САНКТПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

СУВОРОВА
Александра Олеговна

МИКРОЧИПОВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ РЕАКТИВОВ МЕТОДОМ ПЦР С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Научный руководитель:
д.ф-м.н. Ганеев Александр Ахатович

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург
2015

О Г Л А В Л Е Н И Е

Введение……..……..……...6
I. Обзор литературы……..……..…….....10
I.1. Полимеразная цепная реакция…….....10
I.1.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией……....11
I.1.2. Методы детектирования продуктов ПЦР…….……..……...13
I.2. Микрочиповые технологии в аналитической практике и в методе ПЦР……..……18
I.2.1. Особенности использования микрочиповых технологий для проведения ОТПЦР……....20
I.3. Способы модифицирования и пассивации поверхности алюминиевых ОТПЦР микрочипов и методы исследования полученных пленок……..……...22
I.3.1. Классические методы обработки поверхности алюминиевых изделий…….....22
I.3.2. Плазмохимическое осаждение пленок из газовой фазы…….……..…..23
I.3.3. Механизмы плазмохимического осаждения……....24
I.3.4. Основные реакции ПХО, используемые для модификации поверхности алюминия..….....26
I.3.5. Электрохимическая импедансная спектроскопия для оценки инертности пленок на поверхности металлов.……..28
I.3.6. Исследование морфологической структуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с последующим рентгеноспектральным микроанализом….……..…..33
I.3.7. Оценка структуры покрытий методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)……...…..……..34
I.4. Иммобилизация ПЦР реактивов на поверхности пробирок и микрофлюидных устройств……...35
I.4.1. Лиофилизация как метод сушки биологически активных веществ: принцип, преимущества и недостатки…….…..36
I.4.2. Основные особенности лиофилизации белков……...……..39
I.4.3. Основные стабилизаторы для ПЦР компонентов……...……..42
I.4.4. Особенности применения метода лиофилизации для ПЦР-реактивов……...……..45
I.5 Методы выделения нуклеиновых кислот……..……..…...46
I.5.1. Классические методы выделения нуклеиновых кислот…….……..46
I.5.2. Выделение нуклеиновых кислот с помощью магнитных частиц…….……..47
I.6. Основные сведения о болезни Ньюкасла и Инфекционном бронхите кур…….……..50
I.6.1. Классические методы определения вирусов НБ и ИБК…….……..52
I.6.2. Иммуноферментный метод определения вирусов НБ и ИБК……...……..54
II. Аппаратура, методики и техника экспериментов……..….....56

II.1. Топология и устройство алюминиевого микрочипа..……..…….....56
II.2. Изготовление алюминиевого микрочипа..…….....57
II.2.1. Оборудование для изготовления микрочипов……57
II.2.2. Реактивы для изготовления микрочипов……...……..……57
II.2.3. Стадия 1: предварительная подготовка поверхности алюминиевой подложки……..…58
II.2.4. Стадия 2: плазменная обработка алюминиевой подложки……58
II.2.5. Стадия 3а: гидрофилизация поверхности алюминиевой подложки…….……58
II.2.6. Стадия 3б: Гидрофобизация внешней (между микрореакторами) поверхности алюминиевой подложки ……..…59
II.2.7. Стадия 4: соединение готовой алюминиевой подложки с пластмассовой рамкой ……59
II.3. Плазмохимическое осаждение покрытий на поверхности алюминиевой пластины и методы исследования полученных пленок……..60
II.3.1. Оборудование и реактивы для ПХО…….60
II.3.2. Методика проведения ПХО на поверхности алюминиевых микрочипов…….……61
II.3.3. Исследование инертности покрытий в условиях ПЦР методом спектроскопии электрохимического импеданса…….…63
II.3.4. Измерение угла смачивания поверхности микрочипов водой методом растекающейся капли……...64
II.3.5. Исследование морфологической структуры и оценка элементного состава пленок методами сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского энергодисперсионного микроанализа…….……65
II.3.6. Исследование структуры пленок методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)……...……66
II.4. Методы пробоподготовки биологического материала……..……...66
II.4.1. Выделение РНК из биологического материала с помощью коммерческого комплекта реагентов "АмплиПрайм РИБО-преп"…….……...67
II.4.2. Выделение РНК из биологического материала с помощью комплекта реагентов "АмплиПрайм РИБО-сорб"……...…...68
II.4.3. Выделение РНК из биологического материала с помощью магнитных частиц..……....70
II.5. Проведение ОТПЦР с помощью микрочипового анализатора AriaDNA….……..…….73
II.5.1. Проведение ОТПЦР на жидких реактивах…….……73
II.5.2. Проведение ОТПЦР с иммобилизированными реактивами ……75
II.6. Иммобилизация ОТПЦР-реагентов внутри микрореакторов алюминиевого микрочипа с помощью экспериментальной лиофильной установки …….……...76

II.6.1. Экспериментальная установка для иммобилизации ОТПЦР реактивов……...76
II.6.2. Методика приготовления растворов стабилизаторов……...78
II.6.3. Приготовление полной смеси ПЦР- и ОТПЦР-реактивов для лиофилизации..……...79
II.6.4. Методика иммобилизации реактивов внутри ячеек алюминиевого микрочипа……..…...79
II.6.5. Методика искусственного старения микрочипов с иммобилизированными реагентам.....80
II.7. Исследование морфологической структуры лиофильных пленок методом сканирующей электронной микроскопии ……...……...81
III. Результаты плазмохимического осаждения пленок на поверхности алюминиевых микрочипов……..…..82
III.1. Оценка инертности углеродсодержащих покрытий в условиях ПЦР……..……..83
III.2. Исследование углеродсодержащих пленок с помощью спектроскопии электрохимического импеданса……...87
III.3. Исследование морфологических свойств покрытий методом сканирующей электронной микроскопии и оценка состава полученных пленок методом рентгеновской энергодисперсионной спектроскопии ……...…….90
III.4.Оценка состава покрытия методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)……..…….96
III.5.Измерение контактного угла смачивания поверхности микрочипов водой…….….……98
III.6.Проведение ОТПЦР на микрочипах с нанесенными углеродсодержащими пленками с использованием микрочипового ПЦР-анализатора …….……99
IV.Подбор оптимальных физических условий для иммобилизации ПЦР реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов на примере ДНК-систем……..…….…….102
IV.1. Оптимизация методики модификации поверхности подложки микрочипа……...102
IV.2. Оптимизация условий для экспериментальной установки для иммобилизации реактивов……..105
IV.3. Оптимизация времени лиофилизации ПЦР-реагентов в экспериментальной установке ..107
IV.4. Сравнение методов иммобилизации ПЦР-реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов…….……108
IV.5. Проверка длительности хранения лиофилизированных реактивов для ПЦР-анализа проб……...112
V.Иммобилизация ОТПЦР реактивов в микрореакторах алюминиевого микрочипа…….….114
V.1.Исследование влияния процесса лиофилизации на активность ревертазы ..…….114
V.2 Исследование влияния модельной смеси стабилизаторов на ОТПЦР реактивы в жидкой форме ……..…….117

V.3.Результаты лиофилизации ОТПЦР-реактивов с модельной смесью стабилизаторов….....122
V.4 Исследование эффективности стабилизации иммобилизированных ОТПЦР-реактивов в зависимости от времени хранения.....127
V.5 Исследование стабилизации положительного РНК контроля в процессе искусственного старения.....132
VI. Оптимизация пробоподготовки вирусных пассажей на курином эмбрионе.....137
VI.1. Оптимизация температуры и времени лизиса клеток для схемы пробоподготовки на основе суспензии магнитного сорбента.....138
VI.2 Оптимизация стадии сорбции РНК на поверхности магнитного сорбента.....142
VI.3. Очистка сорбента от гидрофильных и гидрофобных ингибиторов.....143
VI.4. Оптимизация стадии элюирования РНК с магнитного сорбента…….……...…..146
Выводы…….……152
Перечень используемых сокращений……..…….153
Литература…….…..154

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы являются одним из важнейших направлений в современной аналитической химии. Для определения нуклеиновых кислот наиболее широкое распространение получила полимеразная цепная реакция (**ПЦР**), которая обладает уникальными аналитическими характеристиками, такими как: высокая чувствительность, экспрессность и высокая специфичность к нуклеиновым кислотам. В качестве варианта этого метода для анализа объектов, содержащих вирусы на основе рибонуклеиновых кислот (**РНК**), применяется ПЦР с дополнительной стадией обратной транскрипции (**ОТПЦР**). Данная стадия позволяет превратить искомую РНК в комплементарную ДНК (**кДНК**), пригодную для дальнейшего определения по классической схеме ПЦР.

В последние годы широкое распространение для осуществления ПЦР нашли микрочиповые технологии. Но до сих пор предложено очень небольшое количество микрочиповых аналитических приложений, в которых реализован ОТПЦР. Более того, ввиду нестабильности двухферментной системы ПЦР-реактивов, содержащей ревертазу и полимеразу вместе, в микрочиповых системах способ лиофилизации ОТПЦР-реактивов внутри микрореакторов практически не применяется. При этом многократное пипетирование ОТПЦР-реактивов значительно увеличивает трудозатраты метода и сокращает возможности применения ОТПЦР в полевых условиях. Таким образом, существует потребность в разработке новых микрочиповых систем с лиофилизированными ОТПЦР-реактивами для их последующего применения в таких областях как ветеринарный контроль, рыбоводство, птицеводство, ввиду большого количества вирусных возбудителей, которые необходимо оперативно обнаруживать в различных объектах аналитического контроля.

Целью настоящей работы явилась разработка микрочиповой аналитической системы с иммобилизированными реактивами в микрореакторах алюминиевого микрочипа для определения РНК методом ОТПЦР на примере

обнаружения вирусов птиц и ее практическая апробация на реальных объектах.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **основные задачи**:

1. Найти условия модификации свойств поверхности алюминиевых микрочипов с помощью плазмохимического синтеза углеродсодержащих пленок для обеспечения эффективной лиофилизации реактивов.
2. Провести исследования свойств полученных покрытий: инертности и устойчивости в условиях проведения ОТПЦР.
3. Разработать экспериментальную установку для лиофилизации реактивов и обеспечить оптимальные параметры процесса на примере тест-систем для определения ДНК.
4. Обосновать выбор стабилизаторов для одновременной лиофилизации ревертазы и полимеразы в микрореакторах алюминиевых микрочипов, и оптимизировать их концентрации для обеспечения длительных сроков хранения микрочипов с лиофилизированными реактивами.
5. Оптимизировать методику пробоподготовки вируссодержащих биологических материалов для обеспечения мобильности и экспрессности предлагаемой аналитической системы.

Научная новизна.

1. Предложен новый способ модификации поверхности алюминиевых микрочипов с помощью плазменного осаждения полимеров из газовой фазы, обеспечивающий возможность иммобилизации реактивов, необходимых для определения РНК-вирусов методом ОТПЦР.

2. Достигнуты высокие значения эффективности ОТПЦР (до 98%) с иммобилизированными реактивами в микрореакторах алюминиевого микрочипа, модифицированного предложенным способом, на примере обнаружения вирусов птиц.

3. Разработан способ лиофилизации всех компонентов ОТПЦР, включая полимеразу и ревертазу, а также плазмиды и вакцины вирусов в микрореакторах модифицированных алюминиевых микрочипов с помощью добавки бычьего сывороточного альбумина (**БСА**) в смесь стабилизаторов в качестве динамического пассиватора, что позволило обеспечить долговременную стабильность микрочипов при хранении в течение 8 месяцев.

Практическая значимость работы.

1. Разработан макет микрочипа с иммобилизированными реактивами для определения РНК методом ОТПЦР в режиме реального времени (ОТПЦР РВ) на примере обнаружения вирусов птиц.
2. Разработана принципиальная схема методики пробоподготовки на основе суспензии магнитного сорбента для определения РНК с помощью микрочиповой ОТПЦР, позволяющая проводить анализ в полевых условиях.
3. На примере обнаружения вирусов птиц в реальных образцах показано, что разработанный микрочип позволяет значительно сократить затраты на дорогостоящие реактивы, упростить работу оператора и снизить вероятность кросс-контаминации образцов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и 9 тезисов докладов.

Апробация работы. Результаты работы представлены в виде докладов на следующих научных мероприятиях: World Congress on Engineering and Technology CET 2012 (Пекин, 2012), 1-ой Зимней молодежной школе–конференции с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), VII Всероссийской конференции «Менделеев – 2013» (Санкт-Петербург, 2013), VIII Всероссийской конференции «Менделеев – 2014» (Санкт-Петербург,2014), 97th Canadian Chemistry Conference and Exhibition: "Chemistry from Sea to Sky" (Ванкувер, 2014), III Всероссийской студенческой конференции с международным участием, посвященной 140-летию со дня рождения химика–

органика Ю.С. Залькинда (Санкт-Петербург, 2015).

Положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Основные принципы модификации поверхности алюминиевых микрочипов с помощью плазменного осаждения полимеров из газовой фазы, способствующие дальнейшей иммобилизации реактивов, необходимых для определения РНК-вирусов методом ОТПЦР, в микрореакторах.
2. Условия лиофилизации всех компонентов ОТПЦР внутри микрореакторов модифицированного алюминиевого микрочипа, позволяющие обеспечить высокие значения эффективности ОТПЦР на примере обнаружения вирусов птиц.
3. Состав стабилизаторов для лиофилизации всех компонентов ОТПЦР, включая полимеразу и ревертазу, а также плазмиды и вакцины вирусов в микрореакторах модифицированных алюминиевых микрочипов, с помощью добавки бычьего сывороточного альбумина (БСА).
4. Результаты прямого обнаружения вирусов птиц в реальных образцах с помощью разработанного микрочипа и пробоподготовки с использованием суспензии магнитного сорбента.

Личный вклад автора. Авторский вклад состоит в выборе стратегии решения основных задач и их экспериментальной реализации, в обработке и оформлении полученных результатов, анализе и обобщении полученных данных и формулировании основных выводов.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция представляет собой ферментативный синтез определенного участка дезоксирибонуклеиновой кислоты (**ДНК**) с заданной нуклеотидной последовательностью. Высокая специфичность и чувствительность ПЦР позволяют использовать этот метод для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний, обнаружения генетически модифицированных организмов и чужеродного генетического материала в продуктах питания [1, 2].

ПЦР проводится в условиях повторяющихся температурных циклов синтеза участка ДНК, что приводит к геометрическому росту (амплификации) количества копий этого участка ДНК (ампликонов) в растворе [3, 4]. Управление физико-химическими процессами осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси (температурный режим) в определенном порядке (рис. 1).

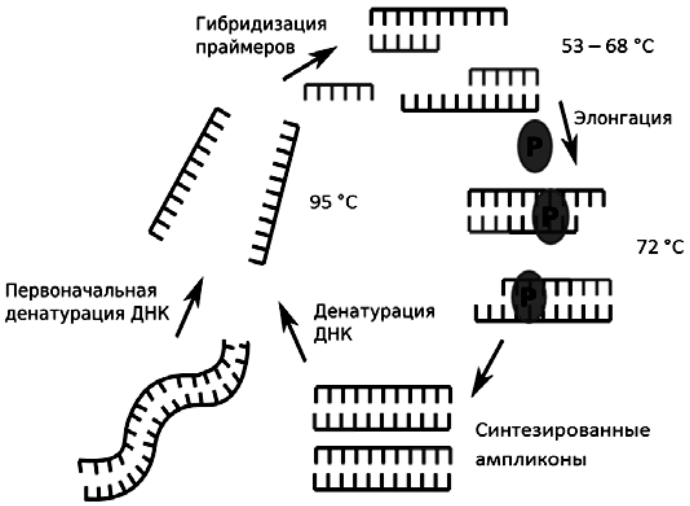


Рис. 1 Схематичное изображение процессов, происходящих при одном температурном цикле ПЦР [3].

При повышении температуры до 94 °C двухцепочечная молекула ДНК диссоциирует на две одноцепочечные (*стадия денатурации*). Полученные нити выступают матрицами для синтеза последующих комплементарных цепочек. При понижении температуры до 53–68 °C (*стадия гибридизации*) к комплементарным

участкам одноцепочечных молекул ДНК присоединяются короткие олигонуклеотиды. Далее температуру реакционной смеси повышают до 72 °С — оптимальной температуры для ферментативного синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности (*стадия элонгации*). В результате одного такого цикла число фрагментов ДНК удваивается (образуются ампликоны), при многократном повторении таких циклов происходит рост их количества в геометрической прогрессии [5].

Одним из главных компонентов, которые необходимы для проведения ПЦР в растворе является ***ДНК-полимераза*** — основной фермент, который осуществляет синтез комплементарной последовательности. и должен сохранять активность после инкубации при 95 °С. Чаще всего в аналитической практике применяют Taq-полимеразу, которую выделяют из термофильной эубактерии Thermus aquaticus. В качестве регулятора среды используют ***реакционный буфер*** (с Mg^{2+}), который создает оптимальные условия для работы полимеразы, так как ионы магния являются коферментом ДНК-полимеразы. Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (**дНТФ**) dATP, dGTP, dCTP, dTTP выступают в качестве «строительного материала» для синтеза комплементарной цепи ДНК. Для ограничения амплифицируемого участка используют ***праймеры*** — короткие олигонуклеотиды, которые присоединяются к ДНК-мишеням на стадии гибридизации и служат своеобразными затравками для начала работы полимеразы. Так как полимераза способна взаимодействовать только с ДНК, использовать такую реакцию для анализа рибонуклеиновых принципиально невозможно.

I.1.1. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (**ОТПЦР**) позволяет использовать в качестве исходных молекул для их многократной амплификации рибонуклеиновые кислоты (**РНК**), что значительно расширяет количество объектов, анализируемых методом ПЦР.

До появления ОТПЦР для количественного анализа РНК широко использовался метод северного блоттинга, который основан на иммунохимическом принципе [6]. Данный метод обладал значительными ограничениями, трудоемкостью, требовал большого количества исходной РНК и был неточным [7]. В настоящее время ОТПЦР повсеместно заменяет блоттинг.

Принцип ОТПЦР (рис. 2) заключается в том, что молекула РНК сначала транскрибируется в кДНК с помощью обратной транскриптазы (ревертазы). После стадии обратной транскрипции полученные молекулы комплементарной ДНК (кДНК) уже могут амплифицироваться с помощью стандартной ПЦР.

Для проведения обратной транскрипции в реакционной смеси также должны присутствовать праймеры в качестве затравки и смесь четырех дНТФ, в качестве строительного материала.

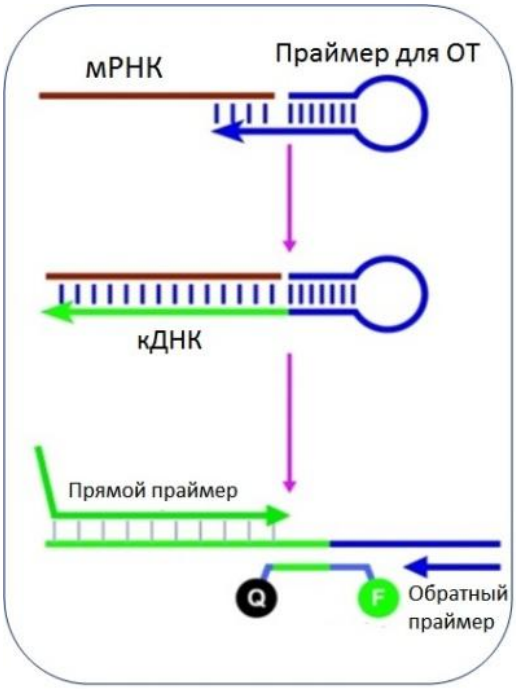


Рис. 2. Принципиальная схема реакция обратной транскрипции.

В аналитической практике используют два подхода для проведения ОТПЦР. Реакция обратной транскрипции проводится либо в отдельной пробирке (двухстадийная ОТПЦР), либо в той же самой пробирке, что и последующая ПЦР (одностадийная ОТПЦР) [8]. Основным преимуществом двухстадийного варианта является возможность сохранения комплементарной ДНК для последующего

использования (клонирования, определения последовательности и т. п.) а также большая точность полученных результатов. Однако при проведении одностадийной ОТПЦР вероятность ошибок экспериментатора существенно снижается, кросс-контаминация и случайный разброс параметров реакции сводятся у минимуму, поскольку обе реакции проходят в одной емкости.

На данный момент ОТПЦР является самым удобным инструментом для исследования и анализа РНК, так как обладает непревзойденными аналитическими характеристиками: высокой чувствительностью и специфичностью, широким диапазоном определяемых концентраций (более 7 порядков), возможностью одновременного количественного и качественного анализа [9]. В настоящее время разработано множество разнообразных ОТПЦР методик для широчайшего круга объектов и аналитических задач: от определения количества дрожжей в вине [10] до анализа вируса гриппа в крови [11].

I.1.2. Методы детектирования продуктов ПЦР

Среди методов детектирования ампликонов, синтезированных в результате ПЦР и ОТПЦР, наиболее распространенными являются метод электрофореза и методы гибридизации продуктов ПЦР с зондами после (методы конечной точки [12]) и в процессе амплификации (режим реального времени [13]).

В основе электрофоретического метода лежит разделение молекул ДНК\РНК по размеру (рис. 3) в пластине агарозного или полиакриламидного геля, содержащего краситель, например бромистый этидий, который встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы нуклеиновой кислоты (**НК**). Пластину геля помещают в аппарат для гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная НК начинает двигаться в геле от отрицательно заряженного электрода к положительно заряженному, при этом более короткие молекулы НК движутся быстрее, чем длинные.

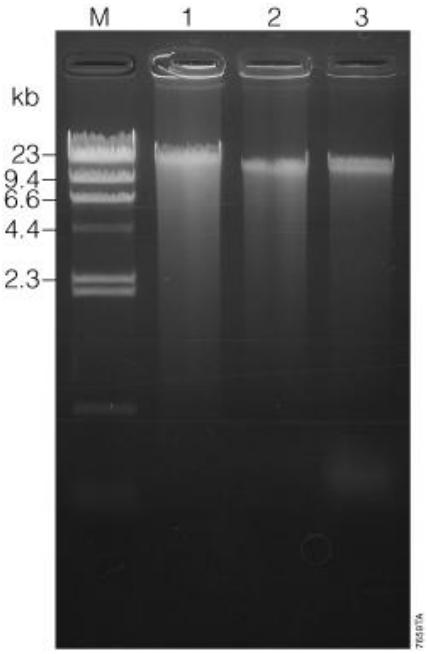


Рис. 3 Пример разделения молекул НК в агарозном геле [9].

Стоит отметить, что данный метод детектирования позволяет осуществлять только качественный ПЦР анализ и обладает такими недостатками, как большие временные затраты, невозможность автоматизации, сложность и субъективность трактовки результатов, а также высокий риск контаминации.

С другой стороны, методика ПЦР в режиме реального времени (**ПЦР РВ**) позволяет количественно определять искомые аналиты благодаря регистрации изменения интенсивности флуоресценции особых зондов. Выделяют две основные группы зондов: неспецифический Сайбер грин (SYBR Green) и специфические TaqMan зонды.

Молекула SYBR Green в процессе связывания с двухцепочечной ДНК начинает флуоресцировать под действием возбуждающего излучения [12], при этом интенсивность флуоресценции растет с накоплением продуктов ПЦР. Следует отметить, что такой краситель также присоединяется к неспецифичным побочным продуктам реакции, таким как праймер–даймер и др., однако это наиболее экономичный и простой в использовании зонд [13].

Специфичность флуоресцентно-меченных зондов обуславливается олигонуклеотидной последовательностью, которая комплементарна участку в молекуле ампликона, поэтому они являются селективными индикаторами именно

на нуклеотидную последовательность амплифицируемого участка ДНК. Taqman зонды представляют собой олигонуклеотиды, которые имеют флуоресцентный зонд, присоединенный к 5' концу и тушитель, присоединенный к 3' концу. Во время амплификации зонд связывается с целевой последовательностью ДНК или кДНК. В результате 5'–нуклеазой активности полимераза расщепляет связь зонд-олигонуклеотид, что приводит к пропорциональному росту флуоресценции [14, 15]. Флуоресценция TaqMan зондов зависит от резонансного переноса энергии (FRET) связывания молекулы красителя и тушителя на олигонуклеотидные субстраты [16]. Правильно подобранные TaqMan зонды обеспечивают очень точные результаты ОТПЦР. В зависимости от строения структуры «краситель–тушитель» выделяют такие типы зондов как «молекулярные маячки» (molecular beacons) [17], «скорпионы» (Scorpion Probes) [18], гибридизационные зонды (Multiplex Probes) [19] и др.

Кроме того, концевые последовательности зонда также представляют собой взаимно комплементарные области, а флуорофор и тушитель присоединяют к концевым нуклеотидам (рис. 4). При температуре отжига свободные зонды образуют *шпильки* за счет наличия комплементарных участков. При этом флуорофор и тушитель оказываются в непосредственной близости, что приводит к тушению флуоресценции.

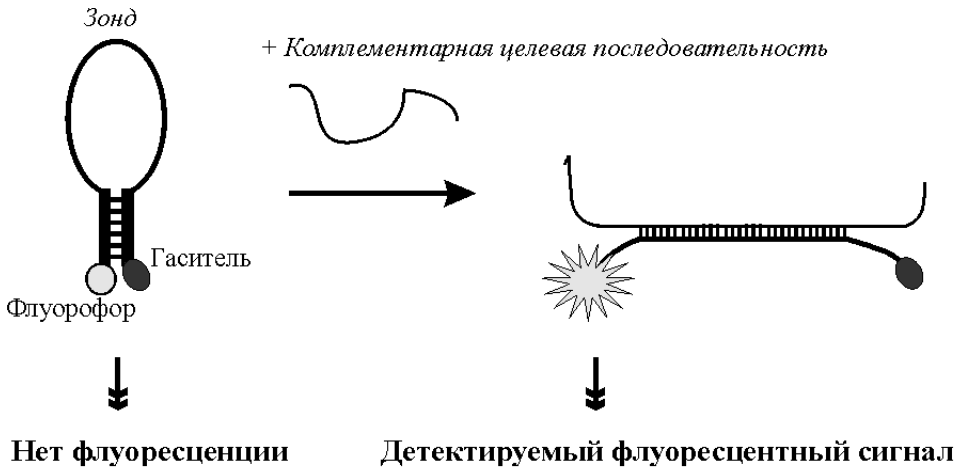


Рис. 4 Принцип действия флуоресцентно-меченного зонда на примере зонда–шпильки [3].

ПЦР РВ позволяет получать количественные данные о содержании ДНК в пробе путем определения порогового цикла по кинетической кривой ПЦР РВ и построения градуировочной зависимости [3]. Величина порогового цикла (**C_t**) определяется как номер цикла, при котором флуоресценция в процессе реакции превышает пороговое значение. Величина C_t обратно пропорциональна логарифму первоначального числа копий ДНК и, таким образом, отражает точку накопления достаточного количества ампликонов. Кинетическая кривая ПЦР в координатах "Уровень флуоресценции — цикл амплификации" имеет сигмоидную форму (рис. 6).

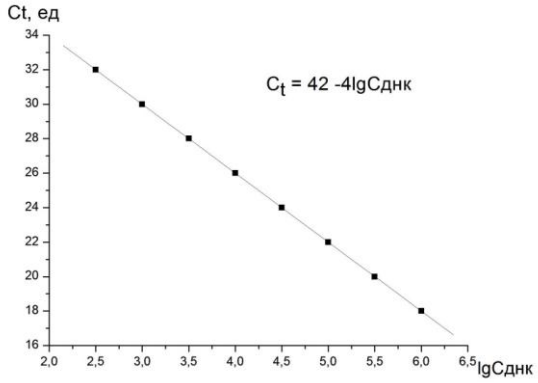


Рис. 5 Зависимость порогового цикла ПЦР от концентрации ДНК.

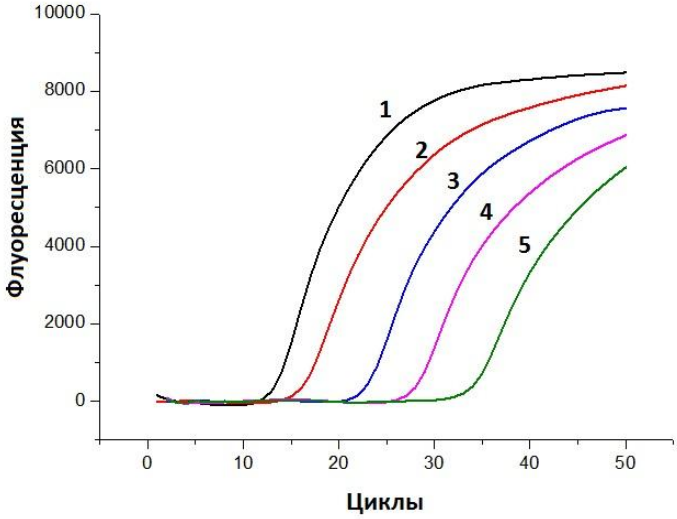


Рис. 6 Кинетические кривые ОТПЦР при различных концентрациях исходной НК. 1 — c_o, 2 — $c_o \times 10^{-1}$, 3 — $c_o \times 10^{-2}$, 4 — $c_o \times 10^{-3}$, 5 — $c_o \times 10^{-4}$.

В ходе ПЦР кривой можно выделить три стадии: *Стадию инициации* (ПЦР-продукты еще не детектируются); *Экспоненциальную стадию*, в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР); *Плато* (стадию насыщения).

Продолжительность эк*споненциальной стадии* зависит от концентрации НК и от качества реагентов. При идеальной реакции с каждой ДНК-мишени в образце за цикл амплифицируются 2 молекулы. На стадии насыщения эффективность амплификации снижается (чаще всего после 40 циклов), что обусловлено образованием веществ, приводящих к расщеплению продуктов амплификации, денатурацией полимеразы или присутствием ингибиторов [20, 21].

Неоспоримым преимуществом режима реального времени по сравнению с электрофоретическим детектированием является возможность проведения количественного анализа и сокращение числа стадий анализа в случае сложных образцов [22]. Однако при этом стоит брать во внимание, что количественная ПЦР РВ требует дополнительного перевода флуоресцентных сигналов в числовую форму, что приводит к спорным результатам в некоторых случаях.

Несмотря на все преимущества и достоинства определения РНК методом ОТПЦР существуют некоторые трудности, связанные с применением данного метода в повседневной аналитической практике. Так, экспоненциальный рост кДНК во время множественных циклов ПЦР значительно снижает линейность сигнала флуоресценции вблизи участка насыщения [23]. Крайняя чувствительность ОТПЦР имеет свои побочные эффекты, так как даже малейшее загрязнение РНК может привести к нежелательным результатам или полному ингибированию реакции [24], поэтому при анализе реальных объектов следует выбирать методики пробоподготовки, которые обеспечивают максимальное очищение пробы перед проведением ОТПЦР. Кроме того, количественный анализ для некоторых образцов представляет серьезную техническую и аналитическую задачу в связи с большим количеством влияющих параметров, таких как

эффективность амплификации и различные матричные эффекты пробы, например наличие в образце высоких концентраций ингибирующих компонентов: липидов, полисахаридов, белков, тяжелых металлов [25].

Повышение аналитических характеристик метода при проведении ПЦР в пластиковых пробирках и планшетах достигло предела в своем развитии, так как существующие анализаторы обладают низкими скоростями термоциклирования 2–5 °C/с [3] и высокой неравномерностью распределения температур внутри реактора, которые ограничивают время проведения ПЦР 0.8–1.5 ч, а также характеризуются высоким расходом реагентов 20–50 мкл, приводящим к высокой стоимости анализа [26, 27]. При этом производительность анализа в таких приборах как правило ограничена 96–384 одновременно регистрируемыми реакциями. Отметим, что 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, быстродействие анализа, правильность и воспроизводимость результатов [4].

I.2. Микрочиповые технологии в аналитической практике и в методе ПЦР

В течение последних десятилетий совершенствование технологий микроэлектромеханических систем (**МЭМС**) привело к появлению миниатюризированных сенсоров и аналитических систем [28, 29, 30]. Технологии МЭМС широко используют для создания миниатюризированных устройств для решения аналитических задач в биологии и медицине [31, 32]. Основным элементом микроаналитической системы является химический микрочип – миниатюрное устройство планарной геометрии, в котором создана разветвлённая сеть микроканалов или микрореакторов, выполненное с применением технологий

МЭМС из различных материалов: стекло, кварц, кремний, керамика, полимеры, а также металлы и их сплавы [30, 28].

Высокие аналитические характеристики микрочиповых систем продемонстрированы для систем анализа, реализующих электрокинетические и хроматографические методы разделения, методы жидкостно–жидкостной и твердофазной экстракции, электрохимические методы, а также биохимические и иммуноферментные методы [33, 34].

Микрочиповые аналитические системы, которые реализуют молекулярно-генетический анализ нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) давно привлекают значительный интерес исследователей [3, 4]. В настоящее время активно разрабатываются новые методы, основанные на применении микрочиповых аналитических систем, которые обладают принципиально новыми преимуществами [27, 35]. К числу таких преимуществ относятся: высокое быстродействие, высокие скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси, низкое потребление дорогостоящих ПЦР-реактивов, проведение ПЦР в «цифровом формате» [36, 37], а также потенциальная возможность интеграции нескольких стадий молекулярно-генетического анализа в едином микрочипе.

Одна из первых микрочиповых аналитических систем с высоким быстродействием ПЦР анализа продемонстрирована в 1993 группой Нортрупа с использованием микрочипа, выполненного из кремния [38].

Благодаря низкой термической массе микрочипов и проб микрочиповые аналитические системы позволяют достичь максимальных скоростей нагрева 175 °C/с и охлаждения 125 °C/с и выполнить 40 циклов ПЦР менее чем за 6 минут [39]. При этом становится возможным сократить расход реактивов до 0.01–1 мкл на реакцию и увеличить производительность до нескольких тысяч одновременно регистрируемых реакций [40].

I.2.1. Особенности использования микрочиповых технологий для проведения ОТПЦР

Внедрение микрочиповых технологий в метод ОТПЦР несколько отличается от подходов к классической ПЦР ввиду дополнительной стадии обратной транскрипции. Так, во многих работах по ОТПЦР в микрофлюидное устройство включены только две стадии процесса – выделение РНК и синтез кДНК. Авторы таких подходов исходили из того, что молекула РНК в гораздо большей степени подвержена деструкции и мешающему влиянию посторонних веществ, таких как РНК-аза и др., которые содержатся в воздухе, поэтому с точки зрения точности и надежности анализа стадия синтеза кДНК из РНК должна проходить в автоматическом режиме в закрытой системе. Так, в работе [41] представлен микрочип для ОТПЦР, который обладает очень высокой чувствительностью и включает в себя экспрессную (1 мин) стадию экстракции РНК из лизата с помощью продольного магнитофореза с использованием магнитных сферических частиц, на поверхности которых иммобилизированы олиго-dT фрагменты. Внутри каналов данного микрочипа под определенным углом к приложенному внешнему магнитному полю внедрен массив ферромагнитных волокон. С помощью боковых смещений результирующего вектора магнитной и гидродинамический сил осуществлялся точный контроль потоков внутри каналов.

Несмотря на сложность объединения всех стадий ОТПЦР в одну платформу, предпринято несколько удачных попыток создать полностью интегрированный чип. В работе [42] предложена схема интегрированного микрофлюидного устройства, которое выполняло очистку нуклеиновых кислот, амплификацию и детектирование методом электрофореза. В работе [43] также удалось совместить все стадии ОТПЦР, в котором пробоподготовка осуществлялась за счет селективного связывания и концентрирования вирусов на поверхности суперпарамагнитных эпоксидных шариков Dynabeads® M-450, покрытых специфичными антителами. С помощью интегрированных микронасосов и

микроклапанов весь процесс выполнялся автоматически, необходимость вмешательства оператора сводилась к минимуму.

Автоматические микрочиповые приборы для проведения ПЦР и ОТПЦР уже покинули исследовательские лаборатории и все шире используются для исследований в рутинной диагностической практике молекулярно-генетического анализа [44, 45, 46]. В работе [47] проведена валидация коммерческой микрочиповой системы VereFlu™ для быстрого обнаружения птичьего гриппа H1N1, а также его типирования (установления штамма вируса). Предложенная методика позволила обнаруживать одновременно пять подтипов вируса, в том числе и высокопатогенный штамм вируса гриппа A (H1N1). Чувствительность и специфичность предложенной методики составила 96.8% и 92.8%, соответственно. Данное устройство давало ответ по истечению 3-х часов, что в несколько десятков раз быстрее классических подходов. Подобная микрочиповая система с микрочипами VereChip применена авторами этой научной группы в работе [46] для анализа 26 тропических болезней в более чем 170 клинических образцах. Пределы обнаружения находились в диапазоне 10^2 – 10^3 ДНК или РНК копий в пробе. Диагностическая чувствительность, которая определяется отношением числа истинно-положительных проб к общему количеству проанализированных проб, включая ложноотрицательные пробы, находилась в диапазоне 83.1–91.3%, а диагностическая специфичность, которая представляет величину отношения истинно-отрицательных проб к общему числу проб, включая ложноположительные — в диапазоне 99.3–100%.

Высокое соотношение площади поверхности к объему ячейки для реакционных камер и каналов ОТПЦР микрочипов приводит к возрастанию влияния взаимодействий между поверхностью и молекулами реакционной смеси на эффективность проведения реакции. Для успешного проведения ПЦР на микрочипе требуется модификация внутренней поверхности реакционной камеры или микроканала [5]. Прежде всего, рабочая поверхность должна быть очищена от загрязнений, в том числе и биологических, которые могут помешать проведению

ПЦР. На сегодняшний день существует большое количество различных способов очистки поверхности. Помимо очистки важно придать поверхности требуемые свойства, такие как гидрофильность, гидрофобность, инертность.

В качестве подложек для микрочипов принято использовать экономичные материалы, которые обладают высокими коэффициентами теплопроводности и легко обрабатываются. Наилучшее сочетание этих характеристик для ПЦР-микрочипов достигнуто для алюминия и кремния [48]. Высокая трудоемкость изготовления микрочипов из кремния накладывает некоторые ограничения на их использование в рутинном анализе, в то время, как алюминиевые подложки могут быть изготовлены достаточно легко. Однако, при использовании алюминия в условиях ПЦР существуют некоторые трудности. Так, алюминий активно вступает в реакцию с ПЦР-буфером (pH 8.3, при 95 °C) по следующей схеме:

$$Al + nOH^- + H_2O \rightarrow [Al(OH)_n]^{3-n} + H_2\uparrow.$$

В процессе реакции образуются газообразные продукты, которые затрудняют детектирование флуоресценции в ячейках микрочипа. Кроме того, появление пузырьков увеличивает риски взаимного смешивания нескольких образцов, что может привести к получению недостоверных результатов анализа.

I.3. Способы модифицирования и пассивации поверхности алюминиевых ОТПЦР микрочипов и методы исследования полученных пленок

I.3.1. Классические методы обработки поверхности алюминиевых изделий

Большинство из известных способов пассивации алюминия несовместимы с дальнейшим применением полученных подложек для ОТПЦР. Так, при химическом травлении [49] поверхность подложки загрязняется и становится рыхлой, вследствие чего микрореакторы прогревались бы неравномерно. Химическая пассивация [50] может повлечь за собой появление в реакционной смеси посторонних ионов переходных металлов, ингибирующих ПЦР, к тому же, травление в растворах, содержащих, например, Cr (III), создает серьезную угрозу

для человеческого здоровья и окружающей среды ввиду токсичности реагентов [51]. Создание пассивирующих пленок на поверхности алюминия путём реакции с модификаторами в жидкой фазе требует применения дорогостоящих реагентов, растворенных в органических растворителях, что значительно снижает технологичность серийного производства [52].

I.3.2. Плазмохимическое осаждение пленок из газовой фазы

Эффективным способом синтеза тонких пленок на поверхности металлов является плазмохимическое осаждение из газовой фазы (**ПХО**, англ. PECVD — Plasma-Enhanced Chemical Vapour Deposition) [53].

Плазменная полимеризация позволяет получать покрытия толщиной порядка десятков и сотен нанометров высокой адгезией к субстрату, низкой растворимостью, высокой термостабильностью. Используя ПХО в качестве мономеров можно использовать даже насыщенные углеводороды. В работах [54, 55, 56] в ходе модификации поверхности алюминия методом ПХО достигнута высокая коррозионная стойкость полученных покрытий.

Плазмохимическое осаждение из газовой фазы обладает рядом преимуществ относительно других методов модификации поверхности. Так, в результате управления широким спектром параметров ПХО можно контролировать состав и микроструктуру пленок. Полученные пленки имеют высокую плотность упаковки (около 98%), что обуславливает их прочность и стабильность. При этом характеристики пленок могут колебаться в зависимости от толщины. Это свойство используется для изготовления оптических устройств, твердых и прочных защитных покрытий, биомедицинских материалов. Немаловажно также отметить, что с помощью ПХО получать покрытия однородной толщины на субстратах различной формы, в том числе и на трехмерных. Метод ПХО обеспечивает высокие скорости осаждения (до 1–10 нм/с и больше), что значительно превосходит другие традиционные вакуумные методы модификации.

