

T 3726
2010-2

НАНО

ТЕХНОЛОГИИ ЭКОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВО

№2 (4) МАЙ'10



Человек номера:
Жорес Алферов

Безопасность и контроль
в наноиндустрии

Инновации
от Зеленограда
до Новосибирска

Нано...
Нано материалы Метрология
Нано...
Нано...
Наномат...
Б...
Ст...
И...

Микрофлюидные системы в биологии и конструирование геносенсоров



●●● Рубцов Н.Б., Попик В.М., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А.

В настоящее время в мировой науке происходит технологическая революция, направленная на создание сверхмалых устройств, применимых для изучения функции биологических макромолекул, геномов, клеток, клеточных структур, клинической диагностики и биохимических исследований. В основе этого направления лежит использование микрофлюидных систем [1].

ИЦиГ СО РАН:

Пельтек С.Е.,

зам. директора института,
к.б.н.

Горячкова Т.Н.,

научный сотрудник

Рубцов Н.Б.,

зам. директора института,
д.б.н.

Хлебодарова Т.М.,

ведущий научный сотрудник,
д.б.н.

Колчанов Н.А.,

директор института,
академик

ИЯФ им. Г.И. Будкера СО РАН:

Попик В.М.,

старший научный сотрудник,
к.ф.-м.н.

Пиндюрин В.Ф.,

старший
научный сотрудник

Гольденберг Б.Г.,

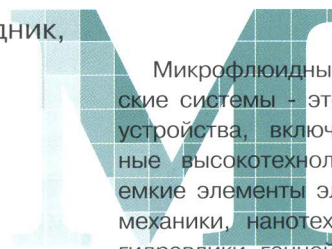
научный сотрудник

Щеглов М.А.,

ведущий научный сотрудник,
к.ф.-м.н.

Кулипанов Г.Н.,

зам. директора института,
академик



Микрофлюидные биоаналитические системы - это интегрированные устройства, включающие современные высокотехнологичные и наукоемкие элементы электроники, микромеханики, нанотехнологий, оптики и гидравлики, генной и клеточной инженерии, биоинформатики. Базовым элементом системы является стеклянная или полимерная пластина - одноразовый сменный модуль с многоуровневой системой каналов, микрореакторов, клапанов и насосов, оперирующая с фемто- и пиколитрами жидкостей. Микрофлюидные биоаналитические системы позволяют реализовать важнейшие транспортные методы современной аналитической химии, дают возможность использовать преимущества ламинарных потоков, оптимизировать соотношение объема к поверхности в микрореакторах и др.

Радикальная миниатюризация размеров экспериментальных устройств,

на правах рекламы

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант №09-02-12100, Президиума СО РАН, проект №39, Президиума РАН, проект №3.6.8.

достигаемая с использованием микро-, нанофлюидных технологий, открывает переход к качественно новым, исключительно низким по стоимости высокопроизводительным методам решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и биомедицины. Работа микрофлюидных систем с фемто- и пиколитрами жидкостей позволяет на порядок снизить количество анализируемых биологических объектов: макромолекул, клеток, биологически активных веществ. Соответственно этому радикально снижаются расходы дорогостоящих реактивов и стоимость экспериментов или анализов.

Для производства сменных микрофлюидных модулей используются методы LIGA-технологии, лазерной абляции, литографии, обработки алмазными порошками, штамповки, литья и др.

Высокочувствительные системы детекции, применяемые в микрофлюидных биоаналитических системах, дают возможность обнаруживать искомые компоненты на уровне следовых количеств, вплоть до единичных молекул.

Для реализации этого направления науки и технологии в Сибирском отделении РАН была создана рабочая группа специалистов ИЦиГ СО РАН и ИЯФ СО РАН. Этой группой был осуществлен полный цикл от проектирования и изготовления до реальной работы микрофлюидной биоаналитической системы.

Изготовление микрофлюидного модуля методом LIGA-технологии

На накопителе ВЭПП-3 в ИЯФ СО РАН действует станция «LIGA», позволяющая выполнять глубокую рентгеновскую литографию в диапазоне 6 – 40 кэВ. На ее основе разработаны технологические этапы изготовления сменных микрофлюидных модулей по LIGA-методу, включающие описанные ниже этапы [2].

