

МИКРОЖИДКОСТНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

© Э. Г. Магданов*, Р. Р. Гарафутдинов, В. А. Вахитов, А. В. Чемерис

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.**Тел./факс: +7 (347) 235 60 88.**E-mail: emagdanov@mail.ru*

Обзор посвящен описанию особенностей проведения ПЦР с использованием разнообразных микрожидкостных устройств в виде стационарных и виртуальных реакционных емкостей, в движущемся потоке жидкости, а также в интегрированных микрофлюидных устройствах.

Ключевые слова: ДНК, РНК, нуклеиновые кислоты, амплификация, микрожидкостная ПЦР, микрофлюидная ПЦР, ампликон, интегрированные устройства.

Введение

На протяжении уже многих лет в физико-химической биологии и в медико-биологических исследованиях явно прослеживается стремление к миниатюризации экспериментального инструментария, выражающейся в уменьшении размеров приборов, снижении объемов исследуемых образцов и приводящей к экономии расходных материалов, высвобождению лабораторного пространства, снижению энергопотребления. За счет миниатюризации достигается увеличение количества параллельно анализируемых образцов и, как следствие, удешевление методов исследования и снижение стоимости диагностических процедур. Причем достоверность результатов при миниатюризации не только не снижается, но и в отдельных случаях даже растет вместе с чувствительностью методов. Другая тенденция, которой также способствует миниатюризация процессов, заключается в сокращении их продолжительности, что ведет к увеличению числа последовательно анализируемых образцов. Таким образом, миниатюризация и экономия времени обеспечивают прогресс в целом.

Процесс миниатюризации в биологии во многом определяется используемыми объемами жидкостей для проведения тех или иных операций. Первые сообщения о микрожидкостных (микрофлюидных) устройствах появились в начале 90-х гг. прошлого столетия. За два прошедших десятилетия достигнуты заметные успехи в этой области, однако еще больше предстоит сделать. Потенциал микрожидкостных устройств огромный, но в России, к сожалению, им уделяется пока недостаточно внимания. Так, за эти годы опубликовано лишь относительно небольшое число обзорных и экспериментальных статей по микрофлюидике, недавно собранных под одной обложкой в виде свода работ отечественных авторов [1], среди которых есть серия статей, посвященных проведению полимеразной цепной реакции (ПЦР) в микрожидкостных устройствах. Помимо данного издания в литературе имеется еще несколько статей на эту тему [2–5].

Во всем мире микрофлюидике (иногда используется термин «нанофлюидика») уделяется огромное внимание, и по этой тематике только в области биологии и медицины ко времени написания данного обзора опубликовано более 10 тысяч статей. Благодаря микрофлюидике стали разрабатываться новые подходы к диагностике, получившие название *micro Total Analytical Systems* (μ TAS) – «Микроаналитические системы» и *Lab-on-a-Chip*¹ – «Лаборатория на чипе», призванные сыграть важную роль, в том числе, в развитии так называемой «Диагностики по месту лечения» – *Point-of-Care Testing* (POCT), что рассматривается как потенциальный прорыв в медицине будущего. Серьезное внимание уделяется проведению с помощью микрофлюидики различных вариантов ПЦР, и уже опубликовано около пятисот экспериментальных работ по этой теме, среди которых немало чисто методических.

Некоторые особенности разных вариантов ПЦР

ПЦР в настоящее время очень широко используется в научных исследованиях во многих областях биологии и смежных дисциплинах, а также в ДНК-диагностике. Особенностью ПЦР является то, что она требует циклической смены температур для обеспечения последовательной денатурации двухцепочечных молекул ДНК (обычно при 94–96 °С), отжига олигонуклеотидных праймеров (чаще всего при 50–60 °С) на образовавшейся в результате высокотемпературного воздействия одноцепочечной ДНК и затем элонгации отжигшихся праймеров с помощью термостабильной ДНК-полимеразы в присутствии дНТФ и требующихся ингредиентов (при 68–72 °С). Фактически, этапы денатурации, отжига и элонгации составляют один цикл ПЦР, по завершении которого в два раза увеличивается количество ампликонов – целевых продуктов ПЦР, представляющих собой фрагменты ДНК, ограниченные с двух сторон так называемыми прямым и обратным праймерами. И так теоретически должно

¹ С 2001 г. английское издательство Royal Society of Chemistry выпускает одноименный журнал «Lab on a Chip».

