

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ  
АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ТУПИК Александра Николаевна

РАЗРАБОТКА МИКРОЧИПОВОГО УСТРОЙСТВА  
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ  
В ГЕЛЕВОЙ СРЕДЕ

Специальность 01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Научный руководитель  
доктор технических наук Евстапов А.А.

Санкт-Петербург 2015

## Оглавление

Введение .....	4
Глава 1. Литературный обзор .....	11
1.1. Актуальность .....	11
1.1.1. Микрочиповые устройства .....	11
1.1.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	12
1.1.3. Микрочиповые устройства для ПЦР .....	13
1.2. Изготовление микрочиповых устройств .....	15
1.2.1. Основные подходы и конструктивные решения при создании микрочиповых устройств для ПЦР .....	15
Стационарные реакционные камеры для ПЦР .....	15
Проточные реакционные камеры для ПЦР .....	17
ПЦР в капле .....	18
1.2.2. Топология микрочипового устройства для ПЦР .....	19
1.2.3. Выбор материала и формирование микроструктур .....	20
Кремний .....	20
Стекланные материалы .....	21
Полимерные материалы .....	22
1.2.4. Способы герметизации микроструктур .....	25
1.2.5. Обработка поверхности полимеров для создания функциональных слоев .....	28
Химические методы обработки .....	29
Физические методы обработки .....	29
1.3. Особенности проведения ПЦР на микрочиповом устройстве .....	30
1.3.1. Детектирование продукта полимеразной цепной реакции .....	30
1.3.2. Влияние температурного режима на эффективность ПЦР .....	32
1.3.3. Ингибирование ПЦР .....	34
Способы выявления ингибирующих веществ .....	35
Ингибирование в микрочипах .....	37
Определение влияния материалов на эффективность ПЦР .....	38
1.4. Методы и способы проведения цифровой полимеразной цепной реакции (цПЦР) .....	40
1.4.1. Цифровая полимеразная цепная реакция (цПЦР) .....	40
1.4.2. Способы реализации цифровой ПЦР .....	41
1.4.3. Цифровая ПЦР в геле (метод молекулярных колоний) .....	42
1.4.4. Реализация цифровой ПЦР в геле (метод молекулярных колоний) .....	44
1.4.5. Детектирование молекулярных колоний .....	44
1.4.6. Выбор тестового объекта исследования .....	46
1.5. Основные результаты главы 1 .....	47
1.5.1. Постановка задачи .....	49
Глава 2. Теоретические исследования .....	50
2.1. Основные требования к материалам микрочиповых устройств .....	50
Стекланные материалы .....	50
Полимерные материалы .....	53
2.2. Температуропроводность материалов .....	55
2.3. Оценка погрешности счета колоний .....	62
2.4. Основные результаты главы 2 .....	65
Глава 3. Технологические исследования .....	67
3.1. Оптические свойства материалов .....	67

Спектральные зависимости светопропускания материалов .....	67
Спектры флуоресценции.....	68
3.2. Формирование микроструктур .....	70
3.2.1. Стеклообразные материалы.....	70
3.2.2. Полимерные материалы .....	72
Термоформование (горячее прессование).....	72
Механическая обработка .....	74
Лазерная микрообработка.....	75
3.3. Подготовка поверхности для иммобилизации геля .....	78
3.3.1. Изменение поверхностных свойств стеклянных пластин .....	78
3.3.2. Изменение поверхностных свойств полимерных пластин из ПММА .....	81
Химические методы обработки .....	82
Физические методы обработки.....	83
3.4. Герметизация микрочиповых устройств для ПЦР .....	85
3.4.1. Соединение стеклянных пластин.....	86
Термическое связывание.....	86
Низкотемпературные способы соединения пластин.....	87
Фотоотверждаемые композиции .....	88
3.4.2. Соединение полимерных пластин.....	91
3.4.3. Определение герметичности реакционных камер.....	96
3.5. Основные результаты главы 3 .....	99
Глава 4. Экспериментальные исследования .....	101
4.1. Проверка влияния материалов на эффективность ПЦР .....	102
Материал подложки .....	102
Герметизирующие материалы .....	104
4.2. Очистка стеклянных реакционных камер.....	106
4.3. Постановка цПЦР в микрочиповых устройствах.....	109
4.4. Изменение размеров колоний .....	110
4.5. Основные результаты главы 4 .....	113
Заключение .....	114
Перечень сокращений и условных обозначений: .....	115
Список литературы.....	118
Приложение А.....	129

## Введение

Применение современных технологий изготовления микро- и наноструктур в неорганических и полимерных материалах позволяет разрабатывать микросистемы полного анализа ( $\mu$ 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 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 - colony), 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. 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 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<sup>®</sup>, - 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  $200 \pm 10$  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, 2011г. (г. Волгоград); IV конференция “Аналитические приборы”, 2012 г. (Санкт-Петербург); II конференция “Implementation of microreactor technology in biotechnology - IMTB” 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 - Медицине», 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.

#### **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.

#### **Краткое 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.

**Во второй главе** сформулированы требования к материалам для изготовления микрочиповых устройств. Для выбранных материалов с учетом температуропроводности

материалов определена поправка для режима циклического нагрева. Сформулирован способ оценки погрешности количественного анализа молекулярных колоний на основе классических комбинаторных схем (выбор без повторений), позволяющий оценить максимальное число колоний, регистрируемое в данных условиях с заданной погрешностью счета.

**Третья глава** диссертации посвящена экспериментальным исследованиям оптических свойств материала, технологическим исследованиям, связанным с выбором и адаптацией способов изготовления, модификации и герметизации реакционных камер при создании микрочиповых устройств для ПЦР.

Приведены результаты исследования спектральных зависимостей светопропускания материалов, применяемых для микрочиповых устройств. Изучена флуоресценция материалов при возбуждении на длинах волн, соответствующих поглощению основных флуоресцирующих меток. Рассмотрены технологии и способы формирования реакционных камер для ПЦР в стеклянных и полимерных подложках, приведены результаты исследования поверхности сформированных микроструктур методами кислотного травления (стекло), термоформованием, механической и лазерной микрообработкой (полимер). Представлены результаты физико-химической обработки поверхности полимера, необходимой для иммобилизации гелевого слоя. Обработка проводилась химическими растворами (гидролиз в кислой среде, гидролиз в щелочной среде, раствором «пиранья») либо под действием ионизирующего излучения (ультрафиолетовое облучение, плазменная обработка в кислородной среде).

Для соединения и герметизации микрочиповых устройств изучены низкотемпературные способы склеивания полимерными фотоотверждаемыми композициями (ФОК), применение которых позволяет получить прозрачный водонепроницаемый связующий слой, выдерживающий нагрев до 120°C. Отверждение полимерных композиций осуществлялось под воздействием УФ излучения. Неразрушающий контроль отверждения полимерных композиций осуществляли оптическими методами (флуориметрии и спектрофотометрии в ближнем ИК (БИК) диапазоне) на основе анализа изменения полос поглощения и спектров люминесценции полимерного слоя при различной продолжительности УФ облучения. Тестирование на герметичность полученных устройств из полимерных материалов проводили гравиметрическим методом после циклического нагрева по программе ПЦР. Методика контроля герметичности микрочиповых устройств была усовершенствована за счет дополнительного учета влагопоглощения полимерных материалов.

**В четвертой главе** приведены экспериментальные результаты, полученные при апробации изготовленных стеклянных и полимерных прототипов микрочиповых устройств при обнаружении кДНК онкомаркера цитокератина-19 с применением специфичных флуоресцентных зондов и праймеров, позволяющих синтезировать фрагменты разной длины.

Проведено исследование материалов и полимерных композиций, используемых для изготовления микрочиповых устройств, с целью оценки их влияния на эффективность ПЦР. Для многократного применения стеклянных микрочиповых устройств, герметизированных полимерными фотоотверждаемыми композициями, определены щадящие химические растворы, позволяющие очистить поверхность реакционных камер после проведения ПЦР-РВ и не оказывающие деструктивного влияния на полимерный соединительный слой.

В **заключении** подводятся итоги работы, перечисляются результаты, на основании которых формулируются основные выводы.

## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1. Актуальность

#### 1.1.1. Микрочиповые устройства

Применение современных технологий изготовления микро- и наноструктур в неорганических и полимерных материалах позволяет разрабатывать микросистемы полного анализа ( $\mu$ 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. [1] Различают несколько типов микрочипов: матричные и микрофлюидные чипы, а также гибридные, сочетающие оба подхода.

В матричных чипах используются процессы гибридизации — связывания с поверхностью химических или биохимических компонентов, обладающих селективной чувствительностью к определяемому объекту. Матричные микрочипы являются высокопроизводительными сверхчувствительными аналитическими микросистемами, созданными на основе технологий молекулярной биологии и микроэлектроники. Они представляют собой набор химически или биологически активных микрозондов (селективно-чувствительных микроструктур) на поверхности пластины при отсутствии подводящих каналов. Основное применение матричных чипов — мультисенсоры для генетического или иммунного анализа.

Микрофлюидные чипы представляют собой миниатюрные устройства с системой микро- и наноразмерных каналов. Микрофлюидные устройства могут содержать различные функциональные и вспомогательные элементы: микроструктуры (электроды, фильтры, колонки), биологические компоненты (осажденные на поверхности белки и ферменты), сложные электромеханические и оптические системы (микросмесители, насосы и клапаны, оптические линзы) и функциональные слои (гидрофобные и гидрофильные покрытия). Стандартные операции на микрофлюидном чипе включают подготовку образца, ввод и дозирование пробы, перемешивание реагентов, химические реакции, (электрофоретическое или хроматографическое) разделение и детектирование. Линейные размеры транспортных и реакционных каналов составляют: от единиц до сотен микрометров в ширину и до десятков миллиметров в длину, что позволяет значительно сократить расход применяемых реагентов, повысить скорость анализа и улучшить эффективность разделения компонентов. Типичный объем проб и реагентов для микрофлюидных систем варьируется от долей пиколитров до нескольких микролитров. Работа со сверхмалыми количествами вещества упрощает процедуру утилизации отходов, что делает применение микрочипов экологически и экономически выгодным.

Возможность автоматизации, управления и полного контроля выполнения основных операций является бесспорным преимуществом аналитических систем на микрочиповой платформе. Становится возможным создание миниатюрных систем экспресс-анализа химических и биологических проб. Конструкция микрочипа позволяет проводить параллельные исследования с множеством проб, что повышает производительность аналитических исследований.

Применение микрочиповых устройств позволяет реализовать новые подходы и методики анализа и создавать приборы с отличными от макроаналогов техническими характеристиками. К ограничениям использования микрочипов в аналитических исследованиях на сегодняшний день можно отнести относительную дороговизну их изготовления, необходимость разработки специальных устройств ввода/вывода пробы (гидравлических интерфейсов), устройств для создания стабильных потоков в микроканалах, а также высокие требования к чувствительности систем для детектирования.

### **1.1.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Для молекулярной диагностики и генетических исследований используются методы амплификации, из которых наиболее распространенным является полимеразная цепная реакция – ПЦР (polymerase chain reaction - PCR). При проведении ПЦР осуществляется синтез заданных фрагментов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в условиях циклического изменения температуры. [2] Высокая чувствительность и специфичность реакции обусловлена самим принципом амплификации – реакция идет только в присутствии определенной последовательности ДНК (молекулы-мишени). Использование ПЦР особенно актуально при анализе исходно малого количества генного материала, при работе с особо опасными патогенами или трудно культивируемыми в лабораторных условиях микроорганизмами, для анализа генетических мутаций или синтеза заданных фрагментов ДНК.

ПЦР широко применяется в различных областях, начиная от научных исследований до криминалистики и сельского хозяйства. Появление метода ПЦР способствовало формированию нового диагностического направления в клинической медицине – молекулярной ДНК-диагностики. Применение методов ПЦР эффективно при ранней диагностике социально-значимых (в том числе инфекционных и онкологических) заболеваний, при обнаружении иммунных патологий и генетических отклонений, при клонировании и секвенировании ДНК в научных исследованиях. Также ПЦР применяют для определения устойчивости организмов к лекарственным препаратам в фармакологии, установлении биологического родства индивидов в судмедэкспертизе, при экологическом мониторинге микробиологического загрязнения окружающей среды, для выявления генетически модифицированных пищевых продуктов и др.

Особенностью ПЦР является специальный температурный режим, который задает условия протекания процессов копирования фрагментов ДНК. Под действием последовательных изменений температуры двухцепочные молекулы ДНК расплетаются («денатурация»), к ним присоединяются праймеры («отжиг»), после чего полимеразы начинают достраивать вторую цепь ДНК из мономеров («элонгация»). В дальнейшем этапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются, и на каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Широкому распространению методов ПЦР в повседневной практике способствовало появление специализированного оборудования для обеспечения циклического температурного режима: программируемых нагревателей, позволяющих автоматически изменять температуру реакционной смеси по заданной циклической программе. Точность воспроизведения заданного температурного режима оказывает существенное влияние на эффективность реакции. Это определяет высокие требования к точности поддержания заданной температуры и равномерности распределения температурных полей нагревателем при амплификации множества проб.

Высокая чувствительность ПЦР требует соблюдения специальных мер при проведении анализа, направленных на то, чтобы избежать загрязнения анализируемой смеси фрагментами ДНК из внешней среды. Термином «контаминация» (от лат. *contaminatio* — загрязнение в результате соприкосновения, смешение) обозначают присутствие в реакционной смеси молекул ДНК, которые не являются анализируемой пробой, но способны стать мишенями для амплификации и повлиять на результат анализа. Основной причиной контаминации является разгерметизация реакционного объема во время или после проведения ПЦР. Так как первоначально регистрацию результатов ПЦР проводили электрофоретическими методами после проведения реакции, когда в анализируемой смеси содержится наибольшее количество определяемых фрагментов ДНК, то разгерметизация реакционного объема приводила к загрязнению окружающего пространства продуктами реакции. Для предотвращения контаминации разработаны специальные правила к организации ПЦР-лабораторий, призванные предотвратить возможность попадания отработанных продуктов реакции в анализируемый раствор [3-5], рекомендованы к применению физические и химические средства для дезактивации нецелевых фрагментов ДНК до и после проведения анализа [6, 7], а также разработаны методики для инактивации фрагментов ДНК, попавших в раствор перед амплификацией [8, 9].

### **1.1.3. Микрочиповые устройства для ПЦР**

Миниатюризация устройств для ПЦР позволяет достичь высокой скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси за счет значительного уменьшения объема в сочетании с высоким соотношением площади поверхности реакционной камеры к объему. Повышение

скорости, равномерности и точности нагрева обеспечивает более эффективные условия для протекания реакции и позволяет существенно уменьшить продолжительность анализа.

Уменьшение объема реакционной камеры позволяет снизить расход реактивов и биологических образцов, а также разместить на одном устройстве большое количество реакционных камер для ПЦР, что позволяет параллельно анализировать большое число образцов. Возможность проведения одновременно нескольких реакций на одном устройстве позволяет получить более достоверные и надежные результаты, а так же проводить исследования, которые сложно или невозможно реализовать на макро-аналогах устройств.

Размещение на микрочипе для ПЦР дополнительных функциональных элементов для выделения и очистки генетического материала способствует созданию аналитических систем, объединяющих все стадии ПЦР анализа (подготовка пробы, амплификация и детектирование результатов реакции) на одном миниатюрном устройстве. Это позволяет исключить ручной труд на этапе подготовки образцов, повысить точность и воспроизводимость манипуляций с объемом пробы, устранить возможность контаминации (заражения образцов продуктами ПЦР) на этапе пробоподготовки. Работа со сверхмалыми объемами упрощает процедуру утилизации отходов, что делает применение микрочипов привлекательным с точки зрения экологической безопасности.

Однако на сегодняшний день существует ряд ограничений, препятствующих широкому распространению микрочиповых технологий для ПЦР в повседневную практику. К ним относятся ограничения, общие для всех микроаналитических систем, и ограничения, связанные со спецификой реакции.

Общим ограничением является высокие требования к точности изготовления микроструктур и чувствительности детектирующей системы, так как уменьшение объема анализируемого вещества приводит к значительному уменьшению интенсивности аналитического сигнала. Для оптических измерений предпочтительными становятся приборы на основе лазер-индуцированной флуоресценции, существенно повышающие общую стоимость аналитической системы.

Другая особенность применения микрочиповых технологий - высокое соотношение площади поверхности к объему реакционной камеры, что увеличивает вероятность побочного (не прогнозируемого) влияния материала поверхности микроструктур на реагенты и анализируемую пробу. При реализации ПЦР на микрочипе взаимодействие между поверхностью и компонентами реакционной смеси может отражаться на эффективности реакции, вплоть до прекращения реакции ПЦР (ингибирования). Исследование причин ингибирования и уточнение механизма взаимодействия компонентов смеси с поверхностью материала является актуальной проблемой. Для предотвращения влияния поверхности

микроструктур на компоненты растворов в аналитической химии применяют процедуры нанесения защитных слоев на поверхности материала (статическая модификация) или введения дополнительных поверхностно-активных компонентов в раствор (динамическая модификация).

Объединение на микрочиповом устройстве для ПЦР систем нагрева и детектирования приводит к усложнению конструкции и удорожанию методов изготовления микрочипа, а высокое соотношение площади поверхности к объему реакционных камер обуславливает сложности при разработке методик регенерации микроустройств с целью проведения многократного анализа. Преодоление этих трудностей способствовало бы более успешному внедрению микрочиповых технологий для ПЦР в повседневную практику, однако до сих пор не существует однозначных решений.

## **1.2. Изготовление микрочиповых устройств**

### **1.2.1. Основные подходы и конструктивные решения при создании микрочиповых устройств для ПЦР**

Одно из первых микрочиповых устройств для ПЦР было предложено в 1993 году группой исследователей под руководством А.Нортрапа. Чип представлял собой кремниевую подложку с миниатюрной реакционной камерой и встроенным нагревательным элементом [10]. На данный момент существует большое количество вариантов микрочиповых устройств для ПЦР, которые можно классифицировать: по способу транспортировки или по принципу нагрева реакционной смеси. [11] Согласно первому варианту классификации, можно выделить два основных подхода к реализации миниатюрных устройств для ПЦР: создание стационарных или проточных (микрофлюидных) реакционных камер. Особо следует выделить способы создания реакционных камер для ПЦР методами «капельной» микрофлюидики. Применение капель жидкости в качестве отдельных реакционных камер широко используется в современных микрофлюидных системах, в том числе и в стационарных и в проточных микрочиповых системах для ПЦР.

#### **Стационарные реакционные камеры для ПЦР**

Первые микрочипы для ПЦР имели стационарные реакционные камеры, в которых ПЦР происходит за счет последовательного циклического изменения температуры от нагревательного элемента. Такие камеры являются микро-аналогом уже существующих пробирок или планшетов для ПЦР. Миниатюризация реакционных камер позволяет достичь высокой скорости нагрева и охлаждения за счет значительного уменьшения объема нагреваемой жидкости, что также способствует снижению расхода реактивов и биологических образцов и позволяет разместить на одном устройстве большое количество реакционных камер для одновременного проведения ПЦР. Например, микрочипы серии Dynamic Array (Fluidigm,

США) содержат от 2 до 9 тысяч отдельных реакционных камер для ПЦР объемом около 10 нл, заполнение которых осуществляется под давлением. [12] В пластинах для ПЦР OpenArray® (Applied Biosystems™, США [13]) сделано 3072 цилиндрические реакционные камеры объемом 33 нл, которые заполняются жидкостью за счет капиллярных сил. Во всех этих устройствах эффекты микрофлюидики используются только при заполнении, а в процессе термоциклирования движение жидкости не осуществляется. Следовательно, эти устройства можно отнести к системам со стационарными реакционными камерами.

В микрочиповых устройствах миниатюризация реакционных камер помимо непосредственного уменьшения объема позволяет увеличить площадь контакта жидкости с нагревательной поверхностью и за счет этого дополнительно увеличить скорость и однородность теплообмена. Также можно организовать расположение нагревательных элементов на микрочиповом устройстве вблизи реакционных камер, что приводит к уменьшению общей массы нагреваемых элементов и увеличению скорости термоциклирования.

Однако скорость изменения температуры в стационарных камерах ограничена в первую очередь временем изменения температуры в пределах одного цикла, что определяется характеристиками используемого нагревателя и нагреваемого объема. Для преодоления этих ограничений разрабатываются скоростные миниатюрные нагреватели [14] или предлагаются альтернативные высокоскоростные методы нагрева жидкости (ИК-нагреватели, лазеры). [15]

Применение предельно малых объемов реакционных камер (например, десятки пиколитров) приводит к тому, что скорость нагрева и охлаждения ограничена не объемом, а тепловой инерцией стенок реакционной камеры. В качестве преодоления этой проблемы П. Нейжил с соавторами в 2006 году предложили оригинальную модификацию стационарных камер – создание «виртуальных камер» для ПЦР, когда капля реакционной смеси расположена внутри капли минерального масла. [14, 16] Применение «виртуальных камер» позволило существенно увеличить скорость ПЦР за счет уменьшения термической массы системы, состоящей из микрообъема реакционной смеси и тонкого слоя минерального масла. Использование «виртуальных камер» позволяет транспортировать анализируемый объем для дальнейших манипуляций с продуктом ПЦР, что необходимо при создании сложных интегрированных систем для генетического анализа. Недостатком «виртуальных камер» является высокая вероятность контаминации из-за нестабильности и проницаемости масляной оболочки для компонентов смеси, однако разработка и применение специализированных полимерных и масляных смесей позволяет преодолеть эти ограничения.

Достоинствами стационарных камер являются: простота изготовления и эксплуатации, возможность применения традиционного оборудования для ПЦР с плоским нагревателем. Подобный подход привлекателен для проведения на одном устройстве многочисленных

однотипных реакций. Недостатками стационарных камер являются: низкая скорость термоциклирования, сложности при сочетании на микрочипе стационарных камер с другими методами анализа (например, электрофоретическим разделением продуктов ПЦР). Увеличение скорости нагрева и охлаждения при сохранении однородности температурных полей в реакционной камере является основной проблемой функционирования стационарных реакционных камер.

### **Проточные реакционные камеры для ПЦР**

Вторым подходом к реализации микрочиповых устройств для ПЦР является создание проточных (микрофлюидных) камер-каналов. Микрочип с проточными камерами разделен на области, в каждой из которых поддерживается постоянная температура, соответствующая этапам ПЦР. Реакционная смесь двигается по каналу и последовательно проходит несколько температурных зон. Благодаря высокому соотношению площади поверхности к объему микроканала изменение температуры реакционной смеси происходит с минимальной инерционностью и зависит только от характеристик потока.

Впервые подобный подход был предложен Накано с сотрудниками в 1994 году [17], а первый микрочип с змеевидным каналом, проходящим через три нагревательных блока был продемонстрирован в 1998 году М.Коппом с соавторами [18]. В 2005 году Ю. Хиаю с соавторами продемонстрировал полимерный чип со спиральным каналом, расположенным вокруг нагревательного элемента. [19] Однако в проточные реакционные камеры в форме спирального или серпантинного канала сложно реализовать для одновременного анализа большого количества проб, а многократное применение микрочипов с камерами-каналами ограничено, так как сложная форма и большая длина, а также малые геометрические размеры сечения канала усложняют процесс очистки и регенерации поверхности реакционной камеры.

Альтернативный вариант микрофлюидного чипа с тремя разнесенными температурными зонами и одним линейным каналом был предложен в 2003 году М. Бу с соавторами [20]. В этом микрочипе реакционная смесь под действием встроенной мембраны многократно проходила по каналу в двух направлениях. В 2005 году был реализован вариант микрочипа с множеством линейных каналов, что позволило проводить одновременную амплификацию нескольких проб.[21].

Преимуществами проточных камер являются: высокая скорость теплообмена, что значительно сокращает продолжительность анализа, а также возможность интеграции проточных камер с другими устройствами на микрочипе. К недостаткам можно отнести: сложность при реализации одновременной амплификации большого числа проб, необходимость применения вспомогательных систем и оборудования. Эффективность ПЦР напрямую зависит

от скорости перемещения реакционной смеси и длины канала в термической зоне. Поэтому в первую очередь необходимо обеспечить создание стабильных, регулируемых высокоскоростных потоков в каналах, однако трудности возникают из-за малых размеров сечения канала. Применение внешних или встраиваемых (интегрированных в микроустройства) насосов повышает общую стоимость системы, к тому же гидравлический поток имеет параболический профиль, что может привести к размытию пробы. В обзоре [22] рассмотрены альтернативные методики по созданию и управлению микропотоками, например применение жидкостей с магнитными частицами («феррофлюидные» микрочипы для ПЦР) или электрокинетических способов управления потоками.

Другим недостатком проточных камер является адсорбция компонентов смеси на стенках канала, а также образование пузырьков воздуха при вводе (загрузке) жидкости и нагревании, что неблагоприятно сказывается на эффективности ПЦР. Однако эти недостатки можно преодолеть, используя жидкость-носитель на основе масла, в которой содержатся маленькие капли реакционной смеси.

### **ПЦР в капле**

Основным принципом цифровой микрофлюидики является концепция раздробление анализируемой жидкости на множество отдельных независимых объемов (микрокапель), каждый из которых содержит все необходимые компоненты реакции и является, по сути, отдельной закрытой реакционной микрокамерой. Эта концепция перспективна для применения в различных областях исследований, при этом в зависимости от целей эксперимента и объема генерируемых капель в них могут содержаться не только молекулы, но и такие биологические объекты как вирусы, бактерии, клетки организмов.

Генерация капель может производиться под действием ультразвука (от 0,1 до 2 кГц), либо с применением микрофлюидных технологий. [23] Оболочка капли должна быть непроницаемой для компонентов реакции при циклическом нагреве по программе ПЦР. Первоначально недостатком «виртуальных камер» для ПЦР являлась высокая вероятность контаминации из-за нестабильности и проницаемости масляной оболочки для компонентов смеси. Однако современные достижения в области химии позволили создавать специальные смеси на основе масла или органических полимеров, которые остаются стабильными в условиях ПЦР. [24]

Применение капель в качестве отдельных реакционных камер позволяет преодолеть недостатки существующих подходов для проведения ПЦР. В стационарных микрочипах создание «виртуальных камер» для ПЦР значительно уменьшает термическую массу системы и дает возможность манипулировать с отдельными образцами (каплями) до и после реакции амплификации, что способствует объединению стационарных камер для ПЦР с другими

функциональными элементами микрочиповых устройств. В проточных микрочипах применение капель реакционной смеси в жидкости-носителе позволяет избежать адсорбции компонентов смеси на стенках канала и проводить непрерывную амплификацию большого количества отдельных микрообъемов-капель.

Интеграция на микрочиповом устройстве средств генерации и управления каплями способствует объединению всех стадий анализа на одном устройстве: ввод пробы и реагентов, разбитие раствора на капли, амплификации в каждой капле, транспортировка и сортировка капель для дальнейших манипуляций с образцом, причем при необходимости можно реализовать слияние капель. Однако создание миниатюрных интегрированных систем может привести к усложнению конструкции микрочипа, что отражается на стоимости устройства.

### **1.2.2. Топология микрочипового устройства для ПЦР**

Топология аналитического микрочипа (состав, взаимосвязь и размеры функциональных микроструктур) в основном определяется теми стадиями анализа пробы, которые необходимо реализовать в процессе исследования. В большинстве случаев обязательными являются: ввод и дозирование пробы, ее транспортировка к различным участкам чипа, разделение (сепарация) на компоненты и слив отработанного продукта. Для ввода и управления потоками жидкости применяются следующие методы: электрокинетический, гидростатический и гидродинамический. Наиболее технологичным и автоматизируемым считается электрокинетический, но его использование подразумевает необходимость выбора режимов управления, буферного раствора, контроля и учета возможных химических и электрохимических реакций

Соответственно, простейший аналитический микрочип для ПЦР в общем случае имеет резервуары, систему транспортных каналов, реакционную камеру, в которой происходит амплификация. Для герметизации реакционной камеры можно предложить два основных подхода: 1) создание открытых реакционных камер, герметизация которых осуществляется после введения жидкости (реакционной смеси), например, минеральным маслом (аналог виртуальных камер), 2) создание закрытых реакционных камер, ввод жидкости в которые происходит через систему входных/выходных отверстий или каналов, которые после использования герметизируются.

Первый вариант камер является простым в реализации, масло может служить демпферным слоем при изменении давления внутри реакционной камеры во время термоциклирования, проницаемость масляной оболочки для газов позволяет устранить условия для образования пузырей воздуха. Однако недостатком минерального масла является его нестабильность и потенциальная проницаемость для продукта реакции, что может привести к контаминации или разгерметизации реакционной камеры при проведении ПЦР. Это

преодолевается путем введения в масляный слой дополнительных компонентов, включающих ПАВ и полимерные композиции. [24]

Второй вариант камер является традиционным для микрофлюидных устройств и подразумевает наличие входных и выходных отверстий или каналов. После введения реагентов эти отверстия и каналы необходимо надежно герметизировать, для чего применяются: традиционные средства для ПЦР-планшетов (скотчи для ПЦР, фольги с адгезивом), водонепроницаемые вязкие среды (минеральные масла, парафины и др) или специальные конструктивные решения (встроенные мембраны или клапаны). [25]

### **1.2.3. Выбор материала и формирование микроструктур**

Методы формирования микро- и наноразмерных структур в первую очередь зависят от применяемого материала. Традиционными материалами первых микрочиповых устройств были кремний, кварц и различные марки стекол. Применение полимерных материалов позволило снизить себестоимость изготовления и приблизить перспективы массового производства микрочипов.

#### **Кремний**

Считается, что первое микрочиповое устройство для ПЦР было предложено в 1993 году группой исследователей под руководством А.Нортрапа. Чип представлял собой кремниевую подложку с миниатюрной реакционной камерой и встроенным нагревательным элементом. [10] Использование кремния для создания ПЦР микрочипов обусловлено его высокой теплопроводностью (примерно 160 Вт/(м·°C)). Были отработаны методы нанесения металлических покрытий на поверхность кремния, что позволило создавать микрочипы со встроенными нагревателями и сенсорами. Однако необработанная поверхность кремния ингибирует или значительно снижает эффективность ПЦР, а электропроводность и оптическая непрозрачность материала не позволили реализовать оптические и электрофоретические методы анализа продуктов ПЦР на микрочипе.

Для преодоления этих ограничений были разработаны гибридные устройства на основе двух материалов: кремния (для нагрева) и стекла (для детектирования). Разработке первых гибридных микрочипов для ПЦР из кремния и стекла были посвящены работы Л.Криска [26, 27]. Однако для этих устройств также необходимо проведение дополнительных операций по предотвращению ингибирования ПЦР кремниевой поверхностью (например, окисление поверхности или нанесение полимерных покрытий), а высокая теплопроводность кремния обуславливает большие тепловые потери во время эксплуатации, что подразумевает наличие термоизоляции и усложнение конструкции микрочипа.

## Стекланные материалы

Применение стекланных микрочипов для ПЦР получило более широкое распространение благодаря диэлектрическим и оптическим свойствам стекланных материалов. Стекланные материалы хорошо изучены, поверхность стекла более инертная по сравнению с кремнием, а большой выбор марок стекол позволяет найти материал с требуемыми свойствами. Значение коэффициента теплопроводности стекланных материалов зависит от марки стекла и меняется в интервале от 0,5 до 1,3 Вт/(м·°С), что вполне достаточно для передачи тепла от нагревателя к реакционной камере и обеспечения температурного режима при ПЦР. Для стекланных материалов разработаны методы очистки и модификации поверхности, что позволяет создавать микрочиповые устройства для многократного применения.

Для стекланных, кварцевых и кремниевых материалов хорошо отработаны технологии создания микроразмерных структур любой формы с шероховатостью до нескольких десятков нанометров. Основные методы обработки кремниевых и стекланных материалов приведены в работе [15]. Наиболее распространенной технологией формирования микроразмерных структур в стекланных и кремниевых материалах является метод фотолитографии и травления. Преимуществами этого метода являются: детальная отработка технологии (для кварца и ряда марок стекол), возможность задавать произвольную топологию структур на этапе фотолитографии, дополнительная очистка микроструктур в процессе изготовления. Травление условно разделяют на жидкостное (под действием кислоты или щелочей) или сухое (ионно-лучевое, плазменное и др.). Особенности жидкостного травления является изотропность (за исключением кремния), боковое подтравливание (трапецеидальное сечение микроструктур), однако в случае изготовления реакционных камер для ПЦР это не оказывает существенного влияния.

Фотолитографические маски изготавливаются на стекле с высокой оптической однородностью и различаются покрытием: эмульсионные, с покрытием из хрома, с покрытием из окиси железа. При использовании фотошаблона осуществляется экспонирование под УФ-излучением (Рисунок 1.1). Далее следует стадия проявления, в результате которой формируется рисунок заданной топологии. После промывки и сушки фоторезиста следует процесс травления маски, затем снова – промывка и химическое удаление фоторезиста. Полученная заготовка помещается в подогреваемую ванну, где осуществляется кислотное травление кремния или стекла. Поддержание выбранной температуры позволяет контролировать процесс травления и обеспечивает получение заданных размеров микроструктур. После травления снова следует промывка и подготовка поверхности для герметизации – соединение с защитной пластиной (Рисунок 1.1).

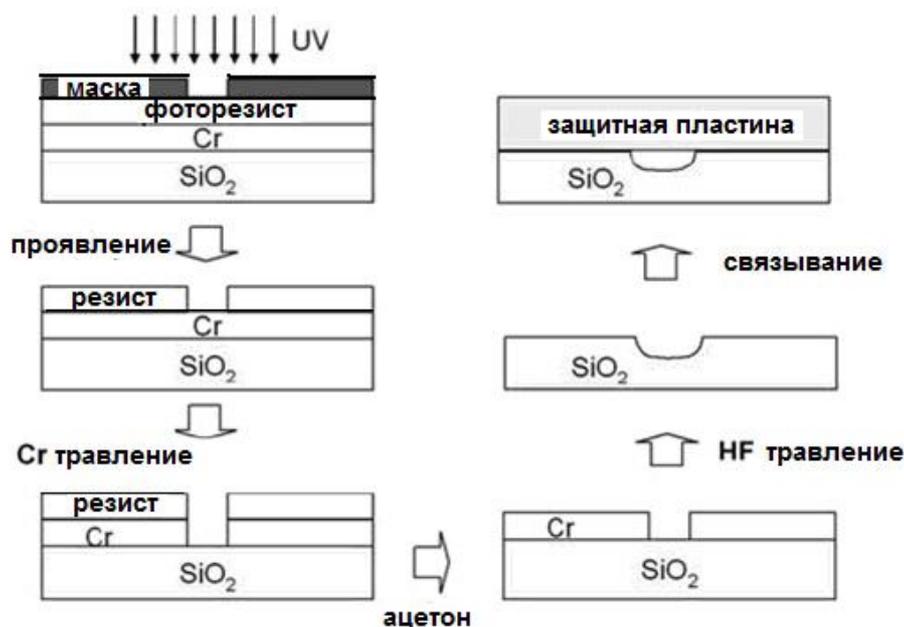


Рисунок 1.1 Основные стадии получения микрочипа методами фотолитографии и жидкостного (кислотного) травления.

Ограничением использования стекляннокремневых подложек для изготовления микрочиповых устройств считается относительная высокая себестоимость исходного материала. К тому же технологии создания подобных микрочипов трудоемки, требуют специального оборудования, применения агрессивных сред и занимают достаточно много времени. Одним из способов снижения стоимости анализа на микрочиповом устройстве из стеклянных материалов является его многократное использование, для чего необходимо разработать методы очистки поверхности реакционных камер после проведения ПЦР. Для однократного использования гораздо целесообразнее использовать устройства на основе полимерных материалов. Однако кремний и стеклянные материалы остаются востребованными в микроаналитических системах, в которых предъявляются повышенные требования к аналитическим характеристикам.

### Полимерные материалы

В последние годы наблюдается устойчивая тенденция применения полимерных материалов при создании микрочипов для ПЦР. Полимерные материалы обладают значительно более низкой себестоимостью по сравнению с кремнием или стеклом и относительно низкой стоимостью изделия при массовом производстве. Это позволяет создавать микрочиповые устройства однократного применения, что оправдано при массовом анализе биологического материала. Широкий ассортимент полимеров с разными свойствами позволяет подобрать

требуемое сочетание химических и физических свойств материала, например теплопроводность, химическую стойкость, твердость, диэлектрическую проницаемость и другие характеристики, необходимые для микроаналитического устройства. Ограничением использования полимерных микрочипов часто является химическая несовместимость полимера с органическими растворителями или органическими компонентами растворов. Полимерные материалы обладают невысокой теплопроводностью ( $0.1 \div 0.3$  Вт/(м·°C)) и обычно не выдерживают высоких температур. Наиболее часто применяют следующие термопластичные полимеры: поликарбонат (ПК), полиметилметакрилат (ПММА), полиэтилентерефталат (ПЭТ), полистирол (ПС), полипропилен (ПП), а также кремнийорганические полимерны на основе полидиметилсилоксана (ПДМС), фоторезист Su-8 и др. [28] Сравнение некоторых полимерных материалов приведено в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 Свойства основных полимерных материалов, применяемых для изготовления микрочипов

Материалы	Сокращенное обозначение	T размягчения по Вика	Хим. стойкость	Адсорбция воды (%)	Коэф. темп. расширения ( $10^{-6} \text{ C}^{-1}$ )
Поликарбонат	ПК	150	+	0,12-0,34	60-70
Полиметилметакрилат	ПММА	85-105	+	0,3-0,6	70-150
Полиэтилентерефталат	ПЭТ	130	++	0,1-0,33	48-78
Полипропилен	ПП	160	+	0,10	100-200
Полидиметилсилоксан	ПДМС	-	+	0,1	960

Поликарбонат (ПК) — термопластичный линейный полимер, характеризуется высокой прочностью, хорошими диэлектрическими и механическими свойствами. ПК оптически прозрачен, имеет температуру стеклования  $150^{\circ}\text{C}$ , устойчив к действию кислот, растворов солей, окислителей, но подвержен растворимости в большинстве органических растворителей.

