



ВАРИАЦИИ ПРИБОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Вахитов В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

Описаны различные способы смены температур в реакционных блоках/камерах ДНК-термоциклеров при проведении обычной (не микрожидкостной) ПЦР и их эволюционное развитие. Кратко рассмотрены изотермические варианты ПЦР и обсуждены их перспективы.

Ключевые слова: ПЦР, ДНК-термоциклер, ДНК-амплификатор, элементы Пельтье

В середине 80-х годов был разработан способ амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ставший фактически методом номер один (по крайней мере, по масштабу применения) в биологической науке, и уже довольно давно перешагнувший ее границы. Для осуществления ПЦР необходимым условием является повторяющееся много раз построение комплементарной цепи ДНК ДНК-полимеразой по одноцепочечной матрице, стартовой точкой для чего служит 3'-конец двухцепочечного участка, образующегося за счет специфичного отжига на одноцепочечной ДНК короткого олигонуклеотида – праймера. Чтобы произошло существенное накопление в реакционной смеси такого целевого участка ДНК - ограниченного праймерами – ампликона, требуется циклическое повторение данного процесса. Постоянными компонентами реакционной смеси служат ДНК-полимераза, пара праймеров и дНТФ, содержание которых от цикла к циклу практически не изменяется. Но синтезируемая в каждом цикле ДНК должна расплетаться - переходить из двухцепочечного состояния в одноцепочечное. Самым простым способом «расплести» двухцепочечную ДНК и перевести ее в одноцепочечное состояние служит высокотемпературная денатурация, которую легко осуществить, нагревая до 95-96°C реакционную смесь тем или иным способом. Таким

образом, ПЦР следует относить к реакциям, управляемым сменой температур. Необходимо только заметить, что существуют и другие способы денатурации (расплетания) цепей ДНК, без помощи высокой температуры. На основе некоторых из них разработаны изотермические варианты ПЦР, также заслуживающие хотя бы краткого упоминания в данной статье. К тому же за последние десятилетия, кроме ПЦР, разработано немало иных способов амплификации нуклеиновых кислот, протекающих в изотермических условиях¹, но здесь о них говорить не будет, поскольку в будущем таким реакциям будут посвящены отдельные статьи в данном журнале.

Вся история развития метода ПЦР - это непрерывающаяся борьба за повышение специфичности и чувствительности ДНК-амплификации, за сокращение времени всего процесса, за уменьшение объемов реакционной смеси и, следовательно, за экономию дорогостоящих реагентов. Параллельно шел и продолжает идти процесс совершенствования методов детекции целевых продуктов ПЦР как по конечной точке, так и в режиме реального времени.

¹ В протекающих изотермически многочисленных реакциях амплификации нуклеиновых кислот появление новых одноцепочечных матриц (ДНК или РНК) достигается иными и при этом отличающимися от метода к методу способами.

Также ведется постоянный поиск новых природных термостабильных ДНК-полимераз и генно-инженерное совершенствование уже используемых. Исследования ведутся и по другим направлениям, в том числе не остаются без внимания и прочие ингредиенты и составляющие ПЦР. Но поскольку в одной статье невозможно рассмотреть все, что связано с ПЦР, то взаимосвязанные вопросы чувствительности / специфичности ПЦР, способы регистрации результатов ПЦР, а также ряд других мы оставим для последующих наших статей, которые будут посвящены этой очень актуальной теме - амплификации специфичных фрагментов нуклеиновых кислот. Ее важность косвенно подтверждается издающейся уже на протяжении многих лет серией прогнозных эконометрических обзоров технологий и оборудования для ПЦР – The World Outlook for Polymerase Chain Reaction (PCR) Technologies (<http://www.icongrouponline.com/purchase.asp?isbn=114866792&type=wol/>) и The World Outlook for Polymerase Chain Reaction (PCR) Machines (<http://www.icongrouponline.com/purchase.asp?isbn=114858668&type=wol/>), которые готовит компания Icon Group, и на сегодняшний момент изданные в январе 2011 г. их последние выпуски (объемом около 200 страниц каждый) охватывают период на 2011 – 2016 гг.²

В настоящее время «виды» ПЦР можно условно и очень грубо подразделить на два больших направления – обычные (англ. – conventional) и микрофлюидные (микрожидкостные). Под обычной ПЦР понимается реакция амплификации ДНК, проводимая в неких «стандартных» пробирках или капиллярах микролитровых объемов, размещаемых в твердотельных реакционных блоках или полых воздушных камерах. В микрофлюидной ПЦР реакционными сосудами, как правило, служат микроканалы в специальных чипах, а объемы жидкости на порядки меньше. Также в той или иной степени развиваются конвекционная ПЦР, твердофазная ПЦР, эмульсионная ПЦР и некоторые другие модификации этой реакции, которым в будущем будут посвящены самостоятельные статьи, как и бурно развивающейся микрожидкостной ПЦР. Таким образом, в данной статье основное внимание

² К сожалению, из-за чрезвычайно высокой стоимости данных обзоров (795 долл. США за электронную или печатную версии) приобрести их нам затруднительно и поэтому можем лишь по косвенным признакам и доступным оглавлению и введению судить об их важности и сделанному в них охвату рассматриваемых вопросов для более чем 200 стран и 2000 крупнейших городов мира.

будет уделено обычной ПЦР, точнее - способам изменения температур реакционной смеси и типам реакционных камер, сосудов и их объемам, измеряемым, главным образом, микролитрами.

Сделанное здесь описание различных приборов для проведения ПЦР, насколько это было возможно, выдержано нами в хронологическом порядке, причем наибольшее внимание уделено не коммерчески реализуемым приборам, а лабораторным прототипам и различным предложениям многих авторов, не нашедших или пока не нашедших промышленного применения. В наших лабораториях с начала 90-х гг. прошедшего столетия в общей сложности побывало в эксплуатации более полутора десятков ДНК термоциклеров³ зарубежного и отечественного производства, а также собственного изготовления. Смена температур в их термоблоках, камерах и сосудах достигалась разными способами и поэтому мы не понаслышке знаем особенности тех или иных способов нагрева/охлаждения реакционных сосудов. Но при этом наш обзор отнюдь не претендует на исчерпывающую полноту, поскольку только в этой части (смена температур, типы реакционных блоков/камер, включая реакционные сосуды) того огромного мира, что зовется «ПЦР» сделано так много, что просто не объять. Хотя стремиться к этому мы намерены и будем признательны всем откликнувшимся на эту статью и особенно тем, кто укажет на какие-либо наши неточности и упущения.

Так, в первые годы использования ПЦР еще далеко не все экспериментаторы имели возможность приобретения специальных ДНК-амплификаторов, производство которых тогда только начиналось, и поэтому требуемые для данного метода циклические смены температур в реакционной смеси часто осуществляли весьма просто - вручную перенося пробирки из одной водяной бани в другую. При этом весь процесс занимал много времени и требовал неусыпного внимания лаборанта. Чтобы как-то автоматизировать этот монотонный процесс и исключить ошибки, вызванные человеческим фактором, стали конструироваться различные механизмы и публиковаться различные статьи на эту тему. Так, были изготовлены ДНК-термоциклеры, обеспечивающее механическое перемещение образцов между тремя водяными банями, поддерживающими температуры денатурации, отжига и элонгации соответственно. В одной из работ описывалась модификация существующего прибора Histokinette, использовавшегося к тому времени многие годы в гистологии [Foulkes et al., 1988]. Авторы отметили,

³ многие из которых работают у нас и по сей день

что они сконструировали механическую руку со штативом для 0,5 мл пробирок так, чтобы последние полностью погружались в воду. Это исключало конденсацию паров жидкости и позволяло не использовать в качестве водонепроницаемого барьера минеральное масло. Аналогичный прибор был создан французскими авторами, где вращающийся штатив, имеющий форму диска, перемещал пробирки по кругу от первой водяной бани ко второй и далее к третьей, установленным на соответствующие температуры. Затем цикл повторялся. Процессом перемещений управлял несложный программатор [Vertraund et al., 1989].