Изготовление рентгеношаблона (РШ)

На шлифованные пластины из стеклоуглерода размером 40x40x0,5 мм наносится негативный фоторезист SU-8. Игольчатый пучок рентгеновского синхротронного излучения (СИ) создает, согласно заданной топологии, скрытое изображение требуемой

микроструктуры непосредственно в слое резиста толщиной 30-35 мкм. В результате химического травления резиста получается маска с рисунком микрофлюидного модуля, которая используется для электрогальванического осаждения золота. После осаждения слоя золота толщиной 8-10 мкм получается рентгеношаблон (РШ) с нужной топологией и шириной рабочих каналов около 40 микрон.

Тиражирование микрофлюидных модулей

Для изготовления сменных микрофлюидных модулей использовались пластины оргстекла. Через созданный РШ на станции «LIGA» пластины оргстекла облучали широким пучком СИ. Облученные участки оргстекла травили в ультразвуковой ванне в специальном растворе. В результате на поверхности пластины оргстекла формируются микроканалы заданной топологии, глубина и качество которых определяется дозой облучения и временем травления. Процесс получения микрофлюидных модулей методом LIGA-технологии изображен на рис. 1.

Изготовление сенсорного элемента микрофлюидной биоаналитической системы методами геной инженерии

В качестве сенсорного элемента в микрофлюидной биоаналитической системе были использованы клетки *E.coli*, несущие искусственную генетическую конструкцию [3]. В ответ на внешнее воздействие генетическая конструкция в клетках *E.coli* обеспечивает изменение цвета клеток при освещении ультрафиолетовым излучением. Принцип работы геносенсора приведен на рис. 2.

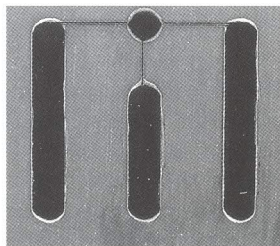
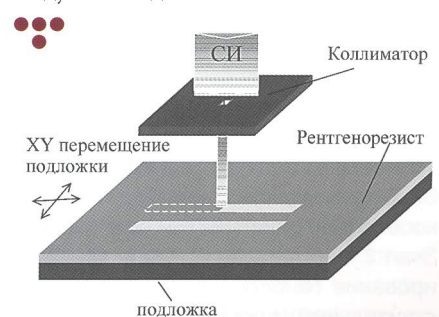
В ИЦиГ СО РАН имеются обширные биоинформационные ресурсы,

включающие различные базы данных и средства их анализа (рис. 3) [4].

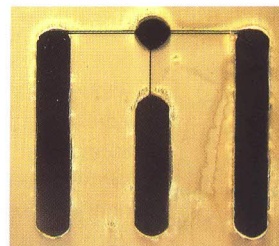
На основе анализа геной сети стресс-ответа клетки был проведен компьютерный дизайн геносенсоров с заданными свойствами. Для поиска генов-кандидатов использовали базу данных GenSensor, содержащую информацию о структуре бактериальных промоторов, экспрессия которых активируется в ответ на определенное внешнее воздействие. Для получения нужной генетической конструкции стрессочувствительный промотор присоединили генно-инженерными методами к репортерному гену и встроили в плазмиду. Таким образом, была сконструирована плазида pDps-gfp, содержащая под контролем промотора dps ген gfp, кодирующий флуоресцентный белок GFP (green fluorescent protein). Полученная рекомбинантная плазида была помещена в бактериальную клетку. При внешнем воздействии, к которому чувствителен промотор, в клетке начинается экспрессия репортерного гена и продукция флуоресцентного белка. Принципиальная схема устройства геносенсора приведена на рис. 4.

Регуляторная область гена dps *E.coli* чувствительна к разнообразным факторам, повреждающим компоненты клетки, таким как перекись водорода, фенол, митамин. Уже при concentra-

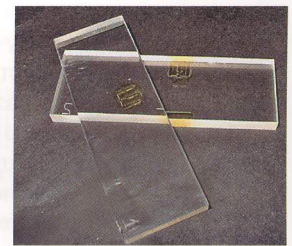
Рис. 1. Создание одноразового сменного микрофлюидного модуля методом LIGA-технологии.



