

На правах рукописи



ТУПИК Александра Николаевна

РАЗРАБОТКА МИКРОЧИПОВЫХ УСТРОЙСТВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ГЕЛЕВОЙ СРЕДЕ

Специальность:

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН)

Научный руководитель:

доктор технических наук, профессор, заведующий лабораторией «Информационно-измерительных био- и хемосенсорных микросистем» ИАП РАН

Евстрапов
Анатолий
Александрович

Официальные оппоненты:

Доктор технических наук,
профессор, заведующий кафедрой

Абиев
Руфат

Оптимизации химической и биотехнологической аппаратуры
Государственного технологического института (технического университета)

Шовкетович

Доктор физико-математических наук,
профессор, научный советник лаборатории

Иванов-Омский
Владимир

Фотоэлектрических явлений в полупроводниках
ФГБУН Физико-технического института им. А.Ф.Иоффе РАН

Иванович

лауреат Государственной премии, заслуженный деятель науки РФ

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», физический факультет.

Защита состоится 18 декабря 2015 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета Д002.034.01 на базе ИАП РАН по адресу 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте www.iairas.ru и www.iai.rssi.ru. Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31-33, лит. А.

Автореферат разослан

«__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор физико-математических наук

А.Л. Буляница

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Применение современных технологий изготовления микро- и наноструктур в неорганических и полимерных материалах позволяет разрабатывать микросистемы полного анализа (μ TAS -micro total analysis system) и «Лаборатория на чипе» (Lab-on-a-Chip), в которых все стадии анализа или отдельные этапы выполняются на миниатюрном устройстве – аналитическом микрочипе. Простейшая конструкция микрочипа представляет собой неразъемное соединение двух пластин, в одной из которых выполнена сеть каналов и резервуаров для манипуляции с микрообъемами жидкости с целью дозирования, разделения, фильтрации, проведения химических реакций, детектирования и т.д. Это позволяет значительно сократить расход реактивов, изолировать рабочий объем от влияния внешней среды, упростить процедуру утилизации отработанных реагентов и делает применение микрочиповых устройств экологически и экономически выгодным. К ограничениям, препятствующим широкому применению микрочипов можно отнести относительную дороговизну их изготовления, однако использование полимерных материалов и высокопроизводительных методов формирования микроструктур способствует снижению стоимости микрочиповых устройств.

Для молекулярной диагностики и генетических исследований преимущественно используются методы амплификации, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), при которой осуществляется синтез заданных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в условиях циклического изменения температуры. Современные технологии цифровой ПЦР (цПЦР) позволяют регистрировать малые количества нуклеиновых кислот в присутствии мешающих факторов (конкурентные ДНК, ингибирующие вещества и др.) и не требуют построения градуировочных зависимостей. Предложенный российскими учеными под руководством д.б.н, чл.-кор. РАН А.Б. Четверина [1] метод молекулярных колоний (ММК), обеспечивает визуализацию результата ПЦР от отдельных молекул ДНК (колоний) в вязкой гелевой среде с использованием флуоресцентных зондов. В зарубежной литературе известен аналогичный метод «полоний» (полимеразных колоний - polony) [2], который используется для решения задач генетического анализа (секвенирование, поиск однонуклеотидного полиморфизма, экспрессия генов и др.). Применение ММК позволяет на порядок повысить чувствительность диагностики онкологических заболеваний [3]. Чтобы обеспечить доступность этого метода для исследовательских и диагностических лабораторий необходимо снизить трудоемкость анализа при проведении ПЦР в слое геля, что возможно при создании специализированных микрочиповых устройств с герметичными реакционными камерами.

Таким образом, актуальным является развитие и адаптация существующих технологий изготовления микрочиповых устройств с целью создания экспериментальных образцов для проведения ПЦР в гелевой среде и регистрации результатов флуориметрическим методом. Для этого необходимы комплексные исследования, включающие: выбор материала подложки, определение способов физико-химической обработки, методов изготовления и герметизации микроструктур, обеспечивающих воспроизводимые характеристики устройств, а также апробация изготовленных устройств.

Цель работы

Разработка и создание микрочиповых устройств для обнаружения предельно малых количеств молекул нуклеиновых кислот на основе полимеразной цепной реакции в гелевой среде с применением флуориметрических методов детектирования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Обоснование и выбор конструкционных материалов для микрочиповых устройств, позволяющих реализовать ПЦР.
- Адаптация технологий изготовления микроструктур и способов физико-химической обработки поверхности материалов для создания реакционных камер с гелевым слоем. Исследование поверхностных свойств материала после целевой обработки.
- Выбор и отработка технологий герметизации микрочиповых устройств. Разработка методик контроля герметичности на основе физических (оптических, гравиметрических) методов.
- Изготовление прототипов микрочиповых устройств для ПЦР в гелевой среде (на примере ММК) и их апробация на образцах, содержащих молекулы нуклеиновых кислот (ДНК).

Научная новизна

1. Предложен критерий порогового типа, позволяющий установить факт отверждения фотоотверждаемой полимерной композиции на акрилатной основе по результатам измерений светопропускания в ближней инфракрасной области.

2. Усовершенствована методика определения герметичности микрочиповых устройств гравиметрическим методом за счет обоснования и введения в расчет поправки, учитывающей влагопоглощение применяемых полимерных материалов, величина которой определяется по результатам спектрофотометрических измерений в ближней ИК области спектра.

3. Выявлена монотонно убывающая зависимость характерного радиуса молекулярных колоний от длины амплифицируемого фрагмента ДНК (в диапазоне от 200 до 500 пар оснований – п.о.) при проведении ММК с применением специфичных флуоресцентных зондов. Характер полученной зависимости имеет хорошее соответствие с результатами [2] для метода «полоний» (polony).

4. Предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний при их случайном и равномерном размещении в реакционной камере и с учетом размеров колоний, основанный на применении классических комбинаторных схем (выбор без возвращения). Такой подход позволяет определить максимальное число колоний, регистрируемое ММК с выбранной погрешностью счета.

Практическая значимость работы

- Разработаны и созданы микрочиповые устройства на основе: а) боросиликатного стекла марки К8; б) полиметилметакрилата (ПММА) марки ТОСП[®], - позволяющие обнаружить единичные молекулы нуклеиновых кислот при проведении ПЦР в гелевой среде с последующим детектированием результатов амплификации флуориметрическим методом.
- Предложен подход, позволяющий оценить влияние твердофазных полимерных материалов и композиций на эффективность ПЦР, сочетающий известные методики определения влияния веществ на ингибирование ПЦР. Он основывается на оценке изменения величины порогового цикла при проведении ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в присутствии тестируемого материала.
- Определены режимы формирования микроструктур глубиной 200 ± 10 мкм в листовом полиметилметакрилате методами лазерной микрообработки (на длине волны 10,6 мкм), позволяющие оперативно изготавливать однотипные заготовки для микрочиповых устройств.
- Предложен способ восстановления работоспособности стеклянных микрочиповых устройств после проведения ПЦР, заключающийся в обработке реакционной камеры раствором гипохлорита натрия (1%), позволяющий многократно (не менее 3х раз)

использовать микрочиповые устройства, герметизированные полимерными фотоотверждаемыми композициями.

- Результаты работы, связанные с определением влияния твердофазных полимерных материалов и композиций на эффективность ПЦР, использованы при выполнении ПНИЭР (уникальный номер RFMEFI57914X0012): «Создание роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» Минобрнауки России.

Положения, выносимые на защиту

1. Фотоотверждение слоя полимерной композиции на акрилатной основе достигается при выполнении следующих условий: 1) $D_{2110} < D_{2138}$ – оптическая плотность слоя в максимуме поглощения на длине волны 2110 нм (D_{2110}) меньше, чем оптическая плотность на длине волны 2138 нм (D_{2138}); 2) $D_{1622} \leq D^*$ – оптическая плотность в максимуме поглощения на длине волны 1622 нм не превышает определенного порогового значения, зависящего от толщины слоя.

