия элюции (десорбции) НК

Для стадии элюции изменяли время инкубирования для элюирующего реагента с суспензией магнитных частиц, после сушки. В таблице 3.4. представлены результаты эффективности выделения ДНК из модельного образца при изменении длительности стадии промывки, эксперимент проводился в трёх повторах, в таблице представлены средние значения.

Таблица 3.4 – Эффективность выделения ДНК при различной длительности стадии элюции НК.

Время элюции, сек.	C[НК] исходная копий/мкл	C[НК] выделенная копий/мкл	Выход НК, %
1	$1,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^4$	30
5	$1,0 \cdot 10^5$	$9,1 \cdot 10^4$	91
10	$1,0 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^4$	97

Как видно из представленной таблицы 5 минут для стадии элюции достаточно, чтобы с поверхности магнитных частиц десорбировалось 91 % НК, таким образом для модельного образца время заключительной стадии выделения НК может быть сокращено до 5 мин, против 10 мин, рекомендованных производителем реагентов для выделения НК. Одной минуты на стадии элюции не достаточно для десорбции даже половины НК с поверхности магнитных частиц.

Таким образом, для выделения НК из модельного образца, в автоматизированном режиме, на экспериментальной установке следует использовать время элюции 5 минут.

Определение режимов дозирования и перемешивания реагентов для автоматического выделения НК

Для определения режимов дозирования и перемешивания реагентов устанавливали заправленный картридж без крышки (рисунок 2.3 п.10, рисунок 2.5 б). Управляя скоростью дозирования реагентов, подбирали параметры скорости и расхода (объёма) так, чтобы скорость была максимальной, при этом не происходило образование пузырей (пенообразование), так как при дальнейшей смене реагентов их удаление из ячеек картриджа практически невозможно и плохо воспроизводимо.

Таким образом были определены скорости дозирования (расхода) для реагентов:

- лизирующий реагент - до 1,5 мл/сек;
- осаждающий реагент – до 3 мл/сек;
- промывочный реагент – до 3 мл/сек;
- элюирующий реагент – до 2 мл/сек.

Определение скорости дозирования суспензии магнитных частиц (сорбирующего реагента), не целесообразно, так как в соответствии с методикой автоматического выделения, лизат добавляется к сорбенту, а для их смеси справедлива предельная скорость дозирования до 1,5 мл/мин.

Полученные результаты по скоростям дозирования (расхода) справедливы для данной конфигурации картриджа, и сильно зависят от диаметра его каналов и материала из которого изготовлен картридж, тем не менее основной вывод из данных результатов свидетельствует о том, что скорости дозирования различных реагентов внутри картриджа значительно отличаются и требуют определения в каждом индивидуальном случае в модели картридж – набор реагентов.

В разделе 3.1 определены режимы работы макета установки в автоматическом режиме, такие как: длительность стадий выделения НК, количество промывок сорбента, скорость дозирования (расхода) реагентов внутри картриджа.

3.2 Исследование влияния различной температуры на эффективность выделения НК

Для приготовления модельных растворов ДНК использовали раствор ДНК *m.tuberculosis* концентрации $1 \cdot 10^7$ копий/мкл, входящий в состав коммерческого набора «Ампли-Туб-РВ» (ЗАО «Синтол»). Для выделения ДНК *m.tuberculosis* на стекловолоконной мембране применяли набор «К-Сорб» (ООО «Синтол») со спин – колонками NucleoSpin (США). Рабочий модельный раствор концентрации $1 \cdot 10^5$ копий/мкл готовили методом последовательного разбавления, применяя для этой цели «Лизирующий реагент» (ЛР) из наборов «К-Сорб» и «М-Сорб». ЛР предназначен в общем случае для проведения лизиса клеточного материала, а также для создания оптимальных условий при последующей сорбции ДНК на микроколонке или магнитном сорбенте .

При количественном определении ДНК использовали реагенты, входящие в состав набора для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Туб-РВ»: праймеры, буфер, зонды, олигонуклеотиды, хлорид магния.

Все эти материалы были предоставлены ООО «Синтол» (г.Москва).

Для изучения воздействия температуры на эффективность выделения ДНК на стекловолоконной мембране изменяли температуру пробы во время сорбции с помощью термостата в экспериментальной установке.

Для приготовления исследуемых проб в 800 мкл лизирующего реагента добавляли 200 мкл водного раствора ДНК и перемешивали с помощью микроцентрифуги-встряхивателя «Циклотемп-901». Таким образом, концентрация ДНК в растворе, пропускаемом через миниколонку, составляла $2 \cdot 10^4$ копий/мкл. (В каждую партию растворов при выделении ДНК включали отрицательный контроль выделения, что позволяло оценить возможность загрязнения на этапе выделения). Для работы с набором М-Сорб добавляли 200 мкл пробы ДНК, 500 мкл Лизирующего реагента, 50 мкл лизирующего компонента и 400 мкл осаждающего реагента, в соответствии с методическими рекомендациями производителя набора для выделения.

Выделение на микроколонке (спин-колонке)

Производили смешивание пробы и лизирующего реагента, согласно методике из раздела 2.3.1, далее при помощи термостата нагревали раствор внутри ячейки до необходимой температуры, после чего выдерживали различное время (1, 5 и 10 мин соответственно), после чего протокол соответствовал методике ручного выделения.

Все стадии – за исключением первой – выполняли в соответствии с рекомендациями производителя набора «К-Сорб» (используемые растворы входят в состав набора «К-Сорб», компоненты растворов производителем не сообщаются).

Результаты выделения оценивались методом ПЦР-РВ, на приборе АНК 32.

Выделение НК на магнитном сорбенте

Для экспериментов на магнитном сорбенте заправляли картридж в соответствии с разделом 2.3, после чего добавляли 1 мл пробы в ячейку 1 и включали протокол на выполнение последовательности команд в соответствии с методикой, при этом задавая температуру на стадии сорбции от 20 до 90°C, с шагом в 10 °C. Далее протокол выполнялся без изменений в соответствии с разделом 2.3.1.

Результаты экспериментов во воздействие температуры на эффективность выделения НК.

Таким образом были получены результаты влияния температуры на стадию сорбции целевого продукта на сорбенте. В результате было выяснено, что зависимость эффективности сорбции от температуры носит линейный характер и растёт до 70°C, далее наблюдается практически линейный спад. Количество выделенной ДНК получали по результатам ПЦР-РВ анализа, соизмеряя с результатом с калибровки (10^5 и 10^3 копий/мкл). Результаты выделения НК на магнитном сорбенте и микроколонке оказался идентичным (различия в измеряемых точках не более 2-5%), вероятно потому что механизм сорбции ДНК на поверхности магнитного сорбента и силикатной мембраны

микроколонки одинаков, результат представлен на рисунке 3.1, где по оси абсцисс температура на стадии сорбции, по оси ординат процент выхода целевой ДНК от изначального количества ДНК в пробе.

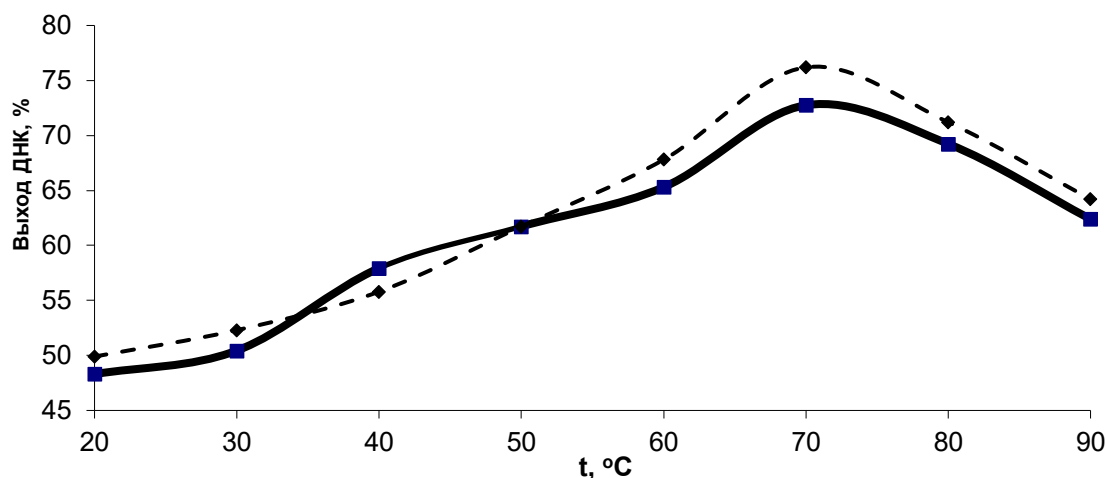


Рисунок 3.1 – Зависимость эффективности выделения НК от температуры во время стадии сорбции в течении 1 минуты. — — — — выход НК на магнитных частицах, - - - - - выход НК на спин-колонке (стекловолоконной мембране)

Как видно из результатов изменение температуры на стадии сорбции от 20°C до 90°C может привести к потере до 45% целевого продукта (при 20°C). Максимальный выход ДНК наблюдается при температуре сорбции около 70°C, а минимальный при 20°C.

Изменение температуры на других стадиях выделения ДНК (Отмывка сорбента, сушка сорбента и элюция ДНК с его поверхности), вносят вклад не более 15%, что соизмеримо с суммарной погрешностью дозирования около 4% и погрешностью оператора около 10-20%.

3.3 Исследование эффективности выделения НК под воздействием мегагерцового ультразвука на пробу во время сорбции.

Как было указано ранее в разделе 1.3 данной работы ультразвуковое воздействие способно увеличить скорость массообменных процессов в жидких средах.

Эффект от воздействия ультразвука значительно зависит от его частоты и интенсивности. Различные параметры задаваемого ультразвукового воздействия на жидкости послужили основой для создания различных инструментов для: очистки поверхности твёрдых тел, разрушения молекул, получения фрагментов молекул и т.д. В основе таких эффектов лежат механические колебания возникающие при озвучивании жидких образцов (проб) [67, 68]. Дело в том, что каждое тело имеет свою проницаемость для ультразвука, к тому же на границе раздела фаз наблюдается множество эффектов визуализировать которые возможно благодаря различного рода красителям и демонстрационным объектам. Современные технологии часто основываются на реализации гетерогенных процессов, протекающих между двумя или несколькими неоднородными средами в системах жидкость – жидкость и жидкость – твердое тело. К таким процессам относятся: процессы массообмена, процессы диспергирования, разделения жидкостей и суспензий, кристаллизации, предотвращения и т.д., а также различные химические и электрохимические реакции. Скорость протекания большинства гетерогенных процессов в обычных условиях не велика, и определяется величиной поверхности соприкосновения реагирующих компонентов.

Ультразвук и массообменные процессы в жидкой пробе.

В данном разделе рассмотрим основные уравнения массопереноса и физические эффекты, влияющие на скорость массообменных процессов, послужившие основой для исследований приведённых в данной диссертации.

Для понимания физики процесса массообмена напомним несколько основополагающих уравнений и зависимостей. В общем случае массоперенос в

жидкости происходит по градиенту концентрации из области с большей концентрацией вещества в область с меньшей концентрацией. Данный закон описывается формулой Фика [127], эмпирически открытой им в 1855г

$$j_x = -D\left(\frac{dC}{dx}\right). \quad (1)$$

Это уравнение первого закона Фика, справедливое для одномерной диффузии, где D – коэффициент диффузии, C – концентрация вещества, j_x – плотность потока вещества (в направлении x). Знак «минус» означает, что поток направлен из области с большей концентрацией в область с меньшей.

В жидкостях, диффузия определяется характеристиками броуновского движения частиц, средний сдвиг которых за единицу времени t , можно выразить соотношением Эйнштейна-Смолуховского [128]:

$$\Delta_x = 2Dt. \quad (2)$$

Где коэффициент диффузии можно выразить уравнением Стокса-Эйнштейна[129]:

$$D = \frac{RT}{6\pi r \eta N_A}. \quad (3)$$

В уравнении (3): R – универсальная газовая постоянная, N_A – число Авагадро, r – эффективный радиус диффундирующей молекулы; η – динамическая вязкость среды; T – абсолютная температуры среды.

Коэффициентом диффузии называют физическую величину, которая равна количеству диффундирующего вещества, проникающего за единицу времени через единицу поверхности, если разность плотностей на двух поверхностях, находящихся на расстоянии равном единице длины, равна единице.

Как видно из соотношений 2 и 3, скорость броуновского движения прямо-пропорциональна температуре среды, в нашем случае жидкой пробы, поэтому одним из способов увеличения скорости массообменных процессов служит

повышение температуры среды. Исследования данного явления приведены в главе 3 данной работы.

Как отмечалось ранее, применение ультразвука может являться эффективным способом по увеличению скорости массообменных процессов [1,71].

Ультразвуковая волна (УЗ) имеет механическую природу и распространяясь в жидкости, теряет часть своей энергии. Эта энергия частично переходит в тепловую, а частично передается молекулам среды в виде механического импульса, в жидких средах это приводит к возникновению различных гидродинамических эффектов. Эти эффекты называются **акустическими (иногда гидродинамическими)** и легко возникают в неоднородном ультразвуковом поле или вблизи веществ с отличающейся от среды распространения УЗ плотностью. В общем случае назовём их препятствиями.

При воздействии ультразвука наибольший эффект имеют эффекты в пограничном слое у поверхности препятствий. Данные эффекты формируют течения размерность и интенсивность которых зависят от параметров воздействующего на жидкую пробу ультразвука. Размеры акустических течений определяются толщиной акустического пограничного слоя. Толщина пограничного слоя h зависит от вязкости η и плотности ρ жидкости, а также от частоты ω ультразвука [129]. Она намного меньше длины волны ультразвука и рассчитывается по формуле:

$$h = \sqrt{\frac{\eta}{2\rho\omega}} . (4)$$

Пограничный слой может также возникать при взаимодействии ультразвуковой волны с микро неоднородностями, имеющими отличную от среды плотность, например, при взаимодействии с магнитными частицами сорбирующими нуклеиновые кислоты.

Подставив в формулу (4) значения: вязкости лизирующего реагента $\eta = 0,9$ спуаз, плотности лизирующего реагента $\rho = 0,92$ г/см, получаем толщину

пограничного слоя $h = 0,0024$ мм или $2,4 \cdot 10^{-6}$ м, при этом магнитный сорбент, используемый в экспериментах, имеет размерность от 10 до 100 мкм, или $10^{-6} - 10^{-5}$ м, таким образом при возникновении коагуляции частиц сорбента в спокойном состоянии, УЗ воздействие может способствовать разрушению этик конгломератов и разъединению магнитных частиц друг от друга, что приводит к увеличению сорбционной емкости, так как увеличивает доступную для взаимодействия площадь силикатной оболочки всего сорбента.

Важными параметрами при изучении влияния ультразвука на массообменные процессы в жидкости является его интенсивность I и частота ω .

Из формулы 4 видно что квадрат толщины пограничного слоя обратно пропорционально зависит от частоты ультразвука (5), чтобы оценить длину ультразвуковой волны в жидкости, возьмём к примеру скорость звука в воде (c) за величину 1500 м/с, подставим в формулу (5) частоту ультразвука примем равной 1 МГц, если:

$$\lambda = \frac{c}{\omega}, \quad (5)$$

то длина ультразвуковой волны в воде равна 1,5 мм.

Для достижения необходимого эффекта, параметры частоты и интенсивности ультразвука могут изменять.

Интенсивность звука – это количество энергии (Вт) проходящее за 1 секунду через площадь равную 1 см^2 , таким образом интенсивность ультразвука I имеет размерность Вт/см².

Распространяясь в жидкой среде ультразвук создаёт давление называемое акустическим (P) которое можно вычислить как произведение частоты и амплитуды ультразвуковой волны (A), формула (6).

$$P = \omega A. \quad (6)$$

Связь акустического давления и интенсивности ультразвука можно выразить уравнением (7).

$$I = \frac{P^2}{2\rho c} \cdot (7)$$

Таким образом, желая изменить интенсивность ультразвукового воздействия, при сохранении его частоты - изменяют амплитуду колебаний. Физический смысл интенсивности - это энергия приходящаяся на единицу площади, в диссертации представлены данные экспериментов по влиянию УЗ воздействия на сорбцию НК в диапазоне интенсивностей 1,2 - 3,0 Вт/см². В опубликованных работах [3] , есть данные о энергии связывания фрагмента НК с силикатной поверхностью которая составляет порядка 1,5 ккал/моль. При переводе Вт в ккал получаем 1,2 - 3,0 Вт/см² ~ 0,28 – 0,71 ккал/см² Вт = 0,02 ккал/мин. При подсчёте площади кюветы (Диаметр 12 мм) где происходит воздействие УЗ на пробу с сорбентом получаем 3,77 см, таким образом энергия приходящая за единицу времени на магнитный сорбент на интенсивности 1,2 Вт/см² составляет 1,05 ккал, а при интенсивности 3,0 Вт/см² составляет 2,67 ккал, что превышает энергию связывания фрагмента НК с силикатной мембраной (1,5 ккал), чем также можно объяснить снижение эффективности выделения НК при увеличении интенсивности УЗ выше 2,2 Вт/см².

