



УДК 577.113.088

**БЫСТРАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК В МИНИАТЮРНЫХ,
СВЕРХТОНКОСТЕННЫХ МИКРОПЛАТАХ**© 1997 г. А. Н. Третьяков[#], Р. А. Пантина, О. К. Кабоев*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН, 188350, Гатчина*

Поступило в редакцию 22.11.96 г. Принято к печати 03.03.97 г.

Разработан новый метод быстрой амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции в миниатюрных, сверхтонкостенных микроплатах, формируемых непосредственно на термоблоке термоциклера. Микроплаты изготавливаются из тонкой (40–60 мкм) полипропиленовой пленки методом термического вакуум-формования. Благодаря эффективному переносу тепла к образцам объемом 10–15 мкл и высокой скорости нагрева и охлаждения термоблока (до 7°C/с) время, необходимое для амплификации ДНК в течение 30 циклов, составляет 15–30 мин.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, быстрая амплификация ДНК, микроплата.

Центральным моментом при амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1, 2] является циклическая инкубация реакционной смеси с последовательной сменой температур, оптимальных для синтеза фрагментов ДНК, плавления синтезированных продуктов и отжига праймеров. Применяя специальную технику амплификации ДНК в режиме “быстрых циклов” [3, 4], можно в 5–10 раз сократить время ПЦР, а также увеличить ее специфичность и чувствительность по сравнению со стандартной процедурой [5–7].

В настоящем сообщении описывается новый метод быстрой амплификации ДНК в миниатюрных, сверхтонкостенных микроплатах, формируемых на термоблоке высокоскоростного термоциклера [4] из термопластичных пленок (рис. 1). Тонкая (40–60 мкм) полипропиленовая пленка закрепляется с помощью прямоугольной рамки с резиновой прокладкой на термоблоке термоциклера, нагревается до температуры размягчения (145°C) и формуется за счет создания разряжения порядка 0.8 атм в полости между пленкой и поверхностью термоблока. Сформованные таким образом микроплаты в 5–10 раз тоньше специальной тонкостенной пробирки для ПЦР объемом 0.5 мл. Для полипропилена характерна низкая адгезия к металлам, поэтому микроплата при формировании не прилипает к термоблоку. Специальные “ребра жесткости” по периметру микроплаты предотвращают ее изгибание во время заполнения и забора образцов. Миниатюрная мик-

роплата содержит 96 лунок объемом 30 мкл каждая и имеет размеры 40 × 60 мм, что в 4 раза меньше, чем у стандартной платы с тем же числом лунок. Расстояние между лунками составляет 4.5 мм. Это позволяет использовать стандартную многоканальную пипетку при заполнении образцов. Во время проведения ПЦР микроплата плотно прижимается к поверхности термоблока с помощью создаваемого разряжения, что обеспечивает эффективный перенос тепла от термоблока к реакционной смеси объемом 10–15 мкл. Для предотвращения испарения образцов во время ПЦР микроплата с образцами, установленная на термоблоке, покрывается герметизирующей пленкой (Microseal ‘A’ Film, MJ Research, Inc., США), которая прижимается к термоблоку подогреваемой до 75°C крышкой. (Возможен и стандартный метод герметизации с помощью минерального масла.)

На рис. 2 представлены результаты амплификации фрагментов ДНК вирусов HIV-1 (вирус иммунодефицита человека), HPV-18 (вирус папилломы человека) и локуса *ApoB* человека в течение 30 циклов за 20 мин. ПЦР проводили на праймерных системах, описанных ранее [8–10]. В качестве матриц использовали плазмиду, содержащую кДНК HIV-1 (для амплификации фрагмента ДНК HIV-1), и ДНК из клеток HeLa (для HPV-18 и *ApoB*). Состав реакционной смеси (15 мкл): 67 мМ трис-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 7 мМ MgCl₂, 0.01% Tween 20, 0.25 мМ dNTP (каждый), 0.3 мМ каждый праймер. В смесь добавляли 2.5 ед. Taq-ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва), 1 пг плазмидной ДНК или 50 нг ДНК клеток HeLa.

[#] Автор для переписки (тел.: (812-71) 4-64-97; факс: (812-71) 3-23-03; e-mail: tretjakov@omrb.pnpi.spb.ru).

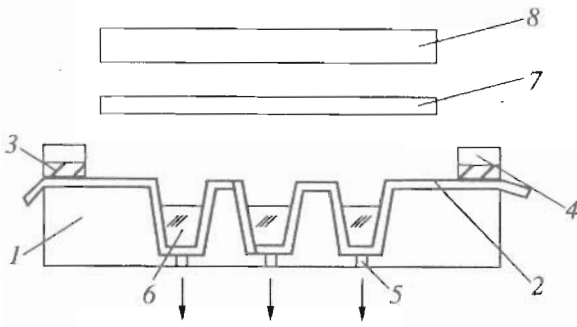


Рис. 1. Схема формирования тонкостенной микроплаты для ПЦР: 1 - термоблок, 2 - полипропиленовая пленка, 3 - резиновая прокладка, 4 - прямоугольная рамка, 5 - отверстие для подключения к вакууму, 6 - реакционная смесь, 7 - герметизирующая пленка, 8 - подогреваемая крышка.