I.3.3. Механизмы плазмохимического осаждения

Общий механизм полимеризации в плазме представляется следующим образом. При неупругом соударении электронов с молекулами возникает возбуждение электронных уровней, что приводит к частичной диссоциации молекул на осколки (ионы и радикалы), которые могут вступать в реакцию друг с другом или с молекулами исходного вещества.

Распределение электронов по энергиям приводит к тому, что в молекулах сложных органических веществ уже при первичном акте взаимодействия возбуждаются различные электронные состояния, в результате чего образуются разнообразные осколки диссоциации. Кроме того, высокие давления в ближней зоне разряда способствуют протеканию вторичных процессов в газовой фазе, например, органические молекулы могут распадаться под действием свободных радикалов и реагировать с атомами водорода, которые образуются в результате первичных реакций.

Скорость образования твердых полимеров на поверхности в значительной степени определяется соотношением числа атомов углерода и водорода в исходных соединениях. Максимальная скорость образования полимеров характерна для ароматических соединений и почти на порядок превышает скорость образования полимеров для углеводородов алифатического ряда.

Полимеризация в плазме может протекать как в объеме камеры, так и на поверхности (рис. 7).

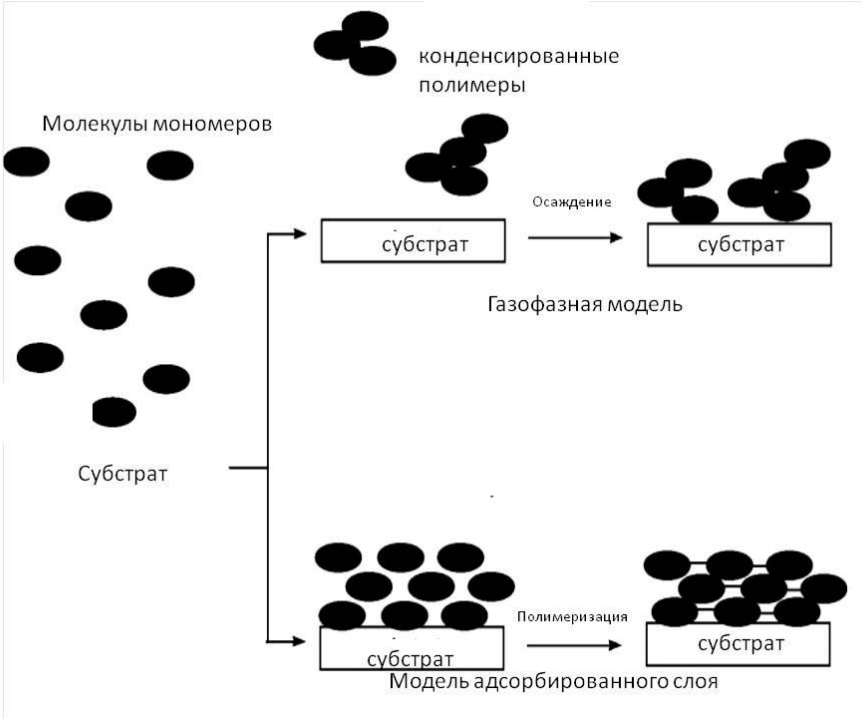


Рис. 7. Схема процессов, описывающих плазмохимическое осаждение из газовой фазы [54].

Полимерные соединения, образующиеся при объемной полимеризации и отлагающиеся на электродах или стенках реактора, являются, как правило, порошкообразными веществами с большой пористостью и слабой адгезией к поверхности. При полимеризации на поверхности удается получать плотные пленки, обладающие хорошими диэлектрическими свойствами и адгезией.

В условиях ПХО в камере синтеза параллельно протекают следующие физико-химические процессы:

•радикальная полимеризация, при которой из радикалов, продуцируемых в плазме, формируется регулярная структура полимера (линейного или разветвленного);

•ионная цепная полимеризация (катионная, анионная), в процессе которой происходит образование разветвленных/линейных полимеров;

•фрагментация и рекомбинация при условиях большого избытка энергии, что приводит к образованию олигомеров и «полимеров» нерегулярной структуры с высокой концентрацией радикалов и нежелательного кислорода, а также с

высокой степенью ненасыщенности; в этом случае могут образовываться также промежуточные продукты, сходные с обычными полимерами;

•сшивание полимерных цепей в результате рекомбинации радикалов, а также под воздействием УФ-излучения плазмы [57].

I.3.4. Основные реакции ПХО, используемые для модификации поверхности алюминия

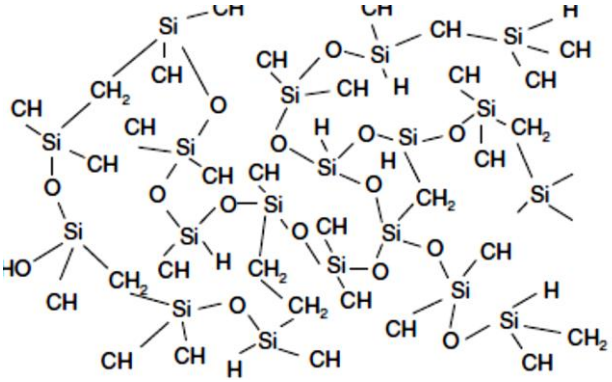
Основные мономеры ПХО, которые чаще всего используют для модификации поверхности алюминия, можно условно разделить на два больших класса: кремний-органические соединения и разнообразные углеводороды.

В работе [58] впервые подтверждается точный механизм ПХО при использовании в качестве мономера гексаметилдисилоксана (**ГМДС**). В низкотемпературной плазме ГМДС одновременно происходит два конкурирующих процесса, а именно:

а) газофазная реакция разложения ГМДС с образованием аморфного диоксида кремния:

$$(CH_3)_3–Si–O–Si–(CH_3)_3 \rightarrow 12O_2 + 2SiO_2 + 6CO_2 + 9H_2O;$$

б) рекомбинация радикалов в плазме ГМДС, в результате которой на поверхности образуются разветвленные структуры:



При использовании в качестве мономеров углеводородов (в методе ПХО применяют такие нетрадиционные мономеры, например, алканы) рост слабо

структурированной пленки происходит на центрах роста – свободных химических связях, вызванных разрывом связей С–Н и С–С. Необходимая для этого энергия выделяется в результате рекомбинации положительных ионов, приходящих из плазмы, с электронами подложки [59].

Во многих реакциях ПХО ключевым промежуточным продуктом считается ацетилен. Так, в процессе ПХО возможны следующие реакции с данным мономером:

- реакция замещения при сохранении тройной связи:

$$\mathbf{HC{\equiv}CH + X_2 \rightarrow XC{\equiv}CX,}$$

- реакция присоединения водорода:

$$\mathbf{HC{\equiv}CH + H_2 \rightarrow H_2C{=}CH_2,}$$

- реакция тримеризации:

$$\mathbf{3\ HC{\equiv}CH \rightarrow C_6H_6,}$$

- реакция полимеризации с участием тройной связи:

$$\mathbf{n\ HC{\equiv}CH \rightarrow {-}(HC{=}CH)_n{-}}$$

Наиболее вероятный механизм образования полимера из органических мономеров, включая ацетилен, может быть представлен в виде последовательного ступенчатого образования реакционноспособных соединений (рис. 8).

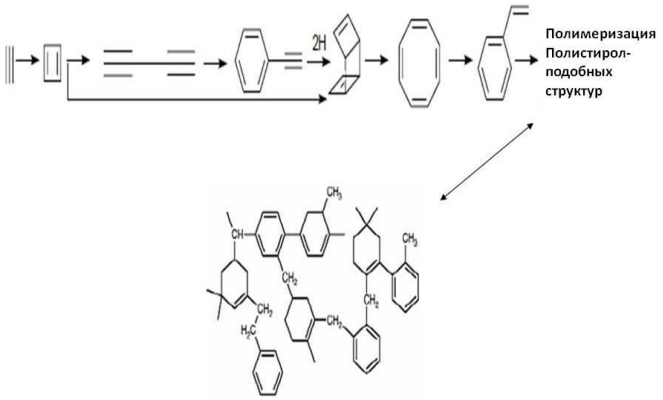


Рис 8. Механизм образования разветвленного полимера в процессе ПХО ненасыщенных углеводородов [60].

В работе [60] Ясуда предположил, что при высоких напряжениях в механизме роста пленки преобладают радикалы состава C_4H_3•, C_6H_3• и C_2H•, и осаждение представляет собой как газофазный, так и поверхностный процесс, где ионная бомбардировка обеспечивает сшивание, обуславливающее твердость и инертность пленок.

I.3.5. Электрохимическая импедансная спектроскопия для оценки инертности пленок на поверхности металлов

Электрохимическая импедансная спектроскопия (**ЭИС**) широко применяется для исследования разнообразных покрытий **[**61] и определения таких важных характеристик, как количество воды, которая проникла в поры пленки, мера набухания покрытия, потеря адгезии, коррозия и т.д.

Известно, что диэлектрическая проницаемость органических покрытий, как правило, небольшая — на порядок меньше, чем у воды (ε = 80 при комнатной температуре). По этой причине адсорбция даже небольшого количества воды может значительно влиять на емкость пленки.

Емкость органического покрытия может быть рассчитана из следующей формулы:

$$C = \varepsilon\varepsilon_0 \frac{S}{d}$$

Где ε — диэлектрическая проницаемость покрытия (ф/м), ε_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума (ф/м), d — толщина диэлектрика (см), s — площадь поверхности (см^2).

Процесс адсорбции/проникновения воды начинается с погружения пленки в воду, что приводит к быстрому росту емкости пленки (этап 1), далее наблюдается насыщение в виде приближения к плато, где емкость остается постоянной (этап 2). Если же за этим следует дальнейшее увеличение емкости (этап 3), то

происходит накопление воды, обычное для системы полимер–металл, приводящее к потере адгезии и, возможно, коррозии (рис. 9).

Рис. 9. График зависимости проницаемости покрытия от времени обработки жидкостью, иллюстрирующий эффект постепенного проникновения воды в поры покрытия [61].

Период времени, по истечении которого наступает этап 3, как правило, связан с толщиной покрытия, электролитическими условиями и силой адгезии.

Данные ЭИС, полученные на низких частотах, показывают значительное изменение чувствительности к изменению отношения сопротивление/фазовый угол в связи с поглощением воды (рис. 10).

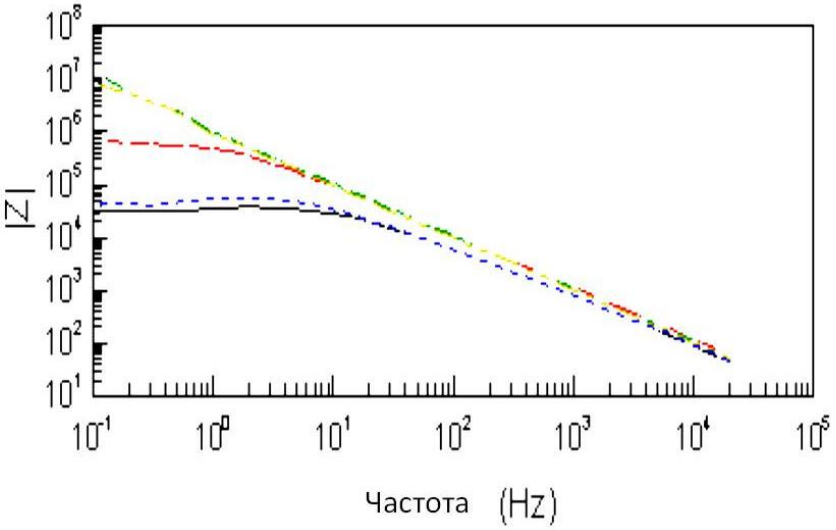


Рис 10. График зависимости модуля импеданса от частоты для серии из пяти одинаковых по составу пленок различной толщины при воздействии солевого раствора.

Анализируя участок низкочастотной области спектра, можно предположить, какие пленки обеспечат наиболее эффективную защиту от коррозии (чем выше значение импеданса на низкой частоте, тем более эффективно покрытие). В примере на рис. 10 для образцов без видимой коррозии и потери адгезии импеданс остается на уровне около 10^7 Ом при 0.1 Гц.

Для проведения анализа покрытий методом ЭИС на электрод при заданном потенциале, накладывают синусоидальное напряжение с амплитудой 5–10 мВ. Предполагается, что при малых амплитудах переменного напряжения возникающий в системе переменный ток также имеет синусоидальную форму и ту же частоту, что и приложенное переменное напряжение. Общее сопротивление электрической цепи такому току называют импедансом. Откликом системы является импедансный спектр, обычно представляемый в виде графической зависимости действительной (Z_{Re}) и мнимой (Z_{Im}) составляющих импеданса электрода от частоты накладываемого переменного потенциала в комплексных координатах $-iZ_{Im}(Z_{Re})$. Использование небольшой амплитуды переменного напряжения дает возможность теоретической интерпретации отклика через линеаризованную зависимость тока от потенциала, что ведет к значительному упрощению моделирования процессов диффузии и кинетики переноса заряда.

Моделирование эквивалентной схемы [62] является стандартным инструментом для интерпретации данных импеданса. Цепи, которые используются для моделирования данных, как правило, состоят из сопротивления электролита/раствора, R_s, последовательно соединенного с емкостью покрытия, C_c в свою очередь, параллельно соединенного с R_p, сопротивлением пор (рис. 11, а). Z_w (импеданс Варбурга, описывающий диффузию реагирующих частиц к электроду и отвод продуктов реакции от электрода в раствор) описывает электрохимические процессы, протекающие на границе раздела покрытие–металл. Его часто представляют как C_{dl} (емкость двойного электрического слоя **ДЭС**), параллельно соединенную с R_{ct} (сопротивление переносу заряда) при коррозии

металла с покрытием (рис. 11, б). Эта модель применима для самых разных систем, где рассматриваются макродефекты покрытия. Емкость покрытия C_c, как правило, изображается как функция времени его нахождения в растворе и увеличивается с поглощением воды покрытием. Емкость ДЭС, C_{dl}, пропорциональна площади контакта покрытия с раствором. На это, в свою очередь, влияет шероховатость покрытия, и можно легко выполнить точное измерение данного морфологического параметра при помощи ЭИС, получая информацию о расслаивании покрытия. Сопротивление пор R_p относится к диффузии электролита через поры покрытия, что может влиять на его барьерные свойства; параметр R_p обратно пропорционален площади поверхностных дефектов (пор).

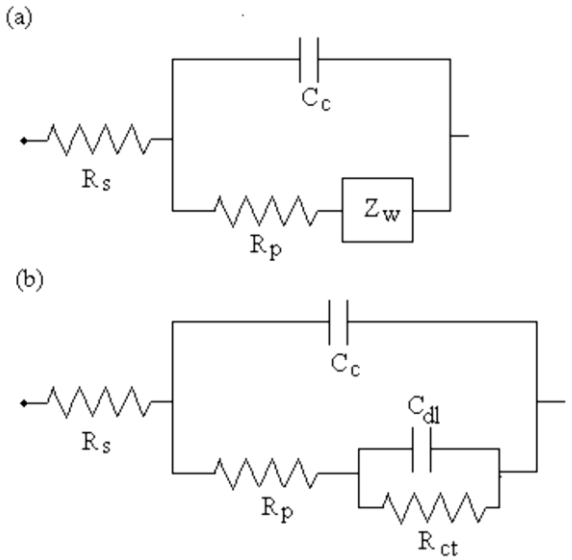


Рис. 11. Эквивалентная схема, описывающая вклад в электрохимический импеданс в системе «покрытие –раствор» : а – упрощенная модель; б – модель, описывающая покрытие с макродефектами.

Данные об импедансе можно представить двумя способами: в виде спектров Найквиста: $-Z_{im}$ как функцию Z_{re}; или спектров Боде: log |Z| как функцию log ν.

В случае, если существует большое различие времен релаксации различных электродных процессов, как в случае анализа тонких пленок, полный спектр импеданса показывает различные частотные области, соответствующие каждому из них. В пределе высоких частот (10 кГц и выше) основной вклад вносит

сопротивление раствора электролита, R_s. В области несколько меньших частот импеданс обусловлен процессом на поверхности пленки [63]. Данные низких частот (0.01–10 Гц) показывают значительную чувствительность к изменениям сопротивления в связи с поглощением воды. Очевидно, что разные толщины покрытия будет значительно влиять на эффективность покрытия в агрессивной среде. Анализ низкочастотной области спектра Боде указывает, какие пленки обеспечивают наиболее эффективную защиту. В работе [61] величина модуля импеданса для образцов, не подвергшихся коррозии находится в пределах 10^7 Ом при 0.1 Гц.

Измерения проводятся в широком диапазоне частот (обычно от 100 кГц до 10 МГц) и амплитудой сигнала напряжения в диапазоне 5 до 50 мВ. Следует поддерживать постоянную температуру, так как она достаточно сильно влияет на кинетику коррозии [64]. Трехэлектродную ячейку, заполняют электролитом и подключают к потенциостату с частотным анализатором; (рис. 12). Исследуемый образец используется в качестве рабочего электрода, платиновый электрод выступает вспомогательным, а в качестве электрода сравнения используют хлорсеребряный электрод.

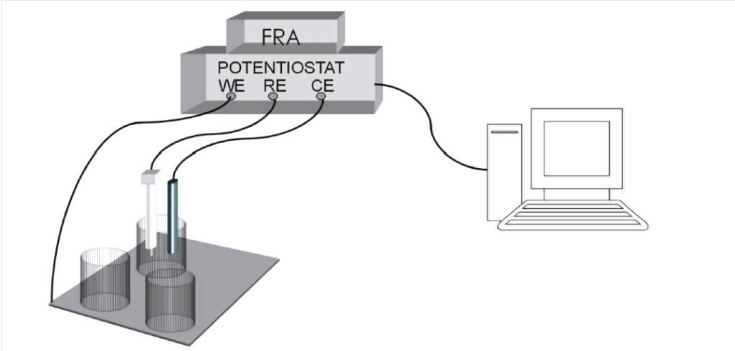


Рис. 12. Схема измерения сигнала в ЭИС [61].

I.3.6. Исследование морфологической структуры пленок методом сканирующей электронной микроскопии с последующим рентгеноспектральным микроанализом

В различных исследованиях связь морфологических свойств углеродсодержащих пленок со структурой [65] или коррозионной стойкостью [66] описывается при помощи сканирующей электронной микроскопии.

Сканирующая электронная микроскопия (**СЭМ**) – метод анализа поверхностной структуры микрообъекта путем анализа отраженного «электронного изображения». В растровых электронных микроскопах электронный луч, сжатый магнитными линзами в тонкий (1–10 нм) зонд, сканирует поверхность образца, формируя на ней растр из нескольких тысяч параллельных линий. Возникающие при электронной бомбардировке поверхности вторичные излучения регистрируются различными детекторами и преобразуются в изображение. Основной режим работы электронного микроскопа – регистрация вторичных электронов. Поскольку интенсивность эмиссии таких электронов сильно зависит от угла падения электронного луча на поверхность, получаемое изображение весьма близко к обычному макроскопическому изображению рельефа объекта, освещаемого со всех сторон рассеянным светом; иначе говоря, формируется топографический контраст. Контрастность изображения сложным образом связана с углом падения электронного пучка, количеством вторичных электронов, геометрическим положением детектора и усилителя и т.д. Тонкопленочные образцы (до 1 мкм) просвечиваются электронным лучом насквозь, и прошедшие электроны регистрируются детектором, расположенным под объектом.

Кроме исследования морфологии поверхности, аналитические возможности современных микроскопов расширены дополнительными приставками для рентгеновского микроанализа, что позволяет выполнять количественную оценку элементного состава даже нестехиометрических соединений с выбором

анализируемой области: в точке, по площади, либо по линии (с заданным шагом получения спектров) получать карты распределения элементов по площади и профили вдоль заданной линии [67, 68].

I.3.7. Оценка структуры покрытий методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)

Комбинационное рассеяние света (**КРС**) широко используется как один из наиболее информативных методов диагностики различных форм углерода. Углеродсодержащие пленки обычно характеризуют, используя два основных пика спектра: D (disorder) — пик при 1350 см $^{-1}$ и G (graphite) — пик при 1580 см $^{-1}$, которые соответствуют пульсационному колебанию ароматических колец и валентным колебаниям в sp^2-кластерах в ароматических кольцах или олефиновых цепях (рис. 13) [69, 70].

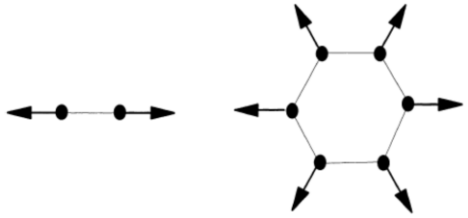


Рис. 13. Валентные и пульсационные колебания связей C–C для sp^2-углерода.

Параметры спектров КРС, такие как положение, ширины и интенсивности D- и G-пика, тесно связаны с плотностью, размером и структурой sp^2-кластеров. Эти свойства sp^2-кластеров, в свою очередь обуславливаются наличием sp^3-углерода, что позволяет измерить его содержание. Появление водорода в составе покрытия приводит к разделению sp^3-связей на C–C и C–H связи, и это меняет характер связи между содержанием sp^3-углерода и конфигурацией sp^2-кластеров. В целом, корреляция между содержанием sp^3 и параметрами КРС может демонстрировать значительный разброс для углеродсодержащих покрытий с различным

содержанием водорода [70], поэтому, в большинстве случаев целесообразно рассматривать общее содержание sp^3-углерода.

В работе [71] подчеркивается тот факт, что скорость нанесения покрытий за определенны промежуток времени пропорциональна интенсивности полос КРС-спектров, и можно использовать эту связь для оценки толщины пленок.

I.4. Иммобилизация ПЦР реактивов на поверхности пробирок и микрофлюидных устройств

Несмотря на всевозможные преимущества проведения ОТПЦР в микрочиповом формате существуют некоторые аспекты, которые затрудняют использование данного метода в повседневной аналитической практике, например: необходимость приготовления растворов ПЦР-реактивов, а также специальные условия для их хранения (некоторые реактивы требуют хранения при –20 °C и могут терять реакционную способность при многократном размораживании); сложный ввод большого числа реагентов, которые необходимо смешивать непосредственно перед началом анализа, с последующим вводом реакционной смеси в микрореакторы. Большое количество таких операций при подготовке образцов увеличивает риск ошибки оператора, а также затрудняет проведение анализа в полевых условиях.

Для того чтобы еще больше повысить производительность и надежность микрочиповых ОТПЦР систем, в последнее время стал распространяться подход к разработке лиофилизированных ПЦР-реагентов в микрореакторах или каналах микрочипа. Таким образом, вероятность ошибки оператора или кросс-контаминации образцов (загрязнение отрицательного образца положительным образцом, приводящие к ложноположительным результатам) сводится к минимуму. В работе [72] предложен автономный одноразовый поликарбонатный микрофлюидный картридж, для обнаружения нуклеиновых кислот. Такая система

могла работать полностью автоматически за счет того, что все жидкости и сухие реагенты, необходимые для реакций предварительно помещены в кассету.

I.4.1. Лиофилизация как метод сушки биологически активных веществ: принцип, преимущества и недостатки

Существует большое количество подходов к высушиванию реагентов, например высушивание на воздухе при обычной температуре, при низкой температуре под уменьшенным давлением, высушивание в атмосфере инертного газа и т.д. Наиболее важным методом, который используют для подготовки термолабильных веществ, является лиофилизация. За счет отсутствия воздействия высоких температур на препарат, сохранения дисперсной фазы препарата и возможности использования летучих растворителей метод лиофилизации позволяет получать сухие ткани, препараты, продукты и т. п. без потери их структурной целостности и биологической активности.

Процесс лиофилизации основан на сублимации. В случае биологических препаратов основным растворителем для лиофилизируемых веществ выступает вода [73]. Согласно фазовой диаграмме (рис. 14), для того, чтобы перевести воду из твердого состояния в газообразное, необходимо, поддерживая давление ниже 0.06 атм. не поднимать температуру выше 0 °С. Такие условия являются граничным для лиофилизации водных растворов биологических веществ.

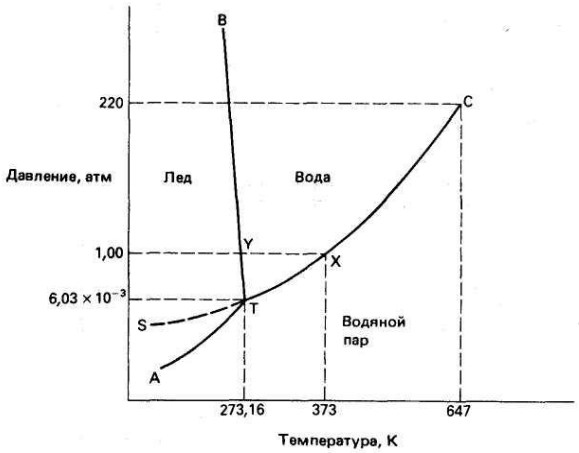


Рис. 14 Фазовая диаграмма воды [115].

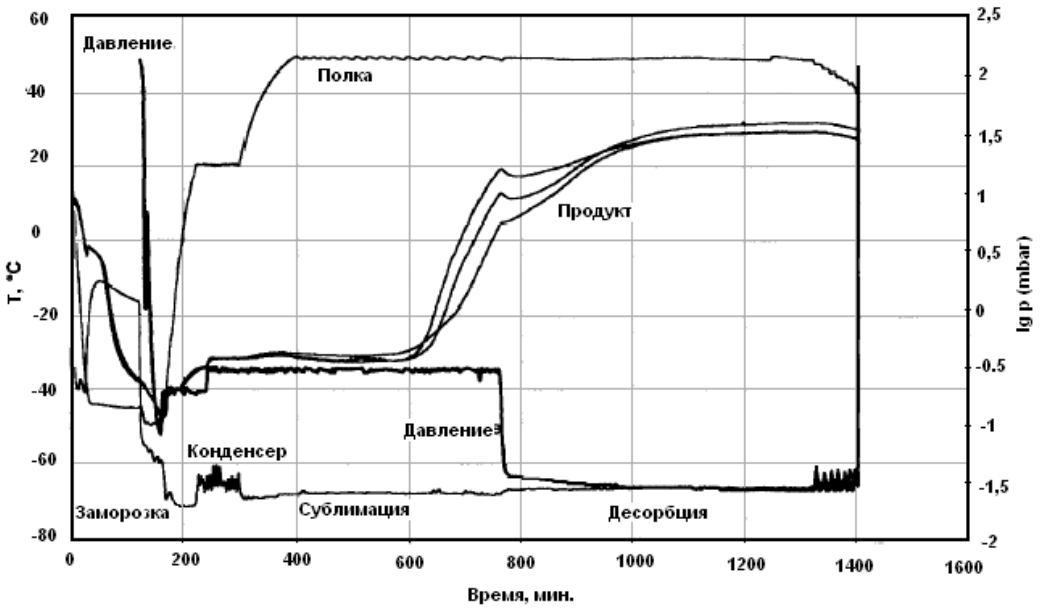


Рис. 15. Диаграмма полного цикла лиофилизации, включающего первичную и вторичную сушку. На графике указаны температуры стационарных участков и самого лиофилизирумого материала, а также давление в рабочей камере [115].

Лиофилизация (рис. 15) состоит из трех последовательных стадий, а именно предварительного замораживания препарата, первичного высушивания и досушивания.

На этапе *заморозки* происходит замораживание материала. В лабораториях замораживание производят в смесях льда с солью, сухого льда со спиртом или ацетоном, в жидком азоте; в промышленности используют низкотемпературные холодильные шкафы. На этом этапе очень важно, чтобы охлаждение материала происходило ниже эвтектической точки. Это условие гарантирует, что в следующем шаге будет происходить сублимация растворителя, а не его плавление.

Во время этапа *первичной сушки* давление снижается (в диапазоне нескольких миллибар), и к материалу поступает достаточно тепла для сублимации воды. В процессе этого начального этапа сушки удается сублимировать большее количество воды (около 95%).

Этап *вторичной сушки* нацелен на то, чтобы удалить связанные молекулы воды и регулируется изотермой адсорбции материала. В этой фазе температура поднимается выше, чем на этапе первичной сушки, вследствие чего нарушаются физико-химические взаимодействия между молекулами воды и замороженными веществами. В отдельных случаях на этой стадии применяют специальные химические поглотители (P_2O_5) и высоковакуумные диффузионные насосы в дополнение к насосам и поглотителям, используемым на стадии удаления свободной воды. В конце операции, окончательное остаточное содержание воды в продукте составляет от 1% до 4%, что является чрезвычайно низким показателем [74]. Полученный лиофилизат крайне гигроскопичен, и требует дополнительной защиты от влаги, кислорода воздуха и света (в случае наличия чувствительных компонентов) [75].

Лиофилизация имеет свои преимущества и недостатки, но на данный момент это наиболее популярный метод сушки биологических веществ. Наиболее важным аспектом лиофилизации применительно к ПЦР-компонентам является эффективное сохранение стабильности белков, за счет подавления таких процессов, как гидролиз пептидной связи, дезаминирование. Более того, в лиофилизате резко снижается активность микроорганизмов, которые могут привести к деградации препарата [76].

Отметим, что для растворения высушенных препаратов требуется небольшое количество времени, так как в процессе испарения на поверхности лиофилизата остаются микропоры, возникающие при сублимации кристалликов льда. Метод лиофилизации выгоден и с экономической точки зрения, так как хранение и трансфер высушенных материалов дешевле, чем их растворенной формы [77]. Кроме того, лиофилизация приносит меньше вреда веществам, чем другие методы удаления воды, использующие повышенные температуры.

К слабой стороне метода причисляют риск испарения летучих компонентов под высоким вакуумом, необходимость использования насоса для создания вакуума. Стоит отметить, что быстрое зарождение и рост кристалликов льда в

результате переохлаждения ведет к образованию большой ледяной поверхности, которая способна взаимодействовать с белками, что может привести к денатурации. Удаление гидратной оболочки белков в процессе сушки в отсутствии стабилизаторов может привести к дестабилизации структуры белка [78], поэтому для лиофилизации некоторых биологически-активных компонентов требуется разработка специальных добавок [79]. Одним из самых чувствительных и сложных компонентов ОТПЦР является именно фермент, поэтому стоит рассмотреть отдельно особенности лиофилизации белков.

I.4.2. Основные особенности лиофилизации белков

Теоретические аспекты лиофилизации в случае белков довольно сложны. Когда подобная белку биологическая субстанция находится в водном растворе, ее молекулы окружены гидратной оболочкой. Подобная оболочка стабилизирует белок и способствует сохранению его активности [78]. В процессе сублимации воды, активные группы белка, обычно прикрытые молекулами воды, открываются и могут химически взаимодействовать друг с другом, таким образом, формируя новые пептидные связи, которые способны исказить нативную структуру белка и привести к сшивке и агрегации белков [80]. Поскольку биологически активными являются именно третичные конформации белков, искажение структуры может послужить причиной потери активности в процессе сушки [81].

Низкая температура первого этапа лиофилизации помогает свести нежелательные реакции между активными группами аминокислот к минимуму, лишая их необходимой для реакций энергии. При этом замороженное состояние белка имеет меньшую стерическую свободу, по сравнению с раствором, что уменьшает склонность к конформационным изменениям.

Кроме взаимодействий, приводящих к образованию пептидных связей, лиофилизаты, содержащие низкий процент остаточной воды, все еще могут подвергаться инактивирующим химическим реакциям, протекающим в

присутствии воды и часто должны храниться в морозильной камере, что является необходимым условием для сохранения их активности [82]. Более того, некоторые белки полностью инактивируются в процессе лиофилизации [83]. По этим причинам при высушивании биологически активных веществ, в частности белков, в лиофильную смесь необходимо вводить стабилизирующие агенты.

Лиофильные стабилизаторы – это добавки, предотвращающие или затормаживающие потерю активности белка в процессе лиофилизации. В качестве таких добавок используют разнообразные вещества, чаще всего полисахариды, аминокислоты, полиолы и соли. Некоторые из приведенных веществ способны увеличивать сроки хранения практически полностью высушенных ферментов при комнатной температуре до нескольких месяцев и дольше. Однако эффективность той или иной предполагаемой добавки зависит от химического состава биологически активного вещества. В случае белков влияние оказывают последовательность аминокислот, его вторичная, третичная и четвертичная структуры [84]. Таким образом, защитная функция конкретных стабилизаторов для конкретных белков не всегда является предсказуемой. Кроме того, влияние на стабильность веществ и время их хранения оказывают также буферный раствор, скорость замораживания, давление, температура в начале, в процессе и в конце процедуры лиофилизации, а также ее продолжительность [85]. Часто эффективная стабилизация одного фермента, осуществляемая композицией стабилизаторов, не подходит для другого. Как результат, большинство коммерчески доступных лиофилизированных препаратов содержат один фермент и стабилизаторы, сохраняющие его активность.

Существуют два предположительных механизма, благодаря которым лиофильные добавки стабилизируют белок в аморфном состоянии:

1) *Гипотеза замены воды.*

Данная гипотеза объясняет осуществление стабилизации за счет сохранения нативной структуры белка в сухом состоянии благодаря образованию водородных связей между стабилизатором и белком. Нативная конформация

термодинамически более стабильна и, следовательно, более устойчива к деградации во время хранения. Стабилизация в результате поддержания нативной структуры предлагает термодинамическое объяснение механизма стабилизации [86, 87].

Доказательства этой гипотезы, основанные на результатах ИК-Фурье-спектроскопии [88], показывают, что отсутствие стабилизатора ведет к существованию двух структур: альфа-спирали и бета-складчатой структуры, при этом альфа-спираль частично переходит в бета-структуру, в которой между пептидными группами также существует водородная связь, но в отличие от а-спирали, эти группы удалены друг от друга гораздо дальше. В присутствии же стабилизатора, равновесие смещено в сторону наиболее стабильной структуры, то есть альфа-спирали [89].

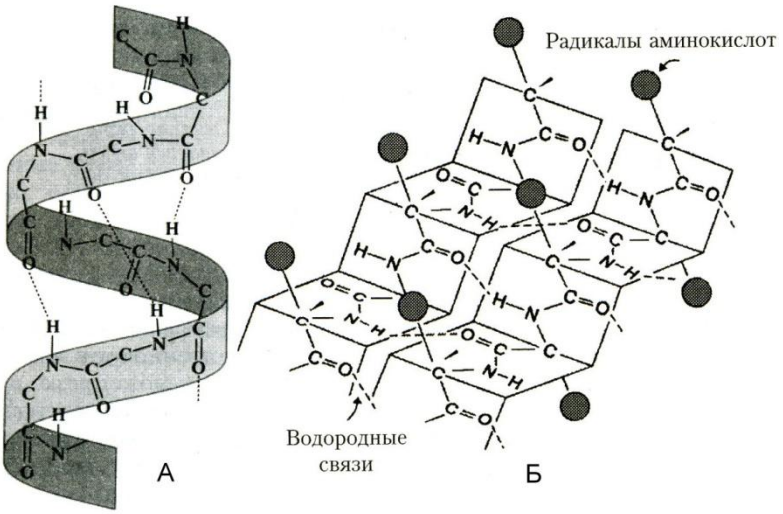


Рис. 16. Трехмерная структура белка: А – альфа-спираль, Б – бета-складчатая структура [3].

2) Гипотеза стеклообразования.

В соответствии с этой гипотезой, стабилизация белков обеспечивается за счет иммобилизации молекул в твердом состоянии, тем самым подавляются перемещения, происходящие в основном из-за поступательных и вращательных колебаний конформации белка. Это приводит к кинетическому замедлению диффузии молекул, которые способны привести к деградации белка [90, 91].

Таким образом, эта теория предлагает объяснение стабилизации с точки зрения кинетики.

Существуют различные исследования, анализирующие правомерность каждой из этих гипотез. Некоторые авторы находят более удачным прогнозируемость стабильности при хранении исходя из сохранения нативной структуры [92, 93], в то время как другие нашли лучшую корреляцию с молекулярной подвижностью [94, 95]. Yoshioka с соавт., к примеру, обнаружил вклад обоих факторов: как кинетического, так и термодинамического [96].

I.4.3. Основные стабилизаторы для ПЦР компонентов

Как отмечалось выше, своеобразными криопротекторами для стабилизации биологически активных молекул чаще всего выступают сахариды [97], особенно невосстанавливающие дисахариды, а также водорастворимые полимеры, имеющие электроположительные или электроотрицательные группы, способные к образованию водородных связей с ферментами. В случае со стабилизацией полимеразы и ревертазы особенное внимание исследователей привлекает трегалоза и поливинилпирролидон (**ПВП**) [98]. В табл. 1 представлены основные стабилизаторы, а также их главные функции. Так, ПВП является динамическим пассиватором и проявляет стабилизирующее действие посредством неспецифических взаимодействий между ферментом и полимером в ходе динамического растворения. Таким образом, ПВП отделяет фермент от окружающей среды, в том числе от поверхности алюминия, препятствуя, таким образом, ее отрицательному воздействию.

Добавление сахаридов в лиофильную систему позволяет защитить ферменты от потери активности [99], химической [100] и тепловой денатурации [101, 102]. Отметим, что присутствие сахаридов (в т.ч. дисахаридов) ингибирует агрегацию белков и ускоряет восстановление их активности после регидратации [103].

Таблица 1. Основные компоненты раствора стабилизаторов

Стабилизатор	Формула	Основная Функция
ПВП		динамический пассиватор
Трегалоза		защита функцианальных групп
Tween-20		Диспергатор

Одним из самых распространенных дисахаридов, который используют в качестве стабилизатора является *трегалоза* — невосстанавливающий дисахарид, в котором две единицы глюкозы связаны α,α-1,1-гликозидной связью. В работах [104,102] показано, что трегалоза может защитить белки и клеточные мембраны от денатурации, вызванной различными стрессовыми состояниями, в том числе высыханием, обезвоживанием, повышенными или пониженными температурами и окислением. Трегалоза обладает наилучшей эффективностью среди дисахаридов, так как защищает функциональные группы и сохраняет третичную структуру белка в процессе сушки через образование водородных связей [105]. Кроме того, защитные свойства трегалозы при лиофилизации можно объяснить ее высокой температурой стеклования (чем выше Tg, тем выше стабильность высушенной матрицы при возрастании температуры) [106]. В частности, безводная трегалоза имеет Tg = 110 °C, сохраняя высокую вязкость при высоких температурах [107].

В последнее время в качестве стабилизатора стали использовать бычий сывороточный альбумин (**БСА**) — белок плазмы крови крупного рогатого скота,

молекулы которого состоят из одинарной аминокислотной цепочки, содержащей 582 аминокислотных остатка. Основная функция данного стабилизатора заключается в стабилизации определенных ферментов и предотвращения их адгезии к стенкам сосудов в результате конкурентной сорбции [108], а также для облегчения растворения белков при их регидратации.

Кроме вышеперечисленных стабилизаторов в качестве дополнительных компонентов в лиофильных смесях часто используют поверхностно-активные вещества (**ПАВ**) благодаря их способности к образованию мицелл с гидрофобной частью внутри мицеллы и гидрофильными группами в наружной (рис. 17) [109]. Среди многих разновидностей ПАВ большой интерес с точки зрения стабилизации лиофильных смесей привлекают неионогенные ПАВ, которые отличаются от ионных тем, что их головная группа не заряжена и гидрофильна. Такие вещества считаются мягкими поверхностно-активными веществами, так как они разрушают белково-липидные и межлипидные, но не межбелковые взаимодействия и большинство из них не вызывает денатурации белков. Таким образом, белки могут быть растворены в своей естественной и биологически активной форме с сохранением белковых взаимодействий [110].

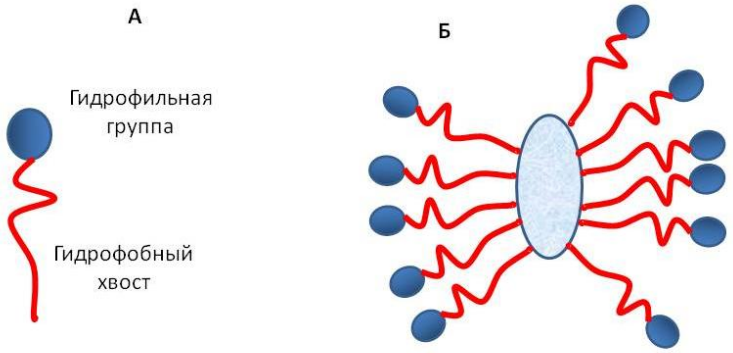


Рис.17 А — Схематическое изображение ПАВ и В — мицелла, образованная ПАВ и белком.

