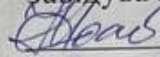


**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

« 2 » червня 2026 р.

**Дипломна робота
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Біоінформатична розробка та валідація системи мультиплексного
синтезу бібліотеки генів за допомогою ПЛР»**

Виконав:

студент IV курсу, групи ББ-21

Строганов Олексій Олексійович

Керівник:

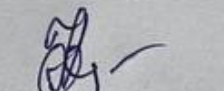
к.т.н., ст. викладач,

Левтун Ігор Ігорович

Рецензент:

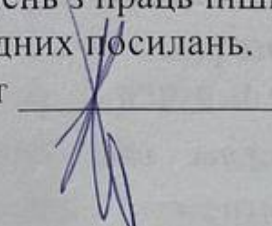
к.т.н., доцент,

Клечак Інна Рішардівна

Засвідчую, що у цій дипломній роботі немає
запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Студент



Київ - 2026 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти - перший (бакалаврський)

Спеціальність - 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор з досліджень та розробки

ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ»

Наталія ЛІТВИНЕНКО

«13» травня 2026р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Наталія ГОЛУБ

«14» травня 2026р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

Строганову Олексію Олексійовичу

1. Тема роботи «Біоінформатична розробка та валідація системи мультиплексного синтезу бібліотеки генів за допомогою ПЛР», керівник роботи Левтун Ігор Ігорович, к.т.н., ст. викладач, затверджені наказом по університету від «27» травня 2026р. №1941с

2. Термін подання студентом роботи 4.06.2026

3. Вихідні дані до роботи: модифікований протокол мультиплексного синтезу генів DropSynth 2.0 (Plesa et al., 2018; Sidore et al., 2020) як технологія-прототип; мікрофлюїдична платформа Fluigent Drop-Seq з пневматичним керуванням тиском, регуляторами витрати Flow Unit (FU-M, FU-L) та одноразовими PDMS-чипами Drop-Seq у конфігурації лабораторії ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ»; два тестові 5'UTR-конструкти А (iHRV-A57) і В (iHRV-B14) завдовжки ≈ 700 пн, що збираються з олігонуклеотидних фрагментів; реагентна база на основі ДНК-полімерази Q5 Hot Start HiFi, ферментів Type-IIS BtsI-v2 і ніказа Nt.BspQ1 (NEB), добавок Pluronic F-68 і BSA, олії HFE-7500 із сурфактантом PFPE-PEG та штрихкоданих бусин Dynabeads M-270 Streptavidin (набори BRD1, BRD2); лабораторне обладнання (термоциклер Applied Biosystems ProFlex, флуориметр

Qubit 4, мікроскоп EVOS FL Auto 2, камера Basler ace, системи електрофорезу AGE/PAGE); середовище розробки відкритого програмного інструментарію мовою Python; чинні нормативи з охорони праці (НПАОП, ДСанПіН).

4. Зміст роботи: робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, переліку використаних джерел і додатків.

У першому, аналітичному розділі оглянуто сучасний стан масштабованого синтезу генних бібліотек, методи хімічного синтезу олігонуклеотидів і ферментативної збірки повнорозмірних конструктів, обґрунтовано вибір олігонуклеотидних бібліотек на мікрочипах (OLS) як джерела фрагментів і технології DropSynth із краплинною емульсійною ПЛР як методу паралельної ізольованої збірки, а також охарактеризовано краплинну мікрофлюїдику та засоби *in silico* проектування бібліотек.

Другий розділ описує реагенти, обладнання, програмний інструментарій і молекулярно-біологічні процедури, застосовані для валідації модифікованого протоколу DropSynth 2.0 на платформі Fluidigm Drop-Seq, разом із методиками калібрування мікрофлюїдної системи та статистичного аналізу розподілу крапель.

У третьому розділі наведено результати дослідження: характеристику компонентів системи, валідацію мікрофлюїдної платформи, порівняння розробленої водної фази MDSMM з комерційною сумішшю ddPCR Supermix і валідацію повного протоколу DropSynth на двох тестових конструктах А і В, а також розроблений і опублікований у відкритому доступі програмний інструментарій (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy).

Четвертий розділ присвячено охороні праці та довіллю - аналізу небезпечних і шкідливих виробничих факторів, вимогам безпеки та заходам з утилізації відходів і екологічної безпеки.

Додатки Б, В та Д містять перелік реагентів, лабораторні протоколи та документацію програмного забезпечення.

5. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо): презентація

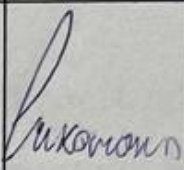
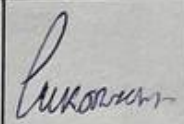
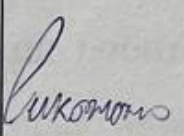
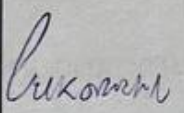
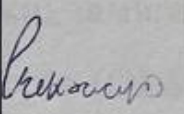
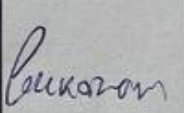
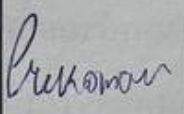
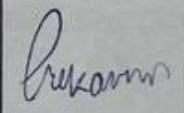
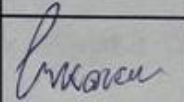
6. Консультанти розділів роботи¹

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
	Немає		
	Немає		

7. Дата видачі завдання 14.04.2026

¹ Якщо визначені консультанти. Консультантом не може бути зазначено керівника дипломної роботи.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Пошук і аналіз літератури; огляд сучасного стану масштабованого синтезу генних бібліотек та обґрунтування вибору технології (Розділ 1)	14.04-18.04.2026	
2	Аналіз небезпечних і шкідливих факторів; охорона праці та довкілля (Розділ 4)	19.04-24.04.2026	
3	Опанування методик, підготовка реагентів і обладнання; опис матеріалів і методів дослідження (Розділ 2)	25.04-29.04.2026	
4	Калібрування Flow Units і налаштування мікрофлюїдної платформи Fluidigm Drop-Seq	30.04-06.05.2026	
5	Розробка та публікація у відкритому доступі програмного інструментарію (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy)	07.05-14.05.2026	
6	Розробка й оптимізація складу водної фази MDSMM; порівняння з комерційною сумішшю ddPCR Supermix	15.05-21.05.2026	
7	Валідація повного модифікованого протоколу DropSynth 2.0; збірка тестових конструктів A і B	22.05-26.05.2026	
8	Оформлення пояснювальної записки, формулювання висновків	27.05-31.05.2026	
9	Підготовка презентації та подання роботи до захисту	01.06-04.06.2026	

Студент

Керівник


(підпис)

Олексій СТРОГАНОВ


(підпис)

Ігор ЛЕВТУН

РЕФЕРАТ

Дипломна робота містить 75 сторінок основного тексту, 16 рисунків, 10 таблиць, 3 додатки, 48 джерел літератури.

Бібліотеки генетичних конструктів відкривають величезні можливості для вдосконалення генетичних конструктів, розробки персональної медицини, та метаболічної інженерії, але їхній синтез є складним та тривалим завданням.

Основними причинами цього є технічні обмеження синтезу олігонуклеотидів, точність послідовностей яких суттєво падає після 300 нт, а також багатостадійність і тривалість збирання генетичних конструктів, що робить побудову бібліотек з 1000 та більше конструктів довжинами від 1000 пн практично недосяжним завданням для багатьох дослідників та інституцій.

Рішенням може бути застосування систем мультиплексного синтезу, зокрема технології DropSynth, які дозволяють паралельно синтезувати до 1536 конструктів значно більшої довжини (до 1500 пн), за одну ітерацію, що займає тижні замість місяців. Принцип полягає у поєднанні синтезу олігонуклеотидних наборів (OLS) та емульсійної ПЛР типу подовження та перекриття, що дозволяє використовувати краплі як мікрореактори, в яких окремо збираються повноцінні конструкти.

У цій роботі описано весь технологічний процес розробки та відтворення технології DropSynth, проведеного у відділенні розробки біотехнологічних продуктів ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ», з використанням нового підходу до формування крапель на основі системи мікрофлюїдики Fluigent Drop-Seq, яка має високу точність та відтворюваність порівняно з іншими підходами.

Результатом роботи є оптимізована суміш для формування крапель, збірка та аналіз двох 5'UTR-конструктів довжиною 700 пн з 3 олігонуклеотидів довжиною 300 нт для кожного конструкту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: МУЛЬТИПЛЕКСНИЙ СИНТЕЗ ДНК, ePCR, DROPSYNTH 2.0, МІКРОФЛЮЇДИКА, FLUIGENT DROP-SEQ, ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ»

ABSTRACT

The thesis comprises 75 pages of main text, 16 figures, 10 tables, 3 appendices, and 48 references.

Gene libraries offer enormous opportunities for engineering novel genetic constructs, developing personalized medicine, and metabolic engineering, yet their synthesis remains a complex and time-consuming task. The reasons are the technical limitations of oligonucleotide synthesis, whose sequence accuracy falls sharply beyond 300 bp, and the multi-step, lengthy assembly of gene constructs—together rendering libraries of a thousand or more constructs longer than 1000 bp practically unattainable for many researchers and institutions.

A solution lies in multiplexed synthesis systems, notably DropSynth, which can synthesize up to 1536 much longer constructs (up to 1500 nt) in parallel within a single iteration that takes weeks rather than months. The approach combines oligonucleotide library synthesis (OLS) with overlap-extension emulsion PCR, using droplets as microreactors in which full-length constructs are assembled individually.

This work describes the full workflow for developing and reproducing the DropSynth technology at the Biotechnology Product Development Department of YURiA-PHARM LLC, employing a novel droplet-formulation approach based on the Fluigent Drop-Seq microfluidic system, which offers higher precision and reproducibility than alternative methods.

The work delivers an optimized droplet-formulation mixture, along with the assembly and analysis of two 5'UTR gene constructs, each 700 bp long, built from three 300 nt oligonucleotides per construct.

KEYWORDS: MULTIPLEXED DNA SYNTHESIS, ePCR, DROPSYNTH 2.0, MICROFLUIDICS, FLUIGENT DROP-SEQ, YURiA-PHARM LLC

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота.

пн - пара нуклеотидних основ, одиниця довжини дволанцюгової ДНК (англ. bp).

нт - нуклеотид, одиниця довжини одностанцюгової ДНК (англ. nt).

тпн - тисяча нуклеотидних пар, одиниця довжини дволанцюгової ДНК (англ. kb).

5' UTR - 5' Untranslated Region - некодована послідовність ДНК на 5' кінці

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція (англ. PCR).

oePCR - overlap-extension PCR - ПЛР з перекриванням і подовженням фрагментів.

W/O - water-in-oil - емульсія типу «вода-в-олії».

ePCR - emulsion PCR - емульсійна ПЛР у краплях W/O-емульсії.

Suppression PCR - супресорна ПЛР зі специфічним hairpin-збагаченням.

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid - етилендіамінтетраоцтова кислота.

BSA - bovine serum albumin - бичачий сироватковий альбумін.

EtBr - ethidium bromide - бромід етидію, ДНК-фарба.

PFO - 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol - реагент руйнування W/O-емульсії.

PEG - polyethylene glycol - поліетиленгліколь.

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine - каталізатор полімеризації акриламиду.

APS - ammonium persulfate - ініціатор полімеризації акриламиду.

Pluronic F-68 - амфифільний триблок-кополімер, неіонний сурфактант.

IPA - isopropyl alcohol - ізопропанол.

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethane - буферний агент.

PDMS - polydimethylsiloxane - полідиметилсилоксан, матеріал мікрофлюїдних чипів.

FU - Flow Unit (Fluigent) - термальний сенсор-регулятор витрати.

HFE-7500 - гідрофторетерова олія, неперервна фаза для W/O-емульсій.

PFPE-PEG - perfluoropolyether-polyethylene glycol - фторований сурфактант W/O-емульсій.

Flow-focusing - геометрія утворення крапель з симетричним фокусуванням неперервної фази.

Dripping / Jetting - крапельний і струменевий режими витікання дисперсної фази.

DropSynth - технологія мультиплексного синтезу ДНК-конструктів у краплинній емульсії (Sidore *et al.*, 2020).

MDSMM - Modified DropSynth Master Mix - модифікована водна фаза для утворення крапель.

BRD1, BRD2 - Barcoded Bead set 1 / 2 - набори штрихкодovаних магнітних бусин.

ITR - inverted terminal repeat - інвертований кінцевий повтор, формує hairpin у супресорній ПЛР.

cp12mer - circular permutation 12-mer - циркулярна пермутація 12-мера, штрихкод-послідовність.

Nt.BspQI - Type-IIS-фермент одноланцюгового розриву (ніказа) (NEB).

BtsI-v2 - термостабільна Type-IIS-рестриктаза (NEB).

M-270 - Dynabeads M-270 Streptavidin - парамагнітні бусини діаметром 2,8 мкм.

AGE - agarose gel electrophoresis - агарозний гель-електрофорез.

PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis - поліакриламідний гель-електрофорез.

TBE - Tris-borate-EDTA buffer - трис-боратний буфер для електрофорезу.

SPRI - solid-phase reversible immobilization - селективна іммобілізація на парамагнітних бусинах.

B&W - Bind & Wash - буфер зв'язування і промивання стрептавідин-бусин.

NGS - next-generation sequencing - секвенування нового покоління.

OLS - oligonucleotide library synthesis - синтез олігонуклеотидних бібліотек на мікрочипах.

JSON - JavaScript Object Notation - формат структурованих даних.

NEB - New England Biolabs (постачальник ферментів і реагентів).

IDT - Integrated DNA Technologies (постачальник синтезованих олігонуклеотидів).

ЗМІСТ

ВСТУП.....	12
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН МАСШТАБОВАНОГО СИНТЕЗУ ГЕННИХ БІБЛІОТЕК ТА ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЇ.....	16
1.1 Проблематика синтезу бібліотек генів.....	16
1.2 Огляд сучасних методів синтезу генів de novo.....	17
1.2.1 Фосфорамідитний синтез олігонуклеотидів.....	18
1.2.2 Методи збирання повнорозмірних конструктів з фрагментів.....	18
1.2.3 OLS на мікрочипах: масштабна хімія.....	20
1.2.4 Корекція помилок.....	20
1.2.5 Сучасний ринок комерційних послуг.....	21
1.3 Технологія DropSynth.....	21
1.3.1 Концепція.....	22
1.3.2 Еволюція технології.....	25
1.3.3 Продуктивність та обмеження DropSynth 2.0.....	26
1.3.4 Економіка DropSynth-платформи.....	27
1.4 Краплинна мікрофлюїдика для біологічних застосунків.....	28
1.4.1 Безрозмірні числа й режими утворення крапель.....	29
1.4.2 Чип-геометрії генераторів крапель.....	30
1.4.3 W/O-емульсії та сурфактанти для ПЛР-сумісних протоколів.....	31
1.4.4 Біотехнологічні застосунки.....	33
1.4.5 Керування потоком у мікрофлюїдиці.....	34
1.4.6 Комерційні платформи краплинної мікрофлюїдики.....	35
1.5 In silico проєктування бібліотек.....	36
1.5.1 Алгоритми дизайну олігонуклеотидів.....	36
1.5.2 Сучасні програмні інструменти.....	37
1.5.3 In silico верифікація конструктів.....	38
1.5.4 Застосування in silico процесів.....	39
Висновки до розділу 1.....	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	42
2.1 Реагенти.....	42
2.1.1 Олігонуклеотиди.....	42
2.1.2 Ферменти і реакційні буфери.....	43
2.1.3 Реагенти емульсії.....	44
2.1.4 Реагенти електрофорезу і PAGE.....	45
2.1.5 Бусини і допоміжні реагенти.....	46

2.2 Обладнання.....	47
2.2.1 Загальнолабораторне обладнання.....	47
2.2.2 Мікрофлюїдична система Fluigent Drop-Seq.....	48
2.3 Програмний інструментарій.....	50
2.4 Молекулярно-біологічні процедури.....	50
2.4.1 Q5-ампліфікація фрагментів.....	51
2.4.2 Рестрикційний аналіз.....	52
2.4.3 Підготовка штрихкодovаних бусин і їх підрахунок.....	52
2.4.4 Емульсійна ПЛР (DropSynth V2).....	54
2.4.5 Супресорна ПЛР.....	55
2.4.6 Очищення ДНК.....	57
2.4.7 Гель-електрофорез і PAGE.....	57
2.5 Налаштування мікрофлюїдної платформи.....	58
2.5.1 Калібрування Flow Units.....	58
2.5.2 Робочий режим утворення крапель.....	59
2.5.3 Дизайн завантаження штрихкодovаних бусин за Пуассоном.....	59
2.6 Статистичний аналіз.....	60
Висновки до розділу 2.....	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	62
3.1 Характеристика компонентів системи.....	62
3.2 Валідація мікрофлюїдної платформи.....	65
3.3 Порівняння MDSMM та ddPCR Supermix.....	66
3.4 Валідація повного протоколу DropSynth.....	69
3.4.1 Параметри запуску.....	69
3.4.2 Збірка конструктів А та В.....	70
3.4.3 Інтегральне обговорення.....	71
3.5 Програмне забезпечення.....	73
3.5.1 DropDrop.....	73
3.5.2 DropleGEN.....	74
3.5.3 PylonGuy.....	76
Висновки до розділу 3.....	77
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ.....	79
4.1 Загальні положення.....	79
4.2 Аналіз небезпечних і шкідливих виробничих факторів.....	79
4.3 Вимоги безпеки перед початком роботи.....	80
4.4 Вимоги безпеки під час роботи.....	81
4.5 Вимоги охорони праці при користуванні хімічним посудом і обладнанням.....	82

4.6 Робота за персональним комп'ютером.....	82
4.7 Вимоги безпеки після закінчення роботи.....	82
4.8 Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях.....	83
4.9 Утилізація відходів та екологічна безпека.....	84
Висновки до розділу 4.....	85
ВИСНОВКИ.....	86
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	87
ДОДАТКИ.....	92
ДОДАТОК Б. Реагенти.....	92
ДОДАТОК В. Протоколи.....	98
ДОДАТОК Д. Програмне забезпечення.....	102

ВСТУП

Проблема масштабованого синтезу синтетичних ДНК-конструктів активно вирішується протягом останнього десятиліття. Провідні комерційні постачальники синтезу генів (Twist Bioscience, Integrated DNA Technologies (IDT), GenScript) забезпечують одиничний синтез з помірною точністю, але висока вартість та значний цикл виготовлення обмежують охоплення бібліотек для відбору. Альтернативний підхід - олігонуклеотидні бібліотеки на мікрочипах (OLS, oligonucleotide library synthesis, реалізації Agilent SurePrint, Twist OLS) - забезпечує синтез до 10^4 - 10^6 варіантів за чип, але є дорогим для академічних та промислових лабораторій без власного OLS-обладнання. Серед академічних розробок останніх років виділяється технологія DropSynth, опублікована науковою групою Sriram Kosuri (UCLA), що поєднує OLS-вхід з паралельною емульсійною збіркою на штрихкодovаних магнітних бусинах (Plesa *et al.*, 2018, Science; Sidore *et al.*, 2020, Nucleic Acids Research). Розв'язане завдання - паралельна збірка тисяч різних генів в одній реакції. Невирішені аспекти включають оптимізацію хімії водної фази для роботи у різних мікрофлюїдних платформах та запобігання передчасній активності рестриктаз під час підготовки реагентів [1].

Актуальність теми:

Сучасна біотехнологія потребує дедалі більших колекцій синтетичних ДНК-конструктів - від тисяч варіантів для відбору ферментів і антитіл до десятків тисяч послідовностей для глибокого мутаційного сканування (deep mutational scanning) та метаболічної інженерії. Поєднання OLS-синтезу олігонуклеотидних наборів і DropSynth-збірки дає можливість скоротити витрати та час синтезу генетичних конструктів за вартістю 1-2 USD на ген і часом виконання у 1-2 тижні. Технологія відкриває можливість для високопропускних експериментів, які за класичним підходом потребували б місяців і сотень тисяч доларів [2].

Особливою перевагою методу є потенційне застосування в академічних і середніх R&D-лабораторіях, де високовартісний комерційний синтез не

вписується у поточні бюджети, а потреба у масових бібліотеках продовжує зростати [3].

Мета роботи:

Метою дослідження є розробка платформи для відтворення та оптимізації модифікованої технології DropSynth 2.0 з системою мікрофлюїдики Fluigent Drop-Seq, на прикладі двох 5'UTR-конструктів довжиною 700 пн.

Об'єкт дослідження:

Технологічний процес мультиплексного синтезу ДНК-конструктів у крапельній емульсії типу «вода-в-олії», сформованій у мікрофлюїдному чипі Drop-Seq, з подальшою ePCR-збіркою повнорозмірних конструктів за модифікованим протоколом DropSynth 2.0.

Предмет дослідження:

Оптимізовані параметри ePCR-збірки у краплях (склад водної фази, фазове співвідношення між олією та водою, режим генерації крапель); стратегія завантаження реагентів у мікрофлюїдний чип для запобігання передчасній рестрикції ДНК на штрихкодovаних бусинах; продуктивність системи Fluigent Drop-Seq у конфігурації у лабораторії ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ».

Завдання дослідження:

1. Дослідити сучасний стан проблеми масштабованого синтезу генних бібліотек: розглянути методи хімічного синтезу олігонуклеотидів і ферментативної збірки повнорозмірних конструктів, обґрунтувати вибір олігонуклеотидних бібліотек на мікрочипах (OLS) як джерела фрагментів, технології DropSynth як методу паралельної ізольованої збірки та краплинної емульсійної ПЛР як засобу компартменталізації шляхом порівняння з альтернативними підходами; охарактеризувати краплинну мікрофлюїдику та засоби *in silico* проєктування бібліотек.
2. Описати реагенти, обладнання, програмний інструментарій і молекулярно-біологічні процедури, застосовані для валідації модифікованого протоколу DropSynth 2.0 на платформі Fluigent Drop-Seq, а також методики калібрування мікрофлюїдної системи і статистичного аналізу розподілу крапель.

3. Виконати валідацію модифікованого протоколу DropSynth 2.0 з оптимізованим складом водної фази (MDSMM) і триканальною схемою завантаження чипа: підготувати олігонуклеотидні фрагменти та штрихковані магнітні бусини, відкалібрувати платформу, зібрати два тестові конструкти А і В, порівняти MDSMM з комерційною альтернативою, а також розробити та опублікувати у відкритому доступі програмний інструментарій (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy).

4. Проаналізувати небезпечні та шкідливі виробничі фактори під час роботи з мікрофлюїдною платформою і реагентами DropSynth, сформулювати вимоги охорони праці та заходи з утилізації відходів і екологічної безпеки.

Особистий внесок здобувача:

Усі експериментальні роботи з оптимізації протоколу та валідації DropSynth-збірки виконано особисто здобувачем у відділенні розробки біотехнологічних продуктів ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ». Робота включає підготовку та ПЛР-ампліфікацію олігонуклеотидних фрагментів і допоміжних плазмід; підготовка та верифікація двох наборів штрихкованих бусин (BRD1, BRD2); калібрування мікрофлюїдної системи Fluigent; розробка та оптимізація складу MDSMM; повний цикл валідації. Розроблено три програмні інструменти (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy) і опубліковано їх з відкритим кодом.

Наукова новизна:

1. Вперше водну фазу DropSynth-збірки розділено на два незалежні потоки у триканальній схемі завантаження мікрофлюїдного чипа Drop-Seq, при якій штрихковані бусини (Channel 3) та рестриктаза BtsI-v2 (Channel 2) подаються у два незалежні входи та з'єднуються лише при формуванні крапель. Ця конфігурація запобігає передчасному відщепленню ДНК від бусин у спільному реагентному резервуарі, що є критичною відмінністю від оригінального протоколу DropSynth 2.0 [3], де всі компоненти перебувають в одній водній фазі.

2. Удосконалено склад водної фази для емульсійної ПЛР: розроблено формулу MDSMM (Modified DropSynth Master Mix) - стандартну реакційну суміш Q5 (1× Q5 Reaction Buffer, dNTPs, праймери, Hot Start Q5 ДНК-полімераза), доповнену

добавками 2,5 % Pluronic F-68 та 0,2 мг/мл BSA - що зберігає активність Hot Start Q5 ДНК-полімерази і сумісна з активністю рестриктази BtsI-v2 при концентраціях Pluronic F-68 до 5 %.