Полиметилметакрилат (ПММА) – оптически прозрачный полимер, имеет температуру стеклования  $\sim 110^{\circ}\text{C}$ , обладает высокой прочностью, устойчив к кислотам, щелочам, маслам. Хорошо поддается различным видам обработки.

Полиэтилентерефталат (ПЭТ) – хороший диэлектрик, оптически прозрачен. Для ПЭТ, несмотря на аморфное строение, характерна высокая жесткость, прочность и ударная вязкость. Стоек к действию кислот и щелочей. Имеет температуру стеклования  $69^{\circ}\text{C}$ , что ограничивает его применение при изготовлении реакционных камер для ПЦР.

Полидиметилсилоксан (ПДМС) – эластомерный материал, обладающий хорошей оптической прозрачностью, который также применяют для модификации кремния и стекла с целью снижения адсорбции компонентов реакционной смеси для ПЦР на поверхности микроструктур. Для преодоления гидрофобности и незначительной пористости материала обычно требуются дополнительные химические и физико-химические способы обработки.

Полимер SU-8 — это негативный фотополимер, специально разработан для микроэлектроники. Методами УФ-литографии в нем могут быть сформированы микроструктуры с аспектным соотношением (глубина/ширина) до 25. Полимер имеет температуру стеклования 210°C, устойчив к кислотам, щелочам, большинству растворителей.

Для полимеров разработано множество доступных технологий формирования микроструктур. [29-31] При создании полимерных чипов применяют различные технологии формирования микроструктур: прямого изготовления (лазерная абляция, литография и т.п.); с применением масок и шаблонов (рентгеновская литография, плазменная обработка, фоторезисторы) и традиционные технологии с использованием мастер-форм (тиснение, литье, штамповка, формование и др.) (Рисунок 1.1). Выбранный метод изготовления для каждого полимера определяет минимальные размеры получаемых структур и аспектное соотношение (соотношение высоты (глубины) к ширине) микроструктур. Также полимерные материалы могут также подвергаться следующим видам обработки: фрезерование, сверление, нарезка резьбы, механическая и лазерная резка, сварка, шлифование и др.



Рисунок 1.2 Основные стадии и процессы изготовления микрочипов из полимерных материалов.

Термоформование является одним из наиболее распространенных видов обработки и применимо для большинства термопластичных полимеров: поликарбонат, полистирол,

поливинилхлорид, полиметилметакрилат и др. Известно несколько разновидностей термоформования: вакуумформовка, пневмоформовка, пневмовакуум-формование, вытяжка свободная и с пуансоном, штамповка и пр. [32] Все эти разновидности объединяет то, что формование изделий осуществляется не из расплава, а из заготовок материала (листа, пленки), нагретых до размягченного состояния. После формовки размягченного материала (вдавливании мастер-формы, сгибания, втягивания под давлением и др.) следует охлаждение изделия при сохраняющемся усилии формования. Охлажденный полимер вновь приобретает первоначальную жесткость, сохраняя приданную ему форму. [33]

Наиболее перспективным является применение лазерной абляции (ЛА) для формирования микроструктур в полимерных материалах. Подробно эффект лазерной абляции рассмотрен в работе [34]. Удаление материала подложки осуществляется испарением и выносом массы вещества, процесс по своей природе является термическим. Глубина проникновения лазерного излучения в материал подложки зависит от характеристик лазерного излучения (длина волны, частота, мощность, скорость перемещения лазерного луча) и оптических свойств материала (показателя преломления и коэффициента поглощения).

В последнее время разрабатываются методы управления химическими и физическими характеристиками органических полимеров, что позволяет создавать микроструктуры с заданными свойствами, такими как гидрофобность, отражательная способность, шероховатость, степень окисления и упорядоченность структуры материала. [35] Основные свойства полимеров, важные для микрофлюидных устройств, такие как прочность, поверхностный заряд, молекулярная адсорбция, электроосмотическая подвижность и оптическая прозрачность, необходимо контролировать как при создании, так и при апробации устройств.

#### **1.2.4. Способы герметизации микроструктур**

В простейшем случае конструкция микрочипа представляет собой две или несколько пластин, герметично соединенных между собой. Если одна из пластин имеет сеть травленных, выплавленных или тисненых открытых каналов, то другая обычно является защитной и обеспечивает формирование закрытых каналов (герметизацию). Способы соединения пластин микрочипа зависят от применяемого материала. Герметизация структур в стеклянных микрочипах может выполняться методом термического или анодного связывания, склеивания, методом глубокого оптического контакта. [15] Более простыми являются способы герметизации микрочипов из полимерных материалов. Широко применяется спекание, плазменная обработка, склеивание, ламинирование, ультразвуковая сварка и др. [36] Многообразие методов соединения пластин можно условно разделить на методы герметизации в условиях высоких и низких температур.

Процесс герметизации при высоких температурах называется термическим связыванием или спеканием и заключается в нагреве и выдержке соприкасающихся пластин при определенной температуре. Интервал температур, применяемых для термического связывания зависит от применяемых материалов и составляет от 400 до 1050°C для стеклянных материалов, а для полимерных материалов обычно не превышает 250°C. Термическое связывание позволяет получить неразъемное соединение, прочность которого близка к прочности самого материала. Качество полученного соединения зависит от скорости нагрева, давления, длительности соприкосновения поверхностей, а также от качества и чистоты поверхности соединяемых пластин. [37] При герметизации кремниевых и стеклянных пластин микрочипа помимо повышенных температур применяют дополнительные физические воздействия, например спекание под давлением или в присутствии электрического тока (метод анодного связывания). В методах анодного связывания используются более низкие температуры от 70 до 500°C и напряжения от 50 до 1200 В.

К температурным методам соединения можно также отнести метод глубокого оптического контакта (ГОК). Это технология соединения стеклянных и кварцевых пластин без промежуточного слоя. Соединение чистых полированных поверхностей осуществляется под действием сил межмолекулярного сцепления (оптический контакт, ОК) в сочетании с усиливающим этот эффект химическим взаимодействием поверхностных слоев при нагреве на 250°C (глубокий оптический контакт, ГОК). Этот метод используют вместо склеивания, когда необходимо исключить влияние клеящего слоя на оптические характеристики сборки. При этом соединяют детали не только из одной марки стекла, но и разнородные по химическому составу. Прочность ГОК зависит от площади соединяемых деталей. [38]

К недостаткам методов термического связывания можно отнести трудоемкость, необходимость использования специального оборудования и высокие требования к качеству соединяемых поверхностей. [39] Так как высокотемпературный нагрев может повредить материал функциональных элементов, то в последнее время активно развиваются технологии герметизации при низких температурах, однако пока их применение для изготовления устройств для ПЦР не столь широко.

Методы герметизации при низких температурах были развиты в связи с тем, что высокие температуры не позволяют проводить герметизацию пластин с электродами и термочувствительными элементами. Для соединения кремниевых или стеклянных пластин применяют пайку эвтектическим сплавом [39], соединение с помощью жидкого стекла [40], при герметизации некоторых полимерных материалов применяется плазменная обработка одной или двух поверхностей перед герметизацией [41]. Недостатком плазменной обработки, как и

обработки при высоких температурах, является риск повреждения интегрированных функциональных элементов.

Использование клеевых композиций позволяет соединять широкий спектр различных материалов. При склеивании соединение поверхностей осуществляется за счет сил межмолекулярного взаимодействия (адгезии) между материалом подложки и полимерным слоем (адгезивом). Качество клеевого соединения зависит от природы соединяемых деталей и свойств их поверхностей, а также от свойств используемого клея (вязкости, типа химического соединения и механизма отверждения). В промышленности имеется широкий ассортимент марок клеев, что позволяет выбрать материал с требуемыми свойствами. Традиционно для соединения материалов разной химической природы используют клеи на основе эпоксидных полимеров, полиуретановых форполимеров, полиарилатов, каучуков и др. Обычно склеивание не требует высоких температур или давлений, является нечувствительным к чистоте и шероховатости поверхности подложки (при условии, что неровности поверхности меньше толщины клеевого слоя), позволяет соединять пластины с разнообразными функциональными покрытиями.

В зависимости от механизма изменения вязкости при отверждении оптические клеи подразделяют на [38]:

- термопластичные (клеи-расплавы, отвердевающие при остывании);
- клеи-растворы (отвердевающие при испарении растворителя);
- полимерные композиции, отверждающиеся в результате протекания химической реакции (полимеризации, поликонденсации и др.), инициируемой при нагревании, световом воздействии и пр.

Применение полимерных композиций, в том числе фотоотверждаемых, позволяет в лабораторных условиях оперативно герметизировать микроструктуры с термочувствительными элементами. [42] Однако в этом случае необходимо учитывать физико-химические особенности получаемого связующего слоя, так как это оказывает существенное влияние на характеристики микрочипа и может влиять на эффективность реакции ПЦР за счет адсорбции компонентов реакционной смеси.

К недостаткам классического склеивания можно отнести сложность получения равномерной и постоянной по толщине клеевой пленки, а также риск засорения адгезивом функциональных элементов микрочипа (каналов, фильтров, гелей). Альтернативой склеиванию является соединение пластин с помощью двухсторонних клейких лент (скотчей), однако часто такие скотчи имеют толщину, соизмеримую с размерами микроструктур, а также в ряде случаев не предназначены для нагрева или эксплуатации во влажной среде.

Особенностью ПЦР является то, что некоторые материалы, применяемые для создания микрочипов, могут влиять на ход реакции, например, адсорбировать компоненты реакционной смеси (кремний, хром), впитывать жидкость (пористые материалы) или выделять какие-либо компоненты в реакционную смесь при нагреве (скотчи, эпоксидные смолы). Среди методов герметизации можно условно выделить две группы: 1) с применением адгезионных материалов в качестве промежуточного слоя (клеи, полимерные композиции, скотчи), основанные на создании сильной связи между адгезивом и соединяемыми материалами; 2) непосредственное соединение применяемых материалов, обычно под действием физических или химических воздействий, например: спекание, анодное связывание, глубокий оптический контакт - для стеклянных материалов, и ламинирование, химическая сварка, плазменная обработка и др - для полимерных материалов. Во второй группе допускается, что свойства материалов в области соединения могут отличаться от свойств материала в основном объеме, однако эти отличия незначительны и не должны оказывать влияния на ПЦР. В случае применения методов герметизации с образованием промежуточного слоя обязательными являются исследования влияния применяемых адгезивных материалов на эффективность ПЦР.

### **1.2.5. Обработка поверхности полимеров для создания функциональных слоев**

Большинство доступных полимерных материалов обладает гидрофобными свойствами (плохо смачиваются водой и растворителями), характеризуется низкими значениями поверхностной энергии, что создает определенные трудности при заполнении растворами каналов и реакционных камер микрофлюидных чипов. Отсутствие на поверхности полимерных материалов активных реакционно-способных функциональных групп является причиной низкой адгезии при иммобилизации на поверхности полимера функциональных слоев. Все это вызывает необходимость модификации поверхности полимеров для повышения ее гидрофильности и поверхностной активности.

Экспериментальным критерием оценки гидрофильных свойств поверхности является величина краевого угла (угла смачивания). Основываясь на измерениях краевого угла для полярной и неполярной жидкостей, можно рассчитать величину поверхностной энергии. Одним из экспрессных и информативных способов измерения угла смачивания при исследовании поверхностных свойств твердых тел, а также поверхностных свойств жидкостей является метод лежащей капли. [43] Наличие функциональных групп на поверхности после обработки можно также оценить методами ИК-спектроскопии. [45]

Для обработки поверхности полимерных материалов применяются физические и химические методы, а также разнообразные их сочетания. Химическая модификация поверхности предполагает химические превращения поверхностных функциональных групп, не

затрагивающие основной объем. [45] Полимерным макромолекулам присущи все химические реакции, характерные для их низкомолекулярных аналогов. Поэтому при такой модификации используют известные химические реакции по функциональным группам или активным центрам в макромолекулах на поверхности полимера. Физические методы обычно связаны с применением лазерного излучения, плазменной обработки, температурных воздействий и т. д. [46-48] Эти методы в некоторых случаях могут приводить к изменениям в химическом составе поверхности за счет удаления или добавления материала, а также проведения химических реакций (например, в плазме). Некоторые химические и физико-химические способы модификации поверхности полимера на примере полиметилметакрилата (ПММА), подробно рассмотрены в совместной работе [49].

### **Химические методы обработки**

Среди возможных химических способов получения гидроксильных групп на поверхности ПММА наиболее изученными и простыми в реализации являются реакция гидролиза сложных эфиров карбоновых кислот в кислой среде и реакция гидрирования сложных эфиров карбоновых кислот. [50] Например, в работе [51] реакция гидролиза в кислой среде была использована для модификации поверхности ПММА при изготовлении микрочипов. После 20 минут обработки 3 М раствором серной кислоты при 60°C было достигнуто уменьшение величины контактного угла для капли воды с  $76^\circ \pm 4^\circ$  - для необработанного материала до  $69^\circ \pm 1^\circ$  – после модификации, что свидетельствует о повышении гидрофильности поверхности. Подробно схема реакции гидролиза поверхности ПММА в кислой среде изложена в работе [49].

Раствор смеси перекиси водорода (30% раствор) и концентрированной серной кислоты в различных соотношениях (называемый, «пиранья») [52] обладает сильной окислительной способностью и, как правило, применяется в микро и нано- технологиях для удаления с поверхности органических загрязнений, а также модификации поверхности, (например, для придания поверхности ПДМС гидрофильных свойств).

В работе [53] для повышения степени гидрофильности поверхности было предложено использовать обработку ПММА в щелочной среде. При этом установлено, что применение спиртового раствора щелочи в 50% этаноле, а также обработка в условиях повышенной температуры (до 110°C) способствует уменьшению продолжительности обработки.

### **Физические методы обработки**

Плазменная обработка поверхности в газовой среде является широко распространенным способом модификации поверхности полимеров. Изменение свойств поверхности

осуществляется под воздействием ионов с высокой энергией, химически активных частиц и фотонов, генерируемых при разряде. Наблюдаются процессы очистки поверхности, абляции, химической функционализации и др. [54] Достижимые эффекты при плазменной обработке зависят от различных параметров, таких как вид плазмы (при постоянном токе, радиочастотная, микроволновая), плотность мощности разряда, давление, скорость потока газовой смеси в камере и время обработки. Плазменная обработка полимеров в среде инертных газов (например, He и Ar) эффективна для создания свободных радикалов и не добавляет новых химических функциональных групп из газовой фазы, а обработка в среде O<sub>2</sub> или H<sub>2</sub>O используется для создания полярных функциональных групп, которые могут значительно увеличить свободную энергию поверхности полимера. [55] Основное преимущество методов плазменной модификации поверхности связано с тем, что достигается однородная обработка поверхности, а глубина модифицируемого слоя составляет несколько нанометров.

Обработка ультрафиолетовым (УФ) излучением при низком давлении рабочего газа позволяет направленно изменять физико-химические свойства поверхности ПММА, не затрагивая при этом свойств материала полимера в объеме и не вызывая заметного нагрева полимера. [56]

### **1.3. Особенности проведения ПЦР на микрочиповом устройстве**

#### **1.3.1. Детектирование продукта полимеразной цепной реакции**

Первоначально регистрацию продуктов реакции проводили после окончания ПЦР электрофоретическими методами или методами гибридизации со специальными зондами, мечеными радиоактивной меткой. Основным недостатком этого подхода является необходимость разгерметизации реакционного объема после проведения ПЦР, что повышает вероятность контаминации. Благодаря применению флуоресцентных красителей и развитию технологий синтеза последовательностей нуклеиновых кислот с флуоресцентными красителями («зондов») стало возможным оценить накопление продуктов амплификации по увеличению интенсивности флуоресцентного сигнала, возникающего при взаимодействии зондов с синтезируемым продуктом реакции. Это позволило регистрировать результат реакции с применением оптических методов детектирования без разгерметизации реакционного объема. Первоначально по аналогии с методами классической ПЦР детектирование сигнала флуоресценции проводилось по окончании реакции. Однако регистрация флуоресценции во время протекания реакции позволяет получить более точную информацию об исходной концентрации анализируемой пробы. Этот метод называется «ПЦР в режиме реального времени» или ПЦР-РВ.

Метод ПЦР-РВ основан на применение флуоресцентных зондов. Увеличение интенсивности сигнала флуоресценции от зондов пропорционально накоплению

синтезируемого продукта реакции. Различают специфичные и неспецифичные флуоресцентные зонды для ПЦР-РВ. Неспецифичные зонды вызывают повышение сигнала флуоресценции при связывании молекул красителя с молекулами ДНК, состоящими из двух цепочек. Специфичные зонды содержат нуклеотидную последовательность, комплементарную анализируемому фрагменту ДНК, что обеспечивает избирательное действие зонда и дополнительный контроль специфичности реакции. Одновременное применение нескольких зондов, специфичных разным фрагментам ДНК и связанных с разными красителями, позволяет регистрировать продукт реакции от нескольких ДНК-мишеней («мультиплексная ПЦР»). Более подробно принципы действия зондов рассмотрены в [57].

Изменение интенсивности флуоресценции на каждом цикле ПЦР позволяет оценить исходную концентрацию молекул–мишеней ДНК, анализируя кинетическую зависимость сигнала флуоресценции (следовательно, накопления продуктов реакции) от количества циклов ПЦР и сравнивая эти данные с градуировочными зависимостями от стандартов, концентрация которых была известна заранее. При этом получение градуировочной зависимости должно проводиться в тех же условиях, что и ПЦР с анализируемой пробой, так как существует много факторов, которые могут повлиять на эффективность ПЦР и величину порогового цикла. При использовании градуировочных зависимостей для ПЦР существует ряд ограничений, например: 1) длина фрагмента ДНК, используемого для построения градуировочной зависимости, должна быть примерно равна длине анализируемого фрагмента; 2) серия многократных разведений должна охватывать все возможные концентрации исследуемого образца; 3) при малых концентрациях (менее  $10^3$  молекул/мкл) погрешность измерения значительно увеличивается, так как начинают проявляться влияния таких мешающих факторов как присутствие ингибиторов, низкая эффективность амплификации на начальных этапах реакции, в результате чего градуировочная зависимость в этой области может принимать нелинейный характер.

Для регистрации наиболее распространенных флуоресцентных красителей для ПЦР-РВ (Таблица 1.2) обычно применяют лазерные источники излучения с длинами волн возбуждения: 473 нм или 488 нм (для красителей FAM, SYBRE Green), 532 нм (HEX, Cy3), 594 нм (ROX), 633 нм (Cy5) (например, лазерные сканеры биочипов серии ScanArray фирмы PerkinElmer, LuxScan фирмы CapitalBio, InnoScan и др). Следовательно, при изготовлении микрочиповых устройств для ПЦР необходимо использовать оптически прозрачные материалы в диапазоне от 450 до 750 нм и обладающие низкой фоновой флуоресценцией при возбуждении на длинах волн возбуждения (473, 488, 530, 590, 630 нм).

Таблица 1.2 Спектральные характеристики наиболее распространенных флуоресцентных красителей для ПЦР-РВ

Флуоресцентные красители	Обозначение	Длина волны максимума поглощения, нм	Длина волны максимума флуоресценции, нм
Карбоксифлуоресцеин	FAM	492	520
Карбоксиродамин	R110	503	528
6-Карбокси-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцеин	6-JOE	520	548
6-Карбоксиродамин	R6G	524	557
Гексахлорофлуоресцеин	HEX	535	556
Тетраметилкарбокси-родамин	TAMRA	546 (555)	576 (580)
Индокарбоцианин	Cy3	550	570
Карбокси-X-родамин	ROX	580	605
Индодикарбоцианин	Cy5	650	670

### 1.3.2. Влияние температурного режима на эффективность ПЦР

Точность воспроизведения заданных температур в объеме реакционной смеси оказывает существенное влияние на эффективность реакции. Считается, что для полной денатурации ДНК достаточно одной секунды инкубации раствора при температуре выше 90°C. [57] Однако для выбора продолжительности и температуры денатурации нужно быть уверенным, что отсчет времени инкубации начинается только тогда, когда температура всей реакционной смеси действительно достигла заданного значения. Поэтому рекомендованное время денатурации зависит от объема реакционной смеси и составляет не менее 5-10 секунд при температуре 93-97°C, при этом для фрагментов с преобладающей последовательностью нуклеотидов G и C предпочтительна более высокая температура. [58] Недогрев на этом этапе приводит к значительному уменьшению доли одноцепочечных молекул ДНК в растворе, что соответствует уменьшению общего числа молекул, вступающих в реакцию амплификации. При этом чрезмерное увеличение температуры, также как и увеличение продолжительности стадии денатурации, приводят к снижению активности фермента полимеразы, что, в конечном счете снижает эффективность ПЦР. При температуре 93°C активность фермента Taq ДНК полимеразы падает в два раза после двух часов нагрева, при температуре 95°C - после 40 минут, а при температуре 98°C – после 5 минут. [59]

Температура и продолжительность отжига на втором этапе ПЦР зависит от нуклеотидной последовательности, длины и концентрации применяемых праймеров. Считается, что при концентрации праймеров более 0,2 мкМ для отжига достаточно нескольких секунд. [59] Слишком низкая температура отжига в сочетании с высокой концентрацией дНТФ повышает вероятность ошибок при отжиге праймеров и способствует образованию неспецифического продукта реакции. [58] Это может привести к уменьшению доли специфического продукта и

получению ложного результата анализа. Высокая температура отжига повышает точность распознавания специфических фрагментов отжигаемых праймеров, однако завышенная температура отжига вызывает снижение эффективности реакции. Таким образом, выбор температуры отжига зависит от целей эксперимента, например при оптимизации реакции по специфичности нужно выбрать более высокое значение температуры отжига, чем в случае оптимизации по эффективности реакции. [59] Особенно важна точность температуры отжига на первых циклах ПЦР, когда количество и качество синтезируемого продукта в наибольшей степени отражается на эффективности и специфичности результатов анализа.

Температура элонгации выбирается согласно свойствам применяемого фермента полимеразы. Обычно приемлемой температурой считается диапазон от 55 до 72°C. При этом наиболее распространенный фермент Taq ДНК полимеразы остается активным в широком диапазоне температур: активность фермента изменяется на 2 порядка в пределах от 20 до 85°C. [59] При температуре 72°C Taq ДНК полимеразы позволяет достраивать цепочку ДНК со скоростью от 35 до 100 пар нуклеотидов в секунду. Различия скорости работы полимеразы зависит от состава буферного раствора, pH, концентрации солей. Одной минуты при температуре 72°C может быть достаточно для синтеза 2 кб ДНК продукта. [58] Для фрагментов в несколько сотен пар нуклеотидов обычно достаточно от 5 до 30 секунд на этапе элонгации. [57]

Часто исследователи предпочитают объединять вторую и третью стадию ПЦР в одну и использовать только две температуры: денатурации и отжига. Это возможно в тех случаях, если температура отжига праймеров выше 60°C, при этом продолжительность стадии отжига увеличивается по сравнению с обычной продолжительностью отжига. [57] Применение двухстадийной программы позволяет уменьшить продолжительность одного цикла, при этом завышенная температура отжига обеспечивает большую специфичность ПЦР.

По теоретическим предположениям, для проведения ПЦР требуется непродолжительные времена выдержки (инкубации) на каждой из температурных полок. Однако общее время анализа, как правило, определяется не только продолжительностью каждой температурной полки, сколько временем выхода на заданный режим. Разница номинальной и реальной температур зависит от нескольких факторов: мощности нагревателя, температуропроводности материала реакционной камеры, соотношения площади нагреваемой поверхности к объему. Для определения температуры реакционной смеси можно использовать следующие подходы: показания датчика, встроенного в систему нагревателя; применение контрольного (модельного) образца; теоретические оценки температуры с учетом объема реакционной смеси и конструкции реакционной камеры, а также в последнее время для контроля распределения температуры по площади нагревателя используются ИК камеры. [57] Наиболее

распространенным является сочетание экспериментальных исследований с теоретическим моделированием распределения температурных полей в реакционном объеме, что позволяет ввести в температурный режим ПЦР поправки, учитывающие теплопроводность материала и особенности конструкции реакционной камеры.

### 1.3.3. Ингибирование ПЦР

Существует достаточно большое количество веществ, уменьшающих эффективность реакции ПЦР вплоть до ее прекращения (ингибирование). Наиболее чувствительными к воздействию ингибиторов являются системы с малым количеством анализируемой мишени. Считается, что влияние ингибиторов возрастает с уменьшением исходной концентрации молекул-мишеней, с увеличением длины синтезируемых фрагментов ДНК, с преобладанием GC последовательности в синтезируемом фрагменте, при применении праймеров с низкой температурой отжига.

В литературе [60] предложено выделить три основные группы ингибиторов ПЦР-РВ в зависимости от объекта воздействия: 1) действующие на фермент (ДНК-полимераза), 2) действующие на нуклеиновые кислоты, 3) действующие на флуоресцентные красители. Первая группа объединяет вещества, непосредственно воздействующие на полимеразу и приводящих к ее деградации или денатурации, а также вещества, воздействие которых является опосредованным, например, образование хелатных соединений с ионом магния, необходимым для работы полимеразы. Ингибиторы второй группы действуют за счет разрушения или связывания (блокировки) с одноцепочечными или двухцепочечными молекулами ДНК. Вещества из третьей группы не позволяют детектировать результат реакции, вызывая тушение флуоресценции или взаимодействуя непосредственно с красителем. Также к третьей группе следует отнести вещества, обладающие собственной флуоресценцией (например, флуоресцентные белки типа GFP, которые могут присутствовать в пробе в случае плохой очитки образца), так как они могут влиять на фоновую составляющую ПЦР-РВ или приводить к ложноположительным результатам при флуоресцентном детектировании после проведения реакции (технология FLASH). [57]

В обзоре [60] перечислены основные вещества или их компоненты, которые могут вызвать ингибирование ПЦР-РВ. Наибольший вклад в эффект ингибирования могут вносить ионы металлов, так как они определяют условия для денатурации, отжига и элонгации. Ион  $Mg^{2+}$  относится к веществам (кофакторам), которые необходимы для работы фермента ДНК полимеразы. Другие двухвалентные ионы металлов (например, ион кальция  $Ca^{2+}$ ) конкурентно связываются с ферментом полимеразы, тем самым приводя к блокировке работы фермента и ингибированию реакции. Предполагается, что ион железа оказывает влияние на ионный баланс, тем самым вызывая нарушение работы полимеразы, а также оказывает влияние на отжиг

прамеров и пробы. Одновалентный ион калия  $K^+$  обычно содержится в буферных растворах, применяемых для стабилизации ионного состава реагентов для ПЦР. Замена иона калия на другие одновалентные ионы, например  $Na^+$ , может стать причиной ингибирования реакции.

В качестве возможных ингибиторов, действующих на нуклеиновые кислоты, можно выделить интеркалирующий краситель SYBR Green I, что можно объяснить хорошим сходством (аффинностью) красителя и двухцепочечной ДНК, так как красители с более низкой аффинностью не оказывают ингибирующего влияния в тех же условиях.[60] Перечень красителей и других веществ, применяемых в научных лабораториях, а также информацию об их концентрациях, влияющих на ПЦР, можно найти по ссылке 61].

Появление ингибирующих веществ при ПЦР может быть обусловлено следующими причинами: 1) применением ингибирующих компонентов в методике подготовки пробы, 2) контактом с ингибирующими материалами при манипуляциях с пробой (дозировании, перемешивании) или при проведении ПЦР, 3) ингибирующими веществами в составе анализируемой пробы (например, гем или иммуноглобулин G в крови, ионы кальция в молоке и т.д.). Подробно ингибиторы, характерные для компонентов анализируемой пробы или получаемые в результате подготовки пробы к анализу рассмотрены в обзоре [58].

Отметим, что производители ПЦР смесей используют обратимое ингибирование фермента ДНК-полимеразы, например, путем связывания ее с антителами, для предотвращения синтеза неспецифичных фрагментов ДНК до начала ПЦР, что происходит из-за значительной активности большинства ферментов ДНК-полимеразы при комнатной температуре. Для этих целей могут использоваться моно- или поликлональные антитела (например, мышинные) в соотношении от 1:1 до 1:10 по молям фермента и антител соответственно. При нагревании реакционного объема в ходе первого цикла ПЦР антитела инактивируются, и полимеразы начинают работать. [57] Подобные подходы называются в литературе ПЦР с «горячим стартом» (hot start), они позволяют изготавливать, хранить и транспортировать готовые наборы, содержащие в своем составе все основные компоненты, в том числе и фермент ДНК-полимеразы.

### **Способы выявления ингибирующих веществ**

Обнаружение действия ингибирующих веществ часто затруднено. Присутствие ингибиторов может вызывать уменьшение эффективности ПЦР (это можно детектировать по наклону зависимости ПЦР-РВ), а может выражаться в задержке амплификации на начальных этапах, что сложно выявить при проведении ПЦР-РВ. К тому же схожие проблемы могут быть вызваны разными причинами (например, неэффективным нагревом в процессе реакции).

В литературе [60] предложено три основных подхода к выявлению ингибиторов: 1) применение внутреннего контроля амплификации, 2) определение и контроль эффективности реакции, 3) использование результатов математического моделирования процессов амплификации. Первый вариант является наиболее распространенным, он заключается в использовании заранее известного количества фрагментов ДНК, которые амплифицируются одновременно с ДНК-мишенью. При этом наличие ингибиторов определяют при отсутствии положительного результата от ПЦР от обеих мишеней, либо при обнаружении меньшей эффективности реакции для известного фрагмента. Применение внутреннего контроля амплификации позволяет избежать ложноотрицательного результата ПЦР и является строго рекомендованными европейскими стандартами для обнаружения патогенов в пищевых продуктах (EN ISO 22174). В литературе такой контроль амплификации часто называется: внутренний контроль (internal control - IC), (internal PCR control - IPC) или внутренний стандарт (internal standard DNA). Однако если концентрация мишеней для внутреннего контроля будет слишком большая, то это тоже может вызвать эффект ингибирования при амплификации анализируемой молекулы ДНК. Концентрация мишеней для внутреннего контроля подбирается исходя из условий реакции, и может насчитывать до сотни молекул на реакцию. Длина фрагмента также имеет значение, так как более короткие фрагменты лучше амплифицируются, чем длинные. Поэтому рекомендуется, чтобы длина анализируемого фрагмента и целевого были схожи.

Второй метод основан на определении эффективности ПЦР. В литературе [57] предложено два основных способа определения эффективности ПЦР-РВ. Первый заключается в последовательном разбавлении исследуемого образца ДНК мишени (обычно в 10 раз) и определении порогового цикла  $C_t$  для каждого разбавления по трем и более повторным экспериментам. По полученным значениям строят градуировочную зависимость значений порогового цикла от концентрации образца, имеющую вид:  $y = -a \cdot x + b$ , где по оси ОУ указаны значения порогового цикла, ОХ – десятичный логарифм концентраций разведенного образца ДНК мишени. Коэффициент наклона прямой (а), взятый с отрицательным знаком, указывает, за сколько циклов концентрация ДНК повышается на порядок. Эффективность реакции ПЦР (Е) определяется через коэффициент а следующим образом:

$$E = 10^{-1/a} \quad (1)$$

По второму способу эффективность ПЦР можно определить по единственному графику кинетической зависимости изменения флуоресценции, изображенной в логарифмическом масштабе, от количества циклов реакции. Для этого определяется коэффициент наклона (с) прямой линии, соответствующей линейному участку роста сигнала флуоресценции на этом графике. В этом случае эффективность реакции (Е) определяется как:  $E = 10^c$ .

Несмотря на то, что второй способ определения эффективности ПЦР достаточно прост и не требует проведения большого количества экспериментов, его точность уступает первому способу, поэтому в случае более тщательного количественного ПЦР исследования авторы рекомендуют первый способ определения эффективности ПЦР, связанный с построением градуировочной зависимости. [57]

### **Ингибирование в микрочипах**

В идеальном случае, поверхность реакционной камеры является химически инертной и не взаимодействует с компонентами смеси для ПЦР. Однако высокое соотношение площади поверхности к объему для реакционных камер и каналов ПЦР микрочипов приводит к возрастанию влияния взаимодействий между поверхностью и молекулами реакционной смеси на эффективность проведения реакции. На ранних этапах при работе с ПЦР чипами из кремния и стекла столкнулись с проблемой взаимодействия поверхности с реакционной смесью и ингибированием реакции. Предположительно механизм ингибирования обуславливается двумя основными факторами: физической адсорбцией и химическим взаимодействием компонентов смеси с внутренней поверхностью микрочипа.

Для ПЦР концентрация некоторых компонентов (например, полимеразы) обычно определяется соотношением основных составляющих смеси и может изменяться в пределах очень узкого диапазона. Адсорбция части компонентов смеси на поверхности реакционной камеры приводит к изменению общего соотношения концентраций компонентов, и как следствие к снижению эффективности ПЦР. Увеличение соотношения площади поверхности к объему повышает вероятность химического взаимодействия внутренней поверхности камеры с реакционной смесью, например, образованию водородных связей при наличии на поверхности микрореакторов силанольных групп. [62]

Способы нейтрализации ингибирования основаны на создании различного рода поверхностных слоев. Основными методами модификации поверхности микроструктур (каналов, капилляров, реакционных камер) являются статический и динамический методы. При обработке поверхности статическими методами внутренняя поверхность микроструктур покрывается пленкой из биосовместимого материала. Простейшим вариантом статического модификации кремниевых или стеклянных микроструктур является окисление, в результате которого образуется химически нейтральная оксидная пленка на поверхности материала. При динамическом покрытии компоненты смеси обратимо адсорбируются на внутренней поверхности микроструктур, создавая вязкую зону, разделяющую поверхность канала и раствор аналита.

Первоначально для обработки микроструктур из кремния или стекла использовали метод традиционной химии силанов, при котором моно-, ди-, или трисиланы присоединялись к поверхностным силанольным группам с образованием силоксановых связей. Основным недостатком применения таких покрытий является нестабильность силоксановых связей в щелочных условиях. Второй способ покрытия внутренней поверхности каналов основан на использовании полимеров. Различают два подхода, которые реализуются в несколько стадий. В первом поверхность предварительно обрабатывается классическим способом химии силанов и на нее наносятся якорные группы, которые на второй стадии могут сополимеризоваться с соответствующими мономерами или олигомерами. Во втором на соответствующий носитель адсорбируется первичный полимер, который затем сополимеризуется *in situ* и поперечно связывается в сетку. Например, в работе [62] в качестве перспективного защитного покрытия для кремниевых микроструктур предложена обработка полиметилметоксисилоксаном (ПММС), позволяющая минимизировать ингибирование ПЦР материалом камеры.

Полимерные материалы, применяемые для создания микрочипов, также могут проявлять эффект ингибирования. Например, для предотвращения возможной адсорбции Taq ДНК-полимеразы на поверхности ПДМС используются химические методы обработки следующими реагентами: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисорбат (Tween 20). [63]

### **Определение влияния материалов на эффективность ПЦР**

При выборе материала для создания микрочиповых устройства предпочтение следует отдавать материалам, не влияющим на эффективность ПЦР. При отсутствии информации о характере влияния материала на эффективность ПЦР необходимо провести дополнительные исследования, адаптируя предложенные в литературе подходы к выявлению ингибиторов при проведении ПЦР в традиционных условиях. Если будет установлено, что материал ингибирует реакцию ПЦР, необходимо предотвратить его контакт с реакционной смесью в микрочиповом устройстве. Это может выражаться в изменении конструкции или способов изготовления устройства, разработке методов модификации поверхности материала для создания защитных поверхностных слоев, либо в исключении этого материала из технологии создания реакционной камеры.