Так, в работах [111, 112], посвященных ПЦР широко используют *Tween-20,* который относится к полисорбатным ПАВ, состоящим из эфира жирной кислоты и длинной полиоксиэтиленовой цепи. В основном, этот неионогенный ПАВ

используется в качестве смачивателя, диспергатора и солюбилизатора (растворителя) белков.

I.4.4. Особенности применения метода лиофилизации для ПЦР реактивов

Лиофилизация ПЦР-реагентов позволяет избежать сложностей, связанных с их хранением. Кроме того, помимо сушки отдельных компонентов [113] возможно совместное хранение всех ПЦР реактивов, за исключением буферного раствора [114], что упрощает процесс ввода проб и уменьшает риск ложноположительных результатов, которые могут быть вызваны внесением чужеродной ДНК при смешивании и вводе реагентов [115].

Первые работы по лиофилизации ПЦР-смеси направлены на высушивание в микропробирках. Так, в работе [116] лиофильно высушивали 20 мкл ПЦР-смеси. Подобный подход позволил упростить процедуру смешивания и ввода реактивов и проб, но не решал в полной мере проблему большого расхода ПЦР реактивов.

Актуальной задачей является иммобилизация ПЦР-реактивов в микрочипах, что позволило бы совместить преимущества этих подходов. В работе [117]в микрореакторах иммобилизировали только праймеры. В работе [114] показана принципиальная возможность иммобилизации ПЦР-реактивов на поверхности кремниевых микрочипов, но предложенный способ позволял проводить процесс только для одного чипа. В связи с преимуществами, которыми обладает проведение ПЦР с использованием иммобилизованных реактивов, актуальной представляется задача наладить массовое производство микрочипов с иммобилизованными реактивами. Создание массового производства ставит вопрос о замене материала для изготовления микрочипа с кремния на более технологичный алюминий, ранее уже показавший свою пригодность для проведения ПЦР на жидких реактивах.

I.5. Методы выделения нуклеиновых кислот

Перед анализом ОТПЦР, необходимо провести пробоподготовку и выделить РНК из исследуемого объекта. Стоит отметить, что одним из недостатков и лимитирующих факторов применения метода ПЦР является зависимость результатов от чистоты пробы. Наличие ингибиторов может привести к тому, что положительная проба не будет работать, поэтому пробоподготовке РНК с последующим ПЦР определением уделяется очень большое внимание исследователей.

Существует множество методов пробоподготовки биологических образцов, которые, как правило, многостадийны и сложны в исполнении. Полнота выделения НК из пробы, а также отсутствие в выделенной пробе ингибиторов и других загрязняющих веществ обеспечивают успех определения НК. Выбор основных условий и параметров пробоподготовки зависит от вида образца (грибы, человеческие клетки, грамположительные или грамотрицательные бактерии и т.д.), а также физико-химических особенностей матрицы пробы (отдельно взятые ткани, кровь, почва, растение и др.). Несмотря на многообразие вариантов, весь цикл пробоподготовки можно разделить на четыре основные стадии: *лизис (*применение хаоторопного вещества и белково-разрушающих ферментов*), сорбция, очистка и элюирование НК*.

I.5.1. Классические методы выделения нуклеиновых кислот

Метод выделения нуклеиновых кислот из жидкой фазы основан на сложных стадиях преципитации и очищения. Основной принцип преципитации РНК (рис. 18) заключается в формировании и осаждении комплекса растворимого молекулярного антигена со специфическим антителом. Осадок комплекса антиген–антитело называется преципитатом.

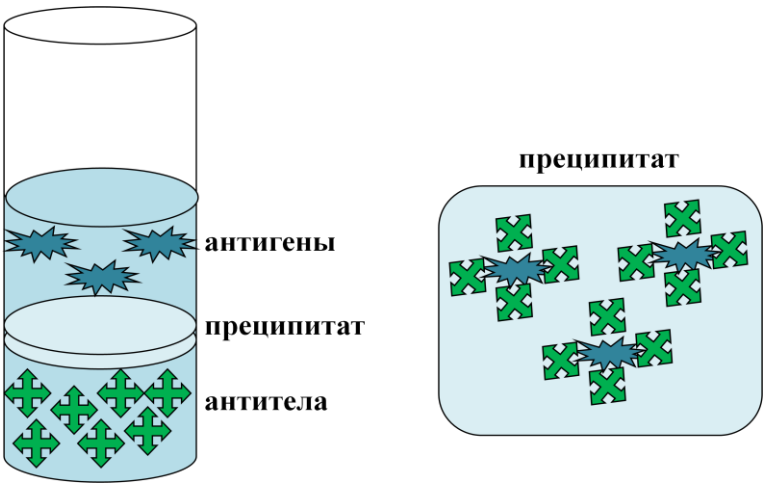


Рис. 18. Схематическое изображение реакции преципитации.

Данные методы не только громоздки, но и трудоемкие, а это в свою очередь увеличивает риск разрушения РНК и кросс-контаминации образцов.

Сорбционные методы выделения нуклеиновых кислот основаны на таких взаимодействиях, как: образование водородных связей между раствором и сорбентом; ионные взаимодействия (анионный обмен); сродство размеров. Основой твёрдой фазы, которая сорбирует НК, являются частицы SiO_2 [118, 119], а также стекловолокно или анионно-обменные носители [120], которые используются в хроматографических разделительных колонках. Связь НК–сорбент образуется в присутствии высококонцентрированных растворов хаотропных солей (например: иодата натрия, перхлората натрия, гуанидин тиоционата).

I.5.2. Выделение нуклеиновых кислот с помощью магнитных частиц

Использование магнитных твёрдых носителей в биохимических и молекулярно-биологических процессах имеет ряд преимуществ по сравнению с другими немагнитными методами выделения НК. Основной принцип заключается в том, что частицы, обладающие магнитным моментом, могут быть извлечены из раствора при наложении магнитного поля, например при использовании постоянного магнита. Данный метод является быстрым, простым и эффективным

для разделения частиц после связывания с НК или на стадии элюирования. Таким же образом можно изолировать компоненты разрушенных клеток, которые ингибируют ДНК-полимеразу в ПЦР. Основными ингибиторами ПЦР являются ионы кальция, полисахариды, фенольные соединения, гумусовые вещества, белки (коллаген, гемоглобин, иммуноглобулин) [121, 122]. Ингибиторы могут находиться в биологическом материале, а могут быть добавлены в процессе обработки образца или выделения нуклеиновой кислоты. Такими веществами могут быть порошок из перчаток [123], различные соли (например, хлориды натрия и калия), а также органические молекулы (например, этилендиаминтетрауксусная кислота (**ЭДТА**), этанол, изопропиловый спирт или фенол) [124, 125, 126, 127]. С одной стороны некоторые из этих веществ необходимы для успешного лизиса клеток, а с другой являются ингибиторами [128].

Материалы для изготовления магнитных частиц различны: синтетические полимеры, пористое стекло или магнитные частицы из неорганических магнитных материалов, например поверхностно-модифицированный оксид железа. Особенно популярными являются суперпарамагнитные частицы, которые не взаимодействуют между собой в отсутствии магнитного поля. Данные частицы будут магнититься только в магнитном поле, а после удаления из него будут терять магнетизм.

Обычно поверхность коллоидных частиц магнетита Fe_3O_4 в лаборатории обрабатывают оксидом кремния (II). Оксид железа способен адсорбировать ДНК [129], но у агрегатов из-за силы притяжения уменьшается площадь поверхности, используемая для адсорбции [130]. В работах [131, 132] использовали интересные магнитные частицы, которые предварительно модифицировали бактериями в присутствии амино-силикатов и сверхразветвленных полиамидаминов. В целях пробоподготовки для ПЦР чаще всего используют поверхностно модифицированные магнитные наночастицы с алкоксисиланами [133, 134] или полиетилениминами [135, 136].

Процесс связывания НК с сорбентом может быть описан, как обёртывание нуклеиновых кислот вокруг частицы с помощью ионных и ванн-дер-ваальсовых взаимодействий. Такое взаимодействие в основном обеспечивается на неровной поверхности, например пористой. Монодисперсные сферические частицы (в основном частицы одинаковых размеров) имеют преимущество относительно полидисперсных, так как обеспечивают воспроизводимость магнитного разделения.

В зависимости от дальнейшей обработки образцов, не всегда можно оставлять НК на сорбенте. Прямое ПЦР определение ДНК/РНК не может проводиться без элюирования нуклеиновых кислот с поверхности сорбента, так как реакция будет ингибироваться магнитными частицами, их стабилизаторами или оксидами металлов [137]. Элюирование НК с поверхности магнитных частиц может быть достигнуто путём увеличения ионной силы, температуры или pH.

Магнитные частицы также эффективно удаляют многие ингибиторы ПЦР [138, 139, 140]. Достаточно направить магнит в сторону сосуда, который содержит раствор образца, для скапливания частиц у стенки сосуда и отделить надосадочную жидкость (рис. 19).

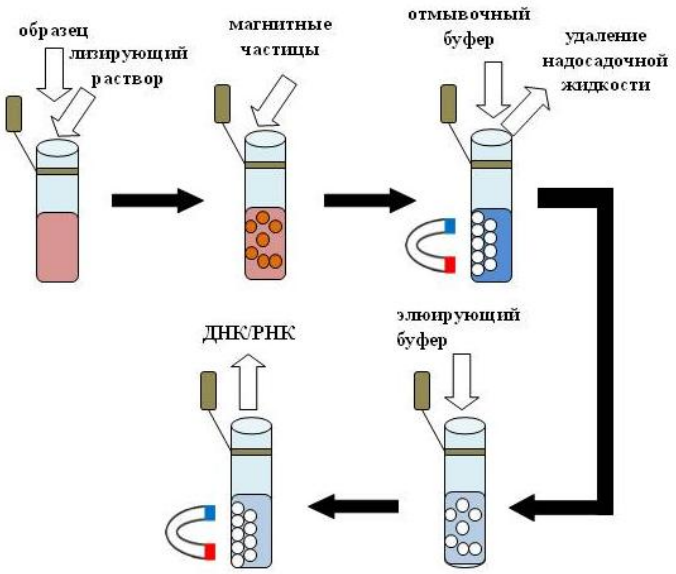


Рис. 19. Схематическая иллюстрация очистки нуклеиновых кислот с помощью магнитных сорбентов.

I.6. Основные сведения о болезни Ньюкасла и Инфекционном бронхите кур

Болезнь Ньюкасла (лат. *Pseudopestis avium,* Morbus Newcastle,), псевдочума птиц или азиатская чума птиц – это высококонтагиозное вирусное заболевание птиц, характеризующееся поражением респираторных и висцеральных органов, центральной нервной системы и сопровождающееся гибелью и падением продуктивности [141].

Возбудителем данной болезни является РНК содержащий вирус (**НБ**) из семейства парамиксовирусов (*Paramyxoviridae* род Paramyxovirus) размером 120—180 нм. В состав вирусной частицы входят рибонуклеопротеид, гемагглютинин (v-антиген), ферменты (нейроминидаза, полимераза), гемолизин, липиды и углеводы. Вирус обладает способностью репродукции на культуре тканей, цитопатогенным действием, гемоагглютинирующей активностью к эритроцитам кур [142].

Болезнь Ньюкасла является эндемической во многих странах. Инкубационный период короткий — до 4-х дней. Молодняк болеет чаще всего в атипичной форме с невыраженной клинической картиной. Продуктивность у кур-несушек снижается до 50%, яйца с тонкой скорлупой или без неё ("литье яиц"). Клинические признаки болезни разнообразны в зависимости от степени заражения, возраста птиц, условий содержания и др. Течение болезни может быть молниеносным, острым (велогенная форма), подострым (мезогенная форма) и хроническим (лентогенная форма). При молниеносном течении заболевшая птица погибает внезапно без выраженных клинических признаков. При остром течении аппетит у птиц резко ухудшается, а затем пропадает. У большинства заболевших птиц температура тела повышается до 44 °С. Смерть наступает через 3–12 дней после начала болезни при сильном истощении [143]. Эффективных лекарственных препаратов для лечения псевдочумы нет. В промышленных птицеводческих хозяйствах вся больная птица подлежит уничтожению ввиду

угрозы разноса инфекции. Использование профилактических вакцин и санитарных мероприятий снижает вероятность вспышек. Контакт людей с инфицированными птицами может вызвать лёгкий конъюнктивит и гриппоподобные симптомы, но вирус НБ не представляет никакой опасности для здоровья человека [144].

Инфекционный бронхит кур (Infectious bronchitis**, ИБК**) — высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания у молодняка, поражением репродуктивных органов и потерей продуктивности у взрослых кур–несушек, а также нефрозонефритным синдромом [145].

Возбудителем данной болезни является также РНК-содержащий вирус Coronavirus avia из рода Coronavirus, семейство Coronaviridae (группа миксовирусов). Размер вириона составляет 65–135 нм. Вирион круглой или эллиптической формы с шероховатой поверхностью и отходящими от нее отростками длиной до 20 нм, которые образуют бахрому, или «солнечную корону». Свободные концы отростков часто утолщены. Вирусные частицы могут располагаться группами или цепочками. У некоторых вирусных частиц ясно видна мембрана [146]. В настоящее время в литературе описано около 30 разновидностей серотипов вируса инфекционного бронхита кур. Антибиотики и химиопрепараты (нитрофураны, сульфаниламиды, и др.) не оказывают губительного действия на вирус. Вирус инфекционного бронхита, попав в организм тем или иным путем, очень быстро проникает в восприимчивые клетки, главным образом в эпителий дыхательного аппарата. В организме птиц вирус инфекционного бронхита быстро размножается в клетках респираторных органов, и уже через 12 ч после заражения в покровном эпителии трахеи обнаруживают зрелые вирусные частицы. Вирус ИБК не агглютинирует эритроциты кур и млекопитающих [147]. К заболеванию в основном восприимчивы цыплята в возрасте до 30 дней, а так же куры в возрасте 5–6 месяцев. До 20−40% цыплят, переболевших инфекционным бронхитом, подлежат выбраковке вследствие недоразвития.

Особенностью болезни является то, что спустя 3−5дней после ее появления она быстро поражает всех птиц в стаде. Вначале заболевают цыплята, а затем болезнь переходит на молодых и взрослых кур. Следует иметь в виду, что диагностировать инфекционный бронхит довольно трудно, так как большинство болезней органов дыхания у птиц протекает со сходной клинической картиной. Если ИБК циркулирует в хозяйстве впервые, то летальность доходит до 70%.

I.6.1. Классические методы определения вирусов Ньюкасла и инфекционного бронхита кур

Для того чтобы определить вирусы по методам пассажей, первой стадии у погибших или вынужденно убитых цыплят делают соскобы со слизистых оболочек. Затем патологический материал суспендируют в мясопетонном бульоне (среда для культивирования микроорганизмов содержит экстрактивные вещества из органов, 0.5% NaCl и 1% пептона). После осаждения крупных кусочков тканей надосадочную жидкость используют для выделения вируса. Жидкость вводят в аллантоисную полость куриных эмбрионов и в трахею 10-20 дневных цыплят.

Для определения вируса НБ в лаборатории поступает мозг, трахея, печень и селезёнка умерших птиц. Из этих органов готовят суспензию, которой заражают 30–60-дневных цыплят и 9–12 дневных эмбрионов. В случае положительной биопробы цыплята заболевают псевдочумой спустя 3–5 дней, а эмбрионы погибают через 48–72 часа. Для дополнительной проверки аллантоисную жидкость, отобранную у погибших эмбрионов исследуют по реакции гемагглютинации (**РГА**) и реакции задержки гемагглютинации (**РТГА**).

Реакция гемагглютинации (рис. 20) основана на использовании эритроцитов с адсорбированными антителами, которые взаимодействуют с соответствующими антигенами сыворотки крови больных птиц. При этом наблюдается склеивание и выпадение эритроцитов на дно пробирки или ячейки в виде осадка [148].

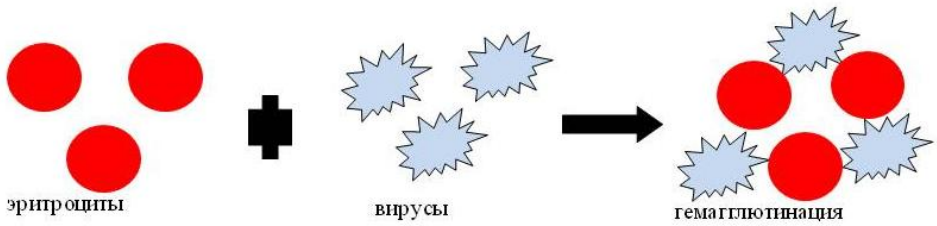


Рис. 20. Схематическое изображение реакции гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (рис. 21) основана на блокаде, подавлении вирусов антителами иммунной сыворотки, в результате чего вирус теряют свойство агглютинировать эритроциты. РТГА применяют для диагностики многих вирусных болезней, возбудители которых могут агглютинировать эритроциты различных животных[150].

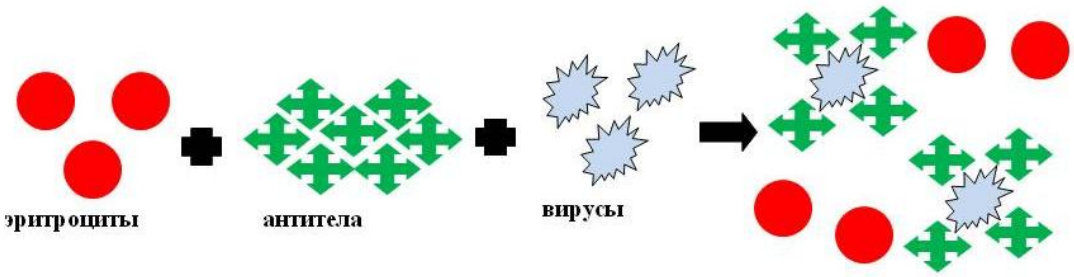


Рис. 21. Схематическое изображение реакции торможения гемагглютинации.

Основной недостаток РГА и РТГА заключается в том, что определение вирусов является визуальным, что может привести к неправильному диагностированию. Кроме того, процесс невозможно анализировать во времени и для проведения реакции требуется большой объём реагентов.

Экспрессным, но довольно неточным методом является спектральное определение вирусов. Известно, что спектр поглощения целых вирусных частиц представляет собой комбинацию спектров белка и нуклеиновой кислоты. Для нуклеиновых кислот в области максимума (~260 нм) удельное поглощение (для 0.1% раствора РНК А = 25, для 0.1% раствора ДНК А = 20) намного выше, чем

для белка (для 0.1% раствора белка А = 0.5). Спектр поглощения можно использовать для определения концентрации вируса.

I.6.2. Иммуноферментный метод определения вирусов НБ и ИБК

Иммуноферментный метод (**ИФА**) основан на выявлении антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом–меткой. После соединения антигена с ферментоиммуной сывороткой в смесь добавляют субстрат и хромоген [148]. Субстрат расщепляется ферментом и его продукты деградации вызывают химическую модификацию хромогена, при этом цвета хромогена меняется, причем интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

Наиболее распространённым подходом является твёрдофазный ИФА (ELISA) (рис. 22) В этом варианте иммунологического теста один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола. При определении антител в лунки с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больной птицы, антиглобулиновую сыворотку и смесь растворов субстрата для фермента и хромогена. При положительном результате цвет хромогена изменяется. Твердофазный носитель можно сенсибилизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с адсорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, а затем смесь растворов субстрата для фермента и хромогена [150].

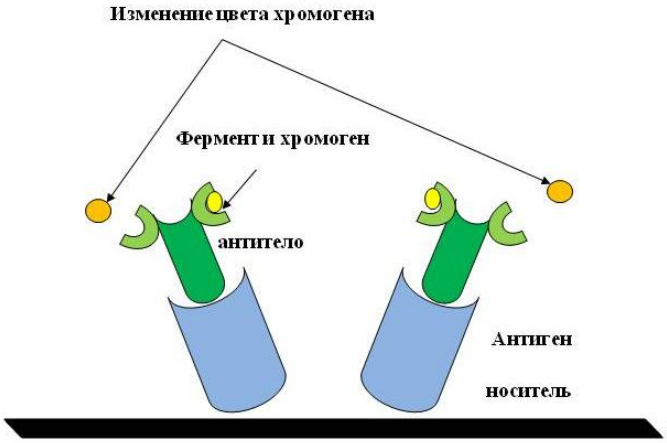


Рис. 22. Схематическое изображение метода ELISA.

Метод ИФА применяется для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях — 10^{-10}–10^{-12} г/л. Преимуществами данного метода является простота и возможность проведения анализа большого объёма образцов. Существенным недостатком является сложность проведения количественного анализа.

Большинство ПЦР-методик для определения болезни Ньюкасла и куриного бронхита основаны на проведении ОТПЦР в пробирке с последующим электрофоретическим детектированием продуктов амплификации. К сожалению, такой подход сильно снижает распространенность метода ПЦР в диагностических ветеринарных лабораториях. Многие птицефабрики имеют свои диагностические центры, однако сложность постановки ПЦР эксперимента требует особых навыков. С другой стороны, использование микрочипов с лиофилизированными реактивами в методе ОТПЦР с детектированием продуктов в режиме реального времени значительно упрощает процедуру ПЦР и не требует высококвалифицированных операторов.

II. АППАРАТУРА, МЕТОДИКИ И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

II.1 Топология и устройство алюминиевого микрочипа

Ввиду высоких коэффициентов теплопроводности, в настоящей работе использовались алюминиевые микрочипы, которые представляют собой алюминиевую пластину с штампованными микрореакторами в виде обратной усеченной пирамиды.

На рис. 23 показана топология микрочипа, состоящего из алюминиевой пластины толщиной 0.7 мм и пластиковой рамки, которые соединялись между собой с помощью герметика на основе силикона.

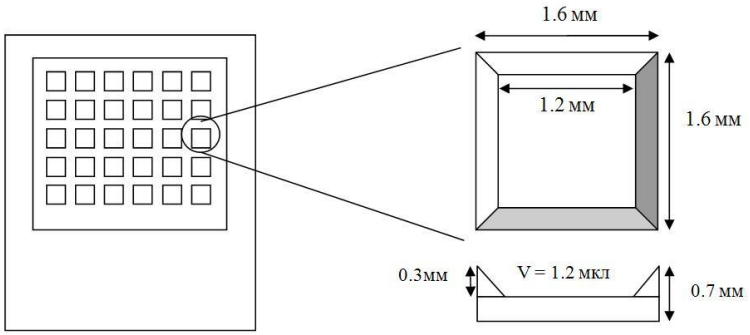


Рис. 23. Топология алюминиевого микрочипа и габаритные размеры отдельного микрореактора.

. Внутри пластиковой подложки, изготовленной из полиакрила, имелось отверстие 17×17 мм, которое заполнялось минеральным маслом для герметизации проб и предотвращения их испарения (рис. 24, а). Собранный таким образом микрочип закреплялся в картридже (рис. 24, б), который в свою очередь вставляли в ПЦР-анализатор.

Рис. 24. Изображения собранного алюминиевого микрочипа: а – микрочип до раскапывания реактивов, б – микрочип, помещенный а картридж перед началом ПЦР-анализа.

II.2. Изготовление алюминиевого микрочипа

Схема изготовления алюминиевых микрочипов состояла из нескольких этапов:

1) предварительной подготовки поверхности алюминиевой подложки;
2) плазменной обработки алюминиевой подложки;
3) локальной обработки отдельных участков микрочипа — гидрофилизации и гидрофобизации поверхности алюминиевой подложки;
4) соединения готовой алюминиевой подложки с пластмассовой рамкой.

Стадия плазменной обработки поверхности будет детально рассмотрена в следующем подразделе. Рассмотрим детально остальные стадии изготовления микрочипа.

II.2.1. Оборудование для изготовления микрочипов

Магнитная мешалка, центрифуга (Sigma 3-16P, Sartorius, Россия), безворсовые салфетки (Defender, Германия), ультразвуковая ванна ("Сапфир", Россия), вытяжной шкаф, дозатор (100–1000 мкл, Biohit) и наконечники к нему, силиконовый тампон, ПЦР-бокс с УФ (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), пластиковые подложки для чипа (изготовлены по заказу), чашки Петри, стеклянные стаканы 200 мл, шприцы объема 1 и 10 мл.

II.2.2. Реактивы для изготовления микрочипов

Поливинилпирролидон (Aldrich Chemistry), фосфатно-солевой буфер (0.01 М, pH 7.3–7.5, Биолот, Россия), спирт изопропиловый, ТВИН-20 (Helicon), полидиметилсилоксан «Пента 107» (ООО «Пента Север», Россия), бутилацетат (х/ч, Экос-1), деионизованная вода, герметик силиконовый Loctite 5910, спирт этиловый.

II.2.3. Стадия 1: предварительная подготовка поверхности алюминиевой подложки

Алюминиевые подложки помещали в специальных фторопластовых держателях в смесь ацетона и этилового спирта в соотношении 1:1и облучали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 10 минут при комнатной температуре. Далее картриджи вынимали из стакана и центрифугировали в течение 10 с при скорости вращения 1500 об/мин. Подложки вынимали из катриджей и досушивали при температуре 50 °С в течение 2 минут.

Таким образом, подложки обезжиривали и очищали от возможных загрязнителей.

II.2.4. Стадия 2: плазменная обработка алюминиевой подложки

Данная стадия изготовления микрочипа включает в себя несколько подходов и несколько этапов и будет рассмотрена далее в разделе.

II.2.5. Стадия 3а: гидрофилизация поверхности алюминиевой подложки

Алюминиевые пластины в специальных фторопластовых картриджах помещали в пассивирующий раствор (стакан объемом 250 мл) состоящий из водно-изопропанольного раствора ТВИН-20, поливинилпироллидона и фосфатно-солевого буфера и облучали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее картриджи центрифугировали для удаления излишков пассивирующего раствора в течение 10 с при скорости вращения 1500 об/мин. После окончания центрифугирования алюминиевые пластины извлекали из картриджей, помещали в чашки Петри и досушивали 5–10 мин на воздухе.

II.2.6. Стадия 3б: Гидрофобизация внешней (между микрореакторами) поверхности алюминиевой подложки

На двойную безворсовую салфетку, помещенную в чашку Петри, выливали 0.6 мл раствора П-107 в бутилацетате (1:3). Далее на внешнюю поверхность каждой из пластин дважды наносили слой гидрофобного соединения методом тампонной печати (интервал между повторными нанесениями 1 мин). После гидрофобизации алюминиевые пластины помещали в чашку Петри и высушивали 5–10 мин на воздухе.

II.2.7. Стадия 4: соединение готовой алюминиевой подложки с пластмассовой рамкой

Пластиковые рамки предварительно очищали от загрязнений. Для этого их помещали в стакан объемом 250 мл, заливали этиловым спиртом и облучали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. Далее для нанесения силиконового герметика подготавливали иглы шприцев. Для этого продажные иглы 0.7 мм × 40 мм обрезали до длины 3–5 мм при помощи гравировального инструмента с наждачным кругом, торцевали и тщательно удаляли заусенцы с наружной и внутренней сторон иглы. Инсулиновые шприцы объемом 1 мл заполняли герметиком в количестве 0.5–0.7 мл и только после заполнения на шприцы одевали подготовленные иглы. Далее на середину выступа тыльной стороны пластиковой подложки выдавливали сплошной слой герметика, визуально контролируя отсутствие разрывов. Лицевую сторону алюминиевой подложки прижимали к клеевому слою, затем микрочип переворачивали алюминиевой пластиной вниз, прижимали с усилием 1–2 кг до полного растекания клеевого шва, центрировали расположение пластины относительно окна пластиковой подложки. Готовый микрочип помещали в чашку Петри и

оставляли на ночь при комнатной температуре для завершения полимеризации силиконового герметика.

Собранные таким образом микрочипы исплользовали для ОТПЦР исследований на жидких реактивах. Для того, чтобы подготовить микрочипы для лиофилизации реактивов стадию гидрофилизации пропускали, так как стабилизаторы, которые использовались в процессе лиофилизации полностью справились с приданием гидрофильных свойств поверхности алюминия внутри микрореакторов.

II.3. Плазмохимическое осаждение покрытий на поверхности алюминиевой пластины и методы исследования полученных пленок

II.3.1. Оборудование и реактивы для плазмохимического осаждения

Плазмохимический синтез и очистка алюминиевых пластин проводились в установке Diener Pico (Германия) с высокочастотным генератором (40 кГц / 200 Вт) (рис. 25). Диаметр камеры составлял 150 мм, глубина: 320 мм, объем камеры: 5 литров, подвод газа осуществлялся с помощью двух регуляторов расхода с игольчатыми клапанами. Ввод в камеру веществ с температурой кипения ниже 130 °C производился путем его впрыскивания из отделения для жидких мономеров.

Рис. 25. Установка для плзамохимического синтеза пленок на поверхности алюминия.

Для ПХО также использовали генератор кислорода (Oxy 6000, Bitmos).

Реактивы для ПХО: баллон с Аргоном (х/ч), ГМДС (Aldrich, х/ч), баллон с ацетиленом (тех/ч).

II.3.2. Методика проведения ПХО на поверхности алюминиевых микрочипов

Подготовка пластин к плазмохимическому синтезу

До начала эксперимента камеру прожигали в низкотемпературной (50 – 60 °С) плазме кислорода в течение 30 мин для очистки. Затем обезжиренные пластины размещали на подложке в камере генератора плазмы и закрывали камеру.

Обработка в плазме аргона

На регуляторе игольчатого насоса устанавливали объемную скорость потока аргона на 25 мл/мин и продували камеру до установки постоянного значения давления (16 Па), затем устанавливали значение объемной скорости потока аргона на 5 мл/мин, значение мощности генератора на 100% (200 Вт), время обработки на 5 мин и включали генератор.

Обработка в плазме кислорода

Включали генератор кислорода, устанавливали значение 0.2 л/мин, устанавливали скорость подачи кислорода 10 мл/мин и продували камеру в течение 5 минут. Затем задавали мощность генератора на 100% (200 Вт), время обработки на 30 минут, и включали генератор.

ПХО адгезионного покрытия в плазме ГМДС

На регуляторе игольчатого насоса устанавливали объемную скорость потока аргона на 5 мл/мин, настраивали подачу ГМДС так, чтобы частота впрыска составила 1 раз/5 с и продували камеру в течение 5 минут. Далее задавали значение мощности генератора на 20% (40 Вт), время обработки на 20 минут и включали генератор. Через 10 мин, не выключая генератор, устанавливали значение мощности на 80% (160 Вт).

ПХО покрытия в плазме ацетилена

На регуляторе игольчатого насоса устанавливали объемную скорость потока аргона на 5 мл/мин, объемную скорость ацетилена 3 мл/мин и продували камеру в течение 5 мин. Затем устанавливали значение мощности генератора на W_4 Вт, время обработки на t_4 минут (W_4 = 40 Вт и t_4 = 10 мин. для образца A, 30 Вт и 10 мин для образца B, 20 Вт и 10 мин для образца C, 10 Вт и 10 мин для образца D, 40 Вт и 5 мин для образца E, 40 Вт и 2 мин для образца F), и включали генератор.

Гидрофилизация покрытия с помощью кратковременной обработки в плазме кислорода

После нанесения покрытия в плазме ацетилена, камеру продували током аргона (25 мл/мин) в течение 5 мин для удаления остатков ацетилена. После этого включали генератор кислорода, устанавливали значение 0.1 л/мин, устанавливали скорость подачи кислорода 10 мл/мин и продували камеру в течение 2 мин, затем устанавливали значение мощности генератора на 100% (200 Вт), время обработки на 0.1 мин и включали генератор.

После завершения всех процессов включали вентиляцию камеры. Обработанные пластины помещали в чашки Петри с помощью пинцета.

Общая схема плазмохимического синтеза представлена в табл. 2.

Таблица 2. Условия плазмохимического синтеза двухслойных покрытий на поверхности алюминия

	P_0, Па	Вещество	Расход, мл/мин	Давление в камере. Па		Время обработки, t, мин	Мощность генератора, % от 200 Вт
				Выкл.	Вкл.		
1	18	Ar	5	18	19	5	100
2	16	O_2	10, 0.2 л/мин	18	19	35	100
3	11	ГМДС	Впрыскивание 1 р/5 с	16	16	1. 10 2. 10	1. 20 2. 80
		Ar	5				
4		Ацетилен					
	17	A	4 мл/мин	17	50	10	20
	17	B		18	50	10	15
	17	C		18	44	10	10
	17	D		18	33	10	5
	17	E		18	36	5	20
	17	F		18	21	2	20
		Ar	5				
4	16	O_2	5, 0.1 л/мин	17	17	0.1	100

II.3.3. Исследование инертности покрытий в условиях ПЦР методом спектроскопии электрохимического импеданса

Оборудование и реактивы

Потенциостат–гальваностат Metrohm Autolab (Eco Chemie, Нидерланды), раствор 0.1М *трис*-(гидроксиметил)аминометана, разбавленный 1М раствором

HCl (5.5 мл) до pH 8.3; хлорсеребряный электрод сравнения; платиновый вспомогательный электрод.

Проведение измерений:

Столб жидкости (раствора 0.1M *трис*-(гидроксиметил) аминометана, доведенного 1M HCl до pH 8.3) фиксируют на пластине в области ячеек (рис 26). После этого подключают хлорсеребряный электрод сравнения и вспомогательный платиновый электрод к потенциостату–гальваностату, а рабочий электрод к алюминиевой пластине так, чтобы его контакт с жидкостью отсутствовал. Устанавливают с помощью программного обеспечения прибора диапазон частот – 0–100 кГц и потенциала E = –1.1 В и проводят измерения.

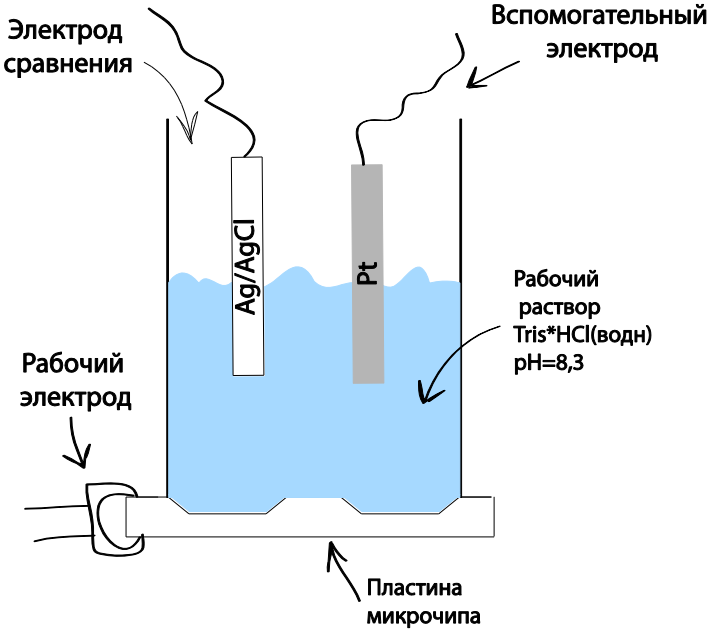


Рис. 26. Схема проведения спектроскопии электрохимического импеданса на микрочипе.

II.3.4. Измерение угла смачивания поверхности микрочипов водой методом растекающейся капли

Краевой угол смачивания θ или cos θ является характеристикой гидрофильности (гидрофобности) поверхности и определяется как угол между касательной AB, проведенной к поверхности смачивающей жидкости, и

смачиваемой поверхностью твердого тела АА, при этом всегда отсчитывается от касательной в сторону жидкой фазы (рис. 27).

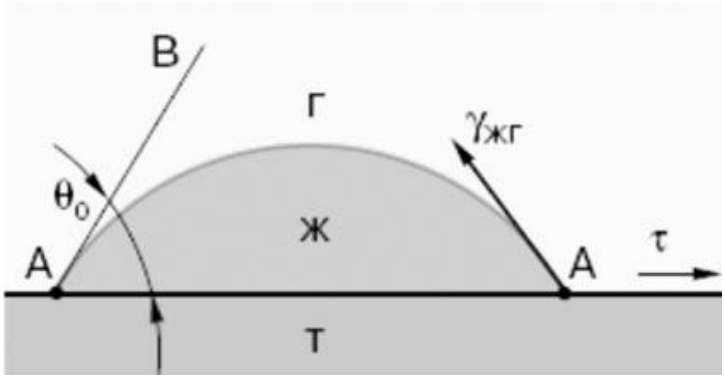


Рис. 27. Схема измерения краевого угла смачивания поверхности жидкостью [52].

С помощью дозатора на поверхность микрочипа наносили каплю воды и фиксировали ее поведение с помощью фотокамеры.

II.3.5. Исследование морфологической структуры и оценка элементного состава пленок методами сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского энергодисперсионного микроанализа

Оборудование: сканирующий электронный микроскоп Zeiss Merlin (Германия) с полевым эмиссионным катодом, колонной электронной оптики GEMINI-II и безмаслянной вакуумной системой, а также системой регистрации дифракции обратнорассеянных электронов (EBSD) (U = 10кВ, $I_{пучка}$ = 500 пА). Исследования выполнены в Междисциплинарном Ресурсном Центре по направлению «Нанотехнологии».

Получить достаточно ровный поперечный срез алюминиевой пластины не представлялось возможным из-за деформаций металла, возникающих при распиливании пластины алмазным диском, поэтому для оценки структуры и толщины пленок рассматривали скол микрочипа, изготовленного из монокристаллического кремния с нанесенным слоем оксида кремния для моделирования свойств поверхности, приближенных к свойствам алюминия

(наличие похожих функциональных групп и аморфность поверхности). Для получения пленок на поверхности микрочипа-свидетеля, в рабочую камеру, помимо алюминиевых образцов, загружали дополнительные пластины кремния. Получены СЭМ-изображения нескольких участков среза, толщина пленок усреднена по результатам нескольких измерений. Элементный анализ провели в 4 различных точках подложек алюминиевых микрочипов, после чего показатели усреднили.

Для оценки толщины покрытия одновременно с получением пленок на алюминии получены аналогичные пленки на поверхности кремниевых пластин для ОТПЦР-микрочипов, с помощью которых стало возможным получить ровный скол профиля пластины, не повредив покрытие.

II.3.6. Исследование структуры пленок методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)

Оборудование и реактивы: экспресс-рамановский спектрометр SENTERRA (Bruker): спектральный диапазон регистрации спектров КР: 80–4500см$^{-1}$, спектральное разрешение: 3 см$^{-1}$, длина волны возбуждающего лазера: 532 нм (максимальная мощность 20 мВт).

Ввиду высокого отражения алюминиевых микрочипов в данных исследованиях также применяли кремниевый свидетель с нанесенным слоем оксида кремния. Спектры снимали при большом накоплении, так как толщина полученных пленок небольшая.

II.4. Методы пробоподготовки биологического материала

Для пробоподготовки пассажей вирусов, которые представляли отобранный куриный альбумин из зараженного патологическим материалом эмбриона,

использовали два коммерческих набора и также подход, основанный на применении магнитных частиц.

II.4.1. Выделение РНК из биологического материала с помощью коммерческого комплекта реагентов "АмплиПрайм РИБО-преп"

Реактивы: пассажи вируса инфекционного бронхита или болезни Ньюкасла, комплект реагентов для экстракции РНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» (ИнтерЛабСервис): раствор для лизиса, раствор для преципитации, раствор для отмывки 3, раствор для отмывки 4, РНК-буфер.

Оборудование: ламинарный шкаф (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), термостат для микропробирок от 25 до 100 °С (ДНК-технология), центрифуга для микропробирок с функцией встряхивателя Vortex (Microspin-2400, BIOSAN), центрифуга для микропробирок до 16000 об/мин (Eppendorf), вакуумный отсасыватель медицинский с колбой–ловушкой для удаления надосадочной жидкости (Утес), дозаторы переменного объема (0.1–3.0; 0.5–10; 10–100 мкл) и наконечники к ним, микропробирки на 1.5 мл (эппендорфы), штативы для микропробирок.

Методика экстракции РНК из исследуемых образцов

В начале работы раствор для стадии разрушения клеток (лизиса) прогревают при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов, образующихся вследствие хранения. Далее 300 мкл *раствора для лизиса* и 100 мкл пробы помещают в микропробирки на 1.5 мл. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, центрифугируют в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогревают 5 мин при 65 °С в термостате. После лизиса в микропробирки добавляют 400 мкл *раствора для преципитации* и перемешивают на настольной центрифуге (вортекс). Далее центрифугируют пробирки на ультрамикроцентрифуге в течение 5 мин при 13000 об/мин. После этого надосадочную жидкость аккуратно отбирают, не задевая

осадок, используя вакуумный отсасыватель. К осадку добавляют 500 мкл *раствора для отмывки 3*, плотно закрывают крышки, осторожно промывают осадок, переворачивая пробирки три–пять раз, снова центрифугируют при 13000 об./мин в течение 1–2 мин. Используя вакуумный отсасыватель осторожно, не захватывая осадок, отбирают надосадочную жидкость. После отмывки микропробирки помещают в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для просушивания осадка (при этом крышка пробирки открыта). В просушенный осадок добавляют 90 мкл РНК-буфера, перемешивают на вортексе и помещают в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. В конце пробирки снова центрифугируют при 13000 об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочную жидкость, которая содержит очищенные РНК, аккуратно отделяют от осадка.