3. У відкритому доступі опубліковано програмний інструментарій для краплинної мікрофлюїдики: розроблено три Python-пакети (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy) для автоматизованого аналізу розподілу діаметрів крапель, керування системою Fluigent у реальному часі та захоплення зображень з промислової камери - всі опубліковано на онлайн платформах GitHub та PyPI з відкритим кодом.

Практичне значення одержаних результатів:

Результати роботи мають безпосереднє практичне застосування у відділенні розробки біотехнологічних продуктів ТОВ «ЮРІЯ-ФАРМ» та потенційно у суміжних біофармацевтичних лабораторіях:

Локалізована платформа DropSynth-збірки повнорозмірних конструктів з комерційних OLS-наборів (Twist, IDT, Agilent), скорочує цикл прототипування з місяців до тижнів і знижує вартість зібраного конструкту на 1-2 порядки порівняно з повнокомерційним синтезом;

Модифікований протокол DropSynth 2.0 з розділенням водної фази на два потоки може бути впроваджений у будь-якій лабораторії, обладнаній системою Fluigent Drop-Seq та іншим необхідним обладнанням.

Відкритий програмний інструментарій (DropDrop, DropleGEN, PylonGuy) - готовий для використання іншими дослідниками без додаткової розробки;

Апробація результатів роботи:

O.O. Stroganov, S.I. Kostyk. VOF MODELING OF THE TRANSITION BETWEEN DRIPPING AND JETTING REGIMES IN A MICROFLUIDIC GENERATOR. «Biotechnology of the 21st century»: materials of the 20th International scientific and practical conference, (Kyiv, 8 May 2026). Kyiv, 2026. С. 452-456 [4].

DropDrop v1.1.0 - github.com/merv1n34k/dropdrop (PyPI: dropdrop)

DropleGEN - github.com/merv1n34k/droplegen (PyPI: droplegen)

PylonGuy v1.9.0 - github.com/merv1n34k/pylonguy (PyPI: pylonguy)

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН МАСШТАБОВАНОГО СИНТЕЗУ ГЕННИХ БІБЛІОТЕК ТА ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЇ

1.1 Проблематика синтезу бібліотек генів

Сучасна біотехнологія використовує бібліотеки синтетичних ДНК-конструктів - упорядковані колекції генних або генетично-регуляторних послідовностей зі спланованими варіаціями - як вхідний матеріал для високопропускних функціональних відборів. На відміну від класичних поодиноких клонів, бібліотеки дозволяють оцінювати функцію відразу тисяч і десятків тисяч варіантів у спільному експерименті, що повністю змінює стандартний цикл розробки у бік статистично потужних, генетично-кодованих експериментів [1].

Залежно від наукового завдання бібліотеки умовно поділяють на чотири перетинні класи. Метаболічна інженерія використовує бібліотеки варіантних промоторів, рибосом-зв'язувальних сайтів (RBS) і кодувальних послідовностей (CDS) для оптимізації внутрішньоклітинних шляхів продукування цільових метаболітів - типова бібліотека містить 10^3 - 10^5 комбінацій модулів. Спрямована еволюція ферментів будує бібліотеки точкових мутацій (saturation mutagenesis), доменних перемішувань (domain shuffling) та химерних варіантів для пошуку поліпшених активностей при відомому каркасі - 10^4 - 10^6 варіантів. Глибоке мутаційне сканування (deep mutational scanning, DMS) систематично замінює кожну позицію білка на всі двадцять амінокислот або підбірку з них, формуючи 10^3 - 10^5 -варіантні бібліотеки, з яких NGS-зчитування переможців і невдах будує функціональні карти відповідності позицій амінокислотам [2]. Нарешті, синтетична біологія будує генетичні ланцюги (toggle switches, осцилятори, орто-генетичні системи) шляхом збирання модульних регуляторних і структурних блоків зі стандартизованих частин - 10^2 - 10^3 конструктів на бібліотеку, проте з суворими вимогами до точності збірки кожного.

Спільна риса всіх чотирьох сценаріїв - нелінійна вартість охоплення комбінаторного простору. Класичний поодинокий синтез генів через комерційних

постачальників (Twist Bioscience, Integrated DNA Technologies, GenScript, GeneArt/Thermo Fisher) надає висококонтрольовану збірку поодиноких конструктів довжиною 0,5-5 тпн, проте вартість одного гену складає 30-300 USD, а цикл виготовлення - від двох до шести тижнів; при 10^4 варіантах загальна вартість сягає мільйонів доларів і кількох місяців очікування. Альтернативний шлях - олігонуклеотидні бібліотеки на мікрочипах (Oligonucleotide Library Synthesis, OLS) - суттєво нижчий за вартістю на варіант, проте вимагає доступу до спеціалізованих OLS-платформ і додаткового етапу зборки повнорозмірних конструктів з коротких олігонуклеотидних фрагментів. Для академічних та середніх R&D-лабораторій без власного OLS-обладнання саме етап збирання повнорозмірних конструктів з OLS-набору залишається технологічним вузьким місцем, що зумовлює актуальність розробки масштабованих, локалізованих платформ паралельної збірки [5, 3].

Таблиця 1.1 - Класи бібліотек ДНК-конструктів за типом відбору та типовий масштаб [1, 2]

Клас	Типове завдання	Розмір бібліотеки	Вимоги до точності збірки
Метаболічна інженерія	Варіантні промотори / RBS / CDS	10^3 - 10^4	висока
Спрямована еволюція	Точкові мутації, domain shuffling	10^4 - 10^5	помірна
Deep mutational scanning	Систематичні заміни позиція $\times$ а.к.	10^4 - 10^6	помірна
Синтетична біологія	Генетичні ланцюги, орто-системи	10^2 - 10^4	дуже висока

1.2 Огляд сучасних методів синтезу генів de novo

Сучасне виробництво синтетичних послідовностей ДНК будується на двох рівнях. На першому виконують хімічний синтез коротких одноланцюгових олігонуклеотидних фрагментів довжиною 30-300 нт; на другому з них збирають повнорозмірні дволанцюгові конструкти довжиною від кількох сотень нт до

десятків тпн. Обидва рівні мають окремі технологічні обмеження, що визначають максимальну довжину і точність кінцевого продукту [1].

1.2.1 Фосфорамідитний синтез олігонуклеотидів

Стандартний фосфорамідитний синтез, запатентований Caruthers у 1980-х, дотепер залишається домінуючою хімією синтезу олігонуклеотидів. Реакційний цикл містить чотири послідовні стадії - деблокування 5'-DMTr-групи трихлороцтовою кислотою, активацію наступного фосфорамідитного мономера тетразолом, сполучення з 3'-гідроксилом ланцюга, що нарощується, кепування неспареного 5'-кінця та окиснення фосфіту до фосфату - повторюваних на кожен приєднуваний нуклеотид. Ефективність кожного циклу сполучення - типово 98,5-99,5%, що накопичується у частоту помилок ~ 1 на 100-200 нт і робить 200-300 нт практичною межею робочої довжини олігонуклеотида; синтез довжиною понад 300 нт потребує спеціалізованих платформ і дає значно нижчий вихід цільового повнорозмірного продукту [1]. Це фундаментальне обмеження визначає, що повнорозмірні гени довжиною понад 300 нт доводиться синтезувати поетапно з декількох коротших фрагментів з подальшим їх з'єднанням, і безпосередньо мотивує всі розглянуті нижче методи збірки.

1.2.2 Методи збирання повнорозмірних конструктів з фрагментів

Збирання повнорозмірних дволанцюгових конструктів з декількох коротких одноланцюгових фрагментів виконують різними ферментативними стратегіями, з яких чотири отримали найбільш широке впровадження [6].

Ligation-based збірка з T4 DNA Ligase - простий і недорогий метод, що базується на лігації сусідніх фрагментів через короткі комплементарні липкі кінці; основні обмеження - необхідність попереднього генерування комплементарних кінців через рестрикційний крок, низька масштабованість для понад 4-6 одночасних фрагментів і чутливість до неспецифічних з'єднань [6].

ПЛР-збірка з перекриттям (overlap-extension PCR, oePCR; також polymerase cycling assembly, PCA) використовує комплементарні 20-40-нт перекриття між сусідніми фрагментами як «зшивні» праймери для відпалу й полімеразного подовження у спільній реакції. Метод стандартно охоплює 4-8 фрагментів

одночасно і дозволяє збирання конструктів до 2 тпн, проте має помірну точність через ризик перехресного праймування між нецільовими перекриваннями [6].

Метод клонування Gibson Assembly [7] - одnoreакторний ізотермічний метод, що поєднує три ферменти: 5'-екзонуклеаза T5, ДНК-полімераза Phusion та лігаза Taq. Екзонуклеаза формує одноланцюгові 5'-кінці фрагментів, які гібридизуються через спільні 15-40-нт послідовності; полімераза заповнює пробіли, а лігаза замикає ніки. Метод працює при 50 °C протягом 1 год, не вимагає рестрикційного етапу і ефективно обробляє 4-6 фрагментів за реакцію, надаючи продукти довжиною до 32 тпн. Класична робота Gibson *et al.* 2009 продемонструвала його застосовність до збирання повного геному *Mycoplasma genitalium* і утвердила метод як стандарт сучасної синтетичної біології.

Метод Golden Gate / MoClo використовують Type-IIIS-рестриктази (BsaI, BbsI, SapI), що розщеплюють ДНК поза своїм сайтом розпізнавання, генеруючи унікальні 4-нт кінці спеціального дизайну. Спільна одночасна рестрикція й лігація у одnoreакторній цикловій реакції дозволяє одночасно з'єднати до 10 фрагментів з гарантовано правильним порядком, оскільки кінці не комплементарні між сусідніми сайтами. MoClo (Modular Cloning) додає три ієрархічні рівні збирання, що масштабує метод до 64+ модулів і робить його основою стандартизованих модулярних систем клонування для синтетичної біології [6].

Таблиця 1.2 - Порівняння методів *de novo* збирання повнорозмірних конструктів [7, 6]

Метод	Принцип	К-сть	Довжина, пн	Точність
T4 Ligase	Лігація комплементарних кінців	2-3	200-500	помірна
oePCR / PCA	ПЛР-перекриття + полімераза	4-8	2000	помірна
Gibson Assembly	Екзонуклеаза + полімераза + лігаза	4-6	до 32000	висока
Golden Gate / MoClo	Type IIS-рестрикція + лігація	до 10	5000-10000	висока

1.2.3 OLS на мікрочипах: масштабна хімія

Олігонуклеотидний синтез на мікрочипах (OLS, Oligonucleotide Library Synthesis) виносить фосфорамідитну хімію на двовимірну поверхню чипа з 10^5 - 10^6 окремими «лунками»-точками, в кожній з яких паралельно синтезується своя унікальна 100-300-мерна послідовність [1]. Промислові OLS-платформи відрізняються механізмом локального деблокування DMTr-групи: фотолітографічна (Agilent SurePrint, Affymetrix) використовує фотолабільну захисну групу і світло у фотомаскованих ділянках, електрохімічна (CombiMatrix) - локально генеровану кислоту під обраним електродом, струменевий друк (Twist, Agilent) - точкове дозування фосфорамідита через п'єзоелектричні форсунки. Сучасні платформи дозволяють синтезувати 10^4 - 10^6 унікальних 200-мерів за один чип за 1-3 доби з заявленою точністю ~ 1 помилка на 200 нт [1].

OLS відкрив можливість синтезу бібліотек, недосяжних для класичних поодиноких підходів, однак має дві суттєві обмеженості. По-перше, вихід ДНК на одну унікальну послідовність вкрай низький - 1-1000 атомолей, що достатньо лише для ПЛР-ампліфікації, але не для безпосереднього клонування. По-друге, OLS-набори є «плоскими» - усі 10^4 - 10^6 варіантів змішані в одній пробірці; будь-яка спроба зібрати повнорозмірні 0,5-2 тпн конструкти з таких наборів вимагає методу ізоляції піднаборів (subpool isolation), щоб запобігти неконтрольованому перекриттю між сусідніми варіантами. Саме потреба у ізоляції піднаборів мотивує перехід від традиційних збиральних методів до краплинно-мікрофлюїдних емульсійних підходів - DropSynth і його похідних, - у яких емульсійна крапля становить мікрореактор для одного штрихкодованого варіанту [5].

1.2.4 Корекція помилок

Помилки, накопичені у фосфорамідитному синтезі (інсерції, делеції, несумісні пари), скорочують частку повнорозмірних правильних конструктів. Сучасні методи корекції помилок поділяють на два класи [1]: (і) ферментативна корекція невідповідних пар через MutS-зв'язування (M2B2-методи, MutS-magnetic

beads) [8], що виловлює дуплексні ДНК з некомплементарними основами і вилучає їх з набору; (ii) NGS-верифікація, при якій кожен зібраний конструкт секвенується, а правильні відбираються електронно або фізично через mate-pair кодування [9]. Найбільш доступним методом залишається NGS-верифікація, проте її вартість і час лімітують застосовність для бібліотек понад 10^4 варіантів.

1.2.5 Сучасний ринок комерційних послуг

Станом на 2025 рік ринок комерційного синтезу генів представлений переважно чотирма провідними постачальниками: Twist Bioscience (струменева OLS-платформа, фокус на бібліотеки 10^4 - 10^5 варіантів, 30-100 USD за 500-нт конструкт у поодинокому форматі і 10-30 USD у бібліотечному), Integrated DNA Technologies (IDT) (gBlocks і gBlocks HiFi - гібрид PCR-збірки і клонування, поодинокі ~0,30 USD за нт), GenScript (повний цикл синтезу-клонування-секвенування за ~0,30-0,60 USD за нт) та GeneArt / Thermo Fisher. Для академічних лабораторій з обмеженим бюджетом усі чотири постачальники залишаються прийнятним рішенням до 10-100 конструктів за партію; вище цього порога локальні платформи на основі OLS і паралельної емульсійної збірки стають економічно виправданими. Саме у масштабному діапазоні 10^3 - 10^4 конструктів виявляється технологічна ніша DropSynth-платформ, що поєднує OLS-вхід з паралельною ізольованою емульсійною збіркою [3].

1.3 Технологія DropSynth

DropSynth - мультиплексний метод збирання повнорозмірних ДНК-конструктів у краплинній емульсії, що поєднує OLS-вхід з паралельною ePCR-збіркою на штрихкодovаних магнітних бусинах [5]. У цьому підрозділі викладено концептуальну схему методу, еволюцію платформи від першої версії до DropSynth 2.0 та деталізований референсний протокол, що становить основу модифікацій, описаних у Розділі 2 цієї роботи.

Потреба у такому методі впливає безпосередньо з обмежень класичних стратегій збірки, розглянутих у підрозділі 1.2.2. Усі чотири широко впроваджені підходи - лігація T4 DNA Ligase, overlap-extension PCR, Gibson Assembly та Golden Gate / MoClo - залишаються одnoreакторними у сенсі «одна пробірка -

один конструкт»: вони ефективно з'єднують від 4 до 10 фрагментів у єдину послідовність, але кожна цільова конструкція потребує власної ізольованої реакції з індивідуально підібраними фрагментами та умовами. Спроба зібрати 10^3 - 10^4 різних конструктів класичним способом означала б стільки ж окремих реакцій з пропорційним зростанням витрат реагентів, робочого часу і похибки ручних маніпуляцій, що робить такий масштаб практично недосяжним для академічної чи R&D-лабораторії, тоді як повнокомерційний синтез за ціною 30-300 USD за конструкт лишається економічно неприйнятним для бібліотек у тисячі варіантів (підрозділ 1.2.5) [6].

DropSynth долає це обмеження масштабу, переносячи принцип «одна пробірка - один конструкт» на рівень мікрокраплі: кожен штрихкодований варіант OLS-набору ізолюється у власній емульсійній краплі, що слугує незалежним мікрореактором overlap-extension-збірки. Завдяки цьому 384-1536 різних конструктів (типові формати платформи) збираються паралельно в одній фізичній реакції за вартістю 1-2 USD за конструкт і циклом 1-2 тижні (підрозділ 1.3.4). Таким чином DropSynth поєднує перевагу OLS за масштабом синтезу олігонуклеотидів з паралельністю збірки, недосяжною для жодного з класичних ферментативних методів, що й обґрунтовує його вибір як технологічної основи цієї роботи [3].

1.3.1 Концепція

Основна ідея DropSynth - фізично відокремити кожен штрихкодований варіант OLS-набору у власну емульсійну краплю, що виконує роль «мікрореактора» для незалежної overlap-extension-ПЛР-збірки. Це досягається через ковалентне прикріплення кожного варіанту до власної штрихкованої магнітної бусини, після чого набір бусин емульгують у W/O-емульсії (рисунок 1.1) [3].

Усі OLS-варіанти проектують зі спільними універсальними праймерними фланками та двома сайтами Type-IIS-рестриктаз - Nt.BspQI з боку 5' і BtsI-v2 з боку 3', - а також з 12-нт унікальним штрихкодом, кодованим у фланкових

ділянках. Цей штрихкод визначає приналежність варіанту до конкретної магнітної бусини у наборі [3].

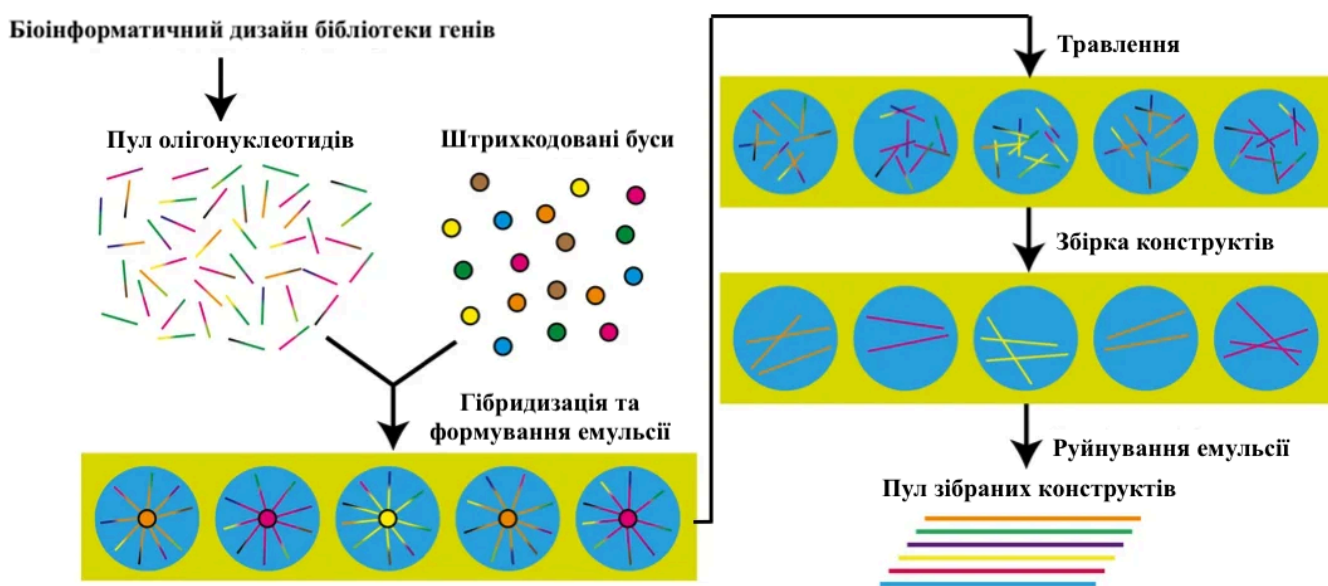


Схема технології DropSynth 2.0

Рисунок 1.1 - Узагальнена схема технології DropSynth 2.0 [3]

Після ампліфікації всього набору у нього вносять одноланцюговий розрив ферментом Nt.BspQI у сайті, проксимальному до 5'-біотину, а біотинільовані короткі фрагменти видаляють захопленням на стрептавідинових бусинах. Очищений набір лігують на набір штрихкованих магнітних бусин Dynabeads M-270 Streptavidin за допомогою Taq DNA Ligase - кожна бусина несе унікальний штрихкод, комплементарний до штрихкод-послідовності одного з варіантів OLS-набору, тож кожна бусина селективно прикріплює лише «свій» варіант [3].

Бусини з прив'язаними варіантами емульгують інтенсивним вихровим струшуванням на вихровому змішувачі Vortex-Genie 2 впродовж 3-4 хв у Bio-Rad QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen (фторвуглецева олія з фірмовим сурфактантом). Таке емульгування дає численні W/O-краплі діаметром <5 мкм (медіана та мода згідно зі звіту Plesa *et al.*, 2018); статистичний надлишок крапель

над бусинами забезпечує, що переважна більшість крапель містить або 0, або 1 бусину - реалізуючи моноклональний принцип збірки [5, 3].

До водної фази додають рестриктазу BtsI-v2 та KAPA HiFi DNA-полімеразу. Після формування емульсії пробірку термоциклюють: спочатку при 55 °C активується BtsI-v2 і відщеплює варіант від поверхні бусини у замкнутий об'єм краплі. Далі стандартні ПЛР-цикли запускають емульсійну overlap-extension PCR (ePCR), в якій короткі піднаборіві фрагменти всередині однієї краплі збираються через свої 20-40-нт перекриття у повнорозмірний 500-700-пн конструкт [3].

Емульсію руйнують додаванням 1H,1H,2H,2H-перфлуоро-1-октанолу (PFO); зібрані продукти збагачують супресорну ПЛР з одним праймером (через ITR-шпильки, що блокують ампліфікацію неправильних побічних продуктів), і кінцевий набір повнорозмірних конструктів очищують колонково. Цей підхід дозволяє паралельно зібрати 384-1536 конструктів в одній спільній реакції - на 2-3 порядки більше за класичні поодинокі методи [5, 3].

Послідовність ключових стадій DropSynth-протоколу узагальнено у таблиці 1.3 [3].

Таблиця 1.3 - Ключові стадії DropSynth-протоколу [5, 3]

№	Стадія	Реагент / інструмент	Результат
1	Ампліфікація всього OLS-набору	Q5 HiFi + біотинільований ампліфікаційний праймер	Біотинільовані ампліконові варіанти
2	Сайт-специфічний одноланцюговий розрив	Nt.BspQI у NEBuffer 3.1, 50 °C overnight	Розриви проксимально до 5'-біотину
3	Видалення коротких 5'-біотин-фрагментів	Стрептавідин-бусини + магнітна сепарація	Очищені довгі фрагменти варіантів
4	Лігація варіантів на штрихковані бусини	Taq DNA Ligase, ramping 50 to 10 °C	Бусини з прив'язаними «своїми» варіантами

Продовження таблиці 1.3.

5	Вортексне емульгування	Vortex-Genie 2, 3-4 хв, у Bio-Rad QX200 Generation Oil	W/O-краплі <5 мкм; надлишок крапель над бусинами забезпечує моноклональність
6	In-droplet рестрикція	BtsI-v2 у краплі, 55 °C / 90 хв	Звільнення варіанту в крапелью
7	ePCR-збірка	KAPA HiFi 2× Master Mix, 30-60 циклів	Повнорозмірний 500-700-пн конструкт
8	Руйнування емульсії	PFO 1 : 1 + центрифугування	Водна фаза з продуктом
9	Збагачення повнорозмірної фракції	Супресорна ПЛР з одним праймером (ITR-шпильки)	Чиста цільова фракція
10	Очищення кінцевого продукту	SPRI або колонкове	Готова бібліотека

1.3.2 Еволюція технології

Перша версія платформи - DropSynth 1.0 - представлена науковою групою Sriram Kosuri (UCLA) у Plesa *et al.* 2018 (Science) як доказ концепції паралельного синтезу OLS-набору через краплинну ізоляцію. Робота продемонструвала збирання 384 конструктів довжиною 200-1000 нт у одній реакції зі кінцевою фракцією правильно зібраних 30-50% для коротших варіантів і 10-20% для довших. Технологічно DropSynth 1.0 використовував простішу ПЛР-збірку без BtsI-v2-опосередкованого відщеплення в краплі і не включав ITR-suppression-етапу, через що частка побічних продуктів була значною [5].

DropSynth 2.0, представлений у Sidore *et al.* 2020, розширює платформу низкою методичних удосконалень [3].

Замість прямої ПЛР-збірки використовується ePCR з 60-цикловою термальною програмою - це поліпшує точність повнорозмірних збірок за рахунок більшої кількості циклів подовження [3].

Введено етап відщеплення варіанту від бусини у краплі через активацію BtsI-v2 у спільному з ПЛР-сумішшю середовищі. Це робить варіант фізично доступним для ePCR після формування емульсії, але не до неї - критичне нововведення, що захищає моноклональний принцип збірки [3].