Уже всего двух водяных бань оказалось достаточно для программируемого микрокомпьютером переключения потоков воды, попеременно нагревавших и охлаждавших полый металлический термоблок до температур денатурации, отжига и элонгации [Rollo et al., 1988; Weier, Gray, 1988]. Когда мы сами еще не имели ДНК-термоциклеров заводского изготовления и амплификацию проводили, вручную перемещая пробирки между банями, то это создавало массу неудобств, и нами была осуществлена попытка хоть как-то усовершенствовать этот процесс. В ИБГ РАН до сих пор сохранился отлитый на одном из заводов Уфы ещё в 1990 г. полый алюминиевый реакционный блок со штуцером, вмещающий 96 пробирок объемом по 1,5 мл, и состоящий из двух герметично соединившихся нижней и верхней половинок. Смена температур в этом блоке проводилась путем ручного переключения многоходовым краном потоков воды из трех ультратермостатов, установленных на соответствующие температуры денатурации, отжига и элонгации. Хотя у нас были намерения устроить переключения потоков воды по задаваемой программе, но до автоматизации процесса дело мы тогда не довели, в отличие от австрийских авторов, изготовивших раньше нас аналогичный ДНК-термоциклер с несложной автоматикой [Torgersen et al., 1989]. Еще одной особенностью их конструкции было то, что в ней было задействовано 6 двухходовых кранов (по 3 штуки до и после реакционного блока), возвращавших потоки воды при термоциклировании в ультратермостаты с той же температурой, откуда она до этого поступала.

В литературе описывается использование для проведения ПЦР усовершенствованного матричного принтера, перемещающего штатив с пробирками между поставленными перед принтером тремя водяными банями с разными температурами [Radu, 1991]. Такой модифицированный принтер управлялся компьютером с помощью специально написанной программы и мог, по уверению автора, быть легко

возвращен в исходное состояние обычного печатающего устройства. Данная работа, рекомендуемая использовать матричный принтер для перемещения пробирок для осуществления ПЦР, оказалась не единственной и несколько позже была опубликована еще одна схожая статья, серьезным отличием которой было использование трех уже твердотельных реакционных блоков с предустановленными температурами денатурации, отжига и элонгации [Frea, 1996]. Также были предложены для термоциклирования при проведении ПЦР использовать термостат от газового хроматографа [Hoffman, Hundt, 1988]. В те же ранние годы развития ПЦР предлагалось и другое размещение реакционных пробирок для термоциклирования вместе с иным принципом смены температур [Wittwer et al., 1989; 1990]. Так, был сконструирован ДНК-термоциклер с полый воздушной камерой, куда вентилятором подавался воздух, нагреваемый нихромовой спиралью мощностью в 1000 Вт, соленоид периодически открывал специальную дверку, когда нужно пропустить в камеру для ее охлаждения уже обычный воздух из окружающей среды. При этом для ускорения смены температур внутри реакционных сосудов амплификация велась не в полипропиленовых пробирках, а в запаиваемых стеклянных капиллярах.

В статье, посвященной сравнению ряда коммерческих ДНК-термоциклеров с прибором их собственного изготовления, автором были произведены даже денежные подсчеты [McLeod, 1990]. Причем примечательно то, что сравниваемый с коммерческими приборами ДНК-термоциклер RPMS Cycler (Royal Postgraduate Medical School) был изготовлен в том же учреждении, где ранее модифицировали прибор Histokinette [Foulkes et al., 1988]. Однако новый прибор имел иную конструкцию и скорее напоминал модернизированный матричный принтер, перемещавший штатив с 53 образцами между стоящими в ряд тремя водяными банями. Указанная стоимость данной модели была довольно высокой - 3750 фунтов стерлингов. По утверждению автора по ряду параметров, включая скорости нагрева и охлаждения, RPMS Cycler превосходил сравниваемые с ним в той работе ДНК-термоциклеры трех фирм - Perkin Elmer / Cetus (7080 фунтов стерлингов), Techne модели PNC-1 (2950 фунтов стерлингов) и Hуbaid модели INB101 (2325 фунтов стерлингов). Особенности этих моделей было то, что у них имелся обычный резистивно нагреваемый твердотельный реакционный блок, охлаждение которого осуществлялось для первой модели

рефрижераторной водяной баней, для второй – обычной водяной баней, а третий ДНК-термоциклер охлаждался воздухом от вентилятора. Фактически все эти модели можно отнести к первому поколению ДНК-термоциклеров, поскольку серьезным конструктивным прорывом в изготовлении ДНК-термоциклеров следующего поколения стало использование элементов Пельтье⁴ и в настоящее время подавляющее большинство коммерчески реализуемых ДНК-термоциклеров производится на их основе.

Довольно подробное описание как изготовить недорогой ДНК-термоциклер было приведено в работе немецких авторов [Collasius et al., 1989]. В их приборе, получившем название Cyclotherm, способ изменения температуры реакционного блока был основан на использовании расположенных между вентилятором и реакционным блоком элементов Пельтье, что заметно упрощало всю конструкцию, поскольку не требовалось никаких дополнительных, в том числе внешних вспомогательных устройств для охлаждения. Авторы подсчитали, что изготовление их прибора обходится всего в 1000 долларов США, тогда как коммерчески доступные модели стоили в том момент, как они отмечают в своей статье, от 5 до 10 тыс. В том же году другими авторами также был предложен еще один недорогой ДНК-термоциклер на элементах Пельтье [Wittbrodt, Erhardt, 1989].

Одними из первых коммерческих ДНК-термоциклеров, основанных на элементах Пельтье, стали модель РНС-2 фирмы Techne и модель РТС-100 фирмы MJ Research. Следует заметить, что качество тогдашних элементов Пельтье было не самым лучшим (для целей термоциклирования) - они довольно быстро выходили из строя и не обеспечивали быстрой смены температур, скорость

⁴ Элемент Пельтье — это термоэлектрический преобразователь, принцип действия которого базируется на эффекте Пельтье — возникновении разности температур при протекании электрического тока. В основе работы элементов Пельтье лежит контакт двух токопроводящих материалов с разными уровнями энергии электронов в зоне проводимости. При обращении направления тока с помощью переключателя можно использовать элементы Пельтье в режиме термоциклирования для чередования режима охлаждения с режимом нагрева, что как раз требуется для проведения ПЦР. Достоинствами элементов Пельтье являются небольшие размеры, отсутствие каких-либо движущихся частей, а также газов и жидкостей.

которой была в пределах 1-2°С/сек при нагреве и охлаждении. Говорим об этом уверенно, поскольку в нескольких наших ранних ДНК-термоциклерах, изготовленных отечественными производителями на основе элементов Пельтье, последние очень быстро переставали работать и после их замены фирмами-производителями, история повторялась. Аналогичной информацией правда уже не из «первых рук» располагаем и о первых партиях ДНК термоциклеров модели РТС-100 фирмы MJ Research, которая, пока не перешла в июле 1990 г. на элементы Пельтье собственного производства, сталкивалась с многочисленными отказами своей техники. Скорости смены температур для основанных на элементах Пельтье разных моделей термоциклеров разных фирм постепенно росли и сейчас обычно варьируют в среднем от 2 до 4°С в секунду. Относительно недавно фирмой Eppendorf сообщено о создании прибора модели MasterCycler ep realplex, рассчитанного на амплификацию в режиме реального времени, со скоростью изменения температур до 6°С в секунду и ныне это самая высокая скорость для ДНК-термоциклеров такого типа. Однако реакционный блок данного амплификатора изготовлен не из обычно используемого алюминия, а из позолоченного серебра⁵, которое гораздо лучше проводит тепло, но при этом заметно дороже.

Самым дешевым⁶ ДНК-термоциклером, основанным на элементах Пельтье, в настоящее время видимо надо признать малогабаритный (Ш 130 x Г 200 x В 250 мм, вес 3,5 кг) OpenPCR Thermocycler (<http://openpcr.org/the-machine/>).