II.4.2. Выделение РНК из биологического материала с помощью комплекта реагентов "АмплиПрайм РИБО-сорб"

Реактивы: пассажи вируса инфекционного бронхита или болезни Ньюкасла, комплект реагентов для экстракции РНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис): лизирующий раствор, раствор для отмывки 1, раствор для отмывки 3, раствор для отмывки 4, сорбент (суспензия белого цвета), РНК-буфер.

Оборудование: Ламинарный бокс (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), термостат для пробирок типа "Эппендорф" от 25 до 100 °С (*Термит*, ДНК-технологии, Россия), вакуумный отсасыватель медицинский с колбой–ловушкой для удаления надосадочной жидкости (ОМ-1, Утес, Россия), микроцентрифуга для пробирок типа "Эппендорф" до 16000 об/мин (centrifuge 5415D, eppendorf, Германия), центрифуга для микропробирок с функцией встряхивателя Vortex (Microspin-2400, BIOSAN), набор механических дозаторов переменного объёма, одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1.5 мл,

штативы для наконечников, одноразовые наконечники для дозаторов переменного объёма с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл, ёмкость для сброса наконечников.

Методика выделения РНК из исследуемых образцов

В начале работы лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогревают при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов. В каждую пробирку вносят по 450 мкл лизирующего раствора и 100 мкл пробы, используя наконечники с фильтром. Далее плотно закрытые пробы тщательно перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 5 с при 5000 об/мин на ультрамикроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Перед началом работы с сорбентом его тщательно ресуспендируют на вортексе. В каждую пробирку с лизатом отдельным наконечником добавляют по 25 мкл ресуспендированного сорбента, перемешивают на вортексе и оставляют на 5 мин в штативе. После прохождения сорбции пробирки центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 с на ультрамикроцентрифуге, а надосадочную жидкость удаляют, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Далее приступают к стадии очистки адсорбированной РНК. Для очистки от ингибиторов гидрофильной природы в пробирки добавляют по 400 мкл раствора для отмывки 1, перемешивают на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировали 30 с при 10000 об/мин на ультрамикроцентрифуге и удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Далее для очистки от ингибиторов гидрофобной природы в пробирки добавляют по 500 мкл раствора для отмывки 3, тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе, а потом центрифугируют 30 с при 10000 об/мин на ультрамикроцентрифуге. Надосадочную жидкость удаляют, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Отмывку раствором 3 повторяют еще раз. На последней стадии очистки в пробирки добавляют по 400 мкл раствора для отмывки 4, снова тщательно ресуспендируют сорбент на вортексе,

центрифугируют 30 с при 10000 об/мин на ультрамикроцентрифуге. После этого надосадочную жидкость полностью удаляют из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель, пробирки помещают в термостат при температуре 60 °С на 12–15 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки открыты. После высушивания в пробирки добавляют по 50 мкл РНК-буфера, используя наконечник с фильтром, перемешивают на вортексе и помещают в термостат при температуре 60 °С на 2–3 минуты После этого пробирки еще раз перемешивают на вортексе и центрифугируют при 12–13 тыс. об/мин в течение 1 мин на ультрамикроцентрифуге. Полученная надосадочная жидкость содержит очищенные от ингибиторов РНК.

II.4.3. Выделение РНК из биологического материала с помощью магнитных частиц

Оборудование: Ламинарный бокс (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), термостат для пробирок типа "Эппендорф" от 25 до 100 °С (*Термит*, ДНК-технологии, Россия), вакуумный отсасыватель медицинский с колбой–ловушкой для удаления надосадочной жидкости (ОМ-1, Утёс, Россия), магнитный штатив на двенадцать пробирок на 1.5 мл, центрифуга для микропробирок с функцией встряхивателя Vortex (Microspin-2400, BIOSAN), набор механических дозаторов переменного объёма, одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1.5 мл, штативы для наконечников, одноразовые наконечники для дозаторов переменного объёма с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл, ёмкость для сброса наконечников.

Приготовление растворов для выделения РНК с помощью магнитных частиц

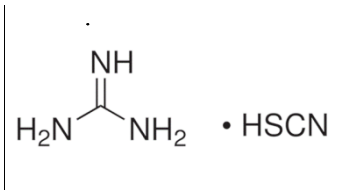
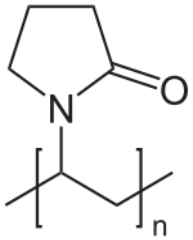
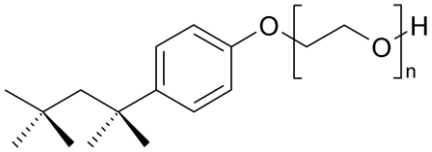
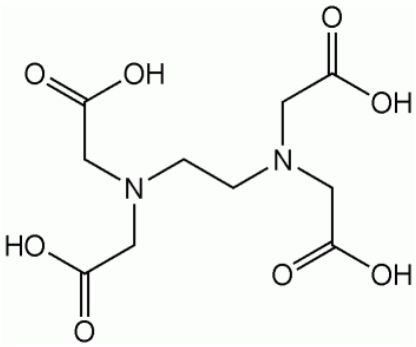
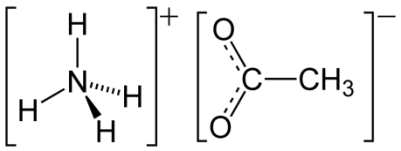
1) Приготовление раствора для лизиса:

Оборудование: аналитические весы (ОКБ ВЕСТА, Россия), дозатор переменного объёма (200–1000 мкл) и наконечник к нему.

Реактивы: гуанидин тиоционат (helicon, Россия), поливинилпирролидон (SIGMA-ALDRICH, Россия), тритон X-100, этилендиаминтетрауксусная кислота (helicon, Россия), ацетат аммония (НеваРеактив, Россия).

В одноразовую баночку на 30 мл добавляли реактивы в количестве, приведенном в табл. 3.

Таблица 3: Реактивы для приготовления раствора для лизиса

Реактив	**Формула**	**масса/объём**
гуанидин тиоционат		14.180 г
поливинилпирролидон		0.606 г
Тритон X-100		0.60 мл
этилендиаминтетрауксусная кислота		0.220 г
ацетат аммония		0.120 г

Объём раствора доводили до 30 мл дистиллированной водой.

Приготовление раствора для отмывки 1: в одноразовую баночку на 30 мл наливают 21 мл этилового спирта и 9 мл дистиллированной воды.

Приготовление раствора для отмывки 2: в одноразовую баночку на 30 мл наливали 30 мл ацетона.

Методика выделения РНК с помощью магнитных частиц

В каждую пробирку на 1.5 мл добавляли по 1 мл раствора для лизиса и вносили по 100 мкл подготовленных проб, используя отдельные наконечники с фильтром для каждой пробы. Содержимое пробирок тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали на вортексе в течение 5–10 с для удаления капель с внутренней поверхности крышки, а потом прогревали 5 мин при 80 °С в термостате. Магнитные частицы тщательно ресуспендировали на вортексе, в чистые одноразовые пробирки на 1.5 мл добавляли по 8 мкл магнитных частиц и переносили лизат, не захватывая осадок. Пробирки тщательно перемешивали на вортексе и помещали в магнитный штатив до полного осветления раствора. Далее, не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно, не задевая магнитные частицы, удаляли надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. После этого приступали к очистке магнитных частиц. Для этого в каждую пробирку добавляли по 1 мл раствора для отмывки 1 (70% этиловый спирт), тщательно перемешивали на вортексе и снова помещали в магнитный штатив до полного осветления раствора с последующим отсасыванием жидкости. Для очистки от гидрофобных примесей в каждую пробирку добавляли по 1 мл раствора для отмывки 2 (ацетон), и повторяли операцию с удалением жидкости в магнитном штативе. После пробирки с открытыми крышками оставляли в магнитном штативе, до полного высыхания магнитных частиц. Далее в каждую пробирку добавляли по 50 мкл раствора для элюирования, аккуратно наконечником переносили магнитные частицы в раствор. Для ускорения десорбции пробы прогревали при 80 °С в течение 10 мин, периодически встряхивая их на вортексе. Затем пробирки помещали в магнитный

штатив и после полного осветления раствора аккуратно, не задевая осадок, переносили готовые пробы РНК в чистые пробирки.

Контроль чистоты выделенной РНК осуществляли с помощью измерения отношения оптических плотностей при 260 нм к 280 нм. Измерения проводили на однолучевом спектрофотометре со ксеноновой лампой (SmartSpec Plus, Bio-Rad, Россия) в пластиковых полистироловых кюветах на 3.5 мл.

II.5. Проведение ОТПЦР с помощью микрочипового анализатора AriaDNA

II.5.1. Проведение ОТПЦР на жидких реактивах

Реактивы: комплект реагентов для ОТПЦР в реальном времени: раствор ДНТФ (Helicon, 100 мМ/мл), раствор прямых и обратных праймеров (DNA-Synthesis, Reverse – 5`–CTACCGCTAGATGAACCAGAG–3`, 3.5 ОЕ; Forward – 5`–GCTGGTATCACTGCTTGTTTG–3`, 3.5 ОЕ), раствор зонда (**ROX**–CCGTTGCTTGGGCTACCTAGTATCC–**BHQ–2**, краситель карбокси-Х-родамин (**ROX**), $\lambda_{возб}$ = 580 нм, $\lambda_{исп}$ – 605 нм, тушитель BHQ-2 – Black Hole Quencher-2, λ_{max}abs = 579 нм, рабочий диапазон гашения 560–670 нм, *c* = 2.5 ОЕ) – для детектирования РНК вируса инфекционного бронхита кур, раствор прямых и обратных праймеров (DNA-Synthesis, Reverse 5`–GGATGACATTGTGGCAGAAGG–3`, Forward 5`–ACCAAACFGAGAATCGGTGAG–3`, 3.5 ОЕ, раствор зонда **FAM**–ACGGGTAGAAGGTGTGAACCTCGA – **BHQ–1,** краситель карбоксифлуоресцеин (**FAM**), $\lambda_{возб}$ = 495 нм, $\lambda_{исп}$ – 520 нм, тушитель BHQ–1 – Black Hole Quencher–1, λ_{max}abs = 534 нм, рабочий диапазон гашения 480–580 нм, *c* = 2.5 ОЕ; — для детектирования РНК вируса Болезни Ньюкасла; 10×ПЦР буфер, Taq ДНК-полимераза (Evrogen, 5Е/мкл), ревертаза (AMPLISENS), растворы проб вирусов ИБК и Болезни Ньюкасла, деионизированная вода (сопротивление 18МОм), полиметилсилоксан-400 («Пента-Север», Россия).

Оборудование: ламинарный шкаф (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), дозаторы переменного объема (0.1–3.0; 0.5–10; 10–100 мкл), центрифуга для микропробирок с функцией встряхивания Vortex (Microspin-2400, BIOSAN), амплификатор нуклеиновых кислот AriaDNA (Люмекс, Россия), дозаторы переменного объема (0.5–10 мкл, 100–1000 мкл) и наконечники к ним, микропробирки на 1.5 мл, автодозатор переменного объема (0.5–10 мкл) и наконечники к нему, алюминиевые микрочипы.

Проведение анализа

Все реактивы сначала размораживали и встряхивали с помощью микроцентрифуги. Для проведения одного анализа (при использовании микрочипа на 30 ячеек) реактивы смешивали в пропорциях, указанных в табл. 4:

Таблица 4 Пропорциональные объемы реагентов для приготовления ОТПЦР смеси реагентов (Master mix)

Реактив	**мкл**
Вода деионизированная	9.0
дНТФ	5.0
Праймеры (смесь прямых, обратных праймеров и зондов)	2.4
10х ПЦР – буфер	5.0
Taq – полимераза	0.6
Ревертаза	0.6
Проба	18.0

С микрочипа удаляли защитную пленку, а затем помещали в картридж. В полость пластиковой рамки с помощью дозатора вносили 620 мкл минерального масла (ПМС-400) так, чтобы масло полностью закрывало поверхность микрочипа. Введение герметизирующей жидкости (ПМС-400) необходимо для минимизации риска контаминации и предотвращения испарения пробы. Приготовленный

раствор для проведения ОТПЦР (ОТПЦР-смесь + проба) вводили в микрореакторы под слой герметизирующей жидкости, как показано на рис. 28. Объем вводимого раствора в каждый микрореактор составлял 1.2 мкл.

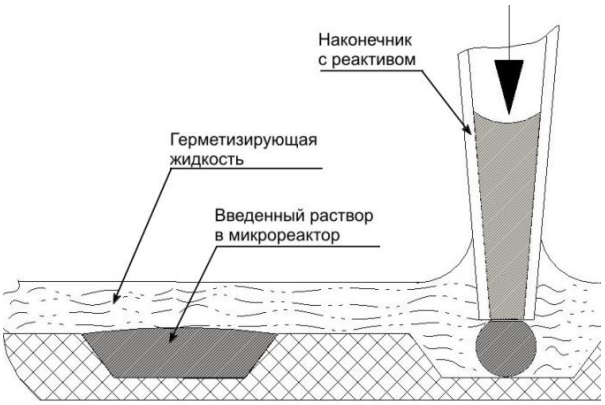


Рис. 282 Схема введения пробы в ячейки микрочипа.

Далее картридж с микрочипом помещали в микрочиповый амплификатор нуклеиновых кислот AriaDNA и указывали температурные режимы с помощью программного обеспечения прибора в зависимости от анализируемого объекта. Терморежим для ОТПЦР: определение РНК вирусов ИБК и НБ: однократное удержание при 37 °С — 1200 с; удержание при 94 °С — 180 с; термоциклирование (45 циклов): 5 с при 94 °С (денатурация), затем 20 с при 58 °С (отжиг праймеров и элонгация). Настройки детектора флуоресценции: FAM (для детектирования вируса Болезни Ньюкасла): выдержка 1000 мс; усиление 100 мс; ROX (для детектирования вируса бронхита): выдержка 800 мс; усиление 100 мс. После проведения анализа картридж с микрочипом извлекали, затем аккуратно извлекали микрочип из картриджа и помещали его в контейнер для утилизации.

II.5.2. Проведение ОТПЦР с иммобилизированными реактивами

Реактивы: раствор пробы, ПЦР-буфер.

Оборудование: ламинарный шкаф (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), дозаторы переменного объема (0.1–3.0; 0.5–10; 10–100 мкл), центрифуга для микропробирок с функцией встряхивания Vortex (Microspin-2400, BIOSAN),

амплификатор нуклеиновых кислот AriaDNA (Люмекс, Россия), дозаторы переменного объема (0.5–10 мкл, 100–1000 мкл) и наконечники к ним, микропробирки на 1.5 мл, автодозатор переменного объема (0,5–10 мкл) и наконечники к нему, алюминиевые микрочипы с иммобилизированными реактивами.

Проведение анализа: Раствор пробы и ПЦР-буфера смешивали в соотношении 9:1. Например, для 30-луночного микрочипа брали 18 мкл пробы и 2 мкл ПЦР-буфера. Далее повторяли все этапы для проведения ПЦР с жидкими реактивами.

II.6. Иммобилизация ОТПЦР-реактивов внутри микрореакторов алюминиевого микрочипа с помощью экспериментальной лиофильной установки

II.6.1. Экспериментальная установка для иммобилизации ОТПЦР-реактивов

В качестве рабочей камеры установки выбран вакуумный эксикатор объемом 4 л, позволяющий разместить хладагент и шестнадцать микрочипов в металлических планшетах (рис. 29). Стеклянные стенки эксикатора и керамическая подставка обеспечивали достаточную теплоизоляцию, сохраняя низкую температуру хладагента. Пониженное давление создавалось при помощи подсоединенного к эксикатору насоса, позволяющего напрямую работать с микрообъемами раствора, без использования конденсора.

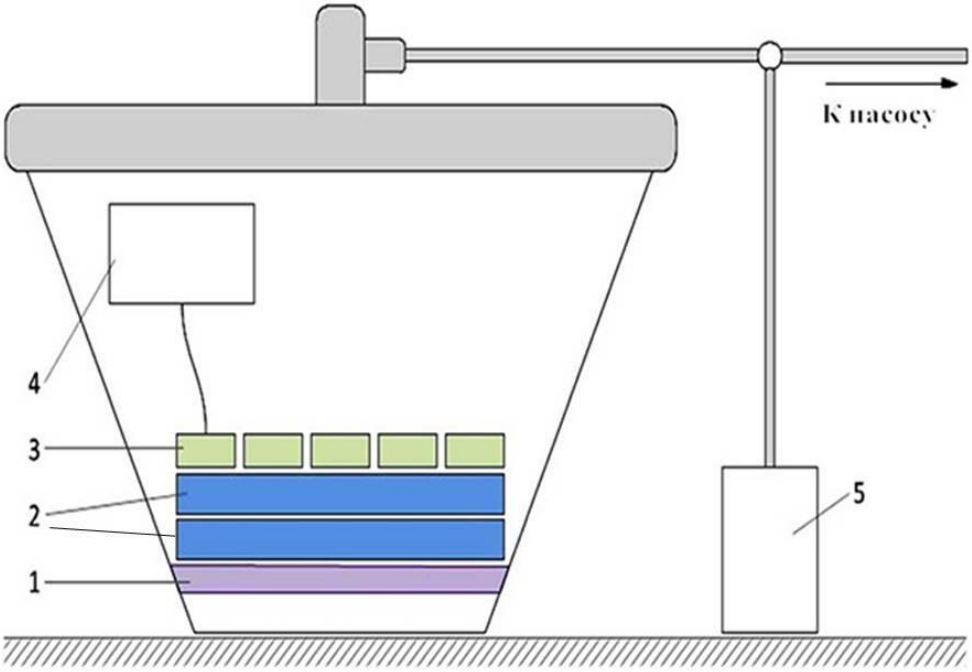


Рис. 29. На керамической подставке (1) находится хладагент (2), на поверхность хладагента помещены микрочипы (3), в т. ч. и термочип (4), давление контролируется с помощью вакуумметра (5).

Между эксикатором и насосом с помощью тройника к системе подключили вакуумметр Мерадат-ВИТ16Т1. Для контроля температуры использовался термодатчик, присоединенный к алюминиевому микрочипу с помощью термоклея. Такое устройство позволяло контролировать температуру поверхности микрочипа (рис. 30).

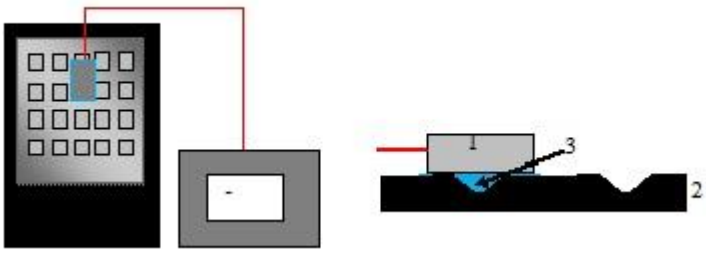


Рис. 30. Устройство термочипа: термодатчик (1) присоединен к поверхности микрочипа (2) с помощью термоклея (3).

II.6.2. Методика приготовления растворов стабилизаторов

Реактивы: D-(+)-трегалозы дигидрат (Sigma-Aldrich, USA), поливинилпирролидон (ПВП) (Sigma-Aldrich, USA), Tween 20 (Fluka Analytical, USA), бычий сывороточный альбумин (**БСА**) (Thermo Scintific, 20 мг/мл), деионизированная вода.

Оборудование: аналитические весы (WAX 60/220, RADWAG), маленький шпатель, полипропиленовый флакон на 13 мл, центрифуга для микропробирок с функцией встряхивателя Vortex (Microspin-2400, BIOSAN).

Методика приготовления стандартного раствора стабилизаторов (№ 1): навески трегалозы (0.946 г) и ПВП (0.5г) смешивали в сухом полипропиленовом флаконе на 13 мл, добавляли 0.25 мл Tween 20 и 4.75 мл деионизированной воды. Компоненты перемешивали до полного растворения трегалозы и ПВП. Непосредственно перед использованием раствор стабилизаторов разбавляли вдвое деионизированной водой (при этом концентрации трегалозы, ПВП и Tween 20 составляли соответственно 55.2, 7.6 и 4.4 ммоль/л).

Таблица 5. Состав растворов основных стабилизаторов (смесь № 1, №2 и №3) для лиофилизации ПЦР и ОТПЦР-реактивов

Компонент	Концентрация в растворе стабилизаторов, ммоль/мл, № раствора		
	1	2	3
Трегалоза	55.20	27.60	13.80
ПВП	7.60	3.78	1.90
Tween 20	4.40	2.20	1.10

Приготовление растворов БСА: для приготовления раствора БСА, концентрацией 2 мг/мл, брали 10 мкл 20 мг/мл раствора БСА и 90 мкл р-ра *трис*-HCl, тщательно перемешивали на вортексе. Растворы БСА 0.2 и 0.02 мг/мл готовили последовательным разбавлением исходного 2 мг/мл раствора.

II.6.3. Приготовление полной смеси ПЦР- и ОТПЦР-реактивов для лиофилизации

Реактивы: комплект реагентов для ОТПЦР в реальном времени (описан выше в разделе), деионизированная вода (сопротивление 18МОм); растворы стабилизаторов в концентрациях, указанных в табл. 2, растворы БСА 2, 0.2, 0.02 и 0.002 мг/мл (0.3, 0.03, 0.003, 0.0003 ммоль/л), раствор вакцины вируса ИБК, штамм Н120 (для профилактики ИБК).

Оборудование: ламинарный шкаф (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), микропробирки на 1,5 мл, дозаторы переменного объема (0.1–3.0; 0.5–10; 10–100 мкл) и наконечники к ним, центрифуга для микропробирок с функцией встряхивания Vortex (Microspin-2400, BIOSAN).

Приготовление смеси ОТПЦР реагентов для иммобилизации: смесь для иммобилизации готовили непосредственно перед использованием и не хранили. Состав смеси объемом 31 мкл (рассчитано на 1 микрочип) приведен в табл. 6.

Таблица 6. Составы лиофильных растворов для иммобилизации ОТПЦР-реактивов, а также плазмид и вакцин в микрореакторах алюминиевых микрочипов

Номер смеси, компонент, мкл	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Раствор стабилизаторов	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50
ДНТФ, 2,5 мМ	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Taq Полимераза	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Ревертаза	0.75	–	0.75	0.75	0.75
Раствор праймеров	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60
Вода деионизированная	14.55	15.30	–	–	–
Раствор БСА	–	–	14.55	14.55	14.55
Раствор вакцины	–	–	–	18.00	–
Раствор плазмиды	–	–	–	–	18.00

II.6.4. Методика иммобилизации реактивов внутри ячеек алюминиевого микрочипа

Реактивы: приготовленные для лиофилизации смеси.

Оборудование: вакуумный эксикатор, насос, морозильная камера (Т = –18 °С), штативы для микрочипов, вакуумметр Мерадат-ВИТ16Т1, автодозатор переменного объема (0.5–10 мкл) и наконечники к нему, алюминиевые микрочипы.

Методика лиофилизации

Лиофильную смесь раскапывали в ячейки микрочипов с помощью одноканального электронного дозатора в режиме многократного дозирования. Объем вводимой в ячейку смеси составлял 1 мкл для 30-луночных чипов. Готовые микрочипы размещали на штативах, предварительно выдержанных в морозильной камере при температуре –18 °С, для замораживания лиофильной смеси. Далее штативы с чипами помещали в вакуумный эксикатор, в котором с помощью насоса создавалось пониженное давление. Вакуумный эксикатор непосредственно перед использованием снабжался металлическими аккумуляторами холода в количестве 2 – 3 шт., предварительно выдержанными при температуре –18 °С. При давлении на уровне 100 Па и низкой температуре высушивали чипы в течение 120 минут. После завершения лиофилизации для защиты микрочипа от попадания загрязнений, рабочую поверхность микрочипа заклеивали защитной полимерной пленкой.

II.6.5. Методика искусственного старения микрочипов с иммобилизированными реагентами

Оборудование: термостат для микропробирок от 25 до 100 °С (ДНК-технология), микрочипы с иммобилизированными реагентами.

Проведение искусственного старения: определение срока годности микрочипов методом искусственного старения подразумевает выдерживание микрочипов на поверхности термостата при заданной температуре в течение определенного интервала времени. Для опытов использовали термостат, автоматически поддерживающий заданную температуру экспериментального

хранения $t_э$ в течение всего опыта с точностью ± 0,5 °С. Выбранная температура для ускоренного старения составила 35 °С, длительность эксперимента – 6 дней.

II.7. Исследование морфологической структуры лиофильных пленок методом сканирующей электронной микроскопии

Для исследования морфологической структуры иммобилизированных реагентов с помощью микроскопии лиофильную смесь лиофилизировали на специальной подложке в виде медной сетки для микроскопии. В работе использовался сканирующий электронный микроскоп Zeiss Merlin (Научный Парк СПбГУ) с полевым эмиссионным катодом, колонной электронной оптикой GEMINI-II и безмаслянной вакуумной системой. Помимо детекторов вторичных электронов In-lens SE и SE2, микроскоп оснащен дополнительной приставкой для рентгеновского микроанализа Oxford Instruments INCAx-act. Ускоряющее напряжение составило 15 кВ.

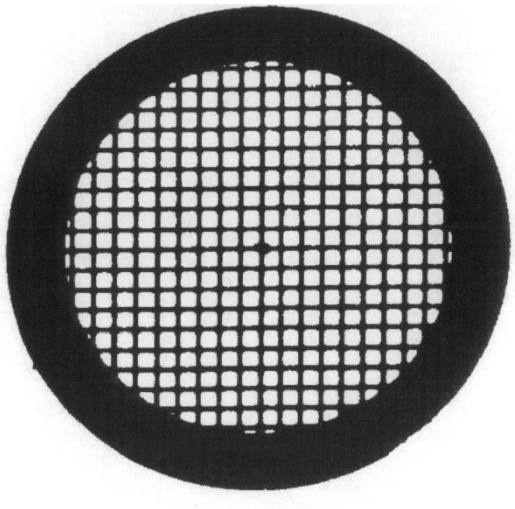


Рис. 31 Медная подложка для исследования лиофильных пленок методом сканирующей электронной микроскопии.

III. Результаты плазмохимического осаждения пленок на поверхности алюминиевых микрочипов

Для создания на поверхности алюминиевых микрочипов покрытий, обеспечивающих условия, близкие к проведению ПЦР в классических инертных полипропиленовых пробирках, в данной работе выбраны два основных мономера: ГМДС, который способен обеспечить адгезию покрытия к алюминию за счет ковалентных полярных связей Si–O и ацетилен, обладающий высокими скоростями его полимеризации в плазме [149].

Большинство современных теорий о механизме Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (**PECVD**) описывают в качестве интермедиата в реакциях ПХО именно ацетилен, поэтому можно предположить, что основные пути реакций, и структура покрытия представляли трехмерную полимерную сетку с полистирольными фрагментами, описанную в работе [150].

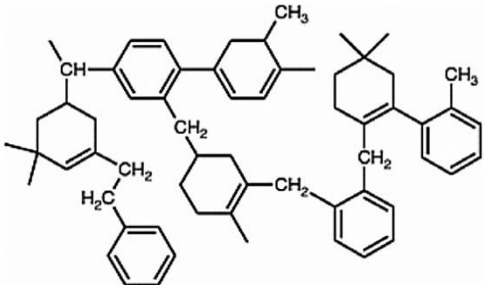


Рис. 32. Структура пленки, полученной методом PECVD в плазме углеводородов согласно основным теориям, описывающим полимеризацию в плазме с химической точки зрения [152].

В качестве газа-носителя для PECVD как правило, используют инертные газы, не влияющие на структуру получаемого полимера, например аргон. Подбор условий для плазмохимического осаждения покрытий на алюминии, а также контроль свойств полученных пленок осуществлялись по нескольким основным параметрам. В первую очередь варьировалась мощность высокочастотного генератора (W, Вт), значение которой изменяли в пределах от 10 до 40 Вт для регулирования скорости нанесения и степени фрагментации мономера.

Предполагалось, что регулировать толщину покрытия может параметр времени нанесения (t, мин), который изменяли в диапазоне от 2 до 20 мин. Расход газа-носителя и мономера (мл/мин давление в камере (Па) являлись производными величинами от концентрации мономера. Данные величины зафиксировали после подбора оптимальных условий впрыскивания жидких мономеров в реакционную камеру и, таким образом, в дальнейшем изменяли только параметры мощности генератора плазмы и время нанесения.

Для выявления зависимости свойств покрытий от условий их нанесения получена серия из шести образцов, условно обозначены буквами A–F с различными параметрами четвертой стадии осаждения: временем (2–20 мин) и мощностью (10–40 Вт) осаждения в плазме ацетилена. С целью сохранения гидрофильности поверхности, последней стадией PECVD стала обработка в плазме кислорода (стадия 5) в течение 6 с, во избежание деструкции покрытия за счет дальнейшего окисления остаточных поверхностных радикалов при хранении на воздухе.

Эксперименты по оптимизации условий ПХО для одного мономера (ГМДС) предложено использование двух стадий нанесения покрытия в различных режимах. Первая стадия синтеза в режиме пониженной мощности служит для создания органического покрытия с высокой адгезией к поверхности алюминия за счет образования связей Al–O–Si, а вторая стадия служила для нанесения более плотного полимерного слоя в условиях повышенной мощности разряда. Такой подход хорошо согласуется механизмом роста пленок в плазме, приведенном в работе [150].

III.1.Оценка инертности углеродсодержащих покрытий в условиях ПЦР

Важным критерием, который характеризует эффективность защиты поверхности микрочипа, является отсутствие пузырьков на его поверхности при нагревании ПЦР-буфера в микрореакторах до 94 °C. Как уже было отмечено

ранее, реакция активных компонентов ПЦР-смеси с необработанным алюминием на поверхности микрочипа сопровождается выделением газообразных продуктов, которые сильно затрудняют детектирование флуоресценции и значительно снижают аналитические характеристики ОТПЦР в режиме реального времени. Для оценки инертности получаемого плазмохимического покрытия в достаточно жестких температурных условиях ПЦР провели термоциклирование модельного раствора (ПЦР-буфер (Evrogen) и 10^{-7} М флуоресцеин, pH 8,3).

Количество пузырьков, которые образовывались в микрореакторах чипа, фиксировали с помощью флуоресцентного детектора ПЦР-амплификатора «АриаДНА» (Люмэкс, Россия). На рис. 33 приведены результаты для необработанной пластины и для и модифицированной поверхности.

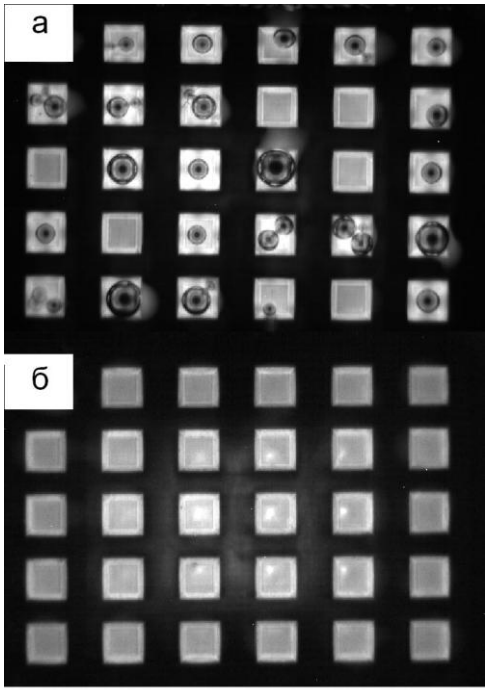


Рис. 33. Визуальная оценка инертности поверхности ПЦР-микрочипа при нагреве модельного раствора до 94 °С в течение 2 мин: а – необработанная пластина алюминия (контрольный образец А), б – образец В, модифицированный в плазме.

Чтобы количественно оценить степень инертности полученных покрытий в условиях ОТПЦР, создана приближенная математическая модель, которая

позволила сравнивать качество поверхности алюминиевых микрочипов, обработанных разными способами. В рамках этой модели с помощью численных коэффициентов оценили влияние отдельно взятого пузырька на флуоресцентный сигнал, полученный из конкретного микрореактора в микрочипе. Количество пузырьков фиксировали с помощью цифрового объектива. Режим термоциклирования модельного раствора состоял из двух температурных ступеней: предварительный прогрев в течение 20 с при 85 °C и непосредственно ступень плавления — 120 с при 94 °C.

Согласно предложенной модели величина F отражала активность поверхности: чем больше значение F, тем больше газообразных продуктов фиксировалось на поверхности микрочипа и тем менее эффективным предложенное покрытие считалось в условиях ОТПЦР. Ввиду разного размера пузырьков введены поправочные коэффициенты, которые отражали бы степень влияния пузырька на величину флуоресценции:

$$F = \frac{1}{0.05\,S_{85} + 0.075\,S_{94} + 0.25\,L_{85} + 0.0125\,L_{94} + 0.5\,B}$$

, где

S_{85} — количество пузырьков, занимающих меньше ¼ ячейки, при 85 °C;

S_{94} — количество пузырьков, занимающих меньше ¼ ячейки, при 94 °C;

L_{85} — количество пузырьков, занимающих больше ¼ ячейки, при 85 °C;

L_{94} — количество пузырьков, занимающих больше ¼ ячейки, при 94 °C;

B — число ячеек, характеризующихся непрерывным выделением пузырьков.

Для минимизации погрешности произведено усреднение параметра F по результатам измерений нескольких микрочипов.

Предложенная модель показал результаты, хорошо согласующиеся с характером фоновых кривых в модельных ПЦР. На диаграмме (рис. 34) показаны величины F, полученные для микрочипов с разной обработкой поверхности. Как видно из диаграммы, величина F для необработанных пластин принимает очень маленькие значения. На поверхности исходных образцов наблюдается сильное

газообразование, проведение ОТПЦР характеризуется очень сильными колебаниями фона, что свидетельствует об отсутствии защитных свойств у таких микрочипов. Плазмохимическая обработка микрочипов с применением октанола и толуола и НПАВ также не показала эффективного уменьшения газообразных продуктов.

Из всего ряда спиртов в качестве мономеров для ПХО только покрытие на основе изопропанола обладало большим значением F. Однако, при повторном измерении F спустя несколько дней хранения данной серии микрочипов, полученная пленка показала существенное ухудшение защитных свойств. Предположительно, такое поведение связано со значительной потерей адгезии пленки к поверхности алюминия при хранении, что может быть связано с окислением покрытия на воздухе. Несколько большая инертность получена для покрытия на основе гептана.

Максимального значения F удалось добиться, используя в качестве мономеров ГМДС и ацетилен. На алюминиевых пластинах с образованными за счет полимеризации пленками газообразные продукты взаимодействия с поверхностью практически отсутствовали. Стоит отметить, что пленки на основе ГМДС, гептана и ацетилена не показывали ухудшения инертности в процессе хранения.

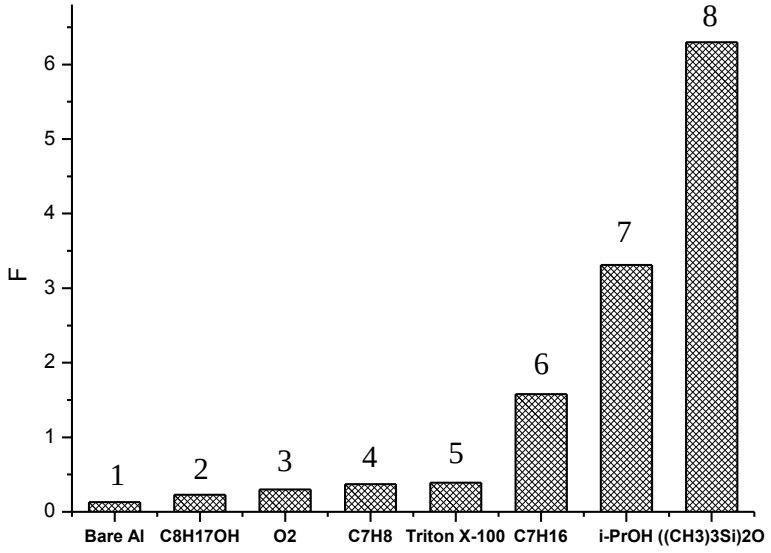


Рис. 34. Диаграмма значений величины F для пленок, полученных методом ПХО : 1— контрольный образец: необработанный алюминий, 2— октанол, 3 — контрольный образец: очищенный алюминий в плазме, 4 — толуол, 5 — Тритон X-100, 6 — гептан,7 — изопропанол, 8 — ГМДС.

III.2. Исследование углеродсодержащих пленок с помощью спектроскопии электрохимического импеданса

Анализ полученных покрытий методом ЭИС проводили in situ, а для точного моделирования условий ОТПЦР использовали раствор ПЦР-буфера. Известно, что для образцов, которые не теряют адгезию и не поддаются видимой коррозии, модуль импеданса принимает значения от 10^7 Ом при 0.1 Гц [64].

На спектре Боде представлены кривые импеданса для серии алюминиевых пластин с покрытием, в сравнении с данными для необработанной пластины и пластины, очищенной в плазме кислорода и аргона (рис. 35).

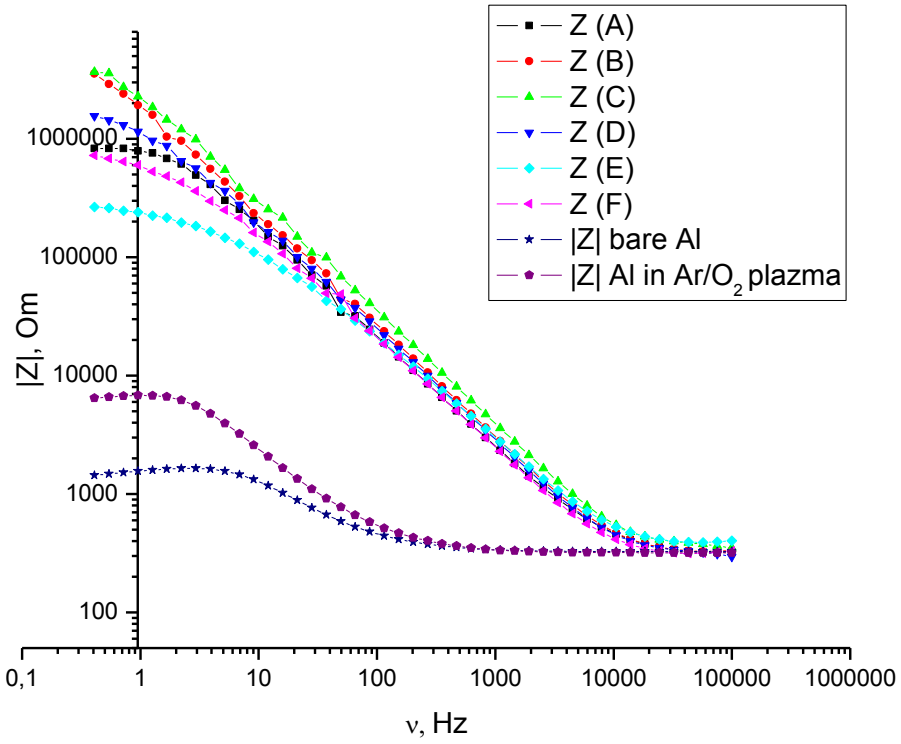


Рис.35. Спектры Боде (зависимость модуля импеданса от частоты), полученные для алюминиевых пластин, обработанных методом ПХО.

Полученные ЭИС-спектры сравнивались по величине |Z| при частоте переменного тока ν = 1 Гц. Из рис. 35 видно, что область высоких частот, характеризующая модуль импеданса $|Z|_{р\text{-}ра}$, имеет одинаковую величину для всех образцов, что указывает на соблюдение постоянства условий анализа. В области низких частот очевидны резкие различия. Так, значения модуля импеданса при ν = 1 Гц для серии пластин с покрытиями A–D как минимум в 500 раз выше, чем для пластин, не подвергавшихся плазмохимической обработке (табл. 7) — следовательно, пластины с покрытиями обладают гораздо большей инертностью в растворе при pH 8.3. При этом, обработки в плазме кислорода и аргона явно недостаточно для пассивации поверхности, так как модуль импеданса в случае таких микрочипов незначительно превышает аналогичную величину для необработанной пластины (6.1 и 1.6 кОм соответственно).

