

Создание устройства регистрации флуоресценции от микрофлюидных чипов

Р.К. Добрецов
Санкт-Петербургский
Политехнический университет
имени Петра Великого
Санкт-Петербург, Россия
rody99@gmail.com

В.В. Давыдов
Санкт-Петербургский
Политехнический университет
имени Петра Великого
Санкт-Петербург, Россия
ВНИИФ Российской академии наук
Московская область, Россия
davydov_vadim66@mail.ru

А.А. Евстапов
Институт аналитического
приборостроения Российской
академии наук
Санкт-Петербург, Россия
an_evs@mail.ru

Аннотация—В данной работе рассматривается создание и проверка на работоспособность макета для регистрации флуоресценции от микрофлюидных чипов при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе приведены характеристики основных элементов, использованных при создании макета устройства для детектирования флуоресценции. Представлены результаты экспериментов при проверке работоспособности элементов макета и микрофлюидных чипов. Продемонстрирована работоспособность собранного макета при проведении ПЦР реакции в реальном времени.

Ключевые слова— полимеразная цепная реакция (ПЦР), микрофлюидный чип, ДНК, флуоресценция, красители, термоциклер, оптоволоконно, амплификация.

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ведущим инструментом для химико-биологических исследований является ПЦР [1, 2]. С помощью ПЦР специфические последовательности в матрице ДНК или кДНК могут быть скопированы или «амплифицированы» в тысячу или миллион раз с использованием специфичных для последовательности олигонуклеотидов, термостабильной ДНК-полимеразы и техники термоциклирования. ПЦР в реальном времени — это разновидность метода ПЦР, который обычно используется для количественного определения ДНК или РНК в образце. Используя праймеры, специфичные для последовательности, можно определить количество копий конкретной последовательности ДНК или РНК. Количественная оценка возможна путем измерения количества амплифицированного продукта на каждом этапе цикла ПЦР. Количественная оценка возможна путем измерения количества амплифицированного продукта на каждом этапе цикла ПЦР. Амплификация будет наблюдаться на более ранних циклах, если в образце присутствует определенная последовательность (ДНК или РНК), а если последовательность недостаточна, амплификация будет наблюдаться на более поздних циклах или вообще не регистрироваться. Количественное определение амплифицированного продукта получают с использованием флуоресцентных зондов или флуоресцентных ДНК-связывающих красителей и инструментов ПЦР в реальном времени, которые измеряют флуоресценцию при выполнении термоциклирования, необходимого для реакции ПЦР [1, 2].

В большинстве существующих на данный момент устройств для ПЦР-анализа используются пробирки или микротитрационные планшеты, и они имеют ряд серьезных недостатков [3, 4]. Недостатки: неравномерный нагрев/охлаждение объемных систем, скорость анализа не соответствует требованиям современной медицины, биологии, экологических служб и т. п., а именно требованию экспрессности анализа. Решением этой проблемы являются микрофлюидные чипы, поскольку они представляют собой планарные системы. Используя микрофлюидные чипы, можно анализировать больше образцов за меньшее время. Таким образом разработка и создание устройств для ПЦР-анализа в реальном времени с использованием микрофлюидных технологий необходимы и крайне важны.

2. МАКЕТ УСТРОЙСТВА РЕГИСТРАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОТ МИКРОФЛЮИДНЫХ ЧИПОВ

На рис. 1 представлен разработанный макет устройства детектирования флуоресценции от микрофлюидных чипов.

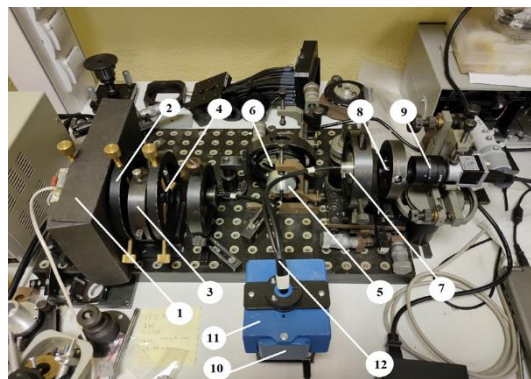


Рис. 1. Макет устройства для регистрации флуоресценции: 1 — источник (светодиод); 2, 4, 6, 8 — линзы; 3 — фильтр возбуждения; 5, 7 — фильтры эмиссии; 9 — фотоприемное устройство; 10 — место расположения чипа; 11 — термоциклер; 12 — оптоволоконно (оптоволоконный жгут)

Основными элементами макета устройства являются: микрофлюидный чип, светодиод, фотоприемник (камера), волоконно-оптический жгут, термоциклер, оптические линзы и фильтры. Источником света в устройстве служит светодиод типа SMD с длиной волны испускаемого света 480 нм, мощностью 3 Вт, с максимальным управляющим током 700 мА и световым потоком до 70 лм. От источника свет попадает на систему

плосковыпуклых линз и фильтром возбуждения с длиной волны 490 нм. Далее свет попадает в тройное оптическое волокно (волоконно-оптический жгут). Один канал — возбуждение, два других — регистрация сигнала флуоресценции/эмиссии. Свет, пройдя по оптоволокну, попадает в раствор, находящейся в микрофлюидном чипе, и возбуждает флуоресценцию. Чип расположен в термоциклере, с помощью которого проводится ПЦР реакция. В термоциклере так же установлено устройство для фиксации оптического волокна, которое позволяет не только закрепить осветительный жгут в термоциклере, но и контролировать расстояние от него до чипа. Детектирование флуоресценции происходит с помощью фотоприемника камеры, на который свет попадает пройдя через фильтр эмиссии с длиной волны 520 нм и плосковыпуклые линзы.