Условно можно разделить ингибирующие факторы по происхождению - они могут попадать через жидкую фазу, например, содержаться в составе пробы (белки, соли мочевины, гепарин и др.), или образоваться в результате контакта жидкой фазы со стенками реакционного объема. В последнем случае при смачивании жидкостью поверхности реакционной камеры из твердой фазы в жидкую могут как вымываться компоненты твердого материала (особенно при

длительном нагреве), так и наоборот осаждаются компоненты жидкости, тогда ингибирующий эффект может сохраняться и при смене реакционной камеры. Таким образом, ингибирующие вещества можно условно разделить на жидкие и твердые. Для анализа жидких веществ достаточно добавить их в ПЦР-смесь и сравнить результат реакции и с результатом без добавления, полученным в стандартных условиях. В этом случае экспериментально можно определить ту концентрацию вещества, при которой происходит ингибирование реакции. Например, для определения влияния вносимых в жидкость реагентов на эффективность ПЦР в работе [64] анализировали изображения полос при электрофоретическом разделении ампликонов (1026 п.о.) геномной ДНК мышей и крыс в агарозном геле с добавлением этидиумома бромида. Оцифровку изображения проводили на денситометре, а эффективность ПЦР определяли как отношение полученных результатов для ряда смесей с исследуемым веществом (например, в концентрации от 0,1 до 10 мМ) к результатам ПЦР без добавления дополнительных веществ. Таким образом, если определяемая эффективность превышала величину 1.1, то считалось, что введение анализируемого вещества приводило к повышению эффективности реакции ПЦР (5 мМ хлорида тетраметиламмония (tetramethylammonium - ТМА), 2 мМ оксалата ТМА и др.). При этом повышение концентраций тех же веществ в 2-5 раз приводило к резкому ингибированию реакции ПЦР (т.е. отсутствию детектируемого продукта). Для подтверждения влияния на эффективность ПЦР реагента оксалат ТМА эксперимент повторяли для других пар праймеров с длиной амплифицируемого фрагмента 813 и 549 п.о. Аналогичный подход реализован современными производителями реактивов при тестировании коммерческих наборов для ПЦР-РВ на устойчивость к таким веществам как гепарин, полисахариды, питательные среды и др. [65]

Если же ингибирование ПЦР связано с твердой фазой, например стенками реакционной камеры, то по аналогии с предыдущим способом, можно предположить проведение ПЦР в реакционной камере из исследуемого материала и сравнение полученных результатов с результатом ПЦР в традиционных условиях. Однако эффективность ПЦР сильно зависит от условий термоциклирования, которые в свою очередь тоже зависят от применяемого материала и конструкции нагревателя, поэтому наилучшего метода выявления степени влияния твердых материалов на ПЦР пока не предложено. В работе [62] для выбора наиболее перспективного защитного покрытия для кремниевого материала применялись модельные системы, представляющие собой кремниевые пластины, которые после обработки модифицирующим раствором помещали в пробирки с ПЦР смесью. Результат ПЦР анализировали методом гель-электрофореза. Таким способом было определено, что наиболее перспективным является использование полиметилметоксисилоксана (ПММС) для модификации поверхности

кремниевого материала, а добавление БСА в качестве динамического модификатора в большинстве случаев позволяло увеличить производительность реакции.

При разработке микрочиповых устройств для ПЦР необходимо подтвердить, что применяемые материалы не оказывают влияние на эффективность ПЦР. Эти материалы условно можно поделить на две группы: основной материал, из которого формируется реакционная камера и вспомогательные материалы, используемые для герметизации реакционной камеры (например, полимерные композиции для формирования неразъемного соединения основных материалов). Так как практически все эти материалы относятся к твердым веществам, то необходимо разработать оперативный способ оценки влияния этих материалов на эффективность ПЦР.

#### **1.4. Методы и способы проведения цифровой полимеразной цепной реакции (цПЦР)**

##### **1.4.1. Цифровая полимеразная цепная реакция (цПЦР)**

Цифровая ПЦР (цПЦР) – количественный метод анализа, основанный на применении методов математической статистики при проведении множества экспериментов с многократным разбавлением пробы. [66] Целью разбавлений является получение в реакционном объеме столь малого количества исходного образца, что в среднем в одном образце содержится не больше одной молекулы ДНК. В таком случае вероятность распределения молекул ДНК в большом количестве реакционных камер соответствует законам Пуассона.

Цифровая ПЦР позволяет регистрировать результат реакции по конечной точке и обеспечивает количественный анализ нуклеиновых кислот без применения стандартов и градуировочных зависимостей. Принцип цифровой ПЦР был впервые предложен еще в 1992 году [67] и все чаще используется для количественного определения ДНК. При проведении цПЦР разбавленная исходная проба случайным образом распределяется по отдельным реакционным объемам таким образом, чтобы средняя концентрация молекул ДНК не превышает 1 молекула/объем. Затем в этих объемах проводят ПЦР, результаты которой регистрируют по окончании реакции и для каждого реакционного объема интерпретируются как «положительный», в случае наличия продукта реакции, или «отрицательный». При этом различие в количестве синтезируемого продукта в пределах «положительных» реакционных объемов не учитывается, что позволяет уменьшить влияние эффективности реакции на результат анализа. Когда соотношение положительных и отрицательных результатов реакции не превышает 30%, зная число разбавлений можно на основании статистических методов вывести точное количество молекул ДНК в исходном образце.

Преимуществом метода цПЦР является то, что в этом случае: 1) минимизируется влияние эффективности на результат ПЦР, 2) не требуется построения градуировочных зависимостей, что значительно сокращает продолжительность и трудоемкость анализа, 3) за счет создания отдельных микрокамер минимизируется конкуренция при амплификации нескольких ДНК-мишеней, что особенно актуально при исследовании сверхмалых концентраций анализируемой пробы (например, для определения редких генетических мутаций, однонуклеотидного полиморфизма и д.т.). К ограничениям цПЦР можно отнести: невозможность предугадать достаточное количество разбавлений для неизвестной пробы, техническая сложность в проведении многочисленных реакций, большой расход реактивов при осуществлении цПЦР в макромасштабе. Традиционное зарубежное и отечественное коммерческое оборудование для ПЦР рассчитано на проведение реакции в полимерных пробирках (максимальный объем каждой от 0,2 до 0,5 мл) или планшетах (96 и 384 луночные планшеты с максимальным объемом одной лунки 40 и 300 мкл соответственно). Поэтому наиболее перспективным является реализация метода цПЦР на основе миниатюрных устройств – микрочипов. В настоящее время лишь ограниченное число компаний в мире выпускает коммерческие приборы и микрочиповые устройства для цПЦР. Поэтому актуальными задачами являются разработка и создание отечественных микроаналитических систем для цифровой ПЦР, а также адаптация методики анализа для микроустройств и их апробация при исследованиях биологических проб.

#### **1.4.2. Способы реализации цифровой ПЦР**

Первоначально метод цПЦР был реализован в традиционных полимерных планшетах для ПЦР. [67] Существенным недостатком такого подхода являлись: высокая трудоемкость при выполнении сотен и тысяч реакций ПЦР, требующихся для анализа каждого образца, а также большой расход реагентов (до 25 мкл на каждую ячейку планшета). В настоящее время существуют коммерчески доступные микрофлюидные устройства для реализации цифровой ПЦР, которые содержат от одной до нескольких тысяч отдельных миниатюрных реакционных камер. [12, 13] Для определения таких устройств иногда применяют название cdPCR (chamber digital PCR) – «цПЦР в камере». Применение таких устройств позволяет реализовать метод цПЦР с использованием значительно меньшего объема реагентов, чем в традиционном варианте. Однако при увеличении точности метода и, следовательно, количества реакционных камер возникает ряд практических трудностей, начиная от увеличения сложности и стоимости изготовления такого устройства (а, следовательно, и стоимости анализа) до физического ограничения по количеству камер на пластине.

К цифровой ПЦР также можно отнести ряд других методов: твердофазная ПЦР, эмульсионная ПЦР и ПЦР в тонком слое геля. Подробно принципы реализации цифровой ПЦР описаны в совместной публикации [68].

Концепция твердофазной ПЦР была разработана двумя независимыми группами под руководством Бинга в 1996 г. и Адесси в 2000 г. [69] Суть ее заключается в том, что на твердой поверхности (предметное стекло, кварц, полимерные или магнитные шарики) прикрепляют праймеры (плотность которых может достигать до тысячи единиц на  $\text{мм}^2$ ). Нарастивание праймеров во время проведения ПЦР приводит к тому, что синтезированные фрагменты ДНК остаются закрепленными одним концом на поверхности, образуя очень плотные ДНК-колонии, количество которых зависит от концентрации исходной ДНК-мишени. Преимуществом этого метода является широкие возможности дальнейшего манипулирования с высококонцентрированными ДНК-фрагментами (например, транспортировка, сортировка, сиквенирование и т.п.), однако ограничением метода является недостаточно прочная фиксация праймеров на поверхности. Например, за 28 циклов термоциклирования до 50% праймеров могут потерять связь с поверхностью, что приводит к снижению продуктивности твердофазной ПЦР и перемешиванию колоний. [69]

Для эмульсионной ПЦР используются принципы цифровой микрофлюидики, когда основной объем разбивается на множество отдельных независимых объемов (микрокапель или эмульсий), каждый из которых содержит все необходимые компоненты реакции, и может использоваться в качестве отдельной «виртуальной» реакционной микрокамеры. Так как расчет производится методом цифровой ПЦР, а для создания камер применяются принципы цифровой микрофлюидики, это этот подход получит название Droplet Digital PCR (ddPCR) - «капельная цифровая ПЦР». В отечественной литературе этот метод часто называют просто «цифровая ПЦР», что не вполне корректно. Такой формат ПЦР был реализован в 2011 году [70]. Специально разработанный генератор эмульсии создавал до 20 000 капель для анализа одного образца за 1 минуту. Для эмульсионной ПЦР обычно в качестве дисперсной фазы применяются специальные составы на основе минерального масла. Первоначально недостатком эмульсионной ПЦР являлась высокая вероятность контаминации из-за нестабильности и проницаемости масляной оболочки для компонентов смеси. Однако современные достижения в области химии позволили создать специальные компоненты для масла, которые позволяют получать стабильные и термоустойчивые микрокапли для ПЦР. [24]

#### **1.4.3. Цифровая ПЦР в геле (метод молекулярных колоний)**

Технология проведения ПЦР в слое геля известна как метод молекулярных колоний (ММК) и была предложена группой исследователей под руководством А.Б.Четверина (ИБ РАН, г.Пушино). [71-76] Основная разница между методами ПЦР-РВ и ММК заключается в том, что

реакционную смесь вносят не в пробирку, а в лунку со слоем полиакриламидного геля. Пористая структура геля не влияет на подвижность компонентов реакционной смеси, позволяя осуществить реакцию амплификации, однако затрудняет диффузию амплифицируемых фрагментов ДНК, которые скапливаются вокруг исходной молекулы. Подобные скопления были названы молекулярные колонии или нанокolonии. [77, 78] Так как каждая колония формируется из одной молекулы ДНК-мишени, то регистрация молекулярных колоний позволяет обнаружить, идентифицировать и посчитать исходную концентрацию ДНК в анализируемой пробе на уровне единичных молекул. В работе [79] указывается, что метод молекулярных колоний позволяет выявить 1 молекулу ДНК или 2 молекулы РНК. Меньший процент выявления молекул РНК отражает выход стадии обратной транскрипции. Данные, изложенные в [80], иллюстрируют отсутствие конкуренции в ММК при размножении сразу нескольких мишеней.

В зарубежной литературе аналогичный метод цПЦР в геле известен как метод «полоний» (полимеразных колоний). [81, 82] Этот метод можно считать разновидностью твердофазной ПЦР, так как он подразумевает проведение реакции в тонком слое геля (~250 мкм) при иммобилизации одного из двух праймеров на поверхности геля с помощью акридной группы. Метод «полоний» применяется для секвенирования, оценки однонуклеотидного полиморфизма (SNP), экспрессии генов и др. [83, 84]

Из имеющегося многообразия реализации цифровой ПЦР метод молекулярных колоний особенно привлекателен, так как проведение ПЦР в геле является простым и недорогим в реализации. В отличие от твердофазных методов выбор метода молекулярных колоний позволяет создавать универсальные аналитические системы, т.е. изначально неспецифичные к применяемым мишеням и реагентам. Преимуществом ММК перед эмульсионной ПЦР является простота эксплуатации (не требуются генераторы капель при заполнении камеры), а также возможность применения традиционного для микрочипов оборудования (лазерные флуоресцентные сканеры) для регистрации результатов ПЦР. При детектировании нет необходимости в организации движущихся жидкостных потоков, что значительно сокращает продолжительность анализа.

Метод молекулярных колоний может повысить точность и надежность современных методов диагностики заболеваний. Перспективным является использование этого метода на ранних стадиях инфекционных и онкологических заболеваний. Например, в работе [85] показано применение ММК для обнаружения мРНК альфа-фетопротеина, являющегося маркером гепатоклеточной карциномы и некоторых опухолей репродуктивной системы. Авторы указывают, что чувствительность диагностики соответствует  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  (1 лейкозная

клетка на фоне  $10^7$ – $10^8$  здоровых лейкоцитов), что на несколько порядков выше максимальной чувствительности других методов.

#### **1.4.4. Реализация цифровой ПЦР в геле (метод молекулярных колоний)**

Для проведения метода молекулярных колоний (цПЦР в геле) можно применять любые термостабильные гелевые среды, например полиакриламидный гель (ПААГ). Первоначально полимеризацию геля проводили в присутствии всех компонентов ПЦР. [71, 76] Со временем авторы усовершенствовали методику, разделив стадии полимеризации и амплификации, что позволило повысить эффективность ПЦР. [80, 86] После полимеризации гель вымачивали в воде, стерилизовали и высушивали. Это позволило удалить из геля растворимые компоненты, снижающие эффективность ПЦР, а также не подвергать дополнительным негативным воздействиям фермент ДНК-полимеразы.

Изначально метода молекулярных колоний был реализован в лунках диаметром 14 мм и глубиной 400 мкм, выполненных в предметном стекле. Объем одной лунки с гелем составлял 65 мкл, что сопоставимо с объемами жидкостной ПЦР в пробирках (около 50 мкл). Перед экспериментом сухой гель восстанавливали до исходного объема обычной смесью для ПЦР (дНТФ, полимераза, праймеры, зонды, анализируемая проба с ДНК). Лунки герметизировали покровными стеклами с минеральным маслом ( $\approx 2$  мкл), которые фиксировали фольгой для герметизации ПЦР-планшетов. [77] Реакцию проводили в таком же режиме термоциклирования, что и традиционную ПЦР, но с увеличением длительности стадии отжига на 10 – 20 секунд. Регистрацию результатов осуществляли как в режиме реального времени (на этапе элонгации), так и по конечной точке.

Предложенный способ реализации ММК подразумевает использование ручного труда на этапе герметизации лунок, что ограничивает применение данного способа при проведении большого количества экспериментов. 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 реакционными камерами, в которых расположен гелевый слой. Так как регистрация результатов ПЦР проводится с применением флуоресцентных красителей, то реакционная камера должна быть выполнена из оптически прозрачных материалов. Объем одной реакционной камеры микрочипового устройства не должен превышать 50 мкл.

#### **1.4.5. Детектирование молекулярных колоний**

Для детектирования молекулярных колоний применяют те же флуоресцентные зонды, что и для жидкостной ПЦР-РВ (кроме зондов типа TaqMan), а также используют одновременно несколько красителей для регистрации колоний от разных ДНК-мишеней. [86, 87] Для регистрации колоний использовали зонды Beacon с красителем и тушителем на

противоположных концах олигонуклеотида, которые начинают флуоресцировать после отжига на ДНК-мишени. Перспективным является применение флуоресцирующих зондов FRET, садящихся на мишень в непосредственной близости друг от друга (на расстоянии 2 п.о.), делает возможным флуоресцентный резонансный перенос энергии между красителем-донором и красителем-акцептором, регистрация которого подтверждает амплификацию ДНК. [87]

Увеличению яркости колоний способствует проведение асимметричной ПЦР, когда концентрация праймеров с прямой последовательностью нуклеотидов в несколько раз меньше, чем концентрация праймеров с обратной последовательностью. В этом случае молекулярные колонии наблюдаются позже, чем при симметричной ПЦР, однако они содержат больше одноцепочечных молекул, комплементарных флуоресцентным зондам, что значительно повышает количество задействованных зондов. [88]

С одной стороны, чем больше яркость и размер колоний, тем меньше требования к чувствительности и разрешаемой способности оптической детектирующей системы. Однако с увеличением диаметра колоний при сохранении размера лунки уменьшается максимальное количество «вмещаемых» в лунку колоний, что снижает динамический диапазон метода. На размер колоний может влиять число циклов амплификации, размер синтезируемого фрагмента ДНК и характеристики гелевой среды. В работе [81] было показано, что размер колоний можно уменьшить почти на два порядка (от ~2000 до 25 мкм) при одновременном увеличении длины ампликона (от 120 до 514 пар оснований (п.о.)) и концентрации акриламида в геле (с 6% до 15%).

При количественном анализе результатов цПЦР в геле важно верно определить число молекулярных колоний в реакционной камере. Чем больше количество исходных молекул ДНК, тем выше вероятность того, что колонии могут быть расположены близко друг другу и частично перекрываются. В таком случае объединенное изображение пары (тройки и т.д.) колоний будет ошибочно рассматриваться, как один объект, и количественный анализ (счет колоний) произойдет с погрешностью. В работе [88] предложен подход, согласно которому наложение колоний можно различить, если центры колоний разнесены друг от друга на расстояние, больше 40% их диаметра. Следовательно, вероятность перекрывания двух колоний зависит от соотношения радиусов колонии и лунки. Однако при увеличении числа колоний может происходить совпадение не только двух, но и более колоний. В таком случае вероятность ошибки определения числа колоний возрастает. Перекрывание колоний наиболее вероятно произойдет при неравномерном распределении колоний по лунке. Поэтому при анализе изображений колоний необходимо учитывать равномерность их распределения, а также вероятность их множественного (двух и более) перекрывания, что позволит определить погрешность количественного анализа на основе прямого счета молекулярных колоний.

#### 1.4.6. Выбор тестового объекта исследования

По данным Госкомстата в Российской Федерации в последние годы наблюдается рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) среди женщин. Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в списке заболеваний, вызывающих ежегодную смертность от онкологических заболеваний среди женщин. По данным ВОЗ за 2014 год, смертность от РМЖ в Российской Федерации составила 17.8% (почти 26,5 тысяч) от общего числа всех умерших от рака женщин, а число пациентов с впервые установленным диагнозом РМЖ достигло 57,5 тысяч человек. [89] Основной причиной летальных исходов у больных РМЖ является развитие рецидивов и отдаленных метастазов, ежегодно выявляемых в 30–40% наблюдений. Ситуация осложняется тем, что среди вновь заболевших в 45% наблюдений опухоль диагностируют на стадиях, когда радикальное лечение уже невозможно. [90]

Следовательно, актуальным является создание, развитие и применение в клинической практике высокочувствительных методов диагностики онкологических заболеваний, в том числе на основе микрочиповых устройств [91], позволяющих осуществить своевременное выявление первичного заболевания, контроль минимального остаточного заболевания, а также проводить постпрофилактику – регулярный мониторинг после окончания лечения. Например, после операции по удалению рака молочной железы молекулярная диагностика по образцам крови пациентов позволила определить признаки новых опухолей задолго до клинического подтверждения рецидивы. [92]

Установлено, что в большинстве случаев заболевания РМЖ у пациентов наблюдается высокий уровень экспрессии цитокератина-19. [93-95] Цитокератины – семейство структурных белков эпителиальных клеток, которые кодируются различными генами и экспрессируются различным образом в соответствии с типом эпителия. При злокачественных изменениях клеток эпителия экспрессия цитокератинов многократно повышается, и растворимые фрагменты поступают в кровь, лимфу и другие жидкости организма. Оценки содержания транскриптов цитокератина-19 (СК-19) в периферической крови онкобольных приводятся в следующих работах [96-97]. Авторы работы [98] показали, что определение уровня этого РНК-онкомаркера в капиллярной крови пациентов может быть использовано для диагностики злокачественных опухолей, для послеоперационного мониторинга выброса фрагментов опухоли в кровоток, оценки угрозы метастазирования и в качестве вспомогательного метода дифференциальной диагностики.

Таким образом, для тестирования работоспособности микрочиповых устройств в качестве объектов измерения были выбраны кДНК онкомаркера цитокератина-19. Образцы получали методом обратной транскрипции мРНК. Предварительно уровень концентрации кДНК оценивали с применением метода ПЦР-РВ.

## 1.5. Основные результаты главы 1

На основании литературного анализа работ, связанных с созданием микрочиповых устройств для ПЦР, можно выделить следующие тенденции их развития и совершенствования: миниатюризация, увеличение количества реакционных камер для проведения одновременного анализа, интеграция функциональных элементов (нагреватели, фильтры, смесители). Применение микрочиповых устройств предоставляет возможность разрабатывать новые миниатюрные аналитические системы, позволяющие значительно уменьшить расход реагентов и время проведения анализа по сравнению с существующими макро-аналогами.

Для молекулярной диагностики и генетических исследований используются методы амплификации, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), при которой осуществляется синтез заданных фрагментов ДНК в условиях циклического изменения температуры. Современные технологии цифровой ПЦР обеспечивают количественный анализ нуклеиновых кислот, не требующий построения градуировочных зависимостей и позволяющий регистрировать малые количества нуклеиновых кислот в присутствии мешающих факторов (конкурентные ДНК, ингибирующие вещества и др.). Из имеющегося многообразия реализации методов цифровой ПЦР привлекательным является ММК, предложенный российскими учеными под руководством д.б.н, чл.-кор. РАН А.Б. Четверина. Этот метод основан на визуализации результата ПЦР от отдельных молекул ДНК в вязкой гелевой среде с использованием традиционного лабораторного оборудования. Однако для реализации ММК в качестве повседневного лабораторного метода необходимо снизить трудоемкость анализа при проведении ПЦР, что возможно при создании специализированных микрочиповых устройств с закрытыми реакционными камерами, в которых расположен гелевый слой. Поэтому 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.

В общем случае процесс разработки аналитического микрочипового устройства включает следующие стадии: 1) определение топологии микроструктур; 2) выбор материала и технологий изготовления микроструктур; 3) модификация поверхности микроструктур; 4) герметизация (соединение). Для создания микрочиповых устройств, ориентированных на отечественные материалы, приоритетными задачами являются выбор подходящих материалов, адаптация для них существующих способов и технологий создания реакционных камер, а также апробация изготовленных устройств. Полимерные материалы являются дешевой альтернативой кремниевых и стеклянных материалов для создания микрочиповых устройств. Методы лазерного микроизготовления в полимерах являются перспективной техникой формирования микроструктур, характеристики которых зависят от материала полимера, методов и условий

обработки. Поэтому важной задачей является определение условий создания микроразмерных структур в полимерных материалах методами лазерной обработки с применением коммерческих технологических систем.

Особенностью микрочиповых технологий для реализации ПЦР является большое соотношение площади поверхности к объему, что позволяет существенно увеличить скорость нагрева (охлаждения) реакционной камеры и сократить общее время анализа. При условии применения плоского внешнего нагревательного устройства, скорость и однородность нагрева повышаются с увеличением площади теплового контакта и уменьшении толщины подложки при сохранении объема реакционной камеры. Точность воспроизведения заданных температур в объеме реакционной смеси оказывает существенное влияние на эффективность реакции. Однако выбор толщины подложки ограничен механическими и прочностными свойствами применяемых материалов, поэтому при нагреве следует учитывать распределение температурных полей в подложке из применяемых материалов.

При изготовлении микрочиповых устройств особое внимание уделяется способам герметизации микроструктур. Наиболее распространенным способом соединения пластин является температурное связывание (спекание), однако применение высоких температур может влиять на встроенные функциональные элементы. Поэтому необходимо использовать низкотемпературные способы герметизации, например герметизацию полимерными адгезивными композициями, в том числе фотоотверждаемыми. Эти способы не требуют сложного технологического оборудования и могут использоваться в лабораторных условиях, однако их применение при создании микрочиповых устройств для ПЦР требует проведения дополнительных исследований по определению режимов герметизации и проверки герметичности получаемого соединения при циклическом нагреве. Также необходимо исключить влияние связующего слоя на ПЦР, для чего следует разработать способ оценки влияния применяемых твердофазных материалов и полимерных композиций на эффективность реакции, и провести апробацию изготовленных микрочиповых устройств.

### 1.5.1. Постановка задачи

Целью настоящей работы является 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.

**Первой задачей** работы являлись обоснование и выбор конструкционных материалов для микрочиповых устройств, позволяющих реализовать ПЦР. Для этого необходимо:

- а) экспериментально проверить прозрачность материалов в используемом для детектирования диапазоне длин волн, а также оценить уровень флуоресценции при возбуждении на длинах волн (473, 488, 530, 670 нм), соответствующих поглощению наиболее распространенных флуоресцентных красителей;
- б) определить влияние применяемых твердофазных материалов на эффективность ПЦР;
- в) оценить влияние свойств теплопроводности применяемых материалов на продолжительность нагрева микрочипового устройства по программе ПЦР.

**Вторая задача** работы состояла в выборе и адаптации технологий изготовления микроструктур и способов физико-химической обработки поверхности материалов для создания реакционных камер с гелевым слоем, проведении исследования физических и геометрических характеристик изготовленных микроструктур, а также оценке изменения поверхностных свойств материала после целевой обработки.

**Третья задача** работы заключалась в отработке технологий герметизации микрочиповых устройств на основе полимерных композиций, а также в проведении экспериментальных исследований для разработки методик контроля герметичности микрочиповых устройств на основании физических (оптических, гравиметрических) методов.

**Четвертой задачей** являлось изготовление прототипов микрочиповых устройств для проведения ПЦР в жидкости и в гелевой среде (на примере ММК) и их апробация на образцах, содержащих молекулы нуклеиновых кислот (ДНК).

## Глава 2. Теоретические исследования

### 2.1. Основные требования к материалам микрочиповых устройств

В простейшем случае конструкция аналитического микрочипа представляет собой неразъемное соединение двух пластин, в одной из которых, подложке, выполнена сеть микроструктур (каналы, резервуары, смесители, фильтры и др.), а другая, защитная, обеспечивает их герметичность. Для нагрева традиционно используются приборы для ПЦР с плоским твердотельным нагревательным элементом, а для регистрации результатов ПЦР – оборудование, позволяющее реализовать флуориметрические методы детектирования (например, флуоресцентные сканеры).

Микрочиповое устройство для проведения ПЦР должно обеспечивать: 1) контакт с нагревателем за счет плоской нижней поверхности, 2) регистрацию оптического сигнала за счет оптической прозрачности и низкой фоновой флуоресценции материала реакционной камеры и защитной пластины, 3) ввод жидкой пробы через систему подводящих каналов и/или входных отверстий, которые герметично запечатываются перед термоциклированием, 4) проведение контрольного измерения (без ДНК-мишени) для исключения ложно-положительного результата ПЦР за счет наличия нескольких камер на одном устройстве.

Для создания микрочиповых устройств необходимо выбирать коммерчески доступные, относительно недорогие материалы, состав которых контролируется изготовителем, что гарантирует воспроизводимые физико-химические характеристики материала от партии к партии. В работе рассматривалась возможность применения стеклянных и полимерных материалов отечественного производства для изготовления микрочипов.

#### Стеклянные материалы

В качестве основного материала для микрочиповых устройств было выбрано наиболее распространенное и хорошо изученное натриево-силикатное оптическое стекло марки крон К8 (аналог BK7SchottGlass). Такие стекла обладают высокой прозрачностью и низкой флуоресценцией в оптическом спектральном диапазоне, являются достаточно прочными и химически устойчивыми к воздействию внешних факторов, таких как нагрев или воздействию влаги, слабокислым и щелочным водным растворам. Стекла К8 часто используются для изготовления оптических деталей для видимого и ближнего ИК диапазона [99] и были успешно апробированы при изготовлении микрочиповых устройств для электрофоретического анализа. [37, 100] К ограничениям применения стеклянных материалов относится относительно высокая стоимость, а также хрупкость тонких стеклянных пластин.

Для предварительных исследований был предложен наиболее простой вариант стационарного микрочипового устройства для ПЦР-РВ размером 15×15 мм с четырьмя

открытыми реакционными камерами. Микрочип представлял собой две герметично соединенные стеклянные пластины, в одной из которых были выполнены отверстия диаметром 2,5 мм. Рабочий объем одной реакционной камеры составлял 3-5 мкл. После заполнения реакционной смесью камеры микрочипа герметизировались минеральным маслом (3 мкл). Пластины соединялись посредством термического связывания (спекания), которое обеспечивало прочность и долговечность соединения. В качестве защитных пластин применяли стекло марки флинт Ф1, так как в составе таких стекол имеются оксиды свинца, что определяет более низкую температуру плавления флинтов (540°С) по сравнению с кронами (630°С). Химический состав применяемых стеклянных материалов приведен в Таблице 2.1.

Таблице 2.1 Химический состав применяемых стеклянных материалов (в процентах) [101]

марка стекла	SiO <sub>2</sub>	PbO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	BaO	AsO
К8	68.9	-	11.1	10.4	6.5	2.8	0.3
Ф2(Ф1)	47.0	46.4	-	-	6.3	-	0.2

Недостатком подобного устройства является наличие открытых камер, допускающих перекрестное «заражение» реакционного объема (контаминацию) при проведении ПЦР. Для реализации метода молекулярных колоний необходимо разработать плоские закрытые реакционные камеры с системой подводящих каналов и резервуаров. Было решено, что габаритный размер микрочипового устройства не должен превышать традиционных размеров предметного стекла (25×75 мм), а объем одной реакционной камеры микрочипового устройства не превышать 50 мкл. Размер устройства (25×75 мм, толщина — до 1.9 мм) был выбран исходя из возможности регистрации результатов проведенных реакций на сканерах для биочипов.

Было предложено и апробировано несколько вариантов топологий реакционных камер (Рисунок 2.1) с двумя симметричными входными отверстиями для ввода ПЦР- смеси.

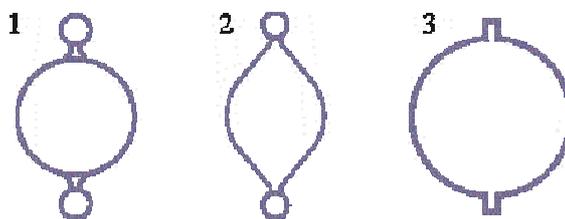


Рисунок 2.1 Варианты топологии реакционных камер для проведения цПЦР в гелевом слое.

В первом варианте топологии (Рисунок 2.1, 1) реакционная камера со слоем геля соединена с круглыми резервуарами системой подводящих каналов. [102] Ввод смеси для ПЦР в реакционную камеру осуществляется путем внесения жидкости в резервуар, образованный отверстием защитной пластины и каналом подложки. При этом капиллярные силы

обеспечивают загрузку пробы в реакционную камеру, заполненную гелем. После заполнения камеры жидкостью гель набухает и занимает все пространство реакционной камеры. Ввод жидкости, особенно если она содержит вязкие компоненты, может производиться с использованием специальных приспособлений, например с применением насоса-дозатора на низкой скорости потока и специального вспомогательного переходного устройства для микрочипов. При этом для исключения контаминации используются сменные (или одноразовые) переходные уплотнители. Для предотвращения испарения пробы при термоциклировании входные резервуары перед нагревом заполняли минеральным маслом.

При одинаковой глубине микроструктур соотношение площади подводящих каналов и резервуаров для топологии 1 составляет около 30% от рабочей площади реакционной камеры, что может привести к погрешности дозирования при избытке жидкости в резервуарах. Были предложены следующие варианты топологии (Рисунок 2.2, 2 и 3), позволяющие уменьшить соотношение рабочей площади к подводящей системе (14% и 10%, соответственно) за счет уменьшения площади подводящих структур и исключения одного из компонентов системы: либо каналов, либо резервуаров. В топологии 2 форма реакционной камеры с гелем вытянутая и каплеобразная, что способствует быстрому заполнению камеры жидкостью за счет капиллярных сил. В топологии 3 введение жидкости осуществляется через короткий подводящий канал при использовании автоматической лабораторной пипетки со сменными наконечниками. При этом применяются защитные пластины без отверстий, что позволяет уменьшить площадь защитных пластин и упростить их изготовление и герметизацию. При создании экспериментальных образцов микрочиповых устройств для ПЦР в геле был выбран вариант устройства, состоящего из трех (Топология 1) или четырех (Топологии 2 и 3) камер — для обеспечения возможности проведения отрицательного контроля (без добавления ДНК-мишени) наряду с анализируемыми образцами.

Преимуществом закрытых планарных микроструктур помимо предотвращения контаминации является точность и воспроизводимость объема вводимой реакционной смеси, а также высокая скорость термоциклирования, так как в плоской камере значительно повышается соотношение площади поверхности к объему. Изготовление микрочипов с закрытыми микроструктурами является более перспективным, так как позволяет в дальнейшем объединить реакционные камеры с другими функциональными элементами, что позволит создать интегрированные системы анализа на чипе. Однако при переходе к закрытым микроструктурам возрастает сложность и трудоемкость обработки поверхности микроструктур после герметизации. Поэтому актуальным является применение полимерных связующих слоев (клеевых композиций, скотчей) для герметизации устройств с возможностью их разборки и последующего повторного использования.

### Полимерные материалы

Для работы было необходимо выбрать оптически прозрачный жесткий пластик, который бы выдерживал циклический нагрев до 95°C, обладал химической устойчивостью к применяемым растворам. Среди отечественных полимерных материалов наиболее перспективными для создания микрочиповых устройств являются органические стекла. Оргстекло представляет собой прочный листовый материал, характеризующийся высокой прозрачностью в видимой области спектра, устойчивостью к действию воды, спиртов, разбавленных кислот и щелочей, применимый для работы в условиях биологических сред. К ограничениям применения оргстекла, как и для большинства полимеров, относится: низкая теплопроводность (менее 0,2 Вт/м·°C), низкая устойчивость к органическим растворителям и гидрофобность поверхности.

Среди полимерных материалов были выбраны сертифицированные термопластичные листовые полимеры, позволяющие применять широкий спектр способов формирования микроструктур при групповой обработке (например, методы репликации или обработки по шаблону) и, по литературным данным, не вступающие в реакцию с компонентами раствора для ПЦР – поликарбонат (ПК) фирмы BARLO (Германия) и полиметилметакрилат (ПММА) производства фирмы «ДОС» - «Дзержинское Оргстекло» (Россия). Сравнительные характеристики полимерных материалов, составленные по данным производителей [103-105], приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 Сравнение характеристик применяемых полимерных материалов.

	Ед. измерения	ПММА	ПК
Производитель		ОАО «ДОС», Россия	BARLO, Германия
Толщина	Мм	1	1
Удельный вес	г/см <sup>3</sup>	1,2	1,2
Предел прочности при растяжении; Прочность при разрыве	МПа	70-80	60
Модуль упругости при растяжении	МПа	3000-3300	2200-2300
Относительное удлинение при растяжении (23 °C) при разрыве	%	4-5	80-100
Температура размягчения по Вика	°C	95	145
Температура формования	°C	150-170	180-210
Светопропускание	%	92	83-90

Химическая стойкость оргстекла зависит от способа получения. Различают два основных способа получения органического стекла: 1) блочная полимеризация мономеров под действием инициаторов радикальной полимеризации (блочное оргстекло), 2) полимеризация при выходе материала под давлением из щели экструдера (экструзионное оргстекло). Блочный полимер имеет высокую молекулярную массу (до 1000000), обладает хорошей механической прочностью, высокой прозрачностью к лучам видимой и УФ-части спектра. Изделия из блочного оргстекла изготавливают штамповкой, вакуумформованием и механической обработкой. [106] Для экструзионного оргстекла по сравнению с блочным полимером характерны: меньшая температура размягчения, меньшая стойкость к ударам, меньшая химическая стойкость. Сравнительные характеристики химической стойкости оргстекла, полученного этими способами, приведены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 Сравнительные характеристики блочного и экструзионного оргстекла при взаимодействии материала с различными растворами при комнатной температуре в течение времени до одного года и более: «-» - не взаимодействует, «+» - явное взаимодействие, «+/-» - ограниченное взаимодействие (по материалам [33])

Раствор	Блочное оргстекло	Экструзионное оргстекло
Серная кислота		
90%	+	+
10%	-	-
Уксусная кислота		
100%	+	+
10%	-	+/-
Этиловый спирт		
30%	+/-	+
10 % (непродолжительное взаимодействие)	-	-
Изопропиловый спирт		
50%	+	+
10%	+/-	+/-
Глицерин	нет данных	-
Ацетон	нет данных	+
Минеральные масла	-	-

Для изготовления прототипов микрочиповых устройств применялись следующие марки блочного ПММА: ТОСП® (ГОСТ 17622-72, ТУ 2216 - 271 - 05757593 – 2001) и ТОСН (ГОСТ

17622-72, ТУ 2216 - 271 - 05757593 – 2001), а также экструзионный полимер марки АCRYМА®72 (ТУ 2216-030-55856863-2004).

Материал марки ТОСП® представляет собой классическое пластифицированное акриловое блочное оргстекло с высокими физико-механическими и эксплуатационными свойствами. Стекло марки ТОСН – это непластифицированное блочное акриловое стекло с добавкой светостабилизатора. Отсутствие пластификатора в ТОСН обуславливает более высокую стойкость данного материала к механическим нагрузкам и термохимическому воздействию по сравнению с маркой ТОСП®. Стекло марки АCRYМА®72 представляет собой экструзионный акриловый пластик, который обладает меньшей химической стойкостью, что может обеспечивать лучшую способность к склеиванию по сравнению с марками ТОСП® и ТОСН. Пластины из оргстекла марки АCRYМА®72 применяли для герметизации реакционных камер.

