

## Микрочиповые системы для молекулярно-генетического анализа

М.Н. Сляднев

*МАКСИМ НИКОЛАЕВИЧ СЛЯДНЕВ — кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИИ Химии Санкт-Петербургского университета, руководитель отдела группы компаний «Люмэкс». Область научных интересов: микрочипы, микрофлюидика, микрочиповые технологии, молекулярно-генетический анализ, полиамидные цепные реакции.*

192029 Санкт-Петербург, просп. Обуховской обороны, д. 70, корп. 2, Лит. «Е», тел. (812)718-68-61, факс (812)718-68-65, E-mail merlin\_pro@lumex.ru

### Введение

Достижения в области технологии изготовления микроэлектромеханических систем (МЭМС; Micro Electro Mechanical Systems MEMS) привели к активным работам по миниатюризации аналитических систем. В течение последних десятилетий по МЭМС-технологии были созданы миниатюризованные функциональные устройства, предназначенные для применения в биологии и медицине. Эти устройства выполняют те же функции, что и традиционно применяемые аналитические средства, но с использованием меньших количеств реактивов, при этом сокращается продолжительность анализа и снижается его стоимость, а также расход энергии. Основным элементом такой микроаналитической системы является химический микрочип — миниатюрное устройство планарной геометрии с разветвленной сетью микроканалов и микрореакторов, изготавливаемых по МЭМС-технологии из различных материалов (стекло, кварц, кремний, полимеры, а также металлы и сплавы). Площадь микрочипа составляет несколько квадратных сантиметров, а линейные размеры по двум измерениям обычно находятся в диапазоне от сотен нанометров до сотен микрометров.

Преимущества химических микрочипов были продемонстрированы при выполнении анализов в сочетании с электрокинетическими и хроматографическими методами разделения, методами жидкостно-жидкостной и твердофазной экстракции, электрохимическими методами, а также биохимическими и иммуноферментными методами [1—3]. Различные аспекты аналитических приложений микрочиповых систем обсуждаются в ряде обзоров и монографий [4—10].

Особый интерес исследователи проявляют к микрочиповым системам, которые осуществляют молекулярно-генетический анализ нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), в частности, с помощью полимеразной цепной реакции [11]. В настоящее время активно разрабатываются новые методы, основанные на применении микрочиповых аналитических систем, которые обладают принципиально новыми преимуществами [12, 13]. К числу таких преимуществ относятся высокое быстро-

действие, высокие скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси, низкое потребление дорогостоящих реактивов, а также потенциальная возможность интеграции нескольких стадий молекулярно-генетического анализа в едином микрочипе. В настоящем обзоре рассмотрены работы, в которых показаны основные преимущества микрочиповых аналитических систем молекулярно-генетического анализа, а также современные достижения в этой области.

### Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), за открытие которой К. Муллису была присуждена Нобелевская премия в 1993 г., является методом ферментативного синтеза определенного участка ДНК с заданной нуклеотидной последовательностью.

ПЦР проводится в условиях повторяющихся температурных циклов синтеза участка ДНК, что приводит к геометрическому росту (амплификации) количества копий этого участка ДНК (ампликонов) в растворе [11, 14]. Путем изменения в определенном порядке температуры реакционной смеси (температурно-временной режим амплификации) осуществляется управление происходящими физико-химическими процессами (рис. 1). При повышении температуры до 95 °С двухцепочечная молекула ДНК диссоциирует на две одноцепочечные (стадия денатурации). Эти нити выступают как матрицы для синтеза комплементарных цепочек. При понижении температуры до 53—68 °С (стадия гибридизации) к комплементарным участкам одноцепочечных молекул ДНК присоединяются короткие олигонуклеотиды (праймеры), которые выполняют роль затравки для синтеза новой цепочки ДНК. Далее температуру реакционной смеси повышают до 72 °С — оптимальной температуры для ферментативного синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности (элонгации). В результате одного такого цикла число фрагментов ДНК удваивается (образуются ампликоны), при многократном повторении таких циклов происходит рост их количества в геометрической прогрессии.

Для проведения ПЦР в растворе помимо молекул ДНК, содержащих интересующий участок, должны

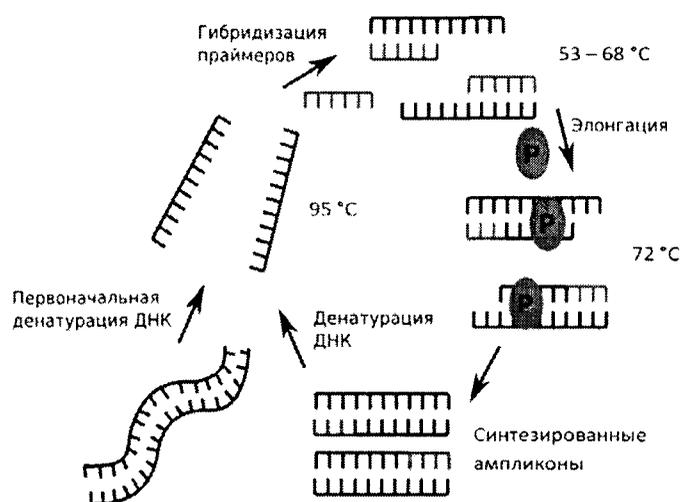


Рис. 1. Схематичное изображение процессов, происходящих при одном температурном цикле полимеразной цепной реакции.

Значком Р схематично отмечен фермент – полимеразы.

присутствовать следующие компоненты: фермент ДНК-полимеразы, осуществляющий синтез комплементарной последовательности, ионы магния  $Mg^{2+}$ , которые являются коферментом ДНК-полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты dATP, dGTP, dCTP, dTTP, которые участвуют в синтезе ампликонов, и два олигонуклеотида-праймера, которые ограничивают интересующий фрагмент на разных нитях ДНК [11, 14].

Среди методов детектирования ампликонов, синтезированных в результате ПЦР, наиболее распространены флуоресцентные методы. Их можно разделить на несколько групп в зависимости от механизма возникновения флуоресценции в растворе [11]. К первой группе относятся методы, использующие интеркалирующие красители (этидийбромид, SYBR Green I и VEBO), которые не флуоресцируют в несвязанном виде, но при взаимодействии с двухцепочечной молекулой ДНК приобретают способность к флуоресценции [11]. Анализ продуктов ПЦР с помощью подобных красителей может проводиться после их разделения методом гель-электрофореза по окончании реакции по результирующей флуоресценции, — так называемый метод «конечной точки» — или непосредственно в ходе реакции, т.е. в режиме реального времени (рис. 2). Из этих методов только метод детектирования ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

позволяет получать количественные данные о содержании ДНК в пробе путем определения «порогового цикла» по кинетической кривой ПЦР-РВ (см. рис. 2а) и построения градуировочной зависимости [11].

Ко второй группе относятся методы с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, получившие устойчивые коммерческие названия, такие как TaqMan® зонды, «молекулярные маячки» (molecular beacons), гибридационные зонды. Детектирование молекул ДНК с помощью таких зондов осуществляется в режиме реального времени, при этом регистрируется изменение интенсивности флуоресценции, которое связано с количеством синтезированных молекул ДНК. Флуоресцентно-меченые зонды содержат олигонуклеотидную последовательность, комплементарную участку в молекуле ампликона, поэтому в отличие от интеркалирующих красителей они являются селективными индикаторами именно на нуклеотидную последовательность амплифицируемого участка ДНК.

Одним из важнейших составляющих системы ПЦР-анализатора является блок термоциклирования, обеспечивающий циклическое изменение температуры. Такие характеристики, как скорость изменения температуры, равномерность распределения температуры внутри реактора и скорость установления этого равновесия, точность поддержания температуры и равномерность распределения температуры по нескольким реакторам, в итоге определяют специфичность ПЦР, быстрдействие анализа, правильность и воспроизводимость результатов [14].

Улучшение аналитических характеристик ПЦР-метода, традиционно проводимого в пластиковых пробирках и в планшетах, достигло предела, который, однако, не удовлетворяет современным требованиям к

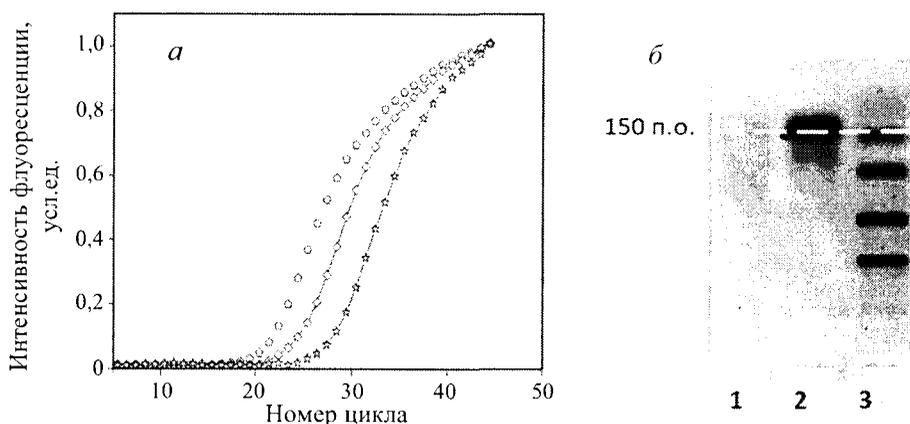


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа при использовании различных методов детектирования ампликонов:

а — ПЦР в режиме реального времени при различных концентрациях исходной ДНК; б — гель-электрофорез продуктов ПЦР: дорожка 1 — отрицательный образец, 2 — положительный образец, специфический фрагмент длиной 150 п.о., 3 — стандартный раствор, содержащий ДНК известного размера

анализу. Существующие ПЦР-анализаторы имеют низкие скорости термоциклирования 2—5 °C/c [11], создают неравномерное распределение температур внутри реактора, что увеличивает время проведения ПЦР до 1,5—2 ч, требуют большого расхода реагентов 20—50 мкл, приводящего к высокой стоимости анализа [12, 13]. Микрочиповые аналитические системы в принципе лишены этих недостатков благодаря низкой теплоёмкости микрочипов (равной произведению массы микрочипа на удельную массовую теплоёмкость материала, из которого они сделаны) и малого объема микрореакторов, 0,1—1 мкл, что позволяет достичь высоких скоростей нагрева, 175 °C/c и охлаждения, 125 °C/c и выполнить 40 циклов ПЦР менее чем за 6 мин [15].