Додано фланкові ITR-шпильки (inverted terminal repeats) і супресорну ПЛР з одним праймером як етап збагачення повнорозмірних продуктів. Неправильні побічні продукти, які не несуть симетричних ITR на обох кінцях, формують внутрішньомолекулярну шпильку при відпалі - це термодинамічно блокує праймер-зв'язування і запобігає їх ампліфікації. Повнорозмірні конструкти з симетричними ITR залишаються лінійними і експоненційно накопичуються [3].

Замість T4 DNA Ligase для лігації варіантів на бусини використано Taq DNA Ligase - термостабільну NAD-залежну лігазу з оптимумом 45-65 °C. Це дозволяє виконувати лігацію за плавним температурним градієнтом від 50 до 10 °C впродовж ночі, що значно підвищує специфічність гібридизації між варіантом і бусиною [3].

Додано опціональну MutS-корекцію помилок після руйнування емульсії - це додатково знижує частку мутантних варіантів у фінальному наборі [3].

У результаті Sidore *et al.* 2020 продемонстрували збирання 12 672 унікальних варіантів довжиною до 1500 нт зі кінцевою фракцією правильно зібраних 65-75% для 5775 DHFR-гомологів та 1152 PPAT-гомологів [3].

1.3.3 Продуктивність та обмеження DropSynth 2.0

Sidore *et al.* (2020) задокументували масштабовану продуктивність DropSynth 2.0 на реальних завданнях синтетичної біології. У 33 паралельних бібліотеках по 384 варіанти (всього 12 672 спроектованих конструктів) досягнуто

65-75% правильно зібраних послідовностей за критерієм perfect read для 5775 гомологів DHFR і 1152 гомологів PPAT [3].

За довжиною повнорозмірний конструкт варіюється у діапазоні 200-1500 нт залежно від кількості та довжини вихідних олігонуклеотидних фрагментів. Типові робочі конфігурації - 4-6 олігонуклеотидів довжиною 200-300 нт, що дають кінцеві конструкти 500-800 нт; довші конструкти потребують пропорційно більше фрагментів і знижують частку правильних зборок через накопичення помилок ePCR [3].

Масштабованість платформи реалізована у двох типових форматах - 384 і 1536 штрихкод-варіантів на бібліотеку. На рівні бібліотек спостерігається невелика частка невдалих збірок (0-10%), а двокодонне дублювання у межах однієї бібліотеки забезпечує покриття понад 80% дизайну при середньому ~70% (60-80% залежно від конкретної бібліотеки) [3].

Серед основних обмежень платформи виділяються три. По-перше, вихрове емульгування дає полідисперсний розподіл крапель з широким діапазоном діаметрів і неконтрольованим завантаженням бусин, що ускладнює кількісний аналіз і відтворюваність між запусками [5, 3]. По-друге, верхня межа довжини конструкту ~1500 нт зумовлена ефективністю overlap-extension PCR при більшій кількості фрагментів. По-третє, ручна підготовка набору штрихкодovаних бусин залишається трудомістким етапом і обмежує мультиплексність до 384 або 1536 - масштабів, зумовлених розміром комерційних чипів-синтезаторів.

1.3.4 Економіка DropSynth-платформи

Ключова конкурентна перевага DropSynth-збірки над комерційним синтезом - низька вартість одного зібраного конструкту при достатньому масштабі бібліотеки. Plesa (2020) оцінює її на рівні 1-2 USD за конструкт у залежності від конфігурації запуску, що на 1-2 порядки нижче за повнокомерційну збірку (30-300 USD за ген) і відповідає бібліотечному тарифу Twist Bioscience при суттєво коротшому циклі виконання (1-2 тижні замість 4-8) [3].

Основну частку вартості DropSynth-протоколу складають дві частини: одноразова підготовка набору штрихкодovаних бусин і повторювана вартість

реагентів кожної ePCR-збірки. За даними презентації Plesa на DMS Workshop 2020 [10], у 384-варіантному форматі підготовка набору бусин коштує близько 4 020 USD за 1 920 мкл маточного препарату - це 41,88 USD за збірку у перерахунку на 1 підготовку і 0,11 USD за один кінцевий конструкт. У 1536-варіантному форматі пропорційне зростання обсягу реагентів дає 15 770 USD стартової вартості, але через більшу кількість конструктів вартість на одну збірку залишається сталою (41,07 USD), а на один конструкт знижується до 0,03 USD [3].

Реагенти безпосередньо ePCR-збірки (KAPA HiFi master mix, BtsI-v2, ферменти одноланцюгового розриву та лігування, набір олігонуклеотидів, SPRI-очищення) додають близько 0,70-1,28 USD на конструкт залежно від масштабу - менші 384-партії обходяться ~1,17-1,28 USD/конструкт, тоді як 1536-партії досягають 0,70-0,73 USD/конструкт за рахунок розділення фіксованих витрат на ферменти і обладнання [3].

Економічна границя ефективності DropSynth - приблизно 200 збірок з одного набору бусин, або 80 000 конструктів сумарно з однієї підготовки. Нижче цього порогу комерційні провайдери залишаються конкурентними; вище - DropSynth здобуває очевидну перевагу за вартістю на конструкт [3].

У цей розрахунок не входять капітальні витрати на спеціалізоване обладнання (термоциклер, центрифуга, гель-система, мікроскоп для контролю якості емульсії), а також робочі години персоналу - фактори, що в окремих лабораторіях суттєво змінюють абсолютну економіку. Проте DropSynth у форматі $\geq 384\times$ залишається безконкурентно дешевим для академічних і R&D-завдань з бібліотеками 10^3 - 10^4 конструктів [3].

1.4 Краплинна мікрофлюїдика для біологічних застосунків

Краплинна емульсія є не лише технічним прийомом, а ключовою передумовою паралельної збірки DropSynth. Щоб провести 10^3 - 10^4 незалежних реакцій overlap-extension одночасно, потрібно стільки ж фізично відокремлених реакційних об'ємів. Планшетні формати (96-, 384-, 1536-лункові) забезпечують лише 10^2 - 10^3 компартментів за мікролітрових об'ємів, що зумовлює надмірні витрати реагентів, складну рідинну логістику і принципово не масштабується до

десятків тисяч реакцій. Емульсія типу «вода-в-олії» натомість дискретизує одну пробірку на мільйони піколітрових крапель, кожна з яких є автономним мікрореактором; при статистичному надлишку крапель над бусинами розподіл Пуассона гарантує, що переважна більшість заповнених крапель містить рівно одну бусину, тобто один варіант, реалізуючи моноклональність збірки практично без додаткових витрат. Саме тому краплинна (емульсійна) ПЛР, а не планшетна чи об'ємна реакція, є природним і економічно виправданим середовищем для DropSynth-збірки [11, 5].

Вище описано класичну реалізацію DropSynth-протоколу через вихрове емульгування, що генерує полідисперсний розподіл крапель з широким діапазоном діаметрів і неконтрольованим завантаженням бусин. Така емульсія цілком придатна для якісної демонстрації DropSynth-принципу і неперевершена за швидкістю первинної підготовки, але обмежує кількісний аналіз і відтворюваність результатів між запусками. Перехід до контрольованої краплинної мікрофлюїдики з заздалегідь заданою монодисперсністю крапель є природним наступним кроком, що дозволяє регулювати λ -параметр завантаження бусин за Пуассоном, прогнозовану пропускну спроможність і відтворюваний CV діаметрів крапель - критичні параметри для якісних протоколів типу ddPCR і модифікованого DropSynth [5, 3].

Краплинно-мікрофлюїдні системи будуються на ламінарному двокомпонентному потоці двох рідин, що не змішуються - найчастіше водної (дисперсна фаза) і олійної (неперервна фаза) - у мікроканалах характерного розміру 10-1000 мкм. У такому масштабі кінематика потоку детермінована переважно в'язкими і капілярними силами, а турбулентністю та інерцією можна знехтувати ($Re \ll 1$); внаслідок цього потоки прогнозовано формують монодисперсні краплі з вузьким розподілом діаметрів і відтворюваною частотою [11].

1.4.1 Безрозмірні числа й режими утворення крапель

Основним безрозмірним числом, що визначає режим утворення крапель, є число капілярності Ca - відношення в'язких сил до сили міжфазного натягу:

$$Ca = \frac{\mu_c \cdot v_c}{\sigma} \quad (1.1)$$

де μ_c - динамічна в'язкість неперервної (олійної) фази, v_c - характеристична швидкість неперервної фази на flow-focusing-стику, σ - міжфазний натяг. Допоміжним параметром є в'язкісне співвідношення двох фаз:

$$\eta = \frac{\mu_d}{\mu_c} \quad (1.2)$$

де μ_d - динамічна в'язкість дисперсної (водної) фази. Залежно від конкретних значень Ca і λ_v , а також геометрії чипа і об'ємного співвідношення фаз, спостерігаються три якісно різні режими генерації крапель [12].

Squeezing-режим (низькі $Ca \lesssim 0,01$): крапля виштовхується неперервною фазою через геометричне стиснення каналу; діаметр краплі визначається переважно геометрією і слабо залежить від Ca - стандартний режим стабільного утворення крапель на T-junction-чипах [13, 12].

Dripping-режим (помірні Ca , $0,01 \lesssim Ca \lesssim 0,3$): дисперсна фаза формує сферичні краплі біля точки звуження, що відриваються періодично під дією балансу в'язких і капілярних сил; розмір і частота крапель є функціями Ca та фазового співвідношення - основний режим для flow-focusing-чипів і для краплинно-мікрофлюїдних протоколів типу ddPCR і DropSynth [12].

Jetting-режим (високі $Ca \gtrsim 0,3$): дисперсна фаза формує неперервну струмину, що розпадається на краплі через rayleigh-нестабільність далеко від точки звуження; режим менш контрольований за монодисперсністю, але дає вищу пропускну спроможність [12].

Для DropSynth-застосунків критично важливо працювати у стабільному dripping-режимі - це забезпечує монодисперсність крапель з коефіцієнтом варіації діаметра $CV < 5\%$, що необхідно для відтворюваного завантаження бусин за Пуассоном [3].

1.4.2 Чип-геометрії генераторів крапель

Основні три геометрії мікрофлюїдних генераторів крапель такі [12].

T-junction [13] - два канали збігаються під прямим кутом, олійна фаза перпендикулярно перетинає водну і відриває краплі; конструкція проста й історично перша, проте обмежена за частотою (десятки-сотні Гц) і стабільно працює лише при низьких числах капілярності ($Ca \lesssim 0,01$).

Flow-focusing [14] - водна фаза вузько фокусується між двома симетричними потоками олії через звужувальний стик; саме на цій геометрії побудована більшість сучасних комерційних платформ (Bio-Rad QX200, Fluidigm Drop-Seq, Sphere Fluidics), оскільки вона дає монодисперсні краплі при широкому діапазоні Ca (0,01-0,3) і частотах 1-10 кГц.

Co-flow / step emulsification - водна фаза рухається співвісно з олійною через концентричні канали (co-flow) або через східчасту висоту каналу (step emulsification), що знімає залежність розміру краплі від тиску і дозволяє паралелізувати чип з десятками-сотнями співвісних форсунок для високопропускних застосунків (Sphere Fluidics, Stilla Naica) [12].

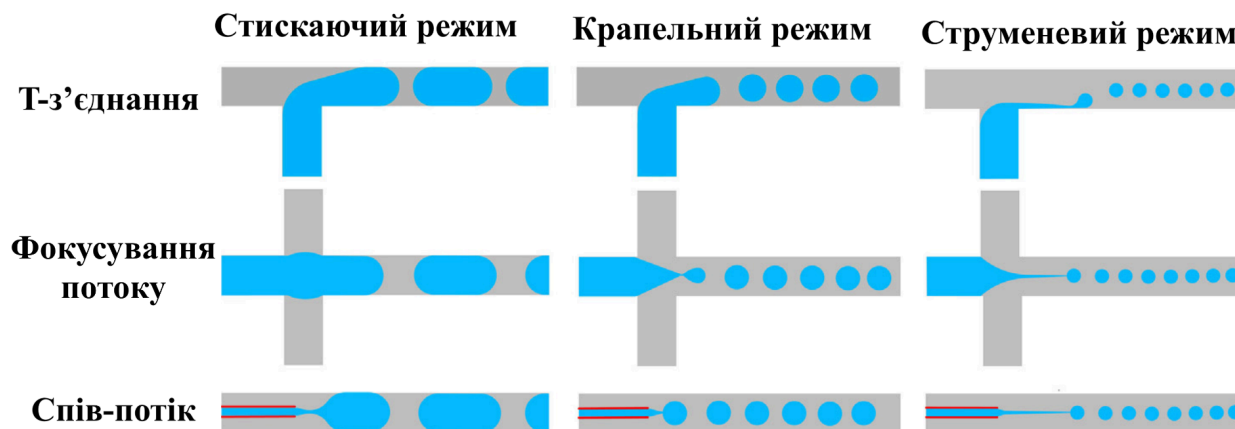


Рисунок 1.2 - Порівняння трьох основних геометрій генераторів крапель (T-junction, flow-focusing, co-flow / step emulsification) з типовими режимами утворення крапель [12]

1.4.3 W/O-емульсії та сурфактанти для ПЛР-сумісних протоколів

Для крапельних ПЛР-протоколів критично важлива термальна стабільність емульсії у діапазоні 4-95 °C упродовж 30-60 циклів. Олійна фаза повинна одночасно: (i) не змішуватись з водною, (ii) не інгібувати ПЛР через міграцію

інгібіторних молекул у краплю, (iii) бути сумісною з PDMS-стінками без набухання і деформації каналів, (iv) формувати стабільну емульсію з водним сурфактантом, що запобігає коалесценції крапель під час температурних змін. Невиконання хоча б одного критерію призводить до втрати якості результатів і непередбачуваної варіативності між запусками [11, 15].

Історично першими використовувались вуглеводневі олії - мінеральна олія (light oil), силіконова олія, гексадекан - у поєднанні з ліпофільними сурфактантами Span 80 або ABIL EM 90. Ці системи дешеві і прості у виробництві, але мають низку обмежень: погана термальна стабільність при 95 °C, набухання PDMS, часткова розчинність полярних інгібіторів ПЛР у вуглеводневій фазі. Тому вуглеводневі олії досі застосовуються переважно для якісних емульсійних протоколів і як термостабільний верхній шар у PCR-пробірках, але не як неперервна фаза мікрофлюїдних якісних протоколів [11].

Сучасний стандарт - фторвуглецеві олії (HFE-7500, FC-40, FC-77, Fluorinert FC-43) у поєднанні з фторованими сурфактантами PFPE-PEG триблок-кополімерами, представленими Holtze *et al.* (2008) як перші біосумісні поверхнево-активні речовини для ПЛР у краплях [15]. Фторвуглецеві олії мають найвищу серед практичних варіантів хімічну інертність - не розчиняють ПЛР-інгібітори і не змочують PDMS, - а PFPE-PEG-сурфактанти забезпечують стабільність емульсії при термоциклюванні впродовж десятків циклів. Цей клас формулювань лежить в основі більшості сучасних комерційних ddPCR-платформ (Bio-Rad QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen/Probes, RAN Biotechnologies dSURE, Sphere Fluidics Pico-Surf).

Розвиток альтернативних сурфактантних хімії триває у напрямку покращення біосумісності та зменшення міжкрапельного обміну молекулами. Chowdhury *et al.* (2019) показали, що дендронізовані фторсурфактанти суттєво зменшують міжкрапельний обмін малими молекулами і дозволяють тривалі інкубації [16]. Но *et al.* (2023) оцінили протизабруднювальні властивості Pluronic F-68 і Tetronic-сурфактантів як водних стабілізаторів, що зменшують прилипання бусин до стінок краплі [17]. Brouzes *et al.* (2018) показали, що додавання

заряджених полімерів до ферментної суміші формує рідкі-рідкі фазові розділення у краплях, які локально концентрують активні центри і підвищують ефективність полімеразної реакції в обмеженому об'ємі [18].

Систематичний огляд властивостей різних класів сурфактантів і параметрів, що визначають їх PCR-сумісність, наведено у Baret (2012); ця робота лишається базовим методологічним довідником для проектування нових емульсійних протоколів [11].

1.4.4 Біотехнологічні застосунки

Краплинна мікрофлюїдика знайшла широке застосування у молекулярній біології через здатність ізолювати індивідуальні реакції у незалежні моноклональні краплі. Найбільш зрілою її реалізацією є цифрова ПЛР (ddPCR) - абсолютна кількісна оцінка цільових послідовностей через підрахунок позитивних і негативних крапель після термоциклювання. Hindson *et al.* (2011) продемонстрували QX200-платформу з близько 20 000 крапель на запуск і досягли CV ~5% абсолютного вимірювання [19], а сучасні протоколи ddPCR стандартизовано у керівних принципах dMIQE 2020 [20]; розширені багатоколірні варіанти дозволяють одночасне вимірювання кількох цільових послідовностей у одній реакції [21].

Близьким за принципом є емульсійна ПЛР (emulsion PCR, oilPCR) - формат для клональної ампліфікації унікальних матриць у власних краплях, що зменшує перехресне праймування при секвенуванні синтезом. Цей принцип лежить в основі історичних NGS-платформ 454 Roche, Ion Torrent і MGI BGISEQ, а також модифікацій DropSynth та інших ePCR-збірок, детально розглянутих вище [5].

Інший напрям - одноклітинна транскриптоміка через Drop-Seq, де інкапсуляція окремих клітин разом зі штрихкодovаними бусинами у краплі дозволяє паралельне зчитування транскриптомів десятків тисяч клітин. Macosko *et al.* (2015) представили цю платформу на прикладі аналізу ретинальних нейронів [22]; пізніше принцип комерціалізовано у 10x Genomics Chromium і споріднених системах.

Краплі також використовуються для спрямованої еволюції ферментів: бібліотеки варіантів фракціонують у моноклональні краплі, в яких функціональний відбір через флуоресцентний субстрат поєднується з подальшим сортуванням за FACS-механізмом - це відкриває паралельне тестування 10^5 - 10^6 варіантів за один запуск. Нарешті, мультиплексний синтез генів DropSynth [5, 3] - застосунок, що становить фокус поточної роботи, - реалізує паралельну збірку повнорозмірних конструктів у моноклональних краплях, як описано вище.

1.4.5 Керування потоком у мікрофлюїдиці

Відтворюваність утворення крапель критично залежить від якості керування витратою або тиском у мікрофлюїдній системі. Серед практичних підходів виокремлюються три класи з різним балансом ціна-точність-швидкість відповіді [23].

Перший - пневматичне керування тиском (pressure-driven flow) реалізоване в системах Fluigent Flow EZ, Elveflow OB1 та інших. Контролер задає постійний тиск у резервуарі з рідиною, який передається на мікрофлюїдний чип через тонке трубокабельне з'єднання. Перевагами є висока швидкість відповіді (час встановлення ~ 10 - 100 мс), відсутність імпульсних артефактів і точність регулювання у діапазоні від десятих часток мбар до десятків бар. Недоліком є вища вартість обладнання та необхідність окремого калібрування для кожної рідини через залежність витрати від в'язкості [23].

Другий підхід - шприцеві насоси (syringe-pump-driven flow) з точним механічним приводом, реалізовані у платформах Harvard Apparatus, KD Scientific, Chemux. Перевагами є простота, нижча вартість і безпосереднє завдання витрати (мкл/хв). Основний недолік - періодичні мікроштовхання при зміні напрямку приводного гвинта (ефект «прилипання-проковзування»), що породжує імпульси у потоці і ускладнює утворення крапель на високих частотах [23].

Третій підхід - гідростатичний (гравітаційний) потік, де перепад висот між резервуаром і збиральною ємністю задає тиск. Це найпростіше і найдешевше рішення, але обмежене за максимальною витратою і чутливе до зміни рівня рідини

в резервуарі під час запуску. Гідростатичний потік придатний переважно для академічних і прототипних експериментів [23].

Незалежно від методу подачі, точне регулювання потоку потребує оберненого зв'язку через flow-сенсори. Найпоширенішими є термоанемометричні сенсори Fluigent Flow Unit і Sensirion LD20/LG16, що вимірюють витрату за принципом теплового балансу між двома симетричними чутливими ділянками капіляра. Сенсор підключається у замкнений PID-контурний цикл з тиск-контролером або шприц-насосом, що дозволяє керування за командою тиску (P_{cmd}) або за командою витрати (Q_{cmd}) із збереженням заданої уставки [23].

У цій роботі застосовано пневматичну Fluigent LineUp-платформу з контролерами Flow EZ (0-2000 мбар), термоанемометричними сенсорами Flow Unit (FU-M і FU-L) та власним програмним шаром DropleGEN для координації багатоканальних процесів виконання запуску [23].

1.4.6 Комерційні платформи краплинної мікрофлюїдики

Сучасний ринок краплинно-мікрофлюїдних платформ структурований за цільовим застосуванням: кількісне визначення послідовностей у ddPCR, одноклітинний аналіз, відбір ферментних бібліотек і гнучкі дослідницькі платформи. Кожен сегмент має кілька усталених комерційних рішень [19, 22, 23].

У сегменті ddPCR домінують дві платформи. Bio-Rad QX200 і її розширення QX600 формують емульсію у спеціалізованій робот-станції з ~20 000 крапель на запуск, після термоциклювання краплі підраховуються флуоресцентно у crystalDetector-модулі - наразі найпоширеніше рішення для кількісного аналізу нуклеїнових кислот у клінічних та академічних лабораторіях. Stilla Naica реалізує альтернативний підхід через двофазне аркадне емульгування у мікрокамері-чипі: тверда геометрія камери задає фіксований об'єм крапель і дозволяє вищу мультиплексність кольорів флуоресценції за один прогін [19, 24].

У сегменті одноклітинного аналізу провідною є 10x Genomics Chromium - комерційно адаптована Drop-Seq-платформа, що автоматизовано формує краплі з клітинами та штрихкодovаними бусинами для подальшого NGS-зчитування транскриптомів. Sphere Fluidics Cyto-Mine пропонує комплементарне рішення для

функціонального відбору клітин: формування крапель, інкубація з флуоресцентним субстратом і подальше сортування позитивних крапель за FACS-механізмом - основа спрямованої еволюції клітинних продуцентів [22].

У сегменті гнучких дослідницьких платформ найпоширенішими є модульні системи Fluigent LineUp і Drop-Seq, Elveflow OB1, Dolomite Mitos. Усі вони пропонують компонентну архітектуру з обмінними чипами, контролерами тиску та flow-сенсорами, що дозволяє адаптувати платформу під специфічні протоколи. Саме Fluigent Drop-Seq у пневматичній LineUp-конфігурації використано у поточній роботі як основу для модифікації DropSynth-протоколу [23].

Канонічним методичним джерелом для практичних протоколів роботи з краплинною мікрофлюїдиною у дослідницьких лабораторіях лишається Mazutis *et al.* (2013) [25]; сучасне оновлення з фокусом на високопропускні застосунки подано у Nan *et al.* (2024) [26].

1.5 *In silico* проєктування бібліотек

Програмно-алгоритмічна частина циклу синтезу бібліотек охоплює дизайн олігонуклеотидних фрагментів з заданої цільової послідовності, побудову штрихкодованих ідентифікаторів варіантів, *in silico* верифікацію та допоміжні застосунки. Цей блок безпосередньо передуює фізичному OLS-замовленню і має критичний вплив на якість кінцевого набору [27, 28].

1.5.1 Алгоритми дизайну олігонуклеотидів

Дизайн олігонуклеотидів для подальшого OLS-замовлення спирається на низку біохімічно-обґрунтованих обмежень [27].

Довжина фрагмента. Оптимальна довжина одного фрагмента для DropSynth-збірки становить 200-300 нт, що поєднує максимальну точність синтезу ($\approx 99,5\%$ на нуклеотид при ≤ 300 нт і градієнтне зниження вище) з достатньою кількістю перекривних регіонів для надійної oePCR-збірки 4-6-фрагментних конструктів [27].

Перекриття між сусідніми фрагментами. Стандартний дизайн передбачає 20-40-нт спільну послідовність із цільовою температурою плавлення 55-65 °C за класичною формулою Wallace або моделями Nearest-Neighbor. Перекриття

довжиною менше 15 нт дають нестабільне праймування при відпалі нижче 55 °C, а понад 50 нт - підвищують ризик internal hairpin-структур [27].

GC-склад. Цільовий діапазон 40-60% GC на фрагмент і на перекриття для уникнення термодинамічної нерівноваги, що ускладнює одночасний відпал усіх перекриттів у однореакторному ePCR. Регіони з GC нижче 30% або вище 70% зазвичай розбивають додатковим фрагментом [27].