## 2.2. Температуропроводность материалов

Необходимым условием проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) является соблюдение специального циклического температурного режима. Традиционно каждый цикл ПЦР состоит из трех стадий: 1) денатурация - разрушение водородных связей между цепочками ДНК, происходящее при температуре 93-97°C; 2) отжиг праймеров на ДНК, при этом температура отжига может варьироваться от 55 до 75°C; 3) синтез комплементарных цепей ДНК путем удлинения праймеров – элонгация, температура которой обычно составляет от 60 до 75°C. Температура отжига зависит от нуклеотидной последовательности и концентрации применяемых праймеров, а температура элонгации выбирается согласно свойствам применяемого фермента полимеразы. Точность выполнения температурного режима оказывает существенное влияние на эффективность реакции. Допустимая величина отклонения среднего значения температуры от заданного для ПЦР не превышает одного градуса, и обычно составляет от 0,5°C до 0,1°C. [107, 108]

Количество циклов, необходимое для регистрации продуктов ПЦР, как правило находится в интервале от 30 до 45 и зависит от эффективности реакции, исходной концентрации ДНК, свойств применяемых флуоресцентных зондов, характеристик детектирующей системы и др. Общее время анализа определяется не только количеством циклов и продолжительностью каждой температурной полки, но и временем выхода на заданную температуру, которое зависит от характеристик оборудования (мощность, скорость нагрева) и нагреваемого объема. Для гарантированного достижения заданной температуры на каждой стадии цикл можно воспользоваться увеличением продолжительности каждого этапа термоциклирования, что приводит к увеличению продолжительности анализа. Следовательно,

необходимо определить минимальную продолжительность нагрева на каждой стадии ПЦР, позволяющую сохранить эффективность реакции и специфичность продукта ПЦР.

При условии теоретически идеального нагревательного оборудования скорость изменения температуры в реакционной камере ограничена скоростью теплопередачи через стенку камеры (при этом контакт реакционной камеры с нагревателем тоже считается идеальным), которая в основном зависит от толщины и тепловых характеристик применяемого материала. Основные характеристики для стеклянных и полимерных применяемых материалов (значения удельной теплоемкости, теплопроводности и температуропроводности) представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 Основные температурные характеристики применяемых материалов. [109]

Материал	Теплоемкость $c$ , Дж/кг · °С	Теплопроводность $\lambda$ , Вт/м · °С	Температуропроводность $\alpha \cdot 10^{-7}$ , м <sup>2</sup> /с
<b>Стеклянные материалы</b>			
К8	710	1,08	<b>6,1</b>
Ф1	522	0,81	<b>4,3</b>
<b>Полимерные материалы</b>			
ПММА	1200-1650	0,19 (0,162)	<b>1,3 (1,29·10<sup>7</sup>)</b>
ПК	1100-2000	0,21 (0,161)	<b>1,7 (1,68·10<sup>7</sup>)</b>

Размеры и толщина стенок реакционной камеры зависят от способов изготовления микрочипового устройства, методов формирования камеры, конструкционной прочности применяемых материалов. Разрабатываемое микрочиповое устройство для ПЦР представляет собой герметично соединенные относительно тонкие пластины, в одной из которых выполнены реакционные камеры, вторая пластина является защитной (герметизирующей). При условии применения плоского твердотельного внешнего нагревателя изменение температуры микрочипа происходит преимущественно в вертикальной плоскости, и чем тоньше нагреваемый слой, тем быстрее проходит теплообмен. Применение тонких пластин для формирования камеры с одной с одной стороны способствует повышению скорости теплообмена, с другой стороны ограничено конструкционной прочностью пластин из применяемого материала.

Для изготовления микрочипов из стекла марки К8 в качестве подложки с микроструктурами применялись стеклянные пластины толщиной от 0,5 до 2 мм, размером от 15×15 мм до 75×25 мм, а для герметизации – защитные пластины толщиной от 0,15 до 0,5 мм. Использование пластин толщиной 2 мм приводит к существенному увеличению массы

исходной заготовки, а стеклянные пластины толщиной 0,5 мм при габаритном размере 75×25 мм являются относительно хрупкими и не подходят для многократного проиенения микрочиповых устройств. При использовании защитных пластин толщиной 0,15 мм повышается риск случайного разрушения пластин, что приведет к разгерметизации уже готового устройства. Поэтому стеклянные пластины толщиной 1 мм применяли для формирования реакционных камер для ПЦР, а в качестве герметизирующих были выбраны пластины толщиной 0,3 мм.

Для изготовления реакционных камер из полимерного материала использовали пластины толщиной 1 мм. Применение более тонких полимерных материалов повышает вероятность пластической деформации полимера в процессе изготовления микроструктур или при эксплуатации во время циклического нагрева и охлаждения.

Рассмотрим идеальную систему, состоящую из плоского нагревателя и микрочипа, при этом контакт нагревателя с поверхностью микрочипа полагается максимально эффективным. Температура одной из стенок (нижней) образца задается нагревателем. В этом случае изменение температуры на дальней (верхней) стенке образца зависит от применяемой схемы нагревателя. Возможны следующие случаи: 1) открытый термостат, когда верхняя стенка устройства постоянно охлаждается воздухом комнатной температуры; 2) закрытый термостат, когда верхняя стенка соприкасается с изолирующим материалом с малым коэффициентом теплопроводности; 3) пассивная термокрышка, когда температура соприкасающейся крышки задается и остается постоянной на протяжении всего измерения; 4) активная термокрышка, когда температура (соприкасающейся) крышки меняется согласно температуре нижнего нагревателя, т.е. происходит симметричный нагрев относительно центра пластины.

Схема нагрева (1) может являться примером случая, когда размер микрочипа много меньше размера камеры термоциклера и воздух в камере нагревается достаточно медленно. Решение этого случая для циклического нагрева стеклянных пластин толщиной 1 мм было рассмотрено в [110]. Применение этой схемы нагрева приводит к значительному перегреву нижних слоев микрочипа для достижения заданной температуры в реакционной камере.

Схема нагрева (2) является предельным случаем, когда размер камеры термоциклера предельно приближается к размеру микрочипа, при этом материал термо-крышки по сути является дополнительным верхним слоем микрочипа. В данном случае допускается, что материал термо-крышки заведомо обладает малым коэффициентом теплопроводности и после предварительного прогрева и выхода на стабильное температурное равновесие системы может считаться обладающим изолирующими свойствами.

Схема нагрева (3) широко распространена в конструкциях современного оборудования для проведения ПЦР-РВ. Нагрев термо-крышки до 100°C позволяет предотвратить

конденсацию жидкости на верхней части реакционного объема. Однако для проведения ПЦР в геле высокая температура в верхней части камеры может привести к уменьшению вязкости геля и повышению интенсивности диффузии полимерных цепочек ДНК в верхних слоях геля. Согласно гипотезе А.Б. Четверина колонии формируются на поверхности геля, а увеличение коэффициента диффузии фрагментов ДНК может привести к «размытию» колоний, то есть увеличению размеров и уменьшению яркости отдельных колоний. Поэтому при реализации схемы (3) следует подбирать такие значения температуры крышки термостата, которые позволили бы увеличить скорость прогрева реакционной камеры с гарантированным отсутствием перегрева верхней ее части.

Схема (4) является наиболее предпочтительной, так как позволяет значительно сократить время, необходимое для нагрева микрочипового устройства. Ограничением такой схемы является сложность реализации, особенно при регистрации сигнала флуоресценции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Регистрация результатов ПЦР в геле по конечной точке позволяет применять такую схему нагрева. Поэтому для расчетов выбираем вариант схемы нагрева (4), когда нагрев осуществляется с двух сторон микрочипа по одинаковой программе (симметричный нагрев).

Для расчетов теплопереноса через слои твердого материала можно выделить два подхода к моделированию: 1) послойное моделирование, каждый слой имеет свою температуропроводность, 2) моделирование со средней теплопроводностью, когда свойства всех слоев усредняются. [110] Рассчитываемая система состоит из трех слоев: нижняя стенка микрочипа, реакционная камера, верхняя стенка микрочипа. Расчетная толщина реакционной камеры составляет 200 мкм, что соответствует от 10 до 15% от суммарной толщины слоев. При условии одинаковой теплопроводности наружных слоев и малой толщины промежуточного слоя можно воспользоваться вторым подходом с вычислением среднего арифметического значения теплопроводности.

Суммарная толщина трех слоев равна толщине микрочипового устройства и составляет 1,3 мм и 2 мм, в зависимости от применяемого материала (при этом толщиной клеевого слоя пренебрегаем). Коэффициент температуропроводности промежуточного слоя, заполненного гелем и водным раствором, примем равным коэффициенту температуропроводности водоподобных жидкостей, а именно  $1,4 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ . Средний коэффициент температуропроводности определим как арифметическое среднее для применяемых материалов с учетом их вклада. Для стеклянных устройств такой коэффициент температуропроводности равен  $5,4 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ , для полимерных устройств среднее арифметическое значения коэффициента температуропроводности слоев практически не отличается от температуропроводности

применяемых материалов. Для расчетов в качестве материала микрочипа выберем полиметилметакрилат с коэффициентом температуропроводности равным  $1,3 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ .

Так как изменение температуры происходит в основном в вертикальной плоскости, то изменением температуры в горизонтальной плоскости можно пренебречь, таким образом, задача является пространственно одномерной. Изменение температуры твердой пластины происходит преимущественно за счет теплопереноса и, следовательно, определяется дифференциальным уравнением теплопроводности Фурье. Если допустить, что значения теплопроводности  $\lambda$ , плотности  $\rho$  и теплоемкости  $c$  материалов в заданном диапазоне температур (от 20 до 95С) меняются незначительно, то для расчетов примем их постоянными, тогда уравнение теплопроводности для пластины записывается в виде:

$$\frac{\partial t}{\partial \tau} = a \frac{\partial^2 t}{\partial x^2} \quad (2)$$

где  $a = \lambda / \rho c$  - коэффициент температуропроводности, который характеризует скорость изменения температуры тела и является мерой теплоинерционных свойств.

Для решения уравнения воспользуемся методом конечных разностей. В этом случае истинные производные в дифференциальных уравнениях теплопроводности в данной точке заменяются приближенными:

$$\frac{\Delta t}{\Delta \tau} = a \frac{\Delta^2 t}{(\Delta x)^2} \quad (3)$$

Приближенные значения производных определяются через конечные разности независимых переменных  $\Delta x$ ,  $\Delta t$  и через значения температур в избранных точках тела. В соответствии с этим вся толщина пластины разбивается на  $n$  элементарных слоев толщиной  $\Delta x$ , а общая продолжительность процесса на  $m$  элементарных участках длительностью  $\Delta \tau = \tau / m$ .

Температура в каждом слое  $\Delta x$  в момент времени  $\Delta \tau$  рассчитывается по формуле:

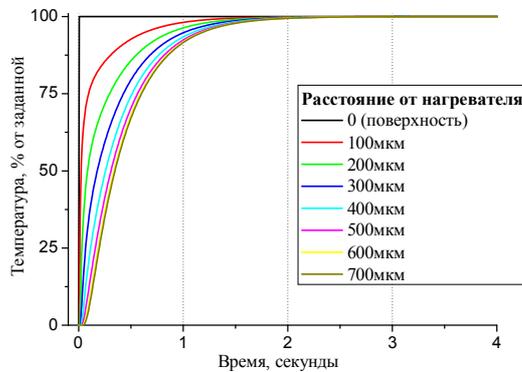
$$t_{i,k+1} = (1 - 2\sigma)t_{i,k} + \sigma(t_{i-1,k} + t_{i+1,k}) \quad (4)$$

где  $\sigma = a\tau / \Delta x^2$  - число подобия Фурье  $Fo$ , отнесенное к слою толщиной  $\Delta x$  и промежутку времени  $\Delta \tau$ . Для устойчивости решения и уменьшения погрешности значение подобия Фурье должно быть не больше 0,5.

При термоциклировании в условиях идеального нагревателя происходит многократное изменение температуры реакционной смеси с температуры денатурации ДНК при  $93 \div 97^\circ\text{C}$  до температуры отжига, величина которой составляет от  $55$  до  $75^\circ\text{C}$  и обратно до температуры денатурации. Примем температуру денатурации и отжига равными  $95^\circ\text{C}$  и  $60^\circ\text{C}$ , тогда разница температур при термоциклировании составляет  $35^\circ\text{C}$ . При этом допустимую погрешность температур в цикле примем равной  $0,3^\circ\text{C}$ . На Рисунке 2.2 представлен график распределения

температурных полей в элементах стеклянного (а) и полимерного (б) микрочипового устройства при условии мгновенного симметричного нагрева.

а)



б)

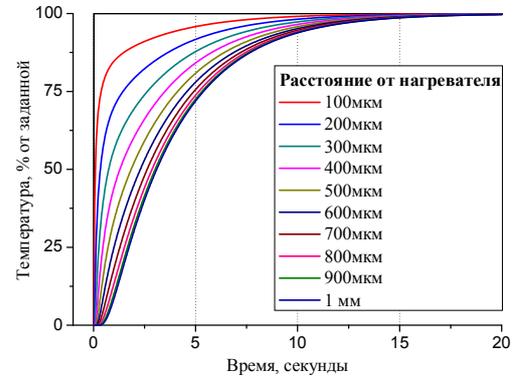
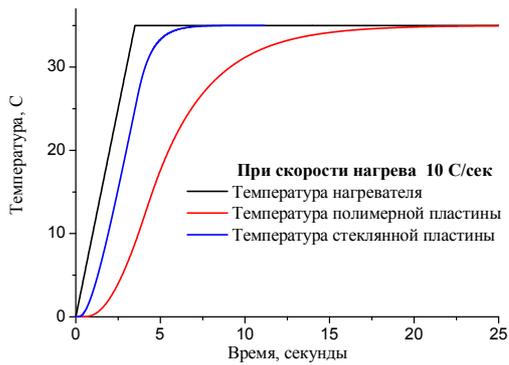


Рисунок 2.2 Распределения температурных полей при мгновенном симметричном нагреве в микрочиповом устройстве на основе: а) стеклянных материалов, б) полимерных материалов.

При нагреве микрочипового устройства на 35 С потребуется примерно 2 секунды (от 1,5 до 1,8 секунд) для устройства из стеклянных материалов, и около 17 секунд (16,5 секунд) для устройства из полимерных материалов. После 16,1 секунды нагрева температура всех слоев полимерной пластины будет выше температуры 34,65°C при заданной пороговой температуре 34,7°C. Следовательно, продолжительность в 16 секунд считать достаточной для нагрева полимерной пластины. Границы реакционной камеры в стеклянном микрочипе расположены несимметрично относительно центра, на расстоянии 300 и 500 мкм от нагревателя. По расчетным данным разница температур на границах камеры после 2 секунд нагрева не должна превышать 0,3°C, следовательно несимметричность расположения камеры не оказывает существенного влияния на равномерность распределения температуры при нагреве.

Для проведения ПЦР применяют специальные коммерческие нагревательные устройства (термоциклеры), обеспечивающие скорость нагрева обычно от 2 до 10°C/сек и скорость охлаждения от 1 до 5°C/сек. Существуют альтернативные подходы, позволяющие на порядок повысить скорость изменения температуры [11], однако в данной работе рассмотрим наиболее распространенный вариант, когда скорость нагрева составляет 5 и 10°C/сек, а скорость охлаждения 1 и 2°C/сек. [107, 108] Если считать, что изменение температуры нагревательного устройства происходит равномерно и линейно зависит от времени, то зависимость изменения температуры пластины от материала при скорости нагрева 10°C/сек и 5°C/сек представлена на Рисунке 2.3.

а)



б)

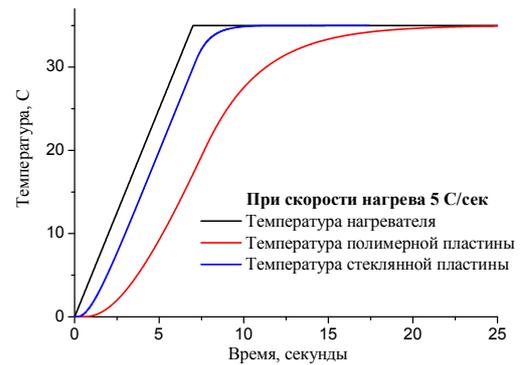


Рисунок 2.3 Изменения температуры центральной части микрочипового устройства при равномерном симметричном линейном нагреве со скоростью: а)  $10^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ ; б)  $5^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ .

Продолжительность нагрева, необходимая для изменения температуры полимерного микрочипового устройства на  $34,7^{\circ}\text{C}$  при условии равномерного симметричного нагрева, приведена в Таблице 2.5. Для полимерных пластин при скорости нагрева  $10^{\circ}\text{C}/\text{сек}$  и  $5^{\circ}\text{C}/\text{сек}$  время отставания температуры центра пластины от температуры нагревателя составляет: 15 и 13,7 секунд. При скорости охлаждения  $2^{\circ}\text{C}/\text{сек}$  и  $1^{\circ}\text{C}/\text{сек}$  время отставания температуры центра пластины от температуры нагревателя составляет примерно 11 и 9 секунд для полимерных пластин.

Таблица 2.5 Продолжительность нагрева полимерного микрочипового устройства на  $35^{\circ}\text{C}$  при условии равномерного симметричного изменения температуры с известной скоростью

Скорость изменения температуры, C/секунду	Продолжительность, секунды
10	15
5	14
2	11
1	9

Если считать, что изменение температуры нагревательного устройства происходит равномерно и линейно, то поправка для полимерных пластин составляет  $14\div 15$  секунд для нагрева и  $9\div 11$  секунд для охлаждения в зависимости от скорости изменения температуры.

Для подтверждения результатов теоретических оценок были проведены экспериментальные исследования скорости нагрева полимерных устройств с применением специального приспособления (Рисунок 2.4 б), представляющего собой измерительное устройство, встроенное в полимерную пластину толщиной 1 мм. Экспериментально

полученные значения изменения температуры от комнатной до 95°C оказались около одной минуты (55 секунд), при этом расчетные значения продолжительности нагрева полимерного устройства от комнатной температуры до 95°C составляет около 20 секунд. Вероятно, экспериментальные значения обусловлены недостаточно качественным контактом нагреваемых поверхностей. Внесение дополнительного теплопроводящего слоя на основе глицерина (теплопроводность около  $290 \times 10^3$  Вт/(м·К) [111]), позволило улучшить контакт и соответственно теплопередачу между нагревательной поверхностью и полимером, при этом время, необходимое для нагрева полимерной пластины, уменьшилось до 30 секунд, что сопоставимо с значениями теоретических расчетов.

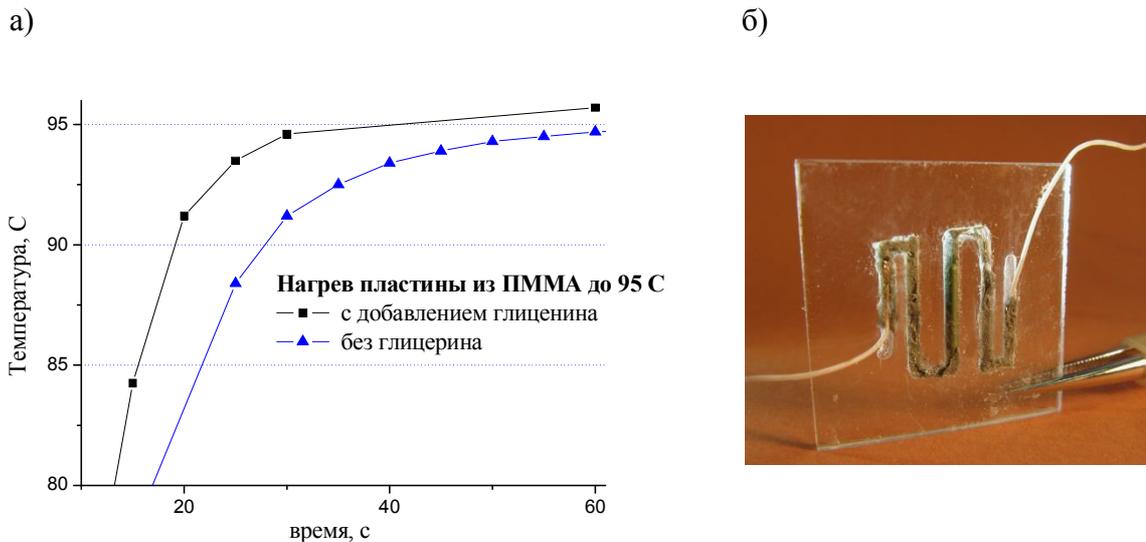


Рисунок 2.4 а) Нагрев полимерной пластины до 95°C. б) Изображение измерительного устройства, встроенного в полимерную пластину.

### 2.3. Оценка погрешности счета колоний

Одной из причин погрешности счета молекулярных колоний при обработке результатов цПЦР в геле является ошибочная интерпретация объединенного изображения нескольких колоний как единого объекта. Для определения погрешности прямого счета молекулярных колоний необходимо учитывать вероятность множественного (двух и более) их совпадения. Для условий случайного и равномерного распределения молекулярных колоний в реакционной камере предложен способ оценки погрешности счета молекулярных колоний, основанный на применении классических комбинаторных схем (выбор без возвращения), подробно описанный в совместной публикации [112].

Предположим, что в процессе амплификации формируются круглые молекулярные колонии радиуса ( $r$ ), которые случайно и равномерно распределены по реакционной камере радиуса ( $R$ ). Известно, что при наложении друг на друга двух соседних колоний, расстояние

между центрами которых менее  $k\tau$ , где  $k \sim 0.4 \div 0.6$ , они интерпретируются, как один объект. [88] Следовательно, круг радиуса  $k\tau$  можно трактовать, как своеобразный «разряд». Отношение  $N$  площади реакционной камеры к площади «разряда» дает общее число «разрядов».

Таким образом, модель счета молекулярных колоний можно представить классической комбинаторной задачей последовательного выбора без возвращения из группы  $N$  элементов с числом повторений  $m$  равным числу колоний. В результате вероятностная модель счета молекулярных колоний аналогична классической комбинаторной задаче последовательного выбора без возвращения из группы  $N$  элементов с числом повторений  $m$  равным числу колоний. Эта задача подробно обсуждена, например, в [113].

Базовые формулы:

- вероятность того, что ни одна из колоний не пересекается с соседними и погрешность количественного анализа отсутствует:

$$P[0] = (N-1)(N-2)\dots(N-m+1) / N^{m-1} \quad (5)$$

- вероятность наличия одной пары пересекающихся колоний, что приводит к занижению числа колоний на 1 составляет:

$$P[1:2] = C_m^2 (N-1)\dots(N-m+2) / N^{m-1} \quad (6)$$

- вероятности наличия двух пар или одной тройки пересекающихся колоний, что приводит к ошибке счета на 2, соответственно составляет:

$$P[2:2] = \frac{1}{2!} C_m^2 C_{m-2}^2 (N-1)\dots(N-m+3) / N^{m-1} \quad (7)$$

$$P[1:3] = C_m^3 (N-1)\dots(N-m+3) / N^{m-1} \quad (8)$$

Аналогично рассчитываются вероятности более сложных схем пересечения колоний и, как следствие, вероятности соответствующей ошибки количественного анализа. Задавая  $m$  и  $N$ , можно найти и математическое ожидание соответствующей ошибки оценивания.

Таким образом, можно рассчитать вероятности безошибочного счета колоний (без совпадения), 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. Например, для регистрации 100 колоний с математическим ожиданием (-2) и вероятностью  $\sim 10\%$  ошибки счета на 4 и более колоний в реакционной камере диаметром 14 мм необходимо обеспечить формирование колоний с характерным радиусом не более 134 мкм.

Выбор величины  $k$ , соответствующей минимальному расстоянию между центрами колоний  $k\tau$  для их разделения и идентификации как отдельных объектов, оказывает значительное влияние на результат расчетов. Например, в зависимости от величины  $k$  число

возможных пересечений колоний, а, следовательно, и число «разрядов», изменяется от 500 до 1200 (Таблице 2.6) для молекулярных колоний диаметром 1 мм в реакционной камере диаметром 14 мм.

Таблица 2.6 Количество «разрядов» для молекулярных колоний диаметром 1 мм в реакционной камере диаметром 14 мм при разных условиях.

Минимальное расстояние между центрами двух колоний $kr$ , мкм	0,4	0,5	0,6
Число возможных пересечений колоний	1225	784	544

В качестве «разряда» предложено применять экспериментально полученные оценки характерного диаметра молекулярных колоний, определяемого на полувысоте сигнала флуоресценции молекулярных колоний. Если допустить, что график пространственного распределения сигнала флуоресценции по диаметру колонии можно описать гауссианной и центры двух колоний находятся на расстоянии двух характерных радиусов или ближе, то разрешение пиков вызывает затруднение (Рисунок 2.5 ) и две молекулярные колонии могут ошибочно интерпретироваться как один объект.

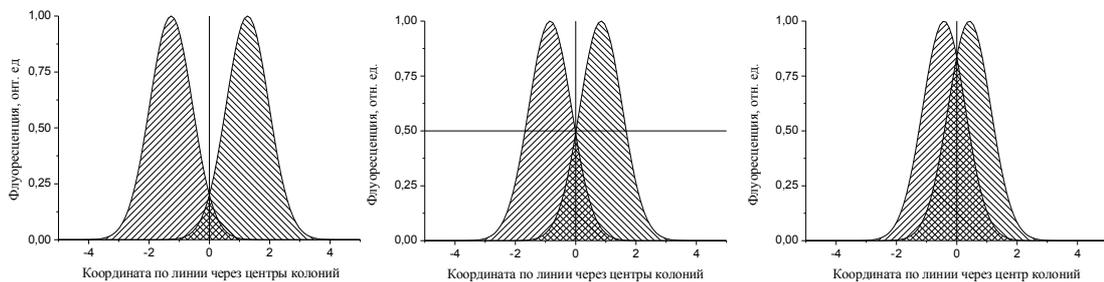


Рисунок 2.5. Варианты Распределения сигнала флуоресценции по диаметру колонии.

Оценки вероятности безошибочного счета, а также вероятности ошибок счета на 1 и 2 объекта, вызванные случайным пересечением молекулярных колоний в реакционной камере стеклянного микрочипового устройства (диаметром 14 мм), представлены в Таблице 2.7. При размещении в реакционной камере 10 молекулярных колоний с характерным радиусом 330 и 160 мкм вероятность их пересечения мала и составляет менее 10%. Вероятность ошибки счета более чем на одну колонию составляет менее 3% для всех анализируемых фрагментов.

Таблица 2.7 Вероятность ошибки счета колоний в реакционной камере диаметром 14 мм

Длина фрагмента, п.о.	Характерный радиус колонии, мкм	Вероятность ошибки счета (%) на n колоний						
		n=0 %	n=1	n=2	n=0	n=1	n=2	n=3
		для 10 колоний			для 30 колоний			
210	570	<b>73,8</b>	<b>23,4</b>	2,7	4,6	<b>16,2</b>	<b>26,2</b>	<b>21,9</b>
309	330	<b>90,4</b>	9,2	0,3	<b>37,2</b>	<b>38,5</b>	<b>18,1</b>	4,4
494	160	<b>97,7</b>	2,3	0,02	<b>79,6</b>	<b>18,4</b>	1,9	0,1

При размещении в реакционной камере диаметром 14 мм 30 молекулярных колоний вероятность ошибки счета более чем на одну колонию составляет менее 2% для колоний с характерным радиусом 160 мкм. Для колоний с радиусом 330 мкм с вероятностью 94% ошибка счета не превысит двух недосчитанных колоний. Для колоний с характерным радиусом 570 мкм заниженная оценка математического ожидания числа недосчитанных колоний составляет (-3,4).

В Таблице 2.8 приведены оценки максимального числа колоний, для которого с вероятностью 90% выполняются следующие условия: а) безошибочный счет (отсутствие совпадений колоний), б) ошибка счета не более чем на 1 колонию, в) ошибка счета не более чем на 4 колонии.

Таблица 2.8 Максимальное число колоний, регистрируемое при анализе ММК в реакционной камере (диаметром 14 мм), с вероятностью 90% соответствующее заданной погрешности счета

Длина фрагмента, п.о.	Безошибочного счета	Ошибки счета не более чем на 1 колонию	Ошибки счета не более чем на 4 колонии
210	6 колоний	13 колоний	26 колоний
310	10 колоний	23 колонии	46 колоний
494	20 колоний	46 колоний	100 колоний

Следовательно, при заданных условиях максимальное количество колоний в реакционной камере, определяемое с погрешностью счета до четырех колоний, составляет от нескольких десятков до ста молекулярных колоний.

## 2.4. Основные результаты главы 2

Во второй главе рассматривалась возможность применения стеклянных (К8) и полимерных (ПММА) материалов отечественного производства для изготовления микрочиповых устройств.

Для условий симметричного вертикального нагрева реакционной камеры глубиной 200 мкм в подложке толщиной 1 мм, рассчитана поправка к 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.

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). Также такой подход позволяет определить максимальное число молекулярных колоний, регистрируемое в данных условиях с заданной погрешностью счета или оценить требуемый размер молекулярных колоний, соответствующий заданным характеристикам.

### Глава 3. Технологические исследования

Третья глава диссертации посвящена экспериментальным исследованиям оптических свойств материала, технологическим исследованиям, связанным с выбором и адаптацией способов изготовления, модификации и герметизации реакционных камер при создании микрочиповых устройств для ПЦР.

#### 3.1. Оптические свойства материалов

##### Спектральные зависимости светопропускания материалов

Измерение спектров пропускания материалов проводили на спектрофотометре Hitachi F4010 (Япония) при ширине щели 2 нм и скорости сканирования спектра 120 нм/мин и 240 нм/мин в диапазоне длин волн 250-850 нм и 850-2500 нм. Результаты представлены на Рисунке 3.1.

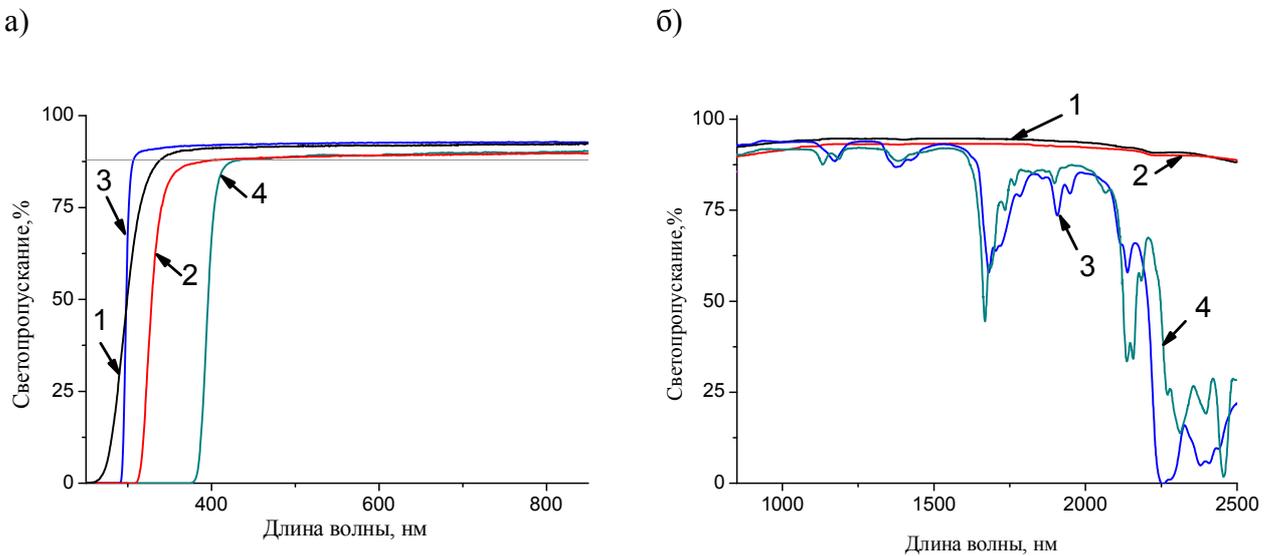


Рисунок 3.1 Спектральные зависимости светопропускания материалов: 1 - крон (К8), 2 - флинт (Ф1); 3 - полиметилметакрилат (ПММА), 4- поликарбонат (ПК) – в диапазоне: а) 250-850 нм, б) 850-2500 нм.

Для стеклянных материалов марок К8 и Ф1 (толщиной 0,5 мм) характерна величина светопропускания составляет  $88\div 90\%$  в диапазоне от 360 нм и 390 нм до 2100 нм соответственно. Для полимерных материалов ПММА и ПК светопропускание не менее 88% достигается в диапазоне от 310 нм для ПММА и 430 нм для ПК до 1100 нм. Следовательно, все применяемые материалы являются прозрачными ( $\geq 85\%$ ) в большей части видимого диапазона (примерно от 430 до 800 нм), что позволяет использовать их для изготовления прозрачных конструкций микрочиповых устройств для ПЦР.

Были проведены исследования полиметилметакрилата марок ТОСП<sup>®</sup>, ТОСН и АCRYMA<sup>®</sup>72 в ближнем инфракрасном (БИК) и ультрафиолетовом диапазонах. Спектры

пропускания этих образцов, толщиной 1 мм, в области от 850 до 2500, не показали значимых различий (Рисунок 3.2). В ближней ультрафиолетовой области УФ-А (от 315 до 400нм) наиболее прозрачным является материал марки ТОСП<sup>®</sup>, величина светопропускания которого превышает 90% во всем диапазоне от 315 до 400 нм. Образцы марок ТОСН и АCRYМА<sup>®</sup>72 достигают подобного значения светопропускания при 365 нм и 390 нм, соответственно. Экструзионный акриловый пластик марки АCRYМА<sup>®</sup>72 частично пропускает ультрафиолетовый свет в диапазоне от 255 до 365 нм, при этом величина светопропускания составляет от 9% до 26% с максимумами пропускания на длинах волн 265 нм (26%) и 315 нм (16%).

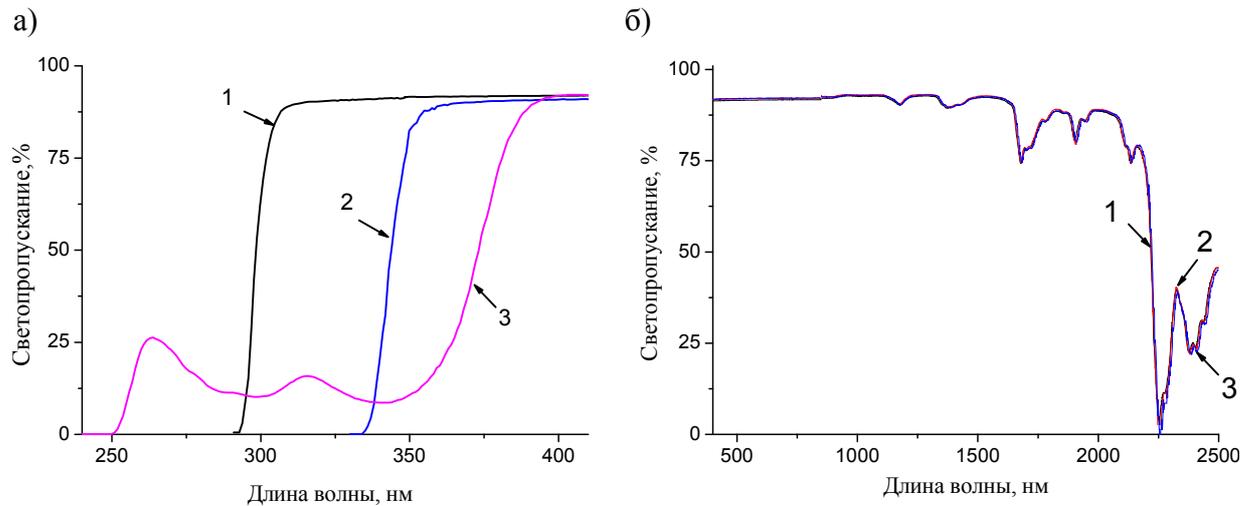


Рисунок 3.2 Спектральные зависимости светопропускания полиметилметакрилата марок: 1-ТОСП<sup>®</sup>, 2-ТОСН, 3-АCRYМА<sup>®</sup>72: а) в ультрафиолетовой области (от 240 до 410 нм); б) в видимой и ближней инфракрасной области (от 400 до 2500 нм).

Таким образом, из применяемых марок полиметилметакрилата (ТОСП<sup>®</sup>, ТОСН, АCRYМА<sup>®</sup>72) наиболее подходящим для использования в ближней ультрафиолетовой области является блочное оргстекло марки ТОСП<sup>®</sup>. Этот материал также перспективен в сочетании с клеевыми композициями, отверждаемыми под действием ультрафиолетового излучения А-диапазона. При использовании клеевых композиций, отверждаемых под действием УФ-Б можно применять материал марки АCRYМА<sup>®</sup>72, однако в таком случае низкий процент светопропускания (10÷25%) обуславливает необходимость подбора условий отверждения.