ПЦР-анализатор с большим быстродействием, в котором в качестве микрореакторов используются стеклянные капилляры, был впервые предложен К. Виттвером с соавт. в 1990 г. [16]. В 1993 г. группой А. Нортропа был продемонстрирован ПЦР-микрочип, выполненный из кремния [17]. После этих пионерских работ наблюдался экспоненциальный рост количества публикаций, посвященных микрочиповым аналитическим системам (рис. 3). К настоящему времени появилось значительное число научных групп, работающих в области создания миниатюризованных ПЦР-систем.

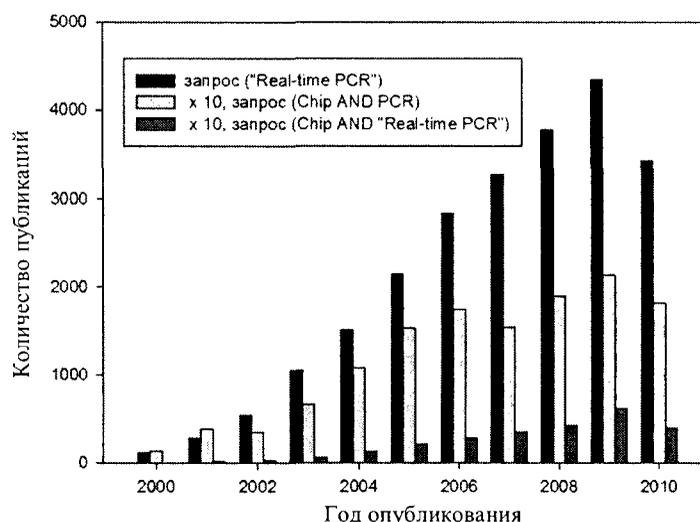


Рис. 3. Динамика роста количества публикаций по микрочиповым ПЦР-системам.

Результаты поиска англоязычных статей в базе данных PubMed, согласно указанному в легенде запросу. Публикации за 2010 год включены до 08.2010

Предложены различные материалы для изготовления подложек чипов, разработаны топологии микрочипов, с помощью этих систем был проведен ПЦР-анализ различных объектов.

В табл. 1 приведены критерии выбора наиболее важных компонентов для микрочиповых аналитических ПЦР-систем.

Таблица 1

Критерии выбора компонентов для микрочиповых аналитических ПЦР-систем

Компонент	Варианты выбора	Критерии
Подложка микрочипа	Материал: Si, SiO <sub>2</sub> , стекло, металл, пластик. Методы изготовления, методы пассивации поверхности материала	Теплопроводность, электропроводность, оптические свойства, совместимость материала и покрытий с ПЦР. Технологичность, стоимость изготовления микрочипа и его пассивации, возможность масштабного производства, одноразовое применение микрочипа
Микрореакторы	Размеры и формы, топология, взаимное расположение	Соотношение площади поверхности микрореактора к его объему. Взаимное влияние между микрореакторами: кросс-контаминация, смешивание, термическая изоляция, паразитные сигналы флуоресценции
Покровный слой	Материал: стекло, пластик, слой масла	Теплопроводность, оптические свойства, совместимость материала с ПЦР, возможность иммобилизации реактивов, извлечения продуктов ПЦР
Система нагрева и охлаждения	Принцип действия: контактный, бесконтактный, эффект Пельтье, эффект Джоуля Размещение: внешнее, интегрированное	Скорость нагрева и охлаждения, равномерность температуры. Технологичность изготовления, стоимость микрочипа с интегрированными нагревателями и датчиками, точность управления температурой
Термодатчик	Принцип действия: контактный, бесконтактный. Материал, размеры, расположение	Точность измерения температуры, быстродействие, совместимость материала датчика с ПЦР, технологичность изготовления
Система детектирования	Принцип действия: флуоресценция, электрохимический. Электрофоретическое разделение, метод по «конечной точке», в режиме реального времени	Чувствительность, быстродействие, возможность миниатюризации, технологичность изготовления интегрированных систем детектирования

Активность исследований, направленных на разработку микрочиповых аналитических устройств, обусловлена необходимостью решения комплекса вопросов, которые возникают при переносе методологии ПЦР и особенно при ПЦР в режиме реального времени в микрочиповый формат.

### Материалы и технологии для изготовления микрочипов. Пассивация поверхности

Существует множество материалов, из которых может быть изготовлен микрочип, предназначенный для проведения ПЦР (табл. 2, подробный анализ и обзор материалов и технологий для изготовления микрочипов приведен в монографиях и обзорах [5, 12, 13]).

На начальных этапах разработки микрочиповых ПЦР-систем наиболее часто использовались кремний [18—23], кварц и стекло [24—27]. Выбор этих материалов был обусловлен прежде всего имевшимся опытом

производства и отлаженными технологиями их обработки в микроэлектронной промышленности. Важно, что кремний обладает хорошей теплопроводностью, благодаря этому достигаются высокие скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси в ходе ПЦР. Одни из первых микрочипов для проведения ПЦР были выполнены из кремния с покрытием — покровной пластиной из стекла. Для нагрева и охлаждения микрочипа использовались внешние элементы Пельтье [28, 29]. С развитием МЭМС-технологий появилась возможность интегрировать в кремниевые микрочипы нагревательные элементы в виде резистивных металлических элементов и платиновые пленочные термодатчики [18, 19]. Микрочипы с интегрированными нагревателями и термодатчиками достаточно дороги, однако при их использовании потребляемая мощность снижается до единиц ватт на микрореактор [30], что позволяет создать портативный ПЦР-анализатор, работающий от аккумулятора

Таблица 2

Характеристики материалов, используемых при изготовлении микрочипов для проведения ПЦР

Материал	Теплопроводность, Вт/(м·К)	Удельная теплоемкость, Дж/(кг·К)	Технология изготовления	Достоинства	Недостатки
Кремний	150	700	Фотолитография, глубокое реактивно-ионное травление, анизотропное и изотропное жидкостное химическое травление. Электрохимическое травление, лазерная абляция	Высокая теплопроводность. Технологии изготовления освоены промышленностью	Непрозрачен в УФ и видимой областях спектра. Высокая стоимость изготовления. Взаимодействие с компонентами ПЦР, ингибирование реакции
Кварц	1,4	1000	Фотолитография, изотропное жидкостное химическое травление. Электрохимическое травление, лазерная абляция	Оптически прозрачные в УФ (кварц) и видимой области. Диэлектрики	Невысокая теплопроводность. Высокая стоимость изготовления. Адсорбция заряженных макромолекул на поверхности
Стекло (пирекс)	1,1	750			
Полидиметилсилоксан (ПДМС)	0,18	1460	Лазерная абляция, импринтинг (ПММА, поликарбонат).	Оптически прозрачны в видимой области спектра.	Низкая теплопроводность. Не выдерживают повышенных температур и обработки в сильных кислотах, органических растворителях
Полиметилметакрилат (ПММА)	0,20	1446	Литье под давлением (ПММА).	Диэлектрики. Совместимы с ПЦР.	
Поликарбонат	0,20	1350	Полимеризация жидких эластомеров на матрице (ПДМС)	Недорогое изготовление; возможность одноразового использования	
Нержавеющая сталь	16	500	Электрохимическое травление	Недорогое изготовление; возможность одноразового использования	Взаимодействие с компонентами ПЦР, ингибирование реакции
Алюминий	250	900	Штамповка	Недорогое изготовление; возможность одноразового использования	Взаимодействие с компонентами ПЦР, ингибирование реакции

ных батарей, пригодный для эксплуатации в полевых условиях и для обследования пациента (в медицинской практике).

Низкий уровень фоновой флуоресценции кремния также способствовал его использованию в ПЦР-системах, работающих в режиме реального времени, в которых регистрация флуоресценции из микрореакторов, как правило, проводится через покрывную пластину из стекла [10, 31, 32] или слой минерального масла [33].

Кварц и различные марки стекла применяются для изготовления ПЦР-микрочипов в основном для обеспечения совместимости с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР, поскольку эти материалы по сравнению с кремнием обладают большим удельным электросопротивлением. Подобные микрочипы из стекла были продемонстрированы группой Рамзея [34] и использованы для проведения ПЦР с электрофоретическим разделением полученных в результате реакции фрагментов [35].

В последние годы в связи с развитием МЭМС-технологий, которые позволяют в серийном масштабе изготавливать микроструктуры и из других материалов, наметился интерес исследователей к более дешевым полимерным материалам [36] и металлам [33, 37]. Так, для изготовления ПЦР-микрочипов с успехом были использованы полидиметилсилоксан [36, 38, 39], поликарбонат [40] и полиметилметакрилат [41—43]. В работе [44] из листового полиимида толщиной 150 мкм методом лазерной абляции формировали две пластины со сквозными структурами: первая содержала отверстия для доступа к каналам, вторая — каналы и микрореакторы. Первую и вторую пластины склеивали между собой, и к этой сборке со стороны второй пластины присоединяли третью сплошную пластину для образования замкнутого микрообъема — получался трехслойный микрочип, который термоциклировался под действием ИК излучения [44]. Микрофлюидный ПЦР-чип из полидиметилсилоксана с микрореакторами емкостью 12 нл был продемонстрирован в работе [39]. В работе [38] был разработан мультимикрореакторный чип из полидиметилсилоксана, в который ввод образцов осуществляется за счет газопроницаемости материала, при этом достигается надежное заполнение микрореакторов без использования насосов и исключается образование воздушных пузырьков. Этот микрочип был с успехом применен для амплификации гена  $\beta$ -актина человека, в будущем он может быть использован для диагностических целей.

Дальнейшее увеличение производительности ПЦР-анализатора было достигнуто в результате применения микрофлюидных технологий для ввода проб [45]. Описан химический микрочип, имеющий микроканалы для ввода проб и пневматические каналы для разделения микрореакторов, который позволяет проводить количественный анализ до 48 проб на наличие 770 генетических элементов [46], что особенно востребовано в генетическом анализе. Микрочип изготавливается из полидиметилсилоксана и не позволяет достигнуть высоких скоростей термоциклирования, однако этот недостаток

компенсируется возможностью одновременно проводить большое число реакций.