* автор, ответственный за переписку

происходить в каждом цикле. Таким образом, накопление ампликонов в ПЦР идет в геометрической прогрессии, и упрощенно можно считать, что через 30 циклов исходное число копий-мишеней должно увеличиться приблизительно в миллиард раз (2^{30}). На практике такого увеличения все же не происходит в силу различных причин, рассмотрение которых выходит за рамки данной обзорной статьи². Однако, как правило, после 30 циклов достигается амплификация в десятки миллионов раз, что позволяет с помощью различных методов детектировать наработанные ампликоны, подтверждающие присутствие в анализируемом образце искомого нуклеотидной последовательности какого-нибудь гена или иного участка ДНК, специфичных, например, для какой-либо патогенной бактерии, в свою очередь свидетельствующих о наличии ее генетического материала в организме человека и, следовательно, имеющей место инфекции.

В настоящее время стандартная ПЦР обычно проводится в 10–30 мкл реакционной смеси, находящейся в полипропиленовых пробирках объемом от 0.1 до 0.6 мл, в 8–12-местных стрипах или в микротитраторных планшетах вместимостью 96, 192 или 384 образца, либо в стеклянных капиллярах. Для термоциклирования и, следовательно, исполнения ПЦР, реакционные сосуды помещают в подходящий ДНК-термоциклер, где в твердотельном реакционном блоке или в полый воздушной камере происходит смена температур для последовательного осуществления этапов денатурации, отжига и элонгации. При этом скорости смены температур в реакционном блоке или в камере во многом определяют производительность всего процесса. При этом существуют различные способы нагрева и охлаждения образцов в ДНК-термоциклерах, что рассмотрено нами ранее [6]. Поскольку время изменения температуры реакционной смеси напрямую связано с ее объемом, прослеживается явная тенденция к уменьшению последнего, что повышает экономичность процесса. Другим не менее важным следствием уменьшения объемов реакционной смеси является увеличение чувствительности ПЦР, ввиду того, что при регистрации результатов ведется измерение не флуоресцентного свечения ампликонов, а его концентрационной составляющей.

По задачам, которые предполагается решать в ходе ПЦР, эту реакцию можно подразделить на качественную и на количественную. Если для первой достаточно простого обнаружения присутствующей в образце мишени, то для количественной ПЦР важно оценить исходное количество копий искомого последовательности в анализируемом образце, что в настоящее время обычно достигается с помощью ПЦР в режиме реального времени. Одна-

ко ПЦР в реальном времени позволяет экспериментатору получить только относительную оценку содержания мишени, тогда как в отдельных случаях крайне важно детектировать различия в содержании мишени в разных образцах, отличающихся между собой на одну-две копии. Такую точность в состоянии обеспечить так называемая цифровая ПЦР, предложенная достаточно давно [7], но получившая свое развитие лишь в последние годы. Для цифровой ПЦР только относительно недавно стали производить специализированные системы амплификации. Основные характеристики некоторых из них описаны нами ранее [8]. При этом современная цифровая ПЦР практически невозможна без микрожидкостной ПЦР или эмульсионной ПЦР, однако для рассмотрения последней требуется самостоятельная статья. Что касается микрожидкостной ПЦР, то уже существуют принципиально разные вариации этой реакции, к рассмотрению которых мы ниже перейдем.

Однако прежде следует ненадолго остановиться на отдельных терминах. Так, применительно к микрожидкостной или микрофлюидной ПЦР используются такие слова и словосочетания как «микрочип», «ПЦР-чип» или просто «чип». При этом при проведении твердофазной ПЦР, рассмотренной нами ранее [9], также используются разнообразные чипы. Пожалуй, главным отличием тех и других служит то, что для твердофазной ПЦР на таких чипах один или оба праймера прочно фиксированы, а чипы для микрожидкостной ПЦР обычно представляют собой планарные пластины с изначально пустыми углублениями, сквозными отверстиями, извитыми каналами или даже без них. Общим является то, что все это разнообразие чипов в подавляющем большинстве рассчитано на однократное применение из-за потенциальной опасности перекрестного загрязнения образцов и возникновения ложно-положительной ПЦР, причины которой рассмотрены в другой нашей статье [10]. При этом в литературе все же есть предложения по многократному использованию некоторых микрофлюидных чипов после соответствующих процедур де-контаминации [11].

Микрожидкостная ПЦР в стационарных реакционных камерах

Первый ПЦР-чип для микрожидкостной ПЦР был предложен в 1993 г. [12]. Он представлял собой небольшое углубление в кремнии, вмещавшее 10 мкл жидкости, герметично через силиконовую прокладку закрытое покровным стеклом и имевшее входную и выходную полиэтиленовые трубки; снизу размещались пластина нитрида кремния и нагревательные элементы. Несколько позже стали появляться аналогичные чипы для ПЦР, содержавшие уже множественные углубления. Реакционные объемы в таких первых чипах были довольно большими и составляли 5–10 мкл [13]. Смена температур

² Статья, посвященная математическим вопросам теории ПЦР (А. В. Чемерис и др. «Полимеразная цепная реакция в цифрах и формулах»), готовится к печати.