### Спектры флуоресценции

Для контроля фоновой флуоресценции применяемых материалов на длинах волн возбуждения (473, 488, 530, 590, 630 нм) были измерены спектральные зависимости флуоресценции на спектрофлуориметре HitachiF-4010 (Япония) при скорости сканирования спектра 240 нм/мин и ширине щели 5 нм. Измерения показали отсутствие значимой

флуоресценции стеклянных материалов и полиметилметакрилата, в то время как для поликарбоната характерна фоновая флуоресценция (с максимумом на длине волны 520 нм при возбуждении на 473 нм), сходная со спектрам возбуждения флуоресцентных красителей, применяемых для ПЦР-РВ (FAM, SYBRGreen). Спектры флуоресценции выбранных стеклянных и полимерных материалов на длине волны возбуждения 473 нм приведены на Рисунке 3.3.

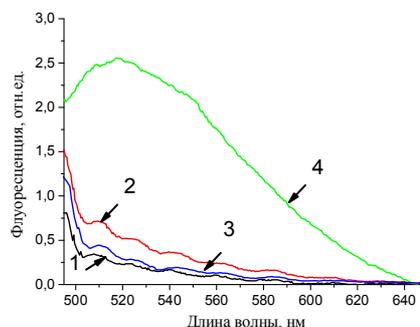


Рисунок 3.3 Спектральные зависимости сигнала флуоресценции на длине волны возбуждения 473 нм для: 1 - стекла марки К8, 2 - стекла марки Ф1, 3 - полиметилметакрилата (ПММА), 4 - поликарбоната (ПК).

Измерение спектров фоновой флуоресценции ПММА марок ТОСП<sup>®</sup>, ТОСН, АСРУМА<sup>®</sup>72 на длинах волн возбуждения 473 и 488 нм, 530 нм, 590 нм, 625 нм показало отсутствие значимой флуоресценции полиметилметакрилата марок ТОСП<sup>®</sup> и ТОСН, а также незначительную фоновую флуоресценцию на длине волны возбуждения 530 нм для материала марки АСРУМА<sup>®</sup>72, представленную на Рисунке 3.4. Таким образом, характеристики применяемых полимеров позволяют применять эти материалы для ПЦР с использованием наиболее распространенных флуоресцентных красителей.

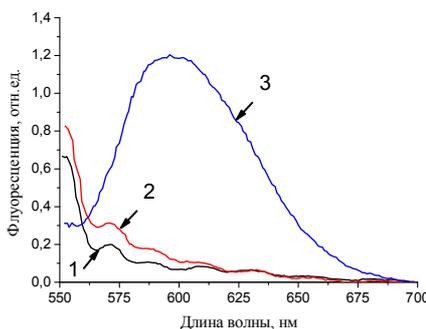


Рисунок 3.4 Спектральные зависимости сигнала флуоресценции при возбуждении на длине волны 530 нм для полиметилметакрилата марок: 1 – ТОСП<sup>®</sup>, 2 – ТОСН, 3 – АСРУМА<sup>®</sup>72.

В качестве основного полимерного материала выбран полиметилметакрилат марки ТОСП<sup>®</sup>, который обладает низкой фоновой флуоресценцией и является прозрачными в области ультрафиолетового излучения (А-диапазона), что позволяет использовать для соединения

пластин фотоотверждаемые полимерные композиции, тем самым создавая возможность применения низкотемпературных способов герметизации микроструктур с термочувствительными функциональными элементами (гелевым слоем).

### 3.2. Формирование микроструктур

Для применяемых материалов рассмотрены технологии формирования реакционных камер для ПЦР в стеклянных и полимерных подложках, приведены результаты исследования поверхности сформированных микроструктур.

#### 3.2.1. Стеклянные материалы

Для создания реакционных камер в стекле марки К8 применялись технологии фотолитографии и кислотного травления. Химическая активность при травлении зависит от состава раствора и подложки, условий травления (температуры, скорости перемешивания и др.). Максимальная глубина каналов определяется многими факторами, в том числе степенью устойчивости защитного слоя. Для получения реакционных камер для ПЦР глубиной 200 мкм применялись технологические приемы по усилению защитного покрытия слоем фоторезиста. [34] В стеклянных подложках из стекла марки К8, размером 15×15, 24×24 или 75×24 мм были выполнены реакционные камеры глубиной 100, 150 и 200 мкм. Формирование микроструктур осуществлялось на базе "Светлана-Полупроводники" (Санкт-Петербург). Пример изображения заготовки для микрочипового устройства приведен на рисунке 3.5.

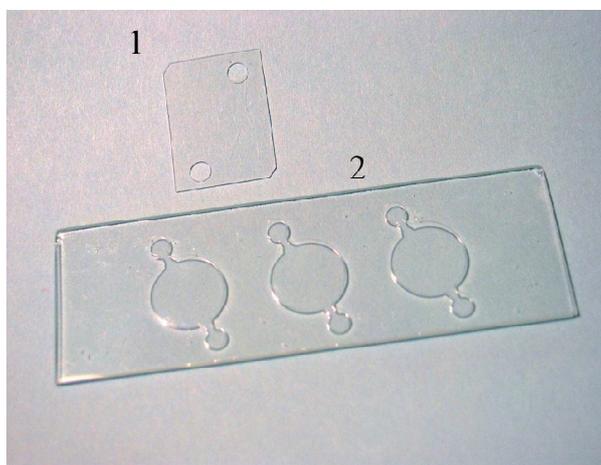


Рисунок 3.5 Изображение заготовок для стеклянного микрочипового устройства:

1 – защитная пластина, 2 – подложка с реакционными камерами. [102]

Поверхность реакционных камер, сформированных после кислотного травления, исследовали методами оптической микроскопии на сканирующем ближнепольном микроскопе (СБОМ) "NTEGRASolaris" (НТ-МДТ, Россия) в режиме микроскопии поперечных сил. Изображения поверхности реакционной камеры после кислотного травления и поверхности

стеклянной подложки, покрытой во время травления защитной хромовой маской, приведены на Рисунке 3.6.

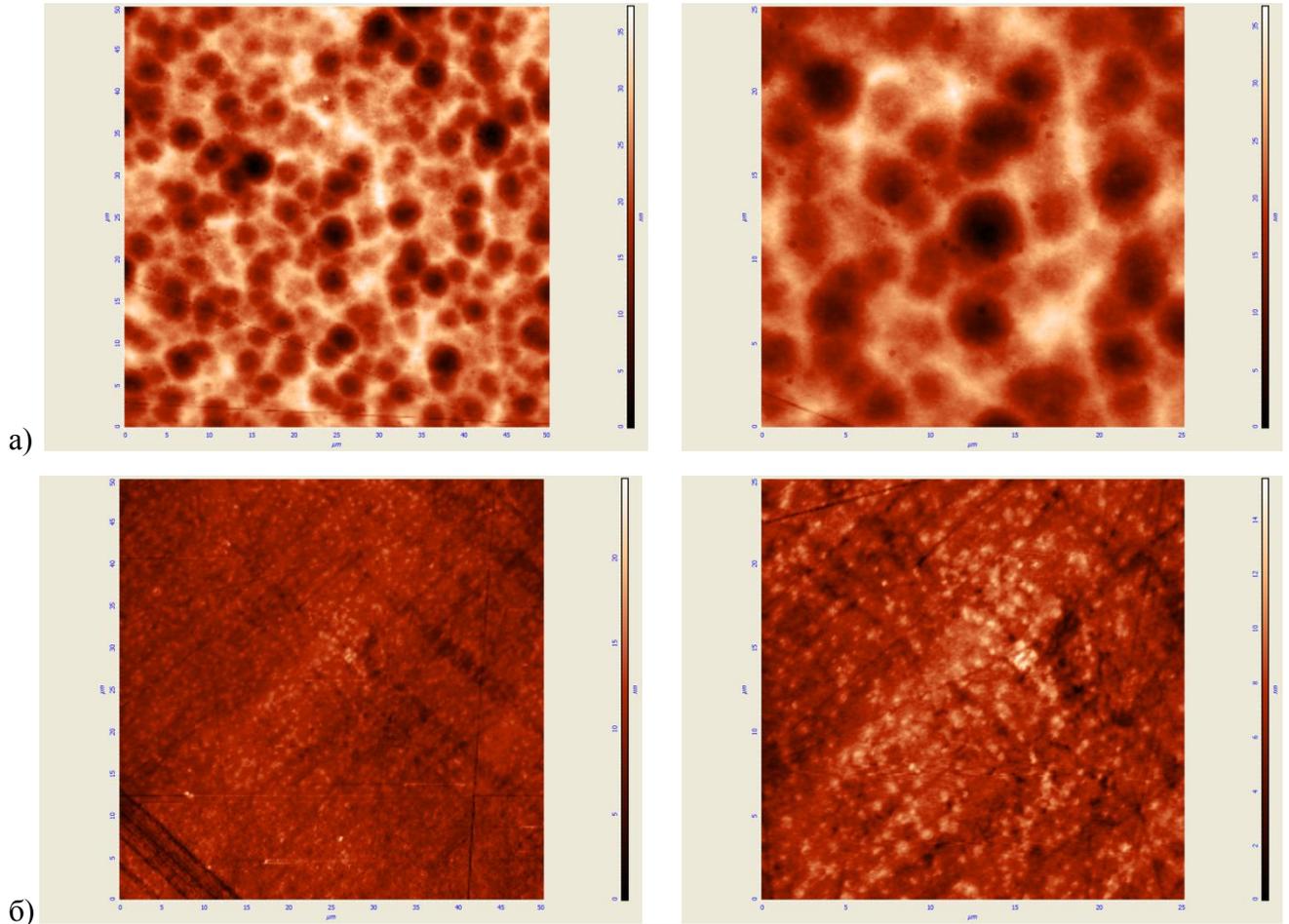


Рисунок 3.6 Изображения поверхности стеклянной пластины марки К8, полученные на СБОМ: а) после кислотного травления (поверхность реакционной камеры), б) поверхность, защищенная во время травления металлической маской. Размер изображений 50×50 мкм и 25×25 мкм.

После кислотного травления на поверхности стекла образуется пористая структура (с диаметром пор около 2-4 мкм), в то время как поверхность, защищенная во время травления хромовой маской, сохраняет однородную непористую структуру с небольшими выступами высотой несколько нанометров и размерами от 300 до 700 нм. Величина шероховатости ( $R_a$ ) по результатам сканирования поверхности площадью 50×50 мкм составляет 2 нм для необработанной поверхности, а после кислотного травления равна 3-4 нм. Зарегистрированное увеличение пористости и шероховатости поверхности стекла К8 после обработки кислотными растворами не приводит к существенным изменениям прозрачности материала, что позволяет применять метод кислотного травления для изготовления оптически прозрачных микроструктур для микрочиповых устройств.

### 3.2.2. Полимерные материалы

Полимерные материалы обладают значительно более низкой себестоимостью по сравнению со стеклянными материалами. Снижение стоимости конечного изделия за счет применения высокопроизводительных методов обработки полимерных материалов позволяет реализовать массовое производство полимерных микрочипов для однократного использования. Для изготовления реакционных камер для ПЦР в полимерных подложках использовали технологии, позволяющие создавать однотипные заготовки из листового материала: термоформование (горячее прессование), механическую и лазерную микрообработку.

#### Термоформование (горячее прессование)

В лабораторных условиях для изготовления однотипных планарных изделий из листового полимера наиболее простым является метод горячего прессования (горячей штамповки), позволяющий применять широкий спектр термопластичных полимеров (ПК, ПММА, ПЭТ и др.) для изготовления прототипов, необходимых на этапе предварительных исследований. Длительность изготовления зависит от скорости и температуры нагрева материал и при использовании специального оборудования (термопресса) занимает около 5-15 минут. К достоинствам этого метода относятся: возможность полной автоматизации процесса изготовления при использовании специального оборудования, универсальность по типу обрабатываемых полимеров с упрощенным переходом от одного листового материала к другому. Особенности этого метода являются: ограниченный выбор рациональных штампуемых форм (например, углубления не могут превышать  $0,3 \cdot H$ , где  $H$  - высота/толщина изделия, в котором производится углубление), высокие требования к качеству поверхности пресс-форм, ограничения габаритного размера пластин-заготовок, обусловленные техническими характеристиками применяемого оборудования.

Для горячего прессования применяли вертикальный (механический) термопресс METAPRESS-M (Metkon, Великобритания) с диаметром рабочей камеры 4 см. Использовались матричные пресс-формы с пунсонами, задающими форму внутренней поверхности полимера: латунная пресс-форма с одной лункой диаметром 8 мм и стальные пресс-формы с двумя лунками, диаметр которых составлял 5 мм или 3 мм. В зависимости от длины выступающей части пуансона глубину формируемых структур меняли от 200 до 500 мкм, расчетный объем которых приведен в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 Зависимость расчетного объема реакционной камеры от геометрических параметров пресс-формы с пунсонами.

Диаметр пуансона, мм	Расчетная глубина камеры, мм	Расчетный объем камеры, мкл
8	200	10
8	500	25
5	500	10
3	500	4

Прототипы микрочиповых устройств для ПЦР размером (25×25×1) мм (ДхШхВ) с одной или двумя реакционными камерами из материалов ПК (BARLO, Германия) и ПММА («Дзержинское Оргстекло», Россия) изготавливались при нагреве материала до температуры 150°C для ПК и 95°C для ПММА и давлении от 70 до 200 МПа для пуансона диаметром 8 мм, до 140 МПа для пуансонов диаметром 5 мм, и для пуансонов меньшего диаметра не более 400 МПа. Для определения глубины микроструктур были проведены измерения образцов с камерой диаметром 8 мм с применением механического микрометра часового тип МКЦ-25 ГОСТ 6507-90 (Россия) с ценой деления 0,001 мм. Режимы формирования представлены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 Режимы термоформования реакционных камер диаметром 8 мм в полимерной подложке

Материал	Температура формования, °C	Давление пресса, МПа	Глубина камеры, мкм
ПК	150	196	470±5 (n=13)
ПК	150	74	220±5 (n=13)
ПММА	95	110	190±10 (n=5)

Превышение рекомендованной температуры изготовления сопровождалось появлением тонкой кромки (облой, грат) по краю камеры, высота которой достигала 100 мкм. Возникновение кромки связано с попаданием размягченного материала в полости между разъёмными частями пресс-формы. Обычно удаление облоя проводят механической обработкой с применением специального оборудования, однако введение дополнительной процедуры повышает трудоемкость и продолжительность изготовления микрочиповых устройств. Поэтому периодически проводили охлаждение установки, а также отбраковку образцов с кромкой более 50 мкм.



возможность варьировать значения диаметра и глубины камеры в широком диапазоне (диаметр – от 3 мм до нескольких сантиметров, глубина – от десятков микрометров до 70% от толщины образца). Механическая обработка позволяет получить структуры с отвесными краями. Однако если форма реакционной камеры не обладает осевой симметрией, то возрастает трудоемкость и сложность процедур изготовления. Невозможность автоматизации операций по выполнению реакционных камер является основным ограничением данного способа для массового производства.

В полимерных пластинах из ПММА марок ТОСП® и АCRYMA®72 выполнены реакционные камеры диаметром 8 мм и глубиной 200 мкм, 350 мкм или 600 мкм. На Рисунке 3.8. приведены изображение поверхности ПММА марки ТОСП® после механической обработки. Величина Ra шероховатости поверхности, измеренная на профилометре ХР-1 (AmbiosTechnology, Канада), составила 5 мкм, при этом светопропускание образцов в видимом диапазоне не превышает 15%, что значительно ниже светопропускания исходного материала (90%).

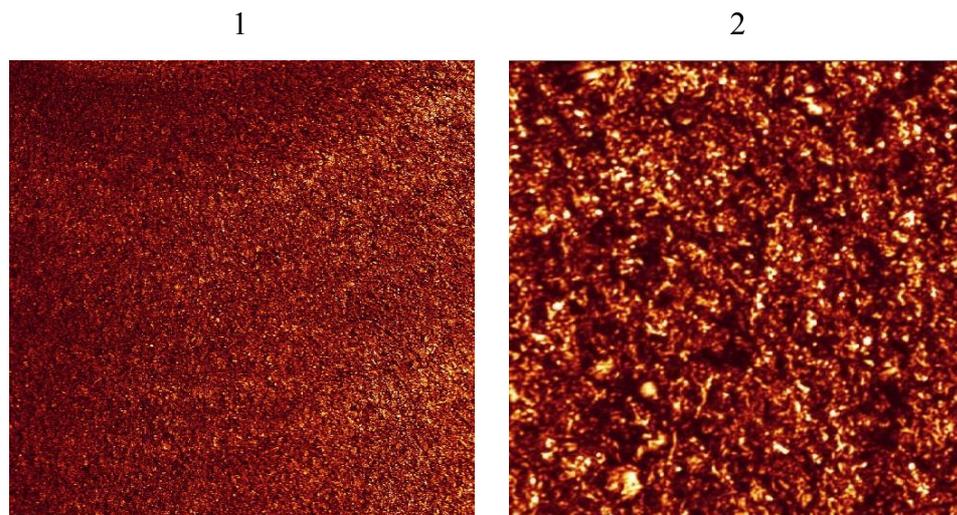


Рисунок 3.8 Изображения поверхности реакционной камеры, выполненной методом механической обработки в полимерной пластине из ПММА марки ТОСП®, полученные на КЛСМ в режиме отраженного света. Размер изображений: 1 – 1×1 мм; 2 – 150×150 мкм.

### **Лазерная микрообработка**

Лазерная обработка является перспективным способом изготовления микроструктур при создании большого количества однотипных микрочиповых устройств. К достоинствам этого метода относятся: возможность полной автоматизации процесса изготовления (с применением «маски» - программно заданного алгоритма обработки), универсальность форм и размеров изготавливаемых планарных структур и высокая скорость изготовления (зависит от площади обрабатываемой поверхности и выбранного режима и занимает от 0,5 до 5 минут). Для

обработки лазерным излучением обычно применяют высокотехнологичное оборудование, программное обеспечение которого позволяет оперативно корректировать форму структур (топологию) и изменять режимы изготовления микроструктур. Ограничениями этого метода являются: высокая стоимость оборудования и небольшой выбор обрабатываемых материалов. Также к особенностям лазерной микрообработки следует отнести неизбежное изменение поверхностной структуры материала под воздействием лазерного излучения.

Лазерная микрообработка проводилась на промышленной установке “SpeedyII” (Trotec, Германия) с лазером мощностью 25 Вт (длина волны излучения 10.6 мкм, 500 Гц) на базе научно-производственной компании «Лазерный центр» (Санкт-Петербург). Экспериментально полученная зависимость глубины формируемых микроструктур от мощности лазерного излучения (в диапазоне от 1,5 до 2,3 Вт, что составляет 6-9% от максимальной) при обработке ПММА марки ТОСП® приведена на Рисунке 3.9. При мощности ~1,8 Вт достигается требуемая глубина микроструктур (180÷200 мкм) с минимальным разбросом значений, поэтому этот режим был выбран для изготовления реакционных камер методом лазерной микрообработки.

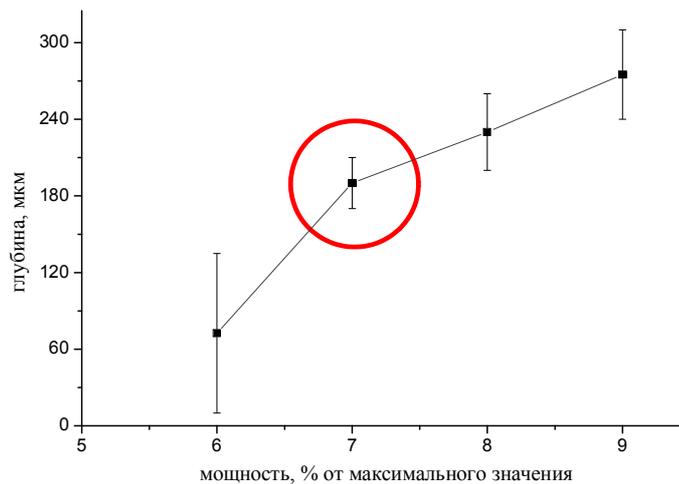


Рисунок 3.9 Зависимость глубины реакционной камеры при формировании методом лазерной микрообработки от мощности лазерного излучения (% от максимального значения, равного 25 Вт).

Изображение поверхности, полученной лазерным излучением мощностью 1,8 Вт, представлено на Рисунке 3.10. Под действием лазерного излучения формируется волнистая структура с углублениями по направлению перемещения лазерного луча. При этом шероховатость поверхности ( $R_a$ ), измеренная на профилометре в двух перпендикулярных направлениях, составила 4 мкм и 8 мкм, соответственно. Лазерной обработки, с периодом повторения около 130 мкм.

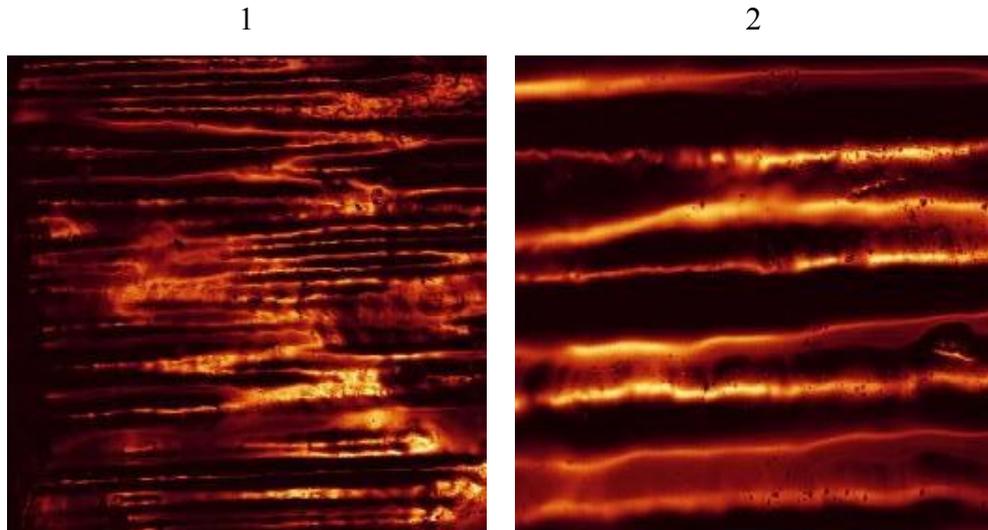


Рисунок 3.10 Изображения поверхности реакционной камеры, выполненной лазерной микрообработкой пластины ПММА марки ТОСП<sup>®</sup>, полученные на КЛСМ в режиме отраженного света. Размер изображений: 1 – 1×1 мм; 2 – 250×250 мкм.

Таким образом, из ПММА марки ТОСП<sup>®</sup> методами термоформования, механической и лазерной микрообработки были изготовлены заготовки (всего более 50 шт.) для прототипов микрочиповых устройств размером 24×24 мм с одной реакционной камерой диаметром 8 мм и глубиной 200 мкм. Сравнение геометрических характеристик и светопропускания реакционных камер из ПММА марки ТОСП<sup>®</sup>, выполненных разными методами, приведены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 Сравнение геометрических характеристик и светопропускания реакционных камер из ПММА марки ТОСП<sup>®</sup>, выполненных разными методами.

Метод изготовления / Параметр	Термоформование	Механическая обработка	Лазерная микрообработка
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 схемой 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 улучшает теплообмен 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 для проведения ПЦР в гелевой среде с несколькими реакционными камерами (было изготовлено 224 заготовки из ПММА марки ТОСП®).

### **3.3. Подготовка поверхности для иммобилизации геля**

Приготовление и полимеризацию геля для проведения цПЦР проводили согласно протоколу, изложенному в работе [77]. Для иммобилизации слоя полиакриламидного (ПАА) геля в реакционной камере микрочипов применяли процедуру модификации поверхности с использованием растворов силанов (например,  $\gamma$ -метакрилоксипропилтриметоксисилан (МОПТМС) в разбавленной уксусной кислоте). [114] Однако для полимерных устройств простые и оперативные методы силанизации поверхности только находятся в разработке. Большинство полимерных материалов обладают гидрофобными свойствами, плохо смачиваются растворителями, характеризуются низкими значениями поверхностной энергии. Поэтому перед иммобилизацией геля необходимо провести подготовку поверхности (модификацию) полимерных материалов с целью повышения их гидрофильности, а также увеличения числа реакционно-способных групп на поверхности используемого материала.

#### **3.3.1. Изменение поверхностных свойств стеклянных пластин**

Перед модификацией стеклянные реакционные камеры обрабатывали в химических растворах для очистки поверхности и придания ей гидрофильных свойств. Наиболее распространенными методами очистки стекла являются обработка в растворах на основе концентрированных кислот или щелочей. Однако необходимо контролировать изменение свойств поверхности реакционных камер стеклянных микрочипов после такой обработки. Было проведено исследование поверхности реакционных камер (полученных методом фотолитографии и кислотного травления) после длительной обработки в растворе хромовой смеси (5% раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте), а также в 0,5 М растворе гидроксида натрия, применяемых для модификации поверхности. Изображения поверхности реакционных камер, полученные методами оптической микроскопии на СБОМ

"NTEGRASolaris" (НТ-МДТ, Россия) в режиме микроскопии поперечных сил, приведены на Рисунке 3.11.

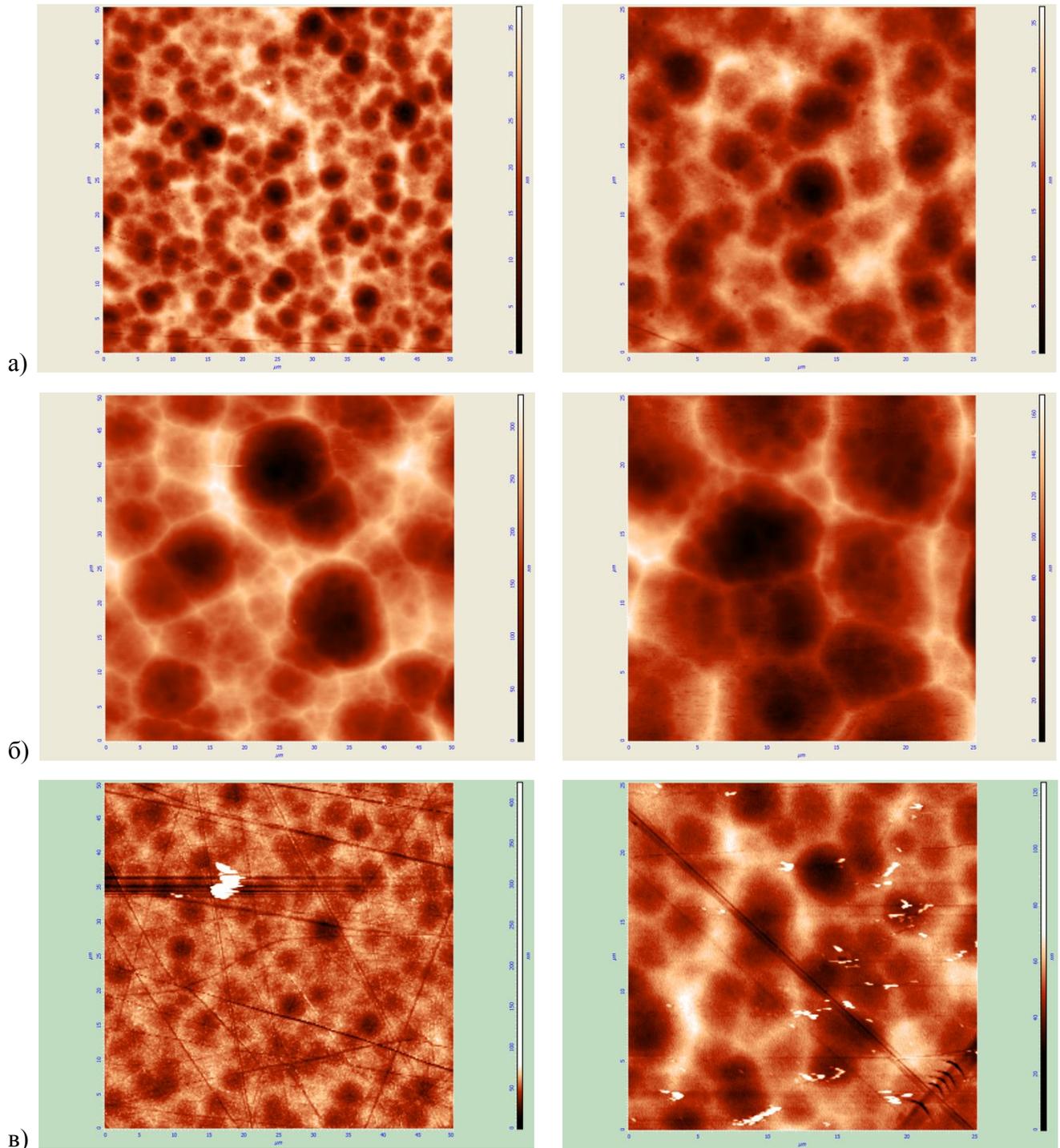


Рисунок 3.11 Изображения поверхности реакционных камер, изготовленных из стекла марки К8 методом фотолитографии и кислотного травления, получены на СБОМ: а) исходная поверхность реакционной камеры, б) после обработки хромовой смесью на основе концентрированной серной кислоты, в) после обработки в 0,5М растворе гидроксида натрия.

Размер изображений 50×50 мкм и 25×25 мкм.

После воздействия хромовой смеси на основе концентрированной серной кислоты поверхность стеклянной реакционной камеры представляет собой крупнопористую структуру с размером пор от 5 до 8 мкм, в то время как после щелочной обработки пористость поверхности практически не изменяется. Шероховатость поверхности (Ra), определенная с помощью сканирующего ближнепольного оптического микроскопа, составляет 4-7 нм после щелочной обработки, а после кислотной достигает 40 нм.

Увеличение размера пор вызвано воздействием кислоты на поверхностный слой стекла. Хотя концентрированные кислоты не реагируют с  $\text{SiO}_2$ , они могут взаимодействовать с металлами и окислами, присутствующими в стекле К8 (Таблица 2.1). Вымывание ионов щелочных металлов из поверхностного слоя стекла создает условия для растворения каркаса кремнеземистого слоя и образования пористой поверхности, что сопровождается снижением химической активности поверхности стекла. [34]

При многократной подобной обработке стеклянных пластин шероховатость и пористость поверхности реакционных камер будет увеличиваться, что подтверждается данными измерения шероховатости (Ra), полученными на профилометре XP-1 (AmbiosTechnology, Канада). Увеличение шероховатости поверхности реакционной камеры после двукратной обработки в применяемых растворах составляет от 70 до 100 нм, а для пластин после многократной (более 10 раз) обработки возрастает до 400-800 нм. При этом поверхность стекла остается прозрачной, однако изменение поверхностных свойств могут привести к снижению химической активности стекла и отразится на качестве модификации поверхности реакционных камер перед нанесением гелевого слоя.

Обработка стеклянных заготовок микрочиповых устройств в растворах на основе концентрированных кислот или щелочей подразумевает многократное ополаскивание образцов в дистиллированной воде. Обычно на этих этапах применяется ручной труд, что приводит к трудоемкости и продолжительности процедур, а также повышает вероятность ухудшения качества изделий (вплоть до брака) из-за субъективного фактора исполнителя. Для устранения указанных недостатков были созданы и апробированы вспомогательные устройства, представленные в совместной работе [115]. На Рисунке 3.12 приведено изображение устройства, выполненного из химически стойких материалов, предназначенное для одновременной фиксации и транспортировки нескольких (до девяти) стеклянных пластин толщиной 1 мм и размером 25×75 мм. Применение этого устройства обеспечивает одновременную обработку рабочей поверхности заготовок стеклянных пластин в агрессивных растворах на основе концентрированной серной кислоты (хромовая смесь), а также оперативное многократное ополаскивание дистиллированной водой., что позволило значительно сократить трудоемкость и продолжительность процедур очистки и подготовки к модификации

поверхности стеклянных заготовок для микрочиповых устройств, а также избежать соприкосновения иммобилизованного геля с другими поверхностями при проведении стерилизации реакционных камер с гелем посредством кипячения заготовок в дистиллированной воде, что способствовало повышению качества изготовления микрочиповых устройств для ПЦР в геле.

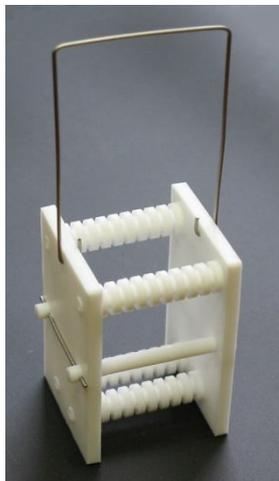


Рисунок 3.12 Вспомогательное устройство для фиксации до 9 пластин размерами (1×25×75) мм.

### 3.3.2. Изменение поверхностных свойств полимерных пластин из ПММА

В целях придания поверхности гидрофильных свойств проведены исследования влияния химических и физических методов обработки на величину краевого угла смачивания ( $\theta$ ) поверхности ПММА (марок ТОСП<sup>®</sup>, ТОСН и АСРУМА<sup>®</sup>72). Определение угла смачивания проводили методом лежащей капли на экспериментальной установке, собранной на основе цифрового микроскопа (Рисунок 3.13). Основные результаты исследований отражены в совместной работе [49].

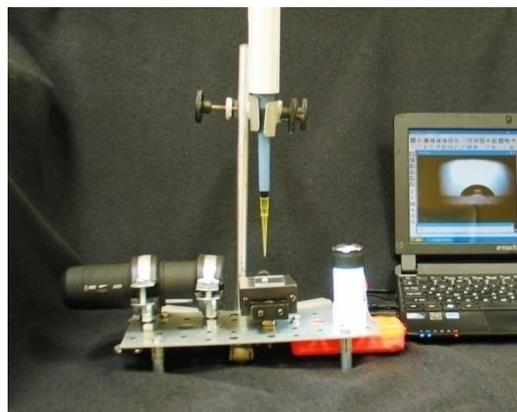


Рисунок 3.13 Изображение экспериментальной установки для измерения величины краевого угла смачивания полимерных образцов методом лежащей капли.

### Химические методы обработки

Для обработки поверхности пластин ПММА применяли: 1) метод гидролиза в кислой среде с применением раствора серной кислоты; 2) обработку с применением смеси перекиси водорода (30% раствор) и концентрированной серной кислоты («пиранья»); 3) метод гидролиза в щелочной среде.

Предварительно образцы ПММА размером (24x24x1) мм промывали в спиртовом растворе и высушивали при комнатной температуре. Гидролиз в кислой среде с применением раствора 3М серной кислоты проводили при температуре 70°C в суховоздушном термостате в течение 30 минут. Для исследований применяли однократную и двукратную обработку в растворе серной кислоты, так как проведение двукратной обработки предположительно способствовало более интенсивному химическому воздействию на поверхность полимера [49]. Вследствие большей стойкости ПММА марки ТОСН к термохимическим воздействиям для проведения данной реакции применяли более высокую температуру (80°C) для увеличения скорости гидролиза.

Гидролиз в щелочной среде проводили в 1М водном или спиртовом (50% этанол) растворе гидроксида натрия при комнатной температуре. Продолжительность обработки составляла от 12 до 24 часов.

Для обработки полимера смесью перекиси водорода (30% раствор) и концентрированной серной кислоты - «пиранья», применяли раствор в соотношении 1:1 объемной доли серной кислоты и перекиси водорода, соответственно. Образцы ПММА марок ТОСП® погружали в свежеприготовленный раствор на несколько минут. Обработку пластин из АCRYMA®72 таким раствором не проводили из-за низкой химической стойкости материала.

После обработки полимерных пластин химическими методами образцы тщательно и многократно промывали в дистиллированной воде и высушивали при комнатной температуре. Результаты измерения угла смачивания полимерной поверхности дистиллированной водой представлены в Таблице 3.4 Угол смачивания для образцов ПММА марок ТОСН и АCRYMA®72 в результате обработки 3М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> уменьшился на 7° и 6° соответственно, в то время как для марки ТОСП® только на 4°. Следовательно, обработка в серной кислоте приводила к усилению гидрофильных свойств полимера марок ТОСН и АCRYMA®72, при этом полимер марки ТОСП® оказался наиболее стойким к обработке методом кислотного гидролиза материалом. Проведение реакции гидролиза в кислой среде при повышенной до 80°C температуре не изменило смачиваемость поверхности этой марки полимера. Также величины контактного угла при проведении двукратной обработки незначительно отличаются от результатов одностадийной обработки.

Таблица 3.4 Изменение смачивания образцов ПММА разных марок после химической обработки

№	Марка ПММА Способ обработки	ТОСП®	ТОСН	ACRYMA®72
		Угол смачивания, °	Угол смачивания, °	Угол смачивания, °
1	Исходные образцы	81 ± 2 (n = 22)	82 ± 2 (n = 22)	78 ± 2 (n = 22)
<b>Обработка в химических растворах</b>				
2	3 М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> при 70°C 30 минут	77 ± 3 (n = 20)	75 ± 2 (n = 20)	72 ± 2 (n = 19)
3	Обработка 3М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (двукратная)	77 ± 3 (n = 22)	74 ± 3 (n = 28)	73 ± 1 (n = 16)
3	3 М H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 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» H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = 1 : 1 5 минут	77 ± 2 (n = 14)	76 ± 3 (n = 15)	обработка не рекомендуется

При обработке ПММА раствором «пиранья» при соотношении составляющих 1:1 результаты измерения контактного угла практически не отличаются от результатов кислотной обработки серной кислотой.