Перед проведением экспериментов необходимо было сначала отобрать наиболее подходящий микрофлюидный чип. Чип выбирался по двум критериям: герметичность и светопропускание. Герметичность чипов проверялась путем проведения имитации ПЦР реакции на собранном макете и по количеству образованных в чипе пузырьков воздуха определялся наиболее герметичный чип. Для проверки фильтров на светопропускание был использован спектрофотометр, с помощью которого были получены графики зависимости процента пропускания от длины волны. По этим графикам и отбирался подходящий микрофлюидный чип. Соответственно чип, использованный в дальнейших экспериментах, выбирался с учетом обоих критериев.

Работоспособность макета устройства была проверена путем проведения на нем ПЦР реакции со специально установленными параметрами и с использованием микрофлюидного чипа, заполненного реагентом, под который и подбирались параметры ПЦР реакции. Сигнал флуоресценции от чипа регистрировался с помощью камеры и затем обрабатывался программой на компьютере для получения графика ПЦР реакции. После чего можно было провести анализ полученного графика.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ СОБРАННОГО МАКЕТА

Для проведения эксперимента были установлены следующие параметры ПЦР:

- Первичная денатурация: 91 °C и продолжительность 1 минуту;
- Параметры цикла:
 - Денатурация за цикл: 60 °C и продолжительность 20 секунд;
 - Синтез в цикле: 75 °C и продолжительность 10 секунд;
 - Отжиг за цикл: 90 °C и продолжительность 10 секунд;
- Количество циклов: 30;
- Окончательная инкубация: 36 °C и продолжительность 2 минуты.

Для заполнения микрофлюидного чипа использовался набор реагентов для обнаружения ДНК растений в продуктах питания, пищевом сырье, семенах

и корнях методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Растение универсал». Использовался краситель $Cu5$.

Был получен график зависимости уровня сигнала от времени ПЦР, представленный на рис. 2.

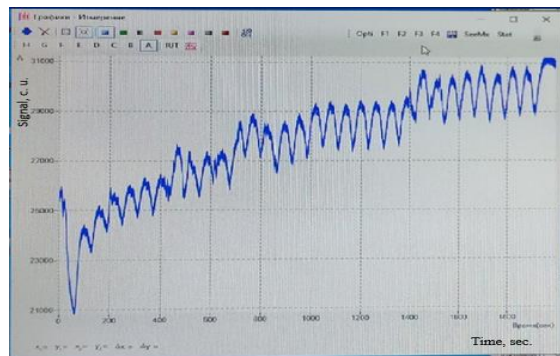


Рис. 2. График зависимости уровня сигнала от времени ПЦР

На графике (рис. 2) можно наблюдать прохождение ПЦР реакции в реальном времени, а именно процесс амплификации в реальном времени. Скачки уровня сигнала с выходом на пик примерно через равные промежутки времени и при увеличении уровня сигнала пика с каждым новым скачком, выражают циклы ПЦР реакции в процессе амплификации. То есть после каждого цикла происходит увеличение количества продукта в чипе и, следовательно, увеличивается сигнал флуоресценции. Стоит отметить, что в ходе эксперимента в камере могут образовываться пузыри, которые в процессе термоциклирования двигаются по камере, и могут привести к неравномерным изменениям уровня сигнала. Чем дольше держать термоциклирование тем больше вероятность слияния пузырей, появления больших пузырей.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения экспериментальных исследований на собранном макете, были получены графики отражающие процессы термоциклирования, амплификации и выхода на плато в реальном времени, то есть регистрировался процесс ПЦР в реальном времени. Таким образом собранный макет устройства может в дальнейшем использоваться для биологических и химических исследований на микрофлюидных чипах при проведении ПЦР в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kruglov, V.A. Development of a hydraulic system for bridge amplification / V.A. Kruglov, V.S. Reznik, A.P. Glinushkin // Journal of Physics: Conference Series. – 2020. – Vol. 1695(1). – P. 012067.
- [2] Reznik, V.S. Development of a measuring device for the study of thermal processes during the polymerase chain reaction / V.S. Reznik, V.A. Kruglov, A.I. Petrov, A.P. Glinuchkin, V.Y. Rud // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1410(1). – P. 012078.
- [3] Matvienko, I.V. Synthesis of Dihydroquinoline-Based Derivatives of Fluorescent Rhodamine Dyes for Nucleic Acid Analysis by a Real-Time Polymerase Chain Reaction / I.V. Matvienko, V.M. Bayramov, N.A. Parygina, V.E. Kurochkin, Y.I. Alekseev // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2020. – Vol. 46(3). – P. 349-359.
- [4] Fedorov, A.A. The polymerase chain reaction model analyzed by the homotopy perturbation method / A.A. Fedorov, A.S. Berdnikov, V.E. Kurochkin // Journal of Mathematical Chemistry. – 2019. – Vol. 57(4). – P. 971-985.