Уникнення вторинних структур. Внутрішньомолекулярних hairpin, паліндромів, тандемних повторів довжиною понад 6 нт слід уникати. Спеціалізовані інструменти (Mfold, RNAfold) валідовують відсутність шпильок з ΔG нижче -5 ккал/моль при робочій температурі відпалу [27].

Унікальність штрихкодів. Для DropSynth-варіантів вимагається Hamming-відстань ≥ 3 між будь-якими двома 12-мерними штрихкодами, що гарантує захист від поодиноких помилок синтезу або секвенування і запобігає перехресному праймуванню між варіантами. Для понад 10^4 варіантів з'являється потреба у 14-мерних або довших штрихкодах зі сильнішим кодуванням [5, 3].

Алгоритми розбиття цільової послідовності на фрагменти діляться на два класи: жадібні (greedy) - швидкі, неоптимальні, придатні для коротких (до 600 нт) конструктів; динамічно-програмні (DP) - оптимальні за заданою цільовою функцією (мінімізація кількості фрагментів, балансування GC-складу між фрагментами, симетрія перекриттів), необхідні для конструктів понад 1000 нт або з GC-незрівноваженими регіонами [27, 28].

1.5.2 Сучасні програмні інструменти

DNAWorks [27] - один з перших і дотепер широко використовуваних інструментів для автоматизованого дизайну олігонуклеотидів для PCR-based збирання генів. Алгоритм приймає на вхід амінокислотну або нуклеотидну цільову послідовність і за заданими обмеженнями (довжина олігонуклеотида, температури плавлення, GC-склад) генерує мінімальний набір фрагментів зі заданими перекриттями. DNAWorks спочатку розроблений для класичних PCA-збірок 4-8-фрагментних конструктів, не оптимізований для

DropSynth-формату з штрихкодами, але залишається стандартним базовим інструментом для дизайну фрагментів у академічних лабораторіях.

j5 [28] - сучасний інструмент Joint BioEnergy Institute (JBEI), що автоматизує дизайн Gibson і Golden Gate-збірок з підтримкою модульних MoClo-фреймворків. На вхід приймає список цільових векторів-«рецептів» зі специфікованими частинами (промотори, RBS, CDS, термінатори) і повертає мінімально-вартісний план: список олігонуклеотидів для синтезу, наявні у репозиторіях частини, скрипти лабораторної автоматизації. j5 інтегровано у TeselaGen, Inscripta та інші комерційні платформи синтетичної біології.

Codon optimization tools. Для гетерологічної експресії білків з оптимізованим використанням кодонів у цільовому експресійному господарі застосовують IDT Codon Optimization Tool (онлайн, безкоштовний), GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher), CodonW (відкритий), DNA2.0 (комерційний). Більшість використовують Codon Adaptation Index (CAI) та uridine-tRNA-баланс як цільові функції [6].

1.5.3 *In silico* верифікація конструктів

Перед фізичним замовленням OLS і початком DropSynth-циклу всі дизайнерські варіанти проходять *in silico*-валідацію.

SnapGene (GSL Biotech) - найбільш поширений інструмент верифікації плазмідних конструктів з графічним інтерфейсом. Він автоматично анотує відкриті рамки зчитування (ORF), сайти рестрикції з повної бібліотеки NEB-ферментів, регуляторні елементи і повторні послідовності, а також підтримує *in silico* моделювання рестрикції-лігації, ПЛР і Gibson-збірки.

Benchling - хмарна платформа для спільної роботи над дизайном і верифікацією плазмід з лабораторно-інтегрованим LIMS-функціоналом. Вона підтримує накопичення історії версій конструктів і автоматизує реєстрацію конструктів у внутрішніх реєстрах, що корисно для розподілених команд та R&D-підрозділів з регуляторними вимогами щодо простежуваності.

NEBcutter (NEB) - швидкий онлайн-інструмент для перевірки наявності або відсутності сайтів конкретних рестриктаз у вхідній послідовності. Він охоплює

повний NEB-каталог ферментів, зокрема Nt.BspQI та BtsI-v2 - критичні для DropSynth-протоколу як сайти одноланцюгового розриву і внутрішньокраплинного відщеплення.

1.5.4 Застосування *in silico* процесів

Біоінформатична частина процесу DropSynth зосереджена у двох ключових моментах - на вході системи (дизайн бібліотеки) та на її виході (NGS-зчитування зібраних варіантів). Повну схему застосування DropSynth, що поєднує усі *in silico* та *in vitro* процеси, наведено на рисунку 1.3 [29].

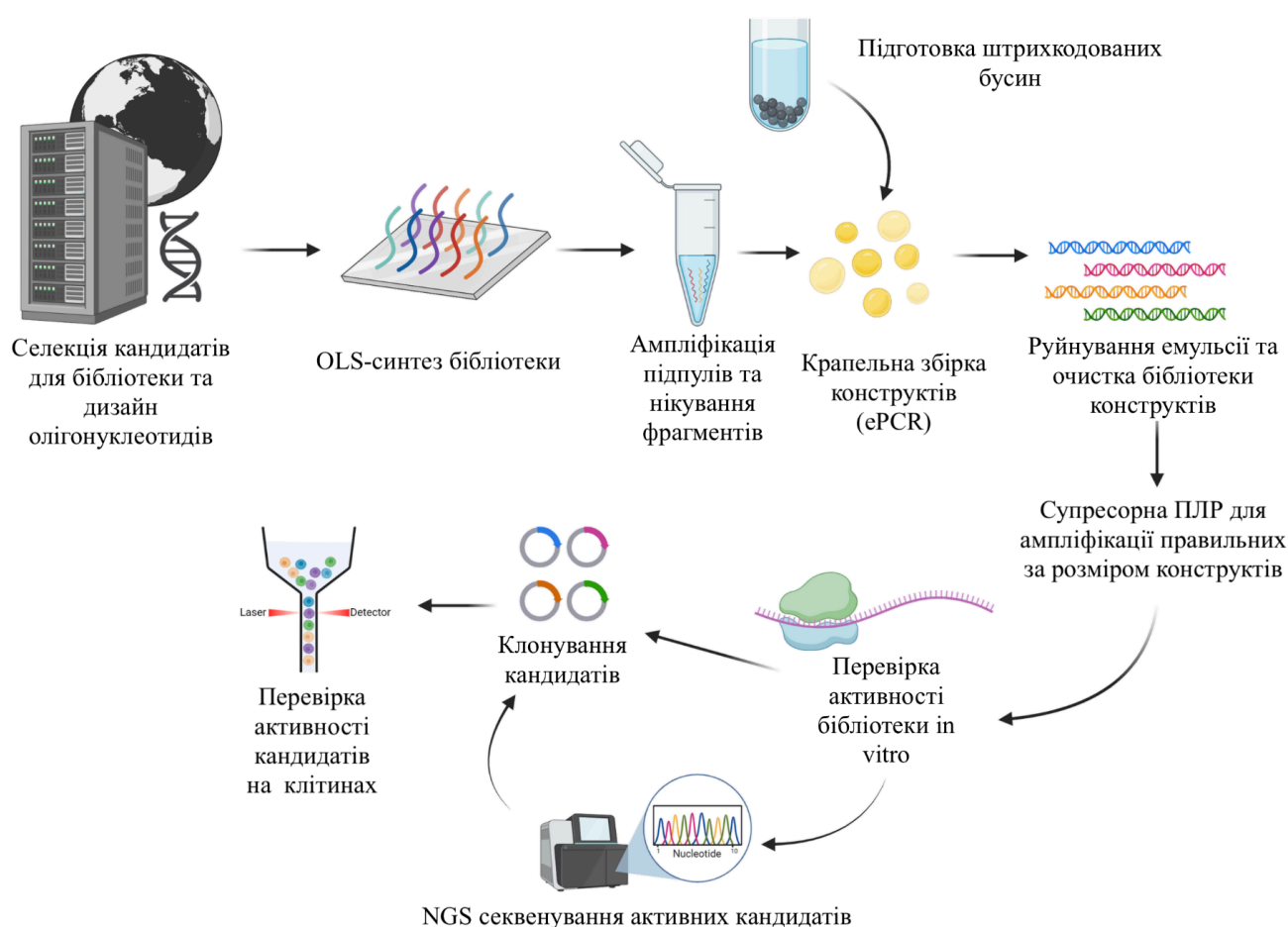


Рисунок 1.3 - Загальна схема процесу відбору з DropSynth-збіркою з поєднанням *in silico* етапів (дизайн бібліотеки, NGS-зчитування) з фізичною ePCR-збіркою у краплях і подальшою функціональною валідацією зібраних варіантів [29].

Дизайн бібліотеки виконується перед фізичним замовленням OLS і покриває три взаємопов'язані завдання. Перша - відбір цільових генів-кандидатів з

природних послідовностей або з результатів попередніх раундів еволюції; друга - розбиття кожного гена на 4-6 олігонуклеотидних фрагментів довжиною 200-300 нт за обмеженнями дизайну (довжина, GC-склад, відсутність вторинних структур); третя - генерація унікальних 12-нт штрихкодів зі заданою мінімальною Hamming-відстанню, що дозволяють однозначно ідентифікувати варіант на бусині та у наступному NGS-зчитуванні [5, 3].

NGS-зчитування зібраних варіантів реалізує зворотний зв'язок: повнорозмірні конструкти після DropSynth-збірки та функціонального відбору секвенуються на платформах Illumina або Oxford Nanopore, після чого зчитування демультіплексуються за штрихкодами, нормалізуються за глибиною покриття і зіставляються з функціональним сигналом. Результатом є карти відповідності послідовності та активності, які служать основою для подальших циклів спрямованої еволюції, механістичних висновків і аналізу структурно-функціональних взаємозв'язків [3].

Висновки до розділу 1

1. Розглянуто дворівневу організацію синтезу ДНК - хімічний синтез олігонуклеотидів і ферментативну збірку повнорозмірних конструктів - і показано, що фосфорамідитна хімія обмежує практичну довжину олігонуклеотида приблизно 300 нт, що робить збірку з фрагментів обов'язковою для генів нормальної довжини.

2. На основі порівняння методів збірки (T4-лігація, oePCR, Gibson Assembly, Golden Gate / MoClo) та OLS обґрунтовано вибір поєднання OLS + DropSynth + краплинна емульсійна ПЛР: класичні методи не масштабуються понад одиничні конструкти на реакцію, а комерційний синтез лишається дорогим у масштабі тисяч варіантів, тоді як краплинна ізоляція забезпечує паралельну збірку 384-1536 конструктів за вартістю 1-2 USD за конструкт.

3. Проаналізовано фізику краплинної мікрофлюїдики - число капілярності, режими утворення крапель, чип-геометрії, фторвуглецеві олії та PCR-сумісні сурфактанти - і встановлено, що стабільний dripping-режим на flow-focusing-чипі забезпечує монодисперсність, необхідну для пуассонівського завантаження бусин.

4. Розглянуто *in silico* етапи (дизайн фрагментів і штрихкодів, верифікація конструктів) як критичну передумову якості набору; виявлено основне обмеження класичної реалізації DropSynth - полідисперсність вихрового емульгування, що мотивує перехід до контрольованої мікрофлюїдної інкапсуляції, реалізований у цій роботі.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розділ описує реагенти, обладнання, програмний інструментарій, молекулярно-біологічні процедури, налаштування мікрофлюїдної платформи Fluidigm Drop-Seq та методи статистичного аналізу, застосовані у роботі.

2.1 Реагенти

Основні реагенти, безпосередньо використані в експериментах, описано у підрозділах 2.1.1-2.1.5. Повні специфікаційні таблиці винесено в Додаток А.

2.1.1 Олігонуклеотиди

Для протоколу DropSynth-V2-збірки використано три категорії олігонуклеотидів: ампліфікаційні праймери, штрихкод-олігонуклеотиди для іммобілізації на M-270 Streptavidin Dynabeads (у подальшому - штрихкодовані бусини) та шість синтетичних фрагментів-вставників [5].

Ампліфікаційні праймери включали універсальну пару skpp15-26-F (5'-GCGGCACCACAAACT-3', T_m 55,3 °C) і skpp15-26-R (5'-CGTGGCCTCTGTCCT-3', T_m 56,4 °C) для масової ампліфікації фрагментів за Q5-протоколом, та її біотинільований варіант skpp15-26-F-B з 5'-біотином для генерації біотинільованих ампліконів перед іммобілізацією на штрихкодованих бусинах. Для емульсійної збірки застосовано пару AsmF_40bpITR і AsmR_40bpITR з 40-нуклеотидним inverted terminal repeat (ITR) на 5'-кінцях, що забезпечує самокомплементарну hairpin-структуру коротких побічних продуктів під час супресорної ПЛР. Останню реалізовано single-primer-протоколом з Suppression_primer (5'-AGGTCTGGCCCTATATACGA-3'), що відповідає центральному фрагменту ITR [5].

Штрихкод-олігонуклеотиди формували триплет: Anchor_oligo (40 нт з 5'-подвійним біотином) для іммобілізації на стрептавідин, Ligation_oligo (20 нт з 3'-біотином і 5'-фосфорилуванням) для T4-лігації, та два використані в роботі варіанти Barcode_oligo_cp12mer-1 і cp12mer-2 (по 32 нт; з трьох доступних у Plesa-системі), що несуть власні 12-нуклеотидні штрихкодові послідовності CATATCAACGCC та TGTAGTGTTCCC для розрізнення наборів А і В відповідно [5].

Шість синтетичних фрагментів-вставників завдовжки рівно 300 нт кожен належали до двох сімейств каркасів: A1, A2, A3 - три кодон-варіанти каркаса iHRV-A57 (з штрихкодом cp12mer-1); B1, B2, B3 - три кодон-варіанти каркаса iHRV-B14 (з штрихкодом cp12mer-2). Усі фрагменти містили спільні фланкуючі ділянки: 5'-GCGGCACCACAAACT - cp12mer - GCTCTTCG - payload - CTGCAGGACAGAGGCCACG-3', що забезпечує сумісність зі skpp15-системою ампліфікаційних праймерів та BspQI/BtsI-системою рестрикційного звільнення [5].

Дизайн праймерів і штрихкод-олігонуклеотидів запозичено з відкритого реагентного набору DropSynth-V2 [5]. Повний перелік олігонуклеотидів з модифікаціями, молекулярними масами та посиланнями на каталожні номери постачальника наведено у Додатку Б (таблиця Б.1).

2.1.2 Ферменти і реакційні буфери

Ферменти молекулярної біології, застосовані у роботі, охоплюють ампліфікаційні полімерази, ферменти рестрикції та одноланцюгового розриву, а також ферменти модифікації кінців ДНК - лігази та кінази. Реакційні буфери підбирали згідно з рекомендаціями постачальника або, у випадку MDSMM, формували з маточних концентратів для збереження свободи варіювання добавок.

Усі ампліфікаційні стадії виконано з Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase (NEB), високоточною полімеразою з 3'-5' екзонуклеазною активністю, що забезпечує точність копіювання дизайн-послідовностей. Полімеразу, 5× Q5 Reaction Buffer та 10 mM dNTPs додавали окремо з маточних концентратів - таке рішення дозволяло варіювати концентрації добавок - бичачого сироваткового альбуміну (BSA) і Pluronic F-68 [17] - у MDSMM-рецептурі без модифікації буферної основи. У ролі еталонної альтернативи протестовано QX200 ddPCR EvaGreen Supermix без dUTP (Bio-Rad); результати порівняння подано далі [30].

Звільнення біотинільованих ампліконів від штрихкодів бусин здійснювали специфічним одноланцюговим розривом сайтом BspQI ферментом Nt.BspQI (NEB) у NEBuffer r3.1. Внутрішньокраплинне розщеплення штрихкоду

виконувала BtsI-v2 (NEB) - Type-IIS-рестриктаза з покращеною термостабільністю порівняно з оригінальним BtsI; *in vitro реакції контролю якості* з BtsI-v2 проводили у rCutSmart Buffer, а внутрішньокраплинне розщеплення - безпосередньо у MDSMM-буфері [30].

Збірка штрихкодovаних бусин залучала дві лігази на послідовних стадіях. T4 DNA Ligase (NEB) у 10× T4 DNA Ligase Reaction Buffer формувала початковий триплет Anchor + Ligation + Barcode на бусинах при гібридизаційних 16 °C. Taq DNA Ligase (NEB), термостабільна NAD⁺-залежна лігаза з оптимумом 45-65 °C, виконувала подальшу лігацію біотинільованих PCR-ампліконів до штрихкодovаних бусин при програмованому зниженні температури від 50 до 10 °C. Перед лігацією 5'-кінці штрихкод-послідовностей фосфорильовали T4 Polynucleotide Kinase (NEB) [30].

Повний перелік ферментів і реакційних буферів з каталожними номерами, концентраціями маточних препаратів та умовами зберігання наведено у Додатку Б (таблиця Б.2).

2.1.3 Реагенти емульсії

Емульсійні реагенти забезпечували формування і подальше руйнування W/O-крапель на Fluidigent Drop-Seq-чипі, а також стабілізацію емульсії під час термоциклювання у PCR-пробірках.

Неперервну олійну фазу у всіх запусках мікрофлюїдного утворення крапель формувала QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen (Bio-Rad, 1864005) - комерційний препарат на основі HFE-7500-фторованої олії з вбудованою PFPE-PEG-сурфактантною системою. Мінеральна олія Sigma M5310-100ML (light oil, BioXtra grade, придатна для культивування ембріонів миші) виконувала окрему допоміжну функцію: слугувала термостабільним верхнім шаром у PCR-пробірках під час термоциклювання, пригнічуючи випаровування водної фази та зменшуючи гетерогенність крапель за рахунок вирівнювання теплопередачі [24].

Руйнування емульсії після завершення ePCR здійснювали додаванням 1H,1H,2H,2H-перфторо-1-октанолу (PFO; Sigma, 370533-5G) у співвідношенні 1:1

до реакційного об'єму з подальшим короткочасним вихровим струшуванням і центрифугуванням для розділення фаз і відбору водної фракції.

Промивання тракту Fluigent Drop-Seq та внутрішніх каналів PDMS-чипа від залишків олії після кожного запуску виконували ізопропанолом (IPA, 99,9%).

Повний перелік реагентів емульсії з каталожними номерами та умовами зберігання наведено у Додатку Б (таблиця Б.3).

2.1.4 Реагенти електрофорезу і PAGE

Для гель-електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот у роботі застосовували три типи гелів: агарозний гель-електрофорез (AGE) з 1% агарози у $1\times$ TBE-буфері - для верифікації PCR-продуктів та підтвердження збірки повнорозмірних конструктів; нативний поліакриламідний гель-електрофорез (Native PAGE) з відношенням акриламід:бісакриламід 29:1 - для розділення натуральних форм ДНК; та денатуруючий поліакриламідний (Urea-PAGE) з відношенням 19:1 і 8 М сечовини - для розділення штрихкод-олігонуклеотидів і одноланцюгових продуктів. Перелік основних реагентів наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 - Реагенти для гель-електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот

№	Реагент	Призначення
1	Агароза	Матриця AGE-гелю (1% у $1\times$ TBE)
2	$5\times$ TBE маточний буфер	Робочий буфер AGE та PAGE
3	Acrylamide:Bisacrylamide 29:1, 30% T	Матриця нативного PAGE
4	Acrylamide:Bisacrylamide 19:1, 30% T	Матриця Urea-PAGE
5	TEMED	Каталізатор полімеризації
6	10% APS	Ініціатор полімеризації
7	Сечовина	Денатурант (8 М у Urea-PAGE)
8	DNA-фарба (EtBr)	Візуалізація ДНК у гелі
9	Маркери ДНК (1 kb plus, 100 bp, Low Range)	Розмірні маркери
10	Буфер для нанесення	Буфери для нанесення

5× TBE-маточний буфер готували безпосередньо перед роботою з розрахунку 54 г Tris base, 27,5 г борної кислоти та 20 мл 0,5 М етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) pH 8,0 на 1 л - без титрування pH. Формамідний буфер для нанесення для денатуруючого PAGE складався з 80% HiDi Formamide, 10 mM EDTA та слідів Bromphenol Blue. Розширений перелік реагентів з каталожними номерами та умовами зберігання наведено у Додатку Б (таблиця Б.4).

2.1.5 Бусини і допоміжні реагенти

Підрозділ охоплює бусини для іммобілізації штрихкод-олігонуклеотидів, очищення PCR-продуктів та допоміжні реагенти для кількісної оцінки ДНК.

Іммобілізацію штрихкод-олігонуклеотидів виконували на M-270 Streptavidin Dynabeads (Invitrogen, 65305) - парамагнітних монодисперсних бусинах діаметром 2,8 мкм з ковалентно приєднаним стрептавідином, що забезпечує специфічне зв'язування біотинільованих олігонуклеотидів. 2× B&W (Bind & Wash) буфер з фінальним складом 2 М NaCl, 1 mM EDTA і 10 mM Tris-HCl pH 7,5 готували безпосередньо перед роботою з розрахунку 4,675 г NaCl, 400 мкл 1 М Tris pH 7,5 (Invitrogen UltraPure) і 80 мкл 0,5 М EDTA pH 8,0 (Invitrogen UltraPure) на 40 мл; буфер слугував як для тримикратного промивання маточних Dynabeads перед іммобілізацією, так і для подальших промивальних циклів. Елюцію готового штрихкод-олігонуклеотидного кон'югата з бусин здійснювали у Qiagen Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5) [31].

Очищення PCR-продуктів та продуктів збірки виконували AmpliClean Magnetic Beads (NimaGen) - твердофазній парамагнітній іммобілізації (SPRI)-системою на основі парамагнітних бусин з полімерним покриттям, що дозволяє селективне зв'язування фрагментів ДНК понад 100 пн за принципом ПЕГ-NaCl-зумовленої агрегації.

Кількісну оцінку дволанцюгової ДНК на всіх етапах роботи виконували Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit (Invitrogen) - флуориметричним методом з готовим 1× premixed реагентом [31].

Повний перелік бусин і допоміжних реагентів з каталожними номерами та умовами зберігання наведено у Додатку Б (таблиця Б.5).

2.2 Обладнання

Обладнання розділене на загальнолабораторне та спеціалізовану мікрофлюїдну платформу Fluigent Drop-Seq.

2.2.1 Загальнолабораторне обладнання

Спеціалізоване обладнання для технології DropSynth охоплювало PCR-термоциклер Applied Biosystems ProFlex з градієнтним блоком, флуориметр Qubit 4 для кількісної оцінки дволанцюгової ДНК, гель-документатор Azure Biosystems Gel Imager 200 для зйомки AGE та PAGE-гелів, гемоцитометр Improved Neubauer для підрахунку штрихкодovаних бусин у робочих розчинах, термомікшер з поєднанням нагрівання та перемішування для тривалих стадій підготовки бусин, Hula Mixer (Thermo Fisher) для гомогенізації штрихкодovаних бусин у резервуарній пробірці під час мікрофлюїдного запуску, а також аналітичні ваги для гравіметричного калібрування Flow Units.

Оптичний супровід мікрофлюїдної генерації забезпечували дві мікроскопні системи з розділеними функціями. Інвертований мікроскоп Euromex Oxion з док-станцією, що утримує Fluigent-кит разом із PDMS-чипом безпосередньо над об'єктивом, у поєднанні з камерою Basler acA1920-40uc забезпечував моніторинг утворення крапель в реальному часі під час запуску. Мікроскоп EVOS FL Auto 2 з лічильними слайдами Luna застосовували для післяемульсійної візуалізації крапель та подальшого автоматизованого вимірювання діаметрів і CV у DropDrop-робочому процесі.

Загальнолабораторну підтримку забезпечували центрифуги MiniSpin (Eppendorf) для коротких відцентрифугувань та FVL-2400N (Biosan) для поєднання вихрового струшування й відцентрифугування, набір автоматичних піпеток Eppendorf Research Plus діапазону P10-P5000, холодильник з відсіками +4 °C і -20 °C, а також система отримання ультрачистої води Direct-Q (Millipore, Type I).

Повний перелік обладнання з моделями, постачальниками та характеристиками наведено у Додатку Б (таблиця Б.6).

2.2.2 Мікрофлюїдична система Fluigent Drop-Seq

Платформа Fluigent Drop-Seq об'єднувала генерування W/O-крапель, точне регулювання витрати трьох робочих рідин та високошвидкісне оптичне захоплення процесу в реальному часі. Формування емульсії виконувалось у спеціально виготовленій формі - чипі, зробленому з полімеру PDMS; схему чипа зображено на рисунку 2.1 [23].

