

Микрочип биохимический на кремниевой подложке для анализа биологических сред на наличие широкого спектра веществ

Представлена разработка микрочипов биохимических на кремниевой подложке для использования в аппаратуре для анализа биологических сред на наличие широкого спектра веществ. Использование микрочипов биохимических обеспечивает высокие скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси в ходе проведения полимеразной цепной реакции, повышению чувствительности и снижения количества расходуемых реагентов.

Микрочипы биохимические (МБ) используются как инструмент в аппаратуре медицинской и биомедицинской технике для проведения анализа ДНК, бактериальных и вирусных инфекций человека, и животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, а также в приборах для анализа атмосферного воздуха, пищевых продуктов, питьевой и сточных вод, и санитарно-эпидемиологического контроля. В настоящее время метод ПЦР-диагностики является современным высокоэффективным способом выявления многочисленных инфекционных заболеваний (туберкулез, ВИЧ, вирусный гепатит, ИППП и т.д.) а так же молекулярно-генетическим методом количественного определения и идентификации нуклеиновых кислот [1].

Данный метод реализуется в микрочиповом амплификаторе нуклеиновых кислот, что позволяет использовать создаваемый прибор и микрочипы с тест-системами для экспрессного анализа [2]. В микрочиповом амплификаторе использован принцип амплификации ДНК/РНК напрямую в микрочипе, что позволяет увеличить быстродействие анализа за счет ускорения динамики нагрева и охлаждения, а также увеличить эффективность ПЦР (более надежное детектирование при исходном малом содержании целевой ДНК/РНК в пробе) и снизить количество расходуемых реагентов [3].

Основным структурным элементом подобной микроаналитической системы является биохимический микрочип – миниатюрное устройство планарной геометрии, в котором создана разветвлённая сеть микроканалов и микрореакторов, выполненное с применением технологий МЭМС из различных материалов: стекло, кварц, кремний, полимеры, а также металлы и их сплавы. Площадь такого биохимического микрочипа составляет несколько квадратных сантиметров, а линейные размеры микроструктур по двум измерениям находятся в диапазоне от сотен нанометров до сотен микрон.

Наиболее часто используемым материалом микрочиповых ПЦР-систем является кремний [4]: благодаря большому опыту производства и отлаженным технологиям его обработки микроэлектронной промышленностью. Использование кремния также обуславливается хорошей теплопроводностью этого материала, за счет чего достигаются высокие скорости нагрева и охлаждения реакционной смеси в ходе проведения ПЦР. Низкие уровни фоновой флуоресценции от кремния также способствуют его использованию в системах ПЦР, в которых регистрация флуоресценции из

микрореакторов как правило проводится через покровную пластину из стекла или слой минерального масла.

В случаях, когда гидрофобность покрытия не позволяет обеспечить достаточный термический контакт раствора с поверхностью микрореактора, на поверхности создается гидрофильный слой SiO_2 , что приводит к смачиванию раствором поверхности микрореактора.

С учётом этих факторов предлагаемый микрочип представляют собой кремниевый кристалл габаритных размеров 28,0x25,0x0,48 мм (см. рисунок 1) с различными типами структур микрореакторов (см. таблицу 1), покрытый защитным гидрофильным окислом.

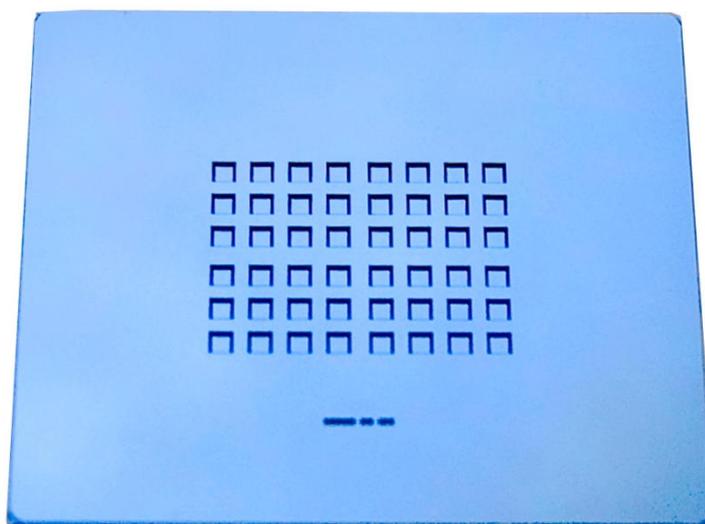


Рисунок 1

Таблица 1

Количество реакторов	Линейный размер реактора, мм	Глубина реактора, мм	Объем, мл
16	2,0x2,0	0,4	1,6
30	1,8x1,8	0,3	1,0
48	1,6x1,6	0,3	0,8
96	1,3x1,3	0,3	0,5