2. Контроль герметичности микрочиповых устройств с применением гравиметрического метода должен осуществляться с учетом дополнительной поправки на влагопоглощение полимерного материала, величина которой определяется на основании спектрофотометрических измерений в ближней ИК области спектра.

3. Зависимость величины характерного радиуса молекулярных колоний (Y , мкм) от длины амплифицируемого фрагмента ДНК (X , п.о.) для ММК с применением специфичных флуоресцентных зондов носит монотонно убывающий характер и хорошо аппроксимируется зависимостью: $\lg Y = -1,49 \cdot \lg X + 6,21$ ($R=0,99$).

4. При условии случайного и равномерного распределения молекулярных колоний в реакционной камере применение классических комбинаторных схем (выбор без возвращения) позволяет оценить максимальное число колоний, регистрируемое с заданной погрешностью счета, при известных размерах молекулярных колоний и камеры.

Апробация работы: Основные результаты диссертации представлены на следующих международных и российских научных конференциях и семинарах: VI конференция молодых ученых. 2009 г. (Санкт-Петербург); XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, 2011 г. (г. Волгоград); IV конференция “Аналитические приборы”, 2012 г. (Санкт-Петербург); II конференция “Implementation of microreactor technology in biotechnology - ИМТВ” 2013 г. (г. Цавтат, Хорватия); Интернет-конференция «Биотехнология. Взгляд в будущее», 2013 г. (г. Казань); IV и V конференции “Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине”, 2012 и 2013 гг. (Санкт-Петербург); XV симпозиум по прикладной и промышленной математике 2014 г. (г. Кисловодск); II Интернет-конференция “Фундаментальные и прикладные аспекты новых высокоэффективных материалов”, 2014 г. (г. Казань).

Поддержка работы грантами и научными программами

1. Программа фундаментальных исследований Президиума РАН «Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов», проекты: «Микрочиповые аналитические системы для метода молекулярных колоний» (2009 г.) и «Микрофлюидные чипы для анализа биополимеров» (2010-2011 гг.).

2. Программа фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки - Медицина», проект «Картриджи-микрочипы для метода молекулярных колоний» (2010-2011 гг.).

3. Федеральная целевая программа «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации», проекты: «Теоретическое и экспериментальное

сравнение аналитических характеристик метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и цифровой ПЦР» (2011 г.), «Разработка приборно-аналитического комплекса для методов цифровой ПЦР» (2012 г.), «Разработка методик регистрации результатов цифровой полимеразной цепной реакции и технологий создания микрофлюидных устройств для ее постановки» (2013-2014 гг.).

Публикации: Основные результаты работы изложены в 13 печатных работах, из них 9 опубликованы в журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Личный вклад автора: Автор участвовал в постановке цели и задач исследований, планировании и проведении экспериментов, в частности: определении влияния применяемых материалов на эффективность ПЦР, изготовлении и испытании на герметичность микрочиповых устройств, определении температурного режима для ПЦР в микрочиповых устройствах, а также при анализе полученных результатов. Подготовка публикаций проводилась совместно с соавторами.

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы из 128 наименований, приложения (акт внедрения результатов работы от 05.10.2015г.). Текст диссертации изложен на 130 страницах, содержит 38 рисунков, 17 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость результатов выполненной работы, перечислены научные положения, выносимые на защиту.

Первая глава диссертации состоит из трех частей. В первой части приведен краткий аналитический обзор работ, связанных с изготовлением аналитических микрофлюидных устройств (микрочипов) для исследований биологических проб. Рассмотрены основные применяемые конструкционные материалы, методы изготовления, способы модификации и герметизации микроструктур для аналитических микрочипов.

Во второй части отражены основные способы реализации ПЦР в микроформате, определены наиболее значимые факторы, влияющие на результат анализа и требующие контроля. Рассмотрены методики определения и оценки влияния материала реакционной камеры на эффективность ПЦР.

В третьей части рассмотрены наиболее значимые преимущества цифровой ПЦР, позволяющей проводить количественную оценку нуклеиновых кислот без применения стандартных образцов и построения градуировочных зависимостей. Рассмотрены основные разновидности метода цифровой ПЦР, подробно описан способ проведения ПЦР в гелевой среде (метод молекулярных колоний), преимуществом которого является возможность использования традиционных реактивов и лабораторного оборудования (термоциклеры, лазерные флуоресцентные сканеры) для проведения и регистрации результатов ПЦР.

На основании литературного обзора поставлена цель настоящего исследования, заключающаяся в разработке микрочиповых устройств для обнаружения предельно малых концентраций молекул нуклеиновых кислот методом ПЦР в гелевой среде с применением флуориметрических методов детектирования и сформулированы задачи исследования.

Вторая глава состоит из трех разделов. **В разделе 2.1.** сформулированы требования к материалам для изготовления микрочиповых устройств. В качестве основных материалов выбраны устойчивые к воздействию влаги, слабокислым и щелочным водным растворам отечественные оптические стекла группы крон (на примере марки К8). Среди наиболее распространенных полимерных материалов были рассмотрены сертифицированные термопластичные листовые полимеры, позволяющие применять широкий спектр способов формования микроструктур при групповой обработке (например, использование литейных

или пресс-форм, обработка по шаблону) и, по литературным данным, не вступающие в реакцию с компонентами раствора для ПЦР - поликарбонат и полиметилметакрилат (на примере марок ТОСП[®], ТОСН, АCRYMA[®]72).

В разделе 2.2 приведены данные расчета температурного профиля в устройстве, состоящем из плоского нагревателя и планарного микрочипа, причем контакт нагревателя с поверхностью микрочипа полагается максимально эффективным, при этом свойства всех слоев усредняются пропорционально их толщине. Для условий симметричного вертикального нагрева реакционной камеры глубиной 200 мкм в подложке толщиной 1 мм, рассчитана поправка для определения продолжительности стадии термоциклирования, учитывающая температуропроводность материала микрочипового устройства и составляющая: около 2 секунд для нагрева стеклянного устройства и около 15 секунд для микрочипового устройства из ПММА.

В разделе 2.3. предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний на основе классических комбинаторных схем (выбор без повторений). Известно, что если круглые колонии радиуса (r) случайно и равномерно распределены по реакционной камере радиуса (R), то при наложении друг на друга двух соседних колоний, расстояние между центрами которых менее kr , где $k = 0.2 \div 0.6$, они интерпретируются, как один объект. Следовательно, круг радиуса kr можно трактовать, как своеобразный «разряд». Отношение N площади реакционной камеры к площади «разряда» дает общее число «разрядов».

Модель счета молекулярных колоний можно представить классической комбинаторной задачей последовательного выбора без возвращения из группы N элементов с числом повторений m равным числу колоний. Задавая N и m , можно рассчитать вероятности безошибочного счета колоний (без совпадения колоний), вероятность ошибки счета на 1 и более, а также найти математическое ожидание соответствующей ошибки счета при заданном числе и известных геометрических параметрах колоний и реакционной камеры.

Также такой подход позволяет определить максимальное число колоний, регистрируемое в данных условиях с заданной погрешностью счета или оценить требуемый размер колоний, соответствующий заданным характеристикам. Например, для регистрации 100 колоний с математическим ожиданием (-2) и вероятностью ~10% ошибки счета на 4 и более колоний в реакционной камере диаметром 14 мм необходимо обеспечить формирование колоний диаметром не более 450 мкм.

Для определения критического расстояния kr между центрами колоний выбран характерный диаметр молекулярных колоний, определяемый как ширина на полувысоте на графике распределения сигнала флуоресценции от отдельной колонии. Если зависимость распределения сигнала флуоресценции от колонии можно описать гауссианной и центры двух колоний находятся на расстоянии двух характерных радиусов или ближе, то разрешение таких колоний вызывает затруднения.

Третья глава диссертации посвящена технологическим исследованиям по выбору и адаптации способов изготовления, модификации и герметизации реакционных камер, используемых при создании микрочиповых устройств для ПЦР из выбранных материалов. В простейшем случае конструкция аналитического микрочипа представляет собой неразъемное соединение двух пластин, в одной из которых выполнена сеть микроструктур (каналы, резервуары, смесители, фильтры и др.), а другая, защитная, обеспечивает их герметичность.