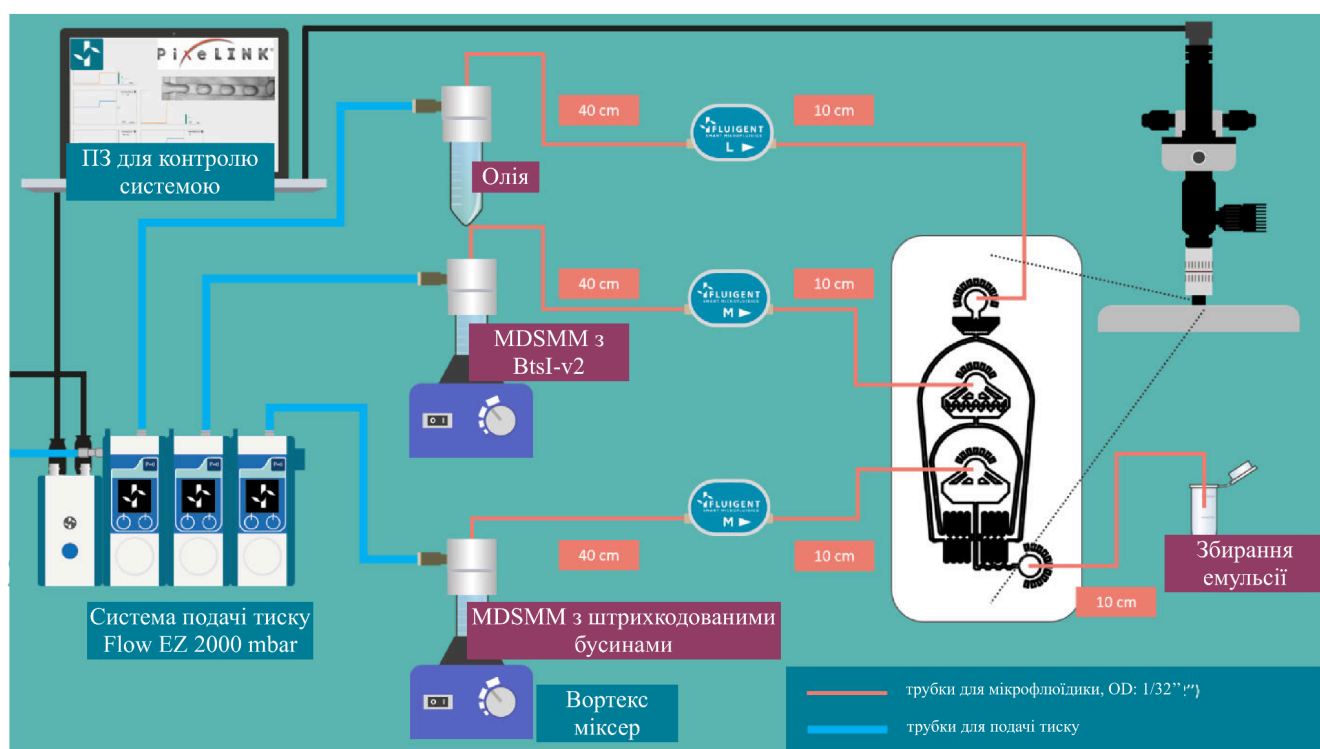


Рисунок 2.1 - Загальна схема Fluigent Drop-seq набору [23]

Тиском у кожному з трьох каналів - олійному (Channel 1), BtsI-v2 у MDSMM (Channel 2) та штрихкованих бусин у MDSMM (Channel 3) - керували окремими контролерами LineUp Flow EZ з робочим діапазоном до 2000 мбар, що працювали у режимі замкненого регулювання за командою тиску (Pcmd) або витрати (Qcmd). Зворотний зв'язок забезпечували термальні сенсори Flow Unit - FU-M (діапазон 0-80 мкл/хв) для водних каналів і FU-L (діапазон 0-1 мл/хв) для олійного каналу - з власним калібруванням під робочі рідини, виконаним окремо для олійної і

водної фаз. Подачу стисненого повітря на резервуарні пробірки забезпечували Р-Сар-ущільнювачі у поєднанні з LineUp Supply Kit (Fluigent, LU-SPK-0002), а гідравлічне з'єднання вузлів - Tubing & Fitting Kit. Комутацію контролерів і сенсорів виконував модуль LineUp LINK [23].

Утворення крапель відбувалось у комерційно готовому полідиметилсилоксановому (PDMS) чипі Drop-Seq із flow-focusing-геометрією; схему чипа зображено на рисунку 2.2. Промивання каналів після кожного запуску здійснювали ізопропанолом [23].

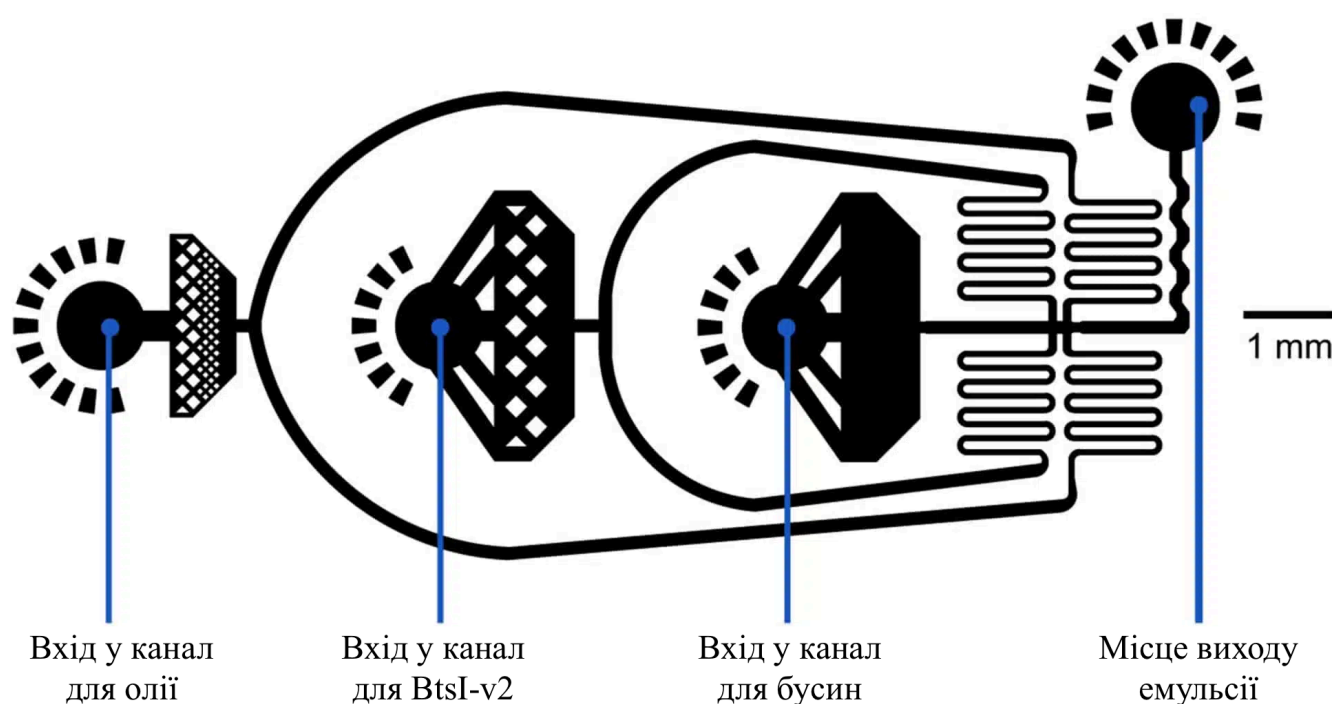


Рисунок 2.2 - Схема мікрофлюїдного PDMS-чипа Drop-Seq із flow-focusing-геометрією

Оптичний канал реалізовано камерою Basler ace acA640-750um (USB 3.0, монохромна матриця, нативна роздільна здатність 640×480 пікселів). У роботі камеру конфігурували на захоплення повних кадрів 480×128 пікселів із частотою близько 2 кГц. Камеру монтували на док-станцію інвертованого мікроскопа Euromex Oxion над PDMS-чипом, що забезпечувало моніторинг геометрії крапель у реальному часі у момент генерації; програмний шар захоплення та пост-обробки відеопотоку був PylonGuy [32].

Технічні характеристики компонентів платформи Fluigent Drop-Seq наведено у Додатку Б (таблиця Б.7).

2.3 Програмний інструментарій

Програмний інструментарій роботи розподілено між статистичним аналізом, обробкою даних, керуванням мікрофлюїдною платформою та інтерфейсом до оптичної камери. Перелік основних інструментів наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 - Програмний інструментарій платформи DropSynth 2.0 [1, 32]

№	Інструмент	Призначення
1	R / RStudio	Статистичний аналіз і побудова графіків
2	Python / uv	Середовище для програм і обробки даних
3	DropDrop	Сегментація крапель на післяемульсійних знімках
4	DropleGEN	Керування Fluigent Drop-Seq у реальному часі
5	PylonGuy	Захоплення відеопотоку з камери Basler
6	DropSynth design code	Дизайн праймерів і штрихкод-олігонуклеотидів

Розроблені пакети DropDrop, DropleGEN і PylonGuy реалізовано на Python з використанням Cellpose 3.0 для сегментації, PySide6 для графічного інтерфейсу користувача (GUI) та pyruylon для апаратного шару камери Basler; усі три розповсюджені під MIT-ліцензією. Деталізовану архітектуру, API (application programming interface)-довідник і допоміжні утиліти командного рядка наведено у Додатку Д [33].

2.4 Молекулярно-біологічні процедури

Підрозділи 2.4.1-2.4.7 описують процедури DropSynth в робочому порядку: Q5-ампліфікація шести фрагментів, *in vitro* рестрикційний аналіз, підготовка штрихкодіваних бусин із кількісним підрахунком, емульсійна ПЛР за DropSynth-V2-протоколом, супресорна ПЛР для збагачення моноклональної фракції, очищення продукту й гель-електрофорез з PAGE-аналізом.

2.4.1 Q5-ампліфікація фрагментів

Шість синтетичних фрагментів (A1, A2, A3 у складі каркаса iHRV-A57 та B1, B2, B3 - iHRV-B14) ампліфікували окремо за стандартним протоколом NEB M0491 для Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase у форматі 25 мкл. Прямим праймером слугував біотинільований skpp15-26-F-B, реверсним - немодифікований skpp15-26-R; кожен - з маточного концентрату 10 мкМ. Склад реакційної суміші наведено у таблиці 2.3 [5].

Таблиця 2.3 - Склад реакційної суміші Q5-ампліфікації фрагментів (25 мкл) [3, 5]

№	Компонент	Об'єм, мкл	Кінцева концентрація
1	Безнуклеазна вода	15,75	-
2	5× Q5 Reaction Buffer	5,00	1×
3	10 mM dNTPs	0,50	200 мкМ кожного
4	10 мкМ skpp15-26-F-B	1,25	0,5 мкМ
5	10 мкМ skpp15-26-R	1,25	0,5 мкМ
6	Плазмідна матриця (10-20 нг/мкл)	1,00	0,4-0,8 нг/мкл
7	Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase	0,25	0,02 од/мкл

Термоциклювання виконували на Applied Biosystems ProFlex за програмою:

1. 30 с 98 °С початкова денатурація
2. 10 с 98 °С денатурація
3. 20 с 55 °С відпал
4. 30 с 72 °С елонгація
5. Перехід до кроку 2, 25 циклів
6. 2 хв 72 °С фінальна елонгація
7. Утримання за 4 °С

Температура відпалу 55 °С обрана за середнім T_m -розрахунком для пари skpp15-26-F-B/R (55,3 і 56,4 °С відповідно).

PCR-продукти очищали AmpliClean Magnetic Beads та оцінювали кількісно Qubit dsDNA BR; виходи окремих фрагментів подано далі.

2.4.2 Рестрикційний аналіз

Підрозділ описує два незалежні *in vitro* рестрикційні протоколи: одноланцюговий розрив біотинільованих PCR-продуктів ферментом Nt.BspQI для звільнення довгого 3'-фрагменту перед іммобілізацією на штрихкодovаних бусинах, та контрольну BtsI-v2-реакцію на плазмідній матриці зі вбудованим штрихкод-сайтом - для верифікації сумісності ферменту з добавками MDSMM (Pluronic F-68 і BSA) [5].

Одноланцюговий розрив Nt.BspQI виконували у 50-мікролітровому форматі за адаптацією протоколу Plesa *et al.* (2018): 5 мкл 10× NEBuffer 3.1, 2 мкл Nt.BspQI (10 од/мкл, NEB) та 43 мкл біотинільованого PCR-продукту (~1-2 мкг ДНК). Реакцію інкубували при 50 °C впродовж ночі з постійним перемішуванням ≥ 1500 об/хв на термомікшері. Утворений короткий 5'-біотинільований фрагмент видаляли наступним кроком захоплення на бусини, а довгий 3'-фрагмент перенаправляли до іммобілізації на штрихкодovаних бусинах [5].

Контрольну BtsI-v2-реакцію проводили на плазмідній матриці pUC19_cp12mer-1 (з вбудованим штрихкод-сайтом) у 10-мікролітровому форматі для серії концентрацій Pluronic F-68 (0, 1, 2,5 і 5%) у присутності 1× Q5 Reaction Buffer + 1,4% BSA. Базова реакція містила 1 мкл матриці (~400 нг), 0,7 мкл BtsI-v2 (5 од/мкл, NEB), 1 мкл 10× Q5 Reaction Buffer, 0,7 мкл 20 мг/мл BSA, відповідний об'єм 10% Pluronic F-68 і безнуклеазну воду до 10 мкл. Інкубація - 55 °C впродовж 1 год. Як позитивний контроль паралельно виконували реакцію у rCutSmart Buffer без добавок [3].

Продукти обох реакцій аналізували на 1% TBE-агарозному гелі. Кількісну оцінку повноти одноланцюгового розриву та обговорення BtsI-v2-сумісності подано далі.

2.4.3 Підготовка штрихкодovаних бусин і їх підрахунок

Підготовка штрихкодovаних бусин охоплює три послідовні стадії: збірку штрихкод-олігонуклеотидного триплету (Anchor + Ligation + Barcode)

безпосередньо на стрептавідин-бусинах, кількісну оцінку отриманого продукту, а також подальшу ковалентну прикріплення довгого 3'-фрагменту PCR-продукту з одноланцюговим розривом до готових штрихкодів бусин - як підготовку до DropSynth-збірки [5, 3].

Збірку триплету здійснювали у двох незалежних наборах - BRD1 (для Набір A: A1 + A2 + A3) і BRD2 (для Набір B: B1 + B2 + B3) - за адаптованим Plesa-протоколом мікрочіп-штрихкодування. Гібридизацію Anchor_oligo + Ligation_oligo + Barcode_oligo_cp12mer виконували у 1× T4 DNA Ligase Reaction Buffer за програмою 70 °C протягом 3 хв, далі 60, 50, 40 і 30 °C по 1 хв на кожен крок (градієнт 0,1 °C/с), з подальшим переносом на лід. Лігацію T4 DNA Ligase проводили при 16 °C впродовж ≥ 1 год з 20-хвилинною інактивацією за 65 °C. 5'-фосфорилування штрихкод-послідовностей виконували T4 Polynucleotide Kinase (37 °C, 40 хв; інактивація 65 °C, 20 хв). Імобілізацію на M-270 Streptavidin Dynabeads (тричі промитих у 2× B&W) здійснювали впродовж ночі при кімнатній температурі з перемішуванням ≥ 2000 об/хв на термомікшері; далі п'ять циклів промивання 2× B&W і повторне суспендування у тому ж буфері для зберігання за +4 °C [3].

Концентрацію штрихкодів бусин c_{bead} у робочих розчинах визначали за гемоцитометром Improved Neubauer безпосередньо перед запуском мікрофлюїдної генерації, що забезпечувало точне налаштування цільового параметра Пуассона λ . Середнє завантаження олігонуклеотидів на реакційний об'єм оцінювали TotalLAB-денситометрією Urea-PAGE-елюатів 80%-формамідної фракції штрихкод-олігонуклеотидів.

Завантаження штрихкодів бусин PCR-продуктами з одноланцюговим розривом виконували Taq DNA Ligase у 100-мікролітровому форматі: 25 мкл маточного препарату штрихкодів бусин, 18,75 мкл PCR-продукту з одноланцюговим розривом, 10 мкл 10× Taq DNA Ligase Reaction Buffer, 4 мкл Taq DNA Ligase (40 од/мкл, NEB) і 42,25 мкл безнуклеазної води. Температурна програма зниження виконувалася впродовж робочого дня: 50 °C протягом 2,5 год, далі 40 °C (2 год), 30 °C (2 год), 20 °C (1 год) і 10 °C (1 год), з подальшим

утриманням за 4 °С. Після завершення лігації штрихкодовані бусини промивали тричі у 2× B&W при 4 °С і двічі при кімнатній температурі, а потім повторно суспендували у Qiagen Elution Buffer для введення в емульсійну ПЛР [3].

2.4.4 Емульсійна ПЛР (DropSynth V2)

Емульсійну ПЛР за адаптованим DropSynth-V2-протоколом виконували у триканальній конфігурації Fluigent Drop-Seq з внутрішньокраплинним рестрикційним розщепленням штрихкоду на бусинах та подальшою overlap-extension-збіркою повнорозмірного конструкту у моноклональних краплях [3].

Три канали мікрофлюїдного утворення крапель несли різні робочі рідини: Channel 1 - неперервна олійна фаза (QX200 EvaGreen Generation Oil), Channel 2 - BtsI-v2 у MDSMM, Channel 3 - штрихкодовані бусини з прикріпленими PCR-фрагментами (Набір А та Набір В у співвідношенні 1 : 1) у MDSMM. Робочі витрати: $Q_{Oil} = 300$ мкл/хв, $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв; VOF-обґрунтування наведено далі [3].

Модифікований DropSynth Master Mix (MDSMM), що формував водну фазу обох водних каналів, готували безпосередньо перед запуском з маточних компонентів. Склад базової рецептури MDSMM наведено у таблиці 2.4 [3].

Таблиця 2.4 - Склад модифікованого DropSynth Master Mix (MDSMM)

№	Компонент	Об'єм, мкл	Кінцева концентрація
1	5× Q5 Reaction Buffer	5,00	1×
2	10 mM dNTPs	0,50	200 мкМ кожного
3	10 мкМ AsmF_40bpITR	1,25	0,5 мкМ
4	10 мкМ AsmR_40bpITR	1,25	0,5 мкМ
5	20 мг/мл BSA	0,25	0,2 мг/мл
6	10% Pluronic F-68	6,25	2,5%
7	Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase	0,25	0,02 од/мкл

До базової MDSMM додавали 1 мкл BtsI-v2 (5 од/мкл, NEB; фінальна концентрація 0,2 од/мкл) у Channel-2-варіанті або ~7,5 мкл штрихкодovаних бусин у робочому розведенні ($c_{\text{bead}} \approx 400$ бусин/мкл) у Channel-3-варіанті; решту об'єму доповнювали безнуклеазною водою до 25 мкл.

Згенеровану на чипі емульсію розподіляли по тонкостінних 200-мкл PCR-пробірках (50-100 мкл емульсії на пробірку) з верхнім шаром мінеральної олії Sigma M5310 (50 мкл) для пригнічення випаровування під час термоциклювання. Програма термоциклера Applied Biosystems ProFlex:

1. 90 хв 55 °C внутрішньокраплинне BtsI-v2-розщеплення штрихкоду на бусинах
2. 30 с 98 °C початкова денатурація
3. 10 с 98 °C денатурація
4. 20 с 55 °C відпал
5. 45 с 72 °C елонгація
6. Перехід до кроку 3, 30 циклів
7. 2 хв 72 °C фінальна елонгація
8. Утримання за 4 °C

Після завершення термоциклювання емульсію руйнували додаванням 1Н,1Н,2Н,2Н-перфторо-1-октанолу (PFO) у 1 : 1-співвідношенні до реакційного об'єму з 1-хвилинним вихровим струшуванням і центрифугуванням при 15 500 g впродовж 10 хв; відбирали верхню водну фазу для подальшого очищення і супресорної ПЛР [3].

2.4.5 Супресорна ПЛР

Супресорна ПЛР збагачує фракцію повнорозмірних коректно зібраних конструктів через ефект самокомплементарних ITR-кінців: короткі побічні продукти утворюють внутрішньомолекулярні hairpin-структури, що пригнічують їхню ампліфікацію, тоді як повнорозмірний продукт уникає hairpin-конкуренції через достатню відстань між ITR-кінцями. Принцип і реалізацію single-primer-протоколу з 40-нуклеотидним ITR на 5'-кінцях AsmF/AsmR-праймерів запозичено з DropSynth-V2 (Plesa *et al.*, 2018) [5].

Реакцію виконували у 25-мікролітровому форматі з 1-5 мкл нерозбавленого водного екстракту після емульсійної PCR; оскільки вихід критично залежить від цілісності крапель, додаткове розведення матриці зменшувало б ефективність ампліфікації. Склад реакції наведено у таблиці 2.5 [5].

Таблиця 2.5 - Склад реакційної суміші супресорної ПЛР (25 мкл) [3]

№	Компонент	Об'єм, мкл	Кінцева концентрація
1	Безнуклеазна вода	12,25	-
2	5× Q5 Reaction Buffer	5,00	1×
3	10 mM dNTPs	0,50	200 мкМ кожного
4	10 мкМ Suppression_primer	2,00	0,8 мкМ
5	Водний екстракт після ePCR	5,00	-
6	Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase	0,25	0,02 од/мкл

Термоциклювання виконували на Applied Biosystems ProFlex:

1. 3 хв 95 °C початкова денатурація (продовжена для розплавлення ITR-hairpin-структур у матриці)
2. 15 с 98 °C денатурація
3. 30 с 55 °C відпал
4. 15 с 72 °C елонгація
5. Перехід до кроку 2, 25 циклів
6. 1 хв 72 °C фінальна елонгація
7. Утримання за 4 °C

Продукти супресорної ПЛР очищали AmpliClean Magnetic Beads та аналізували на 1% ТВЕ-агарозному гелі; повнорозмірний конструктор (~700 пн для Набір А і Набір В) очікувано виявлявся як домінантна смуга з мінімальним фоном коротких побічних продуктів.

2.4.6 Очищення ДНК

Очищення PCR-продуктів та продуктів збірки виконували SPRI-протоколом з AmpliClean Magnetic Beads (NimaGen) за рекомендаціями виробника. До зразка додавали AmpliClean у співвідношенні 1,8 : 1 за об'ємом, перемішували піпеткою та інкубували при кімнатній температурі впродовж 3-5 хв; магнітна сепарація 2 хв, відведення надосадової рідини; двократне промивання 150 мкл свіжоприготованого 70% етанолу з 30-секундною інкубацією між циклами; підсушування на повітрі ≤ 5 хв; елюція 40 мкл 1× TE-буфера (10 mM Tris-Acetate pH 8,0, 1 mM EDTA) з піпетним перемішуванням і подальшою магнітною сепарацією 1 хв; перенесення елюату у чисту пробірку. Спостережений вихід - близько 54%, що відповідає типовому показнику SPRI-протоколу для ампліконів розміром понад 100 пн

2.4.7 Гель-електрофорез і PAGE

Агарозний гель-електрофорез (AGE) виконували на 1% агарозі у 1× TBE-буфері з фарбою EtBr; зразки готували з 6× DNA Gel Loading Dye та розділяли при 100 В постійного струму впродовж 30-45 хв. Розмірними маркерами слугували 1 kb plus та 100 bp DNA-маркери; візуалізацію проводили на гель-документаторі Azure Biosystems Gel Imager 200. AGE застосовували для верифікації PCR-продуктів та підтвердження збірки конструктів A і B.

Нативний PAGE формували з 10% Т акриламід:бісакриламід 29:1 у 1× TBE-буфері: гелева суміш на 8 мл - 2666,7 мкл маточного розчину AA (30% Т 2,67% С), 800 мкл 10× TBE, 5600 мкл dH_2O , 40 мкл 10% персульфату амонію (APS), 4 мкл N,N,N',N'-тетраметилетилендіаміну (TEMED), товщина 1 мм. Попередній прогін проводили 30 хв за 50 В у 0,5× TBE, основний прогін - 100 В у 0,5× TBE з фарбуванням EtBr. Native PAGE застосовували для розділення нативних форм фрагментів A1-A3, B1-B3 та контрольних BtsI-v2-продуктів.