Уникальной особенностью данного прибора следует считать то, что он продается в интернет-магазине www.amazon.com (на страницу с информацией для заказа можно выйти только через линк на вышеприведенном сайте OpenPCR) в виде некоего конструктора - набора комплектующих, из которых действующую модель как уверяют разработчики можно собрать за три часа с помощью набора отверток, гаечных ключей, пассатижей и подробной 76-ти страничной инструкции по сборке. Стоимость OpenPCR Thermocycler составляет 599 долл. США без учета пересылки и прочих сборов. При своей такой низкой стоимости этот прибор вмещает 16 пробирок по 0,2 мл, характеризуется хорошей однородностью температуры реакционного

⁵ Коэффициенты теплопроводности алюминия и серебра составляют 209,3 и 418,7 Вт/м x °Кельвина, соответственно.

⁶ Еще дешевле на сайте www.ebay.com или в аналогичных интернет-магазинах можно купить подержанные ДНК-термоциклеры разных моделей.

блока, имеет так называемую «горячую крышку», нагреваемую до 120°C, но при этом обладает, к сожалению, невысокой скоростью нагрева/охлаждения – 1°C/сек.



Рис. 1. ДНК-термоциклер модели OpenPCR Thermocycler

Помимо использования элементов Пельтье и другие ранее предложенные в упомянутых выше статьях разные способы смены температур реакционных смесей нашли свое воплощение в целом ряде коммерчески реализуемых ДНК-термоциклеров. Так, перемещение реакционных сосудов между сухими термоблоками было реализовано американской фирмой Stratagene, производившей серию ДНК-термоциклеров RoboCycler (рис. 2), главной особенностью которых является механическое, с помощью манипулятора, перемещение реакционных планшет, вмещающих или 40 или 96 пробирок, между четырьмя металлическими блоками, постоянно поддерживающими каждый свою температуру (или градиент температур в некоторых моделях).



Рис. 2. ДНК-термоциклер модели RoboCycler Gradient 40

В дальнейшем данные модели были усовершенствованы горячей крышкой. Здесь можем заметить, что у нас имеется такой ДНК-термоциклер модели RoboCycler Gradient 40, вполне справляющийся с возлагаемыми нами на него сегодняшними задачами.

Роботизированное перемещение специальной трехсекционной алюминиевой корзинки, вмещающей 24 планшета с 96-ю, 384 или с 1536-ю лунками, между тремя встроенными водяными банями, поддерживающими каждая свою температуру имеет место в недавно снятом с производства ДНК-термоциклере английской фирмы ABgene модели H₂OViT, имеющим просто гигантский размер - 1720 мм (Ш) x 700 мм (Г) x 1500 мм (В) с весом в работающем положении целых 700 кг, из которых более трети приходилось на долю циркулирующих внутри 280 литров воды (рис. 3).



Рис. 3. ДНК-термоциклер H₂OViT

Хотя это не имеет прямого отношения к особенностям смены температур в реакционных блоках/камерах, но поскольку оказалось упомянутым в одном из предыдущих абзацев и имеет отношение к нагреву, то позволим себе здесь уточнить, что понимается под градиентом температур и горячей крышкой. Так, горячая крышка, установленная (обычно) на 105°C или 110°C, предотвращает конденсацию паров воды, образующихся в реакционном сосуде в результате испарения. При этом в ДНК-термоциклерах, не оснащенных подобной крышкой, верхняя часть, например, полипропиленовой пробирки оказывается более холодной, чем ее нижняя часть, находящаяся

в термоблоке и в этом случае необходимо создавать водонепроницаемый барьер из минерального масла, которое надо специально добавлять после завершения пипетирования реагентов. Причем бывает нужно от этого масла после завершения ПЦР избавляться, что не так просто. Здесь можно заметить, что несколько легче отобрать реакционную смесь после затвердевания парафинового AmpliWax барьера, применяемого обычно для ПЦР с горячим стартом, что описано нами в предыдущей статье [Чемерис и др., 2011]. Таким образом, горячая крышка служит удобной альтернативой минеральному маслу и является почти неизменным атрибутом большинства современных ДНК-термоциклеров. Однако недавно фирмой Qiagen для создания водонепроницаемого барьера вместо вязкого минерального масла предложено использовать более удобную жидкость, представляющую собой гидрофобный синтетический высокомолекулярный полимер, характеризующийся низкой вязкостью, поставляемый под торговой маркой Varog-Lock.

Что касается градиента температуры, формируемого в термоблоке, то такая возможность, реализованная в довольно большом количестве моделей ДНК-термоциклеров, весьма прогрессивна и позволяет в одном эксперименте опробовать различные температуры, в первую очередь, температуру отжига для подбора наиболее оптимальной, тогда как в обычных ДНК-термоциклерах для этой же цели необходимо проводить самостоятельные эксперименты с установкой в каждом разных температур.

Ранее разработанный ДНК-термоциклер с полой воздушной камерой [Wittwer et al., 1989; 1990] лег в основу коммерчески реализуемого американской фирмой Idaho Technology, Inc. на протяжении ряда лет ДНК-термоциклера Air-Thermo-Cycler модели АТС 1605. Так, в 1991 г. в январском номере журнала *Biotechniques* появилась первая реклама этого прибора, который по скорости амплификации заметно опережал все имевшиеся тогда ДНК-термоциклеры. Скорость движения потоков воздуха в нем составляла 1000 м за 1 мин [Wittwer et al., 1994]. В дальнейшем эта конструкция была заметно усовершенствована [Wittwer et al., 1994; 1995] и новый ДНК-термоциклер, продажи которого были начаты в 1995 г., получил название RapidCycler, а затем был выпущен на рынок RapidCycler 2. В этих моделях имеет место высокая скорость смены температур, достигающая 10-12°C/сек, и 30 циклов завершаются за 10-30 минут⁷,

⁷ Необходимо заметить, что периоды времени, необходимые для проведения того или иного числа

главным образом, за счет быстрого нагрева мощной лампой и охлаждения с помощью вентилятора, а также благодаря тонкостенным стеклянным капиллярам, обладающими по сравнению с полипропиленовыми пробирками гораздо лучшими теплопередающими свойствами, и отсутствию инерции массивного термоблока, вместо которого в этих моделях ДНК-термоциклеров имеется воздушная камера. Мы располагаем таким ДНК-термоциклером и успешно используем его для проведения некоей нестандартной ПЦР, где нам требуется высокая скорость смены температур. Также у нас имеется рассчитанный на детекцию результатов ПЦР в режиме реального времени ДНК-термоциклер роторного типа с оптическим модулем модели Rotor-Gene 6000 HRM австралийской фирмы Corbett Research⁸, в котором вместо массивного термоблока тоже имеется полая воздушная камера с вращающимся в ней ротором с реакционными пробирками или капиллярами, благодаря чему и происходит процесс быстрого нагрева/охлаждения. Ранее эта фирма выпускала аналогичные роторные ДНК-термоциклеры с полой воздушной камерой моделей Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 2000. Некоторое сокращение времени амплификации, связанное с вращением, продемонстрировали шведские авторы, улучшив процесс теплораспределения по всему объему реакционной смеси за счет воздействия возникающей силы Кориолиса, ускоряющей перемешивание слоев жидкости [Martensson et al., 2006]. Так, обеспечив действие силы тяжести до 7000g, им удалось 45 циклов ПЦР завершать за 15 мин.

Один из самых быстрых ДНК-термоциклеров, рассчитанный на использование газа как теплоносителя и обеспечивающий проведение 30 циклов за 10 минут, получил название PCRJet [Whitney, 2004]. В выданном патенте США, по сути, на этот же ДНК-термоциклер, основанный на принципе попеременной подачи под давлением горячего и

циклов ПЦР, приводимые в рекламных буклетах или в оригинальных статьях, зависят не только от скорости смены температур в реакционных блоках/камерах конкретных ДНК-термоциклеров, но и от установленных режимов термоциклирования, при которых продолжительности разных стадий могут очень сильно варьировать по длительности, что зависит от целого ряда причин и потому более точной характеристикой производительности (по времени) таких приборов служит именно скорость смены температур при нагреве/охлаждении.