В разделе 3.1 приведено сравнение спектрофотометрических и флуорометрических характеристик выбранных материалов, подтверждающих, в частности, отсутствие значимой флуоресценции у стеклянных материалов и полиметилметакрилата (при возбуждении на 473, 488, 530, 590 и 625 нм), в то время как для поликарбоната характерна фоновая флуоресценция (с максимумом на длине волны 520 нм при возбуждении на 473 нм), совпадающая со спектрами возбуждения и флуоресценции красителей, применяемых для

ПЦР-РВ (FAM, SYBR Green). В качестве базового полимерного материала выбран полиметилметакрилат марки ТОСП[®], который является прозрачным в области ультрафиолетового излучения (А-диапазона), что позволяет использовать фотоотверждаемые композиции для соединения пластин. Таким образом обеспечивается возможность применения низкотемпературных способов герметизации микроструктур, необходимых при использовании геля.

В разделе 3.2 рассмотрены технологии формирования реакционных камер для ПЦР в стеклянных и полимерных подложках, приведены результаты исследования поверхности сформированных микроструктур.

В стеклянных подложках из материала К8 методом фотолитографии и кислотного травления были выполнены реакционные камеры глубиной 100, 150 и 200 мкм, поверхность которых исследовали методами оптической микроскопии на сканирующем ближнепольном микроскопе СБОМ "NTEGRA Solaris" (НТ-МДТ, Россия). После кислотного травления на поверхности стекла образуется пористая структура (с размерами пор около 3 мкм), при этом шероховатость (Ra) составляет 4 нм. При продолжительном (24 ч) воздействии на стекло К8 раствором на основе концентрированной серной кислоты (хромовая смесь) размер пор достигает 8 мкм, а величина шероховатости возрастает до 40 нм, в то время как после щелочной обработки в 0,5 М растворе гидроксида натрия данные характеристики поверхности стекла практически не изменяются. Последовательная обработка поверхности реакционных камер, выполненных методом кислотного травления в стекле марки К8, в вышеперечисленных растворах с промежуточной тщательной промывкой дистиллированной водой приводит к увеличению шероховатости (Ra) до 70-100 нм при двукратной обработке, и до 400-800 нм при многократной (более 10 раз) обработке. Измерения шероховатости проводили на профилометре ХР-1 (Ambios Technology, Канада).

Вероятно, увеличение пористости поверхности стекла К8 после обработки кислотными растворами связано с вымыванием ионов щелочных металлов из приповерхностного слоя стекла, что создает условия для растворения каркаса кремнеземистого слоя и образования пористой структуры. Однако это не приводит к существенным изменениям прозрачности материала, что позволяет применять метод кислотного травления для изготовления стеклянных реакционных камер для ПЦР, а также использовать вышеперечисленные растворы (хромовая смесь на основе концентрированной серной кислоты, 0,5 М раствор гидроксида натрия) для очистки и восстановления реакционных камер при многократном применении стеклянных микрочиповых устройств.

Для изготовления реакционных камер **в полимерных подложках** использовали технологии, которые применяются для создания однотипных изделий из листового полимера: термоформование, механическую и лазерную микрообработку. В лабораторных условиях наиболее простым является метод термоформования, позволяющий применять широкий спектр термопластичных полимеров (ПК, ПММА, ПЭТ и др.) для изготовления прототипов, необходимых на этапе предварительных исследований. Для материалов ПК (BARLO, Германия) и ПММА («Дзержинское Оргстекло», Россия) были подобраны режимы термоформования реакционных камер диаметром 8, 5 или 3 мм и глубиной от 200 до 500 мкм в пластинах размером (25×25×1) мм (ДхШхВ), в которых была продемонстрирована возможность применения этих материалов для проведения ПЦР.

Помимо термоформования для изготовления микроструктур в ПММА использовали механическую и лазерную микрообработку (лазерная абляция). Механическая обработка заключалась в растачивании реакционной камеры на планшайбе токарного станка. Лазерная микрообработка проводилась на промышленной установке "Speedy II" (Trotec, Германия) с лазером мощностью 25 Вт на длине волны излучения 10.6 мкм. Экспериментально полученная зависимость глубины формируемых микроструктур от мощности лазерного

излучения при однократной обработке ПММА марки ТОСП[®] приведена на Рисунке 1. При мощности 1,8-1,9 Вт достигается требуемая глубина микроструктур (180 ± 200 мкм) с минимальным разбросом значений (выделенная область на Рисунке 1), поэтому этот режим был выбран для изготовления реакционных камер методом лазерной микрообработки.

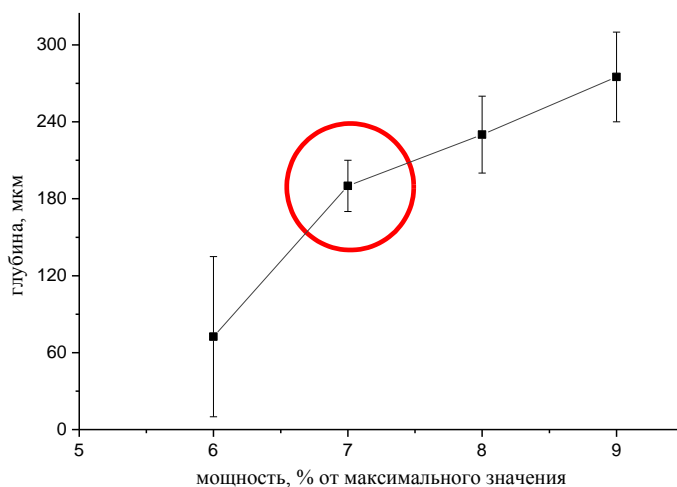


Рис. 1 – Зависимость глубины реакционной камеры от мощности лазерного излучения при формировании камеры методом лазерной микрообработки (мощность приведена в % от максимального значения - 25 Вт).

Из ПММА марки ТОСП[®] методами термоформования, механической и лазерной микрообработки были изготовлены заготовки (всего более 50 шт.) для прототипов микрочиповых устройств с одной реакционной камерой диаметром 8 мм и глубиной 200 мкм. Поверхность ПММА после обработки была исследована методами спектрофотометрии, оптической (конфокальной) микроскопии и профилометрии, основные результаты приведены в Таблице 1. Было показано, что после механической обработки образуется однородная шероховатая поверхность, а под действием лазерного излучения формируется волнистая структура с углублениями по направлению лазерной обработки, с периодом повторения около 60 мкм.

Таблица 1 – Сравнение геометрических характеристик и светопропускания реакционных камер из ПММА марки ТОСП[®], выполненных разными методами.

| Метод изготовления | Термоформование | Механическая обработка | Лазерная микрообработка |
|---|-----------------|------------------------|-------------------------|
| Параметр | | | |
| Глубина, мкм | 190±10 (n=5) | 200±10 (n=5) | 200±10 (n=5) |
| Диаметр лунки, мм | 7,7±0,1 (n=3) | 8,0±0,1 (n=3) | 7,9±0,1 (n=5) |
| Светопропускание в видимом диапазоне, % | 81±3 (n=3) | 13±2 (n=3) | 12±2 (n=5) |

Поверхность ПММА после термоформования остается относительно гладкой и прозрачной, что позволяет создавать полимерные устройства для регистрации сигнала флуоресценции с применением прямой и инвертированной схем оптического детектирования. Низкое светопропускание микроструктур, изготовленных в полимерной подложке методом механической и лазерной микрообработки, позволяет регистрировать сигнал флуоресценции при условии изготовления микрочиповых устройств с прозрачными верхними пластинами. Применение более шероховатой поверхности оправданно для изготовления смесителей и реакционных камер, так как неоднородность поверхности повышает эффективность теплообмена между твердой подложкой и жидкостью в реакционной камере, что предпочтительно при проведении ПЦР в полимерных устройствах.