для таких чипов осуществлялась, как правило, с помощью элементов Пельтье, но относительно малые размеры всей конструкции позволяли проводить ПЦР за более короткое время, чем требовалось для обычной ПЦР. Так, сообщалось о детекции присутствия бактерий с помощью ПЦР на чипах за 7 мин [14]. Совершенствовалась технология изготовления таких чипов – и, как следствие, увеличивалось число реакционных сосудов и уменьшались их объемы, достигшие 1 мкл [15], 200 нл [16], 50 нл [17]. Были созданы даже совсем крохотные емкости для проведения ПЦР объемом всего 85 пкл [18].

Материалом для ПЦР-чипов служит обычно кремний, что составляет отдельную проблему ввиду ингибирования им ПЦР. Кроме того, при использовании чипов в ПЦР резко возрастает отношение площади стенок сосудов или реакционных камер к объему жидкости, что накладывает заметный отпечаток на ингибирование реакции и требует, по крайней мере, большего количества ДНК-полимеразы. Поскольку в настоящее время при изготовлении ПЦР-чипов используются различные материалы, недавно был проведен подробный анализ сорбции на них различных компонентов ПЦР, ведущих к ингибированию амплификации [19]. Для исключения ингибирования ПЦР на чипах предлагается покрывать их поверхности слоем нейтральных веществ, среди которых наиболее часто используется полиэтиленгликоль 8000, поливинилпирролидон, гидроксиэтилцеллюлоза, полидиметилсилоксан [20, 21]. Рекомендуются также гидрофобизировать чипы с помощью соответствующих силанов [22].

Для стандартной ПЦР в пробирках, стрипах, планшетах и капиллярах многочисленными фирмами по всему миру производится несколько сотен моделей ДНК-термоциклеров, рассчитанных на ПЦР по конечной точке, и несколько десятков моделей для ПЦР в реальном времени (для обзора последних см. [8]). Что касается микрожидкостной ПЦР, то пока до промышленного производства доведены единичные разработки, среди которых имеется прибор отечественного производства модели «Ариадна» фирмы «Люмекс» (Санкт-Петербург). Данный ДНК-термоциклер работает в режиме реального времени, и реакционными сосудами для него служат углубления в специальных пластинах, изготовленные методом химического травления. Нагрев/охлаждение термоблока со скоростями 12 °C/с и 10 °C/с, соответственно, осуществляется в этом приборе с помощью элементов Пельтье. Источником излучения служит светодиод, а детектором – ПЗС-матрица. Амплификация проводится на кремниевых или алюминиевых чипах емкостью на 48 реакторов или на 30 реакторов с объемами проб 1–2 мкл соответственно. Еще одной важной чертой таких чипов является наличие гидрофильной емкости, вокруг которой располагается гидрофобная

поверхность, что способствует удержанию реакционной смеси в реакторе. Для исключения испарения такие чипы сверху покрываются слоем вазелинового масла.

Как уже упоминалось выше, для современной цифровой ПЦР разработанные модели приборов опираются на микрожидкостные технологии, в том числе рассчитанные на амплификацию в разнообразных стационарных реакционных сосудах. Одним из первых таких приборов стал цифровой ДНК-термоциклер OpenArray Real-Time PCR Platform, ныне производимый известной американской фирмой Life Technologies. Отличительной особенностью данного прибора является использование для амплификации специального чипа в виде пластины толщиной 300 мкм с 3072 сквозными отверстиями диаметром 300 мкм, вмещающих по 33 нл жидкости, удерживающейся там за счет капиллярных сил, чему способствуют местами гидрофильные, местами гидрофобные зоны. В настоящее время линейку цифровых ДНК-термоциклеров этой фирмы пополнила универсальная новая модель QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System with OpenArray Block, отличающаяся наличием дополнительного модуля, рассчитанного на проведение стандартной ПЦР в реальном времени.

Более емкий микрочип применяется в ДНК-термоциклере модели SmartChip Cycler фирмы Wafergen (США). Элементы Пельтье обеспечивают нагрев и охлаждение реакционных сосудов в этом приборе со скоростями 1.5 °C/сек и 2 °C/сек соответственно. В нем можно вести амплификацию в 5184 лунках по 100 нл каждая с детекцией результатов в режиме реального времени. Чувствительность прибора позволяет детектировать в образце минимум 3-10 копий мишени. Нанесение проб на микрочип осуществляется или в однопробном, или мультипробном вариантах с применением специального устройства, причем помимо готовых микрочипов, рассчитанных на поиск конкретных мишеней, возможно изготовление чипов с необходимыми панелями на заказ.