⁸ В настоящее время данные модели ДНК-термоциклеров производится фирмой Qiagen.

холодного газа, говорится о смене температур со скоростью 17°C в секунду и завершении ПЦР всего за пару минут [Quintanar, Nelson, 2002]. В качестве охлаждающего газа использовался CO_2 , а нагревающим служил или горячий воздух или горячий гелий, поскольку у последнего эффективность теплопередачи в 7 раз выше, чем у воздуха. Скорость потока горячего и холодного газов в данном приборе достигает 45 миль в час [Mooge, 2005]. Спустя несколько лет патентным ведомством США был выдан еще один патент на иную более сложную конструкцию «газового» ДНК-термоциклера [Fawcett, Reed, 2010]. Отличительными особенностями этой модели были охлаждение амплифицируемых образцов холодным газом, тогда как нагрев велся с помощью терморезистивных нагревателей.

Еще один весьма оригинальный ДНК-термоциклер был сконструирован теми же авторами [Ebmeier et al., 2004], что и PCRJet. Его особенностью было то, что подаваемые в специальную трубу газы образовывали известный вихревой эффект Ранка-Хилша, согласно которому на периферии образуется поток с большей температурой, а в центре – охладившийся поток, закручивающийся в другую сторону. Ранее при варьировании входного давления газа, направления потоков и некоторых других характеристик было обнаружено, что газы могут достигать максимальные и минимальные температуры в 200°C и в -50°C [Hilsch, 1947]. Эффективность работы всей системы при проведении такой ПЦР в приборе конструкции американских авторов [Ebmeier et al., 2004] была максимальна, когда горячий воздух нагревался до 110°C , а охлажденный имел температуру 3°C . В камере для образцов размещались 4 специальные кюветы, включая одну для контроля температуры. Скорость нагрева реакционной смеси достигала $3,2^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, а охлаждения – $16^{\circ}\text{C}/\text{сек}$. Поддержание в камере фиксированной температуры обеспечивалось пульсацией соленоидов, попеременно подающих нужные потоки газов. При этом 30 циклов ПЦР завершались за 7 с небольшим минут, однако необходимость применения газов под давлением и специальных кювет заметно усложняет всю конструкцию.

Безусловно со стандартными полипропиленовыми пробирками, которые при необходимости можно легко подвергнуть центрифугированию, обращаться значительно проще, однако пластик обладает более низкой теплопроводностью, чем стекло и поэтому стеклянные капилляры предпочтительнее в тех случаях, когда время проведения ПЦР является лимитирующим фактором или когда необходимо

произвести плавление наработанных ампликонов с высоким разрешением для выявления полиморфизма нуклеотидных последовательностей. Относительно быструю смену температур в самой реакционной смеси в ПЦР удалось достичь благодаря использованию полипропиленовых специальных тонкостенных (с толщиной стенок в 0,3 мм вместо прежних 0,5 мм и более) пробирок, которые сейчас поставляются множеством фирм. В последние годы появились также капилляры из пластика и в специальном исследовании, посвященном сравнительному анализу пластиковых и стеклянных капилляров для проведения ПЦР было обнаружено, что пластик все же сильно уступает стеклу по многим параметрам, вплоть до того, что с одной и той же матрицей амплификация в стекле проходила, а в пластике нет [Elenitoba-Johnson et al., 2008]. В одноразовых наконечниках для микропипеток предложили проводить амплификацию с помощью ПЦР отечественные ученые [Третьяков и др., 1994], где две галогеновые лампы обеспечивали нагрев со скоростью до $8^{\circ}\text{C}/\text{сек}$, а охлаждение со скоростью до $12^{\circ}\text{C}/\text{сек}$ осуществлялось проточной водой. Еще одним преимуществом используемых наконечников вместо пробирок было увеличение отношения теплопроводящей площади к реакционному объему, однако данный вариант проведения ПЦР был недостаточно технологичным и не нашел применения. Еще более тонкий слой полимера, разделяющий термоблок и реакционную смесь, был предложен той же группой отечественных ученых [Третьяков и др., 1997]. Он представлял собой полипропиленовую пленку толщиной 40-60 мкм, из которой предстояло формовать емкости для помещения туда реакционной смеси. Процесс термоформования производился непосредственно в самом термоблоке, нагреваемом до 145°C и имеющем сквозные отверстия в лунках для подвода вакуума и создания в них разрежения, что по технологичности также уступало использованию готовых стандартных пробирок. Японскими авторами предлагалось амплифицировать образец непосредственно в U-образных алюминиевых лунках термоблока, покрытых тефлоном, что, по их мнению, позволяло полностью извлечь оттуда реакционную смесь после амплификации и таким образом спасало от загрязнения ранее образовавшимися ампликонами новых образцов при последующих анализах [Sasaki et al., 1997]. Фактически ими были предложены многоразовые реакционные сосуды, что, безусловно, не отвечает требованиям чистоты эксперимента, причем такого чувствительного как ПЦР.

helicon

Компания ХЕЛИКОН

ВСЕ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КОМПЛЕКСНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИЙ

Оборудование

для:

- ▶ ПЦР
- ▶ Пробоподготовки
- ▶ Центрифугирования
- ▶ Анализа нуклеотидных последовательностей
- ▶ Клонирования
- ▶ Иммуно-ферментного анализа
- ▶ Общелaborаторное оборудование



Реактивы

для:

- ▶ Электрофореза
- ▶ Клонирования
- ▶ Трансфекции
- ▶ Культуральных работ
- ▶ Вторичной детекции
- ▶ Рестрикции и модификации нуклеиновых кислот
- ▶ Выделения и очистки нуклеиновых кислот



Пластик

для:

- ▶ ПЦР
- ▶ ИФА
- ▶ Культуральных работ



119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40 МГУ им. М. В. Ломоносова
Телефон (495) **933-2736**; факс: (495) **930-0084**, mail@helicon.ru, www.helicon.ru

Представительство в **НОВОСИБИРСКЕ**: 630128 г. Новосибирск, ул. Демакова, 23, оф. 201, тел.: (383) 214-60-82, факс: (383) 217-43-89, e-mail: novosibirsk@helicon.ru
Представительство в **САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**: 195220 г. Санкт-Петербург, ул. Гжатская, 27 А, оф. 245, тел./факс: (812) 248-91-30, e-mail: spb@helicon.ru

Говоря о реакционных сосудах, нельзя обойти вниманием объемы реакционной смеси⁹ и количества одновременно амплифицируемых образцов. Так, довольно долго при проведении ПЦР стандартный объем амплифицируемого образца составлял 100 мкл, причем, в первые годы, реакционными сосудами обычно служили 1,5 мл полипропиленовые пробирки, затем те же 100 мкл стали помещать в 0,5 – 0,7 мл пробирки. При переходе на 0,2 мл пробирки в них уже стали вносить, как правило, не более 25 мкл раствора. Интересна фраза в обзорной статье середины 90-х гг. [Oste, 1994], посвященной инструментарию ПЦР, где автор вспоминает о 100 мкл амплифицируемых образцах, говорит об обычном проведении ПЦР в 25-50 мкл объемах и сообщает, что он слышал об успешном проведении ПЦР всего в 5 мкл реакционной смеси. При этом нам известна статья польских авторов тех же лет, где они сообщают об ускорении протекания ПЦР в ДНК-термоциклере модели 480 фирмы Perkin-Elmer, достигаемому благодаря резкому уменьшению объема реакционной смеси до 2,5 мкл и даже до 1 мкл [Sobczak et al., 1995]. В настоящее время все же неким стандартом для ПЦР как по конечной точке, так и в режиме реального времени является объем 10-30 мкл, что позволяет констатировать лишь незначительное уменьшение объемов реакционных смесей в обычной ПЦР с момента возникновения данной реакции. При этом в микрожидкостной ПЦР амплифицируемые объемы уже давно составляют нанолитры [Liu et al., 2002; Gulliksen et al., 2006; Dahl et al., 2007; Shen et al., 2010] и даже пиколитры [Nagai et al., 2001; Marcus et al., 2006; Beer et al., 2008]. Да и разнообразия в способах нагрева/охлаждения реакционных смесей в микрофлюидной ПЦР гораздо больше. Так, например, в одной из работ для нагрева нанолитровых капель, диспергированных в масляной фазе используется маломощный 30 милливатный инфракрасный лазер [Kim et al., 2008]. Что касается эмульсионной ПЦР, то отдельные капли, служащие фактически отдельными реакционными сосудами, могут быть и фемтолитровых объемов, а их количества измеряются миллионами. В различных вариантах цифровой ПЦР амплификация может идти в сотнях и тысячах реакционных емкостей. Так, в монокапельном ДНК-термоциклере модели QX-100 фирмы Bio-Rad Laboratories одновременно