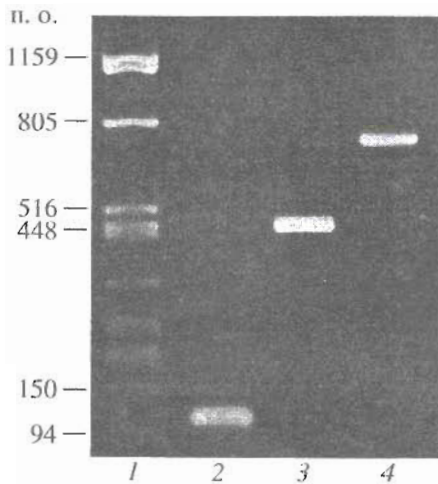


Рис. 2. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК HIV-1 (2), HPV-18 (3) и локуса *AroB* (4). 1 - маркер (ДНК фага λ , расщепленная *Pst*I), указаны длины стандартов. Условия амплификации ДНК: 93°C - 30 с; последующие 30 циклов: синтез - 70°C, 15 с; плавление - 93°C, 5 с; отжиг - 52°C, 3 с. Электрофорез вели в 1.7% агарозном геле в 0.08 M триборатном буфере, содержащем 1 mM EDTA и 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

жиге быстрых циклов не вызывали образования неспецифических продуктов в широком диапазоне температур отжига (данные не приведены). Это упрощает подбор условий для одновременного проведения ПЦР с разными системами праймеров.

В отличие от методов, разработанных ранее [3, 4], предлагаемый метод позволяет упростить и автоматизировать процесс заполнения миниатюрной, 96-луночной микроплаты образцами с помощью стандартной многоканальной пипетки. Разработанная техника быстрой амплификации ДНК может быть использована для решения задач, связанных с широкомасштабным применением ПЦР (секвенирование и картирование геномов, массовый ПЦР-скрининг патогенов и др.). Теоретически она позволяет проводить более 1500 реакций за 8-часовой рабочий день.

Авторы благодарят А.В. Иванова за техническую помощь в изготовлении термоциклера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mullis K.B., Faloona F.A. // *Methods Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335-350.
2. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scarf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. // *Science.* 1988. V. 239. P. 487-491.
3. Wittwer C.T., Fillmore G.C., Garling D.J. // *Anal. Biochem.* 1990. V. 186. P. 328-331.
4. Tretyakov A.N., Gelfand V.M., Pantina R.A., Shevtsov S.P., Bulat S.A. // *Mol. Biol. (Engl. Tr.).* 1994. V. 28. P. 441-443.
5. Wittwer C.T., Garling D.J. // *BioTechniques.* 1991. V. 10. P. 76-83.
6. Tan S.S., Weis J.H. // *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2. P. 137-143.
7. Honda J., Hoshino T., Natori H., Tokisawa S., Akiyoshi H., Nakahara S., Oizumi K. // *Br. J. Haematol.* 1994. V. 86. P. 138-142.
8. Ou C.Y., Kwok S., Mitchell S.W., Mack D.H., Sninsky J.J., Krebs J.W., Feorino P., Warfield D., Schochetman G. // *Science.* 1988. V. 239. P. 295-297.
9. Schiffman M.H., Bauer H.M., Lorincz A.T., Manos M.M., Byrne J.C., Glass A.G., Cadell D.M., Howley P.M. // *J. Clin. Microbiol.* 1991. V. 29. P. 573-577.
10. Boerwinkle E., Lee S.S., Butler R., Schumaker V.N., Chan L. // *Atherosclerosis.* 1990. V. 81. P. 225-232.

Fast DNA Amplification in Tiny Ultrathin Microplates

A. N. Tretyakov, R. A. Pantina, and O. K. Kaboev

Konstantinov Petersburg Institute for Nuclear Physics, Russian Academy of Sciences, 188350 Gatchina

Received November 22, 1996; in final form, March 03, 1997

Abstract—A new method was developed for fast DNA amplification by polymerase chain reaction in tiny ultrathin microplates formed directly on the thermocycler's thermoblock. The microplates are made from thin (40–60 μm) polypropylene film by the thermal vacuum-formation method. Due to the effective heat transfer to 10–15 μl samples and a high velocity of heating and cooling of the thermoblock (up to 7°C/s), the total duration of the DNA amplification (30 cycles) is only 15–30 min.

Key words: polymerase chain reaction, fast DNA amplification, microplate.

Сдано в набор 05.03.97 г.

Офсетная печать

Усл. печ. л. 12.5

Тираж 357 экз.

Подписано к печати 13.05.97 г.

Усл. кр.-отт. 3.9 тыс.

Зак. 1719

Формат бумаги $60 \times 88^{1/8}$

Уч.-изд. л. 10.8

Бум. л. 6.0