Шлифованный стеклоуглерод с рисунком микрофлюидного модуля, полученным из резиста SU-8 по LIGA-методу.



Рентгеношаблон после гальванического нанесения золота. Толщина золота ~ 8-10 мкм. Ширина рабочих каналов ~ 38 мкм.



Одноразовый сменный микрофлюидный модуль. Топология рисунка соответствует шаблону.

Рис. 2. После внешнего воздействия геносенсорная конструкция в клетке начинает синтез флуоресцентного белка. Его накопление в клетке приводит к тому, что клетка приобретает зеленую окраску и легко регистрируется с помощью обычного флуоресцентного микроскопа.

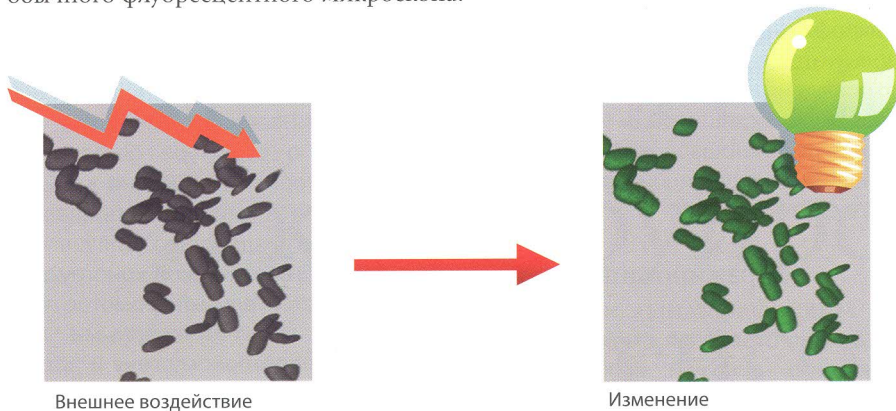
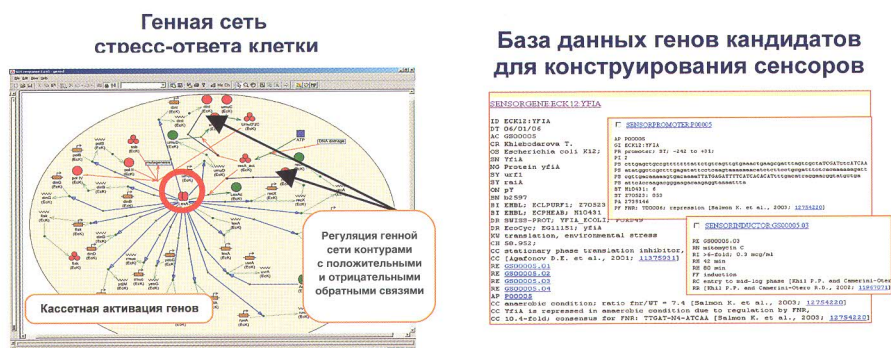


Рис. 3. Биоинформационные ресурсы ИЦИГ СО РАН для поиска генов сенсоров.



ции 1 mM перекиси водорода наблюдается синтез GFP, что свидетельствует о высокой чувствительности сенсора к окислительному стрессу.

Экспериментально-компьютерное конструирование искусственных молекулярно-генетических систем – геносенсоров для выявления повреждающих клетку агентов. Этап 1 - анализ генной сети стресс-ответа клетки и поиск генов - кандидатов в базе данных GenSensor, компьютерный дизайн геносенсоров с заданными свойствами. Этап 2 - экспериментальное конструирование геносенсоров. Стрессочувствительный промотор присоединяется генно-инженерными методами к репортерному гену. Полученная генетическая конструкция встраивается в плазмиду. Гибридная плаزمид помещается в бактериальную клетку. При поступлении сигнала, к которому чувствителен промотор, в клетке начинается экспрессия репортерного гена и продукция флуоресцентного белка. Этап 3 - экспериментальная проверка работы геносенсора. На рис. 5 представлены результаты тестирования геносенсора drps с использованием различных повреждающих клетку

веществ.