возможен анализ пока только 8 образцов, но для каждого образца амплификация идет в 20 тысячах реакторов объемом в 1 нанолитр каждый [Hindson et al., 2011; Pinheiro et al., 2012].

При проведении обычной ПЦР современные реакционные блоки у большинства ДНК-термоциклеров вмещают 96 образцов, что соответствует размерам стандартных микротитраторных планшет, тогда как в старых моделях обычно одновременно амплифицировалось меньшее количество образцов. При этом имеются приборы, в которых может идти одновременная амплификация и заметно большего числа образцов. Так, например, новый ДНК-термоциклер модели SureCycler 8800 фирмы Agilent Technologies комплектуется взаимозаменяемыми термоблоками на 96 и 384 пробирки. А ДНК-термоциклер модели LightCycler 1536 System фирмы Roche способен вести амплификацию 1536 образцов в специальных планшетах. Ранее в уже цитировавшейся выше статье [Sasaki et al., 1997] был описан оригинальный ДНК-термоциклер модели RIKEN GS384, который, помимо того, что был рассчитан на многообразное использование для амплификации покрытых тефлоном лунок, еще и одновременно вмещал очень большое количество анализируемых образцов – максимально 6144. Так, этот прибор имел 4 реакционных блока по 1536 лунок с диаметром 1,6 мм каждая, при этом имелись сменные термоблоки на 384 лунки. К другим интересным чертам этого ДНК-термоциклера можно отнести и некоторые его конструктивные особенности в виде листа графита, размещенного под алюминиевым термоблоком и способствующего лучшему распределению тепла/холода при нагреве/охлаждении, которые осуществлялись терморезистивным нагревателем и элементами Пельтье соответственно, а также роботизированное перемещение термоблоков. Имелся еще контактирующий с горячей крышкой лист силиконовой резины, герметизирующий лунки термоблока.

К другой крайности можно отнести портативный рассчитанный на одновременную амплификацию только 4 образцов ДНК-термоциклер TFRT (Thin-Film Resistive Thermocycler), питающийся постоянным током от батареи в 9V [Herold et al., 2009]. В этом приборе ПЦР проводилась в реакционной смеси объемом 5 мкл в 4 стеклянных капиллярах, находящихся для лучшего (быстрого) нагрева со скоростью 6 - 7°C/сек на тонкой резистивной пленке, а охлаждение (5°C/сек) осуществлялось с помощью двух компактных вентиляторов для компьютерного процессора, расположенных сверху и снизу от резистивной пленки. На 35 циклов при выбранном

⁹ Здесь и далее имеются в виду объемы водных растворов без минерального масла, которое требуется при проведении ПЦР в ДНК-термоциклерах без горячей крышки.

ими режиме термоциклирования требовалось 18 мин.

Описан для проведения ПЦР быстрый способ нагрева реакционной смеси с помощью микроволнового излучения [Fermer et al., 2003]. При этом авторы использовали не бытовую микроволновую печь, рассчитанную на нагрев значительных объемов продуктов и характеризующуюся большими неоднородностями поля микроволн, а коммерчески доступный соответствующий прибор модели Microwell 10, имеющий одну небольшую емкость для генерации в ней микроволн, куда и помещалась 0,5 мл реакционная полипропиленовая пробирка, содержащая 100 мкл жидкости. В качестве некоего преимущества нагрева с помощью микроволн авторы отмечают фактически отсутствие неизбежно возникающего при других способах нагрева внутри пробирок градиента температур, поскольку теплопередача обычно идет от наружных стенок пробирки или другой емкости. Хотя справедливости ради следует отметить, что для охлаждения реакционной смеси на этапе отжига они вручную помещали пробирку в водяную баню, где неизбежно возникал этот самый градиент температуры.

Не так давно выдан патент США на быстрый ДНК-термоциклер с подвижным охлаждающим устройством [Roberts et al., 2011]. Особенностью данной конструкции было наличие нагреваемого реакционного блока с малой массой, тогда как быстрое снижение температуры достигалось путем передвижения до образования физического контакта с реакционным блоком предварительно охлажденного элемента большой массы.

В литературе имеется описание оригинального ДНК-термоциклера, характеризующегося довольно высокой скоростью смены температур в реакционных капиллярах, достигающих 20°C/сек благодаря чему 35 циклов завершались всего за 12 мин [Near et al., 2000]. Особенностью данного прибора был нагрев за счет электролитического сопротивления реакционного буфера, находящегося в двух соседних резервуарах, между которыми помещался специальный капилляр с развальцованными краями, обтянутыми диализной пленкой с таким расчетом, что крупные молекулы выйти из капилляра не могли, а ионы были способны через нее проникать и обеспечивать протекание переменного тока, вызывающего нагрев реакционной смеси внутри капилляра, при этом охлаждение капилляра достигалось обдувом окружающим воздухом с помощью вентилятора. Ввиду громоздкости всей системы коммерческого применения она найти не могла.

Также очень быструю смену температур в ПЦР в виде 65°C в секунду при нагреве и 80°C при охлаждении смогли достичь китайские авторы [Lee et al., 2004]. Они проводили амплификацию в 10 мкл реакционной смеси, помещенной в стеклянный капилляр для гематокритной центрифуги, причем по краям было добавлено по 3 мкл минерального масла и его концы замазаны глиной. Нагрев осуществлялся 50-ти ваттной лампой накаливания, а охлаждение водой, подаваемой насосом.

Несколько меньшая скорость нагрева и охлаждения (44 и 17°C соответственно) реакционной смеси при ПЦР была показана в другой работе [Maltezos et al., 2010]. Время, отведенное ими на каждую стадию, позволило 35 циклов выполнить менее чем за 100 сек. Эти авторы также проводили амплификацию в стеклянных капиллярах, но производства фирмы Idaho Technology, уже специально предназначенных для ПЦР, в объеме 6 мкл. Особенностью разработанного ими ДНК-термоциклера можно считать наличие жидкой фазы между элементами Пельтье, состоящей из эвтектичного галлия, в который для ускорения теплопередачи и помещались капилляры.

Недавно сообщено о равных скоростях изменения температуры в реакционных сосудах при нагревании и охлаждении, составивших 45°C/сек, благодаря чему 30 циклов завершались за 2 мин 18 сек [Wheeler et al., 2011]. Амплификация проводилась ими в особом реакционном блоке, изготовленном из пористой меди, через которую под давлением прокачивались попеременно горячая и холодная вода. В качестве реакционных сосудов использовались специальные 5 мкл полипропиленовые вставки, закрываемые типичной для ПЦР адгезивной герметизирующей пленкой; сверху размещался нагреваемый полимер на основе полиамидной пленки, выполняющий роль «горячей крышки». Ранее в аналогичном термоблоке при проведении ПЦР была зафиксирована максимальная скорость нагрева/охлаждения, достигшая более 150°C/сек [Mahjoob et al., 2008].