Важными преимуществами лазерной микрообработки являются: возможность изготовления микроструктур произвольной (в том числе несимметричной) формы, высокая

скорость выполнения и возможность автоматизации (вплоть до нарезки заготовок из листового полимера) при изготовлении большой партии изделий. Поэтому этот способ был выбран для изготовления экспериментальных образцов полимерных микрочиповых устройств с реакционными камерами для ПЦР в гелевой среде (было изготовлено более 200 заготовок).

В разделе 3.3 приведены результаты физико-химической обработки поверхности ПММА, необходимой для модификации поверхности полимера и иммобилизации гелевого слоя из полиакриламида (ПАА). Обработку ПММА марок ТОСП[®], ТОСН, АCRYMA[®]72 проводили в химических растворах (гидролиз в кислой среде, гидролиз в щелочной среде, воздействие смеси перекиси водорода (30% раствор) и концентрированной серной кислоты в различных соотношениях - «пиранья») либо под действием ионизирующего излучения (ультрафиолетовое облучение, плазменная обработка в кислородной среде). После обработки в химических растворах образцы тщательно и многократно промывали в дистиллированной воде и высушивали при комнатной температуре. Для воздействия на образцы ПММА ультрафиолетовым (УФ) излучением использовали ртутную лампу (250 Вт) в спектральной области 250-400 нм. Плазменная обработка образцов в среде кислорода осуществлялась на частоте 13,56 МГц (45 Вт) и остаточном давлении около 1 мбар.

Оценка изменения поверхностных свойств ПММА проводилась методом лежащей капли, величину краевого угла смачивания дистиллированной воды измеряли на экспериментальной установке, собранной на основе цифрового оптического микроскопа. Полученные результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Изменение угла смачивания для образцов ПММА после разных видов обработки

| № | Марка ПММА Способ обработки | ТОСП [®] | ТОСН | АCRYMA [®] 72 |
|--|---|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | Угол смачивания, ° (n =) | Угол смачивания, ° (n =) | Угол смачивания, ° (n =) |
| 1 | Исходные образцы | 81 ± 2 (n = 22) | 82 ± 2 (n = 22) | 78 ± 2 (n = 22) |
| Обработка в химических растворах | | | | |
| 2 | 3 М Н ₂ SO ₄ при 70°C 30 минут | 77 ± 3 (n = 20) | 75 ± 2 (n = 20) | 72 ± 2 (n = 19) |
| 3 | 3 М Н ₂ SO ₄ при 80°C 30 минут | обработка не рекомендуется | 74 ± 2 (n = 27) | обработка не рекомендуется |
| 4 | 1 М NaOH (водный раствор) 12 часов | 80 ± 2 (n = 15) | 77 ± 3 (n = 26) | 77 ± 1 (n = 18) |
| 5 | 1 М NaOH (спиртовой раствор) 12 часов | 65 ± 5 (n = 15) | 66 ± 4 (n = 15) | 78 ± 3 (n = 25) |
| 6 | «Пиранья» Н ₂ SO ₄ : Н ₂ O ₂ = 1 : 1 5 минут | 77 ± 2 (n = 14) | 76 ± 3 (n = 15) | обработка не рекомендуется |
| Обработка ионизирующим излучением | | | | |
| 7 | Плазменная обработка O ₂ 1 минута | 40 ± 2 (n = 15) | 45 ± 4 (n = 15) | 44 ± 2 (n = 15) |
| 8 | Плазменная обработка O₂ 1,5 минуты | 38 ± 2 (n = 15) | 38 ± 1 (n = 15) | 37 ± 2 (n = 15) |
| 9 | Облучение УФ 15 минут | 73 ± 3 (n = 25) | 75 ± 4 (n = 26) | 71 ± 3 (n = 26) |
| 10 | Облучение УФ 60 минут | 78 ± 2 (n = 22) | 80 ± 3 (n = 18) | 69 ± 2 (n = 16) |

Обработка кислородной плазмой в течение 1,5 минут приводит к значительному изменению угла смачивания всех марок ПММА (до 38°), поэтому она применялась для оперативной модификации поверхности полимера. Однако обработка поверхности химическими растворами не требует применения высокотехнологического оборудования, поэтому в качестве альтернативного метода рассматривали щелочной гидролиз в водно-спиртовой среде.

Таким образом, для обработки поверхности реакционных камер из ПММА перед иммобилизацией гелевого слоя применяли следующие способы: плазменную обработку в кислородной среде или щелочной гидролиз в водно-спиртовой среде.

Раздел 3.4 посвящен низкотемпературным способам герметизации микрочиповых устройств методом склеивания полимерными фотоотверждаемыми композициями (ФОК), применение которых позволяет получить прозрачный водонепроницаемый связующий слой, выдерживающий нагрев до 120°C. Предположительно, при отверждении ФОК происходит полимеризация основных компонентов (мономеров) по свободнорадикальному механизму с участием фотоинициаторов, при этом образование полимерных комплексов можно регистрировать по спектрам материала в УФ и ИК диапазоне. Неразрушающий контроль отверждения полимерных композиций осуществляли оптическими методами (флуориметрии и спектрофотометрии в ближнем ИК (БИК) диапазоне) на основе анализа изменения полос поглощения и люминесценции полимерного слоя при различной продолжительности УФ облучения.

Для соединения стеклянных пластин применяли ФОК на основе уретан-акрилового эфира RiteLock UV02 (Chemence, Великобритания), в состав которой также входят акриловая кислота и стабилизаторы. На спектре флуоресценции неотвержденного слоя ФОК наблюдаются две полосы, имеющие максимумы на длинах волн 320 и 410 нм при возбуждении на 290 нм, соответствующие, по-видимому, основным компонентам полимерной композиции. Воздействие УФ излучения, продолжительность которого варьировалось от 5 до 40 минут, приводит к трансформации спектральной зависимости: после 20 мин отверждения на спектральных зависимостях наблюдается один пик с максимумом на 323 нм, несколько смещенным относительно исходного.

Уменьшение длинноволнового (410 нм) пика флуоресценции и увеличение коротковолнового (320 нм) пика под действием УФ, вероятно соответствует процессу образования устойчивого полимерного комплекса. Если представить полученные зависимости как сумму двух пиков, имеющих форму гауссианы, то можно вычислить амплитуду каждого пика и проанализировать их изменение в зависимости от времени отверждения. Такая зависимость, приведенная на Рисунке 2, свидетельствует о том, что процесс образования комплекса к 20-й минуте уже практически завершился. По результатам, полученным при измерении отвержденного слоя ФОК в режиме поперечно-силовой моды на зондовой лаборатории "Интегра-Солярис" (НТ-МДТ, Россия), следует, что поверхность RiteLock UV02 сформирована из однородных частиц размерами от 150 до 300 нм, при этом шероховатость поверхности составляет около 23 нм.

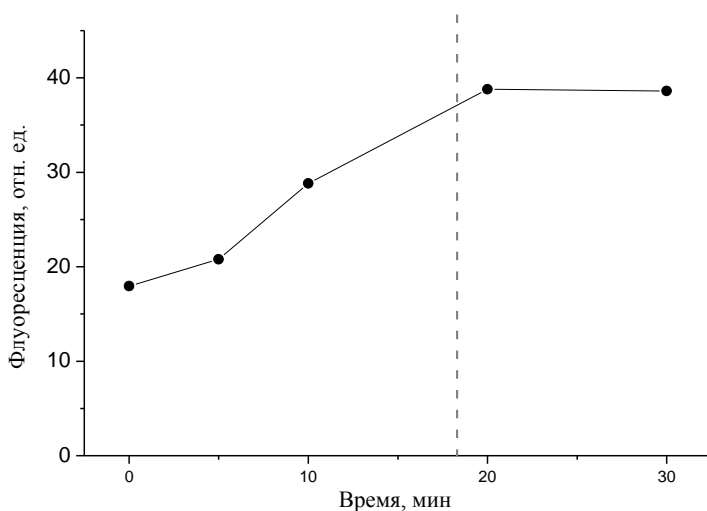


Рис. 2 — Изменение флуоресценции образцов RiteLock UV02 на длине волны 320 нм (при возбуждении на 290 нм) в зависимости от времени отверждения полимера.