Денатуруючий Urea-PAGE формували з 10% Т акриламід:бісакриламід 19:1 у 2× TBE-буфері з 8 М сечовиною: гелева суміш на 7 мл - 2333,3 мкл маточного розчину AA, 1400 мкл 5× TBE, 3,36 г сечовини, безнуклеазна вода до об'єму, 35 мкл 10% APS, 3 мкл TEMED, товщина 0,75 мм. Попередній прогін та основний

прогін виконували при 250 В постійного струму у $1 \times$ TBE-буфері; зразки готували з Formamide loading dye (80% HiDi Formamide, 10 мМ EDTA, Bromphenol Blue) з денатурацією при 95 °С впродовж 3 хв. Urea-PAGE застосовували для аналізу штрихкод-олігонуклеотидних кон'югатів і TotalLAB-денситометрії середнього завантаження штрихкодіваних бусин.

2.5 Налаштування мікрофлюїдної платформи

У підрозділі описано підготовчі процедури для роботи Fluidigm Drop-Seq: гравіметричне калібрування Flow Units, вибір робочого режиму утворення крапель та розрахунок дизайну завантаження штрихкодіваних бусин за розподілом Пуассона.

2.5.1 Калібрування Flow Units

Термальні сенсори Flow Unit реагують на питому теплоємність і густину прокачуваної рідини, тому стандартне заводське калібрування (на дистильованій воді) дає значне відхилення для фторованих олій і водних розчинів з добавками. Для кожної робочої рідини виконували власне калібрування перед запуском мікрофлюїдної генерації [23].

Гравіметричне калібрування виконували за методикою, описаною в користувацькому посібнику Fluidigm Flow Unit / Flowboard [48], у режимі визначеного об'єму. У OxyGEN задавали цільовий об'єм дозування $V_{cmd} = 100$ мкл при робочій витраті Q_{cmd} ; контролер автоматично припиняв прокачування, щойно інтегральне показання сенсора FU досягало V_{cmd} . Витік збирали у попередньо таровану 2-мілілітрову collection-пробірку на аналітичних вагах; реальний дозований об'єм обчислювали як $V_{real} = \Delta m / \rho$, де Δm - масовий приріст пробірки, ρ - табличне значення густини рідини за літературними моделями [34]. Коефіцієнт корекції $k = V_{real} / V_{cmd}$ вводили у поле Set channel parameters OxyGEN як лінійний а-член поліноміальної функції $f(x) = ax + bx^2 + cx^3$; досліджувані рідини демонстрували лінійну реакцію сенсора у робочому діапазоні, тому b- і c-члени не залучали.

Калібровку виконано для двох робочих рідин у двох незалежних реалізаціях. Олійну фазу (QX200 EvaGreen Generation Oil) калібрували на FU-L при робочому

потоці 250 мкл/хв з густиною $\rho = 1,604$ кг/л; для усунення зміщення, зумовленого мертвим об'ємом трубок, виконували три повторності на кожне тестове значення коефіцієнта. Водну фазу (MDSMM) калібрували на FU-M і FU-L при робочих потоках 40 і 67 мкл/хв з $\rho = 1,000$ кг/л за тим самим протоколом. Кінцеві значення поліноміальних коефіцієнтів обох фаз подано далі [23].

2.5.2 Робочий режим утворення крапель

Робочий режим утворення крапель характеризується сталими витратами трьох вхідних каналів: $Q_{Oil} = 300$ мкл/хв для неперервної олійної фази (Channel 1) та $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв для дисперсних водних каналів (Channels 2 і 3). За обраних параметрів потоку усталений діаметр крапель становить близько 120 мкм ($V_{drop} \approx 0,8$ нл) при частоті утворення близько 2-4 кГц.

Якість утворення крапель контролювали у двох незалежних оптичних шляхах. У реальному часі під час запуску знімали відеопотік утворення крапель безпосередньо на Drop-Seq-чипі камерою Basler ace acA640-750um, встановленою на док-станції інвертованого мікроскопа Euromex Oxion, із частотою близько 2 кГц та кадром 480×128 пікселів через програмний шар PylonGuy. Післяемульсійний контроль виконували нанесенням аліквоту емульсії на одноразовий слайд LUNA Cell Counting Slide for Brightfield Cell Counters з подальшою зйомкою на мікроскопі EVOS FL Auto 2 та автоматизованим вимірюванням діаметрів і CV у DropDrop.

2.5.3 Дизайн завантаження штрихкодovаних бусин за Пуассоном

Дизайн завантаження штрихкодovаних бусин у краплі базується на розподілі Пуассона: ймовірність потрапляння рівно k бусин у краплю обсягом V_{drop} за середньої концентрації c_{bead} описується законом $P(k) = e^{(-\lambda)} \cdot \lambda^k / k!$, де середнє число бусин на краплю $\lambda = c_{bead} \cdot V_{drop}$. За усталеного діаметра крапель близько 120 мкм робоча концентрація штрихкодovаних бусин $c_{bead} \approx 400$ бусин/мкл обиралась за оцінкою, що забезпечує очікувані фракції приблизно 74% порожніх крапель, 23% моноклональної та 3% поліклональної фракції - компроміс, що максимізує моноклональний вихід при допустимому рівні поліклонального фону. Скрипт оцінки і прогнозу λ для серії розведень наведено у Додатку Д [3].

Робочу концентрацію штрихкодovаних бусин отримували серійним розведенням маточного препарату у 2× В&W-буфері з окремими серіями для Набір А і Набір В та подальшим змішуванням у співвідношенні 1 : 1 безпосередньо перед запуском. Концентрацію верифікували на гемоцитометрі Improved Neubauer на кожному етапі. Під час самого запуску резервуарну пробірку з бусинами утримували на Hula Mixer (Thermo Fisher) у режимі м'якого нахилу-обертання - це підтримувало гомогенну суспензію та сталу локальну C_{bead} на послідовних аліквотних відборах.

2.6 Статистичний аналіз

Коефіцієнт варіації (CV) розподілу діаметрів крапель визначався як відношення стандартного відхилення σ до середнього μ у відсотках: $CV = \sigma / \mu \cdot 100\%$. Для випадків з потенційно ненормальним розподілом діаметрів додатково обчислювали стійку форму $CV_r = MAD / \text{медіана} \cdot 100\%$, де MAD (median absolute deviation) - медіанне абсолютне відхилення. Обидва показники автоматизовано у DropDrop для післяемульсійних вимірювань на знімках EVOS FL Auto 2; вихідний код наведено у Додатку Д.

Інтерпретація CV для класифікації якості емульсії: $CV < 10\%$ - монодисперсна емульсія, придатна для кількісної ePCR; 10-20% - прийнятна монодисперсність; 20-30% - допустимий рівень лише для якісних висновків; $CV > 30\%$ - потребує корекції робочого режиму утворення крапель.

Висновки до розділу 2

1. Систематизовано реагенти, ферменти і буфери, обладнання (мікрофлюїдна система Fluidigm Drop-Seq у пневматичній LineUp-конфігурації та загальнолабораторне обладнання) і програмний інструментарій, застосовані для валідації модифікованого протоколу DropSynth 2.0.

2. Деталізовано молекулярно-біологічні процедури повного циклу збірки: Q5-ампліфікацію фрагментів, рестрикційний одноланцюговий розрив, підготовку штрихкодovаних бусин, емульсійну та супресорну ПЛР, очищення ДНК і гель-електрофорез.

3. Викладено методики калібрування Flow Units, робочого режиму утворення крапель та пуассонівського дизайну завантаження бусин, а також статистичний апарат оцінки монодисперсності (коефіцієнт варіації та його стійка форма), що становлять методичну основу результатів розділу 3.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розділ містить результати характеристики компонентів системи, валідації мікрофлюїдної платформи, порівняння буферних рецептур, валідації повного протоколу DropSynth та опис розробленого програмного забезпечення.

3.1 Характеристика компонентів системи

Підрозділ містить результати характеристики стартових компонентів системи DropSynth: ампліфікованих фрагментів, сумісності буферних добавок з ферментами та завантаження штрихкодovаних бусин.

Кількісна оцінка Qubit dsDNA BR біотинільованих PCR-продуктів шести фрагментів показала однорідні виходи в діапазоні 25,5-39,1 нг/мкл: A1 - 29,8; A2 - 39,1; A3 - 36,6; B1 - 37,5; B2 - 28,6; B3 - 25,5 нг/мкл (середнє 32,9 нг/мкл). Такий рівень концентрації забезпечив достатню кількість ДНК для подальших стадій одноланцюгового розриву та завантаження на штрихкодovані бусини.

Сумісність буферних добавок MDSMM з полімеразою Q5 оцінено факторною перевіркою у шести умовах: контроль без добавок (SetC), Pluronic F-68 5% + BSA 1% (Set1), Pluronic F-68 5% + BSA 10% (Set2), BSA + Tween-20 2% + PEG-6000 5% (Set3), повна суміш чотирьох добавок (Set4). На AGE спостерігалися чіткі специфічні смуги PCR-продуктів у контролі, Set1 і Set2 без помітної різниці в інтенсивності; у Set3 і Set4 інтенсивність смуг знижена, що свідчить про інгібування Q5 комбінацією Tween-20 і PEG-6000 (рисунок 3.1). Результат обґрунтував вибір Pluronic F-68 і BSA як добавок остаточної MDSMM-рецептури - узгоджений з аналогічними рекомендаціями щодо боротьби з інгібуванням ПЛР у складних реакційних середовищах [35].

Set1 Set2 Set3 Set4 Set5

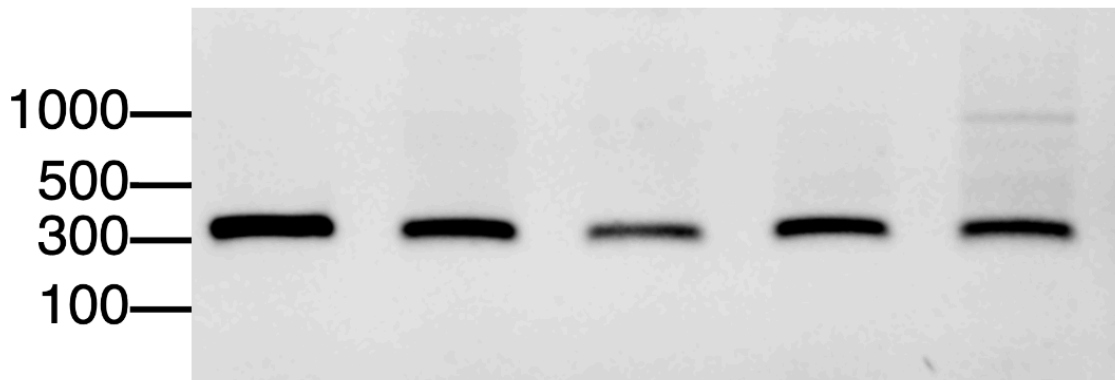


Рисунок 3.1 - Знімок гелі-електрофорезу сумісності буферних добавок з Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase: SetC (контроль без добавок), Set1 (Pluronic F-68 5% + BSA 1%), Set2 (Pluronic F-68 5% + BSA 10%), Set3 (BSA + Tween-20 + PEG-6000), Set4 (повна суміш чотирьох). AGE 1% TBE, фарбування EtBr

Контрольну BtsI-v2-реакцію виконано на плазмідній матриці pUC19_cp12mer-1 у серії концентрацій Pluronic F-68 (0, 1, 2,5 і 5%) у 1× Q5 Reaction Buffer з BSA. У всіх протестованих умовах спостерігалось повне розщеплення матриці за 55 °C впродовж 1 год, ідентичне контролю у rCutSmart Buffer (рисунок 3.2).

Результат підтверджує, що 5% Pluronic F-68 не пригнічує активність BtsI-v2 у формуванні, ідентичному MDSMM-водній фазі, що застосована у внутрішньокраплинному розщепленні штрихкоду.

Кількісну оцінку завантаження штрихкодіваних бусин виконано Urea-PAGE-денситометрією у TotalLAB для обох наборів - BRD1 і BRD2 (рисунок 3.3). Виходи R- і FT-фракцій укладалися в діапазон 16,6-18,4 пмоль на доріжку, що відповідає середньому завантаженню $\approx 2,45$ пмоль олігонуклеотидів на один реакційний об'єм для протоколу DropSynth.

Цей показник близький до теоретичної ємності насичення M-270 Streptavidin Dynabeads діаметром 2,8 мкм. Для розрахунку кількості бусин

використовувати гемоцитометр у трьох повторах, що було прийнято як вихідне значення для розрахунку концентрації штрихкодovаних бусин у мікрофлюїдному запуску [31].

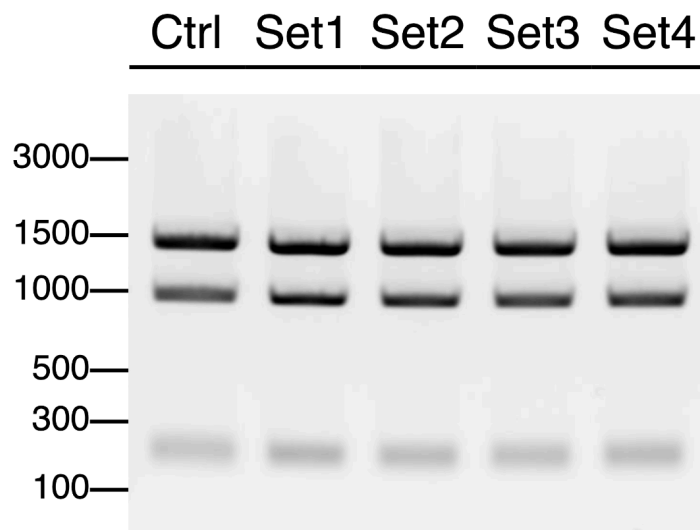


Рисунок 3.2 - Контрольна BtsI-v2-реакція на pUC19_cp12mer-1 у серії концентрацій Pluronic F-68 (0-5%) у 1× Q5 Reaction Buffer з BSA. AGE 1% TBE, фарбування EtBr. У всіх умовах - повне розщеплення; контроль у rCutSmart Buffer для порівняння.

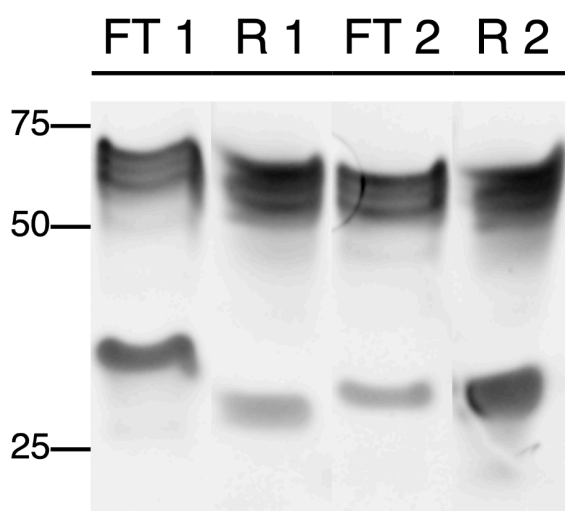


Рисунок 3.3 - Urea-PAGE-елюатів для наборів BRD1 (1) і BRD2 (2), FT - зразок після відщеплення днк він бусин після реакції з формамідом, R - зразок ДНК до насадження на бусини). Середнє завантаження - $\approx 2,45$ пмоль олігонуклеотидів на реакційний об'єм.

3.2 Валідація мікрофлюїдної платформи

Підрозділ містить результати валідації мікрофлюїдної платформи Fluidigm Drop-Seq у робочому режимі за трьома незалежними показниками: коефіцієнти калібрування Flow Units, монодисперсність розподілу діаметрів крапель та спостережуваний середній параметр Пуассона завантаження штрихкодovаних бусин.

Гравіметричне калібрування Flow Units дало робочі коефіцієнти а лінійної поліноміальної функції OxyGEN: для олійної фази (QX200 EvaGreen Generation Oil) на FU-L при потоці 250 мкл/хв - $a = 2,25$; для водної фази (MDSMM) на FU-L і FU-M при потоках 40 і 67 мкл/хв - $a = 1,0$ (заводське водяне калібрування прийнятне за густиною MDSMM $\rho \approx 1,0$ кг/л). Обидва коефіцієнти зафіксовано у Set channel parameters OxyGEN для всіх подальших запусків. Робоча витрата олії 300 мкл/хв (розділ 3.4) і калібрувальна точка 250 мкл/хв лежать у нижній третині діапазону Flow Unit L (0-1000 мкл/хв) та значно перевищують поріг паспортної точності 5 % (40 мкл/хв), тому лінійний коефіцієнт корекції $a = 2,25$ зберігає чинність у всьому робочому інтервалі [48].

Розподіл діаметрів крапель у робочому режимі виміряно у п'яти незалежних запусках платформи (таблиця 3.1). DropDrop-сегментація EVOS-знімків зафіксувала середні діаметри в діапазоні 112-134 мкм і CV у діапазоні 8,4-21,7%, з найкращою монодисперсністю у Set 5 (CV 8,4%, $n = 4072$ крапель). Значення $CV \leq 14\%$ у Set 2-4 свідчать про стабільну роботу платформи в обраному режимі, тоді як завищене CV у Set 1 пов'язане з перехідним пусковим інтервалом.

Таблиця 3.1 - Параметри розподілу діаметрів крапель у п'яти незалежних запусках платформи

№	Запуск	N крапель	Середній діаметр, мкм	Медіанний діаметр, мкм	CV, %
1	Set 1	3505	133,7	128,3	21,7

2	Set 2	3369	119,0	118,3	11,1
3	Set 3	4341	120,1	119,1	10,1
4	Set 4	3782	124,5	123,6	13,6
5	Set 5	4072	112,1	111,9	8,4

Завантаження штрихкодіваних бусин у краплі виміряно за гістограмою включень у тих самих п'яти запусках; обчислений λ = середнє арифметичне числа бусин на краплю варіював у діапазоні 0,345 (Set 5) - 0,521 (Set 1), що відповідає очікуванім моноклональним фракціям від $\approx 25\%$ до $\approx 31\%$ за дизайн-кривою Пуассона. Найкращий запуск (Set 5) досяг цільового $\lambda = 0,345$ і теоретичної моноклональної фракції $\approx 23\%$. Відхилення інших запусків угору від цільового значення пов'язане переважно з варіативністю фактичної концентрації штрихкодіваних бусин у резервуарній пробірці протягом подальших запусків.

3.3 Порівняння MDSMM та ddPCR Supermix

Було порівняно дві буферні рецептури водної фази мікрофлюїдного утворення крапель - розробленого власноруч Modified DropSynth Master Mix (MDSMM) і комерційного QX200 ddPCR EvaGreen Supermix без dUTP (Bio-Rad), популярного у багатоцільових форматах ddPCR [21].

Порівняння виконано у трьох технічних повторностях для кожного буфера в ідентичній конфігурації мікрофлюїдної платформи ($Q_{Oil} = 300$ мкл/хв, $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв). Усі повторності запускали в межах одного експериментального дня на свіжо-приготованій MDSMM-рецептурі та свіжо-розпакованому ddPCR Supermix;

Гістограма розподілу діаметрів крапель, коефіцієнти варіації, та зразки мікроскопії подано на рисунках 3.4-3.7 та результати узагальнено у таблиці 3.2. MDSMM-серія показала CV від 22,4 до 31,8% з найкращою повторністю control1 (CV 22,4%, середній діаметр 138,1 мкм), що перевершує усі ddPCR-повторності; водночас широке розкидання між MDSMM-повторностями свідчить про чутливість рецептури до варіацій підготовки. ddPCR Supermix дав більш однорідні

значення CV 26,5-28,2% при дещо більших середніх діаметрах 140,0-147,6 мкм - комерційна формула забезпечує вищу відтворюваність при цьому вищого нижнього граничного CV. Одну з MDSMM-повторностей виключено з аналізу через критично малу вибірку (n = 8).

Таблиця 3.2 - Порівняння монодисперсності крапель для рецептур MDSMM і QX200

Повторність	Буфер	N крапель	Середній діаметр, мкм	CV, %
control1	MDSMM	4153	138,1	22,4
control2	MDSMM	2906	156,1	31,8
ddpcr1	ddPCR Supermix	3448	140,0	26,5
ddpcr2	ddPCR Supermix	3682	147,6	28,2
ddpcr3	ddPCR Supermix	2402	145,5	27,6

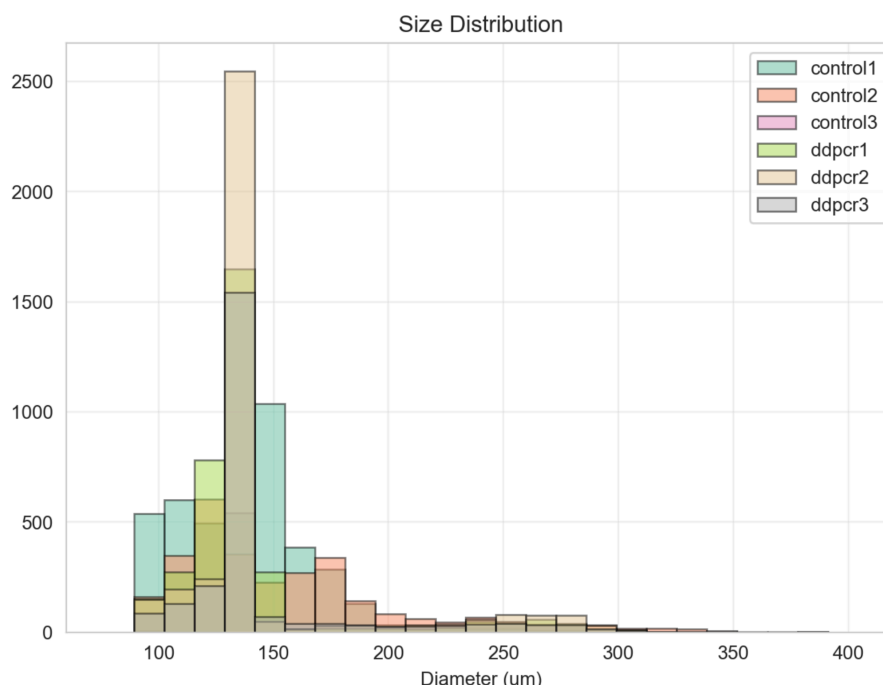


Рисунок 3.4 - Порівняння MDSMM і ddPCR EvaGreen Supermix: гістограма діаметрів для зразків control1-control3 (MDSMM) і ddpcr1-ddpcr3 (Bio-Rad). Дані

2026-05-08

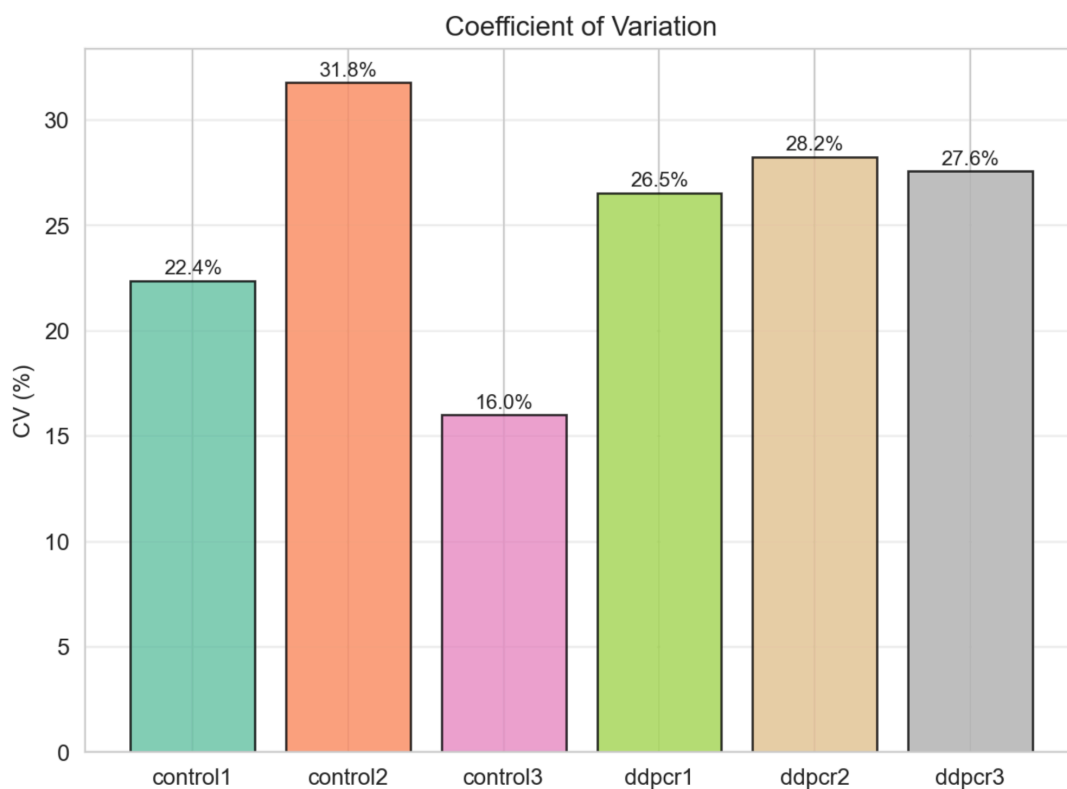


Рисунок 3.5 - Порівняння MDSMM і ddPCR EvaGreen Supermix: стовпчасті діаграми коефіцієнтів варіації для зразків control1-control3 (MDSMM) і ddpcr1-ddpcr3 (Bio-Rad). Дані 2026-05-08

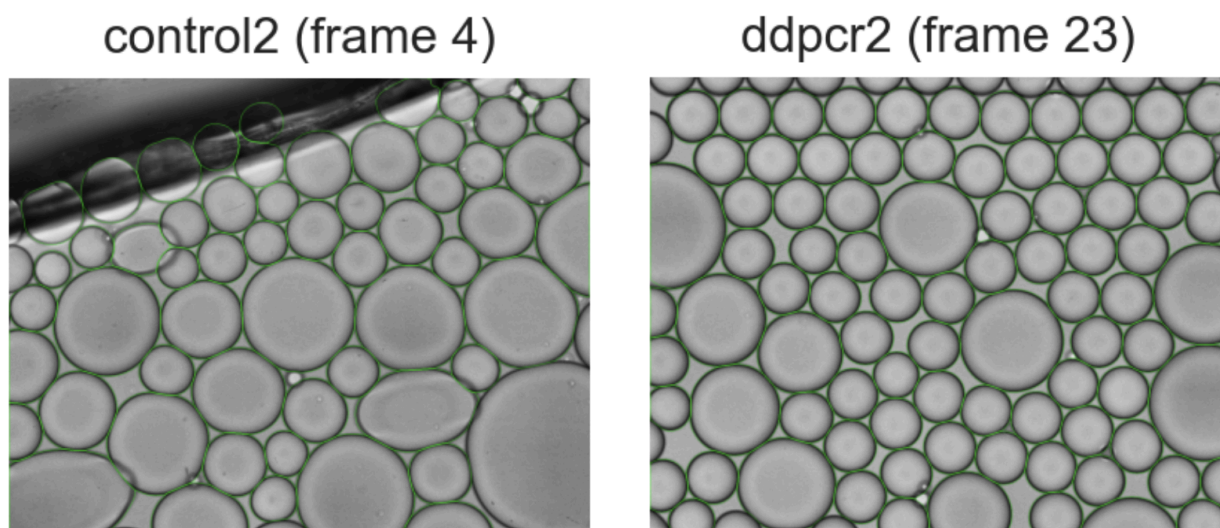


Рисунок 3.6 - Порівняння MDSMM і ddPCR EvaGreen Supermix: EVOS-знімки крапель для зразків control2 (MDSMM) і ddpcr2 (Bio-Rad). Дані 2026-05-08. Збільшення 10х.