При высоких интенсивностях ультразвукового воздействия на жидкости наблюдается явление ультразвуковой кавитации.

Ультразвуковая кавитация - образование в жидкости под воздействием ультразвука, пульсирующих и захлопывающихся пузырьков, заполненных паром и/или их смесью. Кавитация может нести ряд положительных эффектов таких как создание направленного массопереноса, так и негативных, вплоть до разрушения биологических молекул и клеток в следствие высокой интенсивности и возникновения локальных максимумом энергии приводящих к разрушению физико-химических взаимодействий [130-134]. Данное явление по

видимому обуславливает снижение эффективности выделения нуклеиновых кислот при воздействии ультразвука более 2,4 Вт/см².

Применение ультразвука в до-кавитационных режимах открывает широкие перспективы, и позволяет использовать позитивный вклад гидродинамических эффектов в увеличение скорости массообменных процессов [135]. Под действием ультразвука в жидкости возникают Эккартовские течения, они имеют сантиметровую размерность и возникают вследствие акустического давления распространяемого по жидкой пробе. В условиях однородной плотности и отсутствия преград, УЗ волны создают мощные турбулентные потоки визуализировать которые возможно с помощью красителей и небольших частиц, пример такой визуализации приведён на рисунках 3.4, 3.5 [136].

Помимо течений Эккарта в близи препятствий (например стенок кюветы в которую помещена проба) возникают акустические течения Релея, и их размер больше величины пограничного слоя, также такие возмущения называют поверхностными, так как они распространяются по поверхности твёрдого тела в жидкости. Их длина, сопоставима с длиной ультразвуковой волны и пропорциональна:

$$L \sim \lambda/2. \quad (8)$$

Скорость приблизительно составляет 90% скорости распространения поперечной волны.

Наконец, самые малые по размерам акустические течения возникают в пограничном слое между жидкостью и твёрдым препятствием (включением, например магнитной частицей) носят имя Шлихтинга, длину которых можно выразить так:

$$L_{Ш} = \frac{\lambda h}{2} . \quad (9)$$

Где h – толщина пограничного слоя определяемого по формуле (4). Таким образом, воздействие ультразвука на жидкую пробу порождает множество гидродинамических эффектов как на границе раздела фаз твёрдое тело-

жидкость, так и по всему объёму пробы, куда оказывается ультразвуковое давление.

Для численной оценки этих влияний, а также определения режимов УЗ воздействия позволяющих достигать высокие значения эффективности выделения НК на магнитном сорбенте, а также решения задач сформулированных во введении к данной работе, был проведен ряд экспериментов.

Для приготовления модельных растворов ДНК использовали раствор ДНК *M. tuberculosis* концентрации $1 \cdot 10^7$ копий/мкл, входящий в состав коммерческого набора «Ампли-Туб-РВ» (ООО «Синтол»). Для выделения ДНК *M. tuberculosis* применяли микроколонки со стекловолоконной мембраной NucleoSpin (Macherey-nagel, США), входящие в состав набора «М-Сорб-Туб» (ООО «Синтол»). Рабочий модельный раствор концентрации $1 \cdot 10^5$ копий/мкл готовили методом последовательного разбавления, применяя для этой цели «Лизирующий реагент» (ЛР) из набора «М-Сорб-Туб». (ЛР предназначен в общем случае для проведения лизиса клеточного материала, а также для создания оптимальных условий при последующей сорбции ДНК на микроколонке).

При количественном определении ДНК использовали реагенты, входящие в состав набора для проведения ПЦР-РВ «Ампли-Туб-РВ»: праймеры, буфер, зонды, олигонуклеотиды, хлорид магния.

Для проведения экспериментов по исследованию воздействия ультразвука на эффективность выделения ДНК создали подключаемый УЗ модуль пробоподготовки, на базе «Акустического фильтра» производства ИАП РАН. Для осуществления контакта ультразвукового воздействия с пробой на фильтре была изготовлена насадка для фиксирования кюветы. Схема УЗ модуля представлена на рисунке 3.2 (а) и (б) для контакта с магнитными частицами в пробе.

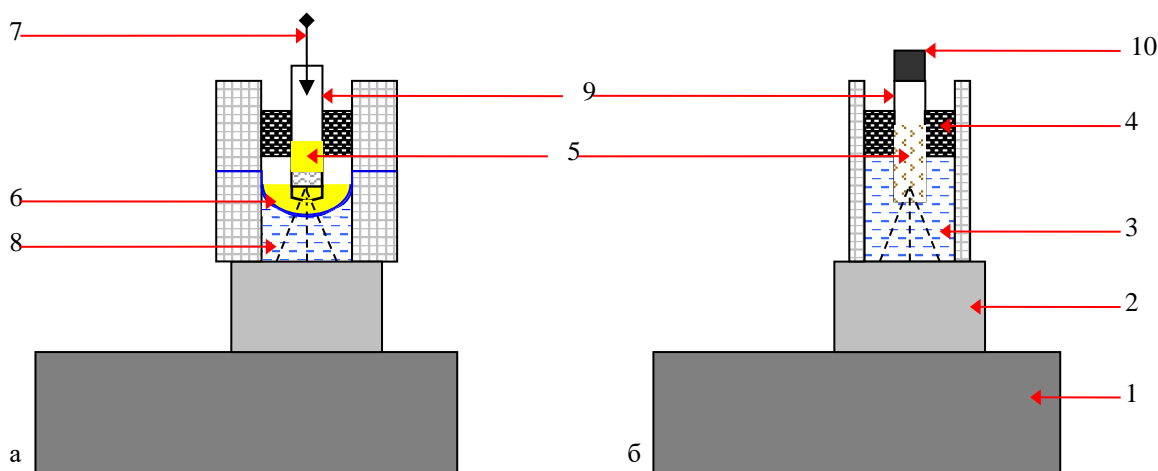


Рисунок 3.2 – Схемы УЗ модуля пробоподготовки со стекловолокном (а) и с магнитными частицами (б), д 1 – блок управления УЗ излучением, 2 – УЗ излучатель, 3 – дистиллированная вода, 4 – материал для фиксации колонки с силикатной мембраной (а), кювета с магнитным сорбентом, 5 – проба объемом 1 мл, 6 – кювета для сбора пробы после пропускания через стекловолоконную мембрану, 7 – устройство подачи пробы (шприцевой дозатор), 8 – УЗ излучение, 9 – колонка со стекловолоконной мембраной (а), кювета (б), 10 – пробка

Подключаемый УЗ модуль пробоподготовки позволяет изменять интенсивность ультразвука в жидкой среде в диапазоне от $0,5 \text{ Вт/см}^2$ до $3,4 \text{ Вт/см}^2$, задавать частотный диапазон излучения от 2,5 до 3,0 МГц.

Оценку выделения НК производили методом ПЦР-РВ на приборе АНК-32 ИАП РАН (Россия). Прибор позволяет получать результат амплификации одновременно из 32 проб. Режим работы (параметры амплификации) выбирали в соответствии с инструкцией к набору «Ампли-Туб-РВ».

Методика экспериментального исследования эффективности выделения ДНК под действием ультразвука различной интенсивности.

Для приготовления исследуемых проб в 800 мкл ЛР добавляли 200 мкл рабочего раствора ДНК и перемешивали с помощью микроцентрифуги-встряхивателя «Циклотемп-901». Таким образом, концентрация ДНК в растворе,

пропускаемом через спин-колонку, составляла $2 \cdot 10^4$ копий/мкл. (В каждую партию растворов при выделении ДНК включали отрицательный контроль выделения, что позволяло оценить возможность загрязнения на этапе выделения). Далее каждую пробу (пробу на каждой интенсивности УЗ), подвергали следующим манипуляциям:

Сорбция ДНК

1. Пробу помещали в стеклянную кювету объёмом 2 мл подключаемого УЗ модуля пробоподготовки (рисунки 2.1, 3.2), добавляли 50 мкл сорбирующего раствора и 500 мкл раствора ОР-Туб. Тщательно перемешивали содержимое кюветы до равномерного распределения сорбента, помещали в установку как показано на рисунке 3.2.

Далее включали УЗ на частоте 2,65 МГц с заданной интенсивностью от 1,2 Вт/см² до 3,2 Вт/см², где изменяли ее на 0,2 Вт/см², для каждого следующего выделения. После окончания воздействия, извлекали кювету. Помещали содержимое в 3 ячейку картриджа и устанавливали картридж в экспериментальную установку, запускали выполнение протокола выделения минуя стадии лизиса и сорбции, поскольку они были проведены ранее.

Для определения концентрации ДНК отбирали дважды по 10 мкл раствора, полученного при элюировании ДНК, и проводили анализ методом ПЦР-РВ с использованием калибровочных образцов на приборе АНК-32 (анализ проводили в двух повторах).

Результаты экспериментальной работы по исследованию эффективности выделения ДНК под действием мегагерцового ультразвука

При облучении пробы ультразвуком наблюдали возникновение возмущений в жидкости, при которых на верхней границе раздела фаз возникал фонтан, который от практически не заметного, на низких интенсивностях до 1,2 Вт/см², увеличивался по мере повышения интенсивности излучения до 3,0 Вт/см²[137]. При этом также увеличивался нагрев пробы, результат измерений приведён на рисунке 3.3.

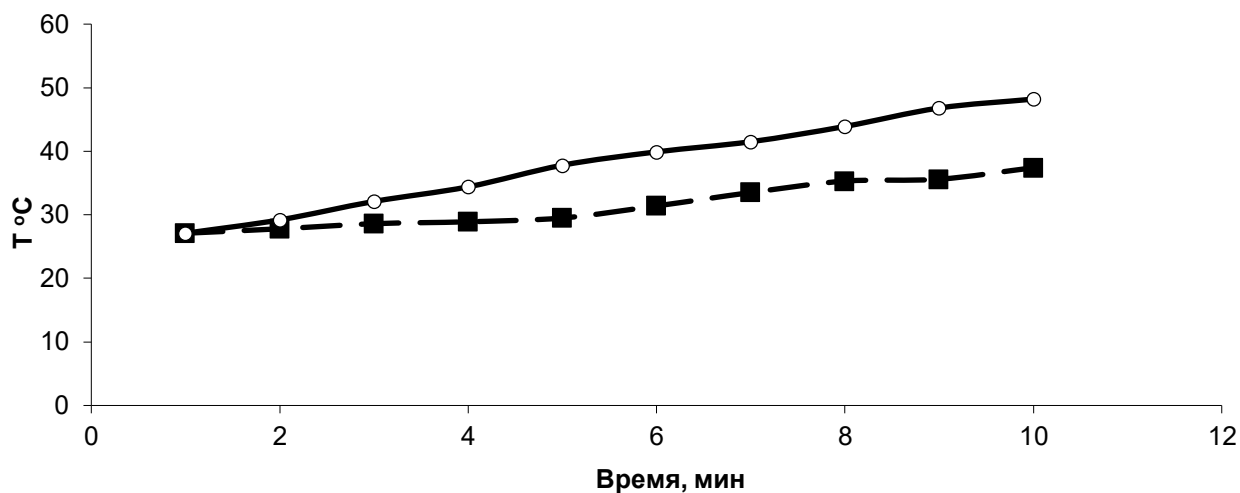


Рисунок 3.3 – Зависимость температуры пробы от времени воздействия УЗ.

- - - интенсивность УЗ 1,2 Вт/см², — — — интенсивность УЗ 3,0 Вт/см²

Как видно из измерений, при облучении, с течением времени температура пробы может достигать тех значений, при которых эффективность выделения НК существенно выше, чем при комнатной температуре [1]. Таким образом, помимо возникновения гидродинамических течений, повышающих скорость массопереноса, положительный вклад в эффективность сорбционных процессов может вносить и повышающаяся со временем температура.

При воздействии УЗ, на пробу с магнитными частицами, визуально наблюдали движение магнитных частиц по всему объёму раствора. Характер движения изменялся в зависимости от интенсивности ультразвука, при этом скорость визуально наблюдаемых массовых (групповых) перемещений частиц в кювете увеличивалась по мере возрастания интенсивности ультразвука.

Время полного взвешивания магнитных частиц в растворе зависело от интенсивности ультразвука, не линейно, причиной тому может являться некоторая полидисперсность магнитного сорбента основная фракция которого лежит в пределах 10-40 мкм. Важно отметить, что при выключении ультразвука частицы постепенно оседают на дно, а при повторном включении эффект постепенного взвешивания повторяется.

Важно учитывать что ввиду размера частиц на них может воздействовать сила радиационного давления, которая в свою очередь не действует на более мелкие частицы, например – частицы красителя «метиленовый голубой», для прояснения этой ситуации провели демонстрационные опыты по озвучиванию магнитных частиц в растворе с каплей красителя, характерные изменения представлены на рисунках 3.4 е,ж,з.

При озвучивании пробы в течении 10 минут при интенсивностях более 2,6 Вт/см² наблюдали постепенное помутнение раствора пробы, начиная с 4-5 минуты, скорость помутнения увеличивалась с возрастанием интенсивности УЗ. Однако образование пузырьков газа происходило только на интенсивности 3,0 Вт/см² (рисунки 3.4а, 3.4б).

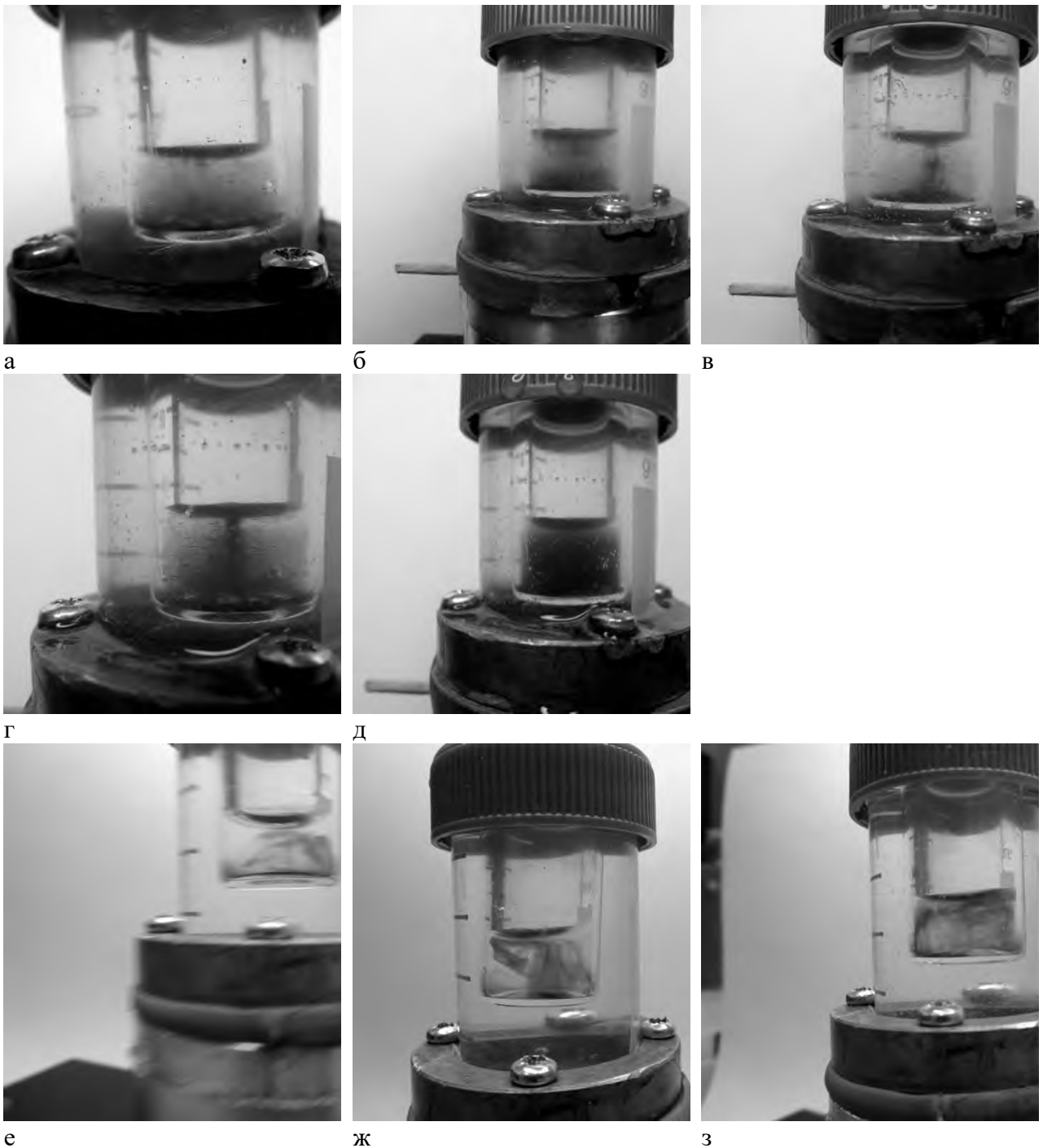


Рисунок 3.4 – Эффекты, визуально наблюдаемые при воздействии УЗ на магнитные частицы в жидкости (пробе), где а) – $I_{US} 1.4-1.8 \text{ Вт/см}^2 0-5 \text{ сек}$, б) $I_{US} 1,4-1,8 \text{ Вт/см}^2 45-60 \text{ сек}$, в) $I_{US} 1,4-1,8 \text{ Вт/см}^2 5-45 \text{ сек}$, г) $I_{US} 2.0-2,4 \text{ Вт/см}^2 30-60 \text{ сек}$, д) $I_{US} 2,6-3,0 \text{ Вт/см}^2 0-60 \text{ сек}$, е) $I_{US} 1,4-1,8 \text{ Вт/см}^2, 0-5 \text{ сек}$ ж) $I_{US} 1,8-2,4 \text{ Вт/см}^2 0-5 \text{ сек}$; з) $I_{US} 2,8-3,0 \text{ Вт/см}^2 0-5 \text{ сек}$

Полученные наблюдения особенно ценны при сопоставлении их с данными по исследованию эффективности выделения НК под действием УЗ

различной интенсивности, так как имеют место значимые изменения в поведении частиц сорбента, и смена тренда выхода НК под действием УЗ с положительного на отрицательный.

