

УДК 54.063: 57.086.15

© Б. Г. Беленький

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ МИКРОДИАГНОСТИКА НА ОСНОВЕ БИОУЗНАВАНИЯ: ЧЕТЫРЕ ПОКОЛЕНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМ

Статья посвящена проблемам микроминиатюризации в биоаналитике. Рассмотрены современные системы, реализующие микрометоды молекулярного биоузнавания. Особенное внимание уделено микрофлюидным чип-анализаторам (МФЧА). Проводится сравнительный анализ методов мультиплексной микродиагностики.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивно развиваются методы мультиплексной микродиагностики на основе биоузнавания (биосенсоры). В 2002 г. выпуск соответствующих приборов за рубежом достиг 1 млрд. долларов США. Эти приборы используются в генетическом анализе (геномика), анализе белков (протеомика), анализе метаболизма (метабономика). Микрометоды мультиплексного анализа объединяются в три формата, которые могут найти и уже находят широкое применение во многих отраслях современной науки и техники.

Помимо удешевления приборов их миниатюризация дает большие преимущества за счет:

- уменьшения стоимости анализа;
- сокращения времени анализа;
- снижения потребления реагентов и анализируемых веществ;
- уменьшения производства потенциально вредных побочных продуктов;
- повышения эффективности разделения;
- возможности проведения анализа в полевых условиях.

ТРИ ФОРМАТА МИКРОМЕТОДОВ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ БИОУЗНАВАНИЯ

Каналы в микроприборах по своим размерам и условиям течения (≈ 100 мкм, 0.1 см/с) приближаются к кровеносным капиллярам в живом организме. Уменьшение геометрических размеров каналов приводит к увеличению разрешающей способности, однако узкие каналы предъявляют более высокие требования к системе детектирования, подвержены засорению и более чувствительны к адсорбции на их внутренней поверхности.

Реальные микролинейки биосенсоров (МЛБС) получают, пришивая биосенсоры-диагностикумы

к стеклянному или пластиковому планшету (матрице) или синтезируя на них сет олигонуклеотидов или олигопептидов с помощью автоматических методов нуклеотидного или пептидного синтеза, по заданной программе управляя процессом синхронного мультисинтеза с помощью сменяемых фотошаблонов (масок) — система "Affimetrix". Может быть использован и вариант предварительного синтеза лигандов и их программированной пришивки к планшету. Оpozнание (идентификация) лигандов, копулированных (прореагировавших) с размещенными на планшете биосенсорами, производится по их заранее известному положению на планшете (топологическое кодирование) с помощью планшетного флюориметра (система "Affimetrix").

Картинирование на чипах, представляющих виртуальную микролинейку биосенсоров, реализуют, используя сет цветокодированных латексов (которые получают путем пришивки биосенсоров к цветокодированным носителям), по соотношению в окраске латексов двух флюоресцентных красителей. Феномен взаимодействия (копуляция) латексов с диагностируемыми лигандами, маркируемыми третьим, сигнальным, красителем-флюорофором, производится в определенных температурно-временных условиях и выявляется с помощью трехцветного проточного цитофлюориметра — целл-сортера (система "FlowMetrix"). Причем два цветовых канала служат для опознания (цветокодирования) биосенсоров.

Идентификация лигандов может быть основана также на использовании микрофлюидных чип-анализаторов (МФЧА) — микроприборов высокоэффективного капиллярного электрофореза, которые оснащены устройствами ввода проб и дериватизации, управляемыми микропроцессорным контроллером (lab-on-a-chip).