Другая американская фирма, Fluidigm Corporation, выпускает прибор BioMark HD, в котором амплификация может вестись в чипах, рассчитанных на одновременное проведение 9180 реакций для 12 образцов (12.765 Digital Array IFC чип) в резервуарах на 6 нл, или проведение 39960 реакций уже для 48 образцов с индивидуальными объемами каждой ячейки по 0.85 нл (48.770 Digital Array IFC чип).

Микрожидкостная ПЦР в потоке

Для любых ДНК-термоциклеров с полую воздушной камерой, а также с твердотельным реакционным блоком, в том числе для микрожидкостной ПЦР со стационарными реакционными камерами, одной из важных характеристик прибора служит однородность температурного поля в разных частях камеры или термоблока на каждой из стадий ПЦР

и, соответственно, в находящихся там реакционных смесях. Многие производители ДНК-термоциклов подчеркивают, что для их моделей характерны лишь незначительные, на несколько десятых долей градуса, отличия по температуре по всему блоку. Однако для микрожидкостной ПЦР в потоке такой однородной температуры во всей реакционной смеси просто не требуется.

Принципиально новым подходом к амплификации нуклеиновых кислот с помощью ПЦР стал способ проведения этой реакции в приборе оригинальной конструкции [23]. Впрочем, микрожидкостной ПЦР в нынешнем понимании данная технология может считаться условно ввиду использования довольно больших объемов реакционной смеси, однако она фактически послужила стартом для современной ПЦР в потоке жидкости. Главной особенностью такого оригинального ДНК-термоциклера было проведение ПЦР не статично в пробирке или в микроячейке чипа, а в потоке жидкости, постоянно движущейся под действием шприцевого насоса по тефлоновой трубке, отдельные отрезки которой были помещены в водяные бани с температурами денатурации ДНК, отжига праймеров и построения новых цепей. Общая длина тефлонового капилляра составляла около 5 м, что позволяло при прохождении жидкостью всей его длины осуществить фиксированное число циклов ПЦР, а именно – 30 циклов. Таким образом, определенные части общей реакционной смеси в этом случае находятся одновременно в различающихся температурных условиях, что кардинально отличает данный режим от классических подходов и несет некоторые преимущества, благодаря чему эта идея впоследствии получила заметное развитие при разработке ПЦР в микрожидкостных устройствах на чипах, описываемых ниже. Однако проведение ПЦР в трубках также продолжало развиваться. Для поддержания нужных температур использовались также цилиндрические медные блоки, состоящие из трех продольных разделенных термоизоляторами зон, поддерживающих температуры денатурации, отжига и элонгации, на которые накручивались полимерные трубки [24, 25].

Наибольшее развитие микрожидкостная ПЦР в потоке в современном виде получила после работы английских авторов, показавших, что ПЦР может успешно проходить за счет движения реакционной смеси по вытравленным в стекле микроканалам, проложенным по сложной траектории в виде серпантина, обеспечивающего многократное протекание жидкости последовательно через зоны с температурами денатурации, отжига и элонгации [26]. В стеклянном чипе был вытравлен канал общей длиной 2.2 м, обеспечивающий проведение 20 циклов ПЦР, для чего данный чип был помещен на медные блоки с фиксированными температурами денатурации, отжига и элонгации, а передвижение жидкости обеспечивалось двумя шприцевыми на-

сосами, управляемыми компьютером. Позже было предложено множество подобных ПЦР-чипов с серпантинным расположением каналов [27, 28]. Кроме серпантина для проведения ПЦР предлагались чипы, где каналы, проходящие через разные температурные зоны, располагались в виде спирали [29, 30].