Впервые о «переходном» воздействии УЗ было отмечено в литературе ещё в середине 20 века [138]. Автор Lieberman L.N., констатирует, что при применении фокусированного ультразвука, как в нашем случае, распространение луча происходит без отражения от стенок цилиндра, при этом, при увеличении диаметра трубки осевая скорость течения Экарта увеличивается. Исследователь указывает на существование двух областей зависимости скорости течения от интенсивности ультразвука, где зависимость носит линейный характер, но с разными константами. Дальнейшие рассуждения автора приводят к заключению, что судя по всему критерий Рейнольдса (число Рейнольдса) при критической скорости гидродинамических течений Экарта имеет порядок 100, что в 20 раз меньше чем значение этого критерия при расчётах ламинарных потоков. Также автор отмечает, что вихревое течение недостаточно симметрично, относительно вертикальной оси проведённой через центр источника УЗ, такое нарушение симметрии может приводить к нарушению взаимосвязи между скоростью жидкости и интенсивностью ультразвука. При попытке отследить движение отдельно взвешенных частиц наблюдается смещение оси их циклического движения относительно её центра, при этом частица сохраняет поступательное движение [139]. В работе [140] показано, что подобное акустическое течение не однородно. В нашем случае это обозначает присутствие зоны в которой данное УЗ воздействие будет наиболее «полезным». Существенным обстоятельством при анализе воздействия УЗ на твёрдые тела в жидкости является возникновение течений Шлихтинга, играющих основную роль в интенсификации теплообмена в пограничном слое [141-143]. При этом, по расчётам размерность пограничного слоя, в котором и возникают данные микротечения, при комнатной температуре составляет единицы микрометров [144, 145]. Таким образом, при воздействии УЗ вблизи каждой частицы сорбента (в нашем случае размер частицы ≥ 10 мкм) возникает несколько гидродинамических течений Шлихтинга, что и является судя

по всему основным механизмом интенсификации массопереноса целевого продукта (НК) из раствора к поверхности сорбента.

При обработке полученных экспериментальных данных, полученных на подключаемом модуле пробоподготовки, была выявлена «критическая» интенсивность УЗ, при дальнейшем повышении которой изменялась тенденция по увеличению эффективности выделения НК, на противоположную. Визуально наблюдали возникновение турбулентных эффектов, при повышении интенсивности УЗ выше «критической», при этом интенсивность турбулентных возмущений возрастала пропорционально увеличению интенсивности УЗ. Для визуального определения границ такой «критической» интенсивности УЗ был проведён эксперимент с дистиллированной водой помещённой в кюветы с диаметром 13 и 21 мм. Кювета диаметром 13 мм использовалась в экспериментах, представленных в диссертации, направленных на исследование эффективности выделения НК под воздействием УЗ. Кювета диаметром 21 мм была аналогична по строению и материалу кювете с диаметром 13 мм и была необходима для анализа визуально наблюдаемых эффектов при воздействии УЗ различной интенсивности на сорбент в жидкости. Для демонстрации и анализа таких эффектов в каждую из кювет содержащих пробу 1 мл, помещены магнитные частицы в суспензии объёмом 100 мкл, при этом наблюдали появление турбулентных потоков при разных интенсивностях (рисунок 3.5).

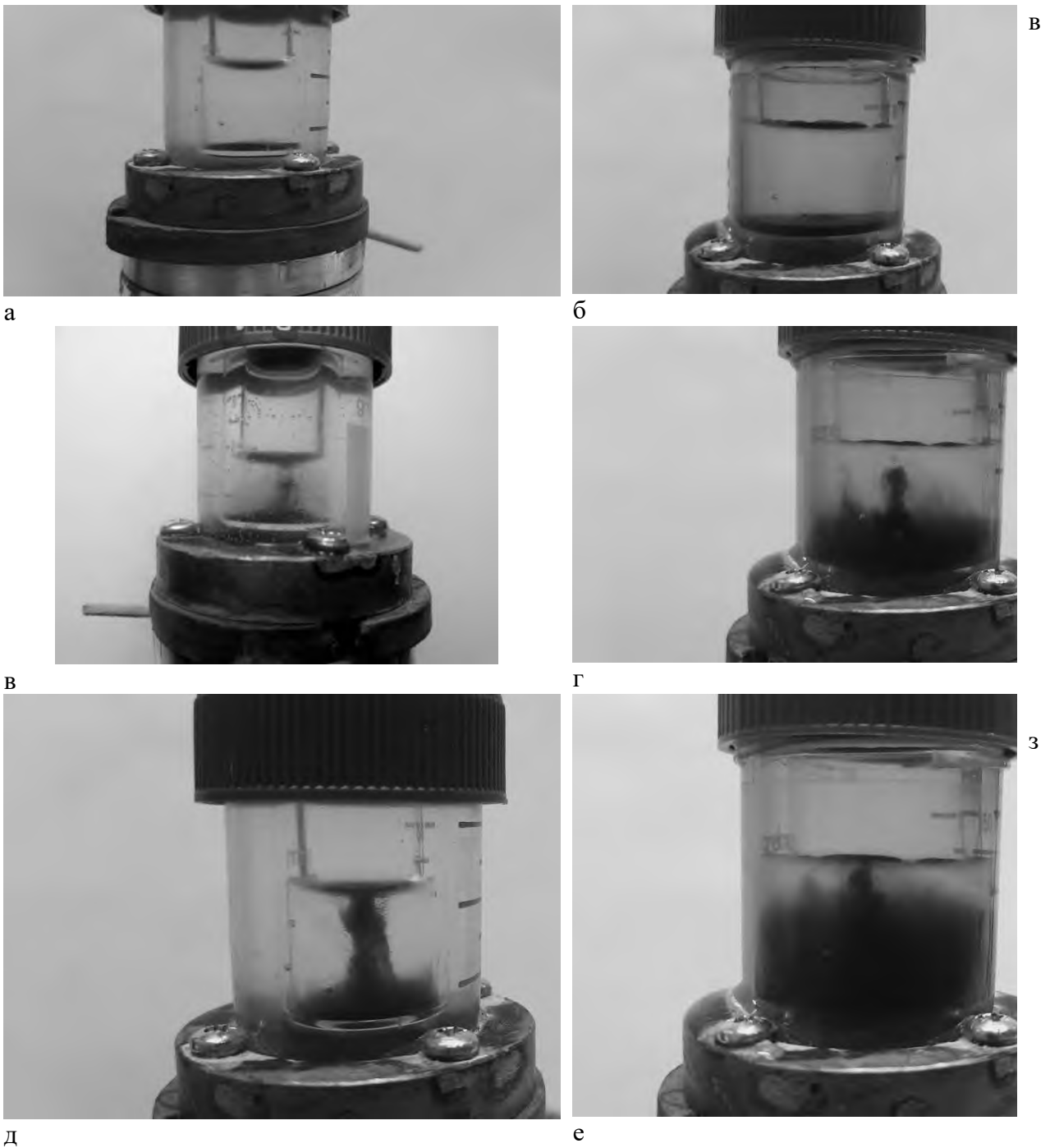


Рисунок 3.5 – Наблюдаемые эффекты в кюветах различного диаметра с магнитным сорбентом, при разных интенсивностях ультразвука), где А) $D_k=13\text{мм}$ $I_{US} 0 \text{ Вт/см}^2$, б) $D_k=21\text{мм}$ $I_{US} 0 \text{ Вт/см}^2$, в) $D_k=13\text{мм}$ $I_{US} 1,6 \text{ Вт/см}^2$, г) $D_k=21\text{мм}$ $I_{US} 1,6 \text{ Вт/см}^2$, д) $D_k=13\text{мм}$ $I_{US} 2,8 \text{ Вт/см}^2$, е) $D_k=21\text{мм}$ $I_{US} 2,8 \text{ Вт/см}^2$

Вероятно, что снижению эффективности выделения НК на поверхности магнитного сорбента под воздействием УЗ не только зависит от возникающей турбулентности при повышении интенсивности УЗ выше «критического»

значения. Важным обстоятельством при работе в режиме интенсивности выше $2,2 \text{ Вт/см}^2$, а особенно при длительностях воздействия на пробу (более 5 минут), является нагревание раствора пробы, причиной которому служит высокая интенсивность гидродинамических течений в пограничном слое и как следствие трение жидкости. При анализе размерности гидродинамических эффектов и объёма всей пробы (сечения) возникает закономерный вывод о сильном локальном разогреве пограничного слоя, который является «нагревателем» всего объёма пробы.

При сопоставлении данных зависимости эффективности выделения НК под воздействием УЗ с результатами экспериментов по исследованию зависимости выделения НК под воздействием различных температур возникает закономерный вывод о возникновении локального разогрева пробы в пограничном слое выше 70°C , так как при дальнейшем повышении температуры эффективность выделения НК снижается с возрастанием температуры пробы.

При отсутствии ультразвукового воздействия эффективность выделения ДНК на экспериментальной установке, не превышает 39-45 %, при сорбции в течении 1 минуты, 50-65% при сорбции в течении 5 минут и 60-90% при сорбции 10 минут.

По данным проведённых исследований удалось определить зависимости выхода ДНК при выделении на экспериментальной установке под воздействием ультразвука в диапазоне от $1,2-2,2 \text{ Вт/см}^2$, при этом наибольшую эффективность выделения НК удаётся достичь используя ультразвуковое воздействие с интенсивностью $2,0-2,2 \text{ Вт/см}^2$. Стоит также отметить, что при этом зависимость от времени УЗ воздействия не носит определяющий характер, так при облучении в течении 1 и 10 минут данные разнятся всего на 15 %. Наибольшие различия происходят при больших интенсивностях УЗ, там данные могут отличаться более чем на 20%, однако величины выхода нуклеиновых кислот при таких интенсивностях воздействия ультразвука не максимальны [5].

На рисунке 3.6 представлен график зависимости средних значений выхода ДНК на стекловоллокне от интенсивности ультразвука при облучении в течении

1 минуты на подключаемом модуле пробоподготовки. В диапазоне интенсивностей от 1,2 до 2,0 Вт/см² изменение средних значений выхода ДНК, может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 49.58 x - 15.92 I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.95$ а при дальнейшем повышении интенсивности происходит уменьшение эффективности выделения НК, что может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 179.79 - 49.04 x I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.97$ [9].

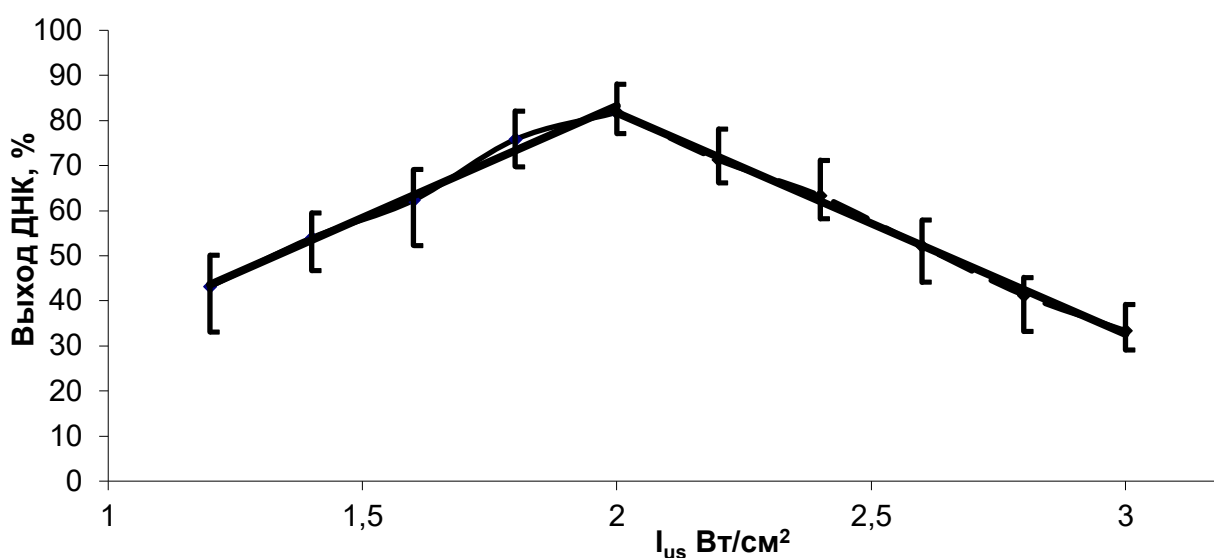


Рисунок 3.6 – Выход ДНК при сорбции на стекловолоконной мембране от интенсивности ультразвука при облучении в течении 1 минуты

На рисунке 3.7 представлен график зависимости средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 1 минуты, на подключаемом УЗ модуле экспериментальной установки. В диапазоне интенсивностей 1,2 ÷ 2,2 Вт/см² изменение средних значений выхода ДНК, может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 16.88 + 32.28 x I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.91$ а при дальнейшем повышении интенсивности происходит уменьшение эффективности выделения НК, что может быть аппроксимировано линейной

зависимостью $Y_i = 128,25 - 23,31 \times I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.92$ [5].

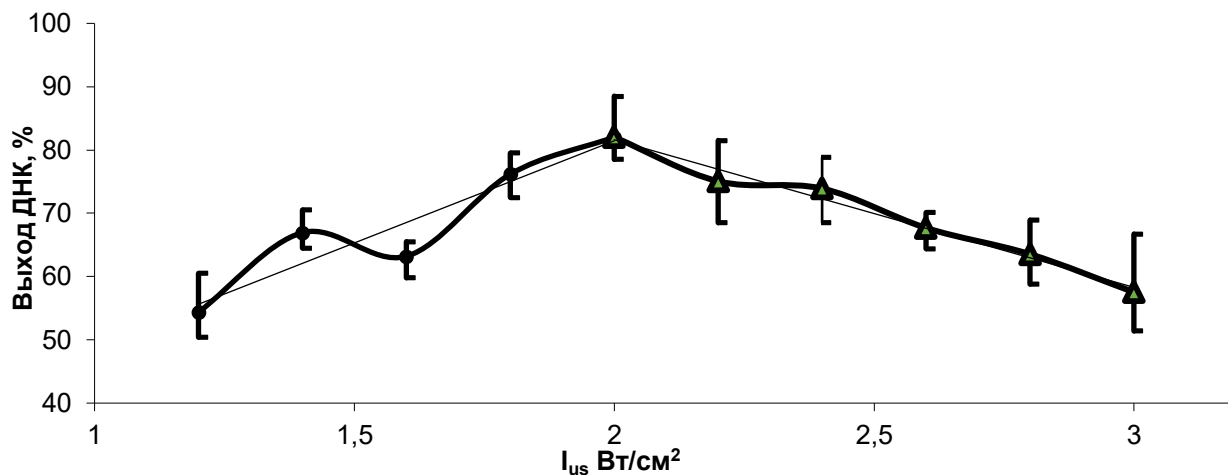


Рисунок 3.7 – Зависимость средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 1 минуты

На рисунке 3.8 представлен график зависимости средних значений выхода ДНК ($n=10$) при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 5 минут, на подключаемом УЗ модуле экспериментальной установки В диапазоне интенсивностей $1,2 \div 2,4$ Вт/см² изменение средних значений выхода ДНК, может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 17,91 + 34,50 \times I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.79$ а при дальнейшем повышении интенсивности происходит уменьшение эффективности выделения НК, что может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 153,39 - 29,85 \times I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.80$ [5].