Таблица 7. Величина модуля импеданса для серии образцов с покрытиями, а также необработанной пластины и пластины, окисленной в плазме кислорода и аргона

Образец	$\|Z\|_{\nu = 1Гц}$, кОм
Необработанный	1.6
Плазма Ar/O_2	6.8
A	787.1
B	1918.2
C	2276.0
D	1148.5
E	239.4
F	599.5

Что касается различий в величине |Z| для образцов серии, очевидно следующее: время нанесения покрытия в плазме ацетилена t_4 для образцов E (t_4 = 5 мин) и F (t_4 = 2 мин) является недостаточным, и покрытие является не совсем инертным при pH 8.3. Однако, модуль импеданса данных образцов значительно превышает Z необработанной пластины в сотни раз. Наилучшими показателями |Z| обладают образцы B, C, и D.

Стоит рассмотреть отдельно спектр импеданса для пленки на основе гептана. Рисунок 36 показывает значительный проскок значения импеданса при малых частотах для данной пленки, что, возможно, связано с потерей адгезии такого покрытия на данных частотах.

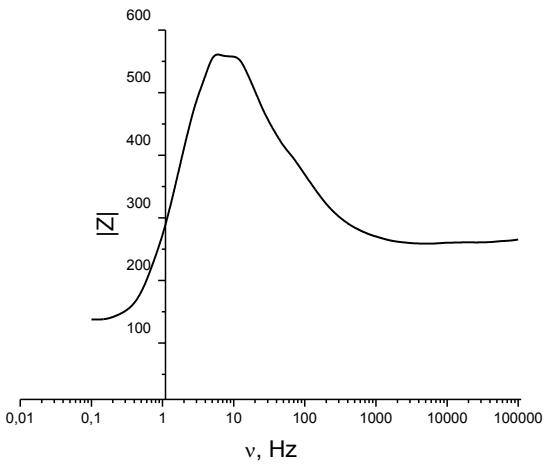


Рис 36. Спектр ЭИС для образца, полученного в плазме гептана в диапазоне частот – 0–100 кГц при потенциале E = –1.1 В в контакте с ПЦР-буфером.

III.3. Исследование морфологических свойств покрытий методом сканирующей электронной микроскопии и оценка состава полученных пленок методом рентгеновской энергодисперсионной спектроскопии

Для оценки толщины и однородности полученных пленок получены СЭМ-изображения скола образцов-свидетелей, представляющих собой кремниевые микрочипы с синтезированными на их поверхности углеродсодержащими пленками, идентичными алюминиевым образцам (рис. 37).

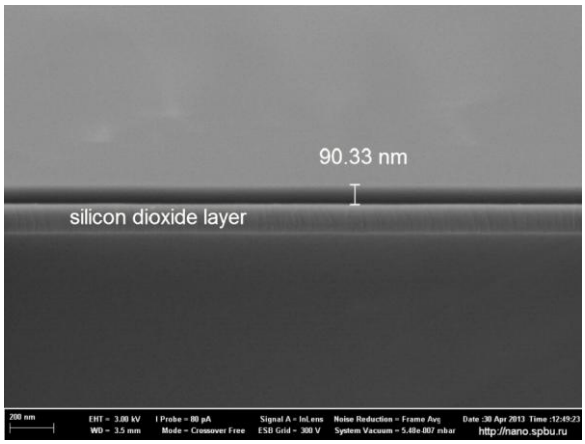


Рис 37. СЭМ-изображение скола кремниевого микрочипа с синтезированной пленкой для оценки толщины покрытия.

Результаты изменения толщины полученных покрытий в зависимости от условий ПХО приведены в табл. 8.

Таблица 8. Значения толщины полученных покрытий, полученные путем обработки СЭМ-изображений (n = 5, P = 0.95)

Образец	**$t_{4,\ мин}$**	**$W_{4,\ Вт}$**	**Толщина покрытия, нм**
A	10	40	267.9 ± 12.7
B	**10**	**20**	318.1 ± 40.1
C	**10**	**20**	299.7 ± 27.9
D	10	10	320.6 ± 24.9
E	5	40	312.6 ± 37.3
F	2	40	304.1 ± 29.2

Согласно полученным данным, следует интересный факт, что все покрытия имеют приблизительно одинаковую толщину (в пределах погрешности). Исходя из этого, можно предположить, что процесс нанесения пленки характеризуется независимыми от мощности генератора и времени нанесения параметрами исходных мономеров (химическая природа, скорости полимеризации в плазме) ввиду того, что после достижения определенной толщины начинается абляция покрытия.

Рисунок 38 иллюстрирует СЭМ-изображение скола кремниевого микрочипа с покрытием (в данном случае, образец B), подтверждающий такие характеристики покрытия, как однородность и постоянная толщина в пределах рассматриваемого профиля. Однородность полученной пленки и отсутствие трещин, а, следовательно, минимальная напряженность связей характерны для процессов низкотемпературного плазмохимического осаждения[151].

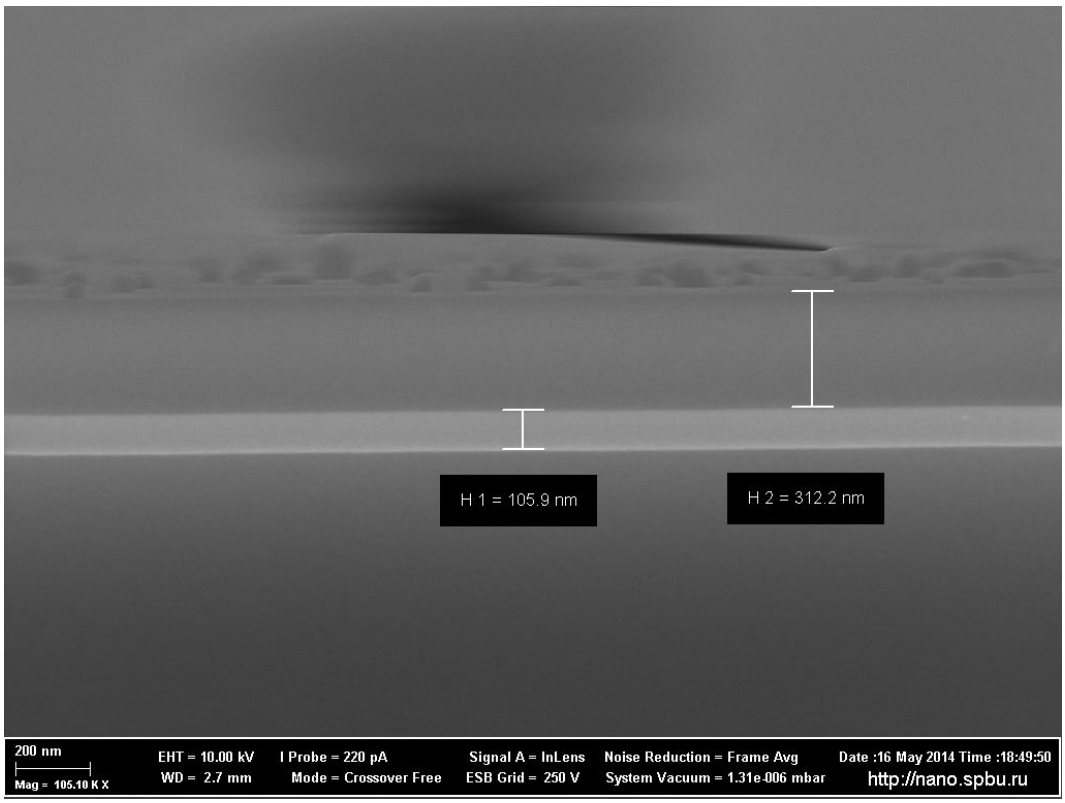


Рис. 38. Изображение скола покрытия на поверхности кремниевого микрочипа. Нижний слой – монокристаллический кремний; средний (толщина 105.9 нм – слой диоксида кремния, полученный при изготовлении пластины; верхний слой толщиной 312.2 нм – покрытие, полученное методом плазмохимического осаждения).

Следует отметить, что, несмотря на двухэтапное нанесение покрытия, визуально детектируется только один слой. Ввиду того, что на протяжении всего эксперимента в камере поддерживалась постоянное давление, поэтому и концентрация плазмообразующих веществ в камере также была постоянной. В таком случае можно говорить о сходной кинетике процесса на стадиях 3 и 4 плазмохимического синтеза, что привело к встраиванию верхнего, ацетиленового слоя покрытия в нижний, состоящий из продуктов полимеризации ГМДС.

Следует отметить, что на поверхности пластин при мощности нанесения 20 Вт и выше (образцы A, B, C,) характерно образование осадка продуктов полимеризации ацетилена в объеме камеры на стадии синтеза углеродсодержащего покрытия (стадия 4). Изображение, демонстрирующее структуру частиц данного продукта, представлено на рис 39.а Более того, в процессе нанесения покрытия в условиях высокой мощности генератора

алмазоподобные частички слипались в объеме камеры, образуя на поверхности разветвленные цепи и агломератов достаточно близких размеров (рис 39., б)

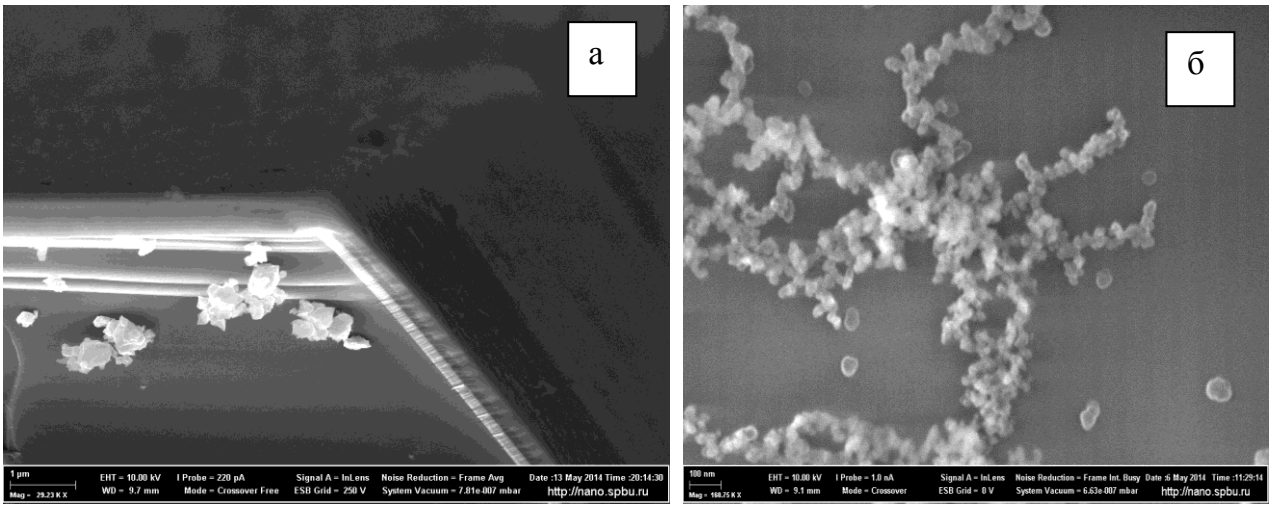


Рис. 39. а - СЭМ-изображение образца А с частицами продукта объемной полимеризации ацетилена в плазме на стадии синтеза углеродсодержащего покрытия. б - СЭМ-изображение образца F с разветвленным цепями агломератов алмазоподобных частиц.

На поверхности покрытия данные частицы могут образовывать конгломераты, которые можно увидеть на рис. 40 в случае гептана.

Рис.40 СЭМ изображение покрытия, полученного с помощью обработки в плазме гептана.

Для оценки элементного состава полученных пленок пользовались следующими допущениями. EDX-спектры полученных образцов снимались в областях, указанных на рис 41. В связи со сложным рельефом поверхности микрочипа, существуют некоторые различия в толщине покрытия в ячейке и вне ее, поэтому наиболее объективно, по нашему мнению, оценивать только спектры, снятые внутри ячейки (области 5, 6, и 7 на рис. 41), так как именно эта поверхность активно взаимодействует с ПЦР-реагентами в дальнейшем. Полученные интенсивности пиков элементов (в %) усреднялись по трем областям.

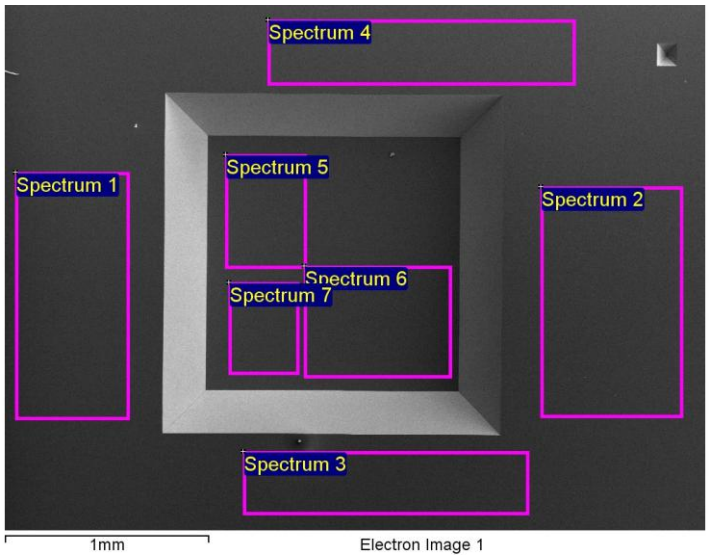


Рис. 41. Области снятия EDX-спектров покрытий для оценки элементного состава.

Результаты элементного анализа полученных пленок представлены в табл. 9. В составе покрытий присутствуют все элементы плазмообразующих веществ и пластины микрочипа (C, H, O, Si, Al) и отсутствуют сторонние элементы, что свидетельствует о корректности проведения микроанализа.

Таблица 9. Данные рентгеновского энергодисперсионного микроанализа для серии алюминиевых пластин с покрытиями, а также для необработанной пластины и пластины, обработанной в плазме кислорода (n = 3, P = 0.95)

Образец	t4, мин	W_4, % 200 Вт	C, %	O,%	Si, %	Al, %
A	10	20	48.1 ± 0.2	10.4 ± 0.3	3.9 ± 0.0	37.6 ± 0.3
B	10	15	48.2 ± 0.1	9.9 ± 0.2	3.8 ± 0.1	38.2 ± 0.0
C	10	10	48.1 ± 0.2	9.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1	38.4 ± 0.0
D	10	5	50.2 ± 0.3	11.1 ± 0.3	4.7 ± 0.1	33.9 ± 0.4
E	5	20	47.0 ± 0.2	10.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1	39.1 ± 0.1
F	2	20	47.3 ± 0.3	9.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	39.1 ± 0.4
Необ. Al	0	0	17.4 ± 1.3	4.0 ± 0.3	0.0 ± 0.0	78.6 ± 1.5
Об-тка в плазме Ar и O2	0	0	5.5 ± 4.3	4.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	89.7 ± 4.4
Среднее по образцам A–F			48.2 ± 1.1	10.2 ± 0.5	4.0 ± 0.4	37.7 ± 1.9

Так, относительная интенсивность пика углерода для необработанной пластины указывает на наличие органических загрязнений, возможно связанных с штамповочным маслом, что подтверждает необходимость плазмохимической очистки алюминиевых пластин. Высокое содержание углерода в контрольном образце (необработанный алюминий) обуславливается остатками масла с механического штампа, который использовали при штамповке микрореакторов, и прочими органическими загрязнителями. Отметим, что именно поэтому предложено очищать алюминиевые пластины путем отмывки в растворителях перед обработкой в плазме. Для образца, обработанного только в плазме кислорода и аргона характерно резкое снижение содержания углерода за счет

плазменной очистки. Однако прирост содержания кислорода для этого образца очень незначительный, что свидетельствует о малом изменении толщины слоя оксида алюминия в плазме кислорода. Слабые защитные свойства полученного слоя подтверждаются еще и тем, что подобные алюминиевые пластины не обладают достаточной инертностью в слабощелочной среде ПЦР-буфера при нагревании. Для увеличения толщины и повышения однородности слоя оксида алюминия необходимо было бы существенно увеличить время кислородной обработки алюминиевых пластин, однако при внедрении данной методики в производство время обработки желательно ограничить. Поиск компромисса между скоростью нанесения пленки и свойствами ее поверхности и привел к необходимости нанесения композитных покрытий.

Из приведенных данных видно, что относительная интенсивность пика углерода значительно возрастает для образцов с покрытием, это дополнительно свидетельствует о наличии углеродсодержащей пленки на поверхности, при этом значение варьируется в пределах 1%, что позволяет сделать предположение об относительном постоянстве состава покрытий в серии. Содержание кремния имеет еще меньший разброс в пределах серии покрытий (0.4%) – следовательно, толщина слоя, полученного в плазме ГМДС постоянна по составу и толщине, что подтверждает возможность получения воспроизводимых пленок методом плазмохимического осаждения. Стоить отметить высокую однородность элементного состава полученных пленок по всей исследуемой поверхности микрочипа.

III. 4. Оценка состава покрытия методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Raman)

В работе [152] при доказательстве структуры пленок, полученных в плазме ацетилена, рассматриваются характеристичные G- и D- полосы как подтверждение структуры покрытия. На рис. 42 представлены спектры

комбинационного рассеяния для образцов A – F. Из-за высокого уровня шума проведено сглаживание спектров в программе Origin. Упомянутые полосы хорошо видны на полученных спектрах.

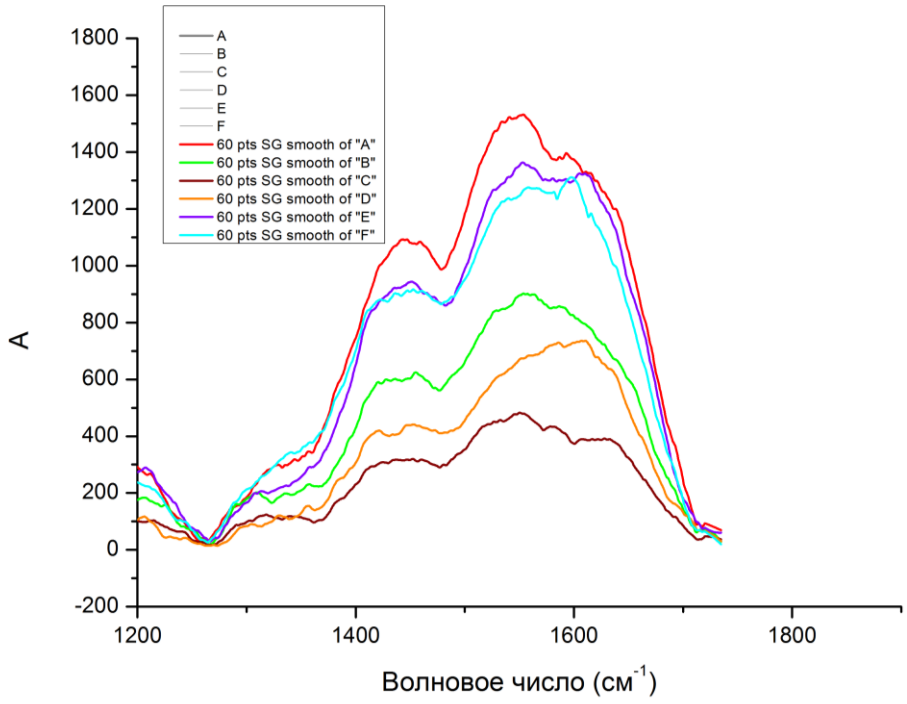


Рис. 42. Спектр комбинационного рассеяния пленок A–F на поверхности алюминиевых микрочипов на приборе SENTERRA (Bruker): спектральный диапазон регистрации спектров КР: 80–4500см–1, спектральное разрешение: 3 см–1, длина волны возбуждающего лазера: 532 нм.

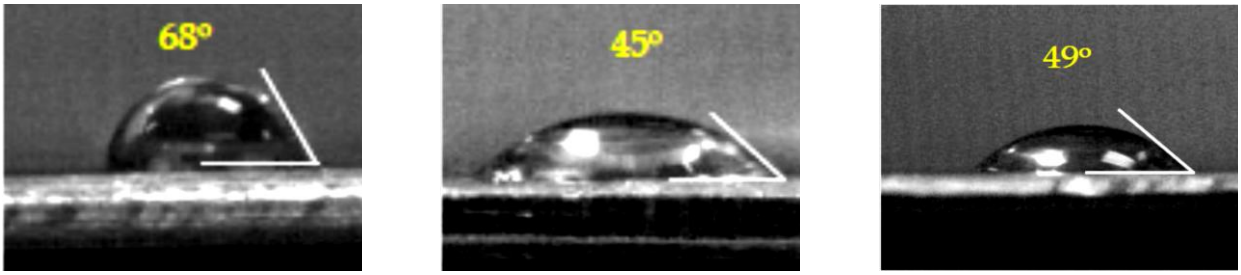
Существующий разброс в расположении полос в спектре (см$^{-1}$) можно объяснить небольшой толщиной пленки (около 300 нм) и высоким уровнем шумов в спектре. Перекрывание полос также препятствует определению точного положения максимумов пиков. Тем не менее, очевидно наличие полос D- и G- (1350 и ~ 1585 см$^{-1}$ соответственно). Согласно существующим данным [153] G-полоса соответствует C–C решеточным колебаниям, а D полоса обычно связывается с малыми размерами областей упорядочения и может служить характеристикой степени дефектности материала. Низкая интенсивность D-полосы может указывать на то, что структура полученной пленки достаточно

регулярна. При этом, интенсивность «графитового» G-пика позволяет предположить, что пленки имеют структуру α–C:H [149], в которой преобладает sp^2-гибридизованный углерод.

Наличие полосы при ≈ 1450 $см^{-1}$ во всех спектрах следует соотнести с присутствием углекислого газа в системе.

III.5. Измерение контактного угла смачивания поверхности микрочипов водой

После обработки алюминиевых пластин в плазме и синтезе на их поверхности углеродсодержщих пленок большой интерес представляло исследовать гидрофильные свойства полученной поверхности ввиду того, что для осуществления ОТПЦР капля внутри микрореактора обязательно должна растекаться. На рис. 43 представлены результаты измерения контактного угла.



а) б) в)

Рис. 43 Результаты измерения краевого угла смачивания поверхности алюминиевых микрочипов водой: а) – необработанный алюминий; б) – обработка в плазме кислорода и аргона; в) – после всех стадий обработки.

Таким образом, после синтеза пленки поверхность алюминия обладает достаточной мерой гидрофильности, сравнимой с очищенной и частично окисленной поверхностью чистого металлического алюминия, полученные микрочипы можно использовать при проведении ОТПЦР и в дальнейших манипуляциях (лиофилизации реактивов на поверхности).

III.6. Проведение ОТПЦР на микрочипах с нанесенными углеродсодержащими пленками с использованием микрочипового ПЦР-анализатора

Известно, что при проведении ОТПЦР в микрореакторах увеличивается вероятность ингибирования реакции из-за необратимой сорбции компонентов ПЦР смеси и деактивации фермента Taq-полимеразы [154]. В работе [155] показано, что использование необработанного алюминия для проведения ПЦР приводит к ингибированию реакции. Авторы предложили наносить на поверхность фольги полимерное покрытие толщиной 5 мкм, с гидрофобными свойствами, а также использовали бычий сывороточный альбумин в качестве динамического пассиватора. Однако применение полимерных покрытий с большой толщиной препятствует достижению высоких скоростей нагрева и охлаждения, а применение высоких концентраций БСА может привести к изменению условий протекания ОТПЦР, поэтому создание тонких покрытий, которые препятствуют подобным процессам, представляет большой практический интерес. Биосовместимость полученных покрытий проверяли в условиях ПЦР в микрочиповом анализаторе «АриаДНА» (Люмэкс, Россия).

Влияние поверхности на проведение ОТПЦР можно оценить путем сравнения величин порогового цикла (C_t) для микрочипов с покрытием (образцы A–F) и для микрочипов, обработанных только в плазме кислорода и аргона. Сравнение проводили как для РНК, так и для ДНК.

Выбранный термопротокол анализа пробы 35S позволил оценить не только устойчивость полученных покрытий в условиях ПЦР, но и их резистивность к резким перепадам температур в процессе реакции.

Следует отметить, что в случае РНК-содержащих проб вероятность ингибирования возрастает [154], а термопротокол в данном случае также занимает в два раза больше времени. Исходя из всего выше сказанного, можно было бы

ожидать неудовлетворительных результатов при проведении ОТПЦР для РНК-содержащих проб при достаточно эффективном прохождении классической ПЦР.

Пороговые циклы ПЦР и ОТПЦР в зависимости от условий обработки пластин представлены в табл. 10.

Таблица 10. Результаты ПЦР-анализа проб РНК на полученных микрочипах с углеродсодержащим покрытием

Образец	**t_4, мин**	**W_4, Вт**	**C_t, номер цикла (n = 10, P = 0.95)**		
			35S	**НБ (зонд FAM)**	**ИБК (зонд ROX)**
Ar/O_2	–	–	**25.0 ± 0.2**	**18.8 ± 0.1**	**20.0 ± 0.2**
A	10	40	23.5 ± 0.4	17.1 ± 0.3	21.2 ± 0.2
B	**10**	**20**	25.8 ± 0.6	16.9 ± 0.1	17.3 ± 0.1
C	**10**	**20**	25.1 ± 0.1	17.3 ± 0.6	16.4 ± 0.1
D	10	10	25.1 ± 1.1	18.0 ± 0.5	18.1 ± 0.1
E	5	40	30.9 ± 0.1	16.4 ± 0.3	17.8 ± 0.3
F	2	40	24.1 ± 0.1	Не старт	20.2 ± 0.1

При сравнении величины порогового цикла ПЦР $\mathbf{C_t}$ для анализа ДНК 35S видно, что величина $\mathbf{C_t}$ для образцов A и F меньше, чем для алюминиевого микрочипа без обработки в плазме таким образом, эти образцы можно считать оптимальными для проведения ПЦР.

Тот же набор микрочипов проанализирован в условиях ОТПЦР. Согласно табл. 4 отсутствие ингибирования ОТПЦР характерно для образцов B, C, D, E. При этом образцы B и E по результатам ОТПЦР-анализа оказались неустойчивыми к перепадам температуры.

Таким образом, оптимальным сочетанием характеристик по результатам ОТПЦР и ПЦР-анализа обладают образцы C и D. Также, стоит отметить образец B, обладающий отличными характеристиками, но при этом с большим разбросом величины Ct для анализа ДНК.

Следует отметить, что использование повышенной мощности разряда во второй стадии синтеза ГМДС-покрытий позволило добиться гидрофильных свойств поверхности (контактный угол составил примерно 50°), что обеспечило достаточно эффективное растекание ПЦР-раствора при введении его в микрореакторы чипа с полученным покрытием. Гидрофильные свойства подобного покрытия обеспечили хороший термический контакт раствора с поверхностью микрочипа, что определило высокие скорости нагрева и охлаждения, характерные для микрочиповых аналитических систем молекулярно-генетического анализа.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что из множества известных мономеров, которые используются при плазмохимическом синтезе покрытий, самым перспективным является ГМДС и ацетилен. При этом образуется плотная однородная углеродсодержащая пленка, которая надежно защищает поверхность микрочипа от взаимодействия с ПЦР-буфером и не ингибирует амплификацию. Также исследование показало, что пленки, полученные из спиртов, деградируют при хранении на воздухе, а пленки, полученные из углеводородов, имеют небольшую адгезию к поверхности алюминия, что отрицательно влияет на их работоспособность в среде ОТПЦР.

IV. Подбор оптимальных физических условий для иммобилизации ПЦР реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов на примере ДНК-систем

IV.1. Оптимизация методики модификации поверхности подложки микрочипа

В процессе иммобилизации ПЦР-реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов вопрос инертной поверхности и ингибирования ферментов становится еще более актуальным. Так, при обработке поверхности алюминиевых микрочипов химическими агентами (щелочи, кислоты, и т.д.) удается получить кривые ПЦР с небольшим разбросом и достаточно низкими значениями фоновой линии при использовании жидких реактивов. Однако в случае последующей иммобилизации удовлетворительные результаты ПЦР удавалось получить лишь в случае кремниевых микрочипов, обладающих почти идеальной поверхностью [156]. В случае алюминиевых микрочипов наблюдалась сниженная интенсивность сигнала, невысокая эффективность реакции и малая продолжительность хранения таких микрочипов при комнатной температуре.

С другой стороны, подход плазмохимической обработки является менее деструктивным для морфологии поверхности микрочипа. К тому же, после обработки в плазме, поверхность микрочипов становится гидрофильной. Но достаточно ли степени такой гидрофильности для дальнейших манипуляций с микрочипом?

Установлено, что подложки, обработанные в плазме, в течение пяти дней теряли гидрофильные свойства, при этом иногда наблюдалось уменьшение интенсивности аналитического сигнала, а иногда и полная потеря реакционной способности. В то же время чипы, поверхность которых дополнительно

обработана специальным пассивирующим раствором, давали удовлетворительные результаты (рис. 44).

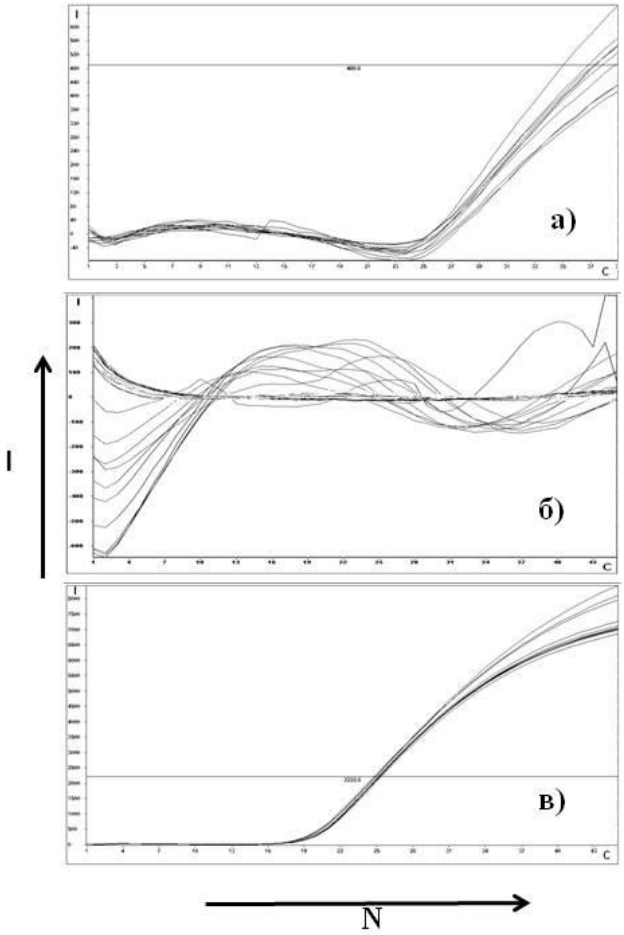


Рис. 44. ПЦР-анализ ДНК-образцов в зависимости от влияния поверхности: а), б) – потеря интенсивности аналитического сигнала; в) – отсутствие влияния поверхности после обработки поверхности.

Таким образом, для проведения ПЦР с использованием жидких реактивов, поверхность микрочипов требовалось обрабатывать пассивирующим раствором. Однако, в состав раствора ПЦР-реагентов, предназначенный для иммобилизации на поверхности микрореакторов уже входили сходные компоненты. В связи с этим представляло интерес определить, придают ли иммобилизованные реактивы поверхности микрореактора нужные гидрофильные свойства на достаточно длительное время, и, следовательно, можно ли исключить этап гидрофилизации поверхности с помощью пассивирующего раствора.

Для сравнения двух подходов в гидрофилизации поверхности подготовили две серии микрочипов с иммобилизованной тест-системой для выявления глобина в геноме человека (данная тест-система используется в клинических анализах в качестве внутреннего контроля выделения пробы из биологических образцов). Один из микрочипов подвергли предварительной гидрофилизации, на поверхности другого иммобилизировали ПЦР-реагенты непосредственно после плазмохимической обработки.

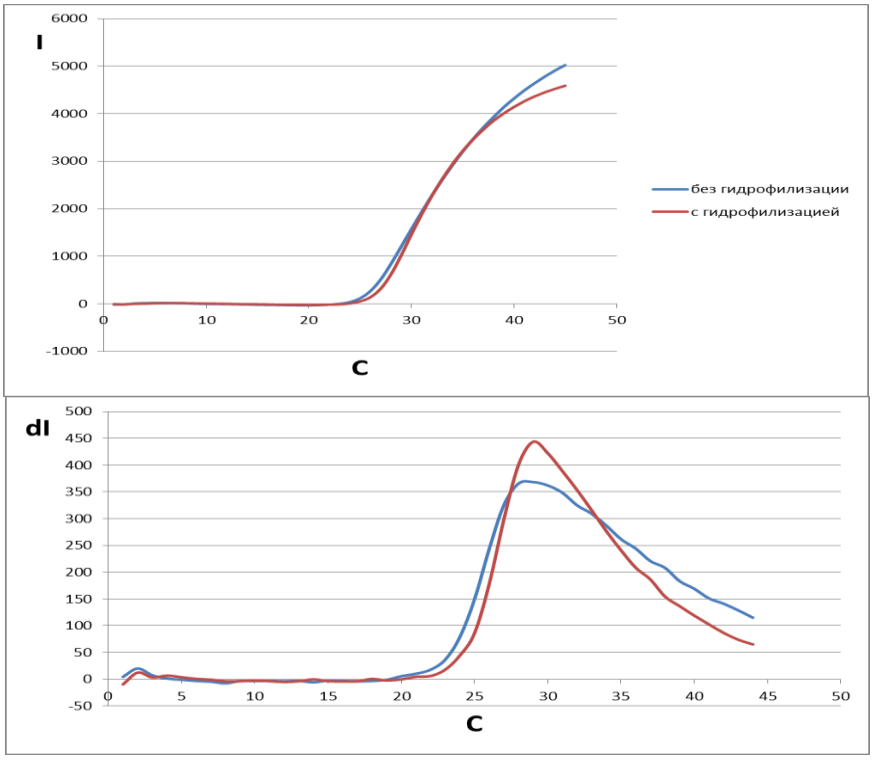


Рис. 45. Усредненные кривые ПЦР, проведенные с использованием иммобилизованных реактивов на чипах с гидрофилизацией поверхности пассивирующим раствором и без нее.

В результате ПЦР-анализа (рис. 45) показано, что исключение стадии гидрофилизации не привело к ухудшению аналитических характеристик ПЦР. Пороговые циклы совпали с точностью до доверительных интервалов (Ct = 26.9 ± 0.6 (n = 30, P = 0.95) – без гидрофилизации, Ct = 27.6 ± 0.4 (n = 28, P = 0.95 – с гидрофилизацией). В дальнейшем микрочипы, предназначенные для иммобилизации реагентов, изготавливались без стадии гидрофилизации

поверхности пассивирующим раствором. Таким образом, удалось сократить число технологических операций по подготовке микрочипов.

IV.2. Оптимизация условий для экспериментальной установки для иммобилизации реактивов

При использовании лиофилизации как метода иммобилизации ПЦР-реактивов требуется соблюдение определенных условий. В классическом понимании метода лиофилизации высушиваемый препарат необходимо предварительно заморозить, а затем сублимировать растворитель внутри вакуумной камеры. При этом важно сохранять препарат в замороженном состоянии, чтобы избежать кипения раствора. Температура препарата не должна превысить 0 °C (в случае использования в качестве растворителя воды) до того момента, пока давление в системе не опустится до уровня тройной точки воды, т. е. до 611 Па [157].

В предыдущих наших работах [160] предложен метод лиофилизации ПЦР реактивов на поверхности микрочипов из кремния. Раствор реактивов замораживали с помощью элемента Пельтье и высушивали при пониженном давлении. Данная установка позволяла проводить лиофилизацию ПЦР реагентов, но обладала низкой производительностью: для изготовления одного чипа требовалось около 1.5 часов. Для повышения производительности процесса лиофилизации разработана новая экспериментальная установка, которая позволила проводить одновременную иммобилизацию ПЦР реагентов одновременно для шестнадцати микрочипов. В случае данной установки наблюдались следующие зависимости температуры и давления от времени (рис. 46).

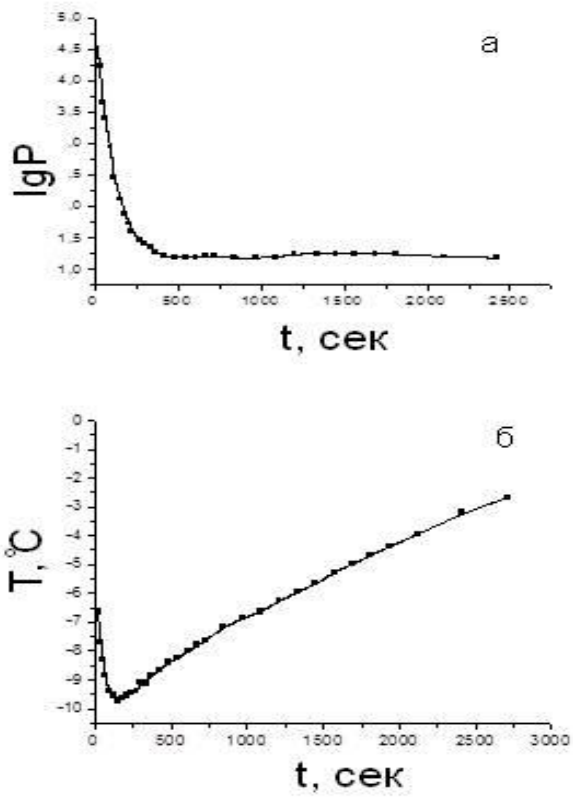


Рис. 46. Графики зависимости десятичного логарифма давления (а) и температуры (б) от времени внутри рабочей камеры для лиофилизации ПЦР-реагентов.

Из полученных зависимостей видно, что давление достигает значения 611 Па в среднем за 5 минут в то время, как температура остается отрицательной на протяжении 45 минут. Характер зависимости температуры от времени обусловлен тем, что первоначально на показания термодатчика влияет воздух внешней среды температуры, находящийся в рабочей камере. При понижении давления показания термодатчика определяется уже только хладагентом, и температура доходит до минимального значения. Последующий постепенный рост температуры обусловлен частичным теплообменом системы с окружающей средой.

Отметим, что температура плавления раствора, содержащего стабилизирующие компоненты, оценена в предварительных экспериментах, и составила –2 °С. Таким образом, установлено, что хладагент позволяет сохранить температуру ниже температуры плавления до момента достижения давления 611 Па, после чего возможна только сублимация растворителя, но не его таяние.

IV.3. Оптимизация времени лиофилизации ПЦР-реагентов в экспериментальной установке

Для того, чтобы оптимизировать время лиофилизации, произведены контрольные взвешивания чипов и сухого лиофильного остатка. Из рис. 47 следует, что основная масса растворителя сублимируется спустя 15 минут. Через 45 минут наблюдается незначительное падение массы. Лиофилизация в течение 120 минут не приводит к дополнительной сублимации. Таким образом, 45 минут достаточно для полной лиофилизации реагентов на поверхности микрочипа. Такой подход более эффективен в сравнении с методикой лиофилизации с осушителем, которую использовали в предыдущих работах.

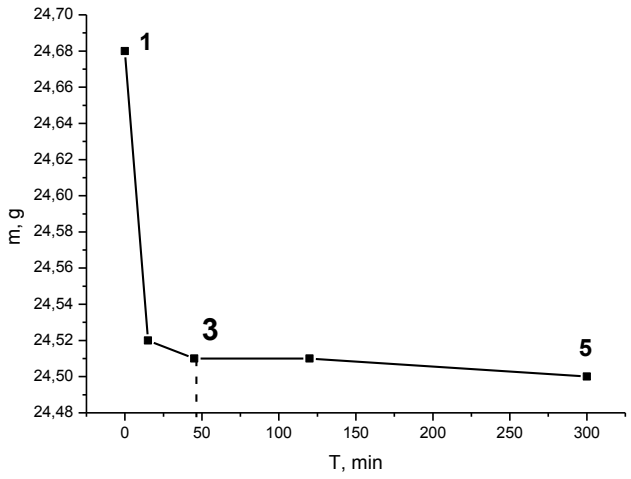


Рис. 47. График зависимости массы шести микрочипов от времени лиофилизации: 1 – масса микрочипов с жидкой лиофильной смесью; 5 – масса пустых микрочипов 3 – оптимальное время лиофилизации (45 минут).

Полученное время лиофилизации позволяет вычислить производительность процесса при массовом производстве микрочипов на подобной установке, и составляет приблизительно 21 микрочип, что в 32 раза больше, чем на предыдущей установке и является приемлемым для пилотного производственного участка.

IV.4. Сравнение методов иммобилизации ПЦР-реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов

Известно, что способ иммобилизации реагентов может влиять не только на плотность полученного слоя, но и на физико-химические свойства самих стабилизируемых белков. Для того, чтобы оценить подобное влияние на ПЦР-реагенты и на их дальнейшую реакционную способность, проведено сравнение двух способов иммобилизации реагентов, а именно: лиофилизации в классическом понимании (сублимация растворителя при пониженном давлении) и импрегнирования, то есть испарения растворителя (также при пониженном давлении).