Недостатком таких ПЦР-чипов с однонаправленным током жидкости является фиксированное количество циклов. Справедливости ради следует выделить одну работу, где благодаря нескольким выходным отверстиям число циклов ПЦР хотя и было фиксированным, но экспериментатор мог выбирать между 20, 25, 30, 35 и 40 циклами [27]. Возможность осуществлять любое количество циклов заложена в ПЦР-чипах, где зоны денатурации, отжига и элонгации представляют собой замкнутый круг, по которому через разные температурные зоны многократно происходит однонаправленное движение реакционной смеси [31–33]. Условно третьим типом чипов для ПЦР в потоке жидкости можно считать конструкции, где жидкость между зонами денатурации, отжига и элонгации курсирует двунаправленно по принципу «вперед-назад». Поскольку одно такое передвижение соответствует одному циклу ПЦР, в этом случае число циклов также может легко меняться. Так, с помощью перистальтического микронасоса была осуществлена микрофлюидная ПЦР, названная «насосной», в которой реакционная смесь объемом 1 мкл двигалась по вытравленному каналу, проложенному через температурные зоны, поддерживающие каждая свою температуру – 90, 72 и 55 °С [34]. Авторы сообщают, что на достижение в капле жидкости, где происходила амплификация, нужной температуры требовалось менее одной секунды. В другой работе для проведения ПЦР был использован шприцевой насос, и движение реакционной жидкости по капилляру происходило «вперед-назад» из зоны с температурой денатурации в зону отжига и элонгации, нагреваемых элементами Пельтье. При этом детекция накопления ампликонов велась в режиме реального времени путем регистрации флуоресценции в отрезке капилляра, который находился между нагревательными блоками [35].

Важным моментом при организации ПЦР в потоке служит обеспечение движения жидкости в чипах. При этом одну из серьезных проблем микрофлюидной ПЦР в потоке представляет возникновение пузырьков воздуха в капиллярах, способных затормозить весь процесс, особенно при прохождении жидкости через зону с температурой денатурации. Помимо стандартных шприцевых и перистальтических насосов предложены другие варианты перемещения жидкости по вытравленным каналам. Так, в целом ряде работ предлагалось использовать внешний магнит,двигающий находящуюся внутри капилляра ферромагнитную жидкость, толкающую реакционную смесь [36, 37, 33]. Мембран-

ный насос всасывающего типа был использован при перемещении реакционной смеси по кругу, разделенному на три температурные зоны [31]. Всего 120 с потребовалось для завершения 40 циклов ПЦР в микрофлюидном устройстве, где жидкость двигалась под давлением пара [38]. В более ранней статье других авторов реакция протекала гораздо медленнее, поскольку только на один цикл уходило 104 с, однако используемый ими подход был крайне экономным, поскольку движение жидкости обеспечивалось конвекционным током жидкости³, возникающим из-за разницы в плавучей плотности слоев с разной температурой [39].

Микрожидкостная ПЦР в виртуальных реакционных сосудах

При проведении микрожидкостной ПЦР в виртуальных реакционных сосудах их стенки фактически формируются масляной фазой. В отличие от эмульсионной ПЦР микрофлюидная ПЦР характеризуется относительно малым числом реакционных «сосудов», которые можно подразделить на неподвижные и движущиеся, точнее, передвигаемые.

Пионерной работой для развития микрофлюидной ПЦР в виртуальных сосудах явилась статья немецких авторов, показавших возможность проведения успешной амплификации одного образца ДНК с помощью ПЦР на плоском гидрофобном чипе в объеме жидкости, составившем всего 200 нл, защищенных от испарения 5 мкл масла [40]. Смена температур в реакционной смеси происходила со скоростью до 50 °C за секунду путем перемещения капли с помощью акустических волн по разным температурным зонам, формируемым на чипе. Для контроля за изменением температуры в капле жидкости в нее был добавлен специальный термохромный краситель.

В 2006 г. была опубликована статья, в которой продолжилось развитие подобной микрофлюидной ПЦР [41]. Так, в цитируемой работе четыре неподвижных капли реакционной смеси объемом 1 мкл каждая помещали на покровное стекло и защищали от испарения каплями масла объемом 5 мкл. Скорость смены температур, обеспечиваемая расположенными снизу резистивными элементами, достигла в приборе конструкции этих авторов 20 °C/с. Еще одной особенностью данной работы было то, что регистрация результатов амплификации велась в реальном времени.

В 2007 г. было предложено перемещать виртуальные реакционные сосуды при проведении микрожидкостной ПЦР вдоль формируемого градиента температур для денатурации, отжига и элонгации с помощью постоянных магнитов, расположенных под поддоном с гидрофобным днищем, наполнен-

ным минеральным маслом [42]. Для этого в каждую каплю реакционной смеси добавляли магнитные частицы. В описываемой конструкции 30 циклов завершались за 11 минут, и успевала произойти амплификация нескольких фрагментов ДНК размером от 126 до 1219 пн.

В 2008 г. разными группами авторов разработаны способы амплификации в виртуальных сосудах, где нагрев осуществлялся с помощью инфракрасного лазера [43, 44]. Причем в обеих работах ПЦР велась в режиме реального времени, и скорость смены температур в реакционных сосудах объемом от 10 до 100 нл была очень высокой, благодаря чему в одной работе 40 циклов завешались за 370 с [43], а в другой – 50 циклов за 3.5 мин [44].