Для МФЧА характерно огромное число химических операций, производимых на ограниченной площади. Эти аналитические системы предназначены для автоматического биохимического,

иммунного и генетического (гибридизационного) микроанализов. МФЧА — это мультиплексный микроаналитический проточный прибор с высокочувствительным детектированием, предназначенный для скоростного и многоступенчатого анализа. Важнейшее требование к МФЧА — его компактность, т. е. размещение его компонентов (капилляра, детектора и т. д.) на малой площади.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИЙ МЛБС И МФЧА

Технология микрокартирования (на МЛБС):

1) изготовление полимерной матрицы в системе "Affimetrix", цветокодированных латексов в системе "FlowMetrix";

2) изготовление аналитической матрицы биосенсоров (микролинейки биосенсоров) путем автоматической аппликации: пришивки диагностических (очищенных аффинных или другим селективным методом) с топологическим кодированием ("Affimetrix") или с цветовым кодированием (в системе "FlowMetrix" — виртуальная линейка двухцветокодированных латексов);

3) введение в аналиты сигнальной флюоресцентной метки (для наблюдения копуляции аналитов с реальной МЛБС или виртуальной линейкой ("FlowMetrix"));

4) копуляция (взаимодействие) аналитов с реальной МЛБС или виртуальной линейкой ("FlowMetrix");

5) наблюдение (распознавание, биоузнавание) копуляции с помощью планшетного флюориметра по топологическим признакам (в системе "Affimetrix") или с помощью трехцветового проточного цитофлюориметра (целл-сортера) по цветовым (в системе "FlowMetrix") признакам.

Технология МФЧА:

1) изготовление МФЧА, подготовка к анализу;

2) получение конъюгата аналита с биосенсором;

3) узнавание (диагностика) аналита по времени электромиграции конъюгата аналита с биосенсором или другим признакам (спектры, электрофоретическая диагностика связывания иммунокомпонентов).*)

Наиболее распространенным методом биоузнавания является иммуноанализ. Здесь критическую роль играет изготовление монофункциональных антител, требующее сложных биологических методов (моноклональных антител в гибридной технологии) или прецизионных методов аффинного фракционирования полифункционального набора

антител (иммуноспецифической сыворотки).

Выбор метода микромультиплексной диагностики определяется в первую очередь конкретной аналитической задачей. Например, поиском кандидатов в лекарства на основе взаимодействия библиотеки лигандов с белком-мишенью (эта разновидность метабономики представляет одну из наиболее сложных, одновременно важных задач аналитической биотехнологии и является прототипом многих других биотехнологических исследований).

Поиск кандидатов в лекарства можно организовать следующим образом:

а) с использованием МЛБС, полученной путем автоматической аппликации лигандов-биосенсоров: после копуляции флюоресцентно-меченного белка-мишени с библиотекой лигандов МЛБС ее промывают и исследуют флюоресцирующие конъюгаты биосенсоров с белком-мишенью, используя с этой целью масс-спектрометр MALDI-MS для определения их химической структуры ("новизны");

б) при использовании МФЧА получают флюоресцирующие потенциальные конъюгаты (кандидаты в лекарства) взаимодействием библиотеки лигандов с флюоресцентно-меченным белком-мишенью и сравнивают полученную с помощью МФЧА электрофореграмму конъюгатов с электрофореграммой нативной флюоресцентно-меченной библиотекой лигандов. Наличие на электрофореграмме конъюгатов флюоресцирующих зон помимо флюоресцентно-меченного белка-мишени рассматривается как указывающее на взаимодействие (копуляцию) лиганда с белком-мишенью. Далее эту флюоресцирующую зону исследуют с помощью масс-спектрометра.

Очевидно, что процедуру с изготовлением МЛБС целесообразно использовать для одновременной работы с несколькими белками-мишенями (с разными флюоресцентными метками).**)

Таким образом, все три метода ("Affimetrix", "FlowMetrix" и МФЧА) мультиплексной микродиагностики могут с успехом использоваться для поиска кандидатов в лекарства на основе взаимодействия библиотеки лигандов с белком-мишенью (в формате метабономики), как и в других аналогичных задачах. При этом характерной особенностью МЛБС является возможность их использования для прецизионного off-line анализа 100 и более лигандов или биологических функций, в то время как МФЧА — это аналитические системы on-line анализа, которые целесообразно применять

*) Принципиальным шагом в развитии технологии МФЧА была бы инсталляция в МФЧА монолитных сорбентов — система МФЧА(М) для микрохроматографического фракционирования проб.

**) Вместо флюоресцентных маркеров можно применять другие, например электроактивные (с использованием более дешевого АМД), однако электрохимическое детектирование белков требует доработки.