В качестве модельных ДНК тест-систем выбраны *Mycoplasma hominis* (ROX) , и глобин (ROX и FAM). В реакторы трех микрочипов поместили реагенты для проведения ПЦР и стандартный стабилизатор для ДНК (рис. 48).

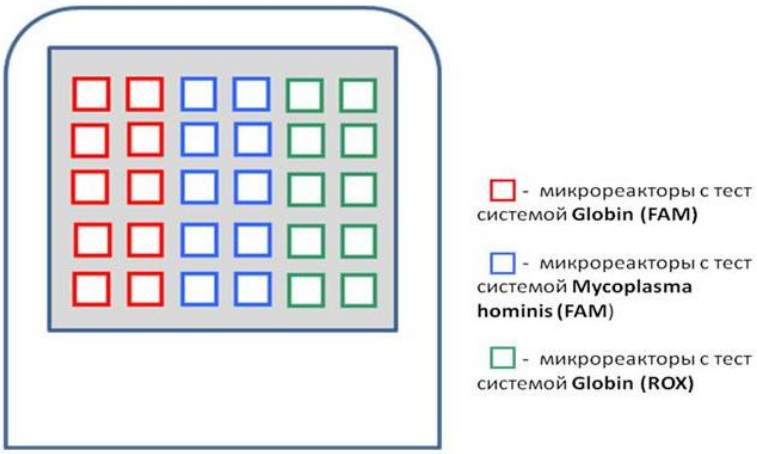


Рис. 48. Схема микрочипа, содержащего иммобилизованные тест-системы для оценки эффективности лиофилизации и испарения растворителя.

Микрочипы с внесенными реагентами подготовили для лиофилизации разными способами: одну часть микрочипов заморозили при температуре –18 °С, вторую — при температуре –30 °С, а третью часть не замораживали. Первые две части микрочипов поместили на поверхность хладагента для того, чтобы

поддержать начальные температуры, а третий тип поместили в установку без хладагента. Процесс иммобилизации проводили в течение 45 минут. Для проведения контрольной ПЦР использовали алюминиевый микрочип с жидкими реагентами.

Стоит отметить, что методика ввода проб при использовании жидких и иммобилизованных реактивов при проведении ПЦР отличается. В случае жидких реактивов 9 мкл пробы смешивали с 16 мкл ПЦР смеси. Для микрочипа с иммобилизированными реактивами 9 мкл пробы смешивали с 1 мкл ПЦР-буфера и вводили в микрочип. Таким образом, в случае ПЦР с использованием жидких реактивов начальная концентрация амплифицируемого участка ДНК заведомо меньше. Для того, чтобы корректно провести сравнение разных методик, стоит принять во внимание дополнительные расчеты. Так, в предположении о 100% эффективности ПЦР, (т.е. удвоение количества ампликонов за каждый цикл), полученные пороговые циклы можно пересчитать, используя формулу:

$$Ct_{корр} = \log_2(2^{Ct\ эксп} \times (x_{эксп}/x_{теор})),$$

где ; $Ct_{эксп}$ — экспериментально полученное значение порогового цикла; $Ct_{корр}$ — значение порогового цикла после пересчета; $x_{эксп}$ — начальная концентрация плазмиды; $x_{корр}$. — значение начальной концентрации плазмиды, на которое производится пересчет .

В табл. 11 представлены результаты проведенных ПЦР. В первую очередь стоит отметить несомненное преимущество предложенной системы: использование иммобилизованных реактивов не привело к увеличению пороговых циклов ПЦР, по сравнению с жидкими реактивами.

Таблица 11. Пороговые циклы ПЦР для модельных тест-систем в случае разных методов иммобилизации реактивов

Тест-система	Пороговые циклы [Ct] (n = 10, P = 0.95)			
	Иммобилизованные реактивы			Жидкие реактивы
	–30 °C	–18 °C	+20 °C	
Gl ROX	26.3 ± 0.2	26.4 ± 0.3	25.9 ± 0.4	26.8 ± 0.5
Gl FAM	26.3 ± 0.2	26.7 ± 0.5	26.4 ± 0.2	26.5 ± 0.4
MH FAM	26.1 ± 0.4	26.6 ± 0.9	26.7 ± 0.3	27.3 ± 0.9

Усредненные ПЦР кривые (по 30 отдельным анализам для каждого случая) модельных тест-систем в исходной и дифференциальной формах приведены на рис. 49. Как видно из графиков, реактивы, которые предварительно заморозили до –30 °C показали усиленный флуоресцентный сигнал, из чего можно сделать вывод, что в процессе лиофилизации все биологически-активные компоненты ПЦР подверглись лишь незначительной деградации. Вероятно, что при лиофильном подходе к иммобилизации полученный слой обладает более плотной и устойчивой структурой, что позволяет реактивам работать эффективнее, чем в случае испарения растворителя из матрицы стабилизатора. Отметим, что оба типа флурисцентных зондов показали одинаковые тенденции, что сведетельствует об отсутствии выгорания зонда или других фото-деструктивных процессов во время лиофилизиации реактивов.

А Б

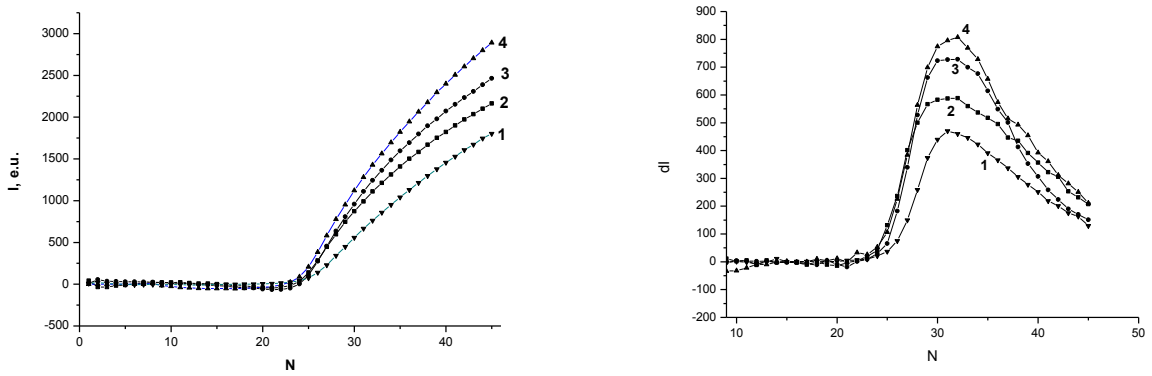


Рис. 49. А) усредненные ПЦР-кривые для тест-системы *Mycoplasma hominis* (FAM) и **Б)** – усредненные ПЦР-кривые в дифференциальном виде для тест-системы глобин (FAM): **1** — жидкие реактивы; **2** — иммобилизированные реактивы без предварительного замораживания; **3** — лиофилизированные реактивы с предварительным замораживанием до –18 °С; **4** — лиофилизированные реактивы с предварительным замораживанием до –30 °С.

Кроме значения порогового цикла важной характеристикой является также величина эффективности ПЦР, которую можно оценить по углу наклона линейного участка ПЦР-кривой: чем больше значение *a,* тем более эффективно проходит амплификация. С целью сравнить эффективность ПЦР, проводимых с использованием реактивов иммобилизованных различными способами рассчитаны значения угловых коэффициентов кривых, которые приведены в табл. 12.

Таблица 12. Значения угловых коэффициентов ПЦР-кривых на линейном участке в зависимости от условий иммобилизации реактивов

Тест-система	Значение *a* (n = 10, P = 0.95)		
	Метод иммобилизации		
	–30 °С	–18 °С	+20 °С
Gl ROX	780 ± 80	710 ± 75	620 ± 20
Gl FAM	810 ± 40	720 ± 80	600 ± 22
MH FAM	200 ± 14	190 ± 20	160 ± 11

Как видно из таблицы, наиболее высокие значения углового коэффициента линейного участка ПЦР, соответствующие максимальной эффективности ПЦР, показали реактивы, предварительно замороженные в микрочипе до –30 °С. Вероятно, это связано с тем, что при глубокой заморозке матрица стабилизатора на основе трегалозы и воды формирует достаточно плотную структуру. При дальнейшей сублимации растворителя с образовавшейся пленки ПЦР компоненты надежно связаны со стабилизаторами и не подвержены деградации.

IV.5. Проверка длительности хранения лиофилизированных реактивов для ПЦР-анализа проб ДНК

Для того чтобы в дальнейшем можно было адекватно оценить эффективность стабилизаторов для систем, содержащих совместно ревертазу и полимеразу, стоило сначала проверить поведение микрочипов с лиофильными реактивами для ДНК-систем.

Для оценки срока хранения алюминиевых микрочипов с лиофилизированными реактивами изготовили тестовую партию для тест-системы Глобин (на красителе FAM). Микрочипы защищенные полимерной пленкой хранились при комнатной температуре более двух месяцев. Из полученных данных выяснилось, что значения порогового цикла ПЦР при хранении меняется незначительно. При дальнейшем хранении наблюдалось небольшое снижение эффективности (рис. 50) реакции, хотя она оставалась достаточно высокой для проведения качественного анализа на алюминиевых микрочипах.

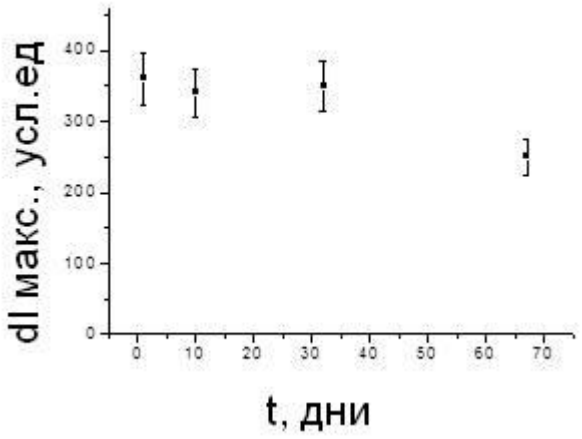


Рис. 50. Зависимость значения максимума производной аналитического сигнала от срока хранения ПЦР реактивов.

Таким образом, собранная экспериментальная установка успешно справилась с задачей иммобилизации ПЦР реагентов на примере ДНК-систем путем лиофилизации. Для применения разработанного подхода для РНК следовало для начала изучить влияние процесса высушивание на стабильность двух ферментов, которые использовались в ОТПЦР.

V. Иммобилизация ОТПЦР реактивов в микрореакторах алюминиевого микрочипа

V.1. Исследование влияния процесса лиофилизации на активность ревертазы

Чтобы определить влияние стабилизаторов на ревертазу а также систему, которая содержит оба фермента одновременно, для начала следовало провести испытания в динамических условиях (жидкие реактивы). Состав и концентрации компонентов раствора стабилизаторов №1 (концентрации трегалозы, ПВП и Tween 20 составляют соответственно 55.2, 7.6 и 4.4 ммоль/л), разрабатывались для проведения анализа ДНК на иммобилизированных реактивах и использовались в предыдущих экспериментах по подбору условий лиофилизации. Однако установлено, что для стабилизации ревертазы компонентов стандартного раствора стабилизаторов недостаточно. Так, на рис. 51 при анализе пробы одной и той же концентрации РНК наблюдается отставание ПЦР-кривых на 8 пороговых циклов в случае жидкого и иммобилизированого фермента. Таким, образом, ревертаза деградирует в процессе лиофилизации настолько, что кажущаяся разница концентраций составляет приблизительно 300 раз.

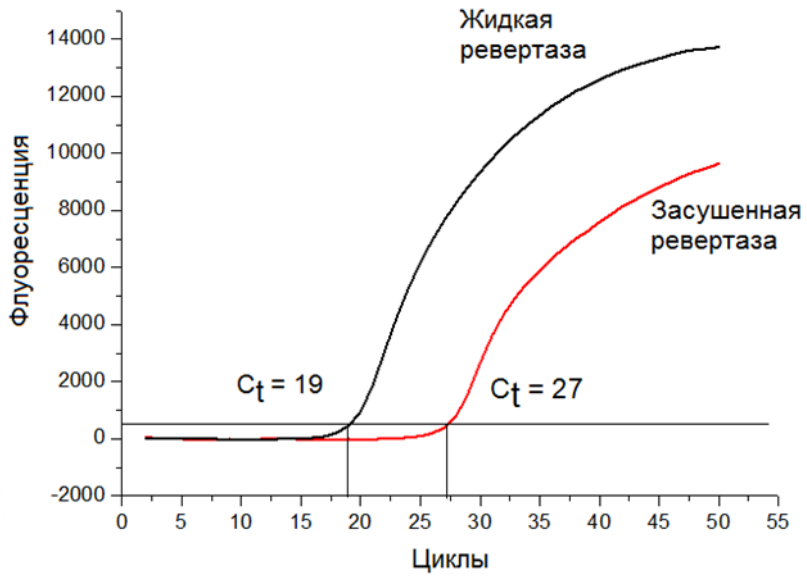


Рис. 51. Усредненные кривые ПЦР, полученные в ходе исследования влияния процесса лиофилизации на стабильность ревертазы.

Для дополнительной стабилизации двухферментной системы предложено добавить к стабилизирующим компонентам раствор БСА, активно использующийся для улучшения работы различных белков и ферментов и предотвращения их адгезии к стенкам сосудов в результате конкурентной сорбции [108]. Последнее свойство БСА особенно играет особенную роль в данной работе, так как взаимодействие белков с активными центрами на алюминиевой подложке микрочипа может привести к инактивации ферментов, и как следствие, ингибированию ОТПЦР.

Для оценки влияния раствора БСА на стабилизацию ОТПЦР-реактивов изготовили серию алюминиевых микрочипов с лиофильными реактивами. В мирореакторах серии высушили смеси как со стандартным раствором стабилизаторов № 1, так и с добавлением раствора БСА (1 мг/мл). При этом половина ячеек содержала ревертазу в иммобилизированном виде, а в другую половину ревертазу добавляли непосредственно перед анализом (рис. 52).

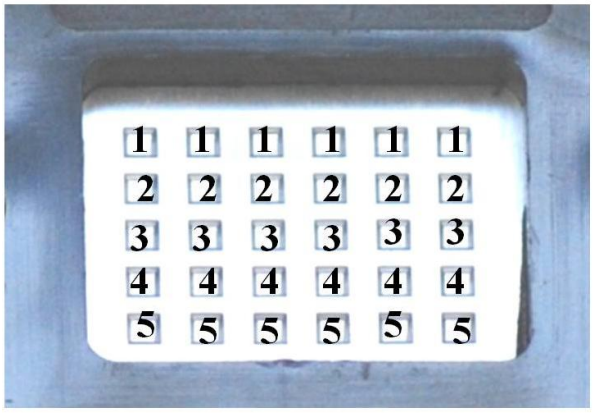


Рис.52. Схема микрочипа, содержащего иммобилизованные реактивы с растворами стабилизаторов для проведения ОТПЦР. 1— пустой ряд для проведения ОТПЦР на жидких реактивах, 2 — раствор стаб. №1. + БСА 1 мг/мл без иммобилизации ревертазы, 3 — раствор стаб. №1. + БСА 1 мг/мл с иммобилизированной ревертазой, 4 — раствор стаб. №1. без иммобилизации ревертазы, 5 — раствор стаб. №1. с иммобилизированной ревертазой.

Целью лиофилизации части реагентов только со стандартным раствором стабилизаторов явилось показать разницу в сохранении ферментативных свойств ревертазы при иммобилизации реактивов с использованием альбумина и без него в одинаковых условиях проведения эксперимента. Для получения опорного

значения порогового цикла ОТПЦР также проводилась на жидких реактивах без стабилизаторов (рис. 53).

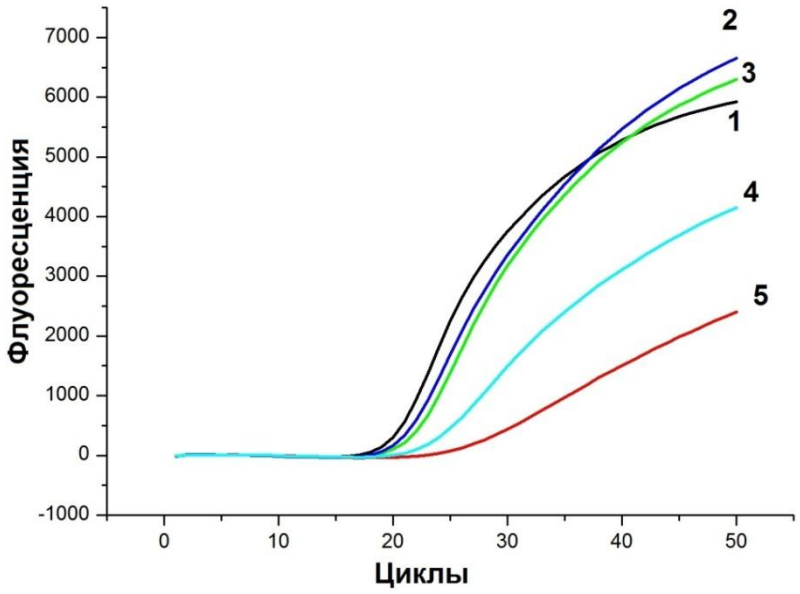


Рис.53 Усредненные кривые ПЦР, полученные в ходе исследования влияния процесса лиофилизации на стабильность ревертазы. 1— ПЦР-смесь, 2 — смесь стабилизатора №1. + БСА 1 мг/мл без иммобилизации ревертазы, 3 — смесь стабилизатора. №1. + БСА 1 мг/мл с иммобилизированной ревертазой, 4 — смесь стабилизатора №1. без иммобилизации ревертазы, 5 — смесь стабилизатора №1. с иммобилизированной ревертазой.

Таблица 13. Значения пороговых циклов ОТПЦР в зависимости от смеси стабилизаторов

Состав лиофильного раствора	Иммобилизация ревертазы	Пороговый цикл (n = 7, P = 0.95)
Раствор стабилизаторов №1	+	28.31 ± 2.21
Раствор стабилизаторов №1	–	25.22 ± 1.93
Раствор стабилизаторов №1 + БСА 1 мг/мл	+	21.03 ± 1.20
Раствор стабилизаторов №1 + БСА 1 мг/мл	–	21.25 ± 1.32
ПЦР – смесь		19.35 ± 0.56

Из приведенных данных в табл. 13 видно, что добавление раствора БСА в смесь стабилизаторов №1 обеспечивает более эффективное сохранение активности ревертазы по сравнению с использованием только стандартной смеси

стабилизаторов. Таким образом, дальнейшее исследование было направлено на подбор оптимальных концентраций стандартного раствора стабилизаторов и раствора БСА, которые обеспечивали бы наилучшие показатели работы полимеразы и ревертазы при их лиофилизации в смеси с остальными ОТПЦР реагентами.

V.2. Исследование влияния модельной смеси стабилизаторов на ОТПЦР реактивы в жидкой форме

С целью подбора концентрации компонентов раствора стабилизаторов а также для оценки возможного ингибирования ОТПЦР, которое может наблюдаться при высоких концентрациях стабилизаторов, проводили проверку воздействия раствора на жидкие реактивы.

В ходе предварительных экспериментов замечено, что проведение ОТПЦР с менее концентрированным раствором стабилизаторов №1 приводило к большей эффективности реакции и меньшим пороговым циклам (рис. 54).

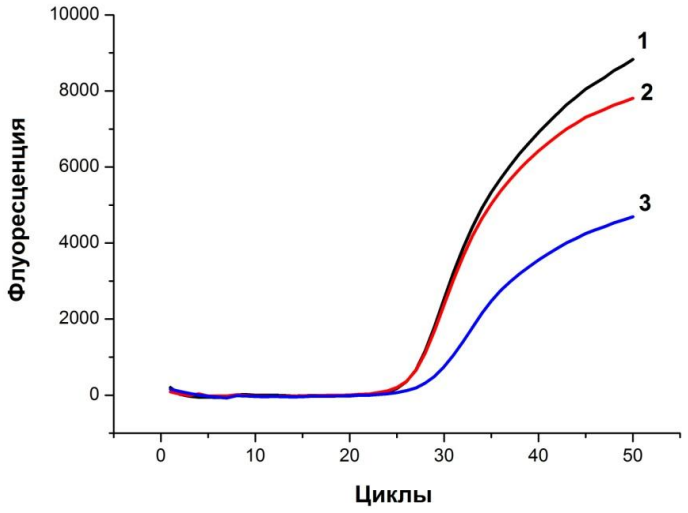


Рис. 54. Усредненные ПЦР- кривые, полученные в алюминиевых микрочипах с иммобилизированными реактивами с использованием различных концентраций раствора стабилизаторов. 1 — раствор стабилизаторов №3, 2 — раствор стабилизаторов №2, 3 — раствор стабилизаторов №1.

На основании данных, представленных выше, сделан вывод, что для оптимизации состава раствора стабилизаторов необходимо не только исследовать влияние альбумина на жидкие ОТПЦР-реактивы, но и провести эксперименты с варьированием концентрации стандартного раствора стабилизаторов.

Таким образом, далее провели эксперимент по подбору оптимальной концентрации раствора стабилизаторов в соответствии с пропорциями, приведенными ниже.

К реакционной смеси для проведения ОТПЦР (7.5 мкл раствора стабилизаторов, 3.75 мкл ДНТФ, 3.6 мкл раствора праймеров, по 0.75 мкл полимеразы и ревертазы и 14.55 мкл воды) добавляли пробу в объеме 18 мкл. Для корректного сравнения пороговых циклов ОТПЦР проводилась также на жидких реактивах без стабилизаторов. Полученные в ходе экспериментов усредненные пороговые циклы представлены в табл. 14.

Таблица 14. Значения пороговых циклов ОТПЦР в зависимости от концентрации основных стабилизаторов

Раствор стабилизаторов, номер	Пороговый цикл (n = 7, P = 0.95)
1	23.54 ± 0.18
2	23.18 ± 0.25
3	21.39 ± 0.21
ПЦР-смесь	19.99 ± 0.19

Усредненные ПЦР-кривые для разных концентраций основных стабилизаторов представлены на рис. 55.

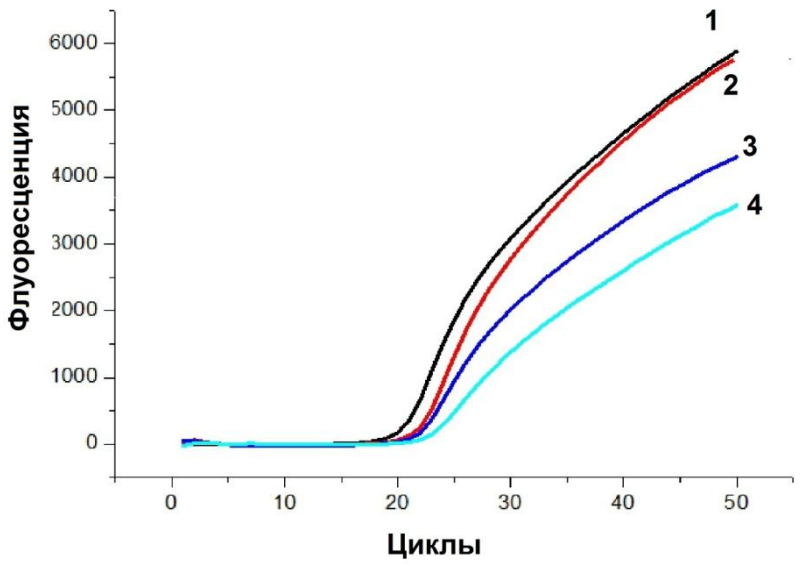


Рис. 55. Усредненные кривые ПЦР, полученные в ходе эксперимента с использованием жидких реактивов. 1 — ПЦР-смесь, 2 — раствор стабилизаторов №3, 3 — раствор стабилизаторов №2, 4 — раствор стабилизаторов №1.

Из представленных результатов следует, что при проведении реакции на жидких реактивах раствор стабилизаторов № 3 обладает наименьшим влиянием на значение эффективности ОТПЦР. При этом использование более концентрированных растворов (раствор стабилизаторов № 1) несколько снижает эффективность и увеличивает пороговые циклы. Такое поведение легко объяснить, учитывая, что при понижении концентрации стабилизаторов ферменты инактивируются в меньшей степени. Однако, с другой стороны, понижение концентрации стабилизаторов может привести к сокращению сроков хранения алюминиевых микрочипов.

На следующем этапе следовало оптимизировать концентрацию БСА. К растворам стабилизаторов №2 и №3 добавляли разное количество БСА до конечных концентраций 2, 0.2, 0.02, мг/мл. Далее к ОТПЦР смеси, содержащей 7.5 мкл раствора разных стабилизаторов, 3.75 мкл ДНТФ, 3.6 мкл раствора праймеров, по 0.75 мкл полимеразы и ревертазы и 14.55 мкл воды, добавляли РНК пробы в объеме 18 мкл. Для получения рефернтного порогового цикла ОТПЦР проводили также на жидких реактивах без стабилизаторов. Полученные в ходе

экспериментов усредненные пороговые циклы представлены в табл. 15. Усредненные ПЦР-кривые, полученные в ходе проведения реакций на партии микрочипов с лиофилизированными реактивами представлены на рис. 56 и 57.

Таблица № 15. Значения пороговых циклов в экспериментах по добавкам БСА (n = 7, P = 0.95)

	Раствор стабилизаторов № 3	Раствор стабилизаторов № 2
Концентрация добавки раствора БСА, мг/мл	Пороговый цикл	Пороговый цикл
2	22.20 ± 0.09	23.01 ± 0.41
0.2	22.09 ± 0.10	23.22 ± 0.58
0.02	22.53 ± 0.11	25.15 ±0.93
ПЦР-смесь	22.08 ± 0.08	22.07 ± 0.37

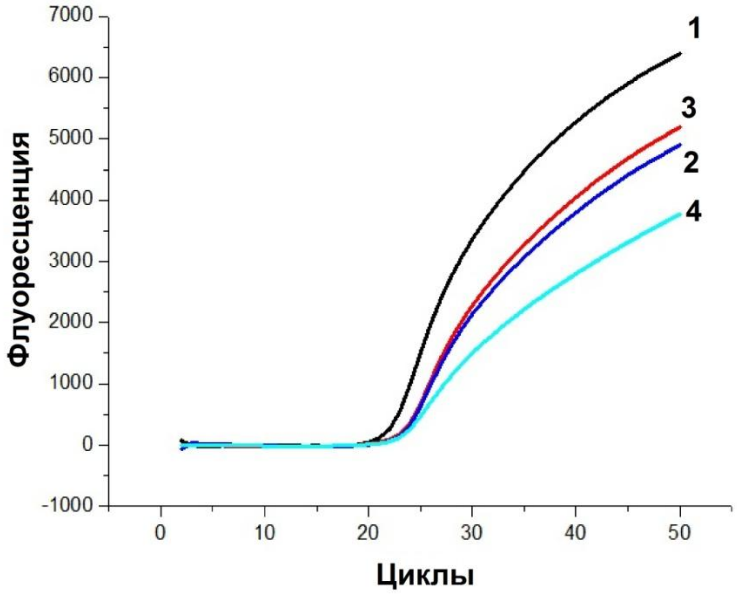


Рис. 56 Усредненные ПЦР-кривые, полученные в ходе эксперимента с использованием жидких реактивов. Раствор стабилизаторов № 3. 1 — ПЦР-смесь, 2 — добавка раствора БСА 2.0 мг/мл, 3 — добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 4 — добавка раствора БСА 0.02 мг/мл.

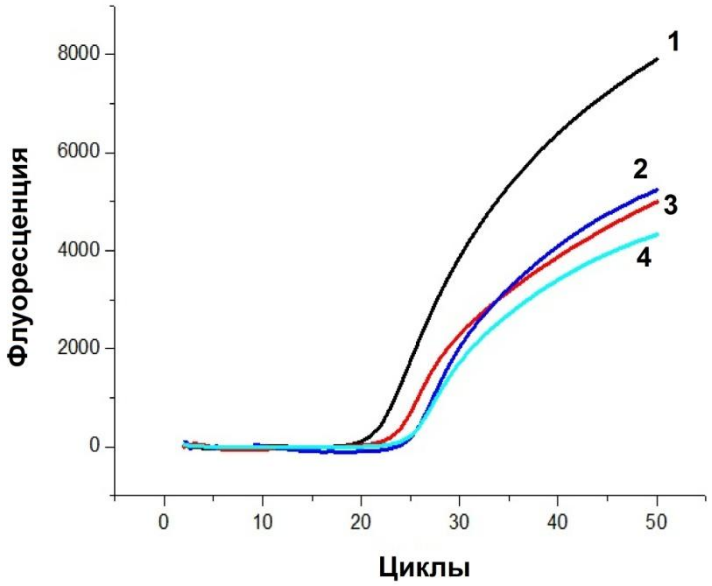


Рис. 57 Усредненные ПЦР-кривые, полученные в ходе эксперимента с использованием жидких реактивов. Раствор стабилизаторов № 2. 1 — ПЦР-смесь, 2 — добавка раствора БСА 2.0 мг/мл, 3 — добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 4 — добавка раствора БСА 0.02 мг/мл.

Из полученных данных видно, что добавление растворов стабилизаторов и раствора БСА представленных концентраций не ингибирует ОТПЦР на жидких реактивах. Исходя из результатов, приведенных в табл. 14 и 15 видно, что наименьший пороговый цикл в динамических условиях дает раствор стабилизаторов №3, как с добавлением БСА, так и без него. Однако об эффективности стабилизации полимеразы и ревертазы в условиях сухих реагентов можно судить только при проведении реакции на иммобилизированных реагентах, так как в высушенном состоянии содержания стабилизаторов в растворе № 3 может быть недостаточно для сохранения активности ферментов во времени. Аналогичным образом следует проверить и эффект добавки раствора БСА – несмотря на то, что раствор стабилизаторов № 3 с концентрациями БСА 2.0 и 0.2 мг/мл давал лучшие характеристики процесса протекания ОТПЦР по сравнению с раствором стабилизаторов №2, в полной мере исследовать стабилизирующее действие и обосновать выбор именного такого состава можно только при лиофилизации реактивов на алюминиевых микрочипах. Однако

данные о взаимодействии БСА и жидких ОТПЦР-реактивов позволили оценить влияние именно химической природы выбранных стабилизаторов и убедиться в том, что в пределе выбранных концентраций ингибирование ОТПЦР отсутствует.

V.3. Результаты лиофилизации ОТПЦР-реактивов с модельной смесью стабилизаторов

С целью проверки эффективности стабилизации реактивов растворы основных стабилизаторов № 2 и №3 с добавками раствора БСА 2.0; 0.2; 0.02 мг/мл использовали для лиофилизации партии микрочипов в модельной установке по методике, разработанной для ДНК тест-систем**.** При выборе оптимальной концентрации стабилизаторов на первом этапе критерием оценки являлся внешний вид иммобилизованной в микрореакторе смеси. Так, хорошо высушенная смесь должна надежно удерживаться в микрореакторе, а также не образовывать кристаллический осадок в процессе лиофилизации. Следующим этапом по выбору оптимальной концентрации стабилизаторов явилась оценка сохранения свойств иммобилизованных реактивов, проведенная путем сопоставления величин пороговых циклов ОТПЦР с иммобилизированными реактивами и с жидкими реактивами без стабилизаторов.

Для оценки морфологических характеристик полученных пленок использовали СЭМ. В результате исследования выявили, что критерии однородности пленок и отсутствия кристаллов отвечали все лиофилизированные реагенты, не зависимо от использованных растворов стабилизаторов и БСА. Все образцы представляли собой прозрачные стекловидные массы, достаточно прочно удерживающиеся в микрореакторах. Следует отметить, что для проведения данного СЭМ-исследования использовали кремниевый микрочип ввиду возможности получения аккуратного скола поверхности на данном материале (рис. 58).

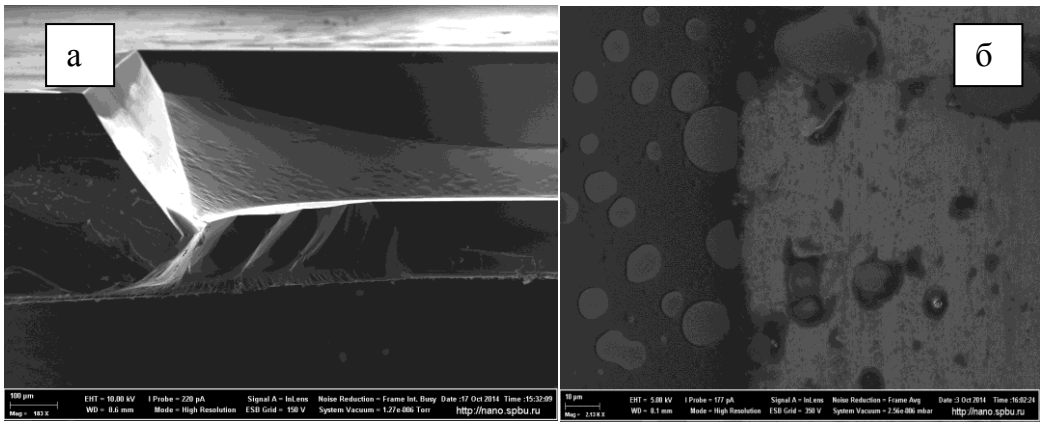


Рис. 58 СЭМ изображение иммобилизированных реактивов в ячейке микрочипа с использованием раствора стабилизаторов №1 (а) и №2 (б).

При использовании концентрированного раствора стабилизаторов (№1) ввиду его большой вязкости лиофильный остаток представлял отдельные капли на поверхности микрочипа (рис.58 б). Лиофильные остатки на основе более разбавленных растворов стабилизаторов оказались лишены этого отрицательного эффекта и распределились по всей поверхности микрореактора равномерно.

Толщина лиофильного остатка позволила также изучить его морфологию отдельно от алюминиевого микрочипа. СЭМ и СТЭМ-изображения лиофильной пленки на основе стабилизатора № 3 с добавкой 2.0 мг/мл БСА, которая иммобилизирована на медной подложке, представлены на рис. 59 и 60 соответственно.

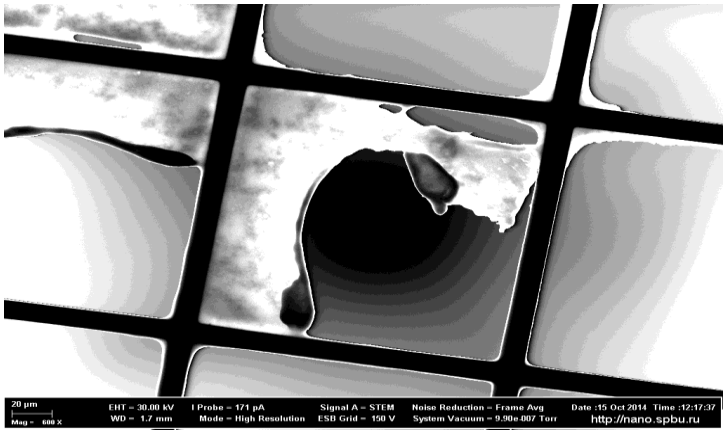


Рис. 59 СЭМ изображение иммобилизированных реактивов на основе стабилизатора № 3 с добавкой 2 мг/мл БСА на медной подложке (общий вид).

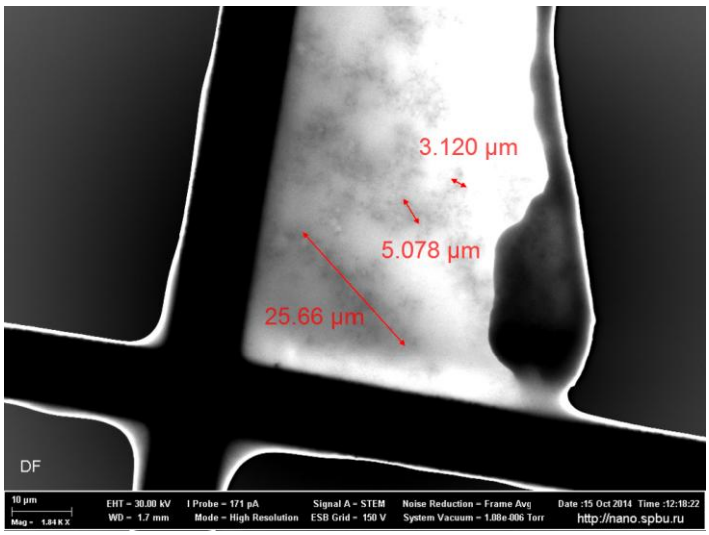


Рис. 60 СТЭМ изображение иммобилизированных реактивов на основе стабилизатора № 3 с добавкой 2 мг/мл БСА на медной подложке (общий вид).

На представленных изображениях достаточно четко просматриваются агломераты ОТПЦР реактивов и компонентов раствора стабилизаторов.

СТЭМ анализ лиофильной пленки проводили для оценки наличия тонкой структуры иммобилизированных реагентов. На изображении видно, что тонкая структура присутствует, но при этом невозможно оценить минимальные размеры элементов тонкой структуры пленки. С данным разрешением можно ценить только макроагломераты и их линейные размеры. Улучшение разрешения стало невозможным вследствие нестабильности пленки ввиду ее быстрого прожигания электронным пучком (рис. 61).

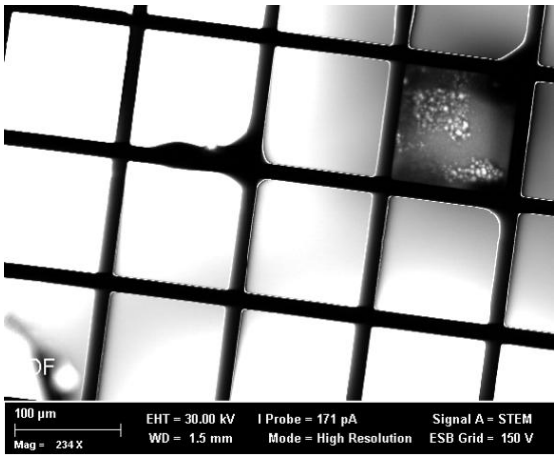


Рис. 61 СТЭМ изображение иммобилизированных реактивов на основе стабилизатора № 3 с добавкой 2 мг/мл БСА на медной подложке (общий вид).

Следующий этап проверки эффективности стабилизации ферментов заключался в проведении ОТПЦР на партии микрочипов с иммобилизированными реактивами в течение 1–2 дней после лиофилизации. При этом все микрочипы хранились в холодильнике при +4 °С. Полученные усредненные пороговые циклы представлены в табл. 16.

Таблица 16 Пороговые циклы ОТПЦР, проведенных с использованием лиофилизированных реактивов после двух дней хранения при +4 °С (n = 7, P = 0.95)

	Раствор стабилизаторов № 3	Раствор стабилизаторов № 2
Концентрация добавки раствора БСА, мг/мл	Пороговый цикл	Пороговый цикл
2	23.30 ± 0.08	22.81 ± 0.13
0.2	23.15 ± 0.04	23.36 ± 0.30
0.02	24.04 ± 0.06	23.55 ± 0.42
ПЦР-смесь	21.72 ± 0.05	22.11 ± 0.10

Следует отметить, что в случае основного стабилизатора № 3 кривые ПЦР для одной пробы показывают очень небольшой разброс значений порогового цикла. Усредненные ПЦР кривые представлены на рис. 62 и 63.

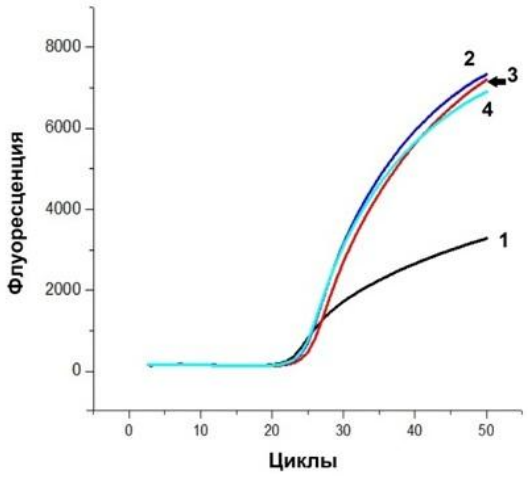


Рис. 62 Усредненные ПЦР-кривые, полученные в ходе эксперимента с использованием иммобилизированных реактивов. Раствор стабилизаторов № 3. 1 — ПЦР-смесь, 2 — добавка раствора БСА 2 мг/мл, 3 — добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 4 — добавка раствора БСА 0.02 мг/мл.