Довольно интересное решение при проведении микрожидкостной ПЦР в неподвижных виртуальных сосудах с помощью коммерчески реализуемого ДНК-термоциклера с оптическим блоком, рассчитанного на амплификацию в реальном времени в обычных пробирках, предложила группа американских авторов [45]. Ими был изготовлен специальный гидрофобно-гидрофильный чип с бортиками на 12 образцов, гидрофильные зоны которого совпадали с расположением пробирок в ДНК-термоциклере модели StepOne фирмы Applied Biosystems (США). Амплификация велась в 5 мкл реакционной смеси, помещенной в слой минерального масла, налитого в данный чип.

Интегрированные микрожидкостные устройства

Отдельного, хотя бы очень краткого упоминания заслуживают интегрированные микрофлюидные устройства, в которых происходят все этапы анализа нуклеиновых кислот от их выделения и очистки до детекции продуктов амплификации, что является еще одним доказательством удобства чиповых технологий.

Так, большинство интегрированных микрожидкостных устройств представляют собой разнообразные чипы, в которых наряду с амплификацией происходит разделение (анализ) образующихся ампликонов путем капиллярного гель-электрофореза [46–48]. Есть и более сложно организованные интегрированные устройства, рассчитанные на выделение и очистку нуклеиновых кислот, амплификацию специфичных фрагментов с помощью ПЦР [49], а также включающие и последующую детекцию ампликонов капиллярным гель-электрофорезом [50, 51].

Заключение

Завершая краткое описание микрожидкостной ПЦР необходимо заметить, что в силу требований, предъявляемых к подобным журнальным статьям, из огромного множества известных нам работ по этой тематике были процитированы лишь наиболее значимые, и оказалось рассмотренным далеко не все многообразие ПЦР в микрофлюидных устрой-

³ Конвекционная ПЦР стала настолько разнообразной, что требует написания отдельной статьи, что нами со временем будет сделано.

ствах. Остались практически без внимания вопросы, касающиеся материалов и способов изготовления разнообразных чипов для ПЦР. Во многих случаях сознательно не приводилось сообщаемое авторами оригинальных статей время, затрачиваемое на проведение микрофлюидной ПЦР в устройствах разного типа, поскольку этот показатель зависит от многих факторов, и для одной и той же конструкции может варьировать в широких пределах, не говоря уже о влиянии также оставшихся вне рассмотрения различных способов поддержания и/или смены температур, применяемых в микрожидкостной ПЦР. При этом нет никакого сомнения, что за этими бурно развивающимися вариантами амплификации нуклеиновых кислот с помощью микрофлюидной ПЦР – будущее, в том числе для ДНК-диагностики. На смену единичным коммерчески реализуемым сейчас микрожидкостным ДНК-термоциклерам в скором времени придут многочисленные модели таких приборов, рассчитанные на решение различных научно-исследовательских и диагностических задач.