Коммерческие компании «BioGrove» выпускают микрочипы с микрореакторами емкостью 33 нл, имеющие сквозные отверстия [37]. Микрореактор изготавливается из нержавеющей стали N-18 с покрытием ковалентно пришитым полиэтиленгликолем для предотвращения ингибирования ПЦР материалом микрочипа, а также для придания гидрофильных свойств. Ввод проб осуществляется через пластиковый наконечник от стандартного дозатора, который касается поверхности микрореактора, и за счет капиллярных сил происходит заполнение микрореактора анализируемым раствором. Несмотря на то, что микрочип изготовлен из нержавеющей стали, теплопроводность которой сопоставима с теплопроводностью кремния и потенциально позволяет достигнуть высоких скоростей термоциклирования, предложенный метод герметизации приводит к большой теплоемкости нагреваемого элемента и не обеспечивает высоких скоростей нагрева и охлаждения.

Описанная система позволяет проводить производительный скрининг нескольких проб на присутствие ряда генетических элементов. Так, ПЦР-методом в режиме реального времени можно анализировать от 48 проб на присутствие 64 участков ДНК, до 192 проб на присутствие 16 участков ДНК, в течение 2,5 ч.

В работе [33] описано использование микрочипов с открытыми микрореакторами емкостью 1—2 мкл, изготовленных из алюминиевого сплава, позволяющих проводить анализ методом ПЦР-РВ. Применение алюминия для изготовления подобных микрочипов методом штамповки значительно снижает их себестоимость при серийном производстве, при этом термические характеристики остаются высокими, а за счет специальных покрытий достигается их совместимость с ПЦР. С помощью такого микрочипа ПЦР была проведена за 20 мин с высокой эффективностью, что указывает на отсутствие ингибирования реакции [33].

При большем соотношении площади поверхности микрореактора к его объему сказывается значительное влияние поверхностных процессов на прохождение ПЦР [12]. Вследствие сорбции компонентов ПЦР-смеси и деактивации полимеразы изменяются их концентрации и активности в растворе и снижается эффективность реакции или она полностью ингибируется. Поэтому особое внимание исследователей направлено на разработку простых и надежных методов модификации поверхности материалов, из которых изготавливается микрочип.

Несмотря на низкую теплопроводность полимеров, которая не позволяет достигнуть высоких скоростей термоциклирования, именно благодаря инертности полимерных материалов по отношению к компонентам ПЦР-смеси (обычно не требуется модифицирование их поверхности) подобные микрочипы получили широкое распространение [47].

Для изготовления микрочипов из кремния или кремнийсодержащих материалов необходимо модифициро-

вание их поверхности, так как эти материалы сорбируют компоненты ПЦР-смеси [48]. Описаны [12, 47] два типа модификаторов: перманентные и динамические модификаторы.

Механизм действия динамических модификаторов основан на конкурентной сорбции компонентов ПЦР-смеси и модификатора, находящегося в растворе. В качестве динамических модификаторов предлагается использовать бычий сывороточный альбумин [49], полиэтиленгликоль [50], глицерин [18, 51], формамид [18, 51], поливинилпирролидон [28], Твин 20 [28].

Перманентные модификаторы наносятся на поверхность перед проведением ПЦР, они создают инертное покрытие, которое предотвращает сорбцию компонентов ПЦР-смеси на поверхности микрореактора [29]. В качестве перманентных модификаторов обычно используются органические соединения, которые образуют гидрофобное покрытие. Примерами таких перманентных модификаторов для микрочипов с закрытыми микрореакторами являются диметилдихлорсилан [52], «SigmaCoat» [28], триметилхлорсилан [28]. В работах [15, 53] поверхность стеклянной пластины обрабатывали гидрофобным и олеофобным перфторалкосиланом, в результате был создан микрочип с открытыми «виртуальными» микрореакторами (virtual reaction chamber, VRC). В подобном микрочипе ПЦР осуществляется в сферической капле водной фазы, помещенной в полусферическую каплю масла, расположенную на поверхности модифицированной стеклянной пластины.

В случаях, когда вследствие гидрофобности покрытия не достигается достаточный термический контакт реакционной системы с поверхностью микрореактора, на поверхности создают гидрофильный слой из  $\text{SiO}_2$  [18, 54], бычьего сывороточного альбумина [40, 55, 56], 3-глицидопропилтриэтоксисилана [57], полиэтиленгликоля [51], что обеспечивает смачивание ПЦР-смесью поверхности микрореактора [58]. В работе [59] удалось создать на поверхности микрореактора гидрофильные и гидрофобные зоны, что позволяет проводить ПЦР на плоской поверхности, при этом растекание ПЦР-смеси в пределах гидрофильной реакционной зоны ограничивается гидрофобной поверхностью снаружи этой зоны.

Отметим, что предложено множество решений по модификации поверхности микрореактора, однако не всегда исследователи проводят оценку эффективности реакции методом ПЦР в режиме реального времени, что затрудняет сравнительный анализ качества получаемых покрытий, и очень редко приводят данные о стабильности получаемых покрытий при хранении. В связи с этим выбор способов и оптимизация условий модифицирования поверхности микрочипа остается актуальной задачей.

## Типы микрочиповых систем

Конструкции микрочиповых ПЦР-систем достаточно разнообразны. По способу проведения реакции ПЦР-системы можно разделить на два класса: проточные и стационарные. В стационарных ПЦР-микрочипах раствор находится в микрореакторе и его температура циклически изменяется. Количество микрореакторов в таком микрочипе может быть от одного до нескольких десятков, сотен и даже тысяч. Для микрочипов с одиночными микрореакторами имеется больше возможностей оптимизировать быстродействие системы, равномерность нагрева и способ ввода раствора в микрореактор, однако производительность таких систем невелика. Для увеличения производительности применяются системы со значительным количеством микрореакторов, однако в этом случае приходится тщательно оптимизировать скорость и неравномерность нагрева, усложнять способ ввода раствора и идти на компромисс, снижая быстродействие.

В стационарных микрочипах термоциклирование раствора внутри микрореакторов может осуществляться контактным способом с помощью внешнего элемента, с помощью интегрированных терморезистивных элементов и бесконтактным способом путем подвода внешней энергии, например ИК излучения [24, 25], индукционных [60] или микроволновых [61] электромагнитных полей (рис. 4). Микрореакторы в таких микрочипах выполняются как в виде закрытых ячеек, которые требуют сложных технологий изготовления, но позволяют

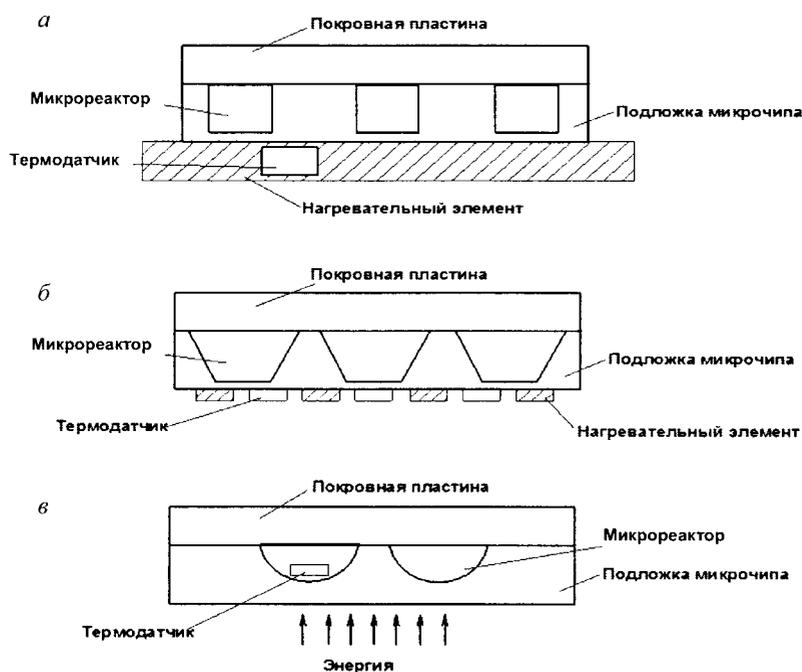


Рис. 4. Варианты стационарных микрочипов с различными способами термоциклирования раствора внутри микрореакторов:

а — контактный способ с помощью внешнего нагревательного элемента; б — использование интегрированных терморезистивных элементов; в — бесконтактный способ путем подвода внешней энергии

использовать микрофлюидные каналы для ввода растворов, и в виде открытых реакторов, которые более просты в изготовлении, однако требуют дополнительных систем дозирования.

В последние годы наблюдается тенденция создания стационарных микрочипов с иммобилизованными ПЦР-реактивами, причем как для микрочипов с открытыми микрореакторами, для которых этого достичь относительно легко, так и для микрочипов с закрытыми ячейками, в которых иммобилизация ПЦР-реактивов сталкивается с рядом трудностей, связанных с доступом раствора к закрытым микрореакторам и с обеспечением испарения растворителя, а также с термоллабильностью компонентов ПЦР. Эти ограничения преодолены в разработанных компанией «Fluidigm» микрочипах из полидиметилсилоксана, в микрореакторы которых при производстве могут быть внесены и лиофилизованы праймеры и зонды, специфичные по отношению к различным фрагментам ДНК [46]. В работе [62] описано применение микрофлюидного чипа с высушенными ПЦР-реактивами, которые изолированы от внешней среды посредством парафина и могут храниться при комнатной температуре. Парафин продолжает служить барьером и при вводе в микрореактор водной пробы, содержащей анализируемую ДНК, и только при нагревании до 95 °С парафиновый барьер расплавляется и высушенные компоненты ПЦР растворяются во введенном растворе пробы. При вводе в микрореактор емкостью 30 мкл 200 копий ДНК фага лямбда исследователи зарегистрировали методом гель-электрофореза амплификацию специфического фрагмента [62]. Отметим, что использование иммобилизованных в микрореакторах реактивов может значительно ускорить внедрение химических микрочипов в аналитическую практику.

Второй тип ПЦР-микрочипов (рис. 5) предназначен для осуществления динамического варианта ПЦР в потоке. В данном способе ПЦР-раствор последовательно прокачивается по микроканалу, выполненному в виде серпантина, через три зоны, температура которых поддерживается постоянной. Подобный способ проведения

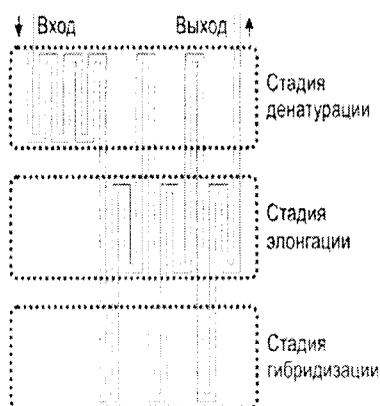


Рис. 5. Схематическое изображение проточного ПЦР-микрочипа

ПЦР в стеклянном микрочипе с использованием медных нагревательных элементов впервые предложил Копп с сотр. в 1998 г. [63]. Авторам удалось выполнить ПЦР-анализ ДНК, используя микрочип с 20-ю последовательными секциями микроканала, за время от 1,5 до 18,7 мин в зависимости от скорости прокачки ПЦР-раствора по микроканалу.