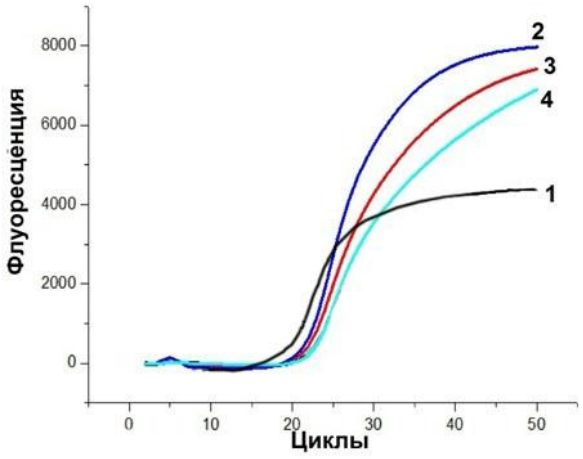


Рис. 63. Усредненные ПЦР-кривые, полученные в ходе эксперимента с использованием иммобилизированных реактивов. Раствор стабилизаторов № 2. 1 — ПЦР-смесь, 2 — добавка раствора БСА 2 мг/мл, 3 — добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 4 — добавка раствора БСА 0.02 мг/мл.

Из представленных результатов легко можно заметить, что при проведении ОТПЦР с помощью иммобилизированных реактивов интенсивность флуоресценции значительно меньше аналогичного значения в случае жидких реактивов. Это объясняется разной концентрацией флуорофора. Так, при проведении ОТПЦР на жидких реактивах, объем раствора флуоресцентного зонда и праймеров составляет 2.4 мкл из расчета на один микрочип. В смесь реактивов, подготовленную для иммобилизации, помещается 3.6 мкл раствора зонда и праймеров, в соответствии с пропорцией, разработанной для лиофилизации ПЦР-реактивов (ДНК тест-системы). Увеличение количества флуоресцентных зондов и остальных реактивов способствует тому, что эффект ухудшения эффективности ПЦР с лиофилизированными реактивами за счет неизбежного инактивирования части веществ сводится к минимуму.

Рассмотрим, влияет ли концентрация основных стабилизаторов на ОТПЦР. При использовании раствора стабилизаторов № 3 не наблюдается явного различия между пороговым циклом и ходом кривых для растворов разных концентраций БСА, что свидетельствует об одинаковом вкладе растворов БСА разной концентрации в эффективность стабилизации реактивов.

При проведении реакции с использованием реактивов, иммобилизированных на микрочипах с раствором стабилизаторов № 2 наибольший аналитический сигнал и минимальные пороговые циклы наблюдаются при добавлении раствора БСА 2 мг/мл. Таким образом, на данном этапе исследования сделан предварительный вывод, что такой состав стабилизаторов обладает лучшими защитными свойствами для белков среди других модельных смесей. Тем не менее, эффективное сохранение биологической активности ферментов в течение длительного времени может обуславливаться более концентрированными растворами. Таким образом, выбор в сторону той или иной концентрации раствора стабилизаторов и раствора БСА может быть сделан только после проведения ОТПЦР на микрочипах, подвергшихся искусственному старению.

V.4. Исследование эффективности стабилизации иммобилизированных ОТПЦР-реактивов в зависимости от времени хранения

Проверку стабильности и сохранения ферментативной активности лиофилизированных ОТПЦР реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов проводились методом «ускоренного старения». Согласно работе [158], методику ускоренного старения проводят при повышенной температуре с целью установления или подтверждения срока годности биологически активных веществ. Суть метода заключается в выдерживании испытуемого лекарственного средства при температурах, превышающих температуру его хранения. При повышенных температурах, как правило, ускоряются протекающие в ферментативных системах физико-химические процессы, приводящие со временем к нежелательным изменениям свойств. В случае ОТПЦР к потере ферментативной активности полимеразы и ревертазы при лиофилизации и последующем хранении приводят реакции дезаминирования, гидролиза, конформационные изменения при образовании новых пептидных связей, следствием которых является денатурация самих ферментов и ингибирование

реакции в целом. Следует отметить, что именно ревертаза быстрее всего теряет биологическую активность в процессе лиофилизации, что было доказано экспериментами, аналогичными описанным в разделе IV: ОТПЦР проводили на микрочипах, часть ячеек которых содержала иммобилизированный реагент, а в другую часть реактив добавляли вместе с пробой перед анализом.

Таким образом, при повышенной температуре промежуток времени, в течение которого контролируемый показатель качества лиофилизированных реагентов – пороговый цикл, сохраняется в допустимых пределах (экспериментальный срок годности микрочипа), искусственно сокращается в сравнении со сроком годности при температуре хранения. Это позволяет значительно сократить время, необходимое для установления срока годности.

Срок годности C при заданной температуре хранения $t_{хр.}$ связан с экспериментальным сроком годности $C_Э$ при повышенной температуре хранения $t_э$ следующей зависимостью:

$$C = K \times C_Э,$$

где коэффициент соответствия $K = A^{\frac{t_э - t_{хр.}}{10}}$, A — Температурный коэффициент скорости химической реакции (2.5). Приведенная зависимость основана на правиле Вант-Гоффа о 2–4-кратном росте скоростей химических реакций при увеличении температуры на 10 °С. В табл. 17 приведены значения коэффициентов соответствия K для различных значений разности температур ускоренного и стандартного хранения при A = 2.5.

Таблица 17 Значения коэффициентов соответствия К дл постановки экспериментов по ускоренному старению активных веществ

($t_э$–$t_{хр}$) °С	10	15	20	25	30	35
K	2.5	4.0	6.3	9.9	15.6	24.7

Для определения срока годности микрочипов, температура хранения которых в холодильнике составляет +4 °С, выбранная температура ускоренного хранения $t_э$, равная +35 °С. Экспериментальный срок годности при 35 °С составил 6 суток.

Для проверки эффективности стабилизирующего действия раствора стабилизаторов по истечении определенных интервалов времени, два микрочипа партии, подвергающейся ускоренному старению, снимали с термостата и проводили ОТПЦР, оценивая пороговые циклы. Полученные данные приведены в табл. 18 графики зависимостей порогового цикла от длительности старения для микрочипов с иммобилизированными реактивами с использованием раствора стабилизаторов № 3 представлены на рис. 64, для микрочипов с иммобилизированными реактивами с использованием раствора стабилизаторов № 2 – на рис. 65.

Таблица 18. Пороговые циклы ОТПЦР в зависимости от срока хранения при повышенных температурах

	Пороговый цикл					
	Раствор стабилизаторов № 2			Раствор стабилизаторов № 3		
Длительность старения, дни	БСА 2 мг/мл	БСА 0.2 мг/мл	БСА 0.02 мг/мл	БСА 2 мг/мл	БСА 0.2 мг/мл	БСА 0.02 мг/мл
0	21.75	22.71	22.60	22.91	24.15	25.11
1	23.61	24.89	25.31	24.53	26.66	26.66
2	26.11	26.94	27.58	26.32	29.49	29.49
3	28.24	29.46	30.44	28.44	33.12	33.12
4	30.01	31.23	32.02	29.82	35.01	35.01
5	31.23	32.14	33.52	31.26	36.49	36.49
6	32.22	33.18	34.85	31.74	38.15	38.15

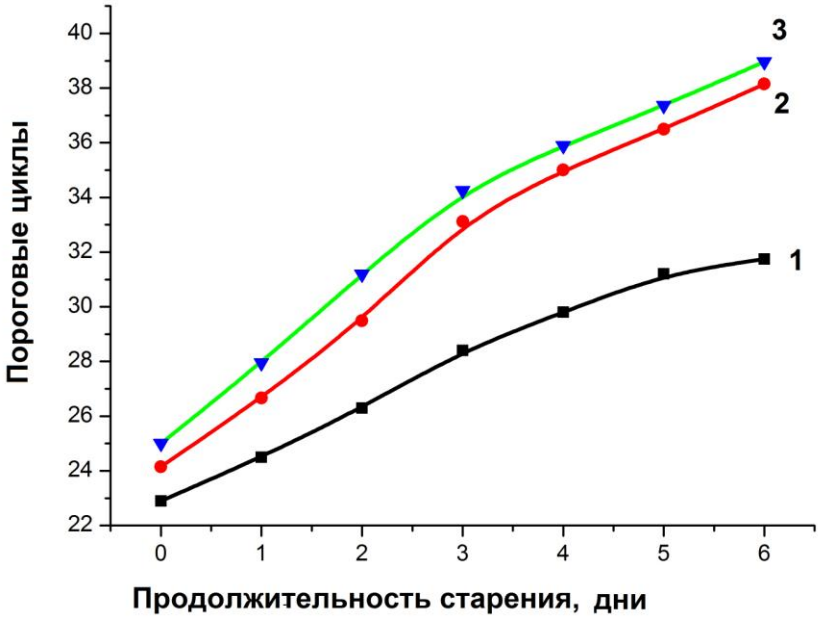


Рис. 64. Графики зависимостей порогового цикла от старения для микрочипов с иммобилизированными реактивами с использованием раствора стабилизаторов № 3. 1 – добавка раствора БСА 2 мг/мл, 2 – добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 3 – добавка раствора БСА 0.02 мг/мл.

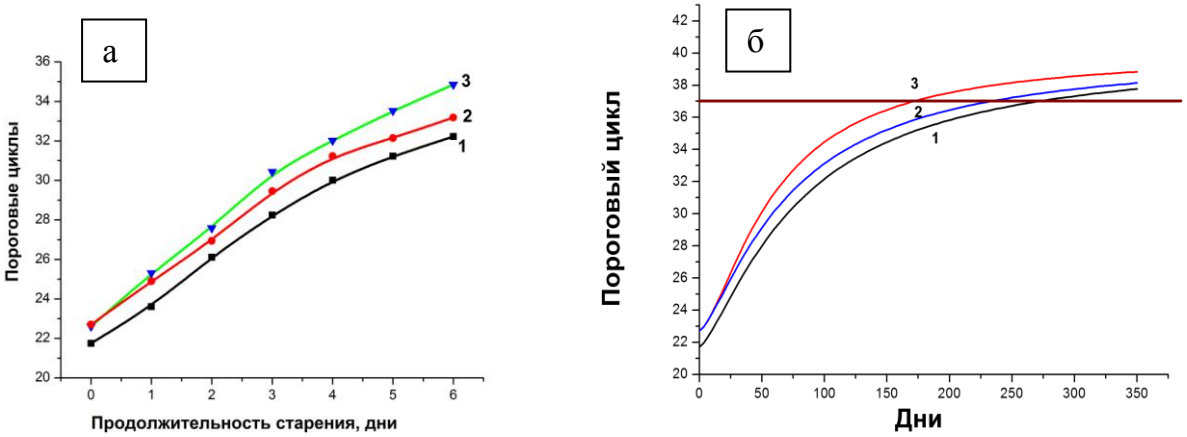


Рис. 65. а) графики зависимостей порогового цикла от старения микрочипов с иммобилизированными реактивами с использованием раствора стабилизаторов № 3. 1 – добавка раствора БСА 2 мг/мл, 2 – добавка раствора БСА 0.2 мг/мл, 3 – добавка раствора БСА 0.02 мг/мл; б) экстраполированные с помощью логистической функции кривые на основе графиков зависимости порогового цикла от старения микрочипов с иммобилизированными реактивами с использованием раствора стабилизаторов № 3

По результатам испытаний все микрочипы, хранившиеся при температуре 35 °С, позволили проводить качественный анализ методом ОТПЦР. Из полученных данных видно, что наименьшие пороговые циклы наблюдаются при добавлении к

стабилизаторам раствора БСА 2 мг/мл, при этом, в течение исследуемого срока старения, нет сильного различия в эффективности стабилизации реактивов при использовании раствора стабилизаторов № 2 или № 3. Таким образом, исходя из значений погрешности (для разбавленного стабилизатора №3 погрешность минимальная), а также с целью сокращения расхода реактивов, для иммобилизации реактивов выбран раствор стабилизаторов № 3.

По данным, приведенным в табл. 18 построена полиномиальная линия тренда со степенью полинома, равной 3, которая позволила вычислить коэффициент соответствия разности температур хранения микрочипов. Из графика зависимости, приведенного на рис. 66 определен коэффициент соответствия К, равный 17.2 при разнице температур в 31 °С.

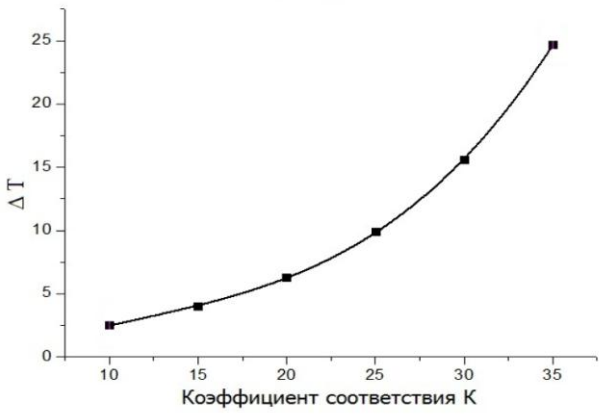


Рис. 66. График зависимости коэффициента соответствия К от разницы температур ускоренного и стандартного хранения.

Таким образом, в соответствии с формулой, срок хранения микрочипов с иммобилизированными реактивами при +4 °С составила 103 дня.

Для того, чтобы оценить сроки хранения микрочипов, исходя из принятого граничного значения порогового цикла (C_t = 40), была проведена экстраполяция полученных кривых для смеси стабилизаторов № 3 (с учетом коэффициента К). Из рис. 65 б следует, что используя 2 мг/мл добавку БСА, разработанные микрочипы можно использовать в качественном анализе, а также скрининге в течение восьми месяцев. Такие сроки ранения полностью покрывают нужды

лаборатории и являются достаточными для внедрения микрочиповой системы в аналитическую практику.

V.5. Исследование стабилизации положительного РНК контроля в процессе искусственного старения

В методе ОТПЦР положительный контроль применяется, чтобы удостовериться в том, что реактивы работают с необходимой для проведения анализа эффективностью. Так, в случае, если положительный контроль не дал ожидаемого результата, результаты всех проб в этой серии считают неприемлемыми, а отрицательные пробы считают потенциально ложноотрицательными. Иммобилизация положительного контроля позволила бы минимизировать ручную работу исследователя, а также способствовать одинаковым условиям хранения реагентов, поэтому следующим этапом создания комплексной иммобилизированной тест-системы стало проведение испытаний по лиофилизации положительного контроля. В случае вирусов птиц, в качестве положительной пробы взяли вакцину ИБК штамм Н120, которая представляла ослабленный вирус инфекционного бронхита, а также искусственную плазмиду вируса в разных концентрациях. При этом эффективное протекание реакции с иммобилизированными реагентами с добавлением вакцины должно свидетельствовать о сохранении ферментативной активности и ревертазы и полимеразы. Для отдельной проверки стабильности полимеразы оценивали протекание реакции с иммобилизованной плазмидой, так как она представляла именно кДНК-участки и, в таком случае стадия транскрипции не нужна.

Положительный контроль иммобилизировали с выбранным ранее раствором стабилизаторов № 3 с добавкой БСА (2мг/мл). Для определения срока годности микрочипов с иммоблизированными положительными контролями, температура экспериментального хранения $t_э$, также составила +35 °С, экспериментальный срок годности при 35 °С составил 6 суток. Для проверки эффективности

стабилизирующего действия по истечении определенных интервалов времени, два микрочипа партии, снимали с термостата для проведения ОТПЦР. Учитывая, что реакционная смесь уже включала в себя все необходимые компоненты, в том числе исходную матрицу ДНК в случае с плазмидой или РНК в случае с вакциной, в ячейки микрочипа добавляли только воду и ПЦР-буфер. Полученные данные приведены в табл. 19. К сожалению, исходная концентрация вакцины не указывается в паспорте из соображений коммерции, поэтому в таблице указаны кратности разбавления исходного раствора.

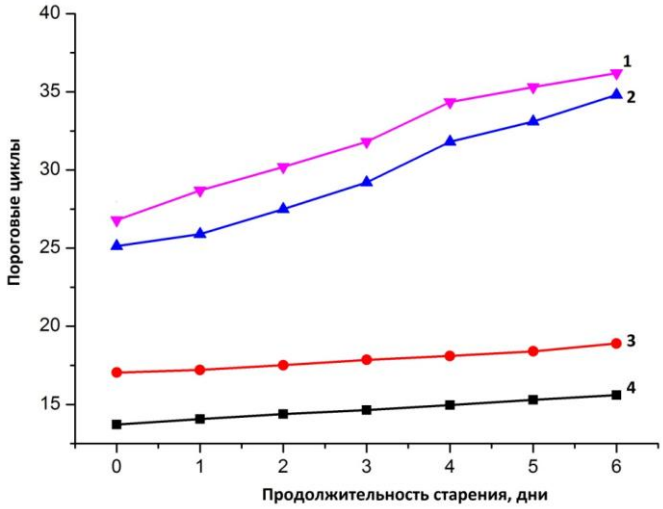
Эффективность ПЦР была оценена по углу наклона градуировочной зависимости, исходя из формулы:

$$E = \left(\frac{1}{10^{-1/A}} - 1\right) \times 100\%,$$

где А – угловой коэффициент градуировочной зависимости порогового цикла от концентрации ДНК (а случае плазмиды) или кДНК (в случае вакцины). Значения Е находились в пределах от 95 до 100% на протяжении всего эксперимента по состариванию микрочипа с лиофилизированными реактивами, что указывает на отсутствие значительной потери активности ферментов, а также подтверждает инертность поверхности алюминиевого микрочипа. Графики зависимостей порогового цикла ОТПЦР от длительности старения для микрочипов с иммобилизированными положительными контролями представлены на рис. 67

Таблица 19. Значения пороговых циклов ОТПЦР для полностью иммобилизированных РНК тест-систем

	Пороговый цикл				
	Плазмида			вакцина	
Длительность старения, дни	120 пкг/мкл	12 пкг/мкл	E, % n = 3	$c_o \times 10^{-3}$	$c_o \times 10^{-4}$
0	13.92	17.04	102 ± 3	25.13	28.37
1	14.07	17.21	102 ± 1	25.91	31.25
2	14.39	17.51	98 ± 2	27.52	31.99
3	14.65	17.86	98 ± 3	29.02	33.75
4	14.97	18.12	97 ± 2	31.82	35.57
5	15.31	18.43	98 ± 2	33.12	36.14
6	15.62	18.92	95 ± 2	34.81	37.82



.

Рис. 67. Графики зависимостей порогового цикла от длительности старения для микрочипов с иммобилизированными положительными контролями с использованием раствора стабилизаторов № 3 и раствора БСА 2 мг/мл. 1 – раствор вакцины 1:1000 , 2 – раствор вакцины 1:10000 , 3 – раствор плазмиды 12 пкг/мкл, 4 – раствор плазмиды 120 пкг/мкл.

Как видно из представленных выше данных, раствор стабилизаторов № 3 с добавкой БСА позволяет эффективно стабилизировать не только реактивы, но и

положительные контроли – вакцину вируса и кДНК плазмиду. Однако, стоит отметит, что в процессе ускоренного старения пороговые циклы в случае плазмиды несколько возрастают. При лиофилизации вакцины, напротив, наблюдается более крутая зависимость порогового цикла от продолжительности хранения. Пороговые циклы для двух представленных концентраций отличаются, в среднем, на 3.5 цикла. В соответствии с формулой для пересчета сроков искусственного старения в срок хранения следует, что 6 дней хранения микрочипов с лиофилизированными реактивами при + 35 °С соответствуют 103 суткам хранения при + 4 °С. Таким образом, при таком сроке хранения, раствор вакцины, разбавленный в 10^4 раз относительно исходного раствора может использоваться в качестве внутреннего контроля. При более продолжительном периоде хранения, вероятно, требуется большая концентрация для обеспечения достоверных результатов.

Таким образом, в результате исследований по стабилизации ПЦР системы, состоящей из двух ферментов, выявлено, что наилучшими показателями из всех исследованных модельных растворов обладает раствор, содержащий трегалозу, ПВП, Tween 20 в концентрациях 13.8, 1.9, 1.1 ммоль/л с добавкой БСА 2 мг/мл. Срок хранения алюминиевых микрочипов с иммобилизированными реактивами, полученный в ходе эксперимента с искусственным хранением составил 103 дня при + 4 °С, что вполне приемлемо для большинства лабораторных нужд. Успешная лиофилизация положительного и отрицательного контроля позволила добиться большей достоверности результатов анализа, минимизировать количество мануальных операций исследователя и создать одинаковые условия хранения всех реагентов ОТПЦР.

Оценка специфичности предлагаемой аналитической системы. В методе ОТПЦР для характеристики разработанной тест-системы используют понятие специфичности отжига разработанных праймеров по сравнению с другими РНК-объектами, которые могут встретиться в анализируемых образцах. Для проверки специфичности предлагаемой аналитической системы было исследовано влияние:

РНК кур, Бурсального вируса (ИБДВ), а также Реовируса (АОРВ). В случае недостаточной специфичности отжига праймеров наличие данных объектов в пробе может способствовать ложноположительным результатам. Вирусы НБ и ИБК также были проверены на предмет кросс-отжига соответствующих тест-систем.

Диагностическую специфичность определяли как отношение истинно-отрицательных результатов к сумме отрицательных и ложноположительных результатов.

Полученные данные (табл. 20) свидетельствуют об отсутствии кросс-отжига между разработанными тест-системами, а также о 100% специфичности предлагаемой аналитической системы относительно РНК-содержащих объектов, которые могут содержаться в исследуемой пробе.

Таблица 20. Данные проверки специфичности предлагаемой аналитической системы в случае других вирусных агентов а также собственной РНК кур

Исследуемый РНК/введенный РНК	n О проб (ОТПЦР)	n ИО проб (культурально)	n ЛП проб (ОТПЦР)	Диагностическая специфичность, %
НБ/ИБК	25	25	0	100%
ИБК/НБ	25	25	0	100%
(НБ/ИБК)/РНК кур	25	25	0	100%
(НБ/ИБК) /АОРВ	25	25	0	100%
(НБ/ИБК)/ИБДВ	25	25	0	100%

VI. Оптимизация пробоподготовки вирусных пассажей на курином эмбрионе

Стадия пробоподготовки исследуемых образцов часто является ключевой для успешного проведения ОТПЦР. Ввиду направленности данного метода аналитической химии именно на скрининг, важным критерием пробоподготовки является ее экспрессность и масштабируемость в условиях потокового анализа. В начале данной работы опробованы готовые наборы реагентов. Так, система пробоподготовки на основе эффекта преципитации Рибо-ПРЕП показывала отличные результаты. Выделенная таким образом проба была свободна от ингибиторов, долго хранилась и не деградировала в процессе хранения. Однако данная методика требовала навыков и была достаточно времязатратной. Другой коммерческий набор Рибо-СОРБ основан на сорбции НК на поверхности силикагеля. Данная методика достаточно простая в исполнении, однако чистота полученной пробы оказалась менее подходящей, чем в предыдущем случае. И хотя оба коммерческих набора давали вполне приемлемые результаты выделения РНК, они обладали одним чрезвычайно важным и весомым недостатком. В обоих случаях в процессе пробоподготовки для осаждения преципитата или очистки сорбента требовалось центрифугирование на скорости 13000 об/мин. Для того, чтоб обеспечить такие условия осаждения требовалась ультрамикроцентрифуга, которая имеет высокую цену а также делает практическим невозможным проведение пробоподготовки в полевых условиях и в небольших лабораториях на птицефабриках.

С другой стороны, метод адсорбции НК на магнитных частицах не требует использования ультрамикроцентрифуги и позволяет провести пробоподготовку гораздо быстрее. С целью доказать эффективность подхода с использованием магнитного сорбента для РНК использована методика, разработанная в нашей лаборатории для выделения ДНК. Однако, полученные результаты (табл. 21)

выделения РНК из четвертого пассажа вирусов НБ и ИБК свидетельствовали о неэффективности существующей методики в случае вирусов птиц. Вследствие этого приняли решение попробовать максимально оптимизировать стадии пробоподготовки на основе суспензии магнитного сорбента и приблизить их к коммерчески доступным по пороговым циклам ОТПЦР.

Таблица 21. Результаты выделения вирусов НБ и ИБК референтными методами РИБО-ПРЕП (1), РИБО-СОРБ (2) и магнитными частицами (3) и спектрофотометрическая чистота их выделенных проб (n = 7, P = 0.95)

НБ			
	РИБО-ПРЕП	РИБО-СОРБ	МЧ
C_t	13.4 ± 0.71 (5.3%)	14.27 ± 0.14 (1.0%)	29.69 ± 0.46 (1.5%)
A260/A280	2.1	1.75	1.24
ИБК			
	РИБО-ПРЕП	РИБО-СОРБ	МЧ
C_t	18.98 ± 0.58 (3.1%)	18.73 ± 0.48 (2.6%)	31.5 ± 1.77 (5.6%)
A260/A280	1.98	1.83	1.53

VI.1. Оптимизация температуры и времени лизиса клеток для схемы пробоподготовки на основе суспензии магнитного сорбента

На первой стадии пробоподготовки РНК для дальнейшего ОТПЦР анализа исследуемее клетки разрушали с помощью хаотропных веществ, которые взаимодействовали непосредственно с клеточными мембранами. В данной работе использовали лизирующий раствор на основе солей гуанидина. Стоит отметить, разрушение клеток и их органелл обязательно проводится при высоких температурах, однако слишком сильное нагревание может способствовать деградации РНК, поэтому, практический интерес представляло найти такую

температуру стадии лизиса, при которой разрушение было бы эффективным, и в то же время безопасным для фрагментов РНК.

Пробы пассажей вирусов НБ и ИБК подвергали лизису в течение разного времени, остальные стадии пробоподготовки проводили одинаково. Полученные результаты приведены на рис.68 и 69.

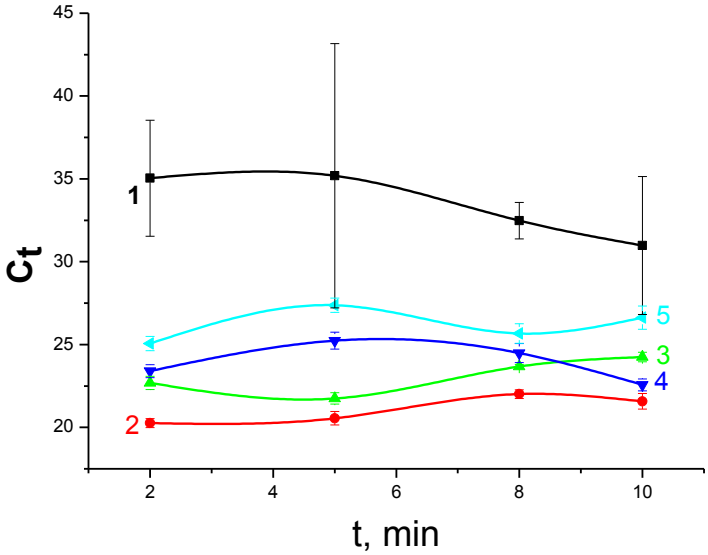


Рис. 68. График зависимости порогового цикла от времени лизиса клеток, зараженных вирусом NVD при разных температурах: 1 — 60 °C, 2 — 70 °C; 3 — 80 °C; 4 — 85 °C; 5 — 90 °C.

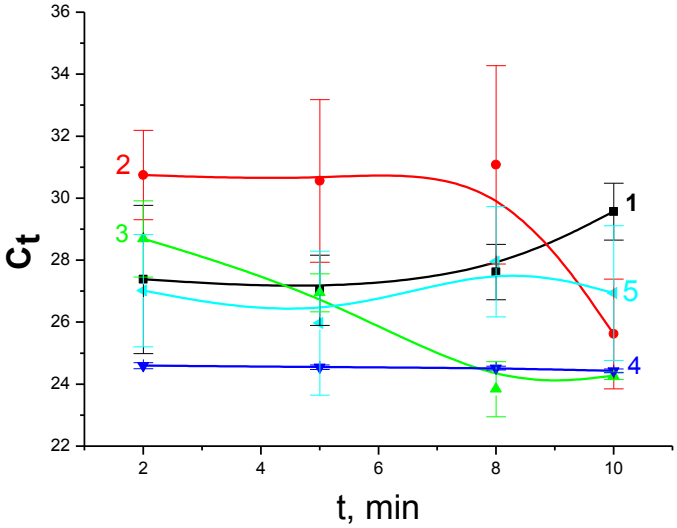


Рис. 69 График зависимости порогового цикла от времени лизиса клеток, зараженных вирусом ИБК при разных температурах: 1 — 60 °C, 2 — 70 °C; 3 — 80 °C; 4 — 85 °C; 5 — 90 °C.

Как видно из представленных графиков, характер зависимости пороговых циклов от времени лизиса сходный для обоих вирусов. Так, при 60 °С даже 10 минут нагрева недостаточно для полноценного разрушения клеток – пороговые циклы достаточно высокие. Стоит также отметить очень высокое значение погрешности значения порогового цикла при этой температуре, что также свидетельствует о низкой воспроизводимости процесса лизиса. Аналогичная ситуация наблюдается и при высокой температуре (90 °С). Причиной высоких пороговых циклов при 90 °С может быть и высокая вероятность частичной денатурации молекул РНК, однако при увеличении времени нагревания сильного повышения порогового цикла не наблюдается, относительная погрешность невысокая.

В случае вируса Ньюкасла максимальной концентрации РНК удалось достичь при нагревании пробы с лизирующим раствором при 70 °С в течение 5 минут. Близкие результаты также показала обработка пробы при 80 °С. Данные, полученные с помощью нагревания при таких температурах отличались также небольшой погрешностью и хорошей воспроизводимостью.

В процессе лизиса клеток, зараженных вирусом бронхита, максимальной эффективности и минимальной погрешности удалось добиться при нагревании лизата в течение 8 минут при 80 °С, а также при 85 °С.

Для того, чтобы определиться с оптимальной температурой лизиса, которая подходила бы для обоих вирусов, стоит также удостовериться в чистоте пробы, так как этот параметр является критическим для проведения ОТПЦР. Для оценки чистоты пробы используют параметр А260/А280, который является отношением поглощения пробы при двух длинах волн. Считается, что проба является чистой и пригодной для дальнейшего проведения ПЦР, если А260/А280 приближается к значению 2. Спектрофотометрические исследования проб вирусов представлены на рис.70 и 71

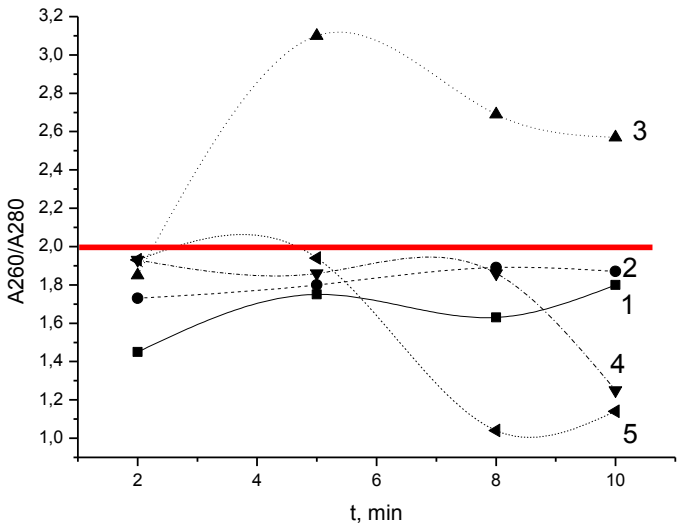


Рис. 70. График зависимости чистоты выделенных проб вируса НБ (A260/A280) от времени и температуре лизиса НБ при: 1 – 60 °C, 2 – 70 °C; 3 – 80 °C; 4 – 85 °C; 5 – 90 °C.

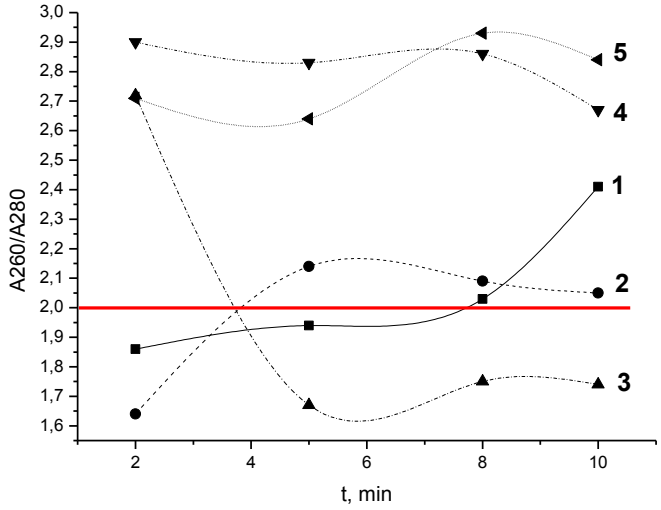


Рис. 71. График зависимости чистоты выделения пробы (A260/A280) от времени и температуре лизиса ИБК при: 1 – 60 °C, 2 – 70 °C; 3 – 80 °C; 4 – 85 °C; 5 – 90 °C.

Из графиков видно, что чистота выделенной РНК достаточно сильно зависит от температуры лизиса. Так, в случае лизиса обоих вирусов при 70 °C отношение A260/A280 принимает значения, которые максимально близки к двум. В качестве оптимального времени обработки выбрали 8 минут.

Таким образом, оптимальные температура и время лизиса для пробоподготовки РНК оказались ниже, чем для ДНК ввиду того, что молекулы РНК подвержены деградации в большей степени.

VI.2. Оптимизация стадии сорбции РНК на поверхности магнитного сорбента

Применение магнитных сорбентов на основе оксида кремния хорошо изучено в случае ДНК. Учитывая неселективные механизмы сорбции НК на поверхности таких сорбентов можно предположить, что они будут неплохо адсорбировать молекулы РНК. Однако, ввиду неселективного связывания с гидроксильными группами на поверхности следует также ожидать и сорбции некоторых ингибиторов, таких как белки, сложные полисахариды, производные жиров. Ввиду этого, следует изучить зависимость сорбции искомых фрагментов РНК от количества введенной в лизат суспензии сорбента.

Так, к разным объемам суспензии магнитного сорбента были добавлены лизаты вирусов Ньюкасла и куриного бронхита, подготовленные в одинаковых условиях (рис. 72).

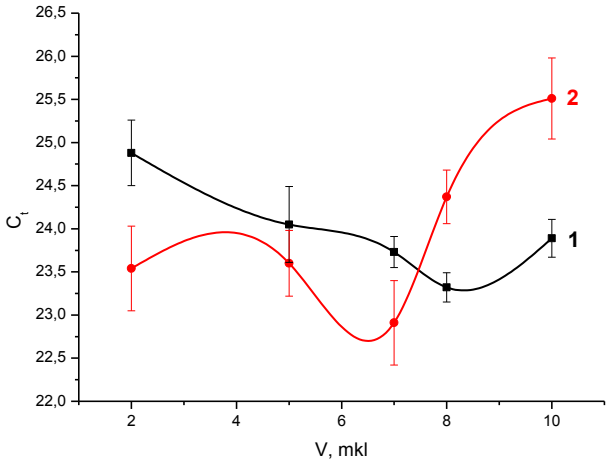


Рис. 72. График зависимости порогового цикла ОТПЦР от объёма суспензии магнитного сорбента на основе оксида кремния для выделенных проб 1 — вируса НБ и 2 — вируса ИБК.

Как видно из графика, при увеличении объема суспензии магнитного сорбента с 2 до 7–8 мкл наблюдается снижение порогового цикла ОТПЦР, то есть увеличение концентрации выделенной РНК. Однако, при дальнейшем росте

конечной концентрации сорбента значение пороговых циклов растет, что может быть связано как раз с сорбцией побочных продуктов лизиса клеток.

Таким образом, оптимальное количество суспензии магнитного сорбента следует принять за 7–8 мкл.

VI.3. Очистка сорбента от гидрофильных и гидрофобных ингибиторов

После того, как молекулы РНК адсорбировались на поверхности магнитного сорбента, следует стадия очистки. Как уже отмечалось выше, ввиду неселективной сорбции на поверхности сорбента могут находится всевозможные гидрофильные и гидрофобные примеси, которые впоследствии способны ингибировать ОТПЦР. В класическом подходе для ДНК используют две стадии очистки. Для гидрофильных ингибиторов, таких, как белки, используют 70% этиловый спирт; а от гидрофобных примесей (жиры и их производные) сорбент можно очистить с помощью ацетона.

В случае РНК было принято в качестве очищающих растворов взять те же растворители. Однако, ввиду невысокой температуры лизиса, на поверхность сорбента могли сорбироваться большие фрагменты молекул, которые могут и не очиститься, поэтому стоило попробовать очищать сорбент одним и тем же растворителем несколько раз. Отметим, что после каждой очистки пробирки тщательно ресуспендировали, а потом вставляли в магнитный штатив, избегая стадии центрифугирования на ультрацентрифуге.

Результаты ОТПЦР в зависимости от способа очистки РНК спиртом и ацетоном представлены в рис. 73 и 74.

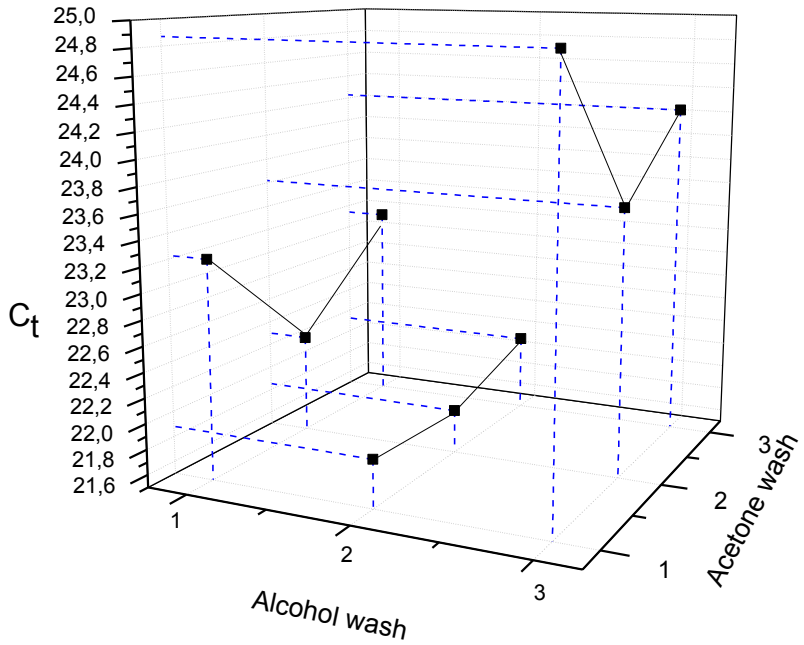


Рис. 73. Диаграмма зависимости порогового цикла ПЦР от количества раз обработки сорбента в спирте и ацетоне для вируса Ньюкасла.

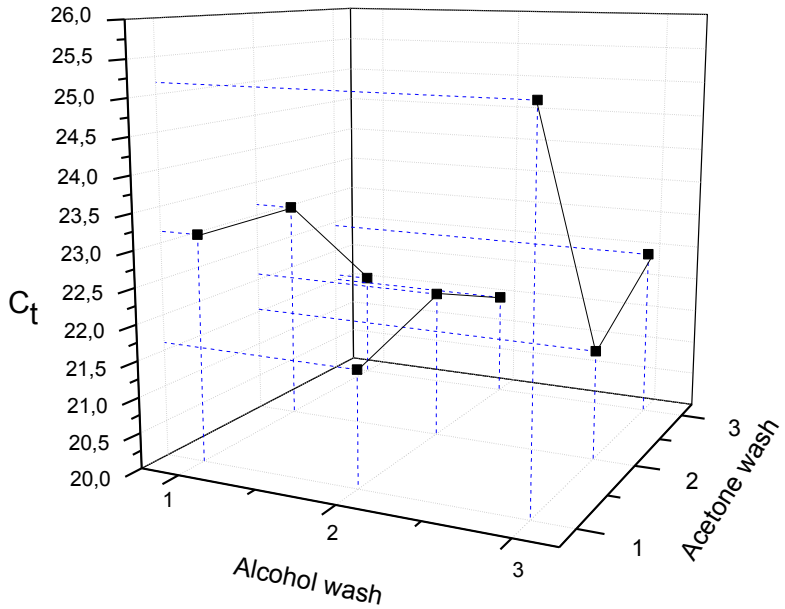


Рис. 74. Диаграмма зависимости порогового цикла ПЦР от количества раз обработки сорбента в спирте и ацетоне для вируса инфекционного бронхита.

Характер зависимости порогового цикла от степени очистки сходен в случае обоих вирусов. Так, увеличение количества раз очистки с помощью спирта (3 раза) ведет к сильному повышению пороговых циклов ОТПЦР, что соответствует низким концентрациям РНК. Вероятно, в процессе многократной обработки спиртом происходит частичное смывание молекул РНК с сорбента. Однако видно, что одного раза обработки недостаточно. Таким образом, оптимальной очистки от гидрофильных примесей можно добиться, применяя спирт два раза.

Обработка ацетоном влияет на концентрацию не так критично. Из диаграмм 73 и 74видно, что 2–3 раза очистки сорбента в ацетона дают схожие результаты в случае двух вирусов.

В табл. 22 и 23 представлены спектрофотометрические данные о чистоте проб, полученных в результате разных стадий очистки сорбента.