Особенность изготовления МБ в отличие от производства интегральной схемы заключается в том, что на пластине диаметром 100 мм размещается только семь микрочипов. Поэтому существует проблема получения качественного микрочипа и требуется усиленный контроль над большой площадью поверхности.

Таким образом, на поверхности микрочипа биохимического в рабочей зоне не допускается наличие трещин, царапин более 15 мм (суммарная длина), шириной более 0,02 мм; вздутий, следов грязи, жира; точек диаметром более 0,07 мм, точек количеством более 3; групповых скоплений мелких точек, с общим размером дефекта более 0,2 мм и количеством более 5, округлых рельефных неровностей более 0,1 мм и количеством более

3. В пределах же любой из ячеек микрочипа биохимического не допускается наличие любого из вышеназванных дефектов. На обратной стороне микрочипа биохимического допускаются: царапины шириной не более 0,1 мм (суммарная длина не более 30 мм); точечные дефекты диаметром не более 0,1 мм; в количестве – не более 5. Вся поверхность микрочипа биохимического должна быть покрыта окисной пленкой SiO₂ голубого цвета (толщина оксидной пленки 0,12-0,15 мкм). Для микрочипа острые кромки менее 0,2 мм, сколы более 0,3 мм – недопустимы.

Качество поверхности микрореакторов главным образом определяется процессом глубокого анизотропного травления кремния и обеспечивается точностью поддержания температуры и концентрации щёлочи в исходном растворе для травления. Эти параметры были выбраны с учётом приемлемой скорости травления кремния, которая, в свою очередь, зависит от травителя и травимой поверхности, а так же соотношения их объёмов.

На рисунке 2 приведены данные по скорости травления микрореактров, полученные для одного и того же объёма травителя, при определённой температуре, концентрации травящего раствора, площади микрореакторов, ориентации пластин, но разной их марки.