в качестве портативных (переносных, карманных) дешевых анализаторов физико-химических параметров и биологических функций (до 200).

Отметим, что главные затраты при использовании МЛБС связаны с аппликацией диагностикумов (получение МЛБС) и изготовлением планшетного флюориметра (при использовании метода проточного целл-сортера ("FlowMetrix")), а в случае МФЧА — с изготовлением чип-анализаторов. Безусловно, при использовании МЛБС эти затраты выше, т. к. в "FlowMetrix" используется групповое изготовление биосенсоров. Понятно, что именно МФЧА следует отнести к числу критических технологий биомедицинского анализа.

ПРЕДАНАЛИЗНАЯ ПОДГОТОВКА В ТЕХНОЛОГИЯХ МЛБС И МФЧА

Важнейшим элементом мультиплексной микродиагностики является подготовка прибора к анализу. Для оценки этого параметра можно использовать время подготовки, связанное с числом необходимых операций. С этой целью:

- для МЛБС ("Affimetrix") необходимо:
 - а) пришить лиганды к матрице, б) пришить сигнальный флюорофор к анализатам;
- для метода "FlowMetrix" необходимо:
 - а) пришить биосенсоры-диагностикумы к пулам цветкодированных латексов, б) составить из них диагностическую панель, в) пришить сигнальный флюорофор к анализатам;
- для МФЧА необходимо только пришить сигнальный флюорофор к анализатам.

При сравнении описанных трех методов мультиплексной микродиагностики следует учесть большее время подготовки прибора к анализу у МЛБС ("Affimetrix"), высокую стоимость проточного цитофлюориметра (целл-сортера), используемого в методе "FlowMetrix". Эти факторы отдают предпочтение МФЧА.

В табл. 1 показаны особенности методов мультиплексной микродиагностики. Из таблицы видно, что как метод биоузнавания наиболее эффективен метод МФЧА. Он же имеет наилучшее отношение качество/цена и поэтому является предпочтительным.

СОВРЕМЕННАЯ МИКРОДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА — ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ МИКРОФЛЮИДНЫЙ ЧИП-АНАЛИЗАТОР (МФЧА) НА ОСНОВЕ ПОЛИИМИДОВ С ИНТЕГРИРОВАННЫМ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

В основе этого анализатора лежит комплекс новаций в области высоких технологий, который должен обеспечить беспрецедентно высокий уровень МФЧА, превосходящий соответствующие

коммерческие зарубежные аналоги. Применение этого МФЧА в биомедицинском анализе в России будет способствовать его развитию в нашей стране при максимальной доступности и минимальной стоимости приборов. При этом следует отметить относительную легкость выполнения технологических операций при его изготовлении.

За границей в разработке и изготовлении микрофлюидных (МФ) приборов занят ряд зарубежных университетов (Политехническая школа, г. Лозанна, Швейцария; Стэнфордский, Мичиганский, Луисвилльский университеты, США). В России — Институт аналитического приборостроения РАН и ЗАО "Люмекс". Российские разработчики в значительной мере повторяют начальные этапы развития МФЧА за рубежом. Основным требованием к современным МФЧА является использование оптимальных технологий разработки и изготовления, обеспечивающих массовое производство с минимальными затратами и значительным сокращением времени между возникновением идеи конструкции МФЧА и ее практической реализацией. Под оптимальной технологией понимается скоростное изготовление каналов, создание микродетекторов, сборка чипов. Выбор оптимальных материалов и технологий изготовления МФЧА должен обеспечить получение микроприборов с инертной поверхностью (биосовместимых) для использования в биомедицинском анализе.

В основе МФЧА лежит микрофлюидика, под которой понимают физико-химическую гидродинамику ламинарных потоков. Современные полимерные МФЧА можно собирать (ламинировать открытые каналы) при комнатной температуре.

МФЧА включает аналитический процессор, представляющий канализированную пластину с устройством ввода пробы, детектор, потенциостат, систему обработки информации. Созданные МФ-системы развиваются с использованием различных материалов и технологий. Можно назвать четыре поколения биосовместимых МФЧА-систем.