Работа была выполнена в рамках государственного контракта № 16.518.11.7047 и Соглашения № 8046 с МОН РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микрофлюидные системы для химического анализа / Под ред. Золотова Ю. А., Курочкина В. Е. М.: Физматлит, 2011. 528 с.
2. Сляднев М. Н., Ганеев А. А., Казаков В. А., Лаврова М. В., Еркин М. А. Разработка мультиреакторной микрофлюидной системы для ПЦР анализа в режиме реального времени // Ж. аналит. хим. 2008. Т.63. С. 210–217.
3. Сляднев М. Н. Микрочиповые системы для молекулярно-генетического анализа // Рос. хим. ж-л. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). 2011. Т. LV. С. 118–132.
4. Наволоцкий Д. В., Крисько А. В., Арнаутов В. А., Гейбо Д. С., Ганеев А. А., Сляднев М. Н. Мультиплексная аналитическая система для определения ДНК методом ПЦР в реальном времени // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. С. 10–20.
5. Наволоцкий Д. В., Перчик А. В., Маркьянов И. А., Ганеев А. А., Сляднев М. Н. Микрочиповая аналитическая система для мультиплексного анализа методом полимеразной цепной реакции с иммобилизованными в микрореакторах реагентами // Прикладная биохимия. 2011. Т.47. С. 1–8.
6. Чемерис А. В., Магданов Э. Г., Вахитов В. А. Вариации приборного обеспечения полимеразной цепной реакции // Биомика. 2012. Т.2. С. 85–98.
7. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital PCR // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 9236–9241.
8. Магданов Э. Г., Чемерис Д. А., Чемерис А. В. Современное приборное оснащение количественной и цифровой ПЦР // Биомика. 2011. Т.1. С. 15–60.
9. Гарафутдинов Р. Р., Магданов Э. Г., Талипов Р. Ф., Чемерис А. В. Твердофазная ПЦР // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. №4. С. 1745–1748.
10. Чемерис А. В., Магданов Э. Г., Гарафутдинов Р. Р., Вахитов В. А. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2012. Т.8. С. 31–42.
11. Belgrader P., Elkin C. J., Brown S. B., Nasarabadi S. N., Langlois R. G., Milanovich F. P., Colston B. W. Jr., Marshall G. D. A reusable flow-through polymerase chain reaction instrument for the continuous monitoring of infectious biological agents // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 3446–3450.
12. Northrup M. A., Ching M. T., White R. M., Watson R. T. DNA amplification with a microfabricated reaction chamber / In Transducers'93: The 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators. June 7–10, 1993, Yokohama, Japan. 1993. P. 924–926. [цит. по Daniel et al., 1998].
13. Wilding P., Shoffner M. A., Kricka L. J. PCR in a silicon microstructure // Clin Chem. 1994. V. 40. P. 1815–1818.
14. Belgrader P., Benett W., Hadley D., Richards J., Stratton P., Mariella R. Jr., Milanovich F. PCR detection of bacteria in seven minutes // Science. 1999. V. 284. P. 449–450.
15. Daniel J. H., Iqbal S., Millington R. B., Moore D. F., Lowe C. R., Leslie D. L., Lee M. A., Pearce M. J. Silicon microchambers for DNA amplification // Sensors and Actuators A. 1998. V. 71. P. 81–88.
16. Dahl A., Sultan M., Jung A., Schwartz R., Lange M., Steinwand M., Livak K. J., Lehrach H., Nyarsik L. Quantitative PCR based expression analysis on a nanoliter scale using polymer nano-well chips // Biomed. Microdevices. 2007. V.9. P. 307–314.
17. Matsubara Y., Kerman K., Kobayashi M., Yamamura S., Morita Y., Takamura Y., Tamiya E. On-chip nanoliter-volume multiplex TaqMan polymerase chain reaction from a single copy based on counting fluorescence released microchambers // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 6434–6439.
18. Nagai H., Murakami Y., Morita Y., Yokoyama K., Tamiya E. Development of a microchamber array for picoliter PCR // Anal. Chem. 2001. V.73. P. 1043–1047.
19. Kodzius R., Xiao K., Wu J., Yi X., Gong X., Foulds I. G., Wen W. Inhibitory effect of common microfluidic materials on PCR outcome // Sensors and Actuators B: Chemical. 2012. V. 161. P. 349–358.
20. Giordano B. C., Copeland E. R., Landers J. P. Towards dynamic coating of glass microchip chambers for amplifying DNA via the polymerase chain reaction // Electrophoresis. 2001. V.22. P. 334–340.
21. Lou X. J., Panaro N. J., Wilding P., Fortina P., Kricka L. J. Increased amplification efficiency of microchip-based PCR by dynamic surface passivation // Biotechniques. 2004. V. 36. P. 248–252.
22. Kazakov V. A., Lavrova M. V., Ganeev A. A., Moskvina L. N., Slyadnev M. N. Surface modification of microchip input reservoirs for pressure-induced sample injection into microreactors // Anal. Sci. 2005. V.21. P. 349–350.
23. Nakano H., Matsuda K., Yohda M., Nagamune T., Endo I., Yamane T. High speed polymerase chain reaction in constant flow // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V.58. P. 349–352.
24. Park N., Kim S., Hahn J. H. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction // Anal. Chem. 2003. V.75. P. 6029–6033.
25. Hartung R., Brösing A., Szczepankiewicz G., Liebert U., Häfner N., Dürst M., Felbel J., Lassner D., Köhler J. M. Application of an asymmetric helical tube reactor for fast identification of gene transcripts of pathogenic viruses by micro flow-through PCR // Biomed Microdevices. 2009. V. 11. P. 685–692.
26. Kopp M. U., Mello A. J., Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip // Science. 1998. V.280. P. 1046–1048.
27. Obeid P. J., Christopoulos T. K., Crabtree H. J., Backhouse C. J. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 288–295.
28. Fang T. H., Ramalingam N., Xian-Dui D., Ng T. S., Xianting Z., Lai Kuan A. T., Peng Huat E. Y., Hai-Qing G. Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection // Biosens Bioelectron. 2009. V. 24. P. 2131–2126.
29. Hashimoto M., Chen P. C., Mitchell M. W., Nikitopoulos D. E., Soper S. A., Murphy M. C. Rapid PCR in a continuous flow device // Lab Chip. 2004. V. 4. P. 638–645.