Незважаючи на ширшу варіативність CV між MDSMM-повторностями, обидва буфера досягають придатної для моноклональної ePCR-збірки якості крапель ($CV < 32\%$ у всіх валідних повторностях). Найкраща MDSMM-повторність переважає мінімум ddPCR-серії, що підтверджує: власноруч сформульована MDSMM здатна забезпечити квазі-комерційну якість при дотриманні протоколу підготовки. Вибір MDSMM як буфера повного DropSynth-протоколу мотивовано гнучкістю формулювання - можливістю незалежного варіювання концентрацій Pluronic F-68 і BSA - та нижчою собівартістю порівняно з QX200 Supermix.

3.4 Валідація повного протоколу DropSynth

3.4.1 Параметри запуску

Повний DropSynth-V2-протокол валідовано у трьох технічних повторностях для двох змішаних конструктів (Набір A+B - iHRV-A57 та iHRV-B14). Робочі параметри швидкості потоків ідентичні фінальній конфігурації валідованої платформи: $Q_{Oil} = 300$ мкл/хв для неперервної олійної фази, $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв для дисперсних водних каналів. Кожен запуск тривав 30 с, з яких перші 5 с - стабілізаційний пуск, а наступні 25 с - активний збір емульсії; за оціночної частоти утворення ~ 3500 Гц це дає близько 90 000 крапель на запуск. Реагентне споживання на один запуск: ~ 500 мкл олії, ~ 120 мкл водної фази і 5 мл IPA для промивання тракту після запуску.

Термоциклювання виконано на Applied Biosystems ProFlex за програмою:

1. 90 хв 55 °C внутрішньокраплинне BtsI-v2-розщеплення штрихкоду
2. 30 с 98 °C ініціальна денатурація
3. 10 с 98 °C денатурація
4. 20 с 55 °C відпал
5. 45 с 72 °C елонгація
6. Перехід до кроку 3, 30 циклів
7. 2 хв 72 °C фінальна елонгація
8. Утримання за 4 °C

Емульсію стабілізовано мінерально-олійним шаром зверху у тонкостінних 200-мкл PCR-пробірках для уникнення випаровування водної фази.

3.4.2 Збірка конструктів А та В

Збірку повнорозмірних конструктів А (iHRV-A57) і В (iHRV-B14) відтворено у двох послідовних аналітичних точках: безпосередньо після ePCR-екстракту з РФО-розривом емульсії і після супресорної ПЛР з ITR-hairpin-збагаченням повнорозмірної фракції.

Гель-аналіз ePCR-екстракту після AmpliClean-очистки не виявив смуги очікуваного розміру (≈ 700 пн для конструктів А та В) у всіх трьох технічних повторностях (рис. 3.5).

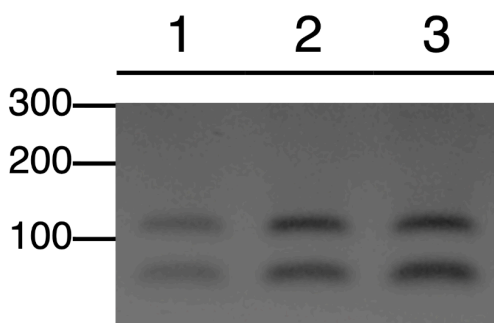


Рисунок 3.7 - AGE 1% TBE ePCR-екстракту після AmpliClean-очистки: три технічні повторності змішаного набору (Набір А+В). Очікуваний повнорозмірний продукт ≈ 700 пн.

Однак, добре спостерігається фон коротких побічних продуктів у діапазоні 50 та 100 пн. Наявний фон може вказувати на надлишкову кількість праймерів, або інші продукти деградації, які зазнали ампліфікації через збережені ділянки прикріплення праймерів. Результат є очікуваним та відповідає результатам, зазначеним у оригінальному протоколі DropSynth 2.0 [3].

Після ePCR-екстракту було отримано різний об'єм екстракту через варіативність генерації крапель, тож при гель-аналізі об'єм для супресорної ПЛР був в обмеженій кількості. Було вирішено взяти 2 з 3 повторностей, причому в об'ємах 5 мкл та 1 мкл. Гель-аналіз продукту супресорної ПЛР після AmpliClean показав декілька смуг у діапазоні 700 пн, що відповідає двом різним конструктам,

у зразку з 5 мкл, при чому у зразку з 1 мкл спостерігалися тільки низькомолекулярні смуги (рисунок 3.6).

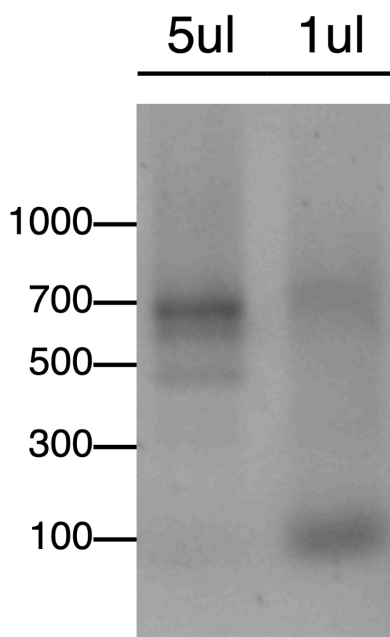


Рисунок 3.8 - AGE 1% TBE продукту супресорної ПЛР змішаного набору (Набір А+В): смуги в діапазоні ≈ 700 пн, що відповідають двом конструктам, у зразку з 5 мкл екстракту (маркер - 1 kb plus DNA Ladder); фон коротких побічних продуктів критично знижений порівняно з рисунком 3.5.

Наявність смуги у очікованому діапазоні вказує, що супресорна ПЛР є необхідною для збагачення суміші після екстракції з емульсії.

3.4.3 Інтегральне обговорення

Повний DropSynth-V2 протокол було перевірено та відтворено на двох конструктах А (iHRV-A57) і В (iHRV-B14), із застосування мікрофлюїдного чипу Drop-Seq та системи Fluidigm.

Розроблена MDSMM-рецептура продемонструвала придатну для DropSynth якість крапель (CV 22-32% у прямому порівнянні) при суттєво нижчій собівартості порівняно з комерційним QX200 ddPCR EvaGreen Supermix. Сумісність ключових ферментів - Q5 Hot Start HiFi та BtsI-v2 - з робочою концентрацією 2,5% Pluronic F-68 і 0,2 мг/мл BSA підтверджено окремими *in vitro*

контрольними реакціями, що дозволило внести домішки безпосередньо у MDSMM без втрати активності.

Основні обмеження роботи:

(а) досягнута монодисперсність у режимі повного протоколу ($CV \approx 22-28\%$) залишається вищою за оптимум платформи ($CV < 5\%$), переважно через неоптимізовану неперервну фазу, яка також має компенсувати додані домішки у дисперсній фазі.

(б) бібліотека обмежена двома штрихкодами *cp12mer-1* і *cp12mer-2* з трьох доступних у Plesa-системі, що відповідає ефективній мультиплексності 2;

Перспективні напрями розвитку охоплюють декілька незалежних векторів. Розробка оптимізованої сурфактантної системи HFE-7500 з Pico-Surf (Sphere Fluidics) при оптимізованому співвідношенні сурфактант : олія здатно суттєво підвищити монодисперсність - у літературі для таких рецептур повідомляють про $CV < 5\%$ [16], що переводить емульсію з категорії якісного у категорію кількісного аналізу.

Масштабування до повного 384-плексного формату - виправдане з точки зору ресурсу: у Plesa *et al.* (2018) описано, що однієї preparatoції набору штрихкодovаних бусин достатньо щонайменше на 210 збірок по 384 гени (понад 80 000 генів сумарно), а у самій роботі виконано $33 \text{ бібліотеки} \times 384 = 12\,672$ цільових конструкти з $\approx 6\,900$ успішно зібраними гомологами (DHFR + PPAT).

Слід зауважити, що цей результат досягнуто вихровим емульгуванням на вихровому змішувачі Vortex-Genie 2; адаптація DropSynth до мікрофлюїдної інкапсуляції за Пуассоном, реалізованої в цій роботі, додатково гарантує статистично контрольовану моноклональність крапель та потенційно ефективнішої збірки, але вимагає більше часу для оптимізації середовищ для якісної емульсії та ефективніших ферментів. Подальша оптимізація MDSMM - тонкий підбір концентрацій Pluronic F-68 і BSA та тестування альтернативних агентів молекулярного скупчення за принципом коацерватної стабілізації [18] - обіцяє звужити розкидання CV між повторностями. Розробка власного тримача-струшувача для резервуарних пробірок з бусинами зробить розподіл

штрихкодovаних бусин гомогенним протягом тривалих запусків і адаптує платформу до виробничих об'ємів. Додаткові поступові поліпшення - автоматизована підрахунок бусин за камерою Нойбауера у режимі реального часу, тонке налаштування c_{bead} до цільового $\lambda = 0,345$ та інтеграція кроку корекції помилок MutS для зменшення помилок збірки.

3.5 Програмне забезпечення

У роботі розроблено три відкритих Python-пакети, що покривають три комплементарні підсистеми DropSynth: оптичне захоплення мікрофлюїдного утворення крапель в реальному часі (PylonGuy), керування Fluigent Drop-Seq та координація запуску (DropleGEN) і автоматизована післяемульсійна сегментація крапель із пакуванням показників у CSV (comma-separated values)-звіт (DropDrop). Усі три пакети розповсюджуються під MIT-license; деталізовану архітектуру, API-довідник і конфігураційні приклади наведено у Додатку Д.

3.5.1 DropDrop

DropDrop - Python-пакет для автоматизованої сегментації крапель на післяемульсійних мікроскопічних знімках. В основі - попередньо натренована модель Cellpose 3.0 (cyto-base) з додатковим калібруванням контурної екстракції під параметри інтенсивності і фону EVOS FL Auto 2 та слайдів LUNA Cell Counting Slides. Вхід - PNG/TIFF-знімки; вихід - CSV з колонками sample, frame, droplet_id, координати центрів (center_x, center_y), діаметр у пікселях і мікрометрах, площа, а також (опційно) число включених бусин у кожній краплі [33].

Пакет розповсюджується на PyPI під назвою dropdrop (MIT-license); Приклад типового вихідного звіту з EVOS-знімком, CSV-показниками та гістограмою розподілу діаметрів подано на рисунку 3.7. CSV-формат вихідних даних узгоджений з R-функціями стійкого CV-розрахунку та Python-конвеєрами побудови гістограм. Деталізовану архітектуру, API-довідник і приклади CLI-використання наведено у Додатку Д.

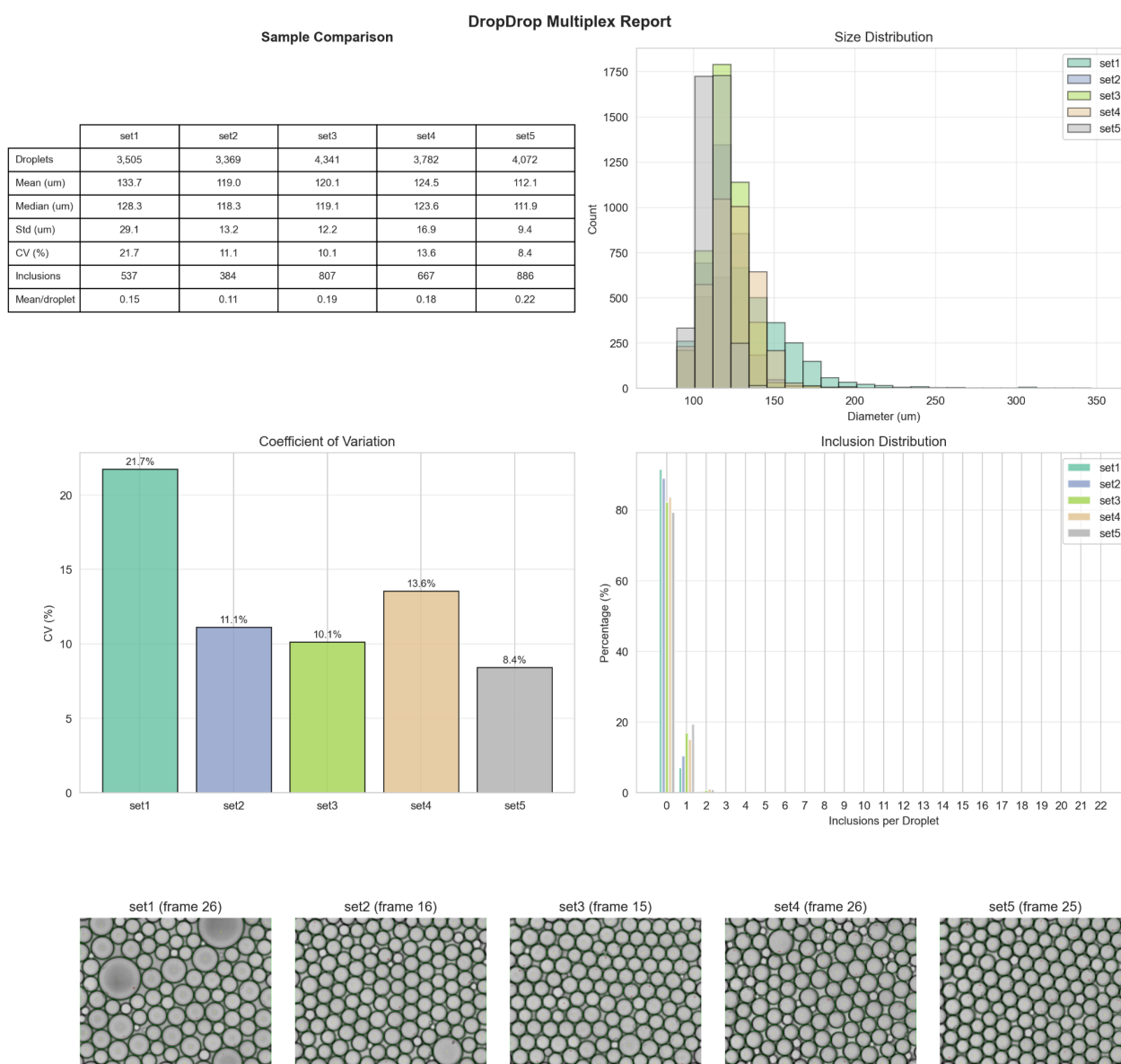


Рисунок 3.9 - Приклад звіту DropDrop: вихідний EVOS-знімок крапель із Cellpose-сегментацією, CSV з геометричними показниками та гістограма розподілу діаметрів з обчисленим CV

3.5.2 DropleGEN

DropleGEN - настільний застосунок на DropletUI / PySide6 для керування мікрофлюїдною платформою Fluidigm Drop-Seq у реальному часі. Зв'язок з апаратним рівнем здійснюється безпосередньо через Fluidigm SDK (software development kit) (без посередництва офіційної настільної програми OxyGEN), що забезпечує повністю автономний робочий процес. В основі архітектури -

трипотокова модель з центральним Controller-медіатором: основний Qt-потік обслуговує панелі керування, моніторингу та конфігурації послідовностей кроків разом із реактивними ruytgraph-графіками витрати і тиску; acquisition-потік опитує сенсори Flow Unit з циклом 100 мс і опційно зберігає телеметрію у CSV; pipeline-потік виконує послідовність автоматизованих кроків.

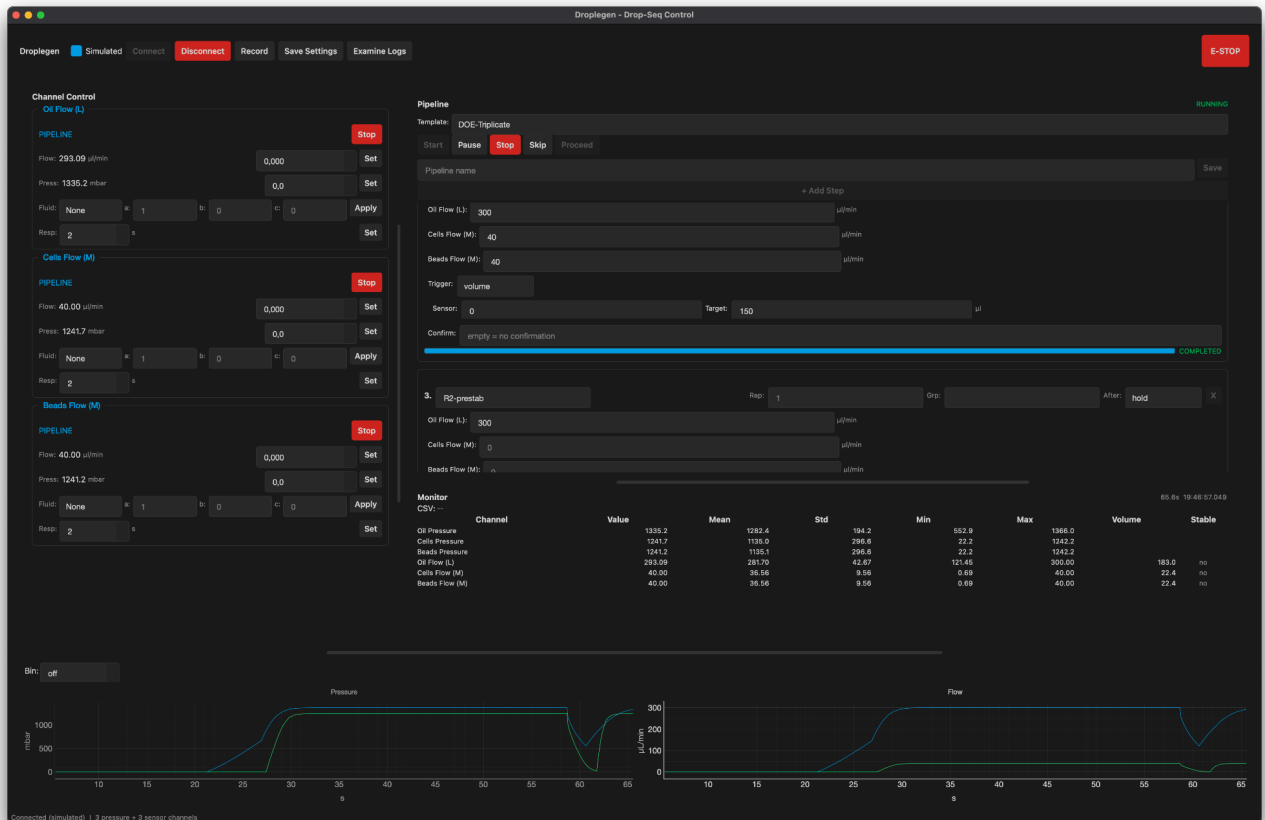


Рисунок 3.10 - Інтерфейс DropleGEN: панелі керування, моніторингу та конфігурації послідовностей кроків Fluigent Drop-Seq із реактивними графіками витрати і тиску

Серед ключових функцій - автоматизовані багатокрокові послідовності кроків з тригерами за часом, об'ємом, граничним значенням сенсора або зовнішньою умовою з можливістю групування, повторення і збереження у JSON-форматі; інтегрований Log Viewer з інтерактивними ruytgraph-графіками та групуванням за часом; режим симуляції (Simulated Mode) на симульованих інструментах Fluigent SDK для розробки і тестування без апаратного підключення.

Деталізовану архітектуру, конфігураційні приклади та документацію наведено у Додатку Д.

3.5.3 PylonGuy

PylonGuy - програмний інтерфейс на DropletUI / PySide6 до камери Basler ace asA640-750um через пакет pyrpylon і Basler Pylon SDK. Архітектура побудована на двофазній моделі, що розділяє захоплення кадрів та відеокодування: фаза capture спрямовує потік кадрів з камери у буфер пам'яті і далі в raw-файли на диск, а фаза постобробки запускає ffmpeg для збирання raw-файлів у відеопотік з довільною заданою частотою відтворення. Така схема дозволяє максимальну швидкість захоплення (обмежену лише пропускнуою здатністю USB 3.0) і незалежне формування уповільненого відео потрібного темпу.