- *Первое поколение* — МФЧА на основе стеклянно-кремневой технологии микроэлектроники и детектора лазер-индуцируемой флуоресценции (ЛИФ) [1]. Используемые технологии: фотолитография (травление, сверление отверстий — микрососудов, нанесение контактов), сборка прибора (склейка, сварка). При этом используются хорошо полированные стеклянные заготовки (для минимизации растрыва при травлении).

Коммерциализация — лабораторный прибор.

- *Второе поколение* — микрофлюидные системы на основе эластомерной (полидиметилсилоксановой, ПДМС) технологии [2] и амперометрического детектора (АМД) [3] (ПДМС-технология

Табл. 1. Сравнение эффективности систем (методов) мультиплексной микродиагностики (биоузнавания)

№	Характеристики метода	Методы мультиплексной микродиагностики		
		МЛБС ("Affimetrix")	"FlowMetrix"	МФЧА
1	Аналитическая система	Off-line	Off-line, сет цветокодированных латексов с пришитыми лигандами	On-line
2	Изготовление чип-анализатора	Стандартное	Стандартное	Индивидуальное, нестандартное
3	Конструкция полимерной основы биочипа	Биочип — планшет с пришитыми лигандами, относительно проста	Групповое изготовление цветокодированных латексов, относительно проста	Более сложная, чем биочипа
4	Конструкция анализатора	Планшетный флюориметр, относительно проста	Целл-сортер, сложная	Амперометрический детектор (АМД) интегрирован с биочипом; относительно проста
5	Время и надежность детектирования	Малое, надежное (кинетический контроль)	Надежное	Малое, менее надежное, чем в МЛБС
6	Преимущественное применение, число анализируемых функций (аналитов)	Прецизионный анализ известных биологических функций, 100 и более	Прецизионный анализ известных биологических функций, 64	Портативные анализаторы физ.-хим. параметров, в т.ч. биолог. функций более 100
7	Мультиплексность — разнообразие аналитических сайтов (функций)	Не ограничена	Не ограничена	Ограничена, аналиты одного или близких классов веществ
8	Возможность иммуноанализа, составления иммунных диагностических панелей	”	”	Требуется развития, не ограничена
9	Главные затраты	Аппликация диагностикумов, изготовление планшетного флюориметра	Изготовление цветокодированных латексов, целл-сортера	Изготовление чип-анализаторов

может использоваться для изготовления целл-сортера, линейки электродов, микросборников). Используемые технологии: быстрое макетирование, изготовление реплик, нанесение контактов, адгезионная сборка. Благодаря липкости ПДМС и простоте адгезионной сборки чипов не требуется чистых, обеспыленных комнат и специальной сборки-склейки.

Коммерциализация — биоаналитические технологии, карманный прибор.

• **Третье поколение** — микрофлюидные системы на основе полиимидов [4], для которых характерны: термо- и химическая стойкость, регулируемые адгезия и реология, использование АМД, возможность создания сложных многослойных МФЧА. Технологии: фотолитография с использованием полиимидных фоторезистов, анодное травление, перенос слоев, метод вспомогательного слоя, нанесение контактов, ламинирование.

Коммерциализация — карманный прибор.

Табл. 2. Перспективные области применения микрофлюидного чип-анализатора, МФЧА (по опыту использования высокоэффективного капиллярного электрофореза, ВЭКЭ)

Область применения	Выполняемые функции
Защита от химического и биологического оружия	Раннее обнаружение и идентификация патогенов и токсинов, ранняя диагностика особо опасных инфекций
Клинический анализ	Экспресс-анализ крови и биологических жидкостей; диагностика у постели больного на основе иммунологического и биохимического анализов (формирование диагностических панелей); анализ нейротрансмиттеров, аминокислот
Высокопроизводительное обследование (скрининг)	Токсикологический анализ, анализ наркотиков
Контроль окружающей среды	Оперативный анализ загрязнений окружающей среды
Фундаментальные исследования	Специальный микроаналитический анализ
Исследование химических реакций	Изучение фермент-субстратного взаимодействия, комплексообразования, кинетики реакций в водных растворах
Исследование малых количеств пробы (следовой анализ)	Выполнение функций микросистемы пробоподготовки
Поиск кандидатов в лекарства	Исследования взаимодействия библиотек лигандов с белком-мишенью методами МФЧА, "Affimetrix", "FlowMetrix"
Генетический микроанализ	В порядке повышения сложности: — анализ ПЦР-фрагментов ДНК для диагностики онкологических, инфекционных (СПИД, гепатиты В и С, туберкулез) заболеваний; — генотипирование (в медицине — для диагностики заболеваний, в криминалистике — для идентификации личности, в сельском хозяйстве — для селекции ценных пород животных и сортов растений); — мониторинг экспрессии генов; — количественное определение ДНК-маркируемых патогенов; — определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК (в перспективе)