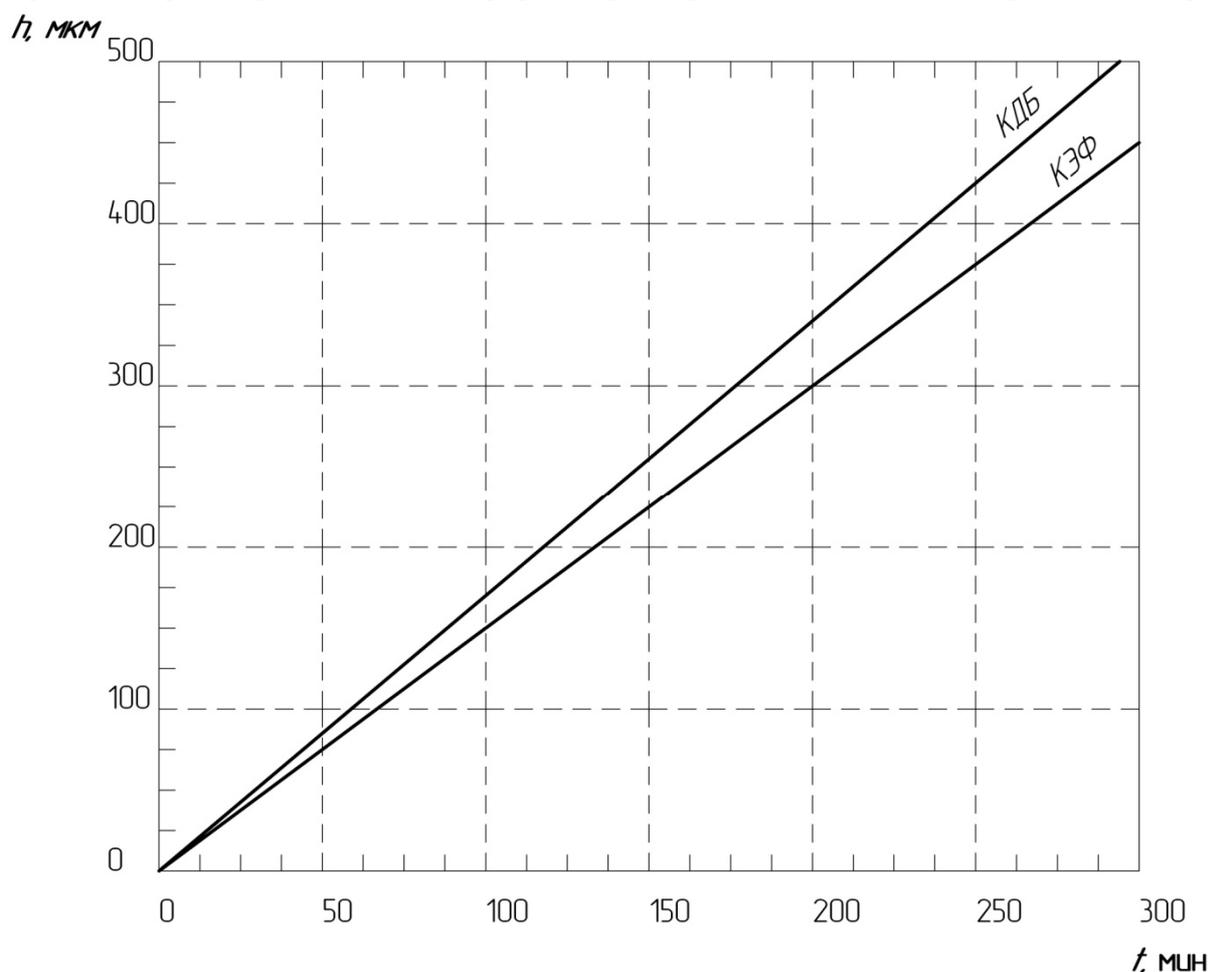


Рисунок 2

Организация процесса ПЦР-намножения ДНК непосредственно в предлагаемом микрочипе биохимическом используется в микрочиповом амплификаторе «AriaDNA». Благодаря данной микрочиповой технологии происходит существенное уменьшение

объема анализируемой пробы и диагностических препаратов, сокращается время проведения единичного анализа, тем самым, увеличивая производительность системы [5]. Кроме того, высокая степень интеграции стадий ПЦР-анализа (дозирование пробы, добавление и смешивание реагентов), а в дальнейшем и более трудоемких операций пробоподготовки (выделение и очистка ДНК из пробы), приводит к снижению объёма ручных операций и повышению воспроизводимости результатов анализа. Высокие скорости проведения процессов термоциклирования, осуществляемых непосредственно в микрочипе, способствуют повышению чувствительности и специфичности диагностических реакций за счёт снижения вероятности возникновения побочных продуктов реакции во время перехода между температурными уровнями [6]. При этом обеспечиваются условия, препятствующие прямому контакту продуктов ПЦР-реакции (фрагменты ДНК возбудителей опасных инфекционных заболеваний) с оператором и минимизируется риск загрязнения окружающей среды.

Высокие эксплуатационные характеристики разработанного анализатора в сочетании с существенно низкой ценой позволяет рассматривать его как серьезную альтернативу аналитическим системам, производимым зарубежными компаниями.

Библиографический список

1. Ребриков Д.В., ред. ПЦР в "реальном времени". М.: Бином, 2009, 223 р.
2. Мак-Махон Д. Аналитические приборы. Руководство по лабораторным, портативным и миниатюрным приборам. М.: Профессия, 2009, 366 р.
3. Евстапов А.А., Рудницкая Г.Е., Петухова Н.А. Научное приборостроение, 2005, v. 15, № 2, р. 27-40.
4. Сляднев М.Н., Казаков В.А., Лаврова М.В., Ганеев А.А., Москвин Л.Н. Научное приборостроение, 2005, v. 15, № 2, р. 41.
5. Беленький Б.Г., Комяк Н.И., Курочкин В.Е., Евстапов А.А., Суханов В.Л. Научное приборостроение, 2000, v. 10, № 2, р. 57-64.
6. Зимина Т.М. Нано- и микросистемная техника, 2007, № 8, р. 27-49.