Обработка в водном растворе щелочи слабо влияет на свойства смачивания поверхности образцов всех трех марок ПММА, в то время как обработка в спиртовом растворе NaOH приводит к значительным изменениям поверхностных свойств образцов марок ТОСП® и ТОСН (угол смачивания уменьшается на 16°). Для марки ACRYMA®72 изменений свойств поверхности после аналогичной обработки не обнаружено.

#### Физические методы обработки

Были проведены исследования по изучению воздействия физических методов обработки (ультрафиолетовое излучение, воздействие кислородной плазмой) на поверхностные свойства смачивания ПММА.

Для воздействия ультрафиолетовым (УФ) излучением использовали УФ ртутную лампу ДРШ 250 (250Вт) в спектральном диапазоне 250-350 нм для обработки образцов в течение 15 и 60 минут. При обработке лампа располагалась на расстоянии 10 см от образца.

Плазменная обработка образцов ПММА в среде кислорода осуществлялась на установке DENIERZERTO (Denier, Германия) при частоте 13,56 МГц, мощности 45 Вт и остаточном давлении около 1 мбар. Результаты исследования представлены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 Изменение смачивания образцов ПММА разных марок после обработки образцов плазмой в среде кислорода и ультрафиолетовым излучением

№	Марка ПММА Способ обработки	ТОСП <sup>®</sup>	ТОСН	ACRYMA <sup>®</sup> 72
		Угол смачивания, °	Угол смачивания, °	Угол смачивания, °
	Исходные образцы	81 ± 2 (n = 22)	82 ± 2 (n = 22)	78 ± 2 (n = 22)
<b>Обработка ионизирующим излучением</b>				
7	Плазменная обработка O <sub>2</sub> 1 минута	40 ± 2 (n = 15)	45 ± 4 (n = 15)	44 ± 2 (n = 15)
8	Плазменная обработка O <sub>2</sub> 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 УФ излучением в течение 15 минут привела к уменьшению угла смачивания для ПММА всех марок на 7-8°. Дальнейшее увеличение длительности обработки до 60 минут восстанавливает гидрофобные свойства поверхности ТОСП<sup>®</sup> и ТОСН почти до исходных значений, в отличие от марки ACRYMA<sup>®</sup>72, для которой гидрофильные свойства продолжали усиливаться, но незначительно.

Воздействие плазмы существенно изменяет характер поверхности образцов полимера всех марок, усиливая гидрофильные свойства. При обработке в течение 1 минуты угол смачивания уменьшается до 40-45°, а при увеличении времени воздействия плазмой до 1.5 минут угол смачивания достигает значений 37- 38°. С точки зрения практического использования модифицированных полимеров важным является сохранение гидрофильности в течение длительного времени. Было обнаружено, что хранение образцов после воздействия

кислородной плазмой в герметично закрытых камерах в течение недели приводит к незначительным изменениям свойств поверхности. Так угол смачивания для ПММА марки ТОСП® возрастает на 9°, для ТОСН – только на 1°, для АCRYМА®72 – на 3°. Такие же изменения значений угла смачивания характерны для образцов через 40 минут после обработки кислородной плазмой при хранении их на воздухе. Хранение обработанных образцов ТОСП® в течение недели на воздухе при комнатной температуре привело к существенному увеличению угла смачивания на 15°. Основные результаты проведенного исследования были опубликованы в работе [49].

Таким образом, наиболее значительные изменения свойств поверхности образцов ПММА марок ТОСП®, ТОСН и АCRYМА®72 были получены при воздействии плазмы в среде кислорода. Поверхность изменяла гидрофобные свойства на гидрофильные, что отражалось на величине угла смачивания, которая уменьшалась до 37-38°. Свойства поверхности обработанных образцов незначительно менялись при хранении в течение недели.

Из химических способов обработки ПММА следует отметить реакцию гидролиза в щелочной среде. При использовании спиртового раствора гидроксида натрия для образцов марок ТОСП® и ТОСН наблюдали уменьшение угла смачивания до 65- 66°. Но ПММА марки АCRYМА®72 оказался устойчивым к этому способу обработки.

Таким образом, для обработки поверхности реакционных камер из ПММА перед иммобилизацией гелевого слоя применяли следующие способы воздействия: плазменную обработку в кислородной среде или щелочной гидролиз в водно-спиртовой среде. Дальнейшая процедура соответствовала протоколу для стеклянных поверхностей, т.е. включала стадии силанизации (МОПТМС) и полимеризации акриламида.

### **3.4. Герметизация микрочиповых устройств для ПЦР**

Одним из важных этапов создания микрочипов является герметизация микроструктур, в частности, реакционных камер. Обычно герметизация осуществляется за счет соединения микроструктур (каналы, реакторы и т.п.) расположенных на подложке с защитной пластиной. Выбор способа герметизации зависит от применяемых материалов и условий эксплуатации устройства. При выборе способа герметизации микрочиповых устройств также необходимо учитывать особенности реализуемой методики – часто важным требованием является обеспечение совместимости применяемых материалов с объектами исследования (белки, клетки и др.) или требования по сохранности свойств герметизируемых микроструктур (особенно, если это био-чувствительные слои). Как правило, нанесение функциональных слоев происходит на этапах изготовления микроструктур, так как проводить эту процедуру после герметизации сложно и неэффективно. Требования сохранности функциональных слоев ограничивает применение высокотемпературного нагрева при соединении материалов, а также нелокальную

обработку ионизированным излучением. В последнем случае защитить слой можно путем применения специальных экранирующих масок. Технологии соединения полимеров с применением локальных воздействий (например, нагрев лазерным излучением) применимы при условии ограничения этого воздействия на область с функциональными элементами.

Перспективными являются низкотемпературные способы соединения с помощью клеевых композиций, скотчей, физической фиксации под давлением либо химической сварки склеиваемых поверхностей.

Применение полимерных фотоотверждаемых композиций (ФОК) позволяет получить прозрачный водонепроницаемый связующий слой, выдерживающий нагрев до 120°C. Преимуществом таких композиций является независимость процесса отверждения от температуры, что дает возможность изменять вязкость ФОК при помощи нагревания. Таким образом, подогрев подложки позволяет получить достаточно равномерный тонкий слой клея.

Предположительно, при отверждении ФОК происходит полимеризация основных компонентов (мономеров) по радикальному механизму с участием фотоинициаторов, при этом образование полимерных комплексов можно регистрировать по спектрам поглощения 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, необходимого для полимеризации.

### **3.4.1. Соединение стеклянных пластин**

Для создания прототипов микрочиповых устройств применяли следующие способы герметизации стеклянных материалов: 1) термическое связывание, 2) соединение полимерными фотоотверждаемыми композициями, 3) соединение полимерными композициями на основе ПДМС (Corning, USA). Все вышеперечисленные способы обеспечивают оптически прозрачное неразъемное соединение стеклянных пластин, выдерживающее циклический нагрев. Соединение полимерными композициями дает возможность применения тех же способов для герметизации микрочиповых устройств с функциональным гелевым слоем.

#### **Термическое связывание**

Термическое связывание обусловлено тепловым движением частиц в узлах кристаллической решетки материала: чем выше температура, тем больше атомов могут проникать через межфазное пространство между пластинами, что приводит к исчезновению межфазных границ между стеклами. [116] Таким образом, получается неразъемное соединение,

прочность которого близка к прочности самого материала, что позволяет впоследствии применять химические (растворы кислот, щелочей и др.) и физические (нагрев выше 300°C) способы обработки для дезактивации органических загрязнений на поверхности реакционной камеры с целью многократного применения микрочипового устройства.

Герметизация стеклянных пластин методом термического связывания проводилось следующим образом: 1) стекла ополаскивались в мыльном растворе и тщательно высушивались; 2) на пластине с реакционными камерами, толщиной от 1 до 2 мм, фиксировалась защитная пластина толщиной 0,5 мм; 3) сборка нагревалась до температуры термического связывания материалов и выдерживалась при максимальной температуре в течение нескольких часов. Для исследований применяли стекла марок К8, соединение которых проводили при температуре 630°C, и сочетание стекол К8 и Ф1, что позволяло проводить термическое связывание материалов при температуре 540°C. Во избежание появлений остаточных напряжений в материале и для повышения качества герметизации нагрев до максимальной температуры проводили в несколько этапов.

Для того чтобы обеспечить термическое связывание соединяемые поверхности должны хорошо прилегать друг к другу, что повышает требования к качеству поверхности. Наличие сколов, дефектов или неорганических включений оказывает существенное влияние на качество герметизации. К ограничениям метода термического связывания относятся: высокие требования к качеству соединяемых поверхностей, длительность и трудоемкость процедуры, а также и необходимость использования специального оборудования (термопечи с программируемым циклом нагрева и охлаждения).

Способом термического связывания были созданы прототипы микрочипов с реакционными камерами для ПЦР-РВ. Однако высокотемпературный нагрев при герметизации (выше 300°C) деструктивно влияет на функциональный слой геля, поэтому термическое связывание для устройств с гелем не применялось.

### **Низкотемпературные способы соединения пластин**

Для герметизации стеклянных прототипов микрочипов для ПЦР-РВ применяли следующие полимерные композиции: фотоотверждаемый клей - RiteLockUV02 (ChemenceLtd, UK) и композицию на основе полидиметилсилоксана – ПДМС (Corning, USA). Инициатором полимеризации фотоотверждаемого клея является УФ-облучение, а полимеризация ПДМС происходит при добавлении отвердителя как при комнатной (24 часа), так и при повышенной температуре. Герметизация проводилась следующим образом: соединяемые поверхности фиксировались неподвижно, полимерная композиция под действием капиллярных сил равномерно заполняла пространство между пластинами. После этого заготовка микрочипа помещалась под УФ лампу или в суховоздушный термостат для осуществления полимеризации.

К особенностям этого способа герметизации можно отнести необходимость подбора условий (соотношения вязкости и вводимого объема смеси) для того, чтобы полимерный клей равномерно заполнил межфазное пространство вокруг реакционной камеры, но не проникал в камеру и систему подводящих каналов за счет равновесия капиллярных сил и сил поверхностного натяжения клея.

Достоинством этого способа является слабая чувствительность соединения к неровностям и неорганическим включениям на поверхности соединяемых пластин, относительно высокая скорость полимеризации. Основным требованием при использовании полимерных композиций является обеспечение полной полимеризации соединяющего слоя, так как неполная полимеризация может привести к низкой прочности соединения и последующей разгерметизации при эксплуатации или хранении образцов. Также неотвержденный слой адгезивного материала может оказывать влияние на эффективность ПЦР. Следовательно, необходимо тщательно подходить к подбору условий отверждения клеевого состава.

### **Фотоотверждаемые композиции**

Для соединения стеклянных пластин применяли ФОК на основе уретан-акрилового эфира – клей RiteLock UV02 (Chemence, Великобритания). Для контроля условий полимеризации были проведены исследования влияния продолжительности отверждения на оптические свойства полимерных композиций, результаты которых подробно изложены в работе [37].

Фотоотверждаемую композицию RiteLock UV02 наносили тонким слоем на стеклянные пластины размером 24×24 мм, полимеризация осуществлялась при использовании УФ-лампы ДРШ 250, время облучения варьировалось от 0 до 40 минут. Измерение спектров возбуждения и флуоресценции образцов в диапазоне длин волн 220 – 800 нм проводилось на спектрофлуориметре HitachiF-4010 (Япония) при скорости сканирования спектра 120 нм/мин и ширине щели 5 нм. Спектральные зависимости флуоресценции образцов при разных временах отверждения клея приведены на Рисунке 3.14 с корректировкой на незначительную фоновую флуоресценцию стеклянных пластин.

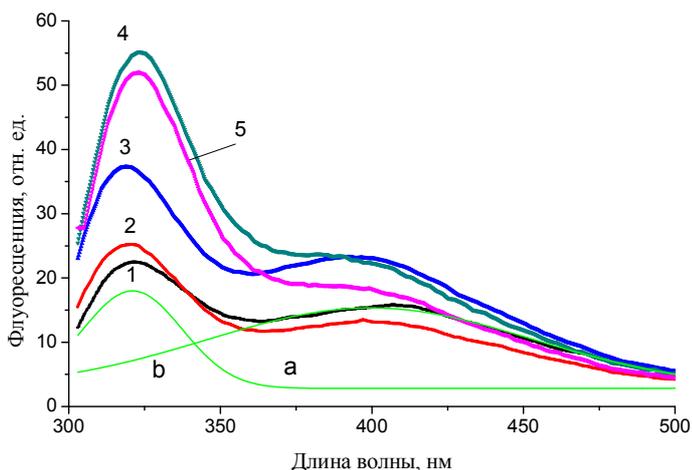


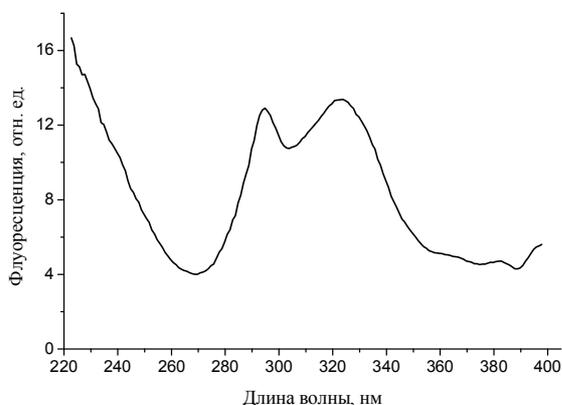
Рисунок 3.14 Спектральная зависимость сигнала флуоресценции образцов ФОК RiteLock UV02 на длине волны 290 нм при разном времени отверждения:

1)  $t=0$ , 2)  $t=5$  мин, 3)  $t=10$  мин, 4)  $t=20$  мин, 5)  $t=30$  мин. [37]

На спектре флуоресценции неотвержденного полимера (Рисунок 3.14, зависимость 1) наблюдаются две полосы, имеющие максимумы на длинах волн 320 и 410 нм при возбуждении на 290 нм, соответствующие, по-видимому, двум основным компонентам полимера. Воздействие УФ излучения на слой клея приводит к трансформации спектральной зависимости: после 20 мин воздействия излучения на спектральных зависимостях наблюдается один пик с максимумом на 323 нм, несколько смещенным относительно исходного.

Спектры возбуждения неотвержденного полимера на длине волны 410 нм и на длине волны 320 нм приведены на Рисунке 3.15. Примечательно, что на длине волны 410 нм наблюдается спектральная зависимость возбуждения с двумя максимумами, один из которых соответствует максимуму флуоресценции при возбуждении на 290 нм.

а)



б)

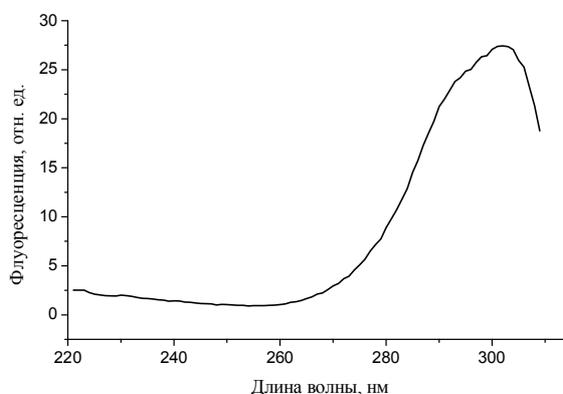


Рисунок 3.15. Спектры возбуждения флуоресценции образцов ФОК для длин волн:

а) 410 нм; б) 320 нм [37]

Вероятно, в процессе отверждения клея RiteLock UV02 мономеры уретан-акрилового эфира и акриловой кислоты формируют так называемые взаимопроникающие полимерные сетки, образованные путем механического переплетения макромолекул. По-видимому, две полосы на спектре флуоресценции неотвержденного полимера, имеющие максимумы на длинах волн 320 и 410 нм при возбуждении на 290 нм, соответствующие двум основным компонентам полимера. Уменьшение длинноволнового (410 нм) пика флуоресценции и увеличение коротковолнового (320 нм) пика, по-видимому, соответствует процессу образования устойчивого полимерного комплекса. Если представить полученные зависимости как сумму двух пиков, имеющих форму гауссианы (например, на Рисунке 3.14 зависимость 1 можно представить суммой пиков а и б), то можно вычислить амплитуду (или площадь) каждого пика и проанализировать изменение амплитуды в зависимости от времени отверждения. Такая зависимость, приведенная на Рисунке 3.16, свидетельствует о том, что процесс образования комплекса к 20-й минуте уже практически завершился.

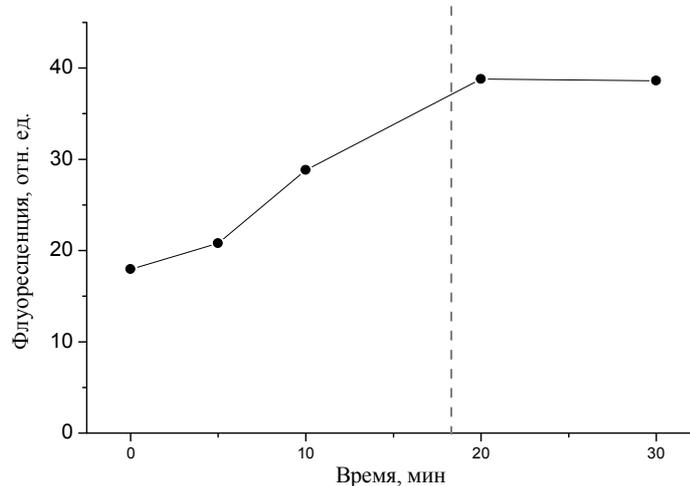
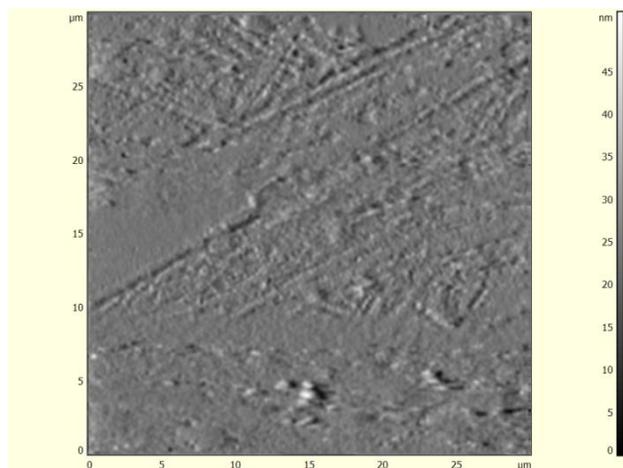


Рисунок 3.16 Изменение флуоресценции образцов ФОК на длине волны 320 нм (при возбуждении на 290 нм) в зависимости от времени отверждения полимера [37]

Изображения поверхности отвержденного слоя ФОК RiteLock UV02, полученные на СБОМ "NTEGRASolaris" (НТ-МДТ, Россия) в режиме микроскопии поперечных сил и представленные на Рисунке 3.17, свидетельствуют, что поверхность сформирована из однородных частиц размерами от 150 до 300 нм, при этом шероховатость ( $R_a$ ) составляет около 23 нм. По всей поверхности сканируемого участка частицы распределены неравномерно, что, по-видимому, обусловлено технологией нанесения слоя. В качестве гипотезы можно предположить, что минимальная толщина клеевого слоя должна определяться размером визуализированных частиц — порядка 300 нм.

а)



б)

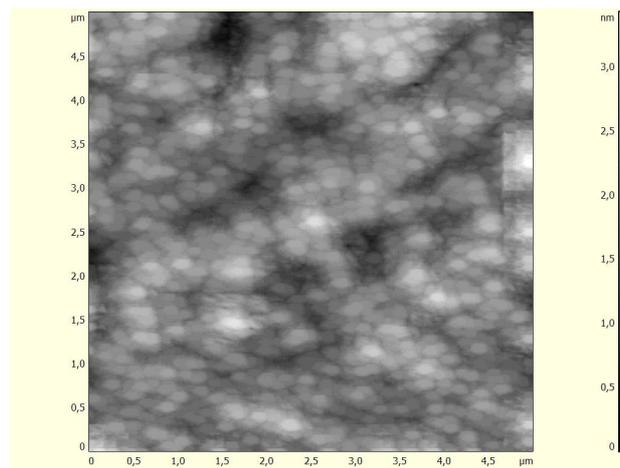


Рисунок 3.17 Изображения поверхности полностью фотоотвержденного клея, полученные на СБОМ в режиме микроскопии поперечных сил. Размер изображения: а) 30×30 мкм, б) 5×5 мкм.

Следует отметить, что полимеризация клея при герметизации будет зависеть и от материала пластин. В частности: оптические свойства материала будут определять спектральный диапазон излучения, которое воздействует на слой клея, а химический состав стекла влияет на прочность связи со слоем клея.

### 3.4.2. Соединение полимерных пластин

Для соединения пластин из ПММА использовали ФОК на акрилатной основе ACRIFIX<sup>®</sup>192 (EVONIC, Германия) в сочетании с разбавителем ACRIFIX<sup>®</sup>ТС 30. Были проведены экспериментальные исследования по выбору условий отверждения клеевого раствора для герметизации микрочипов из ПММА, результаты которых изложены в совместной публикации [117]. Исследование проводили спектрофотометрическим методом в два этапа: первоначально определяли длительность УФ облучения, при которой происходит полная полимеризация ACRIFIX<sup>®</sup>192, затем выясняли, происходит ли при выбранной длительности УФ обработки отверждение композиции с различным соотношением основы (ACRIFIX<sup>®</sup>192) и разбавителя (ACRIFIX<sup>®</sup>ТС 30).

Для исследований были изготовлены плоские кюветы из стеклянных покровных пластин размером 24×24 мм и 18×18 мм, соединенные различными адгезивными материалами. Объем кювет не превышал 200 мкл, длина оптического пути составляла 650±50 мкм или 450±50 мкм, в зависимости от размера кюветы и применяемых адгезивных материалов. Полимеризацию проводили при использовании УФ-лампы типа ДРШ 250, продолжительность облучения варьировали от 0 до 60 минут. Измерение спектров пропускания образцов в диапазоне длин волн от 340 до 2500 нм выполняли на спектрофотометре HitachiF-4010 (Япония) при скорости

сканирования спектра 120 нм/мин и ширине щели 5 нм. Спектральные зависимости светопропускания образцов при разных временах отверждения клея приведены на Рисунке 3.18.

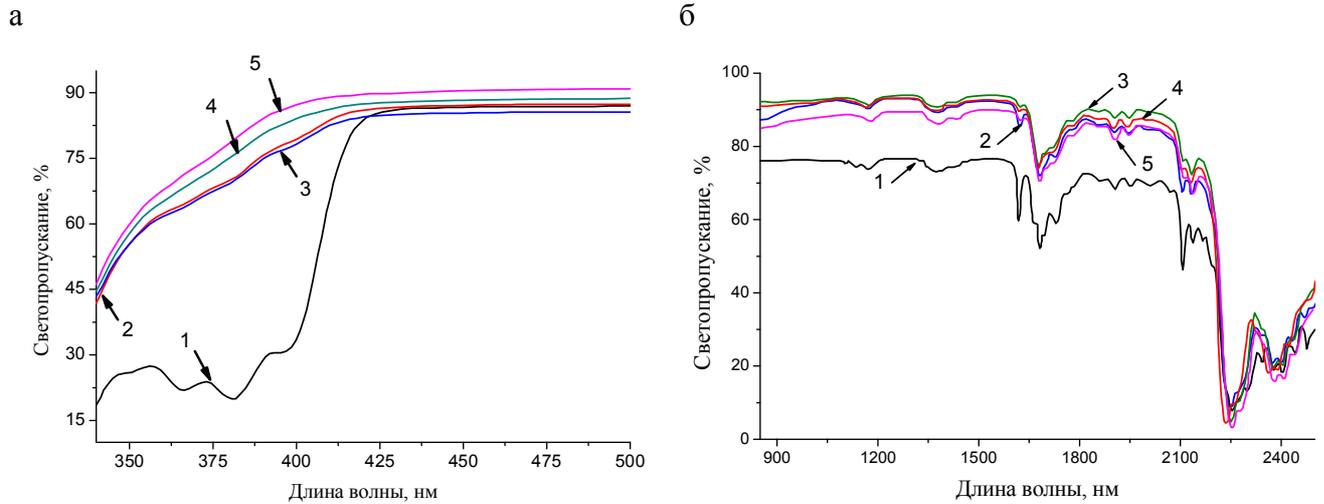


Рисунок 3.18 Спектральные зависимости светопропускания слоя ACRIFIX<sup>®</sup> 192 толщиной 650 мкм при разной продолжительности отверждения под УФ излучением: а) в области от 340 до 450 нм; б) в БИК области (от 850 до 2500 нм). Продолжительность отверждения: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 20 мин, 5 – 60 мин.

На спектральной зависимости светопропускания неотвержденного полимера в ультрафиолетовой области спектра (Рисунок 3.18 а, зависимость 1) от 350 до 400 нм наблюдаются полосы поглощения с максимумами на длинах волн 365, 380 и 390 нм. Воздействие УФ излучения на слой клея приводит к существенным изменениям спектральной зависимости – уже через 5 минут эта область становится более прозрачной, и в дальнейшем претерпевает незначительные изменения при увеличении времени облучения. По-видимому, эти полосы поглощения соответствуют дополнительным компонентам клея, возможно, фотоинициаторам, которые под действием ионизирующего излучения распадаются с образованием свободных радикалов и количество которых быстро уменьшается.

В ближней инфракрасной (БИК) области спектра полимер имеет ряд максимумов поглощения, при этом можно выделить несколько длин волн (1622, 1685, 1730, 2110, 2475 нм), светопропускание на которых изменяется по мере отверждения клея (Рисунок 3.18 б). Для анализа были выбраны полосы поглощения на длинах волн 1622 и 2110 нм, изменение светопропускания на которых по мере отверждения клея проявляется наиболее существенным образом.

На Рисунке 3.19 приведены спектры поглощения слоя ФОК на длине волны 1622 и длине волны 2110 нм при продолжительности воздействия УФ излучения от 0 до 60 минут,

полученные после вычитания фонового сигнала, определенного на линейном участке спектра (1520÷1560 нм). Можно выделить два основных этапа отверждения: первый – соответствующий значительному уменьшению оптической плотности (до 10 мин) и второй – на котором наблюдается незначительное изменение величины оптической плотности. 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 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 ( $D^*_{2110}$ ).

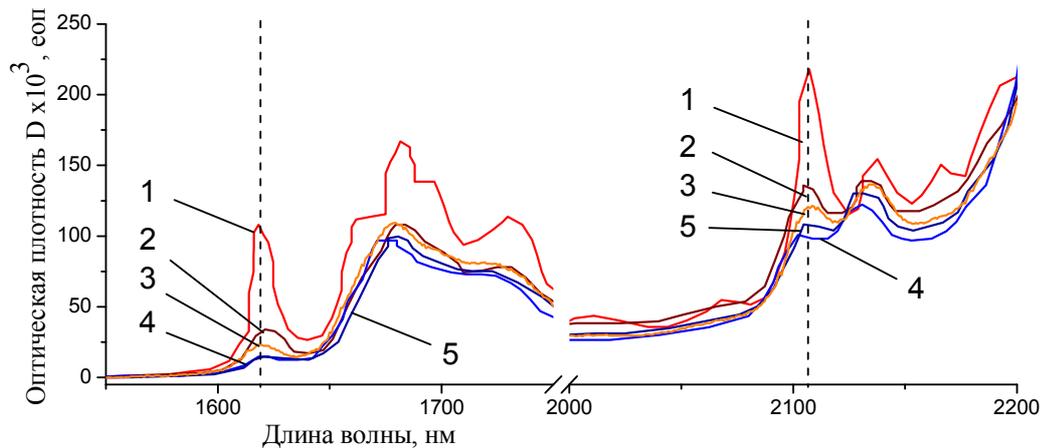
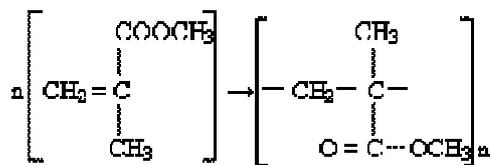


Рисунок 3.19 Спектральная зависимость поглощения слоя ACRIFIX®192, толщиной 650 мкм, при продолжительности воздействия УФ излучения:  
1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 20 мин, 5 – 60 мин.

Полимеризация клея ACRIFIX 192, вероятно, происходит по радикальному механизму в присутствии фотоинициатора, с образованием ПММА, по схеме:



Спектрофотометрическим методом можно регистрировать уменьшение количества связей С=С по мере отверждения ФОК в исследуемом слое. В инфракрасной (ИК) спектроскопии связь

C=C характеризуется пиком поглощения на частоте от 1660 до 1600  $\text{см}^{-1}$  [118]. Например, в [119] приведены ИК спектры пропускания образцов ПММА до и после полимеризации. Наличие двойной связи C=C у неотвержденного образца объясняет полосу поглощения при 1645  $\text{см}^{-1}$ , в то время как в спектре полимера эта полоса полностью исчезает. Спектрофотометрический метод определения мономера с двойной связью C=C описан в [106] и основан на способности мономера поглощать свет в дальней УФ области спектра (длина волны 207 нм). Но так как полимеры и стеклянные материалы имеют невысокую прозрачность в диапазоне менее 300 нм, то для исследования полимеризации была выбрана БИК область спектра (от 800 до 2500 нм или от 12500 до 4000  $\text{см}^{-1}$ ).

Измерения в БИК области спектра позволяют регистрировать обертоны и комбинационные полосы поглощения. В общем случае поглощение обертонов колебаний попадает приблизительно в область  $(2\nu_1) - b$ , где  $\nu_1$  – валентное колебание,  $b = 2 \div 10 \text{ см}^{-1}$ . Сходным образом составные (комбинационные) полосы наблюдаются при частотах, несколько меньших, чем сумма основных частот. Интенсивность обертонов и составных полос обычно ниже, чем основных в 10-100 раз. [120]

Предположительно пик поглощения на длине волны 1622 нм можно интерпретировать как сочетание второго обертона колебаний связи C=C (в области 3320  $\text{см}^{-1}$  до 3200  $\text{см}^{-1}$ ) и валентных колебаний связи CH (вблизи 2960  $\text{см}^{-1}$ ), а пик поглощения на длине волны 2110 нм – как сочетание второго обертона колебаний связи C=C и деформационных колебаний метильной группы CH<sub>3</sub> (около 1450  $\text{см}^{-1}$ ). [120]

По результатам измерений светопропускания в ближней инфракрасной области предложен критерий порогового типа, позволяющий установить факт отверждения фотоотверждаемой полимерной композиции на акрилатной основе, ACRIFIX®192: фотоотверждение слоя полимерной композиции 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. В частности для слоя толщиной 650 мкм пороговая величина  $D^*_{1622}$  составляет 0,024 еоп.

Критерий применяли для определения условий отверждения полимерной композиции. После 10 минут облучения часть образцов оставались неотвержденными, что может свидетельствовать о наличии в этой точке переходного процесса. В целях повышения надежности при дальнейших измерениях было решено определять и сравнивать значения оптической плотности после 20 мин воздействия УФ излучения.

Для уменьшения вязкости ФОКв ACRIFIX<sup>®</sup>192 добавляли разбавитель ACRIFIX<sup>®</sup>ТС 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. Также следует отметить, что для образцов с соотношением клея и растворителя 1:1 отверждение происходит при увеличении длительности воздействия УФ до 30 минут.

Полученные результаты использовались для герметизации реакционных камер при создании микрочиповых устройств из ПММА.

Для отверждения клеевого слоя в качестве источника УФ-излучения применяли лампу ДРШ 250 (мощность 250 Вт), однако применение диодных источников УФ излучения позволяет создавать портативные устройства для отверждения полимерных композиций, при этом снижается вероятность нагрева обрабатываемых образцов, что особенно актуально при герметизации микроструктур с термочувствительными функциональными элементами. По сравнению с ДРШ 250 светодиоды не содержат в своем составе ртути, обладают ударной и вибрационной устойчивостью, длительным сроком эксплуатации, однако отличаются спектральными характеристиками и меньшей мощностью излучения, что может повлиять на условия отверждения полимерных композиций.

Предварительные эксперименты показали, что применение светодиодов (LED Engin, США) с длиной волны 398 нм в качестве источника излучения позволяет провести полимеризацию ACRIFIX<sup>®</sup>192, на основе которых было изготовлено портативное устройство с двумя светодиодами. На Рисунке 3.19 а приведена зависимость изменения величины оптической плотности клеевого слоя ACRIFIX 192 в максимуме поглощения на длине волны 1622 нм от времени воздействия УФ излучения с применением установки (Рисунок 3.19 б). Согласно предложенному критерию отверждение полимерной композиции под светодиодными источниками излучения происходит после 20 минут обработки. Применение вспомогательного портативного устройства на основе светодиодных источников излучения на этапе фиксации защитных пластин перед герметизацией микроструктур позволяет упростить процедуру изготовления микрочиповых устройств. Следовательно, данную установку можно применять при герметизации микрочиповых устройств с применением фотоотверждаемых композиций.

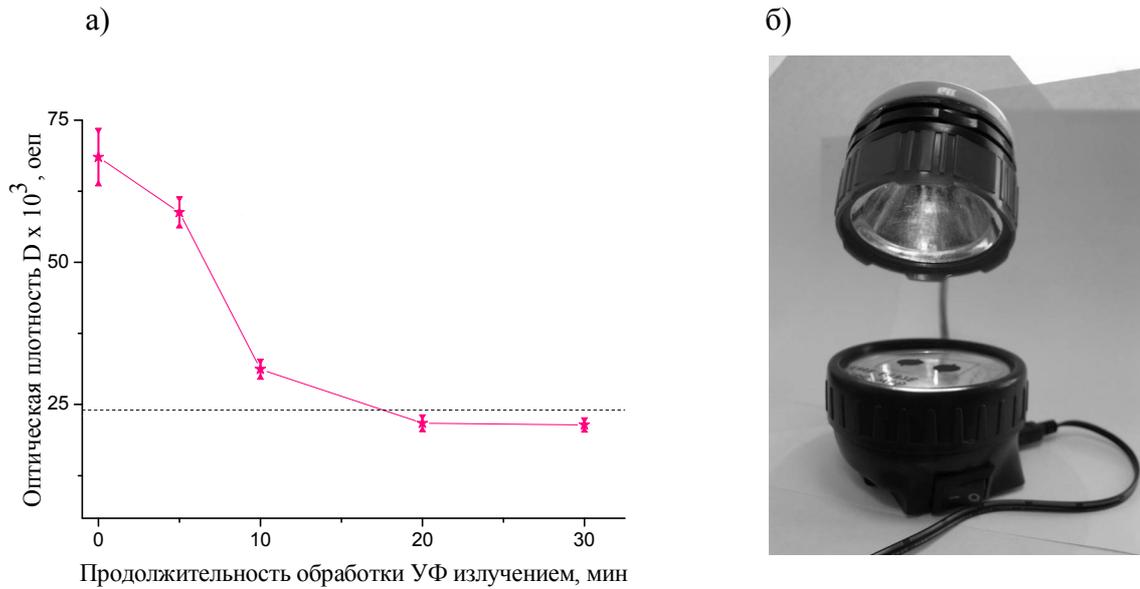


Рисунок 3.20 а) Зависимость величины оптической плотности на длине волны 2110 нм от продолжительности воздействия УФ излучения на слой клея ACRIFIX 192 толщиной 650 мкм с применением светодиодной установки, б) изображение применяемой светодиодной установки.

### 3.4.3. Определение герметичности реакционных камер

Одним из основных требований к реакционным камерам для ПЦР является их водонепроницаемость и герметичность при многократном (от 30) циклическом нагреве. Основным критерием герметичности является отсутствие потери жидкости, введенной в реакционную камеру, после термоциклирования, что можно определить гравиметрическим методом. Для этого реакционную камеру микрочипового устройства заполняли дистиллированной водой через входные отверстия, которые затем запечатывали адгезивной пленкой для ПЦР-планшетов (SARSTEDTAG&Co, Германия). Подготовленное микрочиповое устройство помещали на плоскую нагревательную поверхность оборудования для ПЦР (SwiftMaxPro, ESCO, Сингапур). Нагрев проводился по следующей схеме: предварительный прогрев до 95°C в течение 5 минут, затем 40 циклов в следующем режиме - 95°C в течение 20 сек, 60°C в течение 60 сек. Изменение массы дистиллированной воды в реакционной камере после термоциклирования  $\Delta_m$ , мг, определяли как разность массы микрочипового устройства до и после термоциклирования по следующей формуле:

$$\Delta_m = |m_2 - m_1| \cdot 0,001 \quad (5)$$

где  $m_1$  – масса микрочипового устройства до термоциклирования, г;

$m_2$  – масса микрочипового устройства после термоциклирования, г.