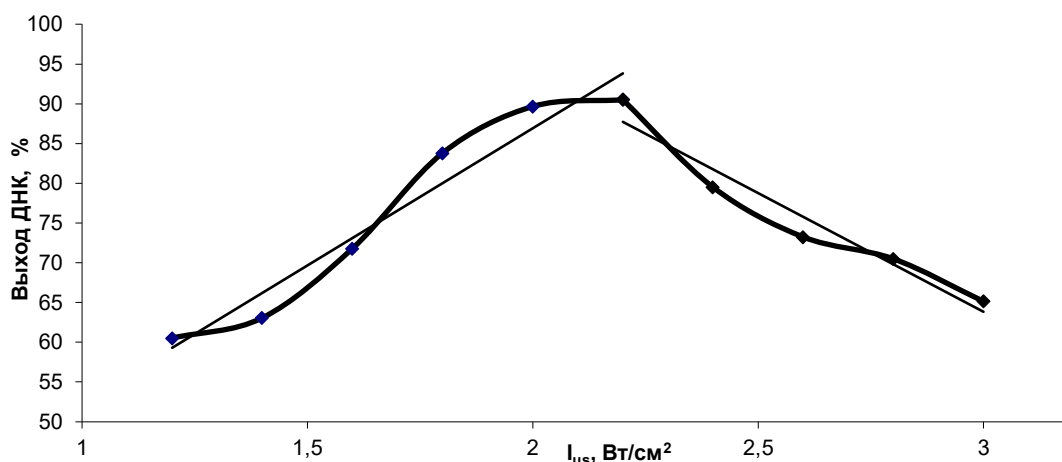


Рисунок 3.8 Зависимость средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 5 минут

На рисунке 3.9 представлен график зависимости средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 10 минут, на подключаемом УЗ модуле экспериментальной установки В диапазоне интенсивностей 1,2 - 2,4 Вт/см² изменение средних значений выхода ДНК, может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 49.31 + 22.11 \times I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.92$ а при дальнейшем повышении интенсивности происходит уменьшение эффективности выделения НК, что может быть аппроксимировано линейной зависимостью $Y_i = 217,40 - 52,00 \times I_{us}$, коэффициент корреляции полученной зависимости $r = 0.92$ [5].

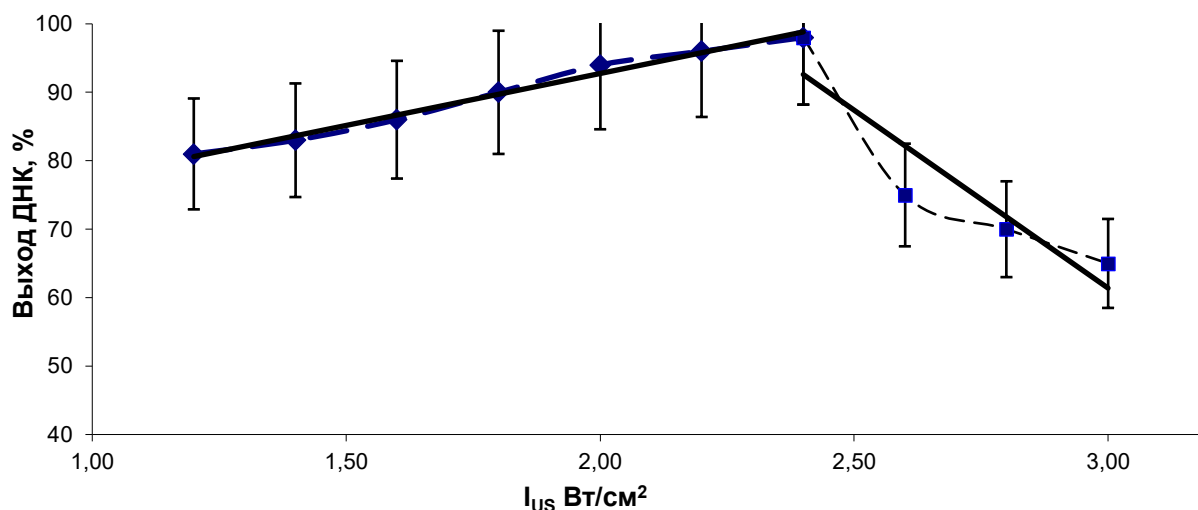


Рисунок 3.9 – Зависимость средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах от интенсивности ультразвука при облучении в течении 10 минут

Таким образом, увеличение интенсивности ультразвука на стадии сорбции до 2,4 Вт/см² позволяет увеличить выход ДНК в 1,25 раза по сравнению с сорбцией при комнатной температуре, в течении 10 минут, на подключаемом УЗ модуле экспериментальной установки. Повышение интенсивности ультразвука на стадии сорбции до 2,0 Вт/см² позволяет увеличить выход ДНК более чем в 2 раза по сравнению с сорбцией при комнатной температуре, в течении 1 минуты. Уменьшение величины сорбции при дальнейшем возрастании интенсивности ультразвука до 3,0 Вт/см² может объясняться возникновением гидродинамических течений, а именно течений Релея и Шлихтинга, которые, при высокой интенсивности могут препятствовать эффективной сорбции НК на магнитных частицах [5].

На рисунке 3.10 представлены результаты зависимости эффективности выделения ДНК от интенсивности УЗ в течении 1 мин., 5 мин., и 10 мин. Из представленных результатов можно сделать вывод, что увеличение времени УЗ воздействия до 5 мин позволяет достигать высокоэффективного выделения ДНК, более 90%, дальнейшее увеличение времени ультразвукового воздействия хоть и способно повысить % выхода ДНК, но не способно качественно влиять на

результат анализа, так как потери части целевой НК могут быть обусловлены погрешностями переноса пробы и дозирования.

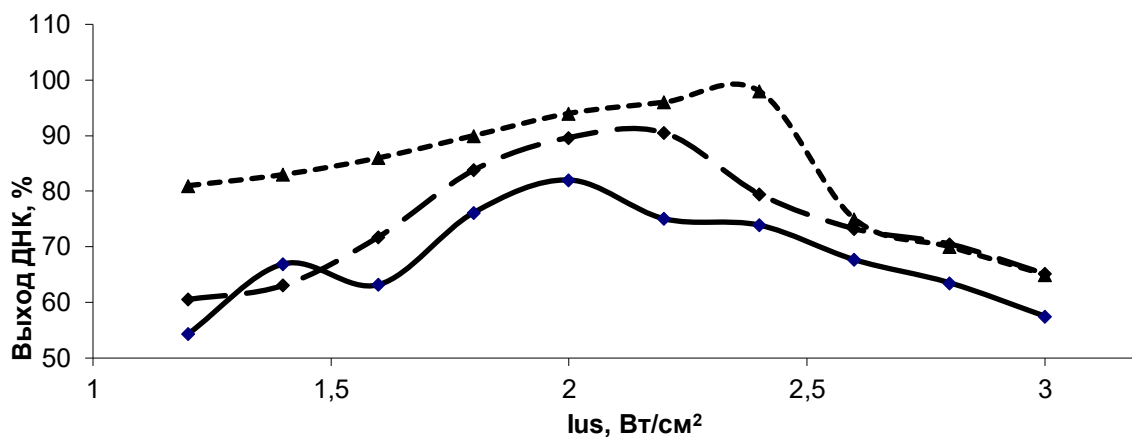


Рисунок 3.10 – Зависимость средних значений выхода ДНК при сорбции на магнитных частицах в течении различного времени.

1 мин - — ; 5 мин - - - ; 10 мин - - · - · -

На рисунке 3.11 представлен результат эксперимента, показывающего сохранность структуры используемой плазмиды при воздействии УЗ различной интенсивности в течении 1, 5 и 10 минут.

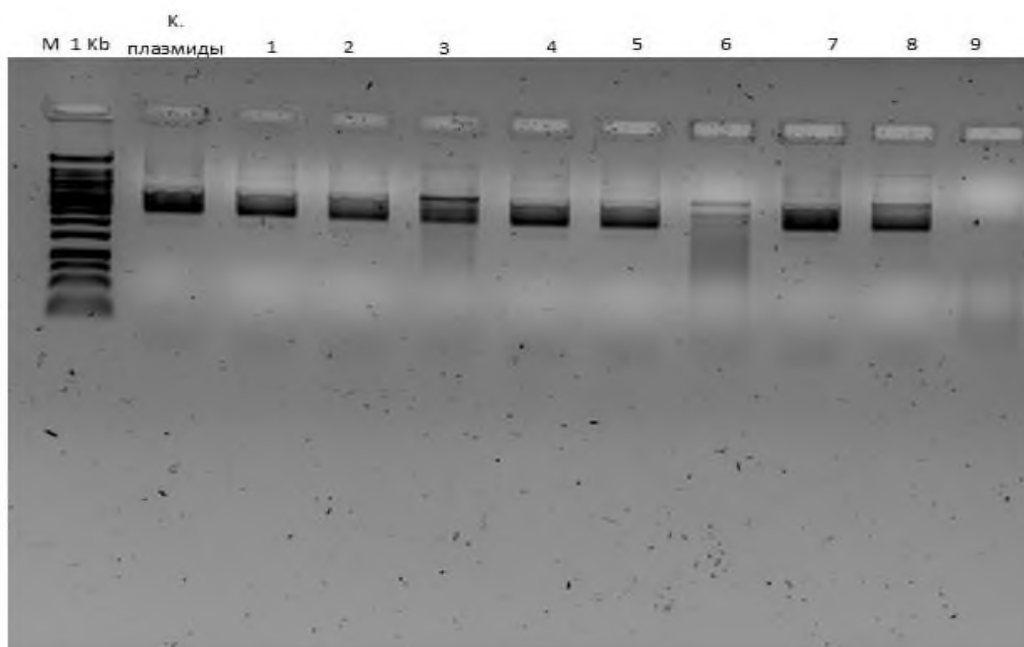


Рисунок 3.11 – Электрофорез плазмиды после УЗ воздействия. 1- интенсивность 1,2 Вт/см², 1 мин, 2 - интенсивность 2,0 Вт/см², 1 мин, 3 - интенсивность 3,0 Вт/см², 1 мин, 4- интенсивность 1,2 Вт/см², 5 мин, 5 - интенсивность 2,0 Вт/см², 5 мин, 6 - интенсивность 3,0 Вт/см², 5 мин, 7-

интенсивность 1,2 Вт/см², 10 мин, 8 - интенсивность 2,0 Вт/см², 5 мин, 9 - интенсивность 3,0 Вт/см², 10 мин

По результатам электрофореза можно сделать вывод от том, разрушение используемой нами плазмиды на фрагменты происходит при интенсивностях близких к 3,0 Вт/см², и при времени воздействия 5 минут и более. При этом, возможность детекции методом ПЦР-РВ может как сохраняться так и нет, так как при разрушении кольцевой структуры, может быть сохранён участок ДНК комплементарный праймеру, таким образом механизм дальнейшей амплификации не нарушается. Также факт фрагментации плазмиды при высоких интенсивностях и продолжительностях воздействия может объяснить обстоятельство появления «сверхэффективности» выделения ДНК (эффективности более 100 %), вероятен процесс при котором отдельные фрагменты ДНК случайным образом могут становиться мишенью для работы праймеров при амплификации тем самым искусственно повышая эффективность ПЦР-РВ анализа. Однако, данный процесс имеет слабовыраженный характер, сравнимый с погрешностью всей процедуры выделения ДНК, от пробоподготовки до непосредственной специфической индикации [9].

При объяснении результатов выделения НК под воздействием УЗ не исключено, что различия в эффективности выделения между опытами в которых облучение пробы происходило в течении 1 минуты и 10 минут, обусловлено повышением температуры, так как во втором случае изменения температуры пробы под воздействием УЗ значительны (рисунок 3.2).

Данные по выделению НК под воздействием УЗ высоких интенсивностей, указывают на тот факт, что вероятно явление термофореза может вносить существенный вклад в количество сорбировавшейся ДНК, а значит и всей процедуры выделения.

Уменьшение эффективности выделения нуклеиновых кислот на магнитных частицах при интенсивностях УЗ выше 2,2 Вт/см², вероятно стоит связывать, как уже отмечалось в это работе ранее с возникновением

турбулентных потоков, препятствующих сорбции ДНК на поверхности магнитного сорбента.

Для сравнения эффективности выделения ДНК под воздействием УЗ, на стекловолоконной мембране и магнитных частицах, проведём сравнение путём наложения графиков зависимости выхода ДНК с сорбентов, от интенсивности ультразвукового воздействия, результат представлен на рисунке 3.12.

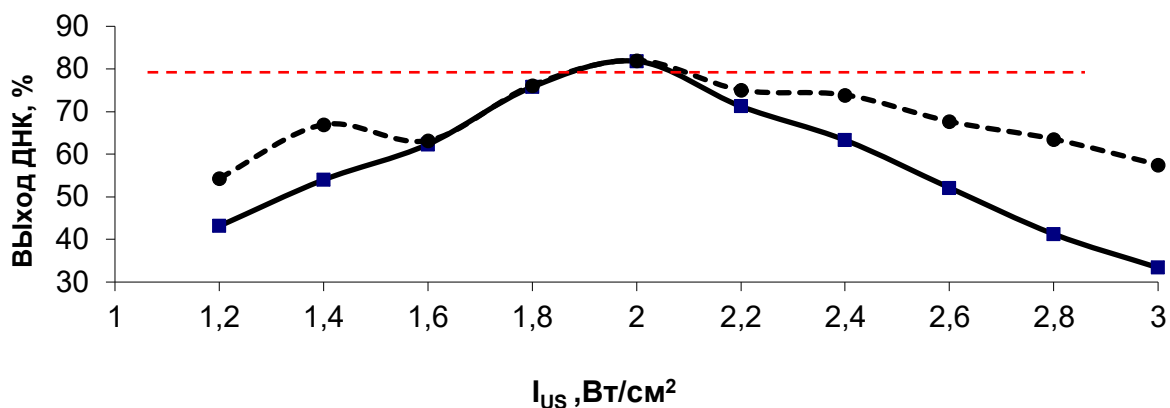


Рисунок 3.12 – Зависимость эффективности выделения НК на стекловолоконной мембране и магнитном сорбенте от интенсивности УЗ на стадии сорбции в течение 1 минуты.

— – выход ДНК на магнитных частицах, - - - выход ДНК на стекловолоконной мембране

При наложении графиков зависимостей эффективности выделения НК от УЗ воздействия на различных сорбентах в течении 1 минуты, рисунок 3.12, можно сделать вывод о том, что свойства свойствах магнитных частиц и стекловолоконных мембран по сорбции НК вблизи значений УЗ воздействия обеспечивающих максимум концентрирования близки. Из графиков также видно, что при УЗ воздействии на частоте 2,65 МГц и интенсивностями 1,8-2,0 Вт/см², в течение 1 минуты удаётся достичь в среднем 80% эффективности выделения НК.

Таким образом, для достижения максимальной эффективности выделения ДНК из модельных проб, по результатам наших исследований, следует использовать режим воздействия УЗ на пробу плазмиды *m.tuberculosis* интенсивностью 2,0 - 2,2 Вт/см² и продолжительностью 10 минут, это позволяет

выделить до 100% целевого продукта. Данный вывод является важным для выбора метода и режима при разработке перспективных высокоэффективных систем и устройств для выделения нуклеиновых кислот, в том числе с использованием одноразовых картриджей.

3.4 Апробация способа проточного концентрирования НК под УЗ воздействием

Одним из перспективных подходов для реализации высокоэффективного выделения НК представляется решение задачи по проточному концентрированию. Принимая во внимание результаты экспериментальных исследований по эффективности выделения НК под воздействием УЗ с частотой 2,65 МГц, различной интенсивности, а также способности УЗ удерживать частицы микрометрового размера [146,147], была сформулирована задача по исследованию режимов позволяющих выделять НК в потоке под воздействием УЗ. Для этого на первом этапе был модифицирован УЗ модуль, представлены на рисунке 3.2, была изготовлена стеклянная камера с объёмом проточной зоны 1,5 мл, прокачка пробы и реагентов осуществлялась с помощью перистальтического насоса, также перистальтический насос осуществлял прокачку дистиллированной воды для обеспечения контакта пьезоизлучателя (генератора УЗ) и охлаждения. На рисунке 3.13 представлена функциональная схема установки с закреплённой проточной камерой.