Для соединения пластин из ПММА использовали ФОК на акрилатной основе ACRIFIX[®]192 (EVONIC, Германия) в сочетании с разбавителем ACRIFIX[®]TC 30. В УФ и БИК диапазоне для слоя ACRIFIX[®]192 характерно несколько максимумов поглощения, величина которых изменяется по мере отверждения. На Рисунке 3 приведены спектры поглощения слоя ФОК в диапазоне 1550-2200 нм при продолжительности воздействия УФ излучения от 0 до 60 минут, полученные после вычитания фонового сигнала, определенного на участке спектра (1520÷1560 нм). Можно выделить два основных этапа отверждения: первый (до 10 мин) – соответствующий значительному уменьшению оптической плотности и второй – на котором наблюдается незначительное изменение величины оптической плотности. Предположительно пики поглощения на длинах волн 1622 нм и 2110 нм можно интерпретировать как сочетание второго обертона колебаний связи С=C (в области 3300 см⁻¹), характерной для молекулы мономера основного компонента ACRIFIX[®]192, с валентными (вблизи 2960 см⁻¹) колебаниями связи (СН) и с деформационными (около 1450 см⁻¹) колебаниями метильной группы (СН₃), входящих в состав мономера.

Установившиеся после 20 минут отверждения значения оптической плотности (D_{1622}) и (D_{2110}) слоя ACRIFIX[®]192 толщиной 650 мкм составляют $(18 \pm 4) \cdot 10^{-3}$ и $(104 \pm 5) \cdot 10^{-3}$ ($n = 8$) единиц оптической плотности (еоп), соответственно. При условии нормального распределения погрешности измерения, величина D отвержденного слоя ФОК с вероятностью не менее 90% попадает в интервал $(D \pm 1,7 \cdot \sigma)$. Таким образом, примем, что отверждение образцов происходит, если (D_{1622}) и (D_{2110}) не превышают пороговые величины (D^*), составляющие 0,024 и 0,113 еоп для слоя ФОК толщиной 650 мкм. Для расположенной рядом с 2110 нм полосы поглощения на 2138 нм величина (D_{2138}) по мере отверждения сохраняется на уровне $(128 \pm 7) \cdot 10^{-3}$ еоп ($n=21$). Сравнение величины (D_{2110}) с (D_{2138}), позволяет независимо от толщины слоя однозначно выявить образцы, отверждения которых недостаточно для достижения порогового значения (D^*_{2110}).

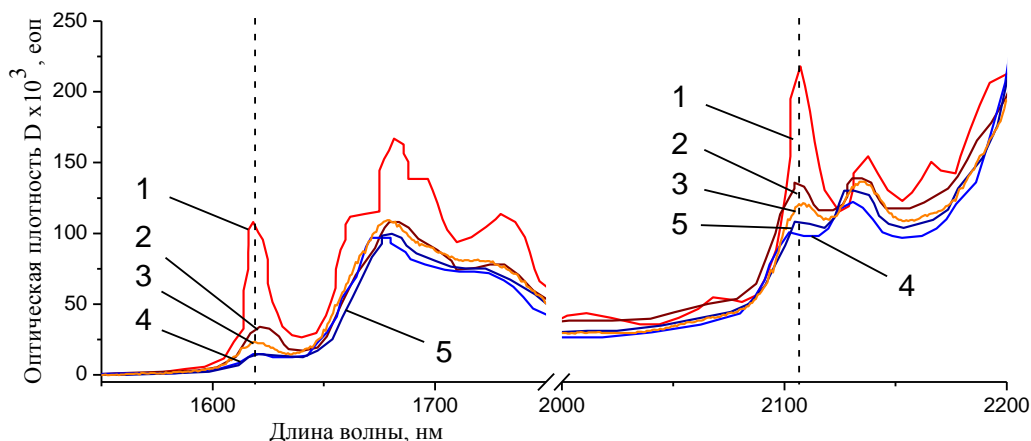


Рис. 3 – Спектральная зависимость поглощения слоя ACRIFIX® 192, толщиной 650 мкм, при продолжительности воздействия УФ излучения: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 20 мин, 5 – 60 мин.

Таким образом, на основе неразрушающего контроля степени отверждения полимерных композиций методом спектрофотометрии в ближнем инфракрасном диапазоне предложен следующий критерий отверждения слоя полимерных композиций на акрилатной основе, ACRIFIX® 192: а) отверждение происходит, если $D_{2110} < D_{2138}$; б) отверждение можно завершить, если D_{1622} не превышает пороговую величину D^* , в частности для слоя толщиной 650 мкм пороговая величина D^*_{1622} составляет 0,024 еоп.

Критерий применяли для определения условий отверждения полимерной композиции. Для герметизации реакционных камер микрочипов желательно уменьшить вязкость ФОК, для этого в ACRIFIX® 192 добавляли разбавитель ACRIFIX® TC 30 в соотношениях 1:1, 1:2, 2:1 (по объему). Согласно предложенному критерию отверждение полимерной композиции происходило только при соотношении компонентов 2:1, при этом изменение вязкости полимерной композиции позволяло заполнять пространство между соединяемыми поверхностями за счет капиллярных сил.

В разделе 3.5 приводятся результаты тестирования на герметичность прототипов полимерных микрочиповых устройств после циклического нагрева по программе ПЦР. Для контроля герметичности применяли гравиметрический метод. Заполненные дистиллированной водой (~30 мг) микрочиповые устройства запечатывали фотоотверждаемыми полимерными композициями (ACRIFIX® 192) и нагревали 5 минут при 95°C, затем проводили 30 циклов в следующем режиме: выдержка при 95°C в течение 20 сек, затем - 60°C в течение 60 сек. Установлено, что для полимерных устройств размером 32×24 мм после нагрева характерна потеря массы около 3 мг. Те же значения получены для полимерных устройств без заполнения водой (холостой эксперимент).

Изменение массы полимера при нагреве вероятно связано с удалением влаги, а наиболее перспективным методом контроля поглощенной влаги является спектрофотометрический метод. Было показано, что на длине волны 1909 ± 3 нм возможно регистрировать поглощение и удаление влаги образцами ПММА марки ТОСП® после кипячения или сушки, а изменение площади пика пропорционально изменению массы образцов (марок ТОСП® и ТОСН) после циклического нагрева, которое составляет $(0,19 \pm 0,02)$ % от исходной массы.

Методика контроля герметичности микрочиповых устройств с применением гравиметрического метода была усовершенствована за счет дополнительного учета влагопоглощения полимерных материалов, в частности составляющего 0,2% от исходной массы ПММА марки ТОСП®. Испытания выборки из 10 микрочиповых устройств,

заполненных водой, показали незначительное изменение массы с учетом поправки. Следовательно, полимерные микрочиповые устройства, изготовленные из полиметилметакрилата и соединенные фотоотверждаемыми полимерными композициями, остаются герметичными в условиях эксплуатации (при циклическом нагреве от 60 до 95°C).

В четвертой главе приведены экспериментальные результаты, полученные при апробации изготовленных стеклянных и полимерных прототипов микрочиповых устройств при обнаружении фрагментов кДНК онкомаркера цитокератина-19 с применением специфичных флуоресцентных зондов и праймеров (ДНК-Синтез, научно-производственная компания СИНТОЛ, Москва). Зонд TaqMan использовали для ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), а для регистрации колоний проводили асимметричную ПЦР при соотношении праймеров (1:5) с флуоресцентными зондами FRET или Beacon.

В разделе 4.1 приведены результаты исследования клеевых полимерных композиций, используемых для получения неразъемного соединения пластин микрочиповых устройств, с целью оценивания их влияния на эффективность ПЦР. Предложен подход, который основывается на оценке изменения величины порогового цикла при проведении ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в присутствии тестируемого материала.