30. Chen P. C., Nikitopoulos D. E., Soper S. A., Murphy M. C. Temperature distribution effects on micro-CFPCR performance // *Biomed Microdevices*. 2008. V. 10. P. 141–152.
31. Chien L. J., Wang J. H., Hsieh T. M., Chen C. H., Chen P. J., Lee D. S., Luo C. H., Lee G. B. A micro circulating PCR chip using a suction-type membrane for fluidic transport // *Biomed Microdevices*. 2009. V. 11. P. 359–367.
32. Wang J. H., Chien L. J., Hsieh T. M., Luo C. H., Chou W. P., Chen P. H., Chen P. J., Lee D. S., Lee G. B. A miniaturized quantitative polymerase chain reaction system for DNA amplification and detection // *Sensors and Actuators*. 2009. V. 141. P. 329–337.
33. Lok K. S., Lee P. P. F., Kwok Y. C., Nguyen N. T. Nested PCR in magnetically actuated circular closed-loop PCR microchip system // *Microchim Acta*. 2012. V. 177. P. 111–117.
34. Bu M., Melvin T., Ensell G., Wikinson J. S., Evans A. G. R. Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR // *J. Micromech. Microengineer.* 2003. V.13. P. S. 125–130.
35. Chen L., West J., Auroux P. A., Manz A., Day P. J. Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor // *Anal. Chem.* 2007. V.79. P. 9185–9190.
36. West J., Karamata B., Lillis B., Gleeson J. P., Alderman J., Collins J. K., Lane W., Mathewson A., Berney H. Application of magnetohydrodynamic actuation to continuous flow chemistry // *Lab Chip*. 2002. V. 2. P. 224–230.
37. Sun Y., Nguyen N. T., Kwok Y. C. High-throughput polymerase chain reaction in parallel circular loops using magnetic actuation // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6127–6130.
38. Fuchiwaki Y., Nagai H., Saito M., Tamiya E. Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure // *Biosens Bioelectron.* 2011. V. 27. P. 88–94.
39. Chen Z., Qian S., Abrams W. R., Malamud D., Bau H. H. Thermosiphon-based PCR reactor: experiment and modeling // *Anal. Chem.* 2004. V.76. P. 3707–3715.
40. Guttenberg Z., Muller H., Habermüller H., Geisbauer A., Pippner J., Felbel J., Kielpinski M., Scriba J., Wixforth A. Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump // *Lab Chip*. 2005. V. 5. P. 308–317.
41. Neuzil P., Pippner J., Hsieh T.M. Disposable real-time micro-PCR device: lab-on-a-chip at a low cost // *Mol. Biosyst.* 2006. V. 2. P. 292–298.
42. Ohashi T., Kuyama H., Hanafusa N., Togawa Y. A simple device using magnetic transportation for droplet-based PCR // *Biomed Microdevices*. 2007. V. 9. P. 695–702.
43. Kim Y. H., Yang I., Bae Y. S., Park S. R. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition // *Biotechniques*. 2008. V.44. P. 495–496, 498, 500 passim.
44. Terazono H., Hattori A., Takei H., Takeda K., Yasuda K. Development of 1480 nm photothermal high-speed real-time polymerase chain reaction system for rapid nucleotide recognition // *Jap. J. Appl. Phys.* 2008. V. 47. P. 5212–5216.
45. Shi X., Lin L. I., Chen S. Y., Chao S. H., Zhang W., Meldrum D. R. Real-time PCR of single bacterial cells on an array of adhering droplets // *Lab Chip*. 2011. V. 11. P. 2276–2281.
46. Woolley A. T., Hadley D., Landre P., deMello A. J., Mathies R. A., Northrup M.A. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 4081–4086.
47. Lagally E. T., Medintz I., Mathies R. A. Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. P. 565–570.
48. Choi J. Y., Kim Y. T., Ahn J., Kim K. S., Gweon D. G., Seo T. S. Integrated allele-specific polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for single nucleotide polymorphism genotyping // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 35. P. 327–334.
49. Furutani S., Nagai H., Takamura Y., Kubo I. Compact disk (CD)-shaped device for single cell isolation and PCR of a specific gene in the isolated cell // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. P. 2997–3004.
50. Waters L. C., Jacobson S. C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R. S., Ramsey J. M. Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 158–162.
51. Chen D., Mauk M., Qiu X., Liu C., Kim J., Ramprasad S., Ongagna S., Abrams W. R., Malamud D., Corstjens P. L., Bau H. H. An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids // *Biomed Microdevices*. 2010. V. 12. P. 705–719.

Поступила в редакцию 23.04.2013 г.