Для любых ДНК-термоциклеров с твердотельным реакционным блоком или с полостью воздушной камерой одной из важных характеристик служит однородность температуры в разных частях термоблока или камеры, и многие производители подчеркивают для своих приборов лишь незначительные на несколько десятых градуса отличия по температуре по всему блоку. В литературе имеются даже специальные исследования технических характеристик большого числа ДНК-термоциклеров, среди которых одной из главных была однородность температуры. В одной работе был проведен многопараметрический анализ

сразу 19 ДНК-термоциклеров 8 моделей [Kim et al., 2008]. Ранее другими авторами сравнивались характеристики ДНК-термоциклеров, в том числе используемых для микробной диагностики производства шести известных фирм [Schoder et al., 2003; 2005]. Однако для конвекционной ПЦР напротив свойственна различная температура в разных зонах пробирки, капилляра или иного реакционного сосуда, или точнее имеет место градиент температур. Фактически в реакционном сосуде возникает или конвекционная ячейка Марангони, где перемещение жидкости вызывается различиями в поверхностном натяжении или конвекционная ячейка Бенара-Рэлея, где перемещение слоев жидкости приводится в действие силой плавучести, являющейся разницей между архимедовой силой и силой тяжести. На этом принципе была предложена первая конвекционная ячейка для проведения ПЦР, представляющая собой вертикальный канал глубиной 1,5 см и объемом 35 мкл в кубике из оргстекла [Krishnan et al., 2002]. Снизу производился нагрев кубика до 97°C, а сверху он был термостатирован при температуре 61°C. В результате за 1,5 часа реакции нарабатывался специфичный ПЦР-продукт, количество которого оказалось достаточным, чтобы его увидеть с помощью агарозного гель-электрофореза. Впоследствии было предложено множество вариантов конвекционной ПЦР¹⁰, однако до сих пор ни один из способов не доведен до коммерческого применения. Нами разработана быстрая конвекционная ПЦР, в основе которой лежит иная конвективная ячейка с наклонным (диагональным) градиентом температур [Чемерис и др., 2008].

Принципиально другим подходом является способ проведения ПЦР в термоциклере оригинальной конструкции (Nakano et al., 1994). Главной особенностью этого подхода было то, что ПЦР протекала не как обычно статично в пробирке, а в потоке жидкости, с помощью шприцевого насоса постоянно движущейся по тефлоновой трубке, отдельные отрезки которой были помещены в водяные бани с соответствующими температурами денатурации ДНК ($l=20$ мм), отжига праймеров ($l=30$ мм) и построения новых цепей ($l=100$ мм). Общая длина этого капилляра составляла около 5 метров, что позволяло при прохождении жидкостью всей длины капилляра фактически осуществить фиксированное число циклов ПЦР, а именно – 30 циклов. Таким образом, определенные части общей реакционной смеси в этом случае находятся

одновременно в несколько различающихся температурных условиях, что кардинально отличает данный режим от классических подходов и несет некоторые преимущества, благодаря чему эта идея впоследствии получила заметное развитие при разработке ПЦР в микрожидкостных устройствах. В 1998 г. вместо движения жидкости по полимерной трубке было показано, что ПЦР может успешно проходить за счет движения реакционной смеси по вытравленным в стекле микроканалам, проложенным по извитой траектории, обеспечивающий многократное протекание жидкости через зоны с температурами денатурации, отжига и элонгации [Коор et al., 1998], что вызвало в дальнейшем лавину работ, сформировав новое направление – микрофлюидную ПЦР. Однако проведение ПЦР в полимерных трубках также продолжало развиваться. Так, в одной статье уже описывается использование более длинной 15-ти метровой тефлоновой трубки, пропущенной через три водяных бани с соответствующими температурами [Cuscio, Roeraade, 2003]. Еще одной отличительной чертой данной работы можно считать после завершения амплификации (чтобы избежать ингибирования реакции) добавление флуоресцентного интеркалирующего красителя в реакционную смесь и регистрация свечения ПЦР-продукта. Другими авторами был сконструирован цилиндрический медный блок, состоящий из трех продольных зон, поддерживающих температуры денатурации, отжига и элонгации и разделенных термоизоляторами [Park et al., 2003]. Подходящий капилляр длиной 3,5 м был 33 раза обернут вокруг этого блока, обеспечивая проведение ПЦР, причем авторы исследовали различные скорости протекания реакционной смеси и обнаружили, что удовлетворительная эффективность амплификации достигалась при скорости 1 мкл/сек, что позволяло завершать ПЦР приблизительно за полчаса.

С помощью перистальтического микронасоса была осуществлена ПЦР, названная авторами «насосная», в которой реакционная смесь объемом 1 мкл двигалась по вытравленному каналу, проложенному через температурные зоны, поддерживающие каждая свою температуру – 90, 72 и 55°C и одно такое передвижение жидкости «вперед-назад» соответствовало одному циклу ПЦР [Vi et al., 2003]. Авторы сообщают, что на то чтобы в капле жидкости, где происходила амплификация, достигалась нужная температура требовалось менее одной секунды. В другой работе для проведения ПЦР был использован шприцевой насос и движение реакционной жидкости по капилляру «вперед-назад» из зоны с температурой денатурации в зону отжига и элонгации, нагреваемых элементами

¹⁰ Как уже упоминалось выше, конвекционной ПЦР будет посвящена отдельная статья в данном журнале.

Пельтье, причем детекция накопления ампликонов велась в режиме реального времени, регистрируя флуоресценцию в отрезке капилляра, который находился между нагревательными блоками [Chen et al., 2007].

Помимо воздействия высокой температуры есть и иные способы расплетания цепей ДНК. Так, была разработана tHDA (thermostable Helicase-Dependent Amplification) или «термостабильная хеликазо-зависимая амплификация», называемая еще «холодной» ПЦР, где стадия высокотемпературной денатурации отсутствует, а ее роль выполняет фермент хеликазы, расплетающая цепи ДНК [Vincent et al., 2004; An et al., 2005; Goldmeyer et al., 2007]. Для проведения такой ПЦР может использоваться как любой подходящий ДНК-термоциклер, так и обычный термостат, установленный на нужную температуру. При этом данный метод, несмотря на свою привлекательность и доступные из коммерческого источника (от аффилированного предприятия Biohelix Corporation американской фирмы New England Biolabs, Inc.) соответствующие наборы, пока не получил серьезного развития. Некоторое удивление вызывает рекомендуемая производителем очень большая продолжительность реакции (90 мин), поскольку казалось бы ферменты должны работать быстрее, тем более, что в изотермических условиях не происходит искусственного сдерживания работы фермента(ов), что имеет место в обычной ПЦР, в которой новый цикл не начнется пока после денатурации температура не опустится до оптимальной для отжига новой порции праймеров. Можно также заметить, что отечественными учеными [Кабоев и др., 1999] ранее предлагалось использовать хеликазу в ПЦР для обеспечения горячего старта, что нашло свое отражение в нашей статье на эту тему [Чемерис и др., 2011].

Другой интересный вариант изотермической «холодной» ПЦР в приборе особой конструкции был относительно недавно защищен патентом США [Bickmore Jr., Roberts, 2009], в котором описывается способ денатурации ДНК под воздействием звука разных длин волн различной мощности, что привело к заметному сокращению времени реакции по сравнению с обычной ПЦР с температурной денатурацией. В данном патенте сообщается, что они испытывали энергию звука в широком диапазоне от 2 Гц до 44 МГц и весь спектр длин был в той или иной степени эффективен. Достаточно несколько милливатт звуковой энергии и пары секунд, чтобы ДНК из двухцепочечной формы переходила в одноцепочечную. Причем испытывались два типа преобразователей: пьезоэлектрический и электромагнитный. Ни ДНК

полимераза, ни остальные ингредиенты реакционной смеси повреждающее воздействие звуковых волн на себе не испытали. Такой способ проведения ПЦР позволяет применять не только термостабильные ферменты, но и другие мезофильные ДНК полимеразы, обладающие некоторыми ценными характеристиками.