Для оценки герметичности полимерных микрочиповых устройств применяли прототипы размером 24×24 мм с одной реакционной камерой диаметром 8 мм и глубиной 200 мкм, выполненной методом лазерной микрообработки. Верхняя пластина с двумя отверстиями для

ввода пробы соединялась с нижней посредством полимерной адгезионной композиции из ACRIFIX 1R 0192 и разбавителя ACRIFIX®TC 0030 (подробнее способ герметизации полимерных устройств рассмотрен в разделе 3.3.2). Установлено, что для полимерных устройств массой  $770 \pm 25$  мг после нагрева характерна потеря массы около  $1,4 \pm 0,2$  мг ( $n=5$ ). При нагреве тех же полимерных устройств без заполнения водой (холостой эксперимент) установлена потеря массы  $1,5 \pm 0,1$  мг ( $n=3$ ), а также при циклическом нагреве полимерных пластин ПММА массой  $770 \pm 30$  мг потеря массы составила  $1,5 \pm 0,1$  мг ( $n=3$ ). Экспериментальные значения приведены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6 Изменение массы пластин ПММА и микрочиповых устройств на их основе после циклического нагрева по программе ПЦР (40 циклов)

№	Масса ПММА			Изменение массы после нагрева	
	исходная, г	до нагрева, г	после нагрева, г	мг	% от исходной
Микрочиповые устройства, заполненные дистиллированной водой					
1	0,7977	0,8116	0,8101	1,5	0,19
2	0,7546	0,8229	0,8213	1,6	0,21
3	0,7772	0,7799	0,7787	1,2	0,15
4	0,7348	0,7837	0,7824	1,3	0,18
5	0,7867	0,8038	0,8026	1,2	0,15
Незаполненные микрочиповые устройства					
1	0,7775		0,7759	1,6	0,21
2	0,787		0,7855	1,5	0,19
3	0,7549		0,7534	1,5	0,20
Пластины					
1	0,760		0,7584	1,6	0,21
2	0,8021		0,8006	1,5	0,19
3	0,7454		0,7439	1,5	0,20

Изменение массы полимера при нагреве вероятно связано с удалением влаги, а наиболее простым неразрушающим методом контроля поглощенной влаги является спектрофотометрический метод. Согласно литературным данным в БИК области для воды при нормальных условиях характерны следующие полосы поглощения: [121]

– составная частота деформационного и валентного колебания на  $5150-5226 \text{ см}^{-1}$  (1942-1914 нм),

- составная частота валентных колебаний или их обертоны на  $6900\text{-}7040\text{ см}^{-1}$  ( $1449\text{-}1420\text{ нм}$ ),
- составная частота деформационного и валентных колебаний или их обертонов на  $8370\text{ см}^{-1}$  ( $1195\text{ нм}$ ).

Было проведено исследование изменений спектров поглощения образцов ПММА марки ТОСП® в области от 850 до 2500 нм до и после обработки, заключающийся в: 1) нагреве пластин при температуре  $80^\circ\text{C}$  в течение двух часов, 2) хранении полимерных пластин в сухой среде (эксикатор с силикагелем) в течение 24 часов, 3) вымачивании ПММА в теплой дистиллированной воде при  $70^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. Результаты измерения представлены на Рисунке 3.21. Очевидно, что на длине волны 1909 нм возможно регистрировать изменения, связанные с поглощением-влаги образцами ПММА марки ТОСП® после обработки.

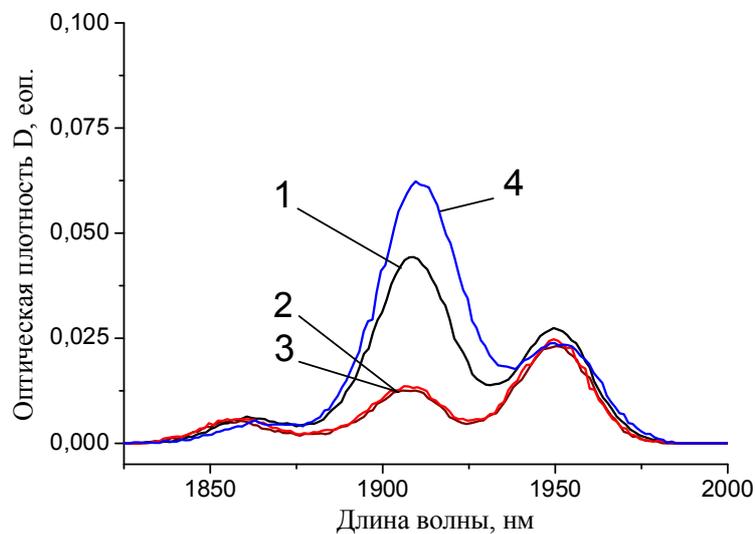


Рисунок 3.21 Зависимость оптической плотности образцов ПММА марки ТОСП® на длине волны 1909 нм от обработки: 1 – без обработки, 2 – нагрев до  $80^\circ\text{C}$  (2 часа), 3 – хранение в сухой среде (24 часа), 4 – хранении в тёплой дистиллированной воде при  $70^\circ\text{C}$  (30 минут).

Было показано, что после нагрева образцов ПММА марки ТОСП® (размером  $25\times 25\text{ мм}$ ) по программе термоциклирования изменение массы образцов составляет  $1,5\pm 0,1\text{ мг}$  ( $0,19\pm 0,02\%$  от исходной массы образцов).

Таким образом, для материала ТОСП массой до 1 г была определена поправка, применяемая при проведении испытаний устройств на герметичность при нагреве, составляющая 2% от массы устройств. Испытания выборки из 10 полимерных микрочиповых устройств показали незначительное изменение массы заполненных водой микрочиповых устройств 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).

### 3.5. Основные результаты главы 3

1. Экспериментальные исследования свойств неорганического стекла марки К8 и полиметилметакрилата (ПММА) марки ТОСП® («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, 670 нм), соответствующих поглощению наиболее распространенных флуоресцентных красителей;

б) отсутствием значимого влияния на эффективность реакции при проведении ПЦР-РВ в реакционной камере из этого материала;

в) применимостью существующих физико-химических способов модификации поверхности материала для последующей иммобилизации слоя геля.

2. Определены режимы формирования микроструктур глубиной  $200 \pm 10$  мкм в листовом ПММА методом лазерной микрообработки (на длине волны 10,6 мкм, частота 500 Гц, мощность 2 Вт), преимуществами которой являются: высокая скорость изготовления микроструктур произвольной (несимметричной) формы, возможность оперативного и частично автоматизированного (до нарезки заготовок из листового полимера) изготовления большого количества (до 100) однотипных заготовок для микрочиповых устройств.

3. Наиболее существенная модификация поверхности ПММА достигается следующими способами обработки: плазменная обработка в кислородной среде, позволяющая оперативно (в течение 1,5 минут) модифицировать поверхность всех анализируемых марок ПММА (ТОСП®, ТОСН, АCRYMA®72), а также щелочной гидролиз в водно-спиртовой среде, не требующий использования электрического оборудования и позволяющий модифицировать поверхность ПММА марок ТОСП® и ТОСН.

4. Предложен критерий порогового типа, учитывающий результаты спектрофотометрических измерений светопропускания слоя фотоотверждаемых полимерных композиций (на акрилатной основе, АCRIFIX®192) в ближней инфракрасной области. Применение критерия позволяет определить степень отверждения полимерных композиций, необходимую для герметизации микрочиповых устройств, и выбрать условия и режим герметизации микрочиповых устройств. В соответствие с предложенным критерием отверждение полимерных композиций достигается после 20 минут УФ излучения и при соотношении (основа : разбавитель)=(2 : 1).

5. Контроль герметичности микрочиповых устройств осуществлялся гравиметрическим методом по усовершенствованной методики, учитывающей влагопоглощение применяемых полимерных материалов, величина которой определяется на основании предварительных исследований с учетом результатов спектрофотометрических измерений. Экспериментальные результаты подтвердили сохранение герметичности реакционных камер для ПЦР, изготовленных из ПММА и соединенных фотоотверждаемыми полимерными композициями, в условиях эксплуатации – 30 циклов нагрева от 60 до 95°C.

## Глава 4. Экспериментальные исследования

Для тестирования работоспособности микрочиповых устройств в качестве объектов исследования выбраны образцы кДНК онкомаркера цитокератина-19, полученные методом обратной транскрипции с применением реактивов M-MLVReverseTranscriptase (PromegaCorp., США). В работе использовали флуоресцентные зонды и синтезированные специфичные праймеры (ДНК-Синтез, СИНТОЛ, Россия). Последовательности применяемых праймеров и зондов приведены в Таблице 4.1.

Таблица 4.1 Последовательности праймеров и зондов

Олигонуклеотиды	Название	5'-3' последовательность
Прямой праймер	СК-19 for	CCTGCGGGACAAGATTCTTG
Обратный праймер фрагмента 210 п.о.	СК-19 rev210	CCTCGATCTGCATCTCCAGGTC
Обратный праймер фрагмента 310 п.о.	СК-19 rev310	GAATCCACCTCCACACTGACCT
Зонд TaqMan	СК-19-Probe	<b>FAM-CCACCATTGAGA</b> ACTCCAGGATTGTCC
Зонд Beacon	СК-19- Beacon	<b>FAM-</b> AGCGTCATTGAGA <b>ACTCCAGGATTGT</b> CGACGCT
Зонд FRET-донор	СК-19-FAM	AGATCGACAATGCCCGTCTGGC- <b>FAM</b>
Зонд FRET-акцептор	СК-19-Cy5	<b>Cy5-CAGATGACTTCCGAACCAAGTTT</b> GAGAC
Прямой праймер фрагмента 494 п.о.	СК-19- for494	TGGATTCCGCTCCGGGCACCG
Обратный праймер фрагмента 494 п.о.	СК-19- rev494	TCAGAGGACCTTGGAGGCAGACAAA
Зонд FRET-донор	СК-19-494	AAGATCCTGAGTGACATGCGAAGCCA- <b>FAM</b>
Зонд FRET-акцептор	СК-19-494	<b>Cy5-ATGAGGTCATGGCCGAGCAGA</b> AC

Зонд TaqMan использовали для проведения 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.

#### 4.1. Проверка влияния материалов на эффективность ПЦР

При постановке ПЦР существенно, чтобы используемые материалы не оказывали влияние на реакцию амплификации. Поэтому необходимо было удостовериться, что материалы, применяемые при создании микрочиповых устройств, не ингибируют ПЦР. Эти материалы можно поделить на две группы: материал подложки (стекло К8, ПММА марки ТОСП) и герметизирующие материалы (адгезивы для неразъемного соединения основных материалов).

##### Материал подложки

Для определения влияния материала подложки (стекло К8, ПММА марки ТОСП) на ПЦР были созданы прототипы микрочиповых устройств с одной или несколькими реакционными камерами (Рисунок 4.1 а,б), изготовленных способами, описанными в разделе 3.3.1. Прототип полимерного микрочипового устройства для ПЦР-РВ был выполнен из полиметилметакрилата. Нижняя полимерная пластина из ПММА марки ТОСП с реакционной камерой диаметром 9 мм и глубиной 0.35 мм, полученной методом механической микрообработки, была герметично соединена с защитной полимерной пластиной из ПММА марки АCRYМА с двумя цилиндрическими отверстиями диаметром 1 мм. Объем реакционной камеры полимерного устройства (30 мкл) был сопоставим с объемом ПЦР смеси в полимерных пробирках (25 мкл) для амплификации на традиционном оборудовании.

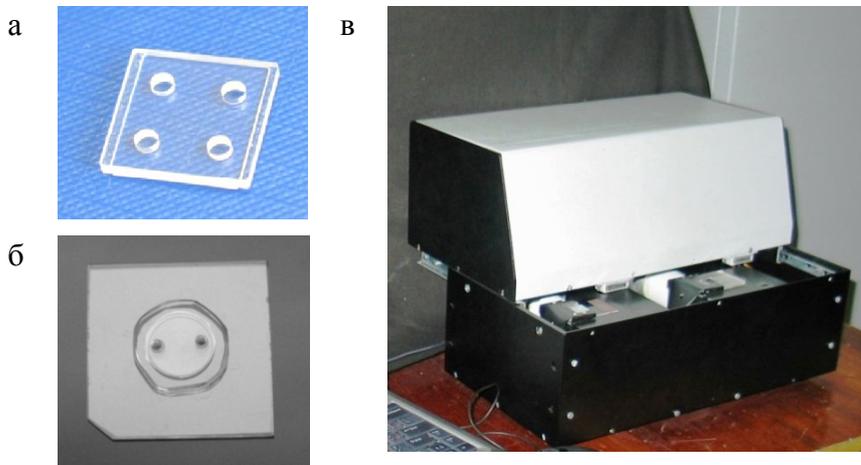


Рисунок 4.1 Изображение прототипов микрочиповых устройства для ПЦР-РВ, изготовленных из материалов: а) стекло К8, б) полиметилметакрилат марки ТОСП [122]. в) Прототип анализатора нуклеиновых кислот для микрочипов АНК-4 (ИАП РАН).

ПЦР-РВ проводили с применением флуоресцентных зондов типа TaqMan и реакционной смеси из набора №М-428 «ПЦР-Микс» (ЗАО Синтол, Россия). Для полимерных чипов был выбран следующий температурный режим: на начальном этапе — прогрев при 95°C в течение 5 минут, затем 45 циклов с температурным профилем: 1 минута при 60°C, 20 секунд при 95°C. Рост сигнала флуоресценции регистрировали в режиме реального времени на прототипе

анализатора нуклеиновых кислот для микрочипов АНК-4 (ИАП РАН, Россия) (Рисунок 4.1 в), позволяющим одновременно регистрировать сигнал от четырех флуоресцентных красителей с длиной волны возбуждения 470, 530, 590 или 625 нм непосредственно во время амплификации. Аналогичный эксперимент проводили в полипропиленовых пробирках на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Россия) по следующему температурному режиму: на начальном этапе — прогрев при 95°C в течение пяти минуты, затем 50 циклов при следующем температурном профиле: 30 секунд при 65°C, 20 секунд при 70°C и 20 секунд при 95°C.

Для определения значений порогового цикла кинетические зависимости амплификации, полученные на полимерном микрочиповом устройстве, аппроксимировали согласно математической модели, представленной в совместной работе [122]. Значения порогового цикла для кинетических зависимостей, полученных на традиционном оборудовании, рассчитывали в автоматическом режиме. На Рисунке 4.2 представлены градуировочные зависимости, построенные методом наименьших квадратов по результатам ПЦР-РВ, проведенной: 1) в полипропиленовых пробирках на АНК-32, 2) в реакционной камере микрочиповых устройств из ПММА (марки ТОСП®) на АНК-4. Результаты приведены в совместной публикации [123].

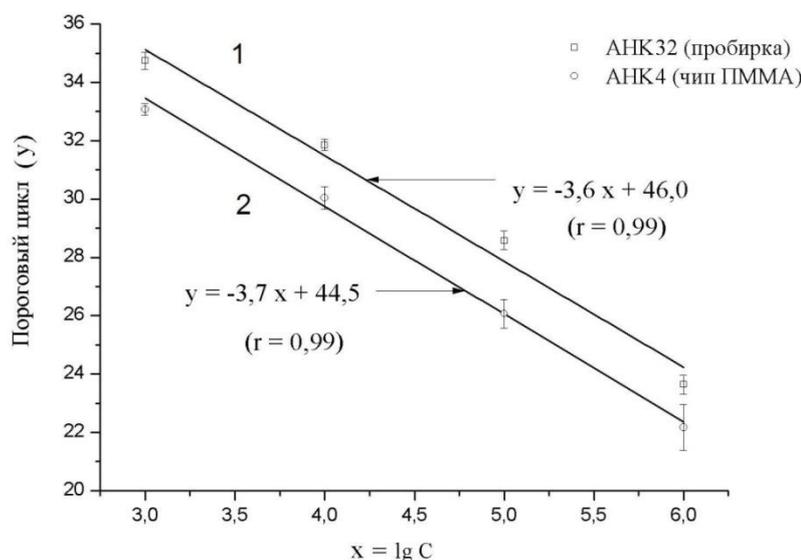


Рисунок 4.2 Градуировочные зависимости, построенные по результатам ПЦР-РВ:

1 – в пробирках (при стандартных условиях); 2 – в реакционной камере микрочипового устройства из ПММА

Градуировочная зависимость для ПЦР-РВ на полимерном чипе описывается уравнением:  $Y = -3,7 \cdot X + 44,5$  ( $R = 0,99$ ), а для полимерных пробирок в АНК-32 уравнение имеет вид:  $Y = -3,6 \cdot X + 46,0$  ( $R = 0,99$ ), при  $X = \lg C$ , где  $C$  – исходная концентрация ДНК-мишени (копий/мкл),  $Y$  – величина порогового цикла ПЦР. Полученные результаты свидетельствуют о

том, что два способа проведения ПЦР-РВ - в пробирке и микрочипе - по своим характеристикам очень близки. Значения эффективности ПЦР сопоставимы и составляют около 1,9 (или 90%) как для полимерного чипа, так и для пробирок в АНК-32. Следовательно, влияние материала микрочипового устройства на эффективность ПЦР либо отсутствует, либо настолько незначительно, что не может быть зарегистрировано данным способом.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что материал ПММА марки ТОСП не оказывает влияние на эффективность ПЦР.

### **Герметизирующие материалы**

Для предварительной оценки влияния герметизирующих материалов на ПЦР (учитывая, что при создании микрочипового устройства они используются в малых количествах) добавляли в пробирку при проведении традиционной ПЦР, ставя в качестве контрольного эксперимента пробирки без этих добавок. Для экспериментов применялось оборудование - амплификатор АНК-32 (ИАП РАН, Россия) и специфичные флуоресцентные зонды типа TaqMan для ПЦР-РВ. Величину порогового цикла ( $C_t$ ) определяли с применением программного обеспечения АНК-32 по трем-пяти повторам. Если материал приводил к ингибированию реакции (отсутствие роста сигнала флуоресценции), то необходимо было предотвратить его контакт с реакционной смесью в микрочиповом устройстве или исключить его из технологии создания микрочипового устройства.

В том случае, если рост флуоресценции регистрируется, однако сопровождается увеличением величины порогового цикла, можно предположить, что материал потенциально является ингибитором реакции. Разброс значений порогового цикла однотипных проб при проведении ПЦР-РВ обычно колеблется в области 0,3-0,5 единиц, и объясняется не идентичными условиями реакции для каждой пробирки (например, погрешностью при дозировании пробы). При анализе кинетической зависимости, полученной от пробирок с небольшим твердым образцом в ПЦР-смеси, можно допустить наличие искажений сигнала флуоресценции, связанных с формой и/или подвижностью твердого образца в жидкости. Поэтому в качестве критерия для определения значимости влияния твердых образцов на результат ПЦР была принята разница с контрольным образцом более чем на 1 цикл ПЦР-РВ. Следовательно, если разность средних значений порогового цикла для исследуемого материала и контрольного измерения ПЦР без добавления каких-либо добавок составляла менее чем 1.1 цикл, то считалось, что материал не оказывает влияние на ПЦР.

Были исследованы следующие материалы: клеи на акрилатной основе, полимеризующиеся под действием ультрафиолетового излучения (RiteLokUV02, ACRIFIX 1R 0192, Permabond 630, Permabond 640), двусторонний скотч на акрилатной основе

3М™ 467MP (3М) и двухкомпонентные кремнийорганические полимеры, отверждающиеся после внесения катализаторов (Sylgard 184, Пентэласт®-750, Пентэласт®-712, Силастик Т4).

Образцы фотоотверждаемых клеев диаметром не более 4 мм и массой около 3 мг обрабатывали под ультрафиолетовым излучением в течение 20 минут. Полимерную композицию Sylgard 184 согласно инструкции смешивали с катализатором в соотношении 10:1 и отверждали 4 часа при 60°C. В дальнейшем от сформированного полимера отрезали несколько образцов массой до 8 мг. Подготовленные образцы хранили в закрытой таре не менее недели, а затем образцы помещали в пустую полимерную пробирку для ПЦР. Массу твердых образцов определяли гравиметрическим методом при взвешивании пробирки на аналитических весах до и после внесения образца, затем пробирку с образцом заполняли подготовленной ПЦР-смесью. Неотвержденную полимерную основу (вязкий компонент) Пентэласта 750 и 712, Sylgard 184 и Силастика Т4 проверяли аналогично фотоотверждаемыми клеями, а жидкие катализаторы исследовали отдельно, добавляя их в реакционную смесь в количестве 5% по объему. Также проверяли влияние разбавителя ACRIFIX®ТС 0030 и метакриловой кислоты, применяемых для герметизации полимерных устройств (глава 3), на эффективность ПЦР.

Для ПЦР применяли специфичные праймеры и зонды с флуоресцентным красителем FAM (ДНК-Синтез, Россия) и реакционную смесь из набора №М-428 «ПЦР-Микс» (ЗАО Синтол, Россия), длина синтезируемого фрагмента составляла 210 п.о. В качестве мишени использовали синтезированный фрагмент кДНК в модельной концентрации  $10^5$  копий/мкл. Режим термоциклирования для АНК-32 был выбран следующий: прогрев 300 минут при 95°C, и 50 циклов по программе – 62°C в течение 60 секунд, 95°C в течение 15 секунд.

Экспериментальные результаты показали, что отвержденные полимерные композиции: ACRIFIX 1R 0192 (3 мг), Permabond 630 (3 мг), RiteLok UV02 (6 мг), Sylgard 184 (7 мг) - удовлетворяют предложенному выше критерию и, следовательно, не оказывают существенного влияния на результат ПЦР-РВ, проведенной на традиционном оборудовании (АНК-32). Такие же результаты характерны для вязких компонентов составных кремнийорганических полимеров: Sylgard 184 (3 мг), Пентэласт 712 (4 мг), Силастик Т4 (5 мг) - и для компонента «А» Пентэласта 750 (7 мг). Среднее значение порогового цикла, характерное для образцов компонента «В» Пентэласта 750 (6 мг) отличается от образца сравнения на 1.1 единицу. Следовательно, этот материал влияет на эффективность ПЦР и потенциально может вызвать ингибирование реакции. Присутствие в пробирке для ПЦР образцов двустороннего скотча 3М™ 467MP или отвержденного полимерного адгезива Permabond 640 вызывало ингибирование реакции.

Добавление в смесь для ПЦР жидких катализаторов (5% по объему) материалов Sylgard 184 и Силастик Т4 не оказывало существенного влияние на реакцию, а катализатор

Пентэласта 712 в тех же условиях ингибировал ПЦР. Также было проверено влияние химических растворителей на эффективность ПЦР. Установлено, что добавка 5 % (по объему) метакриловой кислоты в реакционную смесь ингибирует реакцию, а разбавитель ACRIFIX®TC 0030 в тех же условиях не влияет на ПЦР.

#### 4.2. Очистка стеклянных реакционных камер

Для многократного использования стеклянных микрочиповых 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. Обычно для очистки поверхности микрочиповых устройств от минерального масла достаточно применения слабых растворов щелочи (мыльный раствор), что сочетается с последующей обработкой поверхности реакционной камеры более сильными химическими реагентами для удаления остатков биологических комплексов реакционной смеси.

Выбор процедур очистки реакционной камеры ПЦР от компонентов реакционной смеси зависит от применяемого материала и, в том числе, определяется способом герметизации микрочипа. Обычно для дезактивации фрагментов ДНК применяют: прокаливание (нагрев выше 100°C), УФ-облучение и обработку химическими растворами, разрушающими ДНК и органические соединения реакционной смеси. Облучение УФ является наиболее распространенным способом борьбы с загрязнениями в ПЦР-лабораториях. Рабочие поверхности и оборудование до и после работы с генным материалом подвергаются облучению ультрафиолетовыми лучами с максимумом излучения в области 260 нм. [124] Но применение УФ-облучения для очистки микрочипов ограничено характеристиками применяемых материалов, так как не все материалы являются прозрачными в данном диапазоне. Денатурация ДНК посредством нагрева смеси выше 100°C осуществляется под давлением (автоклав). Однако при работе с микрочипами возникают трудности, связанные с очисткой микроструктур, для чего необходимо создавать конвекционные потоки жидкости в микроканалах.

Для стеклянных микрочиповых устройств выбор химических методов очистки является наиболее приемлемым. В лабораторной практике для дезактивации ДНК обычно применяют растворы на основе концентрированной серной кислоты, раствор гипохлорита натрия, хлорной извести, хлорамина, смесь метанола и соляной кислоты и др. [124] 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); 2)

элюирующий ДНК буферный раствор ТЕ (0.01 М Трис-НСl 0.01 М ЭДТА, рН 7.8); 3) смесь концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 3:1 (подобные растворы носят название «пиранья»).

Хромовая смесь (5 %-й раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте) является одним из лучших моющих средств, обладает сильным окислительным действием, рекомендована для обработки стеклянных пробирок при работе с генным материалом. [52, 125]

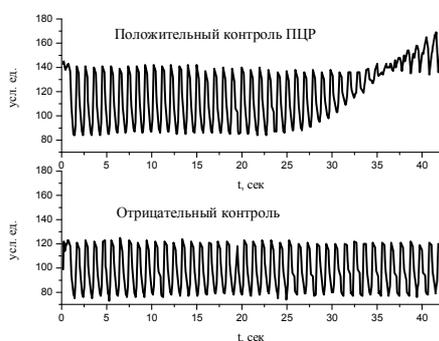
«Пиранья» – смесь концентрированной серной кислоты и перекиси водорода в соотношении 3:1 применяется для очищения поверхностей кварца и стекла от органических загрязнений. [52]

Гипохлорит натрия (раствор натриевой соли хлорноватистой кислоты) в слабых концентрациях сохраняет окислительные свойства и бактерицидную активность — рекомендован для очистки загрязненных поверхностей в ПЦР-лабораториях. [126] Для исследований был выбран 1 %-й раствор гипохлорита натрия, который является наиболее стабильным и комфортным для практической работы.

Элюирующий ДНК буферный раствор ТЕ (0.01 М Трис-НСl рН 7.8, 0.01 М ЭДТА) используется при работе с генетическим материалом для удаления фрагментов ДНК со стеклянной поверхности. [126]

На прототипах стеклянных микрочипов, изготовленных методом термического связывания, выполнялись исследования этих средств по следующей схеме: 1) проведение ПЦР с добавлением ДНК-мишени в концентрации  $10^6$  копий/мкл (Рисунок 4.3 а, положительный контроль), 2) очистка поверхности чипа от органических компонентов при помощи выбранного химического средства, 3) проведение ПЦР без добавления ДНК (Рисунок 4.3 б, отрицательный контроль).

а)



б)

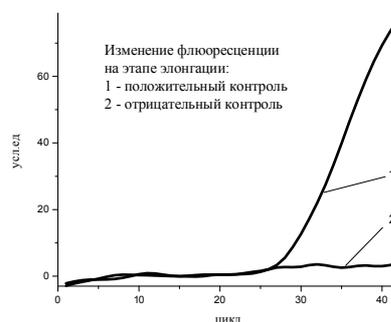


Рисунок 4.3 а) Экспериментальные зависимости интенсивности флуоресценции при циклическом нагреве реакционной смеси в случае положительного и отрицательного контроля.

б) Зависимость изменения флуоресценции (на этапе элонгации) от количества циклов ПЦР при положительном и отрицательном контролях [127]

Предварительные результаты показали, что при отрицательном контроле на микрочипе, промытом буферным раствором ТЕ, наблюдается экспоненциальное увеличение интенсивности флуоресценции на этапе элонгации, характерное для ПЦР. Можно предположить, что даже после обработки буферным раствором на стеклянной поверхности микрочипа присутствуют биологически активные комплексы. Следовательно, применения буферного раствора ТЕ не достаточно для очистки стеклянной поверхности реакционных камер микрочипа.

Установлено, что однократной обработки 1% водным раствором гипохлорита натрия или раствором «пиранья» достаточно для очистки стеклянной поверхности реакционной камеры, что подтверждено отрицательным контролем. Однако после обработки раствором «пиранья» при повторном использовании микрочипового устройства наблюдается изменение характера кинетической зависимости интенсивности флуоресценции (Рисунок 4.4, зависимость 3), что, по-видимому, означает влияние данной смеси на поверхностные свойства реакционной камеры, приводящее к изменению эффективности ПЦР.

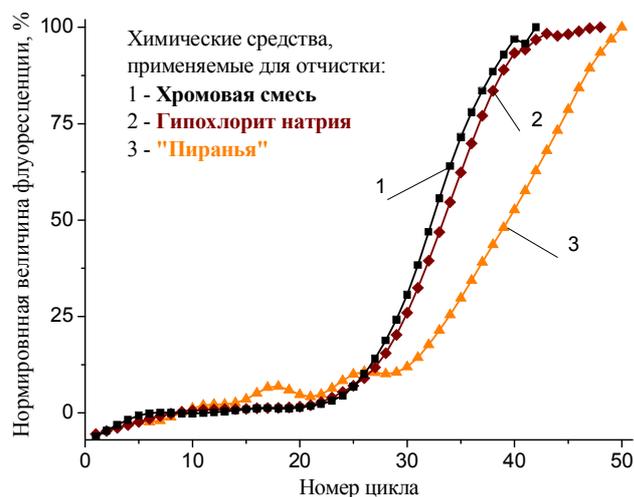


Рисунок 4.4 Нормированные графики накопления ПЦР продукта, полученные в стеклянных микрочиповых устройствах после их обработки разными химическими растворами: 1 – хромовой смесью; 2 – раствором гипохлорита натрия; 3 – смесью перекиси водорода и концентрированной серной кислоты («пиранья»). [127]

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

### 4.3. Постановка цПЦР в микрочиповых устройствах

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. Изображения микрочиповых устройств приведены на Рисунке 4.5.

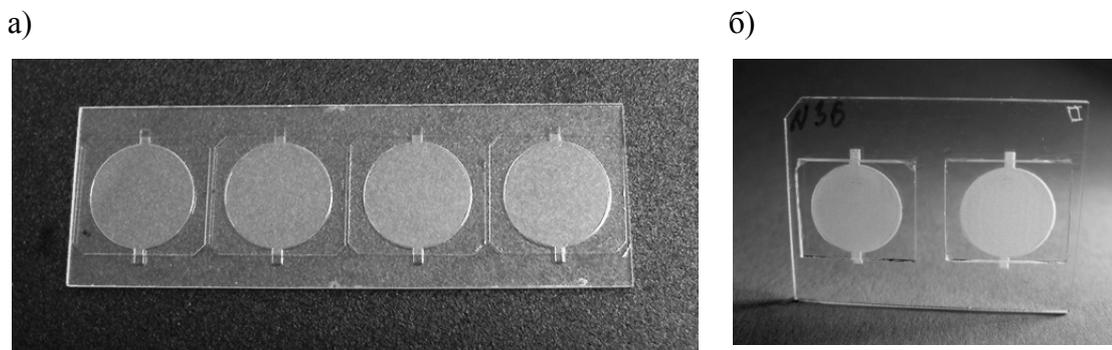


Рисунок 4.5 Микрочиповые устройства для цПЦР: а) из стекла марки К8, б) из ПММА.

Для апробации стеклянных микрочиповых устройств в качестве ДНК-мишени применяли пробу, содержащую кДНК онкомаркера цитокератина СК-19, полученную методом обратной транскрипции. Методика подготовки пробы и основные результаты подробно рассмотрены в совместной работе [128]. Перед экспериментом гель восстанавливали путем пропитывания смесью для ПЦР, которую вводили в каждую лунку дозатором через входное отверстие. Детектирование молекулярных колоний проводили на прототипе детектора молекулярных колоний ДМК-1 (ИАП РАН) при длине волны возбуждения 473 нм.

Исходя из предварительных оценок исходную пробу кДНК цитокератина-19, концентрация которой была определена методом ПЦР-РВ ( $150 \pm 16$  копий/мкл,  $n=4$ ) на АНК-32 (ИАП РАН), разбавляли буферным раствором в 5 и 15 раз до достижения расчетной концентрации 30 и 10 молекул/мкл. В готовую реакционную смесь добавляли 1 мкл раствора анализируемой пробы.

На Рисунке 4.6 приведены изображения колоний, полученные в реакционных камерах стеклянного микрочипового устройства после 45 циклов ПЦР по следующей программе прогрев при  $95^\circ\text{C}$  в течение 300 сек, затем 45 циклов рабочего режима:  $95^\circ\text{C}$  в течение 6 секунд,  $60^\circ\text{C}$  в течение 60 секунд. Применяли зонды FRET и набор праймеров (фрагмент 210 п.о.). При обработке результатов не учитывался разброс по интенсивности свечения колоний, при этом несимметричные объекты интерпретировались как сочетание двух круглых колоний. Таким образом, было зарегистрировано  $31 \pm 7$  ( $n=3$ ) и  $10 \pm 3$  ( $n=9$ ) молекулярных колоний, что согласуется с данными, полученными при ПЦР-РВ.

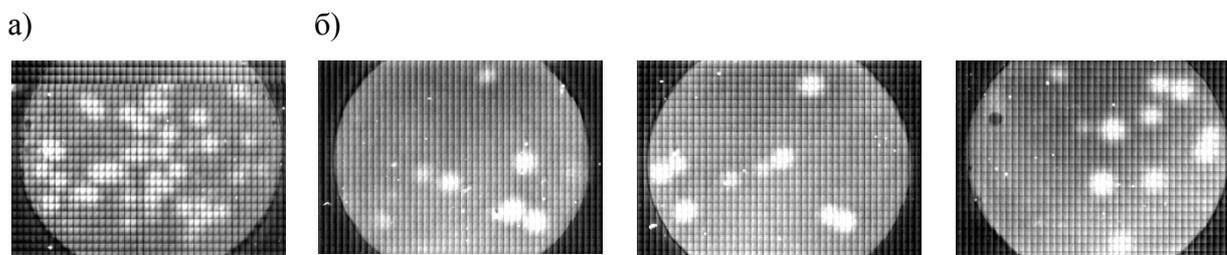


Рисунок 4.6 Изображения молекулярных колоний кДНК цитокератина (фрагмент 210 п.о.), полученные в стеклянном микрочиповом устройстве после 45 циклов амплификации: а) при разбавлении исходной пробы в 5 раз; б) при разбавлении исходной пробы в 15 раз.

Для апробации полимерных микрочиповых устройств использовали синтезированный фрагмент кДНК цитокератина длиной 210 п.о. На Рисунке 4.7 приведены изображения колоний, полученные в полимерном микрочиповом устройстве при внесении в реакционную смесь 1 мкл тестового образца, содержащего  $\sim 10$  молекул/мкл. Для проведения ПЦР применяли прототип устройства для термоциклирования (ИАП РАН), программу температурного профиля корректировали согласно рекомендациям (раздел 2.2). Зарегистрированное число колоний составило  $8 \pm 3$  ( $n=5$ ), при добавлении 2 мкл тестового образца число колоний увеличилось до 15.

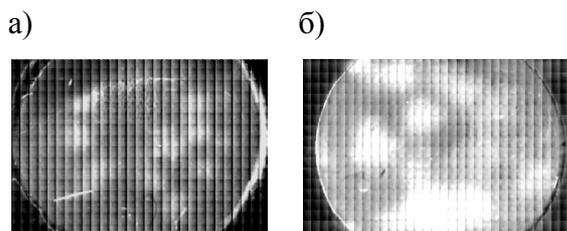


Рисунок 4.7 Изображения молекулярных колоний фрагмента кДНК цитокератина длиной 210 п.о., полученные в полимерном микрочиповом устройстве после 45 циклов амплификации при добавлении тестового образца, содержащего 10 копий/мкл, в объеме: а) 1 мкл; б) 2 мкл.

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.

#### 4.4. Изменение размеров колоний

Для оценки изменения размера колоний применялись наборы специфичных зондов (FRET) и праймеров, позволяющие амплифицировать фрагменты кДНК СК-19 длиной 210, 310 и 494 п.о. Для определения характерного радиуса колонии использовали подход, описанный в работе [81]: для обсчета выбирали отдельно расположенные единичные колонии,

анализировали график пространственного распределения сигнала флуоресценции по линии, проходящей через центр колонии. (Рисунок 4.8).

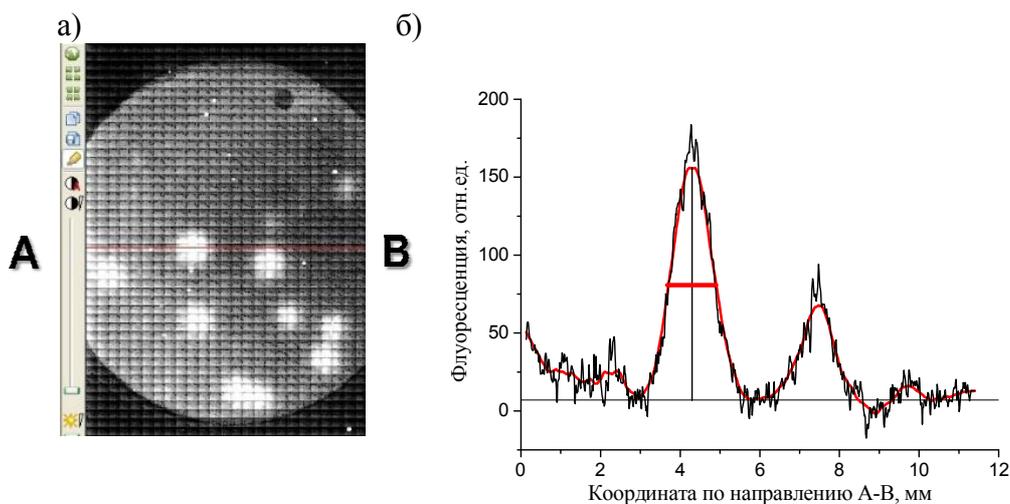


Рисунок 4.8 Оценка характерного размера колонии: а) исходное изображение молекулярных колоний, б) пространственное распределение сигнала флуоресценции по линии, проходящей через центр колонии.