Были исследованы полимерные композиции на акрилатной основе, полимеризующиеся под действием ультрафиолетового излучения (RiteLok UV02, ACRIFIX[®]192, Permabond 630 и 640) и двухкомпонентные кремнийорганические полимеры (Sylgard 184, Пентэласт[®]-750, Пентэласт[®]-712, Силастик Т4). Отвержденный полимерный материал помещали в пробирку с ПЦР-смесью (в соотношении 1:9 по массе), добавляли ДНК-мишень (в концентрации 10⁵ копий/мкл) и проводили ПЦР-РВ на оборудовании АНК-32 (ИАП РАН, Россия). В случае изменения величины порогового цикла более чем на 1.1 при внесении твердого образца, исследуемый материал считался значительно влияющим на эффективность реакции. Установлено, что на эффективность ПЦР не оказывают существенного влияния практически все исследуемые полимерные композиции, кроме Permabond 640, наличие которого приводит к ингибированию ПЦР.

В разделе 4.2. приведены результаты исследования влияния основного полимерного материала (ПММА марки ТОСП[®]), используемого для изготовления микрочипового устройства, на эффективность полимеразной реакции. Прототипы микрочиповых устройств были герметизированы полимерными фотоотверждающими композициями (ACRIFIX[®]192 в сочетании с ACRIFIX[®]ТС 30). Рост сигнала флуоресценции регистрировали в режиме реального времени на анализаторе нуклеиновых кислот для микрочипов АНК-4 (ИАП РАН, Россия).

На Рисунке 4 представлены зависимости величины порогового цикла (Y) от концентрации ДНК-мишени (X=lgC) при проведении ПЦР-РВ: (1) в полипропиленовых пробирках на АНК-32, (2) в реакционной камере микрочиповых устройств из ПММА (марки ТОСП[®]) на АНК-4. Объем реакционной камеры полимерного устройства (30 мкл) был сопоставим с объемом ПЦР смеси в полимерных пробирках (25 мкл). Градуировочная зависимость для ПЦР-РВ на АНК-32 описывается уравнением: $Y = -3,6 \cdot X + 46,0$ (R = 0,99), а для реакции на полимерном устройстве уравнение имеет вид: $Y = -3,7 \cdot X + 44,5$ (R = 0,99). Значения эффективности ПЦР, определенные по градуировочной зависимости, сопоставимы и составляют около 90%. Следовательно, конструкционные материалы микрочипового устройства (ПММА марки ТОСП[®], соединенный фотоотверждаемой полимерной композицией) не оказывают влияния на эффективность ПЦР и могут использоваться для изготовления микрочиповых устройств для ПЦР.

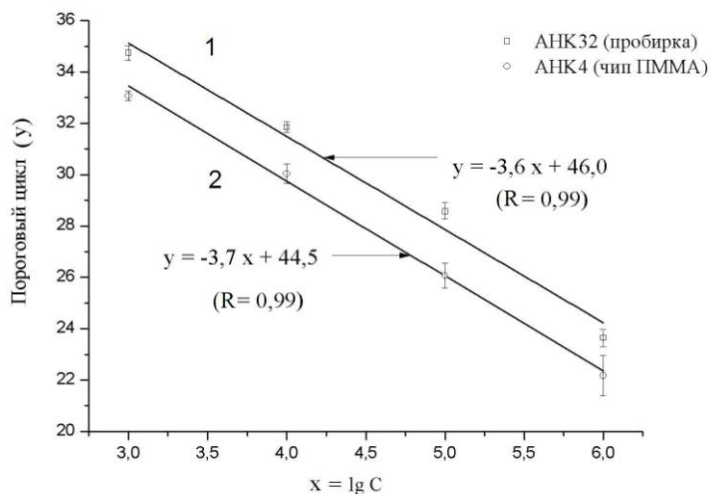


Рис. 4 – Градуировочные зависимости, построенные по результатам проведения ПЦР-РВ: 1 - в пробирках на АНК-32 (при стандартных условиях),

2 - в реакционной камере микроципового устройства из ПММА.

Раздел 4.3. Для многократного использования стеклянных микроциповых устройств, герметизированных полимерными фотоотверждаемыми композициями, необходимо определить щадящие химические растворы, позволяющие очистить поверхность реакционных камер после проведения ПЦР-РВ и не оказывающие деструктивного влияния на полимерный соединительный слой. Для этого на прототипах стеклянных микроципов, изготовленных методом термического связывания, выполнено исследование по следующей схеме: 1) проведение ПЦР с добавлением ДНК-мишени в концентрации 10^6 копий/мкл (положительный контроль), 2) очистка поверхности чипа от органических компонентов при помощи выбранного химического средства, 3) проведение ПЦР без добавления ДНК (отрицательный контроль).

Традиционно для обработки стеклянной поверхности используют химические растворы на основе концентрированной серной кислоты, поэтому для сравнения в качестве эталона использовали хромовую смесь (5 % раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте). Для исследований были выбраны: 1) гипохлорит натрия (раствор натриевой соли хлорноватистой кислоты), водный раствор которого применяется для дезинфекции; 2) элюирующий ДНК буферный раствор ТЕ (0.01 М Трис-НСl 0.01 М ЭДТА, рН 7.8), используемый при работе с генетическим материалом для удаления фрагментов ДНК со стеклянной поверхности; 3) раствор «пиранья» (смесь концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 3:1), используемый для очистки стеклянной поверхности от органических загрязнений.

Установлено, что однократной обработки 1% водным раствором гипохлорита натрия или раствором «пиранья» достаточно для очистки стеклянной поверхности реакционной камеры, что подтверждено отрицательным контролем. После обработки буферным раствором ТЕ при проведении отрицательного контроля наблюдается экспоненциальное увеличение интенсивности флуоресценции, характерное для ПЦР. Следовательно, применения буферного раствора недостаточно для очистки стеклянной поверхности.

После обработки раствором «пиранья» при повторном использовании микроципового устройства наблюдается изменение характера кинетической зависимости интенсивности флуоресценции от номера цикла ПЦР (Рисунок 5, зависимость 3), что, по-видимому, свидетельствует о влиянии данной смеси на поверхностные свойства реакционной камеры, и отражается на эффективности ПЦР.

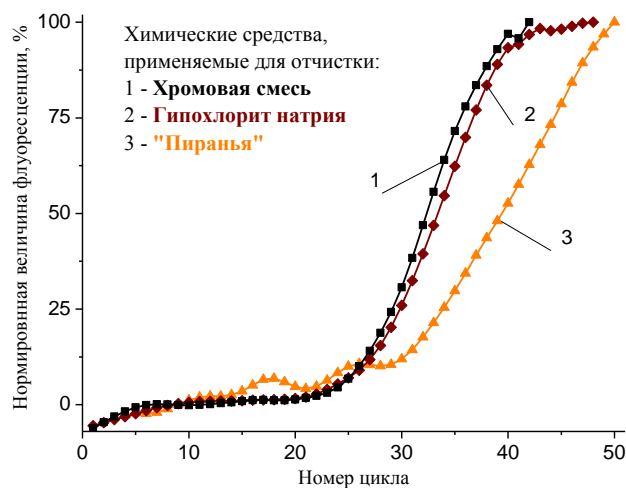


Рис. 5 – Нормированные графики зависимости изменения флуоресценции от номера цикла ПЦР в стеклянных микрочиповых устройствах, обработанных разными химическими растворами:

- 1 – хромовая смесь;
- 2 – раствор гипохлорита натрия;
- 3 – смесь перекиси водорода и концентрированной серной кислоты («пиранья»).

Таким образом, для очистки и восстановления реакционных камер применяли 1 % раствор гипохлорита натрия, что позволило многократно (не менее 3х раз) использовать стеклянные микрочиповые устройства, герметизированные фотоотверждаемыми композициями

В разделе 4.4. приведены результаты проведения ПЦР в гелевой среде на микрочиповых устройствах, представленных на Рисунке 6. Перед экспериментом гель восстанавливали путем пропитывания смесью для ПЦР, которую вводили в каждую лунку дозатором через входное отверстие. Объем реакционной камеры составлял 31 мкл для стеклянного микрочипового устройства и 16 мкл для полимерного устройства, диаметр реакционной камеры соответственно 14 мм и 10 мм. Детектирование молекулярных колоний проводили на прототипе детектора молекулярных колоний ДМК-1 (ИАП РАН, Россия) при длине волны возбуждения 473 нм.