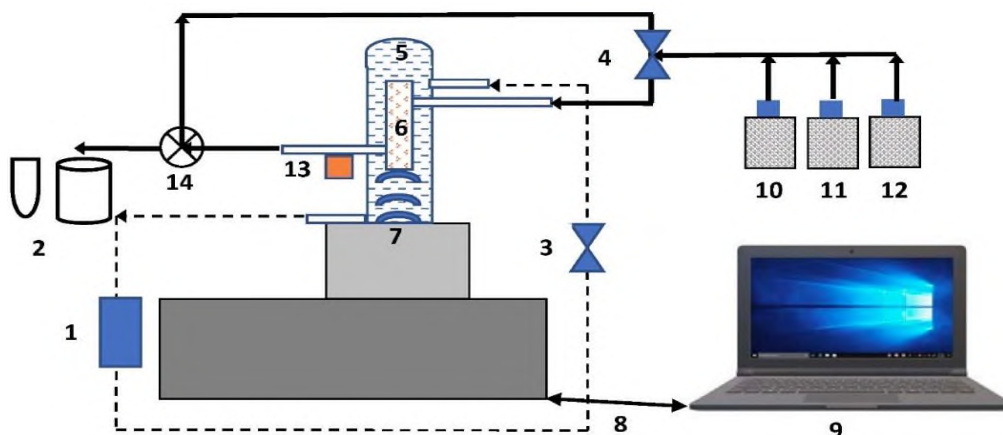


Рисунок 3.13 – Функциональная схема установки для проточного концентрирования НК, где 1 – емкость с дистиллированной водой, 2 – емкости для слива или очищенной НК, 3,4 – перистальтические насосы, 5 – внешний охлаждающий объем, 6 – реакционная камера, 7 – излучатель УЗ, 8 – канал связи, 9 – ПЭВМ, 10 – проба; 11 – промывной реагент, 13 – элюирующий реагент, 13 – постоянный магнит, 15 – кран переключатель

Созданная установка позволяет удерживать магнитный сорбент (магнитные частицы) в жидкости, размером 10 -100 мкм (основная масса частиц имеет размерность около 50 мкм), на интенсивности 2,2 Вт/см², удалось добиться удержания количества суспензии магнитного сорбента как для ручной реализации выделения НК, то есть 50 мкл. Подбор условий удержания осуществляли закачиванием частиц в камеру, и последующим изменением интенсивности от 1,2 - 3,0 Вт/см² с шагом в 0,2 Вт/см². Предельной интенсивностью, после которой наблюдались турбулентные возмущения в жидкости, подобные рисунку 3.4 д, являлась величина в 2,4-2,6 Вт/см², по-видимому более раннее наступление условий при которых возникает турбулентность связано с потоком жидкости через удерживаемые частицы. На интенсивностях менее 1,8 Вт/см² сорбент удерживался до скорости потока 1 мл/мин, далее вымывался. На интенсивности 2,0-2,2 Вт/см², удалось удерживать магнитные частицы на скорости потока до 5,0 мл/мин. Полученные результаты можно обобщить - параметры УЗ воздействия необходимые для удержания

магнитного сорбента 10-100 мкм в потоке жидкости: скорость прокачивания через камеру с сорбентом – до 5 мл/мин, интенсивность УЗ с частотой 2,65 МГц – 2,0-2,2 Вт/см² потока жидкости.

Таким образом были определены режимы удержания магнитного сорбента в потоке под воздействием УЗ, для реализации проточного выделения НК.

3.5.1 Апробация выделения НК в потоке под УЗ воздействием

Для постановки выделения НК в потоке были подготовлены пробы:

- объемом 10 мл состоявшая из водного раствора плазмиды *m.tuberculosis*, объемом 1 (концентрация 10³ молекул/мкл) мл, 3 мл ТЕ 1х буфер, 6 мл лизирующего буфера,

- объемом 3 мл, состоявшая из водного раствора плазмиды *m.tuberculosis* объемом 1 мл (концентрация 10³ молекул/мкл) и 2 мл лизирующего буфера – аналогичная проба для выделения НК на созданной установке с помощью картриджа.

При выделении НК в проточном режиме на созданной установке, в общем виде реализуется следующий алгоритм:

- в проточную колонку предварительно закачивается лизирующий буфер с расходом 3 мл/мин, после чего включается УЗ на частоте 2,65 МГц, и интенсивности 2,0 Вт/см², далее с расходом 1 мл/мин закачивается суспензия магнитных частиц объемом 50 мкл из того же набора реагентов;

- предварительно лизированная проба (режим лизиса соответствовал рекомендациям производителя набора реагентов, а именно + 70°C в течении 10 минут, с регулярным перемешиванием на вортексе), пропускается через проточную камеру с заданной скоростью потока (расходом), при необходимости выход с проточной камеры замыкают на вход обеспечивая таким образом циклическое пропускание пробы через сорбент в камере под воздействием УЗ;

- для осуществления отмывки сорбента пропускают промывочный реагент через камеру, с выключенным УЗ, и закреплённым на выходе из камеры магнитом, который удерживает магнитный сорбент, с расходом 0,1мл/мин,

увеличивая её в течении 5 минут постепенно до 1мл/мин пропускают 5 мл, затем ещё 5 мл со скоростью 3 мл/мин;

- сушку осуществляют путём прокачивания воздуха в течении 5 минут через проточную камеру;

- элюцию осуществляют путём пропускания элюирующего буфера объёмом 1 мл со скоростью 0,2 мл/мин через сорбент удерживаемый на выходе из проточной камеры при помощи магнита, повторяем процедуру 2 раза, включая реверс (обратный поток) на перистальтическом насосе, далее собираем полученный раствор и направляем на ПЦР-РВ анализ.

Эксперименты были разделены на две группы: выделения НК из проб объёмом 3 мл (как для стационарного выделения на картридже), выделение из проб объёмом 10 мл.

Первая серия экспериментов включала выделение из нескольких видов проб, где в качестве растворителя плазмиды помимо воды, как в модельной пробе также использовались вытяжки из стандартов почв и жидкое удобрение «Идеал».

Вытяжки из почв готовились из расчёта 1 гр почвы на весь объём пробы, после лизиса пробу центрифугировали на 4000 об., в течении 1 минуты и забирали супернетант, который использовали далее для выделения НК.

В экспериментах использовались:

- модельная проба (МП);
- жидкое удобрение «Идеал» (ИЛ);
- стандарт дерново-подзолистой почвы (ДПП);
- стандарт песчаной почвы (ПП);
- стандарт чернозёмной почвы (ЧЗП).

3.5.2 Результаты проточного выделения из проб различного объёма

Выделение из проб объёмом 3 мл

В таблицах 3.5 – 3.7 представлены результаты выделения НК в потоке с различными скоростями прокачивания (расхода), а также показана зависимость от количества прокачиваний пробы при сорбции НК через проточную камеру.

Таблица 3.5 – Выход НК из пробы 3 мл при однократном прокачивании

Особенности состава пробы	Выделение на картридже	Скорость потока, мл/мин				
		0,1 мл/мин	0,5 мл/мин	1,0 мл/мин	2,0 мл/мин	3,0 мл/мин
		Выход НК, %				
МП	75	70	73	60	50	20
ИЛ	71	68	66	42	41	10
ДПП	56	52	53	60	50	2
ПП	71	70	63	45	42	11
ЧЗП	62	57	55	28	38	23

Таблица 3.6 – Выход НК из пробы 3 мл при трёхкратном прокачивании

Особенности состава пробы	Выделение на картридже	Скорость потока, мл/мин				
		0,1 мл/мин	0,5 мл/мин	1,0 мл/мин	2,0 мл/мин	3,0 мл/мин
		Выход НК, %				
МП	75	98	99	93	70	51
ИЛ	71	82	81	75	64	44
ДПП	56	77	74	71	62	20
ПП	71	71	68	66	48	31
ЧЗП	62	67	59	62	43	27

Таблица 3.7 – Выход НК из пробы 3 мл при трёхкратном прокачивании

Особенности состава пробы	Выделение на картридже	Скорость потока, мл/мин				
		0,1 мл/мин	0,5 мл/мин	1,0 мл/мин	2,0 мл/мин	3,0 мл/мин
		Выход НК, %				
МП	75	99	95	93	70	65
ИЛ	71	82	81	75	64	49
ДПП	56	81	78	78	66	38
ПП	71	71	73	69	48	39
ЧЗП	62	77	69	62	51	31

Из представленных данных можно сделать вывод о том, что при 3 кратном прокачивании пробы достигается результат эффективности выделения НК практически совпадающий с результатами выделения при пятикратном прокачиваний пробы через проточную камеру (результат в пределах погрешности).

Также следует обратить внимание, что при 3 и 5 кратном пропуске пробы через проточную камеру под воздействием УЗ достигается результат эффективности выделения, превосходящий стационарный способ выделения НК из пробы такого же объёма.

Выделение из проб объёмом 10 мл

В таблицах 3.8 – 3.9 представлены результаты выделения НК в потоке с различными скоростями прокачивания (расхода), а также показана зависимость от количества прокачиваний пробы при сорбции НК через проточную камеру.

Таблица 3.8 – Выход НК из пробы 10 мл при трёхкратном прокачивании

Особенности состава пробы	Выделение на картридже	Скорость потока, мл/мин				
		0,1 мл/мин	0,5 мл/мин	1,0 мл/мин	2,0 мл/мин	3,0 мл/мин
		Выход НК, %				
МП	3,5	91	92	83	61	41
ДПП	2	67	74	51	52	23
ПП	1	71	68	56	38	21
ЧЗП	2,2	67	59	52	23	16

Таблица 3.9 – Выход НК из пробы 10 мл при пятикратном прокачивании

Особенности состава пробы	Выделение на картридже	Скорость потока, мл/мин				
		0,1 мл/мин	0,5 мл/мин	1,0 мл/мин	2,0 мл/мин	3,0 мл/мин
		Выход НК, %				
МП	3,5	95	85	82	70	51
ДПП	2	74	76	71	62	20
ПП	1	77	78	68	49	31
ЧЗП	2,2	67	62	66	53	37

Из представленных данных можно сделать вывод о том, что при 3 кратном прокачивании пробы достигается результат эффективности выделения НК практически совпадающий с результатами выделения при пятикратном прокачиваний модельной пробы через проточную камеру (результат в пределах погрешности), для проб содержащих вытяжки стандартов почв результат при пятикратном пропуске превосходит 3 кратное пропускание.

Полученные результаты позволяют судить о возможности повышения эффективности выделения НК под воздействием УЗ с помощью проточного

способа реализации, при сопоставлении результатов выделения НК из модельных проб объёмом 10 мл удаётся более чем в 22 раза повысить степень концентрирования НК в элюате.

Данные исследования являются основой для разработки перспективных методик и приборов предназначенных для концентрирования НК из проб большого объёма (более 2 мл (объём стандартной лабораторной пробирки для выделения НК ручным способом)). Такие методики и приборы могут быть востребованы при постоянном мониторинге санитарно-эпидемиологической обстановки обеспечивая выделение НК из пробы проточной воды, природных водоёмов, водохранилищ, сточных вод и др.

3.5 Заключение к экспериментальным исследованиям

По результатам проведённой экспериментальной работы, были получены данные позволяющие судить о возможности создания автоматизированного прибора для высокоэффективного выделения НК.

Созданная экспериментальная установка, описанная в главе 2, позволила проанализировать вклад каждой из стадий выделения НК (сорбции, отмывки, сушки, элюции) в эффективность всего процесса в целом. При создании установки также проведен анализ материалов для изготовления макета одноразового картриджа.

Созданный макет одноразового картриджа позволил сформулировать общие требования к составу и количеству реагентов (их пропорций) при автоматизации процесса выделения НК, таких как:

- количество ячеек картриджа - должно быть не менее 6-и, для большей надёжности и гибкости протоколов выделения их количество стоит увеличить до 10-12;

- объёмы ячеек картриджа, достаточные для обработки 1 мл пробы – должны быть от 1 до 5 мл, при этом 2-ух ячеек достаточно с объёмом близким к 5 мл, для остальных достаточный объём будет 1-1,5 мл;

- скорости прокачки (перемещения) растворов внутри картриджа – должны быть в диапазоне от 0,05 до 1 мл/сек;

- режимы температурного воздействия на стадии выделения НК – до 80°C;

- режимы ультразвукового воздействия на стадии сорбции НК следует использовать величины интенсивности от 1,8 до 2,4 Вт/см², при частоте УЗ 2,65 МГц.

Экспериментальная работа показала, что инженерные решения заложенные в основу макета картриджа и экспериментальной установки, пригодны для автоматизации, и способны обеспечить выделение НК с эффективностью не менее 80%, результаты приведены в главе 3.

Подробный анализ режимов работы экспериментальной установки также позволил сформулировать методические требования к высокоэффективному

выделению НК с помощью одноразовых картриджей под воздействием различной температуры. Полученные данные свидетельствуют о том, что:

- эффективность выделения НК не линейно зависит от температурного воздействия при сорбции в диапазоне температур от комнатной до 90°C,
- максимум эффективности выделения НК при сорбции находится около 70°C.

Полученные данные экспериментальных исследований по изучению температурного воздействия на эффективность выделения ДНК легли в основу создания методики работы с одноразовыми картриджами в составе Комплекса КВНК, описанного в разделе 4.1

Эксперименты по воздействию мегагерцового ультразвука на эффективность выделения нуклеиновых кислот показали, что в дальнейшем ультразвуковое воздействие способно значительно сократить необходимость температурного воздействия при выделении НК, без потери эффективности процесса в целом. Наиболее весомым преимуществом применения УЗ для увеличения скорости массообменных процессов, является отсутствие необходимости предварительного прогрева и «выхода на режим» озвучиваемой пробы, а также более равномерное распределение воздействия по всему объёму пробы. Данные преимущества в итоге позволяют существенно сократить время необходимое для сорбции ДНК на поверхности твердой фазы, с сохранением высокой эффективности процесса что выражается в уменьшении общего времени выделения ДНК более чем на 20%. Таким образом:

- наибольшую эффективность выделения НК под действием УЗ удаётся достичь при интенсивности воздействия около 2,0 Вт/см².
- время сорбции при выделении НК под действием УЗ было сокращено с 10 мин., до 5 мин., при сохранении высокой эффективности выделения НК (более 90%).
- применение проточного метода концентрирования ДНК с использованием ультразвука комбинированного с магнитным удержанием сорбента позволяет выделять и анализировать ДНК из объёма более чем в 10 раз

превышающего объём пробы при стационарном выделении (чаще всего он не превышает 500-900 мкл).

Данные полученные при проточном концентрировании ДНК демонстрируют возможность разработки автоматизированного устройства, позволяющего обнаруживать генетический материал возбудителей ИЗ задолго до достижения опасных концентраций (пороговых-вирулентных).

Обобщение выводов экспериментальной работы позволило сформулировать ряд критических параметров для методической реализации выделения НК на автоматическом приборе. Такими параметрами являются:

- скорость перекачивания реагентов внутри картриджа;
- соотношение реагентов между собой включая пробу;
- время инкубирования пробы с реагентами во время стадий сорбции, отмывки и элюции НК;
- количество перемешиваний их интенсивность и периодичность при выделении НК;
- параметры температурного воздействия при выделении НК на различных стадиях.

Таким образом, данные экспериментальной работы по поиску технических и методических решений для высокоэффективного выделения нуклеиновых кислот с помощью одноразовых картриджей легли в основу методики функционирования Комплекса для выделения нуклеиновых кислот КВНК (раздел 4.1).

4 ОБОБЩЕНИЕ И ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведённые исследования позволили сформулировать ряд технических требований для создания экспериментального и серийного прибора для высокоэффективного выделения нуклеиновых кислот из жидких проб с помощью одноразовых картриджей.

В первую очередь стоит отметить, что основной вклад в эффективность процесса выделения НК с помощью магнитных частиц вносит стадия сорбции ДНК/РНК, то есть чем больше НК удалось обратимо осадить на магнитные частицы, тем выше будет отношение между элюированным (десорбированным) количеством НК и исходным количеством НК в обрабатываемой пробе, в идеальном случае это отношение стремиться к 1, а эффективность выделения соответственно к 100%.

Управление температурным режимом при сорбции является самым доступным способом влиять на эффективность выделения НК на магнитном сорбенте.

Увеличение температуры пробы при сорбции выше 70°C приводит к уменьшению эффективности процесса выделения в целом. Зависимость эффективности выделения НК от температуры в диапазоне от комнатной температуры до 90°C не линейна.

Подбор условий температурных режимов при выделении НК на магнитном сорбенте, позволяет достичь эффективности выделения НК из модельных растворов более 85%.

Применение ультразвука мегагерцового диапазона позволяет достигать более 90% эффективности выделения НК без изменения температурных режимов во время выделения НК (при комнатной температуре).

Воздействие ультразвука с интенсивностью более 2,4 Вт/см² в течении более 5 минут приводит к разрушению целостности молекул ДНК.

При этом воздействие в течении 1 минуты ультразвука с интенсивностью близкой к 3,0 Вт/см² не приводит к разрушению нативной структуры ДНК.

Таким образом, подбор параметров ультразвукового воздействия на пробу при выделении ДНК позволяет в перспективе отказаться от управления температурными режимами с сохранением высоких показателей эффективности процесса.

Также отдельно стоит остановиться на результатах по проточному концентрированию нуклеиновых кислот, так как этот подход позволил решить одну из самых сложных задач выделения генетического материала, а именно исключить зависимость объёма одиночной пробы от объёма выделенного препарата НК, так как позволяет концентрировать генетический материал на сорбенте многократно пропуская его через сорбент, что теоретически способно обеспечить отсутствие потерь НК при выделении.