Характерный диаметр колонии оценивали как ширину пика флуоресценции на полувысоте. В Таблице 4.2 приведены результаты измерения характерного радиуса колоний, полученных после 45 циклов ПЦР в реакционных камерах стеклянных микрочиповых устройств.

Таблица 4.2 Оценка характерного радиуса колоний кДНК онкомаркера цитokerатина 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)

Характерный радиус колоний, регистрируемых в микрочиповых устройствах, оказался несколько больше размеров колоний, представленных в работе [81]. Однако изменение радиуса колоний от длины фрагмента хорошо согласуется с результатами зарубежных исследователей, если их аппроксимировать линейными зависимостями, представленными на Рисунке 4.9. Для метода «полоний» зависимость размера колоний от длины фрагмента (120, 234, 514 п.о.) в 6% акриламидном геле в логарифмических осях можно представить в виде:

$$\lg Y = -1,55 \cdot \lg X + 6,17 \quad (R=0,99),$$

а для метода молекулярных колоний (210, 310, 494 п.о.) в виде:

$$\lg Y = -1,49 \cdot \lg X + 6,21 \quad (R=0,99),$$

где  $Y$  – величина характерного радиуса молекулярных колоний (мкм),  $X$  – длина амплифицируемого фрагмента ДНК (п.о.).

Коэффициенты наклона линейных зависимостей близки, что свидетельствует о том, что отличие размеров может быть обусловлено систематическим фактором, который может включать как особенности методов проведения ПЦР в геле, так и отличия в методиках проведения экспериментов (количеством циклов ПЦР, соотношением прямого и обратного праймеров и др.).

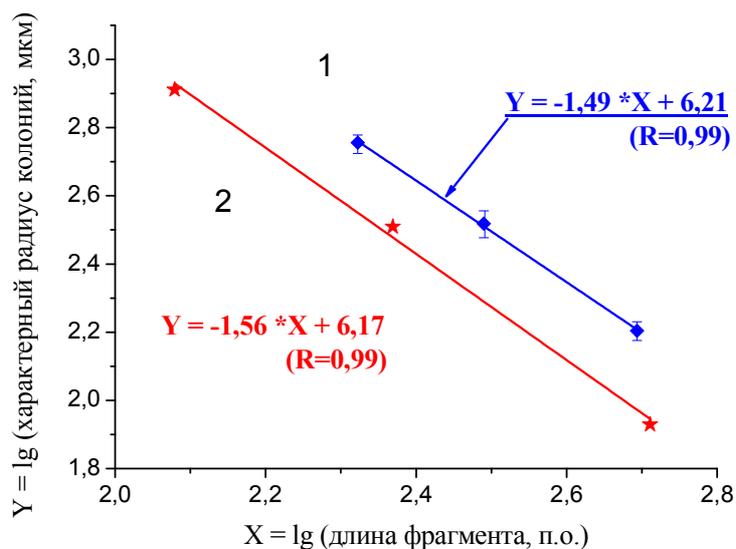


Рисунок 4.9 Зависимости изменения характерного радиуса колоний от длины фрагмента, представленные в двойных логарифмических осях, полученные: 1 – методом молекулярных колоний в микрочиповых устройствах, 2 – методом колоний из работы [81].

Для регистрации молекулярных колоний на более ранней стадии в работе использовался метод микроскопии высокого разрешения. На Рисунке 4.10 приведено изображение молекулярной колонии кДНК СК-19(фрагмент 494 п.о.) после проведения 30 циклов ПЦР, полученное на КЛСМ TCS-SL (Leica, Германия). Характерный диаметр молекулярных колоний составил около 170 мкм.

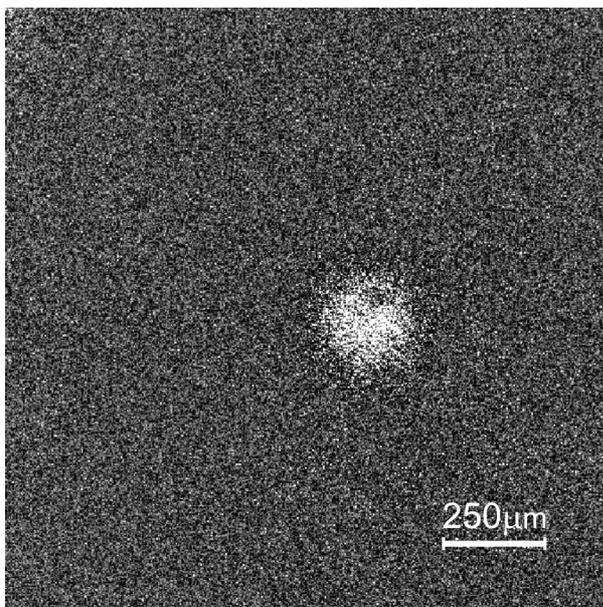


Рисунок 4.10 Изображение отдельной молекулярной колонии, полученное на КЛСМ после 30 циклов ПЦР при амплификации фрагмента кДНК СК-19 (фрагмент 494 п.о.). Размер кадра 1,5x1,5 мм.

#### 4.5. Основные результаты главы 4

1. Созданы микрочиповые устройства, изготовленные из: а) боросиликатного стекла (марки К8) и б) ПММА марки ГОСП<sup>®</sup>, - позволяющие обнаружить единичные молекулы нуклеиновых кислот при проведении ПЦР в гелевой среде с применением флуориметрических методов детектирования, в частности результаты, полученные при разведении исходной пробы кДНК онкомаркера цитокератина-19: а) в 5 раз ( $31 \pm 7$  молекул,  $n=3$ ) и б) в 15 раз ( $10 \pm 3$  молекул,  $n=9$ ) имеют хорошее количественное совпадение с результатами, полученными при анализе исходной пробы (150 молекул) методом ПЦР-РВ.
2. Предложен подход, позволяющий установить влияние твердофазных полимерных материалов и композиций на эффективность ПЦР, сочетающий известные методики определения влияния ингибирующих веществ на ПЦР. Он основывается на оценке изменения величины порогового цикла при проведении ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в присутствии тестируемого материала. Экспериментальные результаты показали, что применяемые фотоотверждаемые полимерные композиции не оказывают негативного влияния на эффективность ПЦР.
3. Зависимость величины характерного радиуса молекулярных колоний ( $Y$ , мкм) от длины амплифицируемого фрагмента ДНК ( $X$ , п.о.) для ММК с применением специфичных флуоресцентных зондов (FRET) носит монотонно убывающий характер и хорошо аппроксимируется зависимостью:  $\lg Y = -1,49 \cdot \lg X + 6,21$  ( $R=0,99$ ).

## Заключение

1. Экспериментальные исследования свойств неорганического стекла марки К8 и полиметилметакрилата (ПММА) марки ТОСП® («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® определены режимы формирования микроструктур глубиной  $200 \pm 10$  мкм в листовом полиметилметакрилате методами лазерной микрообработки (на длине волны 10,6 мкм), позволяющие оперативно изготавливать однотипные заготовки (до 100 шт) 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 специфичных флуоресцентных зондов, имеют хорошее совпадение с результатами, полученными другими методами: а) ПЦР-РВ на АНК-32, б) полоний (polony).

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.

**Перечень сокращений и условных обозначений:**

- СК-19 – онкомаркер цитокератин-19 (Cytokeratin-19)
- БИК – ближний инфракрасный диапазон
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДНК – комплементарная ДНК
- дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
- ИК – инфракрасный диапазон
- КЛСМ – конфокальный лазерный сканирующий микроскоп
- ЛА – лазерная абляция
- ГОК – глубокий оптический контакт
- метод «полоний» (polony) – метод полимеразных колоний
- ММК – метод молекулярных колоний
- МОПТМС –  $\gamma$ -метакрилоксипропилтриметоксисилан
- ПАА – полиакриламид
- ПДМС – полидиметилсилоксан
- ПК – поликарбонат
- ПММА – полиметилметакрилат
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- цПЦР – цифровая полимеразная цепная реакция
- РМЖ – рак молочной железы
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СБОМ – сканирующий ближнепольный оптический микроскоп
- УФ – ультрафиолетовый диапазон
- ФОК – фотоотверждаемые композиции
- оеп – относительные единицы поглощения
- п.о. – пар оснований нуклеотидной последовательности

**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. Евстрапов, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2011. – Т.21. – N.4. – С. 5–21.
- 6) Евстрапов, А.А. Оценка результатов полимеразной цепной реакции в реальном времени кДНК онкомаркеров СК-19 методом электрофореза на микрофлюидном чипе [Текст] / А.А. Евстрапов, 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. Евстрапов, **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. Евстрапов // 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. Евстрапов // 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. Евстратов // Обзорение прикладной и промышленной математики. – 2014. – Т.21. – N 4. – С. 1–2.

11) **Тупик А.Н.** Design reaction chamber for digital PCR in gel / A.N. Tupik, A.A. Evstratov, 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.

## Список литературы

1.  $\mu$ -TAS: Miniaturized Total Chemical Analysis Systems [Text] / A. Manz, E. Verpoorte, D.E. Raymond, C.S. Effenhauser et al. // Micro Total Analysis Systems / ed. A/ Van den Berg, P. Bergveld. – Netherlands: Springer, 1995. – P.5–27.
2. Mullis, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction [Text] / K.B. Mullis// Annales De Biologie Clinique. – 1990. – N.48. – P.579–582.
3. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения. [Текст]. – М.: Госкомсанэпиднадзор, 1995.
4. Санитарные правила и нормы: СП 1.2.731 – 99. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами [Текст]. – М.: Госкомсанэпиднадзор, 1999.
5. Санитарные правила и нормы: СП 1.3.011-03. Безопасность работы с микроорганизмами I- II групп патогенности. [Текст]. – М.: Госкомсанэпиднадзор, 2003.
6. Ou, C.Y., Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction [Text] / C.Y. Ou, J.L. Moore, G. Schochetman // BioTechniques. – 1991. – N.10. – P.442-446.
7. Sarkar, G. Shedding light on PCR contamination [Text] / G. Sarkar. S. Sommer // Nature. – 1990. – N.343. – P.27.
8. Пат. US5605796 A (WO1996002672A1), IPC: C12Q1/68. Method for preventing amplification of nucleic acid contaminants in amplification mixtures using nuclease-receptor conjugates [Text] / Y.Chen, S.J. Rose, E.F. Ullman; патентообладатель Behringwerke Ag – № US08/277547; заявл.19.07.1994; опубл. 25.02.1997.
9. Пат. US5418149 A, IPC: C12N9/00 C12Q1/68, C12N15/09, C12N9/12. Reduction of non-specific amplification glycosylase using DUTP and DNA uracil [Text] / D.H. Gelfand, S.Y. Kwok, J.J. Sninsky; патентообладатель Hoffmann-La Roche Inc. – № US07/960362; заявл.23.07.1991; опубл. 23.05.1995.
10. Northrup, M.A. DNA amplification in a microfabricated reaction chamber [Text] / M.A. Northrup, M.T. Ching, R.M. White, R.T. Watson// Transducers '93, 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators, Yokohama, Japan – IEEE, N.Y. – 1993 – P.924–927.
11. Zhang, C. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends [Text] / C. Zhang, D. Xing //Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol.35. – N.13. – P.4223–4237.
12. Production-scale throughput with exquisite single-cell sensitivity and consistent results [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. - Режим доступа: <http://www.fluidigm.com/biomark-system.html>, свободный.

13. Real-Time PCR Using OpenArray® Technology [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. - Режим доступа: <http://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-openarray.html>, свободный.
14. Neuzil, P. Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost [Text] / P. Neuzil, J. Pipper, T.M. Hsieh // *Molecular BioSystems*. – 2006. – N.2. – P.292–298.
15. Zhang, C. PCR microfluidic devices for DNA amplification [Text] / C. Zhang, J. Xu, W. Ma, W. Zheng // *Biotechnology Advances*. – 2006. – V.24. – P.243–284.
16. Neuzil, P. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes [Text] / P. Neuzil, C.Y. Zhang, J. Pipper, S. Oh, L. Zhuo // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – N.34. – e.77
17. Nakano H., High-speed polymerase chain reaction in constant flow [Text] / H. Nakano, K. Matsuda, M. Yohda et al // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1994. – N.58. – P.349–352.
18. Kopp, M.U. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip [Text] / M.U. Kopp, A.J.D. Mello, A. Manz // *Science*. – 1998. – Vol.280. – P.1046–1048.
19. Xiaoyu, J. Polydimethylsiloxane (PDMS)-based spiral channel PCR chip [Text] / J. Xiaoyu, N. Zhiqiang, C. Wenyuan, Z. Weiping // in *Proc. 4th Electronics Letters Conf.* – 2005. – Vol.2. – N.16.
20. Bu, M. Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR [Text] / M. Bu, T. Melvin, G. Ensell, J.S. Wilkinson, A.G.R. Evans // *J. Micromech. Microeng.* – 2003. – Vol.13. – S125-S130.
21. Wang, W. Droplet-based micro oscillating flow PCR chip [Text] / W. Wang, Z.X. Li, R. Luo, S.H. Lu, A.D. Xu, Y.J. Yang // *J. Micromech. Microeng.* – 2005. – Vol.15. – P.1369-1377.
22. Malic, L. Current state of intellectual property in microfluidic nucleic acid analysis [Text] / L. Malic, M. Herrmann, X.D. Hoa, M. Tabrizian // *Recent Patents on Engineering*. – 2007. – Vol.100. – N.1 – P.71-88. – DOI: 10.2174/187221207779814680
23. West, J. Micro total analysis systems: latest achievements [Text] / J. West, M. Becker, S. Tombrink, A. Manz // *Analytical Chemistry*. – 2008. – V.80. – N.12 – P.4403–4419.
24. Zhang, C. Single-molecule DNA amplification and analysis using microfluidics [Text] / C. Zhang, D. Xing // *Chemical Reviews*. – 2010. – Vol.110. – P.4910–4947.
25. Bu, M., Fabrication of a microfluidic chip for PCR applications [Text] / M. Bu, B. Husband, T. Melvin et al. // *14th MicroMechanics Europe Workshop* – 2003. - P.119-122.
26. Shoffner, M.A. Chip PCR. I. surface passivation of microfabricated silicon-glass chips for PCR [Text] / M.A. Shoffner, J. Cheng, G.E. Hvichia, L.J. Kricka, P. Wilding // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – V.24. – N.2 – P.375–379.
27. Cheng, J. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips [Text] / J. Cheng, M.A. Shoffner, G.E. Hvichia, L.J. Kricka, P. Wilding // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – V.24. – N.2 – P.380–385.

28. Alrifaiy, A. Polymer-based microfluidic devices for pharmacy, biology and tissue engineering [Text] / A. Alrifaiy, O.A.Lindahl, K. Ramser // *Polymers*. – 2012. – V.4. – P.1349–1398.
29. Becker, H. Polymer microfluidic devices [Text] / H. Becker, L.E. Locascio // *Talanta*. – 2002. – Vol.56. – P. 267–287.
30. Becker, H. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems / H. Becker, C. Gartner // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – Vol. 390 – N.1. – P.89–111.
31. Lee, S.-J. J. Microfabrication for microfluidics [Text] / S.-J. J. Lee, N. Sundararajan. – MA, Norwood: ARTECH House Inc, 2010. – 280 p.
32. Крыжановский В.К. Производство изделий из полимерных материалов [Text]: учебное пособие / В.К. Крыжановский, М.Л. Кербер, В.В. Бурлов, А. Д. Паниматченко. – СПб.: Профессия, 2004. – 464 с.
33. Способы обработки органического стекла [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: [http://www.dzor.com/russian/catalog/sposobi\\_obrabotki\\_organicheskogo\\_stekla/](http://www.dzor.com/russian/catalog/sposobi_obrabotki_organicheskogo_stekla/), свободный.
34. Евстрапов, А.А. Микрофлюидные устройства для исследований биологических проб методами флуорометрии и оптической микроскопии высокого разрешения [Текст]: дис. ... д-ра техн.наук: 01.04.01, защищена 13.09.2012 / Евстрапов Анатолий Александрович. – СПб, 2012. – 353 с.
35. Muck, A. Chemical modification of polymeric microchip devices [Text] / A. Muck, A. Svatos // *Talanta*. – 2007. – Vol.74. – P.333–341.
36. Tsao, C.W. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics [Text] / C.W. Tsao, D.L. DeVoe // *Microfluid Nanofluid*. – 2009. – N.6. – P.1–16.
37. 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.
38. Справочник технолога-оптика [Текст]: справочник / ред. М.А. Окатова. – 2-е изд. – СПб: Политехника, 2004. – 680 с.
39. Balslev, S. Lab-on-a-chip with integrated optical transducers [Text] / S. Balslev, A.M. Jorgensen, B. Bilenberg, K.B. Mogensen et al. // *Lab on Chip*. – 2006. – Vol.6. – P.213–217.
40. Ito, T. Water glass bonding for micro-total analysis system [Text] / T. Ito, K. Sobue, S. Ohya // *Sensors and Actuators B*. – 2002. – Vol.81. – N.2. – P.187–195.
41. Brown L., Fabrication and characterization of poly (methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents [Text] / L. Brown, T. Koerner, J.H. Horton, R.D. Oleschuk // *Lab on Chip*. – 2006. – Vol.6. – P.66–73.

42. Schlautmann, S. Fabrication of a microfluidic chip by UV bonding at room temperature for integration of temperature-sensitive layers / S. Schlautmann, G.A.J Besselink., G.R. Prabhu, R.B.M. Schasfoort // *J. Micromech. Microeng.* – 2003. – V.13. – P. S81–S84.
43. Сумм, Б.Д. Физико-химические основы смачивания и растекания [Текст] / Б.Д. Сумм, Ю.В. Горюнов. – М.: Химия, 1976. – 232 с.
44. Cheng, J-Y. Direct-write laser micromachining and universal surface modification of PMMA for device development [Text] / J-Y. Cheng, C-W. Wei, K-H. Hsu // *Sensors and Actuators B.* – 2004. – Vol.99. – N.1. – P.186–196.
45. Химия привитых поверхностных соединений [Текст] / Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан и др.; ред. Г.В. Лисичкина. – М.: Физматлит, 2003. – 592 с.
46. Stratakis, E. Biomimetic micro/nanostructured functional surfaces for microfluidic and tissue engineering applications [Text] / E. Stratakis, A. Ranella, C. Fotakis // *Biomicrofluidics.* – 2011. – Vol.5. – N.1. – P.013411.
47. Mathur, A. Characterisation of PMMA microfluidic channels and devices fabricated by hot embossing and sealed by direct bonding [Text] / A. Mathur, S.S. Roy, M. Tweedie et al. // *Curr. Appl. Phys.* – 2009. – Vol.9. – P.1199–1202.
48. Vesel, A. Surface modification and ageing of PMMA polymer by oxygen plasma treatment [Text] / A. Vesel, M. Mozetic // *Vacuum.* – 2012. – Vol.86. – N.6. – P. 634–637.
49. 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.
50. Нейланд, О.Я. Органическая химия: учебник для хим. спец. вузов [Текст] / О.Я. Нейланд - М.: Высш. шк., 1990. – 751 с.
51. Brown, L. Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents [Text] / L. Brown, T. Koerner, J.H. Horton, R.D. Oleschuk // *Lab on Chip* – 2006. – Vol.6. – N.1. – P. 66–73.
52. Zhuang, G. low temperature bonding of quartz microfluidic chip [Text] / G. Zhuang, Q. Jin, J. Liu, H. Cong et al. // *Biomed Microdevices.* – 2006. – № 8. – P. 255–261.
53. Шляпников Ю.М. Разработка методов иммобилизации и детекции фрагментов ДНК на микрочипах [Текст]: автореферат дис... канд. хим. наук: 02.00.10 / Шляпников Юрий Михайлович; МГУ им. М.В. Ломоносова. – М, 2010 – 22 с.
54. Kitova, S. Soft plasma treatment of polymer surfaces [Text] / S. Kitova, M. Minchev, G. Danev // *J. Optoelectronics and Advanced Materials.* – 2005. – Vol.7. – N.1. – P.249–252.

55. Jafari, M. Surface modification of PMMA polymer in the interaction with oxygen-argon RF plasma [Text] / M. Jafari, D. Dorrnanian // *J. Theoretical and Applied Physics*. – 2011. – Vol.5. – N.2. – P.59–66.
56. Peth, C. Near-edge x-ray absorption fine structure measurements using a laboratory-scale XUV source [Text] / C. Peth, F. Barkusky, K. Mann // *J. Physics D: Applied Physics*. – 2008. – Vol.41. – N.10. – Article ID 687496, 9 p.
57. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223с. ISBN 978-5-9963-0086-0
58. Optimization of PCRs [Text]: protocols for functional genomics / ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. – London: Academic Press, 1999. – 566 p.
59. Grunenwald H. Optimization of Polymerase Chain Reaction [Text]: PCR protocols / ed. J.M.S. Bartlett, D. Stirling. H. Grunenwald. – *Methods in Molecular Biology*. – Vol. 226. – 2nd ed. – Totowa: Humana Press Inc., 2003. – P. 89-99. – ISBN: 978-1-59259-384-2.
60. PCR detection of microbial pathogens [Text] / ed. M. Wilks. – Humana Press, 2013. – 317 p. – ISBN: 978-1-60327-352-7
61. Влияние различных веществ на PCR [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: [http://molbiol.ru/protocol/12\\_03.html](http://molbiol.ru/protocol/12_03.html), свободный.
62. Лаврова, М.В. Разработка микрофлюидной аналитической системы для экспрессного определения ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [Текст]: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Лаврова Марина Викторовна. – СПб, 2007. – с. 23
63. Maturos, T. Temperature cycle and surface treatment study of thermoelectric base micro PCR [Text] / T. Maturos, T. Pogfay, S. Mongpraneet, A. Wisitsoraat et al. // *Pr. 5th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, Xiamen, China. – 2010. – P.712-715
64. Kovarova, M. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions [Text] / M. Kovarova, P. Draber // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol.28. – N.13. – e70.
65. SsoAdvanced™ Universal Inhibitor-Tolerant SYBR® Green Supermix [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: [http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/ssoadvanced-universal-inhibitor-tolerant-sybr-green-supermix?pcp\\_loc=catprod](http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/ssoadvanced-universal-inhibitor-tolerant-sybr-green-supermix?pcp_loc=catprod), свободный.
66. Dube, S.. Matematical analysis of copy number variation in DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device [Text] / S. Dube, J. Qin, R. Ramakrishnan // *PLoS ONE*, 2008. – Vol.3. – N.8. – e2876. – doi:10.1371/journal.pone.0002876.
67. Sykes, P.J. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [Text] / P.J. Sykes, S.H. Neoh, M.J. Brisco et al. // *Biotechniques*. – 1992. – Vol.13. – N.3. – P. 444–449.
68. Антонова, О.С. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик [Текст] / О.С. Антонова, Г.Е. Рудницкая, А.Н. Тулик,

А.Л. Буляница, А.А. Евстапов, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2011. – Т.21. – N.4. – С. 5–21.

69. Adessi, C. Solid phase amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms [Text] / C. Adessi, G. Matton, G. Ayala et al. // *Acids Research*. – 2000. – V.28. – e87.

70. Hindson, B.J. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [Text] / B.J. Hindson, K.D. Ness, D.A. Masquelier et al.// *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol.83. – P.8604–8610.

71. Пат. 2048522 Российская Федерация, МПК C12P19/34, C12P21/00, C12Q1/68 Способ размножения нуклеиновых кислот, способ их экспрессии и среда для их осуществления [Текст] / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина; патентообладатель Институт белка РАН. – заявл. 14.10.1992; опубл. 20.11.1995.

72. Пат. 2114175 Российская Федерация, МПК C12P19/34, C12P21/00, C12Q1/68 Способ клонирования нуклеиновых кислот [Текст] / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина; патентообладатель Институт белка РАН. – № 93044929; заявл. 14.09.1993; опубл. 27.06.1998.

73. Пат. 2114915 Российская Федерация, МПК C12P19/34, C12P21/00, C12Q1/68 Способ диагностики нуклеиновых кислот / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина; патентообладатель Институт белка РАН. – № 93044928; заявл. 14.09.1993; опубл. 10.07.1998.

74. Пат. 5616478 USA, IPC: C12P19/34, C12Q1/60. Method for amplification of nucleic acids in solid media / A.B. Chetverin, H.V. Chetverina; патентообладатель A.B. Chetverin, H.V. Chetverina – № US07/966713; заявл.26.10.1992; опубл. 01.04.1997.

75. Пат. US5958698 A (US6001568) IPC: C12P19/34, C12Q1/60. Method for amplification of nucleic acids in solid media and its application for nucleic acid cloning and diagnostics / A.B. Chetverin, H.V. Chetverina; патентообладатель Institut Belka – № US09/135446; заявл.17.08.1998; опубл. 28.09.1999.

76. Пат. US6001568 A (US5958698) IPC: C12Q1/68 Solid medium for amplification and expression of nucleic acids as colonies / A.B. Chetverin, H.V. Chetverina; патентообладатель Institut Belka – № US08/723260; заявл.30.09.1996; опубл. 14.12.1999.

77. Четверина, Е.В. Нанокolonии: обнаружение, клонирование и анализ индивидуальных молекул [Текст] / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина // *Успехи биол. Химии*. – 2008. – N.48. – С.3-64.

78. Samatov, T.R. Expressible molecular colonies [Text] / T.R. Samatov, H.V. Chetverina, A.B. Chetverin // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol.33. – N.17. – e145.

79. Chetverina, H.V Simultaneous assay of DNA and RNA targets in the whole blood using novel isolation procedure and molecular colony amplification [Text] / H.V. Chetverina, M.V. Falaleeva, A.B. Chetverin // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – Vol.334. – N.2. – P.376–381.

80. Chetverina, H.V. Molecular colony diagnostics: Detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR [Text] / H.V. Chetverina, T.R. Samatov, V.I. Ugarov, A.B. Chetverin // *BioTechniques*. – 2002. – Vol.33. – P.150–156.
81. 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.
82. Mitra, R.D. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies [Text] / R.D. Mitra, J. Shendure, J. Olejnik et al. // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – Vol.320. – P.55–65.
83. Merritt, J. Parallel competition analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains differing by a single base using polymerase colonies [Text] / J. Merritt, J.R. DiTonno, R.D. Mitra et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol.31. – e84.
84. Mitra, R.D. Digital genotyping and haplotyping with polymerase colonies [Text] / R.D. Mitra, V.L Butty, J. Shendure et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol.100. – P.5926–5931.
85. 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.
86. Четверин, А.Б. Преодоление проблем ПЦР-диагностики с помощью метода молекулярных колоний [Текст] / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина // *Молекуляр. Медицина*. – 2003 – N.2. – С.30–39.
87. Samatov, T.R. Real-time monitoring of DNA colonies growing in a polyacrylamide gel [Text] / T.R. Samatov H.V. Chetverina, A.B. Chetverin // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – Vol.356. – N.2. – P.300–302.
88. Четверин, А.Б. Научные и практические приложения молекулярных колоний [Текст] / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т.41. – N.2. – С.284–296.
89. Данные ВОЗ по заболеваемости раком, 2014 год [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.who.int/cancer/country-profiles/ru/>, свободный.
90. Комбинация навельбина и доксорубицина в химиотерапии первой линии распространенного рака молочной железы / Э.К. Возный, И.В. Поддубная, М.М. Константинова, И.А. Королева и др. // *Русский медицинский журнал*. – 2002 . – Т.10. – N.24. – С.1126–1131. – ISSN 1382-4368
91. Microfluidics for research and applications in Oncology [Электронный ресурс] / P.K.Chaudhuri, M.E. Warkiani, T.J. Lim K.T., Lim C.T. // *The Royal Society of Chemistry*. – Downloaded by UNSW Library 27/05/2015 – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: [http://www.academia.edu/14200815/Microfluidics\\_for\\_research\\_and\\_applications\\_in\\_oncology](http://www.academia.edu/14200815/Microfluidics_for_research_and_applications_in_oncology), свободный. – DOI: 10.1039/c5an00382b

92. Laura, K.A., Circulating tumor DNA (ctDNA) as a molecular monitoring tool in metastatic breast cancer (MBC) [Электронный ресурс] / K.A. Laura, P. Fortina, D. Sebisano, L.M. Siew et al. // ASCO Annual Meeting, 2014 – Режим доступа: <http://www.evrika.ru/show/10698>, свободный.
93. Bartek, J. Expression of monoclonal antibody-defined epitopes of keratin 19 in human tumours and cultured cells [Text] / J. Bartek, J. Bartkova, J. Schneider et al. // *Cancer & Clinical Oncology*. – 1986. – Vol.22. – N.12. – P.1441–1452.
94. Aerts, J. A realtime quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood [Text] / J. Aerts, Wynendaele W., Paridaens R. et al. // *Annals of Oncology*. – 2001. – Vol.12. – N.1. – P. 39–46.
95. Stathopoulou, A. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the Lightcycler system [Text] / A. Stathopoulou, A. Gizi, M. Perraki et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2003. – Vol.9. – N.14. – P. 5145–5151.
96. Ignatiadis, M. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer [Text] / M. Ignatiadis, G. Kallergi, M. Ntoulia, M. Perraki et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol.14. – P.2593–2600.
97. Daskalaki, A. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer [Text] / A. Daskalaki, S Agelaki, M. Perraki, S Apostolaki et al. // *Br J Cancer*. – 2009. – Vol.101. – N.4. – P.589–597.
98. Глоба, А.Г. Оценка диагностической значимости РНК-онкомаркеров при злокачественных образованиях молочной железы / А.Г. Глоба, Я.И. Алексеев, Д.А. Варламов, А.А. Вишнеvский // *Биомедицинская химия*. – 2011. – Т.57. – В.6. – С.677–680.
99. Оптическое стекло К8. [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.fluoride.su/StekloK8.html>, свободный.
100. 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.
101. Справочник химика. Т.5: Сырье и продукты промышленности неорганических веществ, процессы и аппараты, коррозия, гальванотехника, химические источники тока [Текст] / ред. Б.П. Никольского – М.-Л.: Химия, 1968 – 974 с.
102. Курочкин, В.Е. Разработка микрочиповых устройств для проведения ПЦР в геле [Текст] / В.Е. Курочкин, А.А. Евстапов, 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.
103. Полиметилметакрилат [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.dzor.com/russian/catalog/polimetilmetakrilati/>, свободный.

104. Barlo PC – листовый поликарбонат [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://www.nkmat.ru/model/52>, свободный.
105. Монолитный поликарбонат [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://uni-plast.ru/monolitnyu-polikarbonat>, свободный.
106. Санитарно-технический анализ пластмасс [Текст] / З.Г. Гуричева, Л.И. Петрова, Л.В. Сухарева, Н.С. Максимова и др. – Л.:Химия, 1977. – 272 с.
107. Esco SWT-MXP Thermal Cyclers [Text]: user and service manual – Singapore, 2008. – 68 p.
108. Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот – «АНК» [Текст]: руководство по эксплуатации – СПб, 2007. – 58 с.
109. Зверев, В.А. Оптические материалы [Электронный ресурс]: учебное пособие / В.А. Зверев, Е.В. Кривопустиова, Т.В. Точилина. – Электрон. текстовые дан. – СПб: СПбГУ ИТМО, 2009. – 244с. – Режим доступа: [http://thermalinfo.ru/publ/tverdye\\_veshhestva/plastmassa\\_i\\_plastik/svoystva\\_polimerov/15-1-0-289](http://thermalinfo.ru/publ/tverdye_veshhestva/plastmassa_i_plastik/svoystva_polimerov/15-1-0-289), свободный.
110. Буляница А.Н. Математическое моделирование циклических режимов управления температурой при реализации полимеразной цепной реакции (ПЦР) для метода молекулярных колоний (ММК) на микрочипах [Текст] / А.Н. Буляница // Научное приборостроение. – 2011. – Т.21. – N.1. – С. 87–96.
111. Справочник по теплопроводности жидкостей и газов [Текст] / Н.Б. Варгафтик, Л.П. Филиппов, А.А. Тарзиманов, Е.Е. Тоцкий. – М.: Энергоатомиздат, 1990. – 352 с
112. 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 // Обзорение прикладной и промышленной математики. – 2014. – Т.21. – N 4. – С. 1–2.
113. Свешников А.А. Сборник задач по теории вероятностей, математической статистике и теории случайных функций [Текст] / А.А. Свешников. – М: Наука, 1965.
114. Hjerten S., High-performance electrophoresis: Elimination of electroendosmosis and solute adsorption [Текст] / S. Hjerten //J. Chromatography. – 1985. – Vol.347. – P.191–198.
115. Тупик, А.Н. Создание технологической базы по изготовлению микрочиповых устройств для ПЦР в геле/ А.Н. Тупик, А.И. Цымбалов // Сборник статей 5й Международной конференции "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине". – Санкт-Петербург, 2013. – Т.1. – С.252–254.
116. Когезия и адгезия горячего стекла [Текст] / ред. К.С. Евстропьева. – М.: Машиностроение, 1969. – 175 с.
117. 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 Интернет–конференции "Фундаментальные и прикладные аспекты новых высокоэффективных материалов", г. Казань, 2014. – С. 30–32. – ISBN 978-5-906217-66-0.
118. Смит, А. Прикладная ИК-спектроскопия [Текст] / А. Смит. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
119. Органикум. Практикум по органической химии [Текст] / Г. Беккер, В. Бергер, Г. Домшке, Э. Фангхенель и др.; пер. с нем. – М.: Мир, 1979. – 453 с.
120. Практикум по химии и физике полимеров [Текст] / Е.В. Кузнецов, С.М. Дивгун, Л.А. Бударина и др. – М., Химия, 1977. – 256 с.
121. Бордина, Г.Е. Инфракрасная спектроскопия водных систем [Электронный ресурс] / Г.Е. Бордина, Г.М. Зубарева // Использование инфракрасного анализатора ИКАР в медицине, экологии и фармации: сб. науч. тр. / ТМА. – Тверь, 2003. – ISBN 5-94789-049-6 – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: [http://www.irikar.narod.ru/Articles/Refer\\_Book/a7.htm](http://www.irikar.narod.ru/Articles/Refer_Book/a7.htm), свободный.
122. Евстрапов, А.А. Оценка результатов полимеразной цепной реакции в реальном времени кДНК онкомаркеров СК-19 методом электрофореза на микрофлюидном чипе [Текст] / А.А. Евстрапов, 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.
123. Tupik A.N. Design reaction chamber for digital PCR in gel / A.N. Tupik, A.A. Evstrapov, G.E. Rudnitskaya, T.A. Lukashenko // CD of extended abstracts of 2-nd International conference "IMTB", Cavtat, Croatia. – 2013. – P. 79.
124. Антонов, Б.И. Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения) №13–7–2/840 [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан. – М.: Минсельхозпрод РФ, 1997. – Режим доступа: [http://www.mcspk.ru/base\\_gvc/vetzac/document/204.html](http://www.mcspk.ru/base_gvc/vetzac/document/204.html), свободный.
125. Коростелев, П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ [Текст] / П.П. Коростелев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Наука., 1964. – 400 с.
126. Гипертекстовая база данных "Практическая молекулярная биология" [Электронный ресурс] / рук. Краснов А. – Электрон. текстовые дан. – N 0220006875 в Госреестре баз данных. – Режим доступа: <http://molbiol.edu.ru/index.html>, свободный.
127. 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.
128. 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.

## **Приложение А**

**Акт внедрения результатов работы**



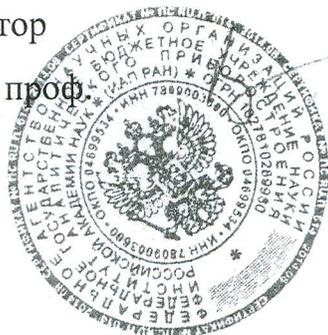
05.10.2015 № 10341-995a/101

**АКТ**  
**внедрения результатов**  
**диссертационной работы Тупик А.Н. на тему:**  
**«Разработка микрочиповых устройств для проведения**  
**полимеразной цепной реакции в гелевой среде»**

Результаты диссертационной работы Тупик А.Н. (раздел 4.1 «Проверка влияния материалов на эффективность ПЦР»), касающиеся предложенного способа определения и оценки влияния полимерных материалов и композиций (полиметилметакрилат, поликарбонат, полидиметилсилоксан, полимерные фотоотверждаемые композиции) на эффективность полимеразной цепной реакции (ПЦР), использованы в виде рекомендаций по выбору полимерных материалов при выполнении ПНИЭР по теме «Создание роботизированного комплекса для молекулярно-генетических исследований» № гос.регистрации 115012130086 (уникальный номер RFMEFI57914X0012) в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» Минобрнауки России.

Директор

Д.т.н., проф.



В.Е. Курочкин