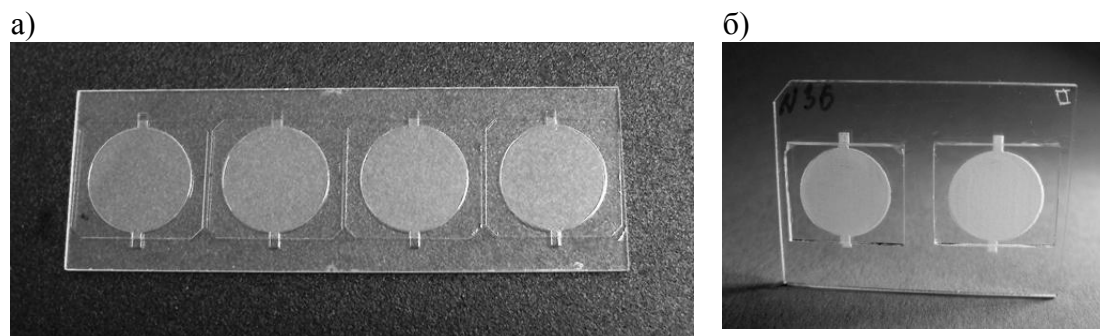


Рис. 6 – Микрочиповые устройства для цПЦР в геле: а) из стекла, б) из ПММА.

Для апробации стеклянных микрочиповых устройств в качестве ДНК-мишени применяли пробу, содержащую кДНК онкомаркера цитокератина СК-19, полученную методом обратной транскрипции. Исходя из предварительных оценок, исходную пробу кДНК цитокератина-19, концентрация которой была определена методом ПЦР-РВ (150 ± 16 копий/мкл, $n=4$) на АНК-32, разбавляли буферным раствором в 5 и 15 раз до достижения расчетной концентрации 30 и 10 копий/мкл. В готовую реакционную смесь добавляли 1 мкл раствора анализируемой пробы.

На Рисунке 7 приведены изображения колоний, полученные в реакционных камерах стеклянного микрочипового устройства после 45 циклов ПЦР по следующей программе прогрев при 95°C в течение 300 сек, затем 45 циклов рабочего режима: 95°C в течение

6 секунд, 60°C в течение 60 секунд. При обработке результатов не учитывался разброс по интенсивности свечения колоний, при этом несимметричные объекты интерпретировались как сочетание двух круглых колоний. Таким образом, было зарегистрировано 31 ± 7 ($n=3$) и 10 ± 3 ($n=9$) молекулярных колоний, что согласуется с данными, полученными при ПЦР-РВ.

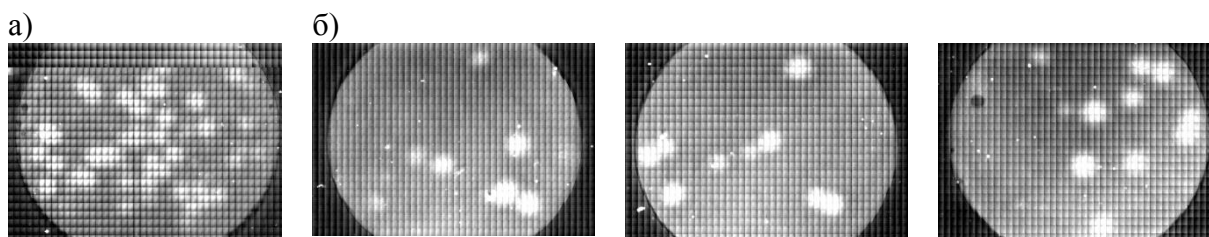


Рис. 7 – Изображения молекулярных колоний кДНК цитокератина (фрагмент 210 п.о.), полученные в стеклянном микрочиповом устройстве после 45 циклов амплификации: а) при разбавлении исходной пробы в 5 раз; б) при разбавлении исходной пробы в 15 раз.

Для апробации полимерных микрочиповых устройств использовали синтезированный фрагмент кДНК цитокератина длиной 210 п.о. На Рисунке 8 приведены изображения колоний, полученные в полимерном микрочиповом устройстве при внесении в реакционную смесь 1 мкл тестового образца, содержащего ~ 10 молекул/мкл. Для проведения ПЦР применяли прототип устройства для термоциклирования (ИАП РАН, Россия), программу температурного профиля корректировали согласно рекомендациям (раздел 2.3) Зарегистрированное число колоний составило 8 ± 3 ($n=5$), при добавлении 2 мкл тестового образца число колоний увеличилось до 15.

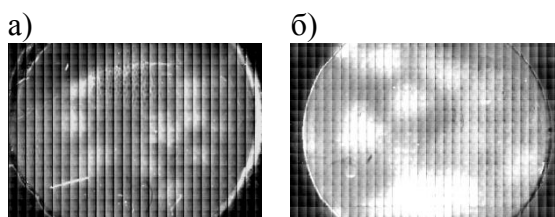


Рис. 8 – Изображения молекулярных колоний фрагмента кДНК цитокератина длиной 210 п.о., полученные в полимерном микрочиповом устройстве после 45 циклов амплификации при добавлении тестового образца, содержащего 10 копий/мкл, в объеме: а) 1 мкл; б) 2 мкл.

Таким образом, разработанные и созданные микрочиповые устройства позволяют регистрировать результат амплификации отдельных молекул ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в гелевой среде с применением флуориметрических методов детектирования.

В разделе 4.5. приведены результаты анализа размеров регистрируемых колоний, полученных при амплификации фрагментов ДНК разной длины. Использовали наборы специфичных зондов (FRET) и праймеров, позволяющие амплифицировать фрагменты кДНК СК-19 длиной 210, 309 и 494 п.о. Для отдельно расположенных единичных колоний анализировали график пространственного распределения сигнала флуоресценции по линии, проходящей через центр колонии. Характерный диаметр колонии оценивали как ширину пика флуоресценции на полувысоте. В Таблице 3 приведены оценки характерного радиуса колоний, полученных после 45 циклов ПЦР в реакционных камерах стеклянных микрочиповых устройств.

Таблица 3 – Изменение характерного радиуса молекулярных колоний при разной длине амплифицируемого фрагмента

| Длина фрагмента, п.о. | Характерный радиус колоний, мкм |
|-----------------------|---------------------------------|
| 210 | 570±40 (n=5) |
| 309 | 330±30 (n=5) |
| 494 | 160±10 (n=9) |

Экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом полоний [2], если их аппроксимировать линейной зависимостью в двойных логарифмических осях (Рисунок 9), при этом коэффициенты наклона зависимостей близки и составляют $(-1,49 \pm 0,04$ с 90% доверительной вероятностью) и $(-1,56)$, для ММК и для метода полоний, соответственно.

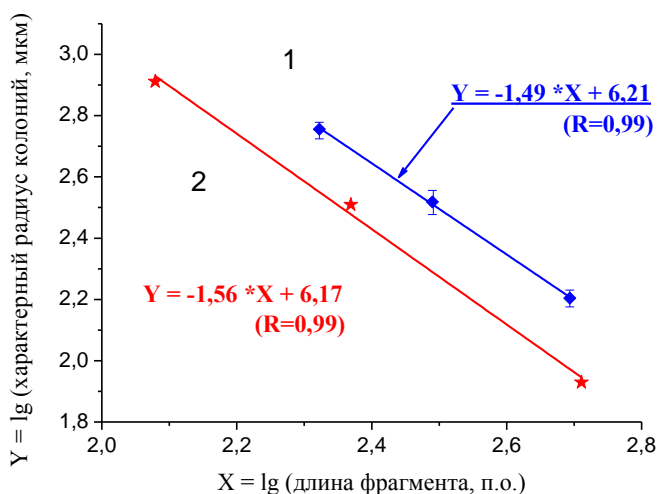


Рис. 9 – Зависимости изменения характерного радиуса колоний от длины фрагмента, представленные в двойных логарифмических осях, полученные: 1 – методом молекулярных колоний в микрочиповых устройствах, 2 – методом полоний из работы [2].