Завершая на этом рассмотрение различных вариантов ПЦР (главным образом способов нагрева реакционной смеси для денатурации ДНК), необходимо заметить следующее. Несмотря на то, что существование молекул ДНК в их одно- или двухцепочечном состоянии зависит от водородных связей (образование которых является по сути физический процесс) между комплементарными азотистыми основаниями, разрыв таких связей и соответственно появление в реакционной смеси в ПЦР новых одноцепочечных матриц в настоящее время достигается разными путями, которые можно до некоторой степени условно считать основанными как на физических, так и на биологическом принципах. К первым надо отнести тепловую денатурацию молекул ДНК и использование энергии звука. При этом нагрев реакционной смеси может, как описано выше, обеспечиваться весьма различными способами. Биологический же подход заключается в ферментативном расплетании двойной спирали ДНК хеликазой, хотя и в этом случае происходит именно физический процесс - разрыв тех же водородных связей. Для ПЦР еще остаются незадействованными способы превращения двухцепочечных молекул ДНК в одноцепочечные, которые условно можно рассматривать как химические. Например, путем разрушения водородных связей между комплементарными нуклеотидами под действием щелочи или других денатурирующих агентов. Ни один из них для ПЦР пока не реализован главным образом из-за технических трудностей в виде необходимости удаления / нейтрализации такого агента из / в реакционной смеси после этапа денатурации ампликонов, чтобы в дальнейшем на них смог произойти отжиг праймеров. Однако интерес к различным амплификациям нуклеиновых кислот не только не ослабевает, но и постоянно растет, ввиду чего можно рассчитывать на появление в будущем новых способов, в том числе основанных и на каком-либо химическом принципе, который позволит обратимо возникать в реакционной смеси новым одноцепочечным матрицам для осуществления ПЦР. Так, международной группой авторов (Китай, Германия, США) проведено исследование, показавшее, что при перемещении из водной фазы кантилевером сканирующего зондового микроскопа цепей ДНК в

«плохой» (для молекул ДНК) растворитель (в их работе таковым служил диэтилбензол) диссоциация цепей ДНК происходит за наносекунды [Cui et al., 2007]. Правда, показано это ими было на примере единичных молекул, что не всегда возможно перенести на их пул. Нами была проведена попытка денатурации двухцепочечных ампликонов, прикрепленных одной цепью к магнитным частицам (через биотин-стрептавидиновую систему) путем их перемещения под действием магнитного поля в толуол (являющийся в определенной степени аналогом диэтилбензола), однако как, впрочем, и следовало ожидать, отдельные магнитные частицы в процессе движения еще в воде слипались и формировали собой некую каплю, сохранявшую обводненность молекул ДНК и, следовательно, их двухспиральную структуру [Гарафутдинов Р.Р., 2012, личное сообщение]. При этом можем заметить, что на этом наш интерес к такому (или схожему) варианту денатурации ДНК совсем не пропал, и мы по-прежнему видим потенциальное применение химических способов диссоциации цепей для проведения изотермической ПЦР, приборное оснащение которой может весьма сильно отличаться от нынешних уже привычных ДНК-термоциклеров.

Литература

1. Кабоев О.К., Шевелев И.В., Лучкина Л.А., Третьяков А.Н., Щербакова О.Г. Горячий старт полимеразной цепной реакции при помощи ДНК-геликаз // Биоорганическая химия. 1999. Т.25. С.398-400.
2. Третьяков А.Н., Гельфанд В.М., Пантина Р.А., Шевцов С.П., Булат С.А. Амплификация ДНК за 15-30 минут в одноразовых наконечниках для микродозаторов // Молекулярная биология. 1994. Т. 28. № 3. С. 665-669.
3. Третьяков А.Н., Пантина Р.А., Кабоев О.К. Быстрая амплификация ДНК в миниатюрных, сверхтонкостенных микроплатах // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. № 6. С. 526-528.
4. Чемерис Д.А., Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Гареев А.Р., Шальков П.А. Конвекционный ДНК термоциклер // 2008. Патент РФ 79672.
5. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. 2011. Т.2. №2. С.1-8.
6. An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H.J., Wytiaz J., Kong H. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 28952-28958.
7. Beer N.R., Wheeler E.K., Lee-Houghton L., Watkins N., Nasarabadi S., Hebert N., Leung P., Arnold D.W., Bailey C.G., Colston B.W. On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets // Anal. Chem. 2008. V.80. P.1854-1858.
8. Bertrand O., Delfau M.H., Garbarz M., Picat C., Devaux I., Dhermy D., Boivin P., Grandchamp B. An efficient laboratory made apparatus for DNA amplification // J. Biochem. Biophys. Methods. 1989. V.18. P.227-235.
9. Bickmore W.D., Jr., Roberts D.R. Methods and apparatus for amplification of DNA using sonic energy // US Patent No. 7,504,219. Mar. 17, 2009.
10. Bu M., Melvin T., Ensell G., Wikinson J.S., Evans A.G.R. Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR // J. Micromech. Microengineer. 2003. V.13. P. S125-130.
11. Chen L., West J., Auroux P.A., Manz A., Day P.J. Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor // Anal. Chem. 2007. V.79. P.9185-9190.
12. Collasius M., Falk H., Ciesler C., Valet G. How to build an inexpensive cyclotherm instrument for automated polymerase chain reaction // Anal. Biochem. 1989. V.181. P.163-166.
13. Cui S., Yu J., Kuhner F., Schulten K., Gaub H.E. Double-stranded DANN dissociates into single strands when dragged into a poor solvent // J. Amer. Chem. Soc. 2007. V.129. P.14710-14716.
14. Curcio M., Roeraade J. Continuous segmented-flow polymerase chain reaction for high-throughput miniaturized DNA amplification // Anal. Chem. 2003. V.75. P.1-7.
15. Dahl A., Sultan M., Jung A., Schwartz R., Lange M., Steinwand M., Livak K.J., Lehrach H., Nyarsik L. Quantitative PCR based expression analysis on a nanoliter scale using polymer nano-well chips // Biomed. Microdevices. 2007. V.9. P.307-314.
16. Ebmeier R.J., Whitney S.E., Sarkar A., Nelson M., Padhye N.V., Gogos G., Viljoen H.J. Ranque-Hilsch vortex tube thermocycler for fast DNA amplification and real-time optical detection // Rev. Sci. Instrum. 2004. V.75. P.5356-5359.
17. Elenitoba-Johnson O., David D., Crews N., Wittwer C.T. Plastic versus glass capillaries for