Интерес к системам с проточными микрочипами обусловили следующие привлекательные свойства и возможности их функционирования [12]: интегрирование процессов пред- и постобработки продуктов ПЦР; управление динамикой термоциклирования изменением только скорости потока раствора; малая тепловая инерция, зависящая от площади сечения микроканала; варьирование объема пробы от одного до нескольких десятков микролитров. Вместе с тем практическое применение таких микрочипов ограничивает ряд недостатков, с которыми столкнулись исследователи проточных систем в начале их появления. Это возможность образования воздушных пузырьков внутри микроканала при нагреве; необходимость применения достаточно громоздких внешних шприцевых насосов; сложность в изменении параметров ПЦР, зависящих от конструкции микроканала; технологические сложности в создании высокоинтегрированных систем для анализа нескольких образцов.

Дальнейшие исследования были направлены на устранение указанных ограничений. Так, в работе [64] предложили заполнять микроканал не смешивающимся с водой фторированным маслом, которое затем вытеснялось ПЦР-раствором, что позволяло избежать образования в микроканале пузырьков воздуха. Развитие подобной идеи в работах этой группы привело к созданию проточного ПЦР-микрочипа, предназначенного для количественного анализа генетически модифицированных организмов таких, как кукуруза линии MON810 [65].

С целью уменьшения размеров ПЦР-системы с проточными микрочипами был предложен микрочип из полиметилметакрилата, в котором для создания реакционного потока по микроканалу вместо внешнего шприцевого насоса используется не смешивающаяся с водой ферромагнитная жидкость, помещенная в данный микроканал [42, 43]. Внешний по отношению к чипу миниатюрный мотор вращает постоянный магнит, который увлекает за собой ферромагнитную жидкость в канале, тем самым обеспечивая прохождение ПЦР-раствора по трем температурным зонам. С помощью такой системы была достигнута амплификация фрагмента ДНК фага лямбда длиной 500 п.о. за 4 мин. Продемонстрировано применение разработанной системы в криминалистической практике.

Оригинальное развитие получила идея использования эмульсии типа «вода в масле» в проточных ПЦР-микрочипах. Так, в 2006 г. предложен метод [66], по которому водная фаза, содержащая компоненты ПЦР, образует капли в не смешивающемся с водой масле, и полученная эмульсия вводится в микроканал ПЦР-чипа, результат ПЦР детектируется по методу «конечной

точки». В последующих работах [67, 68] были продемонстрированы различные приложения метода ПЦР-анализа с помощью подобных микрочипов и эмульсий, содержащих капли объемом вплоть до нескольких пиколитров, в том числе с детектированием продуктов ПЦР в режиме реального времени за 35 мин (55 с/цикл) [69]. Были достигнуты низкие пределы обнаружения, обусловленные возможностью детектировать даже одну копию ДНК в микрокапле, а вариант так называемой цифровой ПЦР, когда в расчет принимается статистическое распределение молекул в микрореакторах, позволяет обнаруживать 1 молекулу ДНК на 167 капель, что соответствует 0,003 пг/мкл ДНК аденовируса [69].

### Методы нагрева и измерения температуры в микрореакторах

Разработаны многочисленные варианты систем термоциклирования ПЦР в микрочипах. Как следует из табл. 1, критерии выбора системы нагрева и охлаждения, а также термодатчика многофакторны, причем требуется согласование характеристик микрочипа и способов его изготовления с характеристиками системы термоциклирования.

Все многообразие систем термоциклирования можно разделить на две группы: контактные и бесконтактные системы.

В контактных системах поверхность нагревателя и поверхность термодатчика находятся в физическом контакте с микрореактором, в то время как в бесконтактных системах нет прямого контакта реакционной системы с нагревателем и термодатчиком, а энергия к микрореактору подводится в виде электромагнитных полей, температура измеряется также опосредованно, например оптическими методами.

Контактные системы нагрева и охлаждения совместно с контактными термодатчиками были интегрированы в первые ПЦР-микрочипы и до сих пор они достаточно распространены в микрочиповых системах благодаря высокой эффективности передачи тепла от нагревателя к микрочипу и легкости измерения и управления температурой.

По принципу действия нагревательного элемента контактные системы нагрева могут быть подразделены на несколько типов.

Микрочиповые системы, использующие эффект Джоуля (резистивный нагрев) — наиболее реализуемый вариант среди интегрированных устройств. Современные МЭМС-технологии позволяют наносить электропроводящие покрытия разных топологий на различные подложки, и полученные резисторы работают в качестве нагрузки. Со времени одного из первых опытов применения подобных нагревателей [17] несколько научных групп распространили и дополнили эту технологию, используя в качестве материала резистора платину, золото, алюминий, вольфрам, оксид олова-индия [18, 19]. Металлические нагреватели наносятся на подложку методом фотолитографии с термическим испарением или распылением в плазме. Проводящие контактные площадки для подключения подложки к внешнему ис-

точнику питания, как правило, формируют ближе к торцу микрочипа. Важными параметрами таких нагревателей являются микроструктурные характеристики образующихся пленок, поскольку любые нарушения пленки при нагреве из-за изменения температурного коэффициента сопротивления и температурного коэффициента расширения приводят к невоспроизводимому распределению температуры в ходе ПЦР. Нагревательные элементы могут быть сформированы на внешней стороне микрочипа и в этом случае не контактируют с ПЦР-раствором.

С целью большей точности поддержания температуры в микрореакторе в работе [19] был изготовлен чип с платиновыми нагревательными и измерительными резисторами, находящимися в контакте с раствором, а для устранения эффекта ингибирования эти металлические резисторы покрывали тонким слоем нитрида кремния. В работе [70] обеспечена термоизоляция микрореакторов от основной массы микрочипа с помощью канавок, что позволяет достичь высоких скоростей нагрева (90 °C/c) и охлаждения (74 °C/c). При наличии таких канавок дополнительно снижается потребляемая электрическая мощность, требуемая для нагрева до заданной температуры. Реализован способ нагрева с использованием поликремниевого резистивного нагревателя [30]. Измерение температуры осуществляется по изменению сопротивления этого резистора, так как температурный коэффициент сопротивления равен  $5,7 \cdot 10^{-3} \text{K}^{-1}$ , а его отклик линеен в диапазоне рабочих температур ПЦР.

Большинство контактных интегрированных нагревателей использует пропорционально-интегрально-дери-вативный (ПИД) алгоритм для управления температурой. Точность поддержания температуры составляет  $\pm 0,5 \text{ °C}$  [71]. Благодаря многим преимуществам, которыми обладают подобные интегрированные системы, они могут быть с успехом внедрены в практику ПЦР-анализа. Это станет возможным, когда стоимость микрочипа и всей аналитической системы будет достаточно низкой, чтобы они могли конкурировать с классическими ПЦР-анализаторами, либо когда функциональность подобных устройств будет обеспечивать полный цикл молекулярно-генетического анализа в варианте «образец на входе – результат на выходе». До настоящего времени массовое применение таких систем ограничено.

В рамках исследования метода ПЦР-анализа осуществляли резистивный нагрев за счет эффекта Джоуля не только металлических проводников, но и ПЦР-раствора, находящегося в микроканале чипа, поскольку он является электролитом и обладает ионной проводимостью. Такой подход был реализован в работе [72]: в капилляре, к концам которого было приложено переменное напряжение частотой 60 Гц, амплитудой от 0 до 1000 В, проводили ПЦР, продукты регистрировали методом гель-электрофореза. В работе [36] на основе теоретических расчетов был разработан микрочип, изготовленный из полидиметилсилоксана, термоциклирование в котором осуществляется путем пропускания электрического тока через ПЦР-раствор в микроканале. Продемонстрирован

метод детектирования ПЦР в режиме реального времени с использованием гибридных флуоресцентных TaqMan зондов, при этом потребляемая мощность составила 1,3 Вт, однако скорости нагрева и охлаждения были невысоки и составили 3 и 2 °C/с, соответственно.

Отметим, что несмотря на ряд успешных реализаций подобного подхода и наличия потенциала для дальнейших улучшений микрочиповых аналитических ПЦР-систем, остаются ограничения, связанные с образованием воздушных пузырьков в микроканале, со сложностью ввода проб в микроканал, с необходимостью стабильного измерения температуры по электросопротивлению ПЦР-раствора, т.е. требуются дальнейшие шаги, чтобы обобщить опыт имеющихся разработок и внедрить микрочиповые системы в практику ПЦР-анализа.

Многие разработчики микрочипов используют внешние нагревательные элементы, так как в этом случае появляется возможность значительно упростить микрочип, снизить себестоимость его производства и обеспечить экономическую целесообразность его одноразового применения. В качестве внешних систем термоциклирования часто применяются элементы, основанные на эффекте Пельтье [10, 28, 31—33, 73, 74]. Элементы Пельтье по сравнению с интегрированными резистивными нагревателями [30] энергетически менее эффективны (потребляют 12,3 и 2,8 Вт, соответственно) и демонстрируют меньшие скорости термоциклирования (нагрев:охлаждение 5:5 °C/с и 15:5 °C/с, соответственно). Однако при увеличении пиковой мощности элементов Пельтье до 56 Вт достигаются относительно высокие скорости цикла нагрев:охлаждение 9,5:10,3 °C/с [33]. Существенным преимуществом в случае использования внешнего элемента Пельтье остается возможность применения достаточно простых одноразовых микрочипов, так как все функции системы термоциклирования реализуются во внешних по отношению к чипу узлах ПЦР-анализатора. К недостаткам относятся несколько повышенное потребление энергии и ограниченные скорости термоциклирования. Отметим, что большинство успешных коммерческих микрочиповых ПЦР-анализаторов, выпускаемых в настоящее время, использует внешние элементы Пельтье.