• **Четвертое поколение** — микрофлюидные системы на основе полиимидов. Используемые технологии: МФ-приборы третьего поколения плюс оптронный ЛИФ-мультидетектор на основе полупроводниковых гетероструктур типа A_3B_5 (ОЛИФ [5]).

Коммерциализация — биоаналитические технологии, карманный прибор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Размышляя о будущем развитии микрофлюидных приборов, можно высказать следующие соображения:

1) в МФЧА для подачи раствора можно применить не только электроосмос, но и микронасос.

2) необходимо развить амперометрическое детектирование в МФЧА для анализа белков (применительно к иммуноанализу).

3) помимо АМД в качестве детектора можно использовать масс-спектрометр: микроэлектроспрей для МФЧА, MALDI для МЛБС.

4) движение жидкости в каналах МФЧА может быть оптимизировано на основе микрофлюидики (физико-химической гидродинамики ламинарного потока).

В настоящее время отказываются от использования в МФЧА дорогостоящих громоздких оптических (ЛИФ) детекторов и переходят на электрохимический (амперометрический) детектор (АМД), по чувствительности близкий флуоресцентному, но значительно более простой и дешевый.

Имеется принципиально новый, предложенный в прошлом году в Стэнфордском университете подход, основанный на применении для детектирования в микрочипах сверхминиатюрных интегрированных оптронных ЛИФ-мультидетекторов на основе полупроводниковых гетероструктур типа A_3B_5 . Использование подобного детектора решает проблему изготовления сверхмалых (размером с наручные часы) МФЧА.

Таким образом, из приборов мультиплексного микроанализа по целому ряду характеристик выделяются как наиболее эффективные приборы МФЧА. А из них реальными для сегодняшней России являются МФЧА третьего поколения (полиимидные чип-анализаторы с монолитным сорбентом и микросхемными высокочувствительным АМД и высоковольтным потенциостатом с наносекундным переключением).

Перспективные области применения МФЧА указаны в табл. 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Manz A., Harrison D.J., Verpoorte E., Widmer H.M. Planar chips technology for miniaturization of separation systems: A developing perspective in chemical monitoring // *Adv. Chromatogr.* 1993. V. 33. P. 1–66.
2. Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J.A., Whitesides G.M. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) // *Anal. Chem.* 1998. V. 70, N 23. P. 4974–4984.
3. Metz S., Holzer R. and Renaud Ph. Polyimide-based microfluidic devices // *Lab on a Chip*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2001. V. 1, N 1. P. 29–34.
4. Woolley A.T., Hadley D., Landre P. et al. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device // *Anal. Chem.* 1996. V. 68, N 23. P. 4081–4086.
5. Locascio L.E., Perso C.E., Lee C.S. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate // *Journal of Chromatography A*. 1999. V. 857, N 1-2. P. 275–284.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Материал поступил в редакцию 1.12.2003.

MULTIPLEX MICRODIAGNOSTICS BASED ON BIORECOGNITION: FOUR GENERATIONS OF BIOCOMPATIBLE MICROFLUIDIC SYSTEMS

B. G. Belenkii

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The paper is devoted to microminiaturization problems in bioanalytics. State-of-the-art systems that realize microtechniques of molecular biorecognition are considered. Particular attention is given to microfluidic chip analyzers (MFCA). A comparative analysis of multiplex microdiagnostic techniques is made.