Данные экспериментов показали, что удаётся обеспечить достаточное концентрирование ДНК для достоверного анализа, из пробы с начальной концентрацией менее 1 шт/мкл, что находится за пределами аналитической чувствительности современных методов ПЦР.

4.1 Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК)

Результаты экспериментальной и теоретической работы, преимущественно изложенные в данной диссертации, были использованы при создании автоматизированного прибора для выделения нуклеиновых кислот с помощью одноразовых картриджей.

Комплекс выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК) был создан в соответствии с техническим заданием (ТЗ) Заказчика в результате ОКР проводимой в ИАП РАН. Комплекс КВНК предназначен автоматического выделения ДНК/РНК возбудителей инфекционных заболеваний из жидких проб. Среди основных требований сформулированных после анализа ТЗ были выделены:

- автоматизация процесса, обеспечивающая минимальное участие оператора в процессе;
- возможность простой корректировки рабочих протоколов выделения, с широкими диапазонами задаваемых параметров;
- осуществление выделения НК внутри одноразового картриджа, с защитным фильтром для сообщения с атмосферой;
- возможность управления процессом выделения с минимальными навыками подготовки по управлению Комплексом.

В результате успешно выполненной НИР, и следующей за ней ОКР был создан Комплекс КВНК, способный обрабатывать одновременно до 4 образцов с объемом жидкой пробы 2мл на образец. Выделение НК происходит за время до 1 часа, при этом объем очищенного препарата может быть от 50 до 500 мкл.

Комплекс КВНК состоит из 3 составных частей:

- блок выделения нуклеиновых кислот (Блок БВНК);
- комплект одноразовых картриджей для выделения нуклеиновых кислот (Комплект СВНК);
- блок управления выделением нуклеиновых кислот реализованный на базе ПЭВМ (Блок УВНК).

Блок БВНК, изображённый на рисунке 4.1 представляет из себя программируемый прибор обеспечивающий в автоматическом режиме манипуляцию подвижными элементами одноразового картриджа и управления режимами термостатированию двух ячеек одноразового картриджа.



Рисунок 4.1 – Блок БВНК из состава Комплекса КВНК

Одноразовый картридж из комплекта СВНК, представленный на рисунке 4.4, представляет из себя совокупность ячеек для реагентов различного объёма. Перемещение реагентов согласно методике выделения осуществляется посредством центрального «крана-переключателя», который также выполняет функцию поршневого насоса.

Для реализации методики выделения нуклеиновых кислот с помощью одноразового картриджа Блок БВНК программируют с помощью ПЭВМ со специализированным программным обеспечением, после записи методики выделения (протокола работы) в память блока БВНК, блок выделения может работать без использования ПЭВМ.

Гибкость задаваемых параметров обеспечивает выделение НК на магнитном сорбенте для существующих и перспективных задач. Для Комплекса КВНК была разработана расширенная версия программного обеспечения, сохранившая архитектуру ПО лежащую в основе программы написанной для экспериментальной установки. Комплекс КВНК представляет из себя четырёхканальное устройство, и для отладки функционирования каждого канала необходимо предусмотреть

обратную связь с ПЭВМ оператора, для этого в новой версии была предусмотрена функция трансляции выполненных команд от каждого канала, также как и в версии для экспериментальной установки, трансляция осуществляется в окно отчёта. Также был расширен перечень команд, так как для эффективного выделения НК с помощью одноразовых картриджей необходимо обеспечить два термостата:

- для лизиса пробы;
- для осуществления промывок, сушки магнитного сорбента и элюции НК с его поверхности.

Также было увеличено количество ячеек картриджа, до 12 – это позволило значительно расширить вариантность построения протоколов выделения НК и увеличить разнообразие наборов реагентов, которые могут быть применены в одноразовом картридже. Вид окна программы для работы Комплекса КВНК, при трансляции выполнения команд (на рисунке 4.2 пример трансляции команд из 3 канала), в таблице 4.1 представлен перечень команд задаваемых в рабочих протоколах Комплекса.

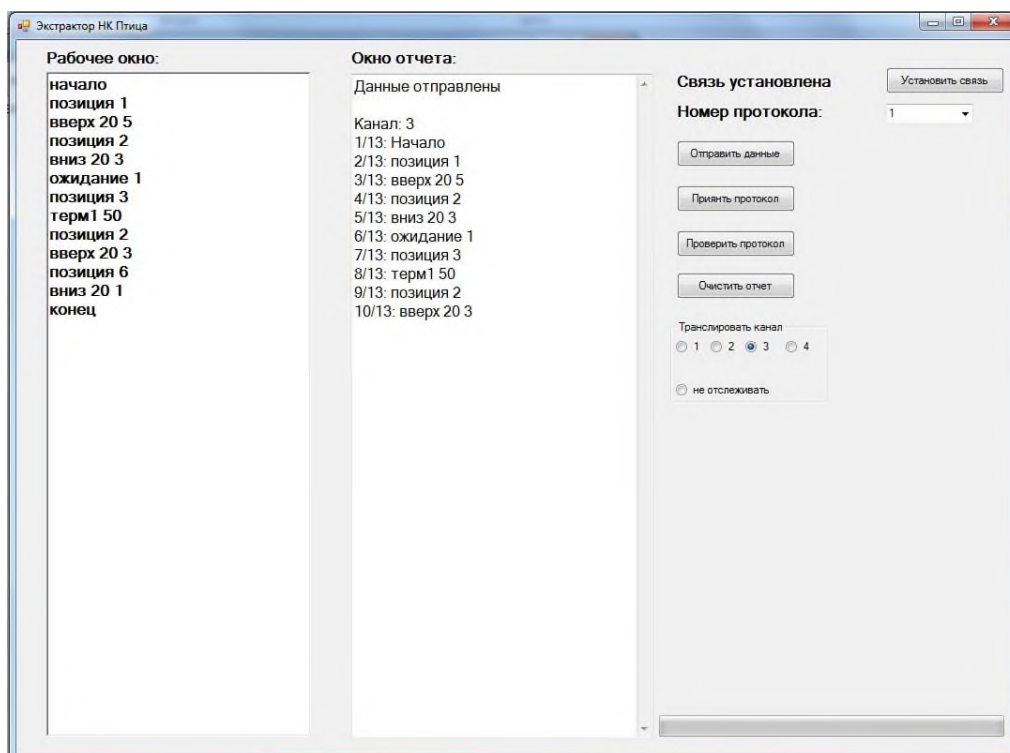


Рисунок 4.2 – Вид окна программы при трансляции команд с 3 канала

Таблица 4.1 Перечень команд используемых для создания рабочих протоколов Комплекса КВНК

Команда	Параметры, пояснения
Начало	Выставление подвижных элементов в начальное положение, пригодное для установки картриджа в канал
Конец	Выставление подвижных элементов в начальное положение, пригодное для снятия картриджа из канала
Позиция N	Установка крана переключателя в позицию N, диапазон от 1 до 12*
Терм1 Т Х	Установка термостата 1 (соответствует ячейке для лизиса), где Т - температура в градусах (диапазон от 10 до 95 °С), Х – время в секундах.
Терм2 Т Х	Установка термостата 2 (соответствует рабочей ячейке), где Т - температура в градусах (диапазон от 10 до 95 °С), Х – время в секундах.
Вверх/вниз S V	Установка поршня (подъём/спуск) на расстояние S со скоростью V**
Мыкл	Установка магнита вплотную к рабочей ячейке
Мвкл	Установка магнита к исходной координате (минимальное влияние на картридж)
Ожидание X	Остановка на X секунд
Свет К	Включение постоянного свечения К-го светодиода (1-5) на линейке «Состояние процесса», при этом следующий светодиод начнёт мигать

* Положение ячеек в картридже и соответствие им позиций крана переключателя показано на рисунке 4.3 – «Схема позиций ячеек картриджа»

** Скорость (V) задаётся в диапазоне от 1 до 8 , 1 соответствует скорости 100 мкл/сек жидкости из ячейки в секунду, 8 соответствует 800 мкл/сек.

Расстояние (S) задаётся в диапазоне от 0,01 до 15 , 0,01 соответствует забору 1 мкл жидкости из ячейки, 15 соответствует 1500 мкл.

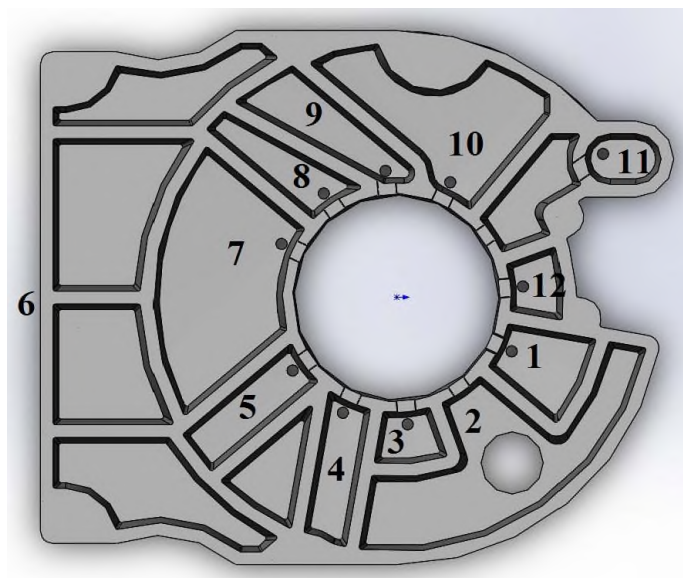


Рисунок 4.3 – Схема позиций ячеек картриджа. 6-ая позиция соответствует пробирке 600 мкл, предназначенной для слива очищенного препарата НК

На рисунке 4.4 представлен внешний вид и 3Д модель одноразового картриджа.

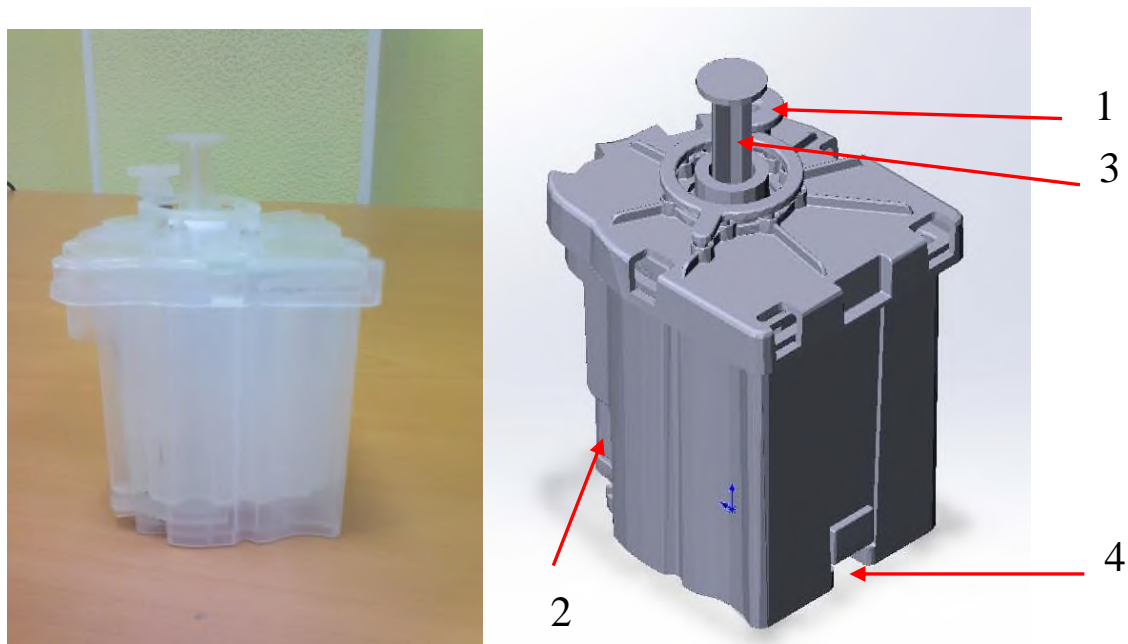


Рисунок 4.4 – Одноразовый картридж для выделения нуклеиновых кислот, где 1 - входной отсек (ячейка для пробы), 2 - рабочая ячейка, 3 - вращающийся цилиндр с поршнем (кран-переключатель), 4 - установочное место пробирки на 600 мкл, для очищенного препарата НК

К особенностям данного комплекса можно отнести следующее:

- выделение нуклеиновых кислот (НК) происходит из образцов окружающей среды внутри герметично закрытых одноразовых картриджей, что в совокупности с блоком управления выделением НК позволяет:

- проводить выделение нуклеиновых кислот в автоматическом режиме по заданному алгоритму без участия оператора и ПЭВМ;
- обеспечить лизис и инактивацию возбудителей непосредственно в картридже, что существенно увеличивает безопасность пробоподготовки;
- одновременно производить выделение из 4 образцов по одинаковым или различным алгоритмам (протоколам);
- обеспечить высокий выход и чистоту НК, пригодную для дальнейшего анализа методом ПЦР-РВ;
- обеспечить возможность работы с жидкими образцами без дополнительной подготовки.

В настоящее время, созданный Комплекс КВНК, поставлен на снабжение Министерства обороны Российской Федерации. Успешное применение данного Комплекса в реальных условиях произошло при ликвидации последствий вспышки Сибирской язвы на полуострове Ямал в 2016 году, результаты работы показали надёжность и высокую эффективность данного Комплекса.

Таким образом была создана зарекомендовавшая себя методика выделения НК с помощью одноразового картриджа, в основе которой лежат исследования представленные в данной работе. На рисунке 4.5 представлена схема методики (алгоритма) выделения НК на Комплексе КВНК в общем виде.

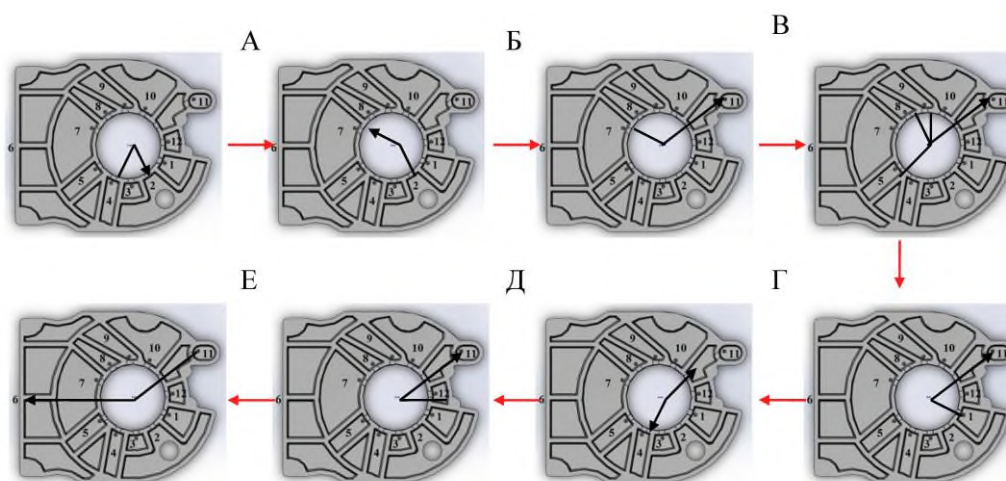


Рисунок 4.5 – Схема методики (алгоритма) работы картриджа в общем виде, где А - лизис пробы 15-30 мин при температуре 70-90°C, Б - смешивание с суспензией магнитных частиц, сорбция НК, В - промывка сорбента от лизата и его остатков, Г - сушка сорбента от остатков промывочных растворов, температура 50°C – 60°C, Д - добавление к сорбенту элюирующего буфера, элюция при температуре 60°C – 70°C, Е - слив очищенного препарата НК из картриджа в установленную пробирку

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Создана экспериментальная установка для исследования отдельных стадий и всей процедуры выделения НК из жидких проб.

2. Проведён анализ и определены режимы работы установки (скорости дозирования и параметры перемешивания реагентов, длительности взаимодействия реагентов) обеспечивающие высокоэффективное выделение НК.

3. Исследованы влияния температуры, и воздействия ультразвука на эффективность выделения НК.

4. Получена оценка эффективности способа проточного концентрирования НК под воздействием УЗ на магнитном сорбенте, с определением условий удержания сорбента в потоке, обеспечивающих повышение степени концентрирования в сравнении со стационарным выделением.

5. Полученные технические и методические решения апробированы в течении экспериментальной работы, результаты которой представлены в данной диссертации, а также опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на конференциях [1-10]. Отдельные результаты представленных в диссертации исследований внедрены в серийно выпускаемый прибор для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК).

Среди основных выводов к диссертационной работе можно сформулировать следующие:

1. Разработана экспериментальная установка, позволяющая создавать и апробировать методики выделения нуклеиновых кислот твердофазными методами. Определение параметров отдельных стадий автоматизированного выделения НК, обеспечивающих повышение эффективности всей процедуры в целом, позволяет создавать новые или модифицировать действующие протоколы выделения НК.