Интересным вариантом контактных систем термоциклирования являются градиентные конвективные микрочипы, в которых осуществляется циркуляция жидкости (ПЦР-раствора) между несколькими температурными зонами за счет изменения ее плотности в зависимости от температуры. В работе [75] микрореактор диаметром 1,5 мм и высотой 1,5 см был размещен в градиентном температурном поле: верх и низ микрореактора находились при температуре 97 и 61 °C, соответственно. В этих условиях возникает конвективное движение, которое было визуализировано с помощью флуоресцентных латексных микросфер. В этом микрореакторе была проведена ПЦР, в результате которой был получен ампликон длиной 295 п.о. Аналогичный подход описан в работе [76]: в микрочипе был создан градиент из трех температурных зон и в результате была

успешно осуществлена амплификация фрагмента ДНК длиной 127 п.о. за 10 мин при исходной концентрации ДНК 10 пг/мкл и фрагмента геномной ДНК длиной 470 п.о. за 20 мин.

Промежуточное положение между контактными и бесконтактными системами термоциклирования занимают ПЦР-термоциклеры. В таких системах с помощью нагревательного элемента создается поток горячего воздуха, который подводит тепло к микрореактору. Пока термоциклеры не вызвали особого интереса у разработчиков химических микрочипов. Это объясняется тем, что в большинстве работ в качестве микрореакторов используются стеклянные капилляры [16, 72], что напрямую связано с широким распространением коммерческого ПЦР-анализатора LightCycler фирмы «Roche» и капилляров к нему. Несмотря на то, что подобные системы термоциклирования позволяют достичь высоких скоростей нагрева и охлаждения, для создания потока горячего воздуха требуется мощность от 300 до 1000 Вт, что значительно уменьшает привлекательность подобных устройств для создания портативных систем.

Бесконтактные системы термоциклирования в ПЦР-микрочипах осуществляют нагрев ИК-излучением, индукционный нагрев и нагрев посредством микроволновой энергии. Одна из первых работ по нагреванию водного раствора в капилляре с помощью ИК лампы была опубликована в 1998 г. [77]. Поскольку вода имеет сильные полосы поглощения в ИК области спектра при длинах волн 2,66, 2,78 и 6,2—8,5 мкм, исследователи использовали лампу накаливания, излучающую в диапазоне вплоть до 4 мкм. Подобная система бесконтактного нагрева была применена в 2001 г. в микрочипах, изготовленных из полиимида, в которых ПЦР завершилась за 4 мин [44]. Группа проф. Ландерса продолжила разработку в этом направлении и предложила интегрированный микрочип с нагревом ИК лампой. В данном случае скорости нагрева и охлаждения были несколько меньшие, 7,8 и 5 °C/с, соответственно, ПЦР была осуществлена за 12 мин (30 циклов) с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР [24, 78]. Дальнейшее развитие этой концепции было продолжено в работе [79], в которой была достигнута успешная амплификация фрагмента геномной ДНК *B. anthracis* длиной 211 п.о. за время 18,8 мин (30 циклов, трехстадийный температурно-временной режим).

Аналогичный подход, потенциально привлекательный с точки зрения развития ПЦР-микрочипов, был использован с целью управления ферментативной реакцией с помощью ИК лазера ( $\lambda=1480$  нм, 150 мВт) [80], излучение которого попадает в полосу поглощения воды при 1500 нм. В работе [81], в которой применялся ИК лазер ( $\lambda=1480$  нм, 75 мВт), была создана система ПЦР-анализа с образованием конвективных потоков. Лазеры также могут быть использованы для нагревания поглощающих микроструктур в микрочипе [82].

Интересным вариантом бесконтактного нагрева служит система термоциклирования [60], функционирующая с помощью генератора высокочастотного электро-

магнитного излучения (частота 200 кГц, мощность 1,4 Вт), которая обеспечивает в кремний-стеклянном микрочипе скорости нагрева и охлаждения 6,5 и 4,2 °C/c, соответственно. ПЦР была проведена также в микрочипе, в котором используется энергия микроволн для бесконтактного нагрева водных ПЦР-растворов в микрореакторе [61]. Достигнуты очень высокие скорости нагрева и охлаждения, равные 65 °C/c, точность поддержания температуры при термоциклировании составила  $\pm 0,1$  °C.

Практически все бесконтактные системы термоциклирования весьма перспективны, поскольку демонстрируют высокие скорости нагрева и охлаждения и совместимы с достаточно дешевыми микрочипами. Однако пока не разработаны системы с большим числом ПЦР-микрореакторов, не решены вопросы, касающиеся неравномерности нагрева в таких мультиреакторных системах, остаются трудности при измерении температуры, так что практическое применение таких систем остается ограниченным.

Выбор системы для измерения температуры в микрореакторах определяется с учетом критериев, обусловленных спецификой условий проведения ПЦР (см. табл. 1). Условно термодатчики можно разделить на контактные и бесконтактные по аналогии с нагревательными системами. В качестве контактных термодатчиков в микрочиповых ПЦР-устройствах применяются внешние термометры, терморезисторы и полупроводниковые термоэлементы [31—33, 74], встроенные в микрореакторы миниатюрные термометры [80] и интегрированные в микрочип пленочные терморезисторы [70]. Преимуществами контактных термодатчиков является относительная простота измерения сигнала и простая калибровка датчиков. Недостатки связаны с возможным ингибированием ПЦР-материалом термодатчика, влиянием измерительного устройства на измеряемую температуру из-за сопоставимых размеров термодатчика и микрореактора, кроме того, необходима индивидуальная калибровка встроенных в микрочип термодатчиков.

В качестве бесконтактных систем измерения температуры предложены оптические методы, в основе которых лежит изменение цвета жидких кристаллов [47], изменение интенсивности флуоресценции красителя за счет температурно-зависимого квантового выхода флуорофора или температурно-зависимого сдвига спектров поглощения или флуоресценции [83], прямая ИК термометрия [18], рамановская спектроскопия [20].

Термотропные жидкие кристаллы, способные изменять свой цвет при нагревании [47], использованы в работе [22] для оценки пространственного распределения температуры в ПЦР-микрореакторах емкостью 1 мкл и в работе [41] для оценки динамики изменения температуры в ПЦР-микроканале. Этот метод позволяет измерять температуру с высокой точностью  $\pm 0,1$  °C, однако диапазон измерений достаточно узок. Сферические капсулы с термотропными жидкими кристаллами имеют диаметр в десятки микрометров и их применение ограниче-

но микроструктурами, большими по размеру. Кроме того, введение таких микросфер непосредственно в ПЦР-раствор может привести к ингибированию реакции, так что потребуется разработка ПЦР-совместимых капсул.

Резкое снижение флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green при достижении точки плавления ампликонов регистрировали в работе [84], а температурную зависимость флуоресценции красителя 6-FAM — в работе [15]. Наибольшее распространение для определения температуры в микрочипах в последние годы получил метод измерения интенсивности флуоресценции красителя родамина В [36, 80]. Его достоинства: широкий динамический диапазон измерения, высокая скорость измерения и высокая температурная чувствительность. Однако этот метод измерения имеет невысокую точность. Для повышения точности измерения температуры предложена новая теоретическая модель расчета температурной калибровки в методе с использованием родамина В [85], которая позволила скорректировать не учтенные ранее ошибки. Подобный подход был применен для оценки распределения температур по всему микрочипу [86], в котором родамин В вносился в тонкий слой полидиметилсилоксана и полученная полимерная пластина приводилась в контакт с исследуемым микрочипом.

Измерения температуры ПЦР-микрочипов методом ИК термографии были выполнены в нескольких работах [18, 19, 41, 55]. Установлено, что требуется провести целый комплекс исследований для взвешенного анализа таких факторов, как потери излучения, фоновое излучение, неопределенность оценки излучательной способности микрочипа. Кроме того, требуется оптимизация параметров измерительного ИК термометра и его тщательная калибровка. Из преимуществ ИК термометрии можно отметить быстрый отклик, достаточный для ПЦР динамический диапазон измерения, высокое пространственное разрешение, отсутствие взаимодействия с компонентами ПЦР.

Еще одним вариантом бесконтактного метода измерения температуры является метод [20], в котором для оценки температуры внутри микрореактора используется спектроскопия рамановского рассеяния. Измерение температуры основано на регистрации температурной зависимости отношения интенсивности полос, характерных для водородосвязанных и неводородосвязанных валентных колебаний —ОН. Интегрирование в кремниевый микрочип платинового резистивного нагревателя и использование разработанной бесконтактной системы измерения температуры позволяют достичь высокой точности поддержания температуры.

Отметим, как и в случае бесконтактных систем нагрева, потенциальную привлекательность бесконтактных систем измерения температуры. Однако практически по отношению ко всем вариантам термодатчиков требуются дальнейшие исследования, направленные на увеличение точности и стабильности измерений, а также на снижение стоимости подобных систем.

### Методы детектирования ДНК в микрочипах

В начальный период развития микрочиповых аналитических ПЦР-систем большинство исследователей применяли способы детектирования, которые требовали извлечения продуктов реакции из микрореакторов и переноса их во внешнюю по отношению к микрочипу систему анализа. Наиболее часто для анализа использовался метод гель-электрофореза с интеркалирующими красителями [28, 29], однако такой анализ достаточно длителен и требует значительных трудозатрат. В дальнейшем интерес исследователей вызвал метод микрочипового капиллярного электрофореза для разделения ДНК, который позволяет ускорить и автоматизировать анализ. В работах [18, 21, 57, 87] описано применение коммерческого анализатора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), а в работе [88] — лабораторных установок с системой лазерно-флуоресцентного детектирования при микрочиповом электрофоретическом разделении и идентификации ампликонов, получаемых в ПЦР-микрочипах. Подобная комбинация из двух микрочиповых систем — ПЦР и электрофореза — позволяет упростить и ускорить проведение ПЦР-анализа нуклеиновых кислот. Однако при использовании данного метода требуется вручную переносить пробы из ПЦР-микрочипов в электрофоретические микрочипы, что может приводить к кросс-контаминации и ошибкам.

Одним из первых примеров интегрированной аналитической системы, в функции которой входят и электрофоретическое разделение, и флуоресцентное детектирование продуктов, является микрочип с реактором, соединенным с сепарационным микроканалом, имеющим крестообразную топологию [34, 89]. В таком чипе ПЦР-смесь вводится в микрореактор на стадию термоциклирования, затем продукты реакции направляются в микроканал для проведения электрофореза. Микрочип изготовлен из двух стеклянных пластин, в одной из которых протравлены углубления (каналы, камеры и коммуникационные отверстия), а вторая служит для закрытия протравленных элементов. Термоциклирование осуществляется с помощью внешних элементов Пельтье. Такой микрочип позволяет провести как саму ПЦР, так и качественное определение продуктов, однако только одной пробы. Анализ нескольких проб возможен при размещении нескольких ячеек для проведения ПЦР и сепарационных микроканалов на одном микрочипе [35, 47, 90].