Таблица 22. Спектрофотометрческая чистота (A260/A280) проб вируса Ньюкасла в зависимости от количества стадий очистки

Спирт / Ацетон	1 раз	2 раза	3 раза
1 раз	1.34	1.30	1.33
2 раза	1.25	1.10	**1.57**
3 раза	1.27	1.26	1.26

Таблица 23. Спектрофотометрческая чистота (A260/A280) проб вируса куриного бронхита в зависимости от количества стадий очистки

Спирт / Ацетон	1 раз	2 раза	3 раза
1 раз	1.34	1.32	1.36
2 раза	1.25	**1.39**	1.18
3 раза	1.47	1.28	1.40

В случае вируса Нюкасла максимальной чистоты пробы удалось добиться при очистке пробы 2 раза спиртом и 3 раза ацетоном. И хотя для вируса бронхита макимальная чистоту пробы показала обработка 1 раз спиртом и 3 раза ацетоном, но в связи с данным ОТПЦР обработка по схеме 2 раза спиртом и два раза ацетоном также показала приемлимые результаты.

Таким образом, при очистке сорбента 2 раза спиртом и два раза ацетоном удалось получить достаточно чистые пробы для дальнейшего анализа.

VI.4. Оптимизация стадии элюирования РНК с магнитного сорбента

На заключительном этапе пробоподготовки адсорбированные на поверхности магнитного сорбента РНК элюировали РНК-буфером. Для смещения равновесия в процессе десорбции нужно нагревать систему, однако следует избегать слишком высоких температур ввиду термической деградации РНК.

На рис. 75 и 76 представлены результаты элюирования РНК при разных температурах и временах удерживания.

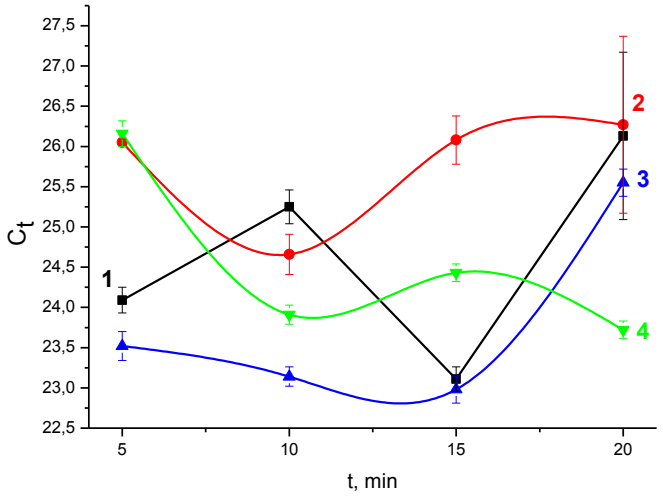


Рис. 75**.** График зависимости порогового цикла ОТПЦР от температуры и времени элюирования РНК с магнитного сорбента для вируса НБ: 1 — 60 °С, 2 — 70 °С; 3 — 80 °С; 4 — 85 °С; 5 — 90 °С.

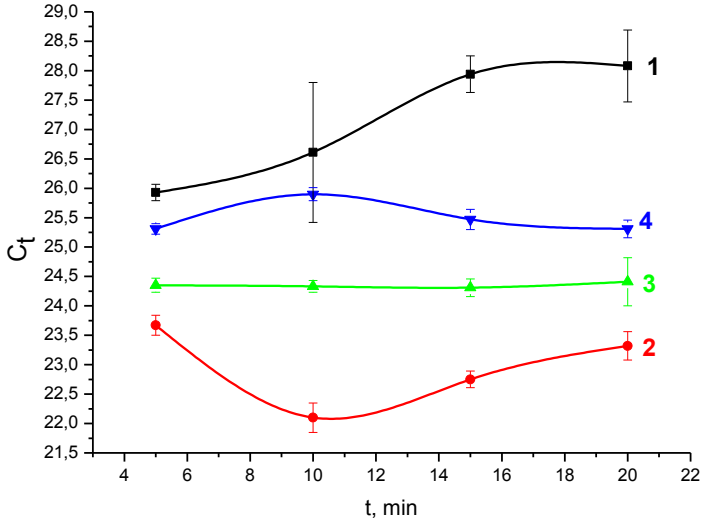


Рис. 76. График зависимости порогового цикла ОТПЦР от температуры и времени элюирования РНК с магнитного сорбента для вируса ИБК: 1 — 60 °C, 2 — 70 °C; 3 — 80 °C; 4 — 85 °C; 5 — 90 °C.

Из представелнных графиков видно, что 60 °C недостаточно для того, чтобы все молекулы РНК десорбировались с магнитного сорбента, так как полученные значения пороговых циклов высокие. С другой стороны, при слишком высокой температуре возможна частичная деградация молекул РНК, что также сопровождается высокими C_t.

Исходя из графиков для обоих вирусов принято, что оптимальное время десорбции составляет 15 минут при 80 °C, так как в таких условиях для обоих вирусов удалось получить приемлемые результаты.

Отдельно стоит рассмотреть вопрос, каким объемом РНК-буфера следует пользоваться для десорбции РНК с поверхности магнитного сорбента. С одной стороны проба должна быть достаточно концентрированной для дальнейшего проведения ОТПЦР, однако при высоких концентрациях РНК следует также ожидать и высоких концентраций ингибиторов, которые в то или иной степени все равно присутствуют в элюате. На рис. 77 представлен график зависимости порогового цикла от объёма элюирующего РНК-буфера в случае двух вирусов.

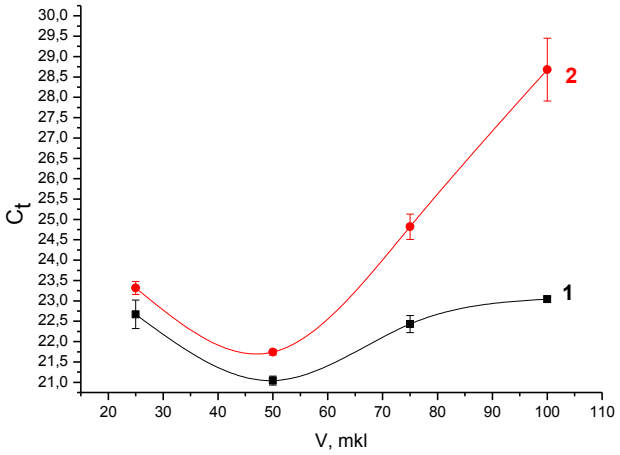


Рис. 77. График зависимости порогового цикла от объёма элюирующего раствора для 1 – вируса НБ и 2 – вируса ИБК.

Из рисунка 77 следует, что при десорбции 50 мкл буфера пороговые циклы ОТПЦР ниже, чем при 25 мкл. Можно предположить, что двукратное разбавление ведет к нивелированию ингибиторного эффекта некоторых примесей, которые десорбировались помимо целевых РНК. При дальнейшем увеличении объема элюента наблюдается рост пороговых циклов, который, по-видимому, соответствует разбавлению пробы.

Для оценки полноту десорбции РНК в предложенных условиях, стадию элюирования проводили последовательно несколько раз. Результаты ОТПЦР данного эксперимента представлены в табл. 24.

Таблица 24**.** Результаты последовательного элюирования с магнитного сорбента для НБ и ИБК (n = 10, P = 0.95)

проба	**C_t**	**Проба**	**C_t**
НБ (первый раз)	21.34 ± 0.36	ИБК (первый раз)	21.19 ± 0.22
НБ (второй раз)	23.15 ± 0.04	ИБК (второй раз)	25.72± 0.23
НБ (третий раз)	нет старта	ИБК (третий раз)	27.00 ± 0.29

Как видно из таблицы, пороговые циклы ОТПЦР, полученные при повторном элюировании с сорбента отличаются на 3–4 единицы. Исходя из этого, можно

сделать вывод, что более 90% связанной РНК десорбировали с сорбента с первого раза.

В табл. 25 представлены результаты сравнения предлагаемых условий пробоподготовки с аналогичными условиями для ДНК, которые пробовали использовать для РНК без оптимизации. Так, данные ПЦР указывают, что с помощью подбора правильных параметров удалось увеличить концентрацию РНК в пробе на три порядка.

Таблица 25. Результаты выделения НБ и ИБК с помощью магнитного сорбента до и после оптимизации (n = 10, P = 0.95)

проба	***C_t***	***чистота выделения (A260/A280)***
НБ до оптимизации	29.69 ± 0.46	1.24
НБ после оптимизации	21.25 ± 0.11	1.44
ИБК до оптимизации	31.5 ± 1.77	1.53
ИБК после оптимизации	21.62 ± 0.41	1.58

После оптимизации всех стадий пробоподготовки проведено сравнение по временным затратам а также количеству ручных операций между предложенной методикой и коммерчески доступными наборами. Для того, чтобы провести пробоподготовку стандартными методами, требовалось 40–45 минут а также 52 (РИБО-ПРЕП) и 62 (РИБО-СОРБ) ручных операции. В то же время для методики на основе магнитного сорбента нужно всего 25 минут и 24 ручных операции. Таким образом, трудовые затраты сократились почти в два раза. Также необходимо заметить, что применение магнитного сорбента позволило значительно сократить энергетические затраты ввиду отсутствия необходимости использовать мощную и дорогостоящую ультрацентрифугу. Безусловно, используя магнитный сорбент, не удалось достичь таких же пороговых циклов ОТПЦР, как для коммерческих методов, однако полученная таким образом

концентрация РНК легко обеспечивает качественное определение искомых вирусов.

Оценка чувствительности микрочиповой аналитической системы. Для того, чтобы оценить чувствительность предложенной аналитической системы с лиофилизированными реактивами, включая стадию пробоподготовки, было сделано предположение о начальной концентрации используемой вакцины ИБК, штамм Н120. В существующих данных встречаются оценки концентрации коммерчески доступных вакцин на уровне 100 нг/мл. Учитывая длину генома исследуемых вирусов (27000 пар нуклеотидов) такие концентрации соответствуют 7×10^9 копий/мкл. Таким образом, градуировочная зависимость порогового цикла от логарифма концентрации РНК примет следующий вид (рис. 78)

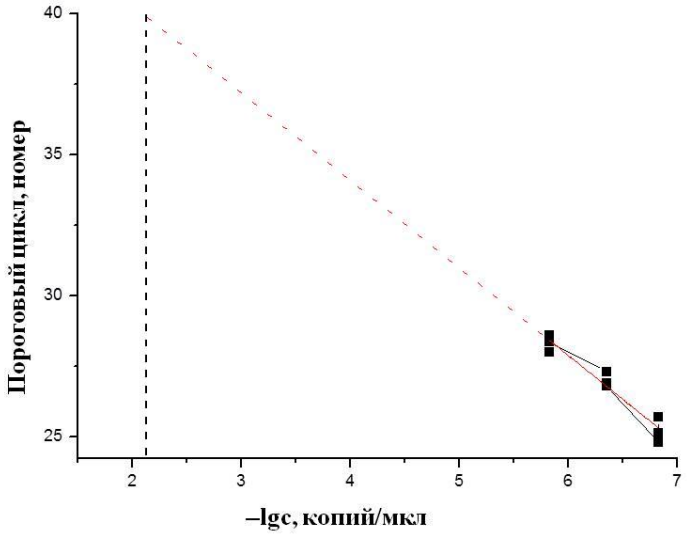


Рис. 78. Градуировочная зависимость для определения вируса ИБК штамм Н120 с помощью микрочиповой аналитической системы с лиофилизированными реактивами.

Как было отмечено ранее, в методе ОТПЦР старт кривых после 40 цикла, связанный со специфическим отжигом праймеров на искомых РНК не наблюдается. Исходя из этого факта, можно провести оценку чувствительности предлагаемой системы. Так, старт на 40 цикле соответствует порядку 100

копий/мкл. Такая чувствительность встречается и для стандартной пробирочной ОТПЦР при анализе вирусов. В случае иммунохимических методов (например, блоттинга) а также культурального метода пассажей чувствительность методик для определения вирусов НБ и ИБК ниже.

Таким образом, разработанная микрочиповая аналитическая система может использоваться для скрининга большого количества проб, а также для качественного определения вирусов НБ и ИБК. При этом, в сравнении с классическими методами время анализа сокращается в десятки раз, а предложенная схема пробоподготовки позволяет проводить анализ непосредственно в небольших ветеринарных лабораториях, избегая транспортировки термолабильной РНК.

ВЫВОДЫ

1. Разработана аналитическая система с микрочипами из алюминия, поверхность которых модифицирована методом плазмохимического осаждения, содержащими полностью лиофилизированные реактивы для определения РНК методом ОТПЦР.

2. Эффективность ПЦР с лиофилизированными ОТПЦР реактивами увеличена до предельно возможной величины 98 ± 2% за счет модификации поверхности алюминиевых микрочипов с помощью метода плазмохимического синтеза углеродсодержащих пленок, что позволило существенно увеличить производительность и технологичность процесса производства микрочипов.

3. Разработан способ и создана экспериментальная установка для лиофилизации ОТПЦР реактивов в алюминиевых микрочипах.

4. Достигнуты достаточно длительные для практического применения сроки хранения микрочипов с полностью лиофилизированными реактивами и контрольными образцами (8 месяцев), что позволило их использовать при проведении анализа реальных образцов.

5. Разработана методика пробоподготовки биологического материала, содержащего вирусы, с использованием магнитного сорбента для определения РНК с помощью микрочиповой ОТПЦР. На примере обнаружения вирусов птиц в реальных образцах показано, что разработанная микрочиповая аналитическая система позволяет существенно сократить время анализа и затраты на дорогостоящие реактивы и оборудование.

Перечень используемых сокращений

ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
ОТПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
БСА – бычий сывороточный альбумин
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
НК – нуклеиновая кислота
ПЦР РВ– полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
МЭМС – микроэлектромеханическая система
ПХО – плазмохимическое осаждение
ГМДС – гексаметилдисилоксан
ЭИС – электрохимическая импедансная спектроскопия
ДЭС – двойной электрический слой
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
КРС – комбинационное рассеяние света
ПВП – поливинилпирролидон
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
НБ – Ньюкасла болезнь
ИБК – инфекционный бронхит кур
РГА – реакция гемагглютинации
РТГА – реакция торможения гемагглютинации
ИФА – иммуноферментный метод
ROX – карбокси-Х-родамин
FAM – карбоксифлуоресцеин
PECVD – plasma enhanced chemical vapor deposition

ЛИТЕРАТУРА

1. Yoon-Kyoung Cho, Jintae Kim, Youngsun Lee, Young-A. Kim. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 2161–2169.

2. Shi-Hua Wang, Ji-Kai Wen, Ya-Feng Zhou, Zhi-Ping Zhang, Rui-Fu Yang, Ji-Bin Zhang, Jia Chen, Xian-En Zhang. Identification and characterization of Bacillus anthracis by multiplex PCR on DNA chip. Biosensors and Bioelectronics 20 (2004) 807–813.

3. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени [Электронный ресурс] / Д. В. Ребриков [и др.] ; ред.д.б.н.Д.В.Ребрикова. — 4-е изд. (эл.). — М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 223 с..

4. E. van Pelt-Verkuil Principles and Technical Aspects of PCR Amplification/ E. van Pelt-Verkuil, A. van Belkum, J.P. Hays// Springer Science. - 2008, - p. 332.

5. Сляднев, М.Н.. Микрочиповые системы для молекулярно-генетического анализа / М.Н. Сляднев// Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева). 2011, т. LV. № 2.

6. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell, 5th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, NY, pp 538-539.

7. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (December 1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (12): 5350–4.

8. Michael J. McPherson PCR Second Edition / Michael J. McPherson, Simon Geir Møller// - 2006. - p. 209-212.

9. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (June 2005). "Quantitative real-time RT-PCR-a perspective". J. Mol. Endocrinol. 34 (3): 597–601

10. Hierro N, Esteve-Zarzoso B, González A, Mas A, Guillamón JM (November 2006)."Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine". Appl. Environ. Microbiol. 72 (11): 7148–55.

11. Slomka MJ, Pavlidis T, Coward VJ, et al. (July 2009). "Validated RealTime reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses". Influenza Other Respi Viruses 3 (4): 151–64.

12. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (October 2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods". Anal. Biochem. 285 (2): 194–204.

13. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER (February 2001). "Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR". J Mol Diagn 3 (1): 26–31.

14. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, et al. (June 2007). "Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes". Curr. Genomics 8 (4): 234–51.

15. Yang DK, Kweon CH, Kim BH, et al. (December 2004). "TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus". J. Vet. Sci. 5(4): 345–51.

16. Holden, M. J.; Wang, L. (2008). "Quantitative Real-Time PCR: Fluorescent Probe Options and Issues". Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II. Springer Series on Fluorescence 6. p. 489.

17. Wong ML, Medrano JF (July 2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation". BioTechniques 39 (1): 75–85.

18 Sharkey FH, Banat IM, Marchant R (July 2004). "Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology". Appl. Environ. Microbiol. 70 (7): 3795–806.

19. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (October 2000). "Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology". Clin. Microbiol. Rev. 13 (4): 559–70.

20. Зорина, В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: ДНК-технология, 2012. — 80 с.

21. Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н. и др. Полимеразная цепная реакция: приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик // Научное приборостроение. - 2011. - Т. 21, № 4. - С. 120-136. / Antonova O.S., Rudnitskaya G.E., Tupik A.N. et al. Polymerase chain reaction:

instrumental and methodological realization. A review of analytical characteristics // Scientific Instrument-Making [Nauchnoye Priborostroyenie]. - 2011. - Vol. 21, № 4. - P. 120-136 [Russian]..

22. Hyun-Sop Choe a, Dong Sup Lee a, Seung-Ju Lee a, Sung-Hoo Hong b, Dong Choon Park c, Mi-Kyung Lee d, Tae-Hyoung Kim e, Yong-Hyun Cho. Performance of AnyplexTM II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. International Journal of Infectious Diseases (2013) xxx.e1–xxx.e7.

23. Shiao YH (December 2003). "A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification". BMC Biotechnol. 3: 22..

24. Gettemy JM, Ma B, Alic M, Gold MH (February 1998). "Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family". Appl. Environ. Microbiol. 64 (2): 569–74.

25. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (March 2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data". Neurosci. Lett.339 (1): 62–69.

26. Zhang C., Xing D. // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. P. 4223-37.

27. Zhang Y., Ozdemir P. // Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 638. P. 115-125.

28. Geschke O., Klank H., Telleman P., eds. Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices. Wiley-VCH, 2008.

29. Herold K.E., Rasooly A., eds. Lab-on-a-Chip Technology (Vol. 1): Fabrication and Microfluidics. Caister Academic Press, 2009.

30. Madou M.J. Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology (Vol.3) From MEMS to Bio-MEMS and Bio-NEMS: Manufacturing Techniques and Applications. CRC Press, 2011.

31. Nge P.N., Rogers C.I., Woolley A.T. // Chemical Reviews. 2013. Vol. 113. P. 2550-2583.

32. Choi J., Jeong Y., Han H.S., Lee K.H. // Biosci Rep. 2014. Vol. 34.

33. West J., Becker M., Tombrink S., Manz A. // Anal. Chem. 2008. Vol. 80. P. 4403-19.

34. Chang C.-M., Chang W.-H., Wang C.-H., Wang J.-H., Mai J.D., Lee G.-B. // Lab Chip. 2013. Vol. 13. P. 1225-1242.

35. Wang J.-H., Wang C.-H., Lee G.-B. // Ann Biomed Eng. 2012. Vol. 40. P. 1367-1383.

36. Day E., Dear P.H., McCaughan F. // Methods. 2013. Vol. 59. P. 101-107.

37. Sedlak H.R., Jerome K.R. // Expert Review of Molecular Diagnostics. 2014. Vol. 14. P. 501-507.

38. Northrup M.A., Ching M.T., White R.M., Watson R.T. // In Transducers'93, seventh international conference on solid state Sens Actuators, Yokahama, Japan,. 1993. P. 924.

39. Neuzil P., Zhang C., Pipper J., Oh S., Zhuo L. // Nucleic Acids Res. 2006. Vol. 34. P. e77.

40. Hong J., Edel J.B., deMello A.J. // Drug Discov Today. 2009. Vol. 14. P. 134-46.

41. Lee H., Han N., Choi I.H., Han K.H. // Biomed Microdevices. 2013. Vol. 15. P. 9-15.

42. 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 U S A. 2006. Vol. 103. P. 19272-7.

43. Lien K.Y., Lin J.L., Liu C.Y., Lei H.Y., Lee G.B. // Lab Chip. 2007. Vol. 7. P. 868-75.

44. Seung-min P., Sabour A.F., Jun Ho S., Sang Hun L., Lee L.P. // Biomedical Engineering, IEEE Transactions on. 2014. Vol. 61. P. 1506-1521.

45. Tan J.J.L., Capozzoli M., Sato M., Watthanaworawit W., Ling C.L., Mauduit M., Malleret B., Grüner A.-C., Tan R., Nosten F.H., Snounou G., Rénia L., Ng L.F.P. // PLoS Negl Trop Dis. 2014. Vol. 8. P. e3043.

46. Petralia S., Verardo R., Klaric E., Cavallaro S., Alessi E., Schneider C. // Sensors and Actuators B: Chemical. 2013. Vol. 187. P. 99-105.

47. Teo J., Di Pietro P., San Biagio F., Capozzoli M., Deng Y.M., Barr I., Caldwell N., Ong K.L., Sato M., Tan R., Lin R. // Arch Virol. 2011. Vol. 156. P. 1371-8.

48. Сляднев, М. Н. Модифицирование поверхности микрореакторов микрофлюидного чипа для проведения полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени. / М. Н. Сляднев, М. В. Лаврова, М. А. Еркин, Д. В. Нàволоцкий, А. В. Крисько, А. А. Ганеев. // НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ, 2007. Том 17. № 3.

49. Cakir O. Chemical etching of aluminium. Journal of materials processing technology. 199. 2008. 337–340

50. Breslin, C. B. Studies on the passivation of aluminium in chromate and molybdate solutions. C. B. Breslin, G. Treacy, W. M. Carroll. Corrosion Science, Vol. 36, No. 7 (1994) 1143-1154.

51. Tammy L. Metroke, Jaspreet S. Gandhi, Allen Apblett. Corrosion resistance properties of Ormosil coatings on 2024-T3 aluminum alloy. Progress in Organic Coatings 50 (2004) 231–246

52. Лисичкин, Г. В. Химия привитых поверхностных соединений / Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан, П.Н. Нестеренко, П.Г. Мингалев, Д.Б. Фурман. – Москва, ФИЗМАТЛИТ (2003).

53. Pfohl, C. Application of wear-resistant PACVD coatings in aluminium diecasting: economical and ecological aspects. C. Pfohl, A. Gebauer-Teichmann, K.-T. Rie. Surface and Coatings Technology 112 (1999) 347–350.

54. Ravi, N. Deposition of diamond-like carbon films on aluminium substrates by RF-PECVD technique: Influence of process parameters. N. Ravi, V.L. Bukhovets, I.G. Varshavskaya, G. Sundararajan. Diamond & Related Materials 16 (2007) 90–97

55. Elly Gil, J.B. Park, J.S. Oh, G.Y. Yeom. Characteristics of SiOx thin films deposited by atmospheric pressure chemical vapor deposition as a function of HMDS/O2 flow rate. Thin Solid Films 518 (2010) 6403–6407

56. Zaninia, Stefano. Characterisation of SiOxCyHz thin films deposited by low-temperature PECVD. Stefano Zaninia, Claudia Riccardia, Marco Orlandib, Elisa Grimoldia. Vacuum 82. 2008. 290–293

57. Friedrich. Mechanisms of Plasma Polymerization – Reviewed from a Chemical Point of View// Plasma Process. Polym. 2011, 8, 783–802

58. Roualdes, S. Plasma Membranes. S. Roualdes, V. Rouessac, J. Durand.Universite Montpellier, Montpellier, France

59. Широбоков М.А. Исследование процессов формирования и антикоррозионных свойств полимерных пленок, полученных в низкотемпературной плазме предельных углеводородов: Автореферат дисс. … канн. хим. наук. Ижевск. 2006. 24 с

60. Yasuda, H. Plasma Polymerization, Academic Press Inc.: Orlando, FL, 1985.

61. Andrew, J. Hinton Determination of coating adhesion using electrochemical impedance spectroscopy. Solartron Materials Test, p.4.

62. Bonora, P.L. Electrochemica Acta. P.L. Bonora, F. Deforlorian and L Fedrizzi. 41. 1073. 1996

63. Albery W.J., Elliott C.M., Mount A.R. A Transmission Line Model for Modified Electrodes and Thin Layer Cells. // J. Electroanal. Chem. 1990.V. 288. P. 15-34.

64. Marie-Georges Olivier and Mireille Poelman (2012). Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) for the Evaluation of Electrocoatings Performances, Recent Researches in Corrosion Evaluation and Protection, Prof. Reza Shoja Razavi (Ed.), ISBN: 978-953-307-920-2

65. Katsuya Teshima, Yasushi Inoue, Hiroyuki Sugimura, Osamu Takai. Growth and structure of silica films deposited on a polymeric material by plasma-enhanced chemical vapor deposition . Thin Solid Films 420 –421 (2002) 324–329

66. Zhe Liu, Yanchun Dong, Zhenhua Chu, Yong Yang, Yingzhen Li, Dianran Yan. Corrosion behavior of plasma sprayed ceramic and metallic coatings on carbon steel in simulated seawater. Materials and Design 52 (2013) 630–637

67. N. Sharma et al. Scratch resistance and tribological properties of DLC coatings under dry and lubrication conditions Tribology International 56 (2012) 129–140

68. Schwarz, Ch. Investigation on wear and adhesion of graded Si/SiC/DLC coatings deposited by plasma-enhanced-CVD. Ch. Schwarz, J. Heeg, M. Rosenberg, Marion Wienecke. Diamond & Related Materials 17 (2008) 1685–1688.

69. Casiraghi, C. Raman spectroscopy of hydrogenated amorphous carbons, PHYSICAL REVIEW B 72

70. C. Casiraghi, A.C. Ferrari, J. Robertson. 085401 – 2005.

71. Kim, Y.T. Dependence of the bonding structure of DLC thin films on the deposition conditions of PECVD method. Y.T. Kim, S.M. Cho, W.S. Choi, B. Hong, D.H. Yoon. Surface and Coatings Technology. 169 –170. 2003. 291–294.

72. 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. // Biomed Microdevices. 2010. Vol. 12. P. 705-19.

73. Soham Shukla Freeze drying process: a review / Soham Shukla // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2011.

74. Understanding Lyophilization Formulation Development / Frank Kofi Bedu-Addo, PhD et al. // Biopharmaceuticals. – 2004. – p. 10-18.

75. Suzanne B. Treml, Cristine J. Dall, Connie A. Draveling, James F. Jolly, Rama P. Ramanujam, патент «Biological reagent spheres» US 5763157, C07H021/00, 1995.

76. Design of Stable Lyophilized Protein Formulations: Theory and Practice / Carpenter JF, Chang BS et al. // Rational Pharm Biotechnol. – 2002. -№ 13. –p. 109-133.

77. G. Day, Glyn N.// Lyophilization of Proteins. - Humana Press. – 2007. –p. 59-64

78. Pikal MJ. Freeze-drying of Proteins/ Pikal MJ // Part I: Process Design. BioPharm. – 1990. -№ 3. -p. 18-27.

79. Jiang, S. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying / Jiang, S. and Nail, S. L// Eur. J. Pharm. Biopharm. – 1998. - № 45. – p. 245–257.

80. Dong A Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature-induced protein aggregation / Dong A, Prestrelski SJ et al. // Pharmacol.Sci. – 1995. -№ 84. –p. 415–424.

81. Prestrelski SJ Separation of freezing- and drying induced denaturation of lyophilized proteins by stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy / Prestrelski SJ, Arakawa T, Carpenter JF.// Arch. Biochem. Biophys. - 1999.– p. 465–473.

82. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation / Chang BS, Beauvais RM, Dong A, Carpenter JF. // Arch. Biochem. Biophys. - 1996. - (331). – p. 249–258.

83. Carpenter JF Lyophilization of protein pharmaceuticals. In Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation / Carpenter JF, Chang BS. // Intepharm Press. - 1996. – p. 199–263.

84. Pikal, M.J. Mechanisms of Protein Satbilization during Freeze-Drying and Storage: The Relative Importance of Thermodynamic Stabilization and Glassy State Relaxation Dynamics / Pikal, M.J. // Freeze-Drying. Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products (Drugs and the Pharmaceutical Sciences. 2004. - Volume 137. –p. 93-108.

85. Lai, M.C. Solid-state chemical stability of proteins and peptides / Lai, M.C. and Topp, E.M // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1999. - 88 (5). – p. 489-500.

86. Carpenter, J.F. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins / Carpenter, J.F. and Crowe, J.H. // Biochemistry. – 1989. - 28 (9). – p. 3916-3922.

87. Crowe, J.H. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. Part 1/ Crowe, J.H., Crowe, L.M., and Carpenter, J.F. // BioPharm (Eugene, Oreg.). – 1993. - 6 (3). – p. 28 - 32.

88. Prestrelski, S.J. Structure of proteins in lyophilized formulations using Fourier transform infrared spectroscopy / Prestrelski, S.J., Arakawa, T., and Carpenter, J.F. // ACS Symposium Series. – 1994. – p. 148-169.

89. Gupta MN Enzymes in organic media. Forms, functions and applications / Gupta MN and Roy I. // Eur J Biochem. - 2004. – 271. – p. 2575-2583.

90. Franks, F. Materials science and the production of shelf-stable biologicals / Franks, F., Hatley, R.H.M., and Mathias, S.F. // BioPharm (Eugene, Oreg.). - 1991. - 4 (9). – p. 38, 40-42, 55.

91. Slade, L. Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. Critical reviews in food science and nutrition / Slade, L. and Levine, H. Beyond // 1991. - 30 (2-3). – p. 315-360.

92. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: Implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state / Chang, L., Shepherd et al. // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2005. - 94 (7). – p. 1445-1455.

93. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy

matrix / Chang, L., Shepherd, D. et al // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2005. - 94 (7). – p. 1427-1444.

94. Shamblin, S.L. Coupling between chemical reactivity and structural relaxation in pharmaceutical glasses / Shamblin, S.L., Hancock, B.C., and Pikal, M.J. // Pharmaceutical Research. – 2006. - 23 (10). – p. 2254-2268.

95. Yoshioka, S. Quantitative assessment of the significance of molecular mobility as a determinant for the stability of lyophilized insulin formulations / Yoshioka, S. and Aso, Y. // Pharmaceutical Research. - 2005. - 22 (8). –p. 1358-1364.

96. Yoshioka, S. Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals / Yoshioka, S. And Aso, Y.// Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2007. - 96 (5). – p. 960-981.

97. Rudolph AS Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline / Rudolph AS and Crowe JH // Cryobiology. – 1985. – 22. - p. 367–377.

98. Nancy L. Shen Stabilized compositions of reverse transcriptase and RNA polymerase for nucleic acid amplification inventors / Nancy L. Shen; Daniel L. Kacian; James G. Putnam; William M. Davis// Patent Number: 5,556,771 Sep. 17, 1996.

99. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA / Carninci, P., Nishiyama, Y. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – 95. –p. 520–524.

100. Sola-Penna M. Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme / Sola-Penna M., Ferreira-Pereira A., Lemos A. P. and Meyer-Fernandes J. R. // Eur. J. Biochem. -1997. – 248. – p. 24-29.

101. Lee, J. C. The stabilization of proteins by sucrose / Lee, J. C. and Timasheff, S. N.// J. Biol. Chem. -1981. – 256. – p. 7193-7201.

102. Xie, G. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose / Xie, G., and Timasheff, S. // Biophys. Chem. – 1997. - Prog. 16. – p. 630-636.

103. Carpenter JF. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations / Carpenter JF, Crowe LM, Crowe JH. // Biochim. Biophys. Acta - 1987. – 923. – p. 109–115.

104. New insights on trehalose: A multifunctional molecule / Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D // Glycobiology. - Volume 13. - Issue 4. – 2003. – p. 17-27.

105. Leslie SB Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying / Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH and Crowe LM. // Appl. Environ. Microb. - 1995. – 61. – p. 3592–3597.

106. Morgan CA Preservation of micro-organisms by drying: A review / Morgan CA, Herman N, White PA and Vesey G. // J. Microbiol. Meth. -2006. – 66. - p. 183 –193.

107. Nishant Kumar Jain Effect of trehalose on protein structure / Nishant Kumar Jain, Ipsita Roy // Protein Sci. – 2009. - 18(1). – p. 24–36.

108. Naoto Shimoda On walls of container / Naoto Shimoda, Tsutomu Kawaguchi // US Patent Number: 4879272 A. - 1989.

109. Mary Johnson Ph. D.Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States. Перевод с английского – Константин Якимчук Ph. D. Детергенты: Тритон X-100 Твин-20 и другие. Материалы и методы 2013. № 3. С. 163.

110. Linke D. Detergents: an overview. Methods Enzymol. 2009. С. 463-603.

111. Tadmor A. Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR / Tadmor A, Ottesen E, Leadbetter J, Phillips R. // Science. - 2011. -333 – p. 58-62.

112. Demeke, T. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR / T. Demeke, R.P. Adams // Biotechniques. – 1992. – 12 – P. 332-334.

113. Маркьянов И.А. Разработка и исследование микрочиповой аналитической системы с иммобилизированными в микрореакторах тест-системами для полимеразной цепной реакции. Дипломная работа. Химический факультет СПбГУ. 2009. 74 с.

114. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. — 589 с.

115. Пат. 2259401 Россия, МПК7 С 12 Р 19/34, С 12 Q 1/68. Сухая смесь реагентов для поли, меразной цепной реакции и способ проведения ПЦР, анализа / Шайхаев Г. О. – № 2004112594/13; заявл. 27.04.2004; опубл. 27.08.2005.

116. Unger, M. Патент «Microfluidic device and methods of using same». M. Unger, I. D. Manger, M. Lucero, Y. Yi, E. Miyashita-Lin, A. Weinecke, G. Facer. US 7, 118, 910 B2 от 10.10.2006.

117. Tom Morrison, James Hurley, Javier Garcia, Karl Yoder, Arrin Katz, Douglas Roberts, Jamie Cho, Tanya Kanigan, Sergey E. Ilyin, Daniel Horowitz, James M. Dixon and Colin J.H. Brenan. Nanoliter high throughput quantitative PCR. Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 00, No. 00 e1–9.

118. Tian, H. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format / H. Tian, A.F.R. Huhmer, J.P. Landers // Anal Biochem. – 2000. – 283 – P. 175-191.

119. Microchip-based purification of DNA from biological samples / Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G. et al. // Anal Chem. – 2003 – 75. – P.1880-1886.

120. Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA / Endres H.N., Johnson J.A., Ross C.A. et al. // Biotechnol Appl Biochem. – 2003 – 37. – P.259-266.

121. Demeke, T. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR / Demeke, T., Adams, R.P. // BioTechniques. - Volume 12. - Issue 3. – 1992. – p. 332-334.

122. Watson, R.J. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction / R.J. Watson, B. Blackwell // Can J Microbiol. – 2000. – 46 – P. 633-642.

123. Demeke, T. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits / T. Demeke, G.R. Jenkins // Anal Bioanal Chem. – 2010. – 396 – P. 1977-1990.

124. Weyant, R.S. Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase / R.S. Weyant, P. Edmonds, B. Swaminathan // Biotechniques. – 1990. – 9 – P. 308-309.

125. Katcher, H.L. A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol / H.L. Katcher, I. Schwartz // Biotechniques. – 1994. – 16 – P. 84-92.

126. Burkardt, H.J. Standardization and quality control of PCR analyses / H.J. Burkardt // Clin Chem Lab Med. 2000. 38. P. 84-91.

127. PCR inhibitors in plant DNA preparations / R. Peist, D. Honsel, G. Twieling, D. Lo ¨ffert // QIAGEN News. – 2001. – 3 – P. 7-9.

128. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal / C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne // Journal of Applied Microbiology. – 2012. – 113 – P. 1014-1026.

129. Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent / M.J. Davies, J.I. Taylor, N. Sachsinger, I.J. Bruce // Anal Biochem. – 1998. – 262 – P. 92-94.

130. DNA purification and isolation using a solid-phase / T.L. Hawkins, T. O'Connor-Morin, A. Roy, C. Santillan // Nucleic Acids Res. – 1994. – 22 – P. 4543-4544..

131. Yoza, B. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound / B. Yoza, M. Matsumoto, T.Matsunaga // J Biotechnol. – 2002. – 94 – P. 217-224.

132. Yoza, B. DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer / B. Yoza, A. Arakaki, T.Matsunaga // J Biotechnol. – 2003. – 101 – P. 219-228.

133. Bruce I.J. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy-silanes and their application in magnetic bioseparations / I.J. Bruce, T. Sen // Langmuir. – 2005. – 21 – P. 7029-7035.

134. Bionanotechnology based on silica nanoparticles / Tan W, Wang K, He X et al. // Med Res Rev. – 2004 – 24. – P. 621-638.

135. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells / Chiang C-L, Sung C-S, Wu T-F et al. // J Chromatogr. – 2005 – B 822. – P. 54-60.

136. Amino-containing magnetic nanoemulsions: elaboration and nucleic acid extraction / R. Veyret, T. Delair, C. Pichot, A. Elaissari // J Magn Magn Mater. – 2005. – 295. – P. 155-163.

137. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications / A. Spanova, D. Horak, E. Soudkova, B.Rittich // J Chromatogr. – 2004. – B 800. – P. 27-32.

138. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification / Rutjes S.A., Italiaander R., van den Berg H.H. et al. // Appl Environ Microbiol. – 2005 – 71. – P.3734-3740.

139. Ngazoa, E.S. Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR / E.S. Ngazoa, I. Fliss, J. Jean // J Appl Microbiol. – 2008. – 104 – P. 707-715.

140. Immiscible phase nucleic acid purification eliminates PCR inhibitors with a single pass of paramagnetic particles through a hydrophobic liquid / K. Sur, S.M. McFal, E.T. Yeh et al. // J Mol Diagn. – 2010 – 12. – P. 620-628.

141. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова. – Москва: Изд-во КолосС, 2007. – 424 с.

142. Csatary, LK; Csatary, E; Moss, RW (Mar 15, 2000). "Re: Scientific interest in Newcastle disease virus is reviving". Journal of the National Cancer Institute 92 (6): 493–4.

143. Macpherson, LW (May 1956). "Some Observations On The Epizootiology Of NewCastle Disease". Canadian journal of comparative medicine and veterinary science 20 (5): 155–68.

144. Nelson, C. B. An Outbreak of Conjunctivitis Due to Newcastle Disease Virus (NDV) Occurring in Poultry Workers. C. B. Nelson, B. S. Pomeroy, Katherine Schrall, W. E. Park, R. J. Lindeman. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.

145. Госманов, Р.Г Ветеринарная вирусология / Р.Г. Госманов, Н.М. КОлычев. – М., 2006. – 304 с.

146. Cavanagh, D (Mar 2007). "Coronavirus avian infectious bronchitis virus". Vet Res. 38(2): 281–97.

147. Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D., Britton, P. (2001). "Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus.". Journal of Virology 75 (24): 12359–12369.

148. Воробьёв, А.А Микробиология и иммунобиология / А.А. Воробьёв. – Москва: Изд-во Медицина, 1999. – 446 с.

149. Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. Material Science and Engineering R 37 (2002) p.129-281.

150. Friedrich. Mechanisms of Plasma Polymerization – Reviewed from a Chemical Point of View// Plasma Process. Polym. 2011, 8, 783–802.

151. Davide Barreca, Alberto Gasparotto, Chiara Maccato, Cinzia Maragno, Eugenio Tondello, and Gilberto Rossetto. Low-Temperature PECVD of Transparent SiOxCyHz Thin Films. Chem. Vap. Deposition 2007, 13, 205–210.

152. Nakao S. et al.: Microstructure of diamond-like carbon films. Phys. stat. sol. (c) 5, No. 4 (2008).

153. Миронов Ю. М. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния для исследований полимерных композиционных материалов // МГТУ им. М. Э. Баумана. Наука и образование № 07. 2012. С. 36-38.

154. Schrader, C. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne. Journal of Applied Microbiology 113, 1014-1026.

155. Lee et al. Reaction system for perfoming in the amplification of nucleic acids. US Patent № 7,264,950 BI (2007).

156. Suvorova O; Slyadnev M; Perchik A; Navolotskii D; Mushnikov N. //Rapid determination of sexually transmitted infections by real-time polymerase chain reaction using microchip analyzer// Engineering – 2012. – V. 4, pp 1-3

157. Rey L., May J.C. «Freese-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products» 2004.

158. Министерство здравоохранения Российской Федерации, Общая фармакопейная статья «Сроки годности лекарственных средств» 42-0075-07. Государственная фармакопея Российской Федерации, XII издание, Часть 1, 2007.