Изучение чувствительности геносенсоров к повреждающим агентам внешней среды в микрофлюидной системе

Разработанный геносенсор использовали в качестве биологического детектора агентов окислительного стресса в микрофлюидной системе, изготовленной из оргстекла методом «LIGA»-технологии. Бактериальная клетка-геносенсор, несущая рекомбинантную плазмиду, была закреплена в микрофлюидной системе, куда осуществлялась подача повреждающих веществ. Оргстекло представляет собой твердый, прозрачный материал, удобный для изготовления микрофлюидных систем и наблюдения за происходящими в микрофлюидной биоаналитической системе биохимическими процессами с помощью флуоресцентного микроскопа. Оргстекло не флуоресцирует при облучении аргоновым лазером, применяемым при возбуждении репортерного белка GFP. Поверхность оргстекла гидрофобна и обладает низкой адгезией для клеток

E.coli. Для закрепления на ней клеток требуется дополнительная обработка поверхности микрофлюидного канала. Поверхность микрофлюидного канала обрабатывали методом открытой кислородной плазмы при давлении 0,1 атм. При этом на поверхности микрофлюидного канала появляются закрепленные отрицательные заряды. Модифицированную таким образом поверхность микрофлюидного канала покрывали полилизин, который закреплялся в канале за счет электростатических взаимодействий. Для позиционирования живых клеток геносенсора через центральный канал микрофлюидной системы пропускали культуру этих клеток в специальной среде, не имеющей автофлуоресценции, клетки приклеивались к поверхности за счет взаимодействия с молекулами полилизина. Не связавшиеся с поверхностью канала клетки отмывали той же средой.

После того как в микрофлюидной системе были закреплены клетки геносенсора, в канал подавали минимальную среду с перекисью водорода в концентрации 1 mM в качестве агента окислительного стресса. Микрофлюидный модуль с клетками геносенсора, позиционированными в канале, микроскопировали через 40 мин. после начала индукции.

Для регистрации сигнала геносенсора в ответ на введение агента окислительного стресса был использован лазерный сканирующий микроскоп LSM500META производства фирмы ZEISS. Для возбуждения молекул GFP использовалась лазерная линия 480 нм аргонового лазера. Использованный метод позволил зарегистрировать отдельные клетки, продуцирующие флуоресцентный белок. На рис. 6 приведены микрофотографии клетко-геносенсоров в канале микрофлюидной системы. Видна зеленая окраска клеток, развившаяся в ответ на подачу в систему перекиси водорода.

Дальнейшее развитие микрофлюидных технологий: новое поколение иммунодиффузионных методов

В результате проделанной работы была проверена функциональная пригодность микрофлюидной биоаналитической системы для тестирования окислительного стресса.

В наших ближайших планах - развитие микрофлюидной техники для нового поколения иммунодиффузион-

ных методов, для концентрирования наночастиц; создание капельных микрореакторов, разработка иммунобиосенсоров. Капельные микрореакторы сегодня являются перспективным направлением решения задач комбинаторной молекулярной биологии, например - поиска оптимальных условий кристаллизации белков. Иммунобиосенсоры представляют собой высокочувствительные системы для определения следовых количеств клинически значимых маркеров иммунитета человека.

Новое поколение иммунодиффузионных методов, основанных на микрофлюидных технологиях и использовании меченных флуорохромами антител, позволит сохранить все достоинства и в то же время избежать недостатков традиционных методов иммунодиффузии в геле агаре. Методы клинической диагностики, основанные на реакции антиген/антитело с последующим усилением сигнала, получили широкое распространение в силу высокой чувствительности. Только в США ежегодно проводится свыше 700 млн. анализов с использованием различных тест-систем, основанных на принципах иммуноанализа. Объем рынка тест-систем, основанных на иммуноферментном анализе, в мире оценивается в несколько десятков миллиардов долларов в год. К недостаткам современных тест-систем следует отнести их трудоемкость, относительно длительное время проведения анализа и его высокую стоимость, связанную с большим расходом дорогостоящих реагентов. В течение последних лет наблюдается стремительное увеличение числа фундаментальных и прикладных исследований, в которых делаются попытки к интеграции методов иммуноанализа и микрофлюидной техники. Такого рода интегральные системы, обладающие высокой производительностью, коротким временем анализа, большой чувствительностью, малым расходом реактивов и возможностью проведения мультиплексного анализа, чрезвычайно необходимы для клинической диагностики, анализа загрязнения окружающей среды и обеспечения биологической безопасности.