2. Определены режимы работы созданной установки, обеспечивающие высокоэффективное выделение НК. Полученные экспериментальным путём параметры: скорости потока реагентов, режимы перемешивания реагентов, время перемешивания реагентов, позволяют прогнозировать эффективность вновь создаваемой методики автоматизированного выделения НК.

3. Экспериментально исследовано влияние тепловых воздействий, в диапазоне от 20°C до 90°C и УЗ воздействий с частотой 2,65 МГц в диапазоне интенсивностей 1,2-3,0 Вт/см² на эффективность выделения НК из жидких проб. Определены условия, при которых достигается максимум, а также условия при которых происходит снижение эффективности выделения. Полученные данные позволяют экспериментально определять параметры УЗ и теплового воздействий, обеспечивающие максимальную эффективность выделения НК.

4. Показана возможность выделения НК проточным способом под воздействием УЗ из модельных проб объёмом 10 мл и концентрацией менее 1000 молекул/мл. С помощью трёхкратного (и более) количества пропусканий пробы через удерживаемый в потоке сорбент удаётся двадцатикратно повысить степень концентрирования НК в элюате в сравнении со стационарным режимом выделения. Такой способ выделения НК наиболее востребован при необходимости анализа проб большого объёма например из природных сред.

5. Серийно выпускаемый Комплекс для выделения нуклеиновых кислот (Комплекс КВНК), позволяет выделять НК из жидких проб в автоматическом режиме. Созданные с использованием разработанной установки методики выделения НК для Комплекса КВНК позволяют сделать вывод о работоспособности такого способа разработки, отладки и модификации методик для автоматического выделения НК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Петров, Д. Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. 1. Влияние температуры / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. А. Корнева, А. С. Альдекеева, Н.Н. Князьков // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – № 2. – С. 91-101.
2. **Петров, Д. Г.** Разработка высокоэффективного метода выделения нуклеиновых кислот, на магнитных частицах / Д. Г. Петров, Н. Н. Князьков, Е. Д. Макарова, С. Н. Малышин, В. Е. Курочкин // Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина». – Москва. – 2015. – Т.1. – С. 99-100.
3. **Petrov, D. G.** Analysis of the effectiveness of the stages of the concentration of genetic material / D. G. Petrov, I. E. Antifeev, N. N. Germash, E. D. Makarova // Journal of Physics : conference series. – 2019. – №033023. – P. 1400.
4. **Петров, Д. Г.** Возможные пути создания автоматического прибора идентификации ПБА методом полимеразной цепной реакции / В. Е. Курочкин, Я.И. Алексеев, Д. Г. Петров, И. Е. Антифеев // Межучрежденческая конференция «Современные аспекты биологической защиты». – Киров. – Т.1. –С. 3-4.
5. **Петров, Д. Г.** Воздействие полей разной природы на выход ДНК из модельных растворов на двуокиси кремния. Влияние ультразвука / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, И. Е. Антифеев, А. В. Бродская, Н. Н. Константинова, С.Н. Малышин // Научное приборостроение. – 2017. – Т. 28. – № 4. – С. 40-55.
6. **Петров, Д. Г.** Ультразвуковая суспензионная колонка для анализа *Mycobacterium tuberculosis* с использованием наноструктурированного магнитного сорбента / Р. Х. Дженлода, В. М. Шкинев, Д. Г. Петров, Б. Я. Спиваков // XIII Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Севастополь. – Т.1. – С.43-45.
7. **Petrov, D. G.** DNA recovery from environmental samples on suspension columns under a combined action of ultrasound and magnetic fields followed by PCR

detection / R. Kh. Dzheloda, D. G. Petrov, V. M. Shkinev, B. Ya Spivakov // Mendeleev Communications. – 2017. – №27. – P. 302-303.

8. Flow sample preparation using standing wave ultrasound and magnetic fields in the determination of nucleic acids by real-time polymerase chain reaction [Text] / B. Ya. Spivakov, R. Kh. Dzheloda, V. M. Shkinev, D. G. Petrov // 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis : Modern Trends and Application. – Heraklion. – №.1. – P.111.

9. **Петров, Д. Г.** Методы выделения и очистки ДНК из лизатов клеток / Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. Н. Гермаш, И. Е. Антифеев // Научное приборостроение. – 2019. – Т.29. – № 4. – С. 28-50.

10. **Петров, Д. Г.** Отечественные приборы для молекулярно-генетического анализа : разработки ИАП РАН и ООО «Синтол» / В. Е. Курочкин, Я. И. Алексеев, Д. Г. Петров, А. А. Евстапов // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2021. – Т. 40. – №3. – С. 69-74.

11. Заявка на изобретение № 2020135259. Автоматизированный прибор для выделения, очистки и анализа нуклеиновых кислот методом ПЦР-РВ [Текст] / А.А. Евстапов, Д.Г. Петров, Ю.В. Белов, А.А. Воробьев, А.А. Казанцев, И.Е. Антифеев, Н.А. Есикова, А.Н. Зубик, Н.Н. Гермаш Д.А. Белов; патентообладатель Минобороны России. – № 2020135259; заявл.26.10.2020 опубл.26.04.2022.

12. **Thatcher, S. A.** DNA/RNA Preparation for molecular detection / S. A. Thatcher // American Association for Clinical Chemistry. – 2015. – Vol. 61. – №1. – PP. 89-99.

13. **Лопухов, Л.В.** Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л.В. Лопухов, М.В. Эйдельштейн // Клин. микробиология и антимикробная терапия 2000. – Т. 2. – №3. – С. 96-106.

14. **Vanechoutte, M.** The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology / M. Vanechoutte, J. Van Eldere // J. Med. Microbiol. – 1997. – Vol. 46. – PP. 188-194.

15. **Tan, S.C., Yip B.C.** DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present // J. Biomed. Biotechnol. 2009. Vol. 2009: 574398. 10p.

16. **Moore, D.** Isolation and Purification of DNA // Current Protocols in Immunology. Supplement 8. 1993. 9 p.
17. **Demeke, T.** Jenkins G.R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 396. P. 1977-1990.
18. **Schrader, C.** Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal // J. Appl. Microbiol. 2012. Vol. 113. P. 1014-1026.
19. **Hedman, J.,** Rådström P. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR // In: Mark Wilks (ed.), PCR Detection of Microbial Pathogens: Second Edition, Methods in Molecular Biology, vol. 943. © Springer Science+Business Media, LLC 2013. P. 17-48.
20. **Hedman, J.** Knutsson R., Ansell R. et al. Pre-PCR processing in bioterrorism preparedness: improved diagnostic capabilities for laboratory response networks // Biosecur. Bioterror. 2013. Vol. 11. Suppl. 1. P. S87-S101.
21. **Chomczynski, P.** DNAzol : a reagent for the rapid isolation of Genomic DNA / P. Chomczynski , K. Mackey, R. Drews, W. Wilfinger // BioTechniques. – 1997. – Vol. 22. – №3. – PP. 550-553.
22. **Ligozzi, M.,** Fontana R. Isolation of total DNA from bacteria and yeast // Afr. J. Biotechnol. 2003. Vol. 2, no 8. P. 251-253.
23. DNA extraction with DNAzol and LAMP, performed in a heating block as a simple procedure for detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens / A. Rodriguez-Garcia, R.E. Mares, P.L.A. Muñoz [et al] // Methods and Protocols. – 2018. – Vol. 1. – 6 p.
24. **Kissoudi, M.** Recent Advances in applications of ionic liquids in miniaturized microextraction techniques / M. Kissoudi, V. Samanidou // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – 6 p.
25. **Martzy, R.,** Kolm C., Krska R. et al. Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis // Anal. Bioanal. Chem. 2019. Vol. 411. P. 1695-1702.

26. **Kapustin, D.V.** High-throughput Method of One-Step DNA Isolation for PCR Diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis* / Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I. et al. // *Acta Naturae* 2014. Vol. 6, no 2 (21). P. 6-10.
27. Boom, R. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / C.J. Sol, M.M. Salimans [et al] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28. – PP. 495-503.
28. **Berensmeier, S.** Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 73, no 3. P. 495-504.
29. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии / О.С. Антонова, Ю.В. Корнева, Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин // *Научное приборостроение*. – 2010. – Т. 20. – № 1. – С. 3-9.
30. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics / N. Ali, R. de Cássia Pontello Rampazzo, A.D.T. Costa, M.A. Krieger // *BioMed Research International* 2017. Vol. 2017: 9306564. 13 p.
31. **Melzak, K.A.** Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions / C.S. Sherwood, R. F. B. Turner, C. A. Haynes // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1996. – Vol. 181. – PP. 635-644.
32. DNA extraction : finding the most suitable method. / C. Barbosa, S. Nogueira, M. Gadanho, S. Chaves // *Molecular Microbial Diagnostic Methods : Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*. – Amsterdam : Elsevier Inc., 2016. –PP. 135-154.
33. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic material / P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // *Biotechniques*. – 1991. – Vol. 10. – №4. – PP. 506-513.
34. **Polski J.M.**, Kimzey S., Percival R.W., Grosso L.E. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100 // *J. Clin. Pathol.* 1998. Vol. 51. P. 215-217.
35. **Lee S.B.**, Shewale J.G. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Online © 2006-2017, John Wiley & Sons, Ltd. 2017. 19p.

36. **Singh U.A.**, Kumari M., Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin // *Biological Procedures Online* 2018. Vol. 20: 12. 8 p.
37. **Rudi K.**, Jakobsen K.S. Overview of DNA Purification for Nucleic Acid-Based Diagnostics from Environmental and Clinical Samples // In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 345: Diagnostic Bacteriology Protocols, Second Edition. Ed. L. O' Connor, Hardcover. © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006. P. 23-35.
38. **Sahu, S.K.** DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol / S.K. Sahu, M. Thangaraj, K. Kathiresan // *Molecular Biology*. – 2012. – PP. 1-6.
39. Эффективный способ выделения ДНК для ПЦР-анализа из "Балк-образцов" проростков / И. А. Клименко, А. А. Антонов, В. А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов // *Адаптивное кормопроизводство*. – 2021. – №3. – С. 29-48.
40. Особенности выделения геномной ДНК из растений / М.Р. Халилуев, Н.В. Варламова, Е.В. Захарова, О.Б. Поливанова. – Москва : Изд-во «КноРус», 2020. – 67 с.
41. Пат. 2738671 С1 Способ получения и очистки биологически активного вещества, продуцируемого бифидобактериями / А. С. Сухих, Ю. В. Захарова, Т. В. Котова, Е. Ю. Плотникова, Г. В. Вавин ; заяв. №2020108321 от 26.02.2020.
42. Silica membrane spin columns : nucleic acid isolation [Электронный ресурс] // *Biopolymer Isolation Technologies, LLC*. – URL : www.bpi-tech.com (дата обращения : 15.06.2019).
43. MaxXbond : first regeneration system for DNA binding silica matrices / К.-Н. Esser, W.H. Marx, T. Lisowsky // *Nature Methods*. – 2006. – PP. 1-2.
44. Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions / P. E. Vandeventer , J. S. Lin, T. J. Zwang [et al] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Vol. 116. – №19. – PP. 661-670.

45. Распространенность туберкулеза в разных странах [Электронный ресурс] // Медицинская информационная сеть. – URL : https://www.medicinform.net/tuberculosis/book/tb_book2.htm(дата обращения : 15.06.2019).
46. The source and fate of Mycobacterium tuberculosis complex in wastewater and possible routes of transmission / H.N. Mtetwa , I.D. Amoah, S. Kumari [et al] // BMC Public Health. – 2022. – Vol. 22: 145.
47. Методические указания МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» [Электронный ресурс] // Система ГАРАНТ. – 2009. – URL : <https://chelsma.ru/files/misc/mu4.2.2039-05.pdf?ysclid=l6f2079nga135775949> (дата обращения : 17.06.2019).
48. **Burden, D.** Guide to the Disruption of Biological Samples / D. Burden // Random Primers. – 2012. – Vol. 25. – №12. – PP. 1-25.
49. **Gibbons, L.E.** Bead Beating : A Primer (OPS Diagnostics, LLC) / L.E. Gibbons, H.C.G. Brangs, D.W. Burden // Random Primers. – 2014. – №12. – P. 20.
50. Extraction of DNA from soil / P. Robe, R. Nalin, C. Capellano, T.M. Vogel, P. Simonet // European Journal of Soil Biology. – 2003. – Vol. 39. – №4. – PP. 183-190.
51. **Islam, M.S., Aryasomayajula A., Selvaganapathy P.R.** A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods // Micromachines 2017. Vol. 8: 83 (27 p.).
52. Heat treatment of Bacteria: A Simple method of DNA Extraction for Molecular Techniques / A.A. Dashti, M.M. Jadaon, A.M. Abdulsamad, H.M. Dashti // Kuwait Medical Journal. – 2009. – Vol. 41. – №2. – PP. 117-122.
53. Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification / J. Kim, M. Johnson, P. Hill, B.K. Gale // Integrative Biology. – 2009. – Vol. 1. – PP. 574-586.
54. **Siegrist, J.,** Validation of a centrifugal microfluidic sample lysis and homogenization platform for nucleic acid extraction with clinical samples / R. Gorkin, M. Bastien [et al] // Lab on a Chip. – 2010. – Vol. 10. – №3. – PP. 363-371.
55. **Kelemen, M.V.** Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different micro-organisms / M.V. Kelemen, J.E. Sharpe // Journal of Cell Science. – 1979. – Vol.35. – PP. 431-441.

56. **Purdy, K.J.** Nucleic Acid Recovery from Complex Environmental Samples // Method Enzymol. 2005. Vol. 397. P. 271-292.
57. **Bakken, L.R.,** Frostegård A. Nucleic Acid Extraction from Soil // Soil Biology v8: Nucleic Acids and Proteins in Soil. P. Nannipieri, K. Smalla (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2006. P. 49-73.
58. **Steffan, R.J.,** Goksoyr J., Bej A.K., Atlas R.M. Recovery of DNA from soils and sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1988. Vol. 54, no 12. P. 2908-2915.
59. **Gabor, E.M.,** Vries E.J.D., Janssen D.B. Efficient recovery of environmental DNA for expressing cloning by indirect extraction method // FEMS Microbiol. Ecol. 2003. Vol. 44, no 3. P. 153-163.
60. **Felczykowska A.,** Krajewska A., Zielińska S., Łoś M. Sampling, metadata and DNA extraction – important steps in metagenomic studies // Acta Biochimica Polonica 2015. Vol. 62, no 1. P. 151-160.
61. **Lorenz, M.G.,** Wackernagel W. Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53, no 12. P. 2948-2952.
62. **Tozak, K.Ö.** Sorption of DNA by diatomite-Zn (II) embedded super macroporous monolithic P (HEMA) Cryogels / M. Erzenin, I. Sargin, N. Ünlü // EXCLI Journal. – 2013. – Vol. 12. – PP. 670-678.
63. Dependence of DNA adsorption to silicon dioxide on incubation temperature and time [Электронныйресурс] / H. Enping, H.C. Kiat, V. Samper [et al]. – 2002. URL :<http://staff.science.nus.edu.sg> (дата обращения : 27.07.2018).
64. Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment / K. Smerkova, S. Dostalova, M. Vaculovicova [et al] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2013. – Vol. 86. – PP. 65–72.
65. **Ведерников, В.Е.** Сравнительные характеристики способов экстракции нуклеиновыхкислот / В.Е. Ведерников // Лаборатория. – 2012. – № 4. – С. 14-15.
66. **Massi, J.** Use temperature to enhance oligonucleotide mass transfer and improve resolution in ion-pair RP HPLC / J. Massi, L. Lloyd. –Agilent Technologies. – 2011. – 3 p.

67. **Авторское свидетельство № 1250576 А1 СССР, МПК С12Q 1/04, G01N 33/48.** Способ выявления иммуноактивных объектов / Н. Н. Князьков, В. Е. Курочкин ; заявитель Всесоюзный научно-исследовательский и конструкторский институт медицинской лабораторной техники. – № 3694611 : заявл. 13.01.1984 : опубл. 15.08.1986. – 4 с.
68. Аналитические и препаративные системы на основе ультразвуковых полей / Н. Н. Князьков, В. Е. Курочкин, Е. Д. Макарова, Т.Н. Пашовкин, Г.В. Шильникова, А.И. Духин // Материалы Четвертого съезда Общества биотехнологов России. – Москва : МАКС Пресс, 2006. – С. 104-106.
69. **Knyazkov, N.N.** Ultrasonic concentration of tissue culture cells / N.N. Knyazkov, G. V. Shilnikov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1996. – Vol. 121. – № 3. – PP. 287-288.
70. **Князьков, НН.** Экспресс-постановка реакций агглютинации в поле стоячей ультразвуковой волны // Научное приборостроение 1997. Т. 7. № 1-2. С. 97-99.
71. **Курочкин, В. Е.** Методы и приборы иммунного экспресс-анализа. Новый подход к решению проблемы / В. Е. Курочкин // Успехи физических наук. – 2006. – Т. 176. – № 9. – С. 994-1000.
72. **Князьков, Н. Н.** Аналитические и препаративные системы на основе ультразвуковых полей / В. Е. Курочкин, Е. Д. Макарова, Т.Н. Пашовкин, Г.В. Шильникова, А.И. Духин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 3. – С. 46-47.
73. Пат. 2393907 С1, МПК В01D 21/28. Российская Федерация Акустический фильтр для разделения частиц жидких дисперсных систем. – № 2009108225/15 ; заявл. 26.02.2009 ; опубл. 10.07.2010 / Н. Н. Князьков ; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «Лабораторные технологии и системы».
74. **Knyaz'kov, N.N.** Methodology of immunoassays with immunosorbent suspensions / N. N. Knyazkov, V. E. Kurochkin // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 1996. – Vol. 121. – №5. – PP. 513-515.