Для увеличения количества микрореакторов на одном чипе был применен метод флуоресцентного детектирования продуктов ПЦР по «конечной точке» [55, 66, 91], который позволяет получить качественную информацию о наличии в пробе искомым фрагментов ДНК. Значительное увеличение информативности было достигнуто с помощью метода флуоресцентного гибридного анализа, заключающегося в проведении реакции комплементарного связывания полученных при ПЦР ампликонов с ковалентно-привитыми к поверхности биочипа участками ДНК после проведения ПЦР в

микрореакторах, что позволило определить мутации в ампликонах [92].

Метод электрофоретического детектирования ДНК и флуоресцентный метод по «конечной точке» не позволяют получить количественные данные о содержании ДНК в пробе, поэтому дальнейшее развитие микрочиповых систем молекулярно-генетического анализа направлено на реализацию метода ПЦР-анализа в режиме реального времени, который дает количественную информацию. Микрочиповые аналитические системы ПЦР-РВ с интеркалирующими красителями и флуоресцентными зондами продемонстрированы в значительном числе работ (см. например [18, 21, 36]). В ряде работ использовали метод плавления в микрочипе для идентификации специфического продукта ПЦР. Абсолютные пределы обнаружения с помощью подобных систем приближаются к теоретическому минимуму: флуоресцентные методы детектирования позволяют определять единичные копии молекул ДНК, полученные в современных лабораторных установках и коммерческих микрочиповых ПЦР-РВ-анализаторах. Такие результаты достигаются благодаря оптимизации системы термоциклирования, микрочипов и модифицирующих покрытий, что обеспечивает высокую эффективность ПЦР, которая, как показано для ряда систем, приближается к 100% [32, 33, 74].

На рис. 6 представлены результаты проведения ПЦР с анализом в режиме реального времени с использованием гибридных зондов [74]. Аналитическая система основана на флуоресцентном детектировании продуктов ПЦР, образующихся в 16 микрореакторах емкостью 1,3 мкл стекляннно-кремниевого микрочипа. Внутренняя поверхность микрореакторов модифицирована слоем полиметилметоксисилоксана. Время проведения ПЦР 18 мин. Отметим высокую эффективность ПЦР, равную 90%, что говорит об отсутствии ингибирования реакции.

В рамках исследований, направленных на миниатюризацию систем детектирования в микрочипах, были разработаны электрохимические методы определения ДНК в режиме реального времени [93]. Установлено, что применение трипиридилосмия(III) в качестве окислительно-восстановительного катализатора, генерируемого на электроде, позволяет регистрировать в ходе ПЦР расход одного из реактивов, 7-deaza-dGTP (7-деаза-2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфат), добавленного в ПЦР-раствор. Реакцию проводили в микрочипе, включающем восемь микрореакторов емкостью 50 мкл со встроенными электродами. Предел обнаружения  $10^3$  молекул ДНК цитомегаловируса на микрореактор, что уступает флуоресцентным системам детектирования на три порядка. Однако существенное упрощение анализатора позволяет создавать портативные устройства. Подобный подход к разработке был предложен в работе [94], в которой использовался электроактивный интеркалирующий краситель метиленовый синий, а ПЦР проводилась в проточном микрочипе. После оптимизации модифицирующих покрытий микроканала и кон-

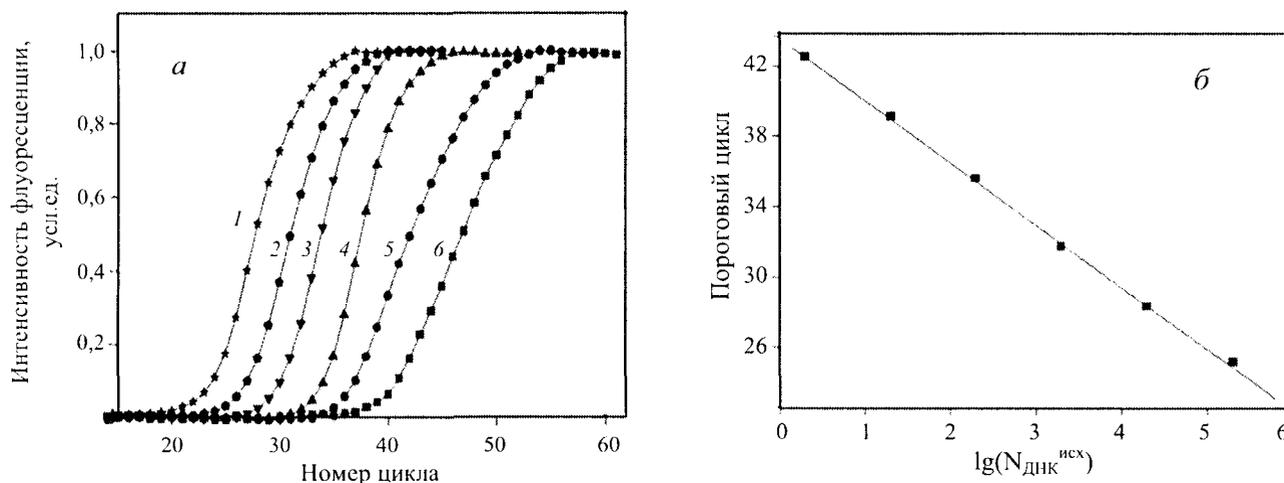


Рис. 6. Результаты ПЦР с анализом в режиме реального времени, полученные в микрочипе при различных концентрациях ДНК (плазмида со встроенным участком вируса гепатита С) (а) и градуировочная характеристика (б):

1 —  $2 \cdot 10^5$  копий/мкл; 2 —  $2 \cdot 10^4$  копий/мкл; 3 —  $2 \cdot 10^3$  копий/мкл, 4 —  $2 \cdot 10^2$  копий/мкл; 5 — 20 копий/мкл; 6 — 2 копии/мкл. Градуировочная зависимость построена для ПЦР-кривых 1—6

центрации метиленового синего, устранения ингибирования ПЦР металлическими электродами и предотвращения образования воздушных пузырьков была достигнута чувствительность определения ДНК фага лямбда, сравнимая с таковой для ПЦР-систем с флуоресцентным детектированием в режиме реального времени.

В работах [37, 46] использовали микрочипы со значительным количеством микрореакторов (2500, 3000, 9000) и метод цифровой ПЦР в режиме реального времени («цифровой ПЦР-РВ») для определения содержания ДНК в пробе с построением градуировочной зависимости в координатах «концентрация ДНК — число ячеек, в которых наблюдается сигнал ПЦР». Подобный подход основан на стохастическом распределении молекул ДНК в микрореакторах, которое описывается распределением Пуассона. Этот метод позволяет регистрировать незначительные вариации в концентрации искомого фрагмента ДНК [37, 46], что недостижимо с помощью градуировочной зависимости в координатах «логарифм концентрации ДНК — пороговый цикл», используемой в традиционном методе ПЦР-РВ. На основе таких микрочипов выпущены коммерческие микрочиповые анализаторы, разработанные компаниями «BioTrove» и «Fluidigm». Надо сказать, что эти анализаторы не обеспечивают высоких скоростей термоциклирования, что связано с применением полимерных материалов с низкой теплопроводностью в конструкции микрочипов. Отметим также, что динамический диапазон измерений по методу «цифровой ПЦР-РВ» значительно уступает таковому для традиционного метода ПЦР-РВ и не превышает трех порядков величины.

Тенденции развития микрочиповых аналитических ПЦР-систем показывают, что в настоящее время и в ближайшем будущем наиболее востребованными будут

системы, реализующие метод ПЦР-РВ, в частности вариант «цифровой ПЦР-РВ», и системы, основанные на методе гибридного анализа. Именно эти аналитические микрочиповые системы позволяют количественно определять концентрацию ДНК в исходной пробе и проводить анализ мутаций получаемых ампликонов.

#### Применение микрочиповых систем для молекулярно-генетического анализа

Молекулярно-генетический анализ реальных образцов состоит из стадий выделения и очистки нуклеиновых кислот и последующего проведения полимеразной цепной реакции с детектированием продуктов реакции. Поскольку процедуры выделения нуклеиновых кислот из различных образцов достаточно длительны и трудоемки, а объемы исходной и очищенной проб плохо сочетаются с микрочиповым форматом проведения ПЦР, возникает актуальная задача разработки микрочиповых систем пробоподготовки. Еще более актуальная задача состоит в создании полностью интегрированной системы полного молекулярно-генетического анализа, в которой должен быть реализован принцип «образец на входе — ответ на выходе» [78].

Многие исследователи пытаются адаптировать к микрочиповой технике существующие методики выделения и очистки нуклеиновых кислот, например, достаточно распространенную методику твердофазной экстракции ДНК на кремнеземных сорбентах с последующим их элюированием буферным раствором. В работе [95] использовали микрочип, в микроканал которого помещаются гибридные частицы кремнеземного сорбента и золь-гель кремнезема. Через микроканал со скоростью 250 мкл/ч пропускается раствор (рН = 6,1), содержащий ДНК фага лямбда. Полученная степень

выделения ДНК составила 67%; выделение ДНК из цельной крови достигается за 15 мин.

Альтернативой экстракции нуклеиновых кислот являются методы, основанные на фильтрации различных клеточных компонентов крови. В работе [96] разработан микрочип с разветвленными микроструктурами в микроканале в виде колонн и щелей. При пропускании образца крови через такие микроструктуры происходит проток всех компонентов крови, кроме белых кровяных клеток. Поскольку гемоглобин, содержащийся в красных кровяных клетках, является основным ингибитором ПЦР, поступающим из цельной крови, удаление этих клеток способствует успешной амплификации оставшейся на фильтре пробы после ее прямого ввода в ПЦР-смесь и разрушения белых кровяных клеток при первоначальном прогреве. Подобные методы с использованием частиц кремнезема в качестве сорбента нуклеиновых кислот были использованы и в других работах для выделения и очистки ДНК из клеток и проведения ПЦР [97, 98].