В качестве среды для иммунодиффузии традиционно используют гель агары или агарозы. Существуют как качественные, так и количественные схемы постановки реакции, все они сводятся к визуальной оценке раз-

Рис. 4. Схема создания клеток-геносенсоров. Методами генной инженерии чувствительный к стрессу промотор присоединяется к гену, кодирующему флуоресцентный белок. Полученный синтетический ген встраивается в плазмиду. Гибридная плазмида помещается в клетку *E.coli*.

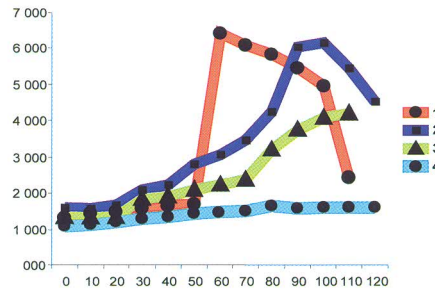


Рис. 5. Экспериментальная проверка работы геносенсора. По горизонтали – минуты, по вертикали – флуоресценция в относительных единицах. Продукция флуоресцентного белка в клетках-геносенсорах: 1мМ перекисью водорода (1), фенолом (2), митомицином С (3), без индукции (4).

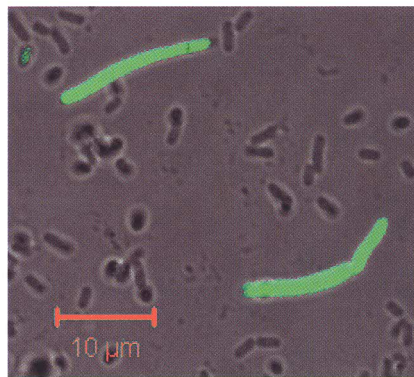


Рис. 6. Клетки геносенсора в канале микрофлюидного модуля, видна продукция GFP в ответ на введение индуктора.

мера, формы и положения осадка. В подавляющем большинстве разрабатываемых за рубежом микрофлюидных иммунохимических детекторах использованы твердофазные схемы иммуноанализа. Особенности твердофазных схем делают непостоянным создание надежно работающих микрофлюидных модулей. Наиболее эффективными в микрофлюидном исполнении могут стать методы иммуноанализа, основанные на свободной диффузии. Диффундирую-

щие во встречном направлении антитела и антигены формируют в зоне эквивалентных концентраций водонерастворимый осадок. Использование микрокапилляра позволит обеспечить высокую скорость диффузии и избежать перемешивания раствора за счет конвекционных потоков. Характер и скорость распределения флуоресцентной метки по капилляру позволит однозначно определить специфичность взаимодействия и наличие в анализируемой жидкости антигена. Основным достоинством методов иммунодиффузии является простота постановки реакции. Эти методы дают возможность надежно отделять специфические и неспецифические сигналы, а также анализировать сложные смеси антигенов.



- Whitesides G.M. The origins and the future of microfluidics NATURE, July 2006, Vol 442, 27, p. 368-373
- Петрова Е.В., Гольденберг Б.Г., Кондратьев В.И. и др. Поверхность. Рентген, синхротрон. и нейтрон. исслед. 2002, №9, с.30.
- Хлебодарова Т.М., Степаненко И.Л., Подколотный Н.Л. (2006) База данных: Гены-сенсоры (GenSensor) // Авторское свидетельство РФ №2006620197
- Khlebodarova T.M., Kachko A.V., Stepanenko I.L., Tikunova N.V. (2006) Database GenSensor as informational source for design of biosensors. Experimental development of biosensor based on yfiA gene. // Proceedings of the fifth international conference on bioinformatics of genome regulation and structure (BGRS), v. 2, pp.93-96.