75. **Князьков, Н. Н.** Методологические основы применения ультразвукового поля стоячей волны для проточного фракционирования частиц различной природы / Н. Н. Князьков, Е. Д. Макарова, С. А., Морев, Б. Я. Спиваков, В.М. Шкинев // Научное приборостроение. – 2006. – Т. 16. – № 1. – С. 23-34.
76. **Chattoraj, D.K.** Adsorption of DNA at solid-water interfaces and DNA-surfactant binding interaction in aqueous media / D.K. Chattoraj, A. Mitra // Current Science. – 2009. – Vol. 97. – №10. – PP. 1430-1438.
77. **Castro, M.D.** Analytical Applications of Ultrasound / M.D.L. Castro, F.P. Capote // Amsterdam : Elsevier, 2007. – 350 p.
78. **Coakley, W.T.** Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation cells and microparticles / Hawkes JJ, Sobanski MA, Cousins CM, Spengler J. // Ultrasonics 2000. Vol. 38. P. 638-641.
79. **Gröschl, M.** Ultrasonic separation of suspended particles. Part I. Fundamentals // Acustica 1998. Vol. 84. No 3. P. 432-447.
80. **Kuznetsova, L.A., Coakley WT.** Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors // Biosensors Bioelectronics 2007. Vol. 22. No 8. PP. 1567-1577.
81. **Schram, C.J.** Process for controlling a reaction by ultrasonic standing wave // Patent US 4879011 (A) Pub date: 07.11.1989. Priority: 07.08.1987. Applicant: Nat Res Dev [GB] (National Research Development Corporation).
82. **Архангельский, М.Е.** Воздействие акустических колебаний на процесс диффузии // Успехи физических наук. – 1967. – Т. 92. – № 2. – С. 181-206.
83. **Mitragotri, S.** Effect of therapeutic ultrasound on partition and diffusion coefficients in human stratum corneum / S. Mitragotri // Journal of Controlled Release. – 2001. – Vol. 71. – №1. – PP. 23-29.
84. **Poćwiardowski, P.** Application of Acoustic Streaming for Improving Metals Diffusion During Electrochemical Deposition / P. Poćwiardowski, A. Stepnowski , L. Bjørnø // Hydroacoustics. – 2001. – Vol. 4. – PP. 205-208.

85. Manipulation of in vitro toxicant sensors in an ultrasonic standing wave / J. Morgan, J. F. Spengler, L. Kuznetsova [et al] // *Toxicology in Vitro*. – 2004. – Vol. 18. – PP. 115-120.
86. **Bengtsson, M.** Ultrasonic agitation in microchannels / M. Bengtsson, T. Laurell // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 378. – PP. 1716-1721.
87. The Influence of a Nonuniform Acoustic Field on Small-Scale Processes at a Heterogeneous Boundary / S.N. Gurbatov, M.S. Deryabin, D.A. Kasyanov [et al] // *Acoustical Physics*. – 2010. – Vol. 56. – №6. – PP. 856-860.
88. **Kasyanov, D.** The influence of a focused acoustic field on mass-transfer processes at a heterogeneous boundary / D. Kasyanov // *Proceedings of Meetings on Acoustics*. – 2013. – Vol. 9. – 7 p.
89. **Yasuda, K.** Deoxyribonucleic acid concentration using acoustic radiation force / M. Kiyama, S-I. Uemura, K. Takeda // *JASA*. – 1996. – Vol. 99. – №2. – PP. 1248-1251.
90. Pat. EP2209545 (A2). Extraction and Purification of Biological Cells Using Ultrasound / Bond D.J.P., Kuznetsova L.A., Mullen W.H. [et al] ; Publication data : 28.07.2010. Priority data : 14.11.2007. Applicant : Prokyma Technologies LTD [GB].
91. **Dual, J.** Particle-based concentration of DNA from solution using ultrasonic manipulation – Pilot-project for future biomedical applications // Bachelor or Master-Project [Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland].
92. **Holmberg, R.C.** High-throughput, Automated Extraction of DNA and RNA from Clinical Samples using TruTip Technology on Common Liquid Handling Robots / Gindlesperger A., Stokes T. et al. // *J. Vis. Exp.* 2013. Vol. 76: e50356 10 p.
93. **Thakore, N.** Automated TruTip nucleic acid extraction and purification from raw sputum / Norville R., Franke M., et al. // *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 7, e0199869.
94. *Akonni Biosystems*. Inc.TruTip® Automated Workstation. URL: <https://akonni.com/technology/sample-prep/>.

95. **Евстрапов, А.А.** Микрофлюидные чипы для биологических и медицинских исследований // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. Об-ва им. Д.И. Менделеева) 2011. Т. LV, №2. С. 99-110.
96. **Кухтевич, И.В.** Микрофлюидные устройства для исследований клеток (Обзор) / Евстрапов А.А., Букатин А.С. // Научное приборостроение 2013. Т. 23, № 4. С. 66-75.
97. **Balasubramanian, A.K.,** Beskok A., Pillai S.D. In situ analysis of bacterial capture in a microfluidic channel // J. Micromech. Microeng. 2007. Vol. 17. PP. 1467-1478.
98. **Breadmore M.C.,** Wolfe K.A., Arcibal I.G. et al. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples // Anal. Chem. 2003. Vol. 75, no 8. PP. 1880-1886.
99. **Šafaříková M.,** Šafařík I. Magnetic solid-phase extraction // J. Magn. Magn. Mater. 1999. Vol. 194. PP. 108-112.
100. **Safarikova, M.,** Safarik I. The Application of Magnetic Techniques in Biosciences // Magnetic and Electrical Separation 2001. Vol. 10. PP. 223-252.
101. **Safarik, I.,** Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides // BioMagnetic Research and Technology. 2004. Vol. 2. P.7 (17p).
102. **Safarik, I.,** Safariková M., Forsythe S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology // J. Appl. Bacteriol. 1995. Vol. 78. PP. 575-585.
103. **Wommer, L.,** Meiers P., Kockler I. et al. Development of a 3D-printed single-use separation chamber for use in mRNA-based vaccine production with magnetic microparticles // Eng. Life. Sci. 2021. Vol. 21. PP. 573-588.
104. **Pearlman, S.L.,** Leelawong M., Richardson K.A. et al. Low-Resource Nucleic Acid Extraction Method Enabled by High-Gradient Magnetic Separation // ACS Appl. Mater. Interfaces 2020. Vol. 12. PP. 12457-12467.
105. **Beall, S.G.** Performance and workflow assessment of six nucleic acid extraction technologies for use in resource limited settings / Cantera J., Diaz M.H. et al. // PLoS ONE 2019. Vol. 14, no 4: e0215753.

106. **Horsman, K.M.**, Bienvenue J.M., Blasier K.R., Landers J.P. Forensic DNA Analysis on Microfluidic Devices: A Review // J. Forensic Sci. 2007. Vol. 52, no 4. PP. 784-799.
107. **Hindson, B.J.**, Gutierrez D.M., Ness K.D. et al. Development of an automated DNA purification module using a microfabricated pillar chip // Analyst 2008. Vol. 133, no 2. PP. 248-255.
108. **Wang, Y.**, Qi W., Wang L. et al. Magnetic Bead Chain-Based Continuous-Flow DNA Extraction for Microfluidic PCR Detection of *Salmonella* // Micromachines 2021. Vol. 12: 384.
109. **Rudi, K.**, Larsen F., Jakobsen K.S. Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. PP. 34-37.
110. **Kim, Y.**, Lee J., Park S. A 3D-Printed Millifluidic Platform Enabling Bacterial Preconcentration and DNA Purification for Molecular Detection of Pathogens in Blood // Micromachines 2018. Vol. 9: 472.
111. QuickGene 810 – Automated Nucleic Acid Isolation System – Gene Target Solutions [Электронный ресурс] // Operation manual. – 2010. – URL : <https://www.genetargetsolutions.com.au/wp-content/uploads/2015/02/QuickGene-810-Operating-Manual.pdf> (дата обращения : 14.06.2018).
112. EZ1 DNA Handbook [Электронный ресурс] // QIAGEN. – 2001 – URL : <https://projects.nfstc.org/workshops/resources/articles/EZ1%20DNA%20Handbook.pdf> (дата обращения : 14.06.2018).
113. Прибор для выделения нуклеиновых кислот GenoXtract [Электронный ресурс] // Bioline. – URL : <http://www.bioline.ru/catalog/88/282/> (дата обращения : 13.06.2018).
114. Chemagic MSM I instrument [Электронный ресурс] // PerkinElmer. – URL : <http://www.chemagen.com/chemagic-msm-i.html> (дата обращения : 13.06.2018).
115. M-PVA Magnetic Beads [Электронный ресурс] // PerkinElmer. – URL: <http://www.chemagen.com/magneticbeads.html> (дата обращения : 13.06.2018).

116. Chemagen Technology [Электронный ресурс] // PerkinElmer. – URL: <http://www.chemagen.com/products/automated-tools-for-nucleicacidisolation/chemagen-technology> (дата обращения : 13.06.2018).
117. Система MagNA Pure LC 2.0 [Электронный ресурс] // Спектральные системы. – URL : http://www.spectralsystems.ru/katalog/oborudovanie/laboratorное_oborudovanie/biohimiya/sistema_magna_pure_lc_20/ (дата обращения : 13.06.2018).
118. MagCore HF16 Automated Nucleic Acid Extractor [Электронныйресурс] // LabGene scientific. – URL : <http://www.labgene.ch/nucleic-acids-purification/151-magcorehf16.html> (дата обращения : 26.09.2018).
119. Станция автоматическая для пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот и белков QIASymphony, вариант исполнения QIASymphony SP, с принадлежностями [Электронный ресурс] // Научный парк СПбГУ. – URL : <http://researchpark.spbu.ru/equipment-biobank-rus/equipment-biobankgenom-rus/equipment-biobank-dnkrnkvd-rus/1763-biobank-qiasymphony-sp-rus> (дата обращения : 10.09.2018).
120. QIASymphony SP/AS instruments [Электронный ресурс] // Qiagen. – URL : <https://www.qiagen.com/us/shop/automated-solutions/samplepreparation/qiasymphony-spas-instruments/#orderinginformation> (дата обращения : 14.06.2018).
121. InnuPure C16 touch [Электронный ресурс] // AnalytikJena. – URL: <https://www.analytikjena.de/en/life-science/products/prod/cat/automated-extraction/prod/innupure-c16touch.html> (дата обращения: 14.06.2018).
122. GeneXpert [Электронный ресурс] // Medcon. – URL : http://www.medcon.ru/content/docs/GeneXpert_2.pdf (дата обращения : 27.07.2018).
123. <https://www.himedialabs.com/HML/images/literature/pdf/100000024/65.pdf>.
124. <https://teaching.healthtech.dtu.dk/36636/images/b/b2/Powersoil.pdf>.
125. FilmArray multiplex PCR system [Электронный ресурс] // Biomerieux – URL : <https://www.biomerieux-diagnostics.com/filmarrayr-multiplex-pcr-system> (дата обращения : 14.05.2018).

126. FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection : Development and Application to Respiratory Tract Infection / M.A. Poritz, A.J. Blaschke, C.L. Byington [et al] // PLOS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 10. – PP. 26-47.
127. **Fick, A. V.** On liquid diffusion / A. Fick // Journal of MembranScience1. – 1855. – PP. 30-39.
128. **Гавроновская, Ю.Ю.** Коллоидная химия / Ю. Ю. Гавронская. – Санкт-Петербург : Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2007. - 267 с
129. **Dill, K. A.** Molecular Driving Forces : Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology / K.A. Dill. – NewYork : Garland Science, 2003. – 666 p.
130. **Курочкин, В. Е.** О вынужденных колебаниях конечной амплитуды в многослойной ультразвуковой камере / В. Е. Курочкин, Е. Д. Макарова, Б. П. Шарфарец // Научное приборостроение. – 2006. – Т. 16. – № 4. – С. 41-54.
131. **Антушева, Т. И.** Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы / Т. И. Антушева // Живые и биокосные системы. – 2013. – № 4. – С. 11.
132. **Мауль, Д.** Исследование влияния ультразвуковой обработки в жидких средах различного состава на поверхностную микрофлору мясных полуфабрикатов / Д. Мауль, Л. В. Красникова, А. С. Громцев // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2017. – Т. 79. – № 3(73). – С. 19-25.
133. **Скворцов, С. П.** Исследование метода контроля ультразвуковой кавитации при обработке биотканей / С. П. Скворцов, П. Д. Юркевич, Д. А. Соловьев // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2019. – Т. 22. – № 7. – С. 32-38.
134. **Фролов, В. В.** Деструкция углеводородных соединений ультразвуком / В. В. Фролов, И. В. Мозговой // Технические науки – от теории к практике. – 2012. – № 10. – С. 136-140.
135. Пат. 2446852 С1 Российская Федерация, МПК В01D 11/00. Способ получения экстрактов / Н. А. Матросов, Д. А. Заярский, С. А. Портнов ; № 2010139725/13 ; заявл. 27.09.2010 ; опубл. 10.04.2012.

136. Распределение интенсивностей в ультразвуковых пучках терапевтических излучателей с использованием красителей : 3-мерное представление распределений интенсивностей в сечениях ультразвуковых пучков и 3D-реконструкция ультразвуковых полей в водных средах / Т. Н. Пашовкин, М. С. Пашовкина, Д. Г. Садилова, Г. В. Шильников // Вестник новых медицинских технологий. – 2006. – Т. 13. – № 3. – С. 155-159.
137. **Шарфарец, Б. П.** О диссипации энергии в электроосмотическом процессе, протекающем при работе электроакустического преобразователя нового типа / Б. П. Шарфарец, Ф. Ф. Легуша // Морские интеллектуальные технологии. – 2019. – № 2-1(44). – С. 143-148.
138. **Liebermann L.** The Second Viscosity of Liquids / L. Liebermann // Physical Review. – 1949. – Vol. 76. – P. 440.
139. **Неручев, Ю. А.** Исследования скорости ультразвука в органических жидкостях на линии насыщения / Ю. А. Неручев, М. Ф. Болотников, В. В. Зотова // Теплофизика высоких температур. – 2005. – Т. 43. – № 2. – С. 274-316.
140. Экспериментальное исследование акустических течений в сфокусированном ультразвуковом поле / М. С. Дерябин, Д. А. Касьянов, В. И. Родченков, Д. А. Сергеев // Прикладная механика и техническая физика. – 2010. – Т. 51. – № 5(303). – С. 52-58.
141. Физика и технология мощного ультразвука. Физические основы ультразвуковой техники / под ред. Л.Д. Розенберга. – Москва : Наука, 1970. – 689 с.
142. **Ланин, В. Л.** Применение ультразвуковых эффектов в жидких средах для получения наноматериалов / В. Л. Ланин, Н. В. Дежкунов, А. В. Котухов // Электронная обработка материалов. – 2010. – № 3(263). – С. 28-35.
143. Экспериментальное исследование акустических течений в сфокусированном ультразвуковом поле / М. С. Дерябин, Д. А. Касьянов, В. И. Родченков, Д. А. Сергеев // Прикладная механика и техническая физика. – 2010. – Т. 51. – № 5(303). – С. 52-58.

144. **Курочкин, В. Е.** Связь радиационного давления с амплитудой рассеяния сложных включений в идеальной жидкости / В. Е. Курочкин, Б. П. Шарфарец // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 419. – № 3. – С. 324-327.
145. **Шарфарец, Б. П.** Анализ работ, посвященных вычислению радиационного давления. 1. идеальная жидкость и случай малых волновых размеров пограничного слоя / Б. П. Шарфарец // Научное приборостроение. – 2010. – Т. 20. – № 3. – С. 95-102.
146. Теоретическое описание удерживания частиц в ультразвуковой суспензионной колонке / Р. Х. Дженлода, Н. Н. Князьков, Е. Д. Макарова [и др.] // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23. – № 3. – С. 44-55.
147. **Spivakov, B. Ya.** Suspension column for recovery and separation of substances using ultrasound-assisted retention of bead sorbents / Shkinev, V.M. Danilova, T.V. Knyazkov [et al] // Talanta. – 2012. – Vol. 102. – PP. 88-92.