Для регистрации молекулярных колоний на ранних стадиях исследования использовался метод микроскопии высокого разрешения – конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. По данным этих исследований характерный радиус молекулярных колоний кДНК СК-19 для фрагмента длиной 494 п.о. после проведения 30 циклов ПЦР составил около 90 мкм.

Основные результаты работы:

1. Экспериментальные исследования свойств неорганического стекла марки К8 и полиметилметакрилата (ПММА) марки ГОСП® («Дзержинское Оргстекло», Россия) позволили обосновать их применимость при изготовлении микрочиповых устройств для проведения ПЦР в гелевой среде и регистрации результатов флуориметрическим методом, что обусловлено: а) низким уровнем флуоресценции в оптическом диапазоне при возбуждении на длинах волн (473, 488, 530, 590 и 625 нм), соответствующих поглощению наиболее распространенных флуоресцентных красителей, б) отсутствием значимого влияния на эффективность реакции при проведении ПЦР-РВ в реакционной камере из этого материала (эффективность реакции сопоставима с результатами, полученными на традиционном оборудовании); в) применимостью существующих физико-химических способов модификации поверхности ПММА для последующей иммобилизации слоя геля (плазменная обработка в кислородной среде, щелочной гидролиз в водно-спиртовой среде).

2. Для ПММА марки ТОСП® адаптированы технологии формирования микроструктур глубиной 200 мкм (с наименьшим разбросом глубины) в листовом полиметилметакрилате методом лазерной микрообработки (абляция на длине волны 10,6 мкм) для изготовления малой серии (до 100 шт) однотипных заготовок для микрочиповых устройств.

3. Предложен критерий порогового типа, учитывающий результаты спектрофотометрических измерений светопропускания слоя фотоотверждаемой композиции (на акрилатной основе, ACRIFIX®192) в ближней инфракрасной области. Применение критерия позволяет определить факт отверждения полимерных композиций, а также оценить продолжительность обработки УФ излучением и соотношение основных компонентов, которые использовались для герметизации микрочиповых устройств. Подтверждено, что применяемые клеевые композиции не оказывают значимого влияния на эффективность ПЦР, а микрочиповые устройства, соединенных фотоотверждаемыми композициями, остаются герметичными в условиях эксплуатации – 30 циклов нагрева от 60 до 95°C

4. Результаты, полученные при обнаружении молекул кДНК онкомаркера цитокератина-19 на микрочиповых устройствах с применением специфических флуоресцентных зондов, имеют хорошее совпадение с результатами, полученными другими методами: а) ПЦР-РВ на АНК-32, б) полоний (polony) с применением неспецифических флуоресцентных красителей.

Таким образом, впервые разработаны и созданы микрочиповые устройства, изготовленные из: а) боросиликатного стекла марки К8, б) полиметилметакрилата марки ТОСП®, которые позволяют регистрировать единичные молекулы нуклеиновых кислот при проведении ПЦР в гелевой среде.

Список цитируемой литературы:

1. Пат. 2048522 Российская Федерация, Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления [Текст] / Четверин А.Б., Четверина Е.В.; патентообладатель «Институт белка РАН». – заявл. 14.10.1992; опублик. 20.11.1995.
2. Mitra, R.D. In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules [Text]/ R.D. Mitra, G.M. Church // Nucleic Acids Research. – 1999. – Vol.27. – N.24 – e34-e39.
3. Фалалеева, М. В. Применение нанокolonий для выявления минимальной остаточной болезни при лейкозе t(8;21). [Текст] / М.В. Фалалеева, Е.В. Четверина, А.В. Кравченко, А.Б. Четверин // Молекулярная биология. – 2009. – Т.42. – №.1. – С. 180–189.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

- 1) **Тупик, А.Н.** Электрокинетические потоки в микрофлюидных устройствах [Текст] / А.Н. Тупик, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко // Научное приборостроение. – 2007. – Т.17. – N.3. – С. 40–45.
- 2) Евстрапов, А.А. Обработка поверхности стеклянных микрочипов после анализа биологических проб [Текст] / А.А. Евстрапов, **А.Н. Тупик** // Научно-технический вестник СПбГУ ИТМО. – 2009. – В.4. – С. 42–47.
- 3) Евстрапов, А.А., Применение фотоотверждаемых оптических клеев для герметизации аналитических микрочипов [Текст] / А.А. Евстрапов, Т.А. Лукашенко, **А.Н. Тупик** // Научное приборостроение. – 2010. – Т.20. – N.1. – С. 29–38.
- 4) Курочкин, В.Е. Разработка микрочиповых устройств для проведения ПЦР в геле [Текст] / В.Е. Курочкин, А.А. Евстрапов, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, **А.Н. Тупик**, А.И. Цымбалов // Научное приборостроение. – 2010. – Т.20. – N.4. – С. 127–131.

- 5) Антонова, О.С. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик [Текст] / О.С. Антонова, Г.Е. Рудницкая, **А.Н. Тупик**, А.Л. Буляница, А.А. Евстапов, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2011. – Т.21. – N.4. – С. 5–21.
- 6) Евстапов, А.А. Оценка результатов полимеразной цепной реакции в реальном времени кДНК онкомаркеров СК-19 методом электрофореза на микрофлюидном чипе [Текст] / А.А. Евстапов, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, **А.Н. Тупик**, А.И. Цымбалов, Н.А. Есикова, Я.С. Посмитная // Научное приборостроение. – 2012. – Т.22. – N.4. – С. 77–85.
- 7) Посмитная, Я.С. Целевая обработка поверхности материалов микрофлюидных чипов [Текст] / Я.С. Посмитная, И.В. Кухтевич, А.А. Евстапов, **А.Н. Тупик** // Научное приборостроение. – 2012. – Т.22. – N.4. – С. 38–45.
- 8) Рудницкая, Г.Е. Физико-химические методы модификации поверхности полиметилметакрилата для микрофлюидных чипов [Текст] / Г.Е. Рудницкая, Т.А. Лукашенко, Я.С. Посмитная, **А.Н. Тупик**, А.А. Евстапов // Научное приборостроение. – 2014. – Т.24. – N.3. – С. 22–31.
- 9) Буляница, А.Л. Численная оценка равномерности распределения молекулярных колоний при анализе изображений результата цПЦР в геле [Текст] / А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, **А.Н. Тупик**, Т.А. Лукашенко, А.И. Цымбалов, А.А. Евстапов // Научное приборостроение. – 2014. – Т.24. – N.4. – С. 3–12.
- 10) Буляница, А.Л. Применение классических комбинаторных схем при количественном генетическом анализе методом молекулярных колоний [Текст] / А.Л. Буляница, **А.Н. Тупик**, Г.Е. Рудницкая, А.А. Евстапов // Обозрение прикладной и промышленной математики. – 2014. – Т.21. – N.4. – С. 1–2.
- 11) **Tupik A.N.** Design reaction chamber for digital PCR in gel / A.N. Tupik, A.A. Evstapov, G.E. Rudnitskaya, T.A. Lukashenko // CD of extended abstracts of 2-nd International conference "Implementation of Microreactor Technology in Biotechnology". 5-8.05.2013, Cavtat, Croatia, P. 79.
- 12) **Тупик, А.Н.** Создание технологической базы по изготовлению микрочиповых устройств для ПЦР в геле [Текст] / А.Н. Тупик, А.И. Цымбалов // Сборник статей 5-й Международной научно-практической конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". 14–15.11.2013, Санкт-Петербург. Т.1., С. 252–254.
- 13) Егоренкова, Г.Ю. Исследование полимеризации фотоотверждаемого клея методами оптической спектрофотометрии для герметизации полимерных микрочиповых устройств [Текст] / Г.Ю. Егоренкова, **А.Н. Тупик**, Т.А. Лукашенко // Сборник материалов 2-й Всероссийской научной Интернет–конференции с международным участием "Фундаментальные и прикладные аспекты новых высокоэффективных материалов" 28.10.2014, г. Казань, 2014. – С. 30–32. – ISBN 978-5-906217-66-0.