Развитие знаний и накопление опыта в области разработки микрочиповых устройств пробоподготовки и ПЦР-микрочипов привели к реальной возможности создания системы полного анализа. Одна из первых подобных систем описана в работе [99]. Это микрофлюидная система, она включает в себя смесители, клапаны, насосы, сеть микроканалов и микрореакторов, нагревательные элементы и гибридационную матрицу с электрохимическим детектором. Система позволяет проводить лизис клеток, поступающих в микрочип с пробой биологических жидкостей, с помощью пьезоэлектрического вибратора, пузырьков воздуха и магнитных частиц сорбента, на которые адсорбируются выделенные молекулы ДНК. Затем насосы, действие которых основано на электролизе водного раствора электролита и электрокинетических явлениях, направляют поток лизата в ПЦР-микрореактор, где магнитные частицы сорбента улавливаются и промываются. Реагенты для ПЦР проходят стадию термоденатурации в микрореакторе. Продукты реакции детектируются на гибридационном биочипе, оснащенном несколькими электродами для снятия специфических сигналов от продуктов ПЦР.

Возможность создания автоматизированной системы полного молекулярно-генетического анализа, выполняющей выделение ДНК из образцов, очистку, амплификацию, разделение и детектирование полученных продуктов методом электрофореза в едином микрочипе, было продемонстрировано в нескольких работах, опубликованных в течение последних лет [100—102].

Оригинальный подход к разрушению клеток и выделению ДНК был реализован с использованием микрочипа с интегрированными электродами, на которых в результате электролиза выделяются гидроксид-ионы, которые вызывают лизис клеток в микрореакторе емкостью в несколько микролитров [103]. Разработанное устройство было использовано для анализа методом ПЦР-РВ четырех типов бактерий, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Показаны та-

кие преимущества, как исключение необходимости нагревания образца и введения химических реагентов, отсутствие ингибирования, низкие потери ДНК, а также возможность функционирования устройства при низком напряжении питания и малой потребляемой мощности.

В работе [104] разработан прототип анализатора на основе проточного микрочипа, осуществляющего количественный ПЦР-РВ анализ ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С. Устройство содержит модули управления микрофлюидным потоком и температурой трех стационарных металлических нагревательных блоков, что позволяет гибко устанавливать параметры температурно-временного режима ПЦР в зависимости от анализируемого объекта.

### Заключение

Проведенная оценка динамики развития микрочиповых аналитических систем молекулярно-биологического анализа, а также обзор последних работ в этой области ясно показывают, что эти системы прошли значительный этап своего эволюционного развития и заняли прочные позиции в аналитической практике. Этому прежде всего способствовало появление коммерческих микрочиповых ПЦР-анализаторов и разнообразных микрочипов для выполнения ряда важных прикладных задач. Начальные идеи, которые были реализованы в первых микрочиповых экспериментальных установках, выполняющих отдельные операции (быстрая ПЦР, быстрый электрофорез, пробоподготовка), были последовательно развиты до прототипов реальных анализаторов, осуществляющих все аналитические функции в одном устройстве. Практически полностью решены вопросы модификации поверхности наиболее распространенных материалов, из которых изготавливают ПЦР-микрочипы. Опробованы различные материалы, включая недорогие полимеры и металлы, и показаны их преимущества.

Растущее количество работ, посвященных конструированию, оптимизации и применению новых микрочиповых систем полного анализа, показывает актуальность этой задачи. Текущие тенденции отражают создание новых недорогих материалов и технологий для изготовления ПЦР-микрочипов, развитие систем бесконтактного термоденатурации и измерения температуры, дальнейшую миниатюризацию систем детектирования, увеличение информативности этих систем. Гибридационный анализ, мультиплексный анализ, автоматизированные системы ввода проб в микрочипы, новые методы пробоподготовки в микрочипах, микрочипы с иммобилизованными реагентами — все это достижения в области создания микрочиповых аналитических систем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. West J., Becker M., Tombrink S., Manz A. *Anal. Chem.*, 2008, v. 80, № 12, p. 4403 – 4419.
2. Ohno K., Tachikawa K., Manz A. *Electrophoresis*, 2008, v. 29, № 22, p. 4443 – 4453.

3. *Dittrich P.S., Tachikawa K., Manz A.* Anal. Chem., 2006, v. 78, № 12, p. 3887–3908.
4. *Arora A., Simone G., Salieb-Beugelaar G.B., Kim J.T., Manz A.* Ibid., 2010, v. 82, № 12, p. 4830–4847.
5. Lab-on-a-Chip Technology. V. 2: Biomolecular Separation and Analysis. Eds. K.E. Herold, A.Rasooly. Caister Academic Press, 2009, 300 p.
6. *Беленький Б.Г., Коляк Н.И., Курочкин В.Е., Евстратов А.А., Суханов В.Л.* Научное приборостроение, 2000, т. 10, № 2, с. 57–64.
7. *Мак-Махон Д.* Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. М.: Профессия, 2009, 366 с.
8. *Зимина Т.М.* Нано- и микросистемная техника, 2007, № 8, с. 27–49.
9. *Евстратов А.А., Рудницкая Г.Е., Петухова Н.А.* Научное приборостроение, 2005, т. 15, № 2, с. 27–40.
10. *Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А., Москвич Л.Н.* Там же, 2005, т. 15, № 2, с. 41.
11. ПЦР в «реальном времени». Ред. Д.В. Ребриков. М.: Бином, 2009, 223 с.
12. *Zhang C., Xing D.* Nucleic Acids Res., 2007, v. 35, № 13, p. 4223–4237.
13. *Zhang Y., Ozdemir P.* Anal. chim. acta, 2009, v. 638, № 2, p. 115–125.
14. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Eds. E. van Pelt-Verkuil, A. van Belkum, J.P. Hays. Springer Science, 2008, 332 p.
15. *Neuzil P., Zhang C., Pipper J., Oh S., Zhuo L.* Nucleic Acids Res., 2006, v. 34, № 11, p. e77.
16. *Wittwer C.T., Fillmore G.C., Garling D.J.* Anal. Biochem., 1990, v. 186, № 2, p. 328–321.
17. *Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T.* In: Transducers'93, seventh international conference on solid state Sens Actuators, Yokohama, Japan, 1993, p. 924.
18. *Cho Y.-K., Kim J., Lee Y., Kim Y.-A., Namkoong K., Lim H., Oh K.W., Kim S., Han J., Park C., Pak Y.E., Ki C.-S., Choi J.R., Myeong H.-K., Ko C.* Biosens. Bioelectron., 2006, v. 21, № 11, p. 2161–2169.
19. *Ke C., Kelleher A.-M., Berney H., Sheehan M., Mathewson A.* Sens. Actuators B: Chem., 2007, v. 120, № 2, p. 538–544.
20. *Kim S.H., Noh J., Jeon M.K., Kim K.W., Lee L.P., Woo S.I.* J. Micromech. Microeng., 2006, v. 16, № 3, p. 526.
21. *Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C.* Lab. Chip, 2006, v. 6, № 7, p. 886–895.
22. *Noh J., Sung S.W., Jeon M.K., Kim S.H., Lee L.P., Woo S.I.* Sens. Actuators A: Phys., 2005, v. 122, p. 196–202.
23. *Wei W., Wang W., Li Z.-X., Luo R., Lü S.-H., Xu A.-D., Yang Y.-J.* J. Micromech. Microeng., 2005, v. 15, № 8, p. 1369.
24. *Easley C.J., Karlinsey J.M., Landers J.P.* Lab. Chip, 2006, v. 6, № 5, p. 601–610.
25. *Legendre L.A., Bienvenue J.M., Roper M.G., Ferrance J.P., Landers J.P.* Anal. Chem., 2006, v. 78, № 5, p. 1444–1451.
26. *Liu C.N., Toriello N.M., Mathies R.A.* Ibid., 2006, v. 78, № 15, p. 5474–5479.
27. *Toriello N.M., Liu C.N., Mathies R.A.* Ibid., 2006, v. 78, № 23, p. 7997–8003.
28. *Shoffner M.A., Cheng J., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P.* Nucleic Acids Res., 1996, v. 24, № 2, p. 375–379.
29. *Cheng J., Shoffner M.A., Hvichia G.E., Kricka L.J., Wilding P.* Ibid., 1996, v. 24, № 2, p. 380–385.
30. *Erill I., Campoy S., Rus J., Fonseca L., Ivorra A., Navarro Z., Plaza J.A., Aguiló J., Barbé J. J.* Micromech. Microeng., 2004, v. 14, № 11, p. 1558.
31. *Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Казаков В.А., Ганеев А.А.* Ж. аналит. химии, 2008, т. 63, № 2, с. 210–217.
32. *Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А.* Научное приборостроение, 2007, т. 17, № 3, с. 16–24.
33. *Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Арнаутов В.А., Гейбо Д.С., Ганеев А.А., Сляднев М.Н.* Там же, 2010, т. 20, № 1, с. 10–20.
34. *Waters L.C., Jacobson S.C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R.S., Ramsey J.M.* Anal. Chem., 1998, v. 70, № 24, p. 5172–5176.
35. *Paegel B.M., Blazej R.G., Mathies R.A.* Curr. Opin. Biotechnol., 2003, v. 14, № 1, p. 42–50.
36. *Hu G., Xiang Q., Fu R., Xu B., Venditti R., Li D.* Anal. chim. acta, 2006, v. 557, № 1–2, p. 146–151.
37. *Brenan C., Morrison T.* Drug Discovery Today: Technologies, 2005, v. 2, № 3, p. 247–253.
38. *Trung N.B., Saito M., Takabayashi H., Viet P.H., Tamiya E., Takamura Y.* Sens. Actuators B: Chem., 2010, v. 149, № 1, p. 284–290.
39. *Liu J., Enzelberger M., Quake S.* Electrophoresis, 2002, v. 23, № 10, p. 1531–1536.
40. *Wang H., Chen J., Zhu L., Shadpour H., Hupert M.L., Soper S.A.* Anal. Chem., 2006, v. 78, № 17, p. 6223–6231.
41. *Cheng J.Y., Hsieh C.J., Chuang Y.C., Hsieh J.R.* Analyst, 2005, v. 130, № 6, p. 931–940.
42. *Sun Y., Kwok Y.C., Foo-Peng Lee P., Nguyen N.T.* Anal. Bioanal. Chem., 2009, v. 394, № 5, p. 1505–1508.
43. *Sun Y., Kwok Y.C., Nguyen N.T.* Lab. Chip, 2007, v. 7, № 8, p. 1012–1017.
44. *Giordano B.C., Ferrance J., Swedberg S., Huhmer A.F., Landers J.P.* Anal. Biochem., 2001, v. 291, № 1, p. 124–132.
45. *Liu J., Hansen C., Quake S.R.* Anal. Chem., 2003, v. 75, № 18, p. 4718–4723.
46. *Seeb J.E., Pascal C.E., Ramakrishnan R., Seeb L.W.* Methods Mol. Biol., 2009, v. 578, p. 277–292.
47. *Zhang C., Xu J., Ma W., Zheng W.* Biotechnol. Adv., 2006, v. 24, № 3, p. 243–284.
48. *Krishnan M., Burke D.T., Burns M.A.* Anal. Chem., 2004, v. 76, № 22, p. 6588–6593.
49. *Koh C.G., Tan W., Zhao M.Q., Ricco A.J., Fan Z.H.* Ibid., 2003, v. 75, № 17, p. 4591–4598.
50. *Yang J., Liu Y., Rauch C.B., Stevens R.L., Liu R.H., Lenigk R., Grodzinski P.* Lab. Chip, 2002, v. 2, № 4, p. 179–187.
51. *Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S.E., Horowitz D., Dixon J.M., Brenan C.J.* Nucleic Acids Res., 2006, v. 34, № 18, p. e123.
52. *Obeid P.J., Christopoulos T.K., Crabtree H.J., Backhouse C. J.* Anal. Chem., 2003, v. 75, № 2, p. 288–295.
53. *Neuzil P., Pipper J., Hsieh T.M.* Mol. Biosyst., 2006, v. 2, № 6–7, p. 292–298.
54. *Panaro N.J., Lou X.J., Fortina P., Kricka L.J., Wilding P.* Biomol. Eng., 2005, v. 21, № 6, p. 157–162.
55. *Matsubara Y., Kerman K., Kobayashi M., Yamamura S., Morita Y., Tamiya E.* Biosens. Bioelectron., 2005, v. 20, № 8, p. 1482–1490.
56. *Zhang L., Dang F., Kaji N., Baba Y.* J. Chromatogr. A, 2006, v. 1106, № 1–2, p. 175–180.
57. *Consolandi C., Severgnini M., Frosini A., Caramenti G., De Fazio M., Ferrara F., Zocco A., Fischetti A., Palmieri M., De Bellis G.* Anal. Biochem., 2006, v. 353, № 2, p. 191–197.
58. *Matsubara Y., Kobayashi M., Morita Y., Tamiya E.* Arch. Histol. Cytol., 2002, v. 65, № 5, p. 481–488.