- rapid-cycle PCR // *Biotechniques*. 2008. V.44. P.487-8, 490, 492.
18. Fawcett A., Reed M.T. Gas thermal cycler // US Patent No. 7,670,834. Mar. 2, 2010.
 19. Fermér C., Nilsson P., Larhed M. Microwave-assisted high-speed PCR // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003. V.18. P.129-132.
 20. Foulkes N.S., Pandolfi de Rinaldis P.P., Macdonnell J., Cross N.C.P., Luzzatto L. Polymerase chain reaction automated at low cost // *Nucl. Acids Res.* 1988. V.16. P.5687-5688.
 21. Frean J. Thermal cycler from recycled printer // *The Lancet*. 1996. V.348. P.126.
 22. Goldmeyer J., Kong H., Tang W. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection // *J. Mol. Diagn.* 2007. V.9. P.639-644.
 23. Gullksen A., Solli L., Karlsen F., Rogne H., Hovig E., Nordstrom T., Sirevag R. Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes // *Anal. Chem.* 2004. V.76. P.9-14.
 24. Heap D.M., Herrmann M.G., Wittwer C.T. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring // *Biotechniques*. 2000. V.29. P.1006-1012.
 25. Herold K.E., Sergeev N., Matviyenko A., Rasooly A. Rapid DNA amplification using a battery-powered thin-film resistive thermocycler // *Methods Mol. Biol.* 2009. V.504. P.441-458.
 26. Hilsch R. The use of the expansion of gases in a centrifugal field as cooling process // *Rev. Sci. Instrum.* 1947. V.18. P. 108–113. (цит. по Ebmeier R.J., Whitney S.E., Sarkar A., Nelson M., Padhye N.V., Gogos G., Viljoen H.J. Ranque-Hilsch vortex tube thermocycler for fast DNA amplification and real-time optical detection // *Rev. Sci. Instrum.* 2004. V.75. P.5356-5359.)
 27. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J., Bright I.J., Lucero M.Y., Hiddessen A.L., Legler T.C., Kitano T.K., Hodel M.R., Petersen J.F., Wyatt P.W., Steenblock E.R., Shah P.H., Bousse L.J., Troup C.B., Mellen J.C., Wittmann D.K., Erndt N.G., Cauley T.H., Koehler R.T., So A.P., Dube S., Rose K.A., Montesclaros L., Wang S., Stumbo D.P., Hodges S.P., Romine S., Milanovich F.P., White H.E., Regan J.F., Karlin-Neumann G.A., Hindson C.M., Saxonov S., Colston B.W. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number // *Anal. Chem.* 2011. V.83. P.8604-8610.
 28. Hoffman L.M., Hundt H. Use of a gas chromatograph oven for DNA amplification by the polymerase chain reaction // *Biotechniques*. 1988. V.6. P.932, 934-936.
 29. Kim H., Dixit S., Green C.J., Faris G.W. Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating // *Opt. Express*. 2009. V.17. P.218-227.
 30. Kim Y.H., Yang I., Bae Y.S., Park S.R. Performance evaluation of thermal cyclers for PCR in a rapid cycling condition // *Biotechniques*. 2008. V.44. P.495-496, 498, 500 passim.
 31. Kopp M.U., Mello A.J., Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip // *Science*. 1998. V.280. P.1046-1048.
 32. Krishnan M., Ugaz V.M., Burns M.A. PCR in a Rayleigh-Benard convection cell // *Science*. 2002. V.298. P.793.
 33. Liu J., Enzelberger M., Quake S. A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction // *Electrophoresis*. 2002. V.23. P.1531-1536.
 34. Mahjoob S., Vafai K., Beer N.R. Rapid microfluidic thermal cycler for polymerase chain reaction nucleic acid amplification // *Int. J. Heat Mass Transf.* 2008. V.51. P.2109-2122.
 35. Maltezos G., Johnston M., Taganov K., Srichantaratsamee C., Gorman J., Baltimore D., Chantratita W., Scherer A. Exploring the limits of ultrafast polymerase chain reaction using liquid for thermal heat exchange: A proof of principle // *Appl. Phys. Lett.* 2010. V.97. 264101.
 36. Marcus J.S., Anderson W.F., Quake S.R. Parallel picoliter rt-PCR assays using microfluidics. *Anal. Chem.* 2006. V.78. P.956-958.
 37. McLeod A. A comparison of thermocycling devices for automating the polymerase chain reaction // *J. Med. Eng. Technol.* 1990. V.14. P.60-68.
 38. Moore P. Replicating success // *Nature*. 2005. V. 435. P.235-238.
 39. Nagai H., Murakami Y., Morita Y., Yokoyama K., Tamiya E. Development of a microchamber array for picoliter PCR // *Anal. Chem.* 2001. V.73. P.1043-1047.
 40. Nakano H., Matsuda K., Yohda M., Nagamune T., Endo I., Yamane T. High speed polymerase chain reaction in constant flow // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994. V.58. P.349-352.
 41. Oste C.C. PCR instrumentation: where do we stand? // *The Polymerase chain reaction*

- (Mullis K.K.B., Ferre F., Gibbs R.A. - Eds.) 1994. Birkhauser. Boston-Basel-Berlin. P.165-173.
42. Park N., Kim S., Hahn J.H. Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction // *Anal. Chem.* 2003. V.75. P.6029-6033.
 43. Quintanar A., Nelson R.M. High speed process and apparatus for amplifying DNA // US Patent No. 6,472,186. Oct. 29, 2002.
 44. Radu A. A simple polymerase chain reaction apparatus based on a computer printer // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1991. V.23. P.275-282.
 45. Roberts D.R., Bickmore W.D., Jr., Hummel J.S. Rapid thermocycler with movable cooling assembly // US Patent No. 7,939,312. May 10, 2011.
 46. Rollo F., Amici A., Salvi R. A simple and low cost DNA amplifier // *Nucl. Acids Res.* 1988. V.16. P.3105-3106.
 47. Sasaki N., Izawa M., Shimojo M., Shibata K., Akiyama J-i., Itoh M., Nagaoka S., Carninchi P., Okazaki Y., Moriuchi T., Muramatsu M., Watanabe S., Hayashizaki Y. A novel control system for polymerase chain reaction using a RIKEN GS384 thermocycler // *DNA Res.* 1997. V.4. P.387-391.
 48. Schoder D., Schmalwieser A., Schauburger G., Hoorfar J., Kuhn M., Wagner M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V.43. P.2724-2728.
 49. Schoder D., Schmalwieser A., Schauburger G., Kuhn M., Hoorfar J., Wagner M. Physical characteristics of six new thermocyclers // *Clin. Chem.* 2003. V.49. P.960-963.
 50. Shen F., Du W., Davydova E.K., Karymov M.A., Pandey J., Ismagilov R.F. Nanoliter multiplex PCR arrays on a SlipChip // *Anal. Chem.* 2010. V.82. P.4606-4612.
 51. Sobczak K., Kozłowski P., Krzyzosiak W.J. Faster and cheaper PCR on a standard thermocycler // *Acta Biochim. Pol.* 1995. V.42. P.363-366.
 52. Torgersen H., Blaas D., Skern T. Low cost apparatus for primer-directed DNA amplification using *Thermus aquaticus*-DNA polymerase // *Anal. Biochem.* 1989. V.176. P.33-35.
 53. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification // *EMBO Reports.* - 2004. - V.5. - P. 795-800.
 54. Weier H.U., Gray J.W. A programmable system to perform the polymerase chain reaction // *DNA.* 1988. V.7. P.441-447.
 55. Wheeler E.K., Hara C.A., Frank J., Deotte J., Hall S.B., Benett W., Spadaccini C., Beer N.R. Under-three minute PCR: probing the limits of fast amplification // *Analyst.* 2011. V.136. P.3707-3712.
 56. Whitney S.E. Analysis of rapid thermocycling for the polymerase chain reaction // Ph. Diss. May, 2004. Lincoln, Nebraska.
 57. Wittbrodt J., Erhardt W. An inexpensive and versatile computer-controlled PCR machine using a Peltier Element as a thermoelectric heat pump // *Trends Genet.* 1989. V.5. P.202-203.
 58. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Garling D.J. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples // *Anal. Biochem.* 1990. V.186. P.328-331.
 59. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Hillyard D.R. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air // *Nucleic Acids Res.* 1989. V.17. P.4353-4357.
 60. Wittwer C.T., Hillyard D.R., Ririe K.M. Rapid thermal cycling device // US Patent No. 5,455,175. Oct. 3, 1995.
 61. Wittwer C.T., Reed G.B., Ririe K.M. Rapid cycle DNA amplification // *The Polymerase chain reaction* (Mullis K.K.B., Ferre F., Gibbs R.A. - Eds.) 1994. Birkhauser. Boston-Basel-Berlin. P.174-181.

VARIATIONS OF MACHINES FOR POLYMERASE CHAIN REACTION

Chemeris A.V., Magdanov E.G., Vakhitov V.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, chemeris@anrb.ru

Resume

Different approaches for temperature changes in reaction blocks/cameras of DNA thermal cyclers during fulfillment of conventional (non microfluid) PCR and their evolutionary development are described. Isothermal variants of PCR are briefly elucidated and their perspectives are discussed.

Keywords: PCR, DNA thermal cycler, Peltier elements