59. Schmidt U., Lutz-Bonengel S., Weisser H.J., Sanger T., Pollak S., Schon U., Zacher T., Mann W. *Int. J. Legal. Med.*, 2006, v. 120, № 1, p. 42—48.
60. Pal D., Venkataraman V. *Sens. Actuators A: Phys.*, 2002, v. 102, № 1-2, p. 151—156.
61. Shaw K.J., Docker P.T., Yelland J.V., Dyer C.E., Greenman J., Greenway G.M., Haswell S.J. *Lab. Chip*, 2010, v. 10, № 13, p. 1725—1728.
62. Kim J., Byun D., Mauk M.G., Bau H.H. *Ibid.*, 2009, v. 9, № 4, p. 606—612.
63. Kopp M.U., de Mello A.J., Manz A. *Science*, 1998, v. 280, p. 1046—1048.
64. Nakayama T., Kurosawa Y., Furui S., Kerman K., Kobayashi M., Rao S.R., Yonezawa Y., Nakano K., Hino A., Yamamura S., Takamura Y., Tamiya E. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, v. 386, № 5, p. 1327—33.
65. Nakayama T., Hiep H.M., Furui S., Yonezawa Y., Saito M., Takamura Y., Tamiya E. *Ibid.*, 2010, v. 396, № 1, p. 457—64.
66. Chabert M., Dorfman K.D., Cremoux P.d., J. R., Viovy J.L. *Anal. Chem.*, 2006, v. 78, p. 7722—7728.
67. Schaerli Y., Wootton R.C., Robinson T., Stein V., Dunsby C., Neil M.A., French P.M., Demello A.J., Abell C., Hollfelder F. *Ibid.*, 2009, v. 81, № 1, p. 302—6.
68. Kiss M.M., Ortoleva-Donnelly L., Beer N.R., Warner J., Bailey C.G., Colston B.W., Rothberg J.M., Link D.R., Leamon J.H. *Ibid.*, 2008, v. 80, № 23, p. 8975—81.
69. Beer N.R., Wheeler E.K., Lee-Houghton L., Watkins N., Nasarabadi S., Hebert N., Leung P., Arnold D.W., Bailey C.G., Colston B.W. *Ibid.*, 2008, v. 80, № 6, p. 1854—1862.
70. Daniel J.H., Iqbal S., Millington R.B., Moore D.F., Lowe C.R., Leslie D.L., Lee M.A., Pearce M.J. *Sens. Actuators A: Phys.*, 1998, v. 71, № 1-2, p. 81—88.
71. Woolley A.T., Hadley D., Landre P., deMello A.J., Mathies R.A., Northrup M.A. *Anal. Chem.*, 1996, v. 68, № 23, p. 4081—6.
72. Heap D.M., Herrmann M.G., Wittwer C.T. *Biotechniques*, 2000, v. 29, № 5, p. 1006—1012.
73. Khandurina J., McKnight T.E., Jacobson S.C., Waters L.C., Foote R.S., Ramsey J.M. *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, № 13, p. 2995—3000.
74. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А. *Научное приборостроение*, 2007, т. 17, № 3, с. 25—30.
75. Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. *Science*, 2002, v. 298, № 5594, p. 793.
76. Chung K.H., Park S.H., Choi Y.H. *Lab. Chip*, 2010, v. 10, № 2, p. 202—210.
77. Oda R.P., Strausbauch M.A., Huhmer A.F., Borson N., Jurens S.R., Craighead J., Wettstein P.J., Eckloff B., Kline B., Landers J.P. *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, № 20, p. 4361—4368.
78. Easley C.J., Karlinsey J.M., Bienvenue J.M., Legendre L.A., Roper M.G., Feldman S.H., Hughes M.A., Hewlett E.L., Merkel T.J., Ferrance J.P., Landers J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, v. 103, № 51, p. 19272—19277.
79. Roper M.G., Easley C.J., Legendre L.A., Humphrey J.A., Landers J.P. *Anal. Chem.*, 2007, v. 79, № 4, p. 1294—1300.
80. Slyadnev M.N., Tanaka Y., Tokeshi M., Kitamori T. *Ibid.*, 2001, v. 73, № 16, p. 4037—4044.
81. Braun D., Goddard N.L., Libchaber A. *Phys. Rev. Lett.*, 2003, v. 91, № 15, p. 158103.
82. Tanaka Y., Slyadnev M.N., Hibara A., Tokeshi M., Kitamori T. *J. Chromatogr. A*, 2000, v. 894, № 1-2, p. 45—51.
83. Sakakibara J., Adrian R.J. *Exp. Fluids*, 1999, v. 26, p. 7—15.
84. Mondal S., Venkataraman V. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2007, v. 70, № 5, p. 773—777.
85. Shah J.J., Gaitan M., Geist J. *Anal. Chem.*, 2009, v. 81, № 19, p. 8260—8263.
86. Samy R., Glawdel T., Ren C.L. *Ibid.*, 2007, v. 80, № 2, p. 369—375.
87. Hataoka Y., Zhang L., Yukimasa T., Baba Y. *Anal. Sci.*, 2005, v. 21, № 1, p. 53—56.
88. Chen J., Wabuyele M., Chen H., Patterson D., Hupert M., Shadpour H., Nikitopoulos D., Soper S.A. *Anal. Chem.*, 2005, v. 77, № 2, p. 658—666.
89. Lagally E.T., Scherer J.R., Blazej R.G., Toriello N.M., Diep B.A., Ramchandani M., Sensabaugh G.F., Riley L.W., Mathies R.A. *Ibid.*, 2004, v. 76, № 11, p. 3162—3170.
90. Shandrick S., Ronai Z., Guttman A. *Electrophoresis*, 2002, v. 23, № 4, p. 591—595.
91. Marcus J.S., Anderson W.F., Quake S.R. *Anal. Chem.*, 2006, v. 78, № 3, p. 956—958.
92. Hashimoto M., Barany F., Soper S.A. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, v. 21, № 10, p. 1915—1923.
93. Defever T., Druet M., Rochelet-Dequaire M., Joannes M., Grossiord C., Limoges B., Marchal D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, v. 131, № 32, p. 11433—11441.
94. Fang T.H., Ramalingam N., Xian-Dui D., Ngin T.S., Xianting Z., Lai Kuan A.T., Peng Huat E.Y., Hai-Qing G. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, v. 24, № 7, p. 2131—2136.
95. Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., Leung W.K., Dickson D., Giordano B.C., Power M.E., Ferrance J.P., Feldman S.H., Norris P.M., Landers J.P. *Anal. Chem.*, 2003, v. 75, № 8, p. 1880—1886.
96. Wilding P., Kricka L.J., Cheng J., Hvichia G., Shoffner M.A., Fortina P. *Anal. Biochem.*, 1998, v. 257, № 2, p. 95—100.
97. O'Grady J., Sedano-Balbas S., Maher M., Smith T., Barry T. *Food Microbiol.*, 2008, v. 25, № 1, p. 75—84.
98. Yuen P.K., Kricka L.J., Fortina P., Panaro N.J., Sakazume T., Wilding P. *Genome Res.*, 2001, v. 11, № 3, p. 405—412.
99. Yobas L., Cheow L.F., Tang K.C., Yong S.E., Ong E.K., Wong L., Teo W.C., Ji H., Rafeah S., Yu C. *Biomed. Microdevices*, 2009, v. 11, № 6, p. 1279—1288.
100. Beyor N., Yi L., Seo T.S., Mathies R.A. *Anal. Chem.*, 2009, v. 81, № 9, p. 3523—3528.
101. Yeung S.H., Liu P., Del Bueno N., Greenspoon S.A., Mathies R.A. *Ibid.*, 2009, v. 81, № 1, p. 210—217.
102. Bienvenue J.M., Legendre L.A., Ferrance J.P., Landers J.P. *Forensic. Sci. Int. Genet.*, 2010, v. 4, № 3, p. 178—186.
103. Lee H.J., Kim J.H., Lim H.K., Cho E.C., Huh N., Ko C., Park J.C., Choi J.W., Lee S.S. *Lab. Chip*, 2010, v. 10, № 5, p. 626—633.
104. 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. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2009, v. 141, № 1, p. 329—337.