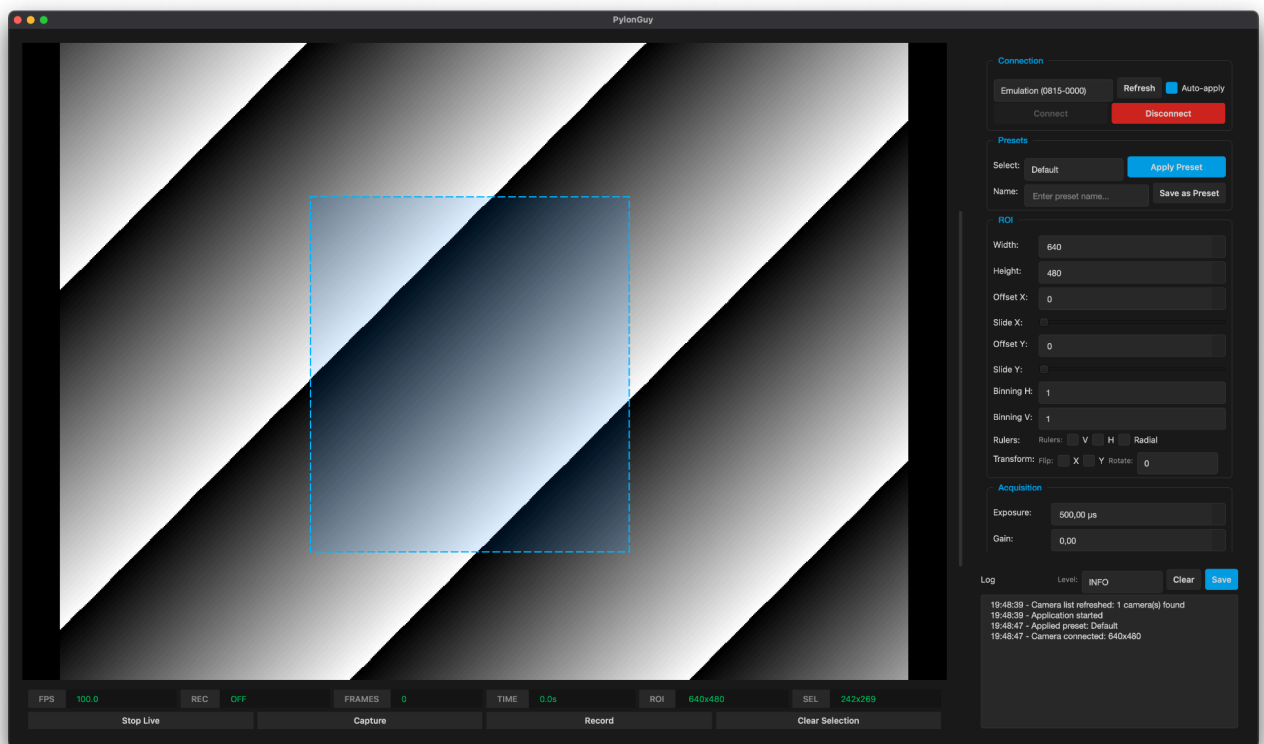


Рисунок 3.11 - Інтерфейс PylonGuy: захоплення відеопотоку з камери Basler ace asA640-750um у профілі Microfluidics та формування уповільненого відео

PylonGuy підтримує адаптивну стратегію захоплення для попереднього перегляду без затримки, інтерактивну конфігурацію області інтересу (ROI) зі

зміщенням, набір попередньо налаштованих профілів (Default, HighSpeed, FullFrame, Microfluidics) з автоматичним застосуванням при підключенні камери, а також спеціалізований waterfall-режим для записування у форматі лінійного сканування (.wtf). У цій роботі застосовано профіль Microfluidics з per-frame-захопленням 480×128 пікселів на частоті ~ 2 кГц для моніторингу геометрії крапель у момент генерації на Drop-Seq-чипі. Деталізовану документацію наведено у Додатку Д.

Висновки до розділу 3

1. Підготовлено шість синтетичних олігонуклеотидних фрагментів A1-A3 (iHRV-A57) і B1-B3 (iHRV-B14) завдовжки 300 нт кожен як вхідні компоненти для збірки двох тестових конструктів А і В: виконано Q5 Hot Start HiFi ПЛР-ампліфікацію з біотинільованим праймером skpp15-26-F-B (25 циклів) з виходами 25,5-39,1 нг/мкл (середнє 32,9 нг/мкл), очищення AmpliClean і верифікацію послідовностей у функціональних сайтах (одноланцюговий розрив BspQI, BtsI-v2-розщеплення, фланкуючі ITR і ділянки зв'язування праймера).

2. Виконано п'ятикроковий протокол DropSynth Bead Barcoding v2.0 і підготовлено два набори штрихкодovаних магнітних бусин - BRD1 (штрихкоди A1-A3) і BRD2 (штрихкоди B1-B3) - на основі Dynabeads M-270 Streptavidin; середнє завантаження штрихкод-олігонуклеотидів - 2,45 пмоль на реакційний об'єм за результатом TotalLAB-денситометрії Urea-PAGE-елюатів.

3. Відкалібровано мікрофлюїдну систему Fluigent Drop-Seq для робочих рідин DropSynth-протоколу гравіметричним методом у режимі визначеного об'єму ($V_{cmd} = 100$ мкл, $n = 3$): встановлено лінійний коефіцієнт корекції $a = 2,25$ для FU-L з QX200 EvaGreen Droplet Generation Oil при робочому потоці 250 мкл/хв; для FU-M і FU-L з MDSMM-водною фазою корекція не потрібна ($a = 1,0$).

4. Розроблено формулу водної фази MDSMM (Modified DropSynth Master Mix) на основі окремих маточних компонентів: $1 \times$ Q5 Reaction Buffer + 200 мкМ dNTPs + 0,5 мкМ AsmF/AsmR_40bpITR + 2,5% Pluronic F-68 + 0,2 мг/мл BSA + 0,02 од/мкл Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase. Окремими *in vitro* контрольними реакціями підтверджено сумісність формули з активністю Q5 (за умови

присутності Pluronic F-68 і BSA без Tween-20 / PEG-6000) і повну активність BtsI-v2 у Q5-буфері з BSA при концентраціях Pluronic F-68 до 5%.

5. Розроблено та опубліковано як open-source три власні Python-пакети під ліцензією MIT: DropDrop (PyPI: dropdrop) - Cellpose-based робочий процес автоматизованої сегментації крапель з одиничним і мультиплексним режимами та звітами у форматі CSV + PNG; DropleGEN (github.com/merv1n34k/droplegen) - настільний застосунок на DropletUI / PySide6 для керування Fluigent Drop-Seq через Fluigent SDK з трипотоковою архітектурою (UI + acquisition 100 мс + pipeline) і автоматизованими тригерними послідовностями кроків у JSON-форматі; PylonGuy (PyPI: pylonguy) - інтерфейс до камери Basler ace acA640-750um з двофазним розділенням захоплення і ffmpeg-постобробкою у профілі Microfluidics.

6. Реалізовано триканальну схему завантаження PDMS-чипа Drop-Seq з функціональним розділенням реагентів за входами: Channel 1 (Oil, FU-L) подає QX200 EvaGreen Droplet Generation Oil як неперервну фазу; Channel 2 (BtsI, FU-M) - MDSMM з BtsI-v2; Channel 3 (Beads, FU-M) - MDSMM зі штрихкодovаними бусинами без рестриктази, що запобігає передчасному відщепленню штрихкоду до утворення крапель. Робочий режим $Q_{Oil} = 300$ мкл/хв, $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв забезпечує стійке монодисперсне утворення крапель з усталеним діаметром близько 120 мкм ($V_{drop} \approx 0,8$ нл) при частоті ~ 3500 Гц.

7. Виконано повну валідацію модифікованого протоколу DropSynth у 30-цикловій версії на двох тестових конструктах А (iHRV-A57) і В (iHRV-B14): на 1% ТВЕ-агарозних гелях для збагаченого продукту супресорної ПЛР (5 мкл екстракту з емульсії) виявлено смуги в очікуваному діапазоні ~ 700 пн, тоді як прямий ePCR-екстракт цільової смуги не показав.

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

4.1 Загальні положення

У цьому розділі викладено вимоги охорони праці та екологічної безпеки, що поширюються на виконання модифікованого протоколу DropSynth 2.0. Вимоги ґрунтуються на Законі України «Про охорону праці» [36], ДСанПіН 6.6.1-079-02 [37], НПАОП 73.1-1.06-77 [38], НПАОП 0.00-1.28-10 [39], ДСН 3.3.6.042-99 [40] і ДСН 3.3.6.037-99 [41].

Лабораторія структурно поділена на три функціональні зони - підготовки реакційних сумішей (до-ПЛР), виконання експериментальних маніпуляцій і аналітичну зону (після-ПЛР), - фізично розділені і обладнані власними наборами ЗІЗ і піпеток для запобігання перехресній контамінації. У лабораторії встановлено ламінарний бокс II класу з НЕРА-фільтрацією, окремі витяжні шафи для робіт з леткими і токсичними реагентами, припливно-витяжну вентиляцію з кратністю 10 повітрообмінів за годину, аварійний душ, фонтанчик для промивання очей, вогнегасники (порошкові і вуглекислотні) і аптечку. До робіт допускаються особи, які пройшли вступний і первинний інструктаж, навчання за програмою охорони праці, медичний огляд і не мають медичних протипоказань. Повторний інструктаж - раз на , позаплановий - після порушень або введення нового обладнання [37, 42].

4.2 Аналіз небезпечних і шкідливих виробничих факторів

Класифікацію небезпечних і шкідливих виробничих факторів (НШВФ) здійснено за ДСТУ 2293:2014 «Охорона праці. Терміни та визначення основних понять» [43]; для DropSynth-протоколу актуальні три групи факторів.

Хімічні фактори. Безпосереднє відношення до DropSynth-протоколу мають такі реагенти підвищеної небезпеки: PFO (1H,1H,2H,2H-перфлуоро-1-октанол, Sigma 370533, H332/H315) для руйнування емульсії; бромід етидію (EtBr, H341 - мутаген категорії 3) для забарвлення агарозних гелів; акриламід і Acrylamide/Bis (H301 - гострий токсин, H372 - накопичувальний нейротоксин) для приготування PAGE; TEMED і APS як каталізатори полімеризації; ізопропанол (H225, t-спалаху) для промивання чипа. EvaGreen Droplet Generation Oil практично нетоксична,

проте фторвуглецеві пари при високих температурах можуть розкладатися з утворенням фтороводневих сполук. Ферменти молекулярної біології у гліцериновому маточному розчині прямої небезпеки не становлять, проте вимагають уникнення контакту зі слизовими [38].

Фізичні фактори: УФ-випромінювання 254 і 365 нм від трансільюмінатора (ризик опіків шкіри і фотокератиту); лазер класу 1 у Qubit-флуориметрі (закрита система, ризик мінімальний); теплові режими від $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (морозильна камера) до $+95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (термоциклер, водяна баня); високовольтний гель-електрофорез до 300 В; пневматика Fluigent до 2000 мбар; статичні заряди від PDMS-чипів; шум обладнання (в межах ДСН 3.3.6.037-99) [43].

Психофізіологічні фактори: тривала робота за ПК з аналітичним ПЗ (4-6 год/день); монотонні маніпуляції з мікропіпетками; концентрація уваги при роботі з реагентами малих об'ємів (1-10 мкл). Категорія важкості праці - Па [43].

4.3 Вимоги безпеки перед початком роботи

Перед сесією працівник одягає базовий ЗІЗ: лабораторний халат (застебнутий), змінне закрите взуття, нітрилові рукавички, захисні окуляри. Для робіт з EtBr, PFO або акриламідом додатково - щиток для обличчя і респіратор FFP2/N95 (обов'язково при роботі з порошковими формами) [38].

Робоча поверхня витирається 70% ізопропанолом. Перевіряється справність обладнання, що буде використане: цілісність ізоляції кабелів, наявність заземлення, працездатність кнопок аварійного відключення. Перед увімкненням Fluigent - візуальна перевірка пневматичних і рідинних з'єднань, відсутності протікань попередніх запусків. Перед роботою у ламінарному боксі - перевірка цілісності НЕРА-фільтра, -хвилинна попередня УФ-стерилізація [38].

Перевіряються терміни придатності ферментів (Q5 HiFi, Nt.BspQI, BtsI-v2 при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$); прострочені флакони не використовуються. Працівник орієнтується у плануванні приміщення на випадок евакуації, локалізації аптечки, аварійного душу, фонтанчика для очей і найближчого вогнегасника (до 20 м від робочого місця) [38].

4.4 Вимоги безпеки під час роботи

ЗІЗ використовуються протягом усього часу робіт; рукавички замінюються після контакту з потенційно токсичним або контамінованим матеріалом і перед виходом з виділеної зони. Халат не виносять за межі лабораторії [38].

Роботи у витяжній шафі - обов'язкові для РФО (руйнування емульсії), приготування акриламідних розчинів, робочих розчинів EtBr, відкривання флаконів Ni-Di Formamide для секвенційної підготовки. Швидкість потоку повітря у перерізі робочого вікна - 0,5 м/с за НПАОП 73.1-1.06-77. Перед початком роботи перевіряється індикатор тиску [38].

Робота з EtBr виконується у виділеному «куточку» з власним набором мікропіпеток і наконечників, що не виносяться за межі зони. Ємності двократно закриті, маркуються «EtBr - мутаген», переміщуються у вторинному контейнері з абсорбентом. УФ-трансліумінатор використовується у захисних окулярах UV400, з прикриттям шкіри (рукав до зап'ястя, рукавички); час опромінення зразка ≤ 60 с [38].

Маркування ємностей: назва речовини, концентрація, дата приготування, ініціали виконавця, термін придатності, піктограми GHS. Не залишати відкритими ємності з леткими або агресивними речовинами. Піпетування - лише автоматичними піпетками; категорично заборонено піпетувати ротом [38].

Електробезпека. Електрообладнання заземлене за схемою TN-S; групи розеток захищені ВДТ (30 мА; 25 А); щомісячний візуальний огляд кабелів. Підключення до мережі - лише сухими руками; вологе прибирання - не пізніше ніж за 30 хв до увімкнення. Гель-електрофорез (до 300 В DC) - лише з закритими кришками; перед маніпуляціями з гелем джерело живлення вимикається. Центрифуги Eppendorf 5424R/5810R запускаються лише з парним симетричним завантаженням ротора; кришка відкривається після повної зупинки. Мікрофлюїдична система Fluigent експлуатується у діапазоні тиску 0-2000 мбар; протікання олії на електронні плати запобігається абсорбентом під Flow Units [44].

Гострі предмети (скляні капіляри, скальпелі, голки) - у спеціалізовані sharps-контейнери з односторонніми затворами. Робота з нагрітими ємностями - у

термоізоляційних рукавичках. Підтримуйте вільними проходи між робочими столами і доступ до аварійного душу і вогнегасників [38].

4.5 Вимоги охорони праці при користуванні хімічним посудом і обладнанням

Скляний посуд оглядається на тріщини і сколи перед використанням; пошкоджений - заборонено. Розбите скло прибирається щіткою і совком (не руками!) у маркований контейнер «Розбите скло». При з'єднанні скляних деталей з пробками поверхні зволожуються водою або гліцерином, руки захищаються тканиною [38].

PDMS-чипи Drop-Seq - одноразові; при роз'єднанні з капілярами утворюється статичний заряд, потенційно небезпечний для електроніки FU. Перед роз'єднанням працівник торкається заземленої металевої поверхні; для критичних операцій - антистатичний браслет на провідному килимку. Капіляри PTFE (0,5 мм внутрішній діаметр) при тиску до 2000 мбар мають обмежений ресурс; перевіряються перед кожним запуском, пошкоджені - замінюються [38].

4.6 Робота за персональним комп'ютером

Аналітична частина протоколу включає тривалу роботу з ПЗ DropDrop, DropleGEN, PylonGuy, SnapGene, R, Python (4-6 год/день), що зумовлює дотримання НПАОП 0.00-1.28-10 [39]. Монітор - на рівні очей або нижче, відстань 50-70 см; крісло з регульованою висотою і опорою попереку; освітлення 300-500 лк без бликів. Кожні 45-60 хв - перерва 10 хв; правило 20-20-20 для очей (кожні 20 хв погляд на 20 секунд на об'єкт за 20 футів / 6 м). Заборонено рідини і їжу біля комп'ютера [39].

4.7 Вимоги безпеки після закінчення роботи

Реагенти тривалого зберігання повертаються у відповідні температурні зони (+4 °C, -20 °C, -80 °C). Електроприлади, що не вимагають постійної роботи, вимикаються і від'єднуються від мережі (виняток - морозильники, холодильники, інкубатори). Подача газу, води, вакууму перекривається. Відходи розподіляються по контейнерах відповідно до встановлених вимог поводження з відходами. Робоча поверхня витирається 70% ізопропанолом; ламінарний бокс повторно

УФ-стерилізується. Перед виходом - миття рук з милом, перевірка зачинених вікон і вимкненого освітлення [38].

4.8 Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

Загальні дії. При аварійній ситуації працівник негайно припиняє роботу (якщо це не створює додаткової небезпеки), за можливості ліквідовує джерело небезпеки (вимикає електроприлад, перекриває кран), повідомляє керівника і викликає екстрені служби: пожежна охорона (101), поліція (102), швидка (103), газова служба (104). Постраждалим надається перша домедична допомога з аптечки [38].

Пожежа. Імовірні джерела у DropSynth-лабораторії: IPA для промивання чипа, нагрівні елементи термоциклера, спирт для стерилізації, акриламід при недостатній вентиляції. При загорянні електрообладнання - першочергово знеструмити апарат; вода для гасіння електрообладнання заборонена. Засоби: вуглекислотні вогнегасники (електрообладнання), порошкові (тверді матеріали і нелегкозаймисті рідини), пісок (незначні загоряння). При сильному задимленні - рухатись пригнувшись, захищаючи органи дихання вологою тканиною [45].

Розлив хімічних речовин. Малі розливи неагресивних реагентів - абсорбент (пісок, вермикуліт, поглинальні серветки) у спеціальну ємність. Розливи PFO, акриламиду, EtBr - залишити приміщення, забезпечити вентиляцію, повідомити керівника; ліквідація лише у повному ЗІЗ (хімічний костюм, респіратор, щиток). Розлиті розчини EtBr нейтралізуються 10 %-розчином NaClO перед збиранням. При розливі IPA - негайно знеструмити джерела вогню і нагрітого обладнання [38].

Контакт хімікатів зі шкірою чи очима - негайно промити проточною водою 15 хв (для очей - фонтанчик); для лужних розчинів 20-30 хв. Звернутись за медичною допомогою, повідомивши назву речовини. Контаміновані ЗІЗ - як хімічні відходи [38].

Травми. Поріз склом: дозволити кровотечі промити рану (1-2 хв), обробити антисептиком, накласти стерильну пов'язку; при глибокій рані - медична допомога. Опіки I ступеня - холодна вода 10-20 хв; II ступеня - стерильна волога

пов'язка, медична допомога. Термічні опіки від контакту з криогенними поверхнями ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) - поступове зігрівання теплою (не гарячою) водою 15-30 хв [38].

Ураження струмом. Усунути контакт постраждалого з джерелом струму сухим неелектропровідним предметом, вимкнути живлення. Перевірити свідомість, дихання, пульс; за відсутності серцебиття - реанімаційні заходи. Викликати швидку (103); огляд лікаря обов'язковий навіть без видимих травм [44].

4.9 Утилізація відходів та екологічна безпека

Утилізація лабораторних відходів виконується відповідно до Закону України «Про відходи» [46] і ДСанПіН 2.2.7.029-99 [47].

EtBr-вмісні розчини - нейтралізація 10%-розчином NaClO або активованим вугіллям (1 г/л); нейтралізований розчин - у маркований контейнер для ліцензованого утилізатора. PFO і фторвуглецеві олії (EvaGreen, dSURF) - нижня олійна фаза після руйнування емульсії частково (до 30%) відновлюється для повторного використання у некритичних протоколах, решта - на спецутилізацію. Акриламід (полімеризовані гелі, рідкі залишки Acrylamide/Bis) - у щільні подвійні пакети з маркуванням «Канцероген - акриламід»; полігон промислових відходів через ліцензованого утилізатора. Органічні розчинники (IPA та ін.) - окремий контейнер для рекуперації або спецутилізації як легкозаймисті відходи [47].

Скляні відходи - у жорсткі ємності «Розбите скло». Гострі предмети - у sharps-контейнери. Електронні відходи (PDMS-чипи, кабелі, ESD-засоби) - централізовано на переробку [47].

Заходи зниження екологічного навантаження. Енергоощадність: обладнання вмикається лише при потребі; УФ-лампи боксу - за графіком. Часткове відновлення фторвуглецевої олії (~30%) суттєво знижує обсяг олії, що передається на спецутилізацію, порівняно з референсним протоколом DropSynth 2.0. Лабораторні стічні води проходять попереднє очищення (нейтралізація, відстоювання) перед скидом у комунальну каналізацію; склад стоків контролюється на відповідність ГДК ДСанПіН [47].

Висновки до розділу 4

1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори DropSynth-протоколу класифіковано за ДСТУ 2293:2014 (хімічні, фізичні та психофізіологічні групи) і визначено категорію важкості праці ІІа.

2. Сформульовано вимоги охорони праці на всіх етапах роботи - до початку, під час, після завершення та в аварійних ситуаціях - включно з електро- і пожежобезпекою, поводженням з токсичними реагентами (PFO, бромід етидію, акриламід) і роботою за персональним комп'ютером.

3. Розроблено схему поводження з відходами та заходи екологічної безпеки; зокрема, часткове (близько 30%) відновлення фторвуглецевої олії знижує обсяг спеціальної утилізації порівняно з референсним протоколом DropSynth 2.0.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу сучасного стану синтезу генних бібліотек обґрунтовано вибір поєднання технології OLS, DropSynth та краплинної eПЛР. Технічні обмеження синтезу до 300 нуклеотидів робить ферментативну збірку з фрагментів для довших конструктів необхідною. Класичні методи збірки не масштабуються понад одиничні конструкти на реакцію, а комерційний синтез лишається дорогим у масштабі тисяч варіантів, тоді як краплинна ізоляція забезпечує паралельну збірку 384-1536 конструктів за вартістю 1-2 USD за конструкт.

2. Систематизовано реагенти, обладнання, програмний інструментарій і молекулярно-біологічні процедури повного циклу збірки конструктів, методики калібрування мікрофлюїдної платформи Fluigent Drop-Seq і статистичний апарат оцінки монодисперсності крапель, що склали методичну основу валідації модифікованого протоколу DropSynth 2.0.

3. Виконано повну валідацію модифікованого протоколу DropSynth 2.0, яка має вищу якість конструктів через точний контроль завантаження бусин. Було підготовлено шість олігонуклеотидних фрагментів (300 нт, виходи Q5-ампліфікації 25,5-39,1 нг/мкл) і два набори штрихкодovаних магнітних бусин (в середньому 2,45 пмоль на реакційний об'єм). Відкалібровано платформу Fluigent Drop-Seq (коефіцієнт корекції $a = 2,25$ для FU-L з генераційною олією; $a = 1,0$ для MDSMM) і реалізовано триканальну схему завантаження чипа.

Розроблено власну водну фазу MDSMM, сумісну з Q5 Hot Start HiFi та BtsI-v2 і дешевшу за комерційні альтернативи. Повний протокол відтворено у трьох технічних повторностях на двох тестових конструктах А і В, а цільовий продукт близько 700 пн виявлено після супресорної ПЛР в одній з аналізованих повторностей (5 мкл екстракту). Розроблено та опубліковано у відкритому доступі три власні Python-пакети - DropDrop, DropleGEN і PylonGuy.

4. Проаналізовано небезпечні та шкідливі виробничі фактори (класифікація за ДСТУ 2293:2014), наведено основні вимоги охорони праці на всіх етапах роботи та розроблено заходи поводження з відходами й екологічної безпеки, зокрема часткове (близько 30%) відновлення фторвуглецевої олії.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kosuri S., Church G. M. Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications. *Nature Methods*. 2014. Vol. 11, no. 5. P. 499-507. DOI: 10.1038/nmeth.2918 (дата звернення: 10.06.2026).
2. Fowler D. M., Fields S. Deep mutational scanning: a new style of protein science. *Nature Methods*. 2014. Vol. 11, no. 8. P. 801-807. DOI: 10.1038/nmeth.3027 (дата звернення: 10.06.2026).
3. Sidore A. M., Plesa C., Samson J. A., Lubock N. B., Kosuri S. DropSynth 2.0: high-fidelity multiplexed gene synthesis in emulsions. *Nucleic Acids Research*. 2020. Vol. 48, no. 16. P. e95. DOI: 10.1093/nar/gkaa600 (дата звернення: 10.06.2026).
4. Stroganov O. O., Kostyk S. I. VOF modeling of the transition between dripping and jetting regimes in a microfluidic generator : *Збірник матеріалів конференції КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ, 2026. С. 452-456.*
5. Plesa C., Sidore A. M., Lubock N. B., Zhang D., Kosuri S. Multiplexed gene synthesis in emulsions for exploring protein functional landscapes. *Science*. 2018. Vol. 359, no. 6373. P. 343-347. DOI: 10.1126/science.aao5167 (дата звернення: 10.06.2026).
6. Hoose A., Vellacott R., Storch M., Freemont P. S., Ryadnov M. G. DNA synthesis technologies to close the gene writing gap. *Nature Reviews Chemistry*. 2023. Vol. 7, no. 3. P. 144-161. DOI: 10.1038/s41570-022-00456-9 (дата звернення: 10.06.2026).
7. Gibson D. G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A. III, Smith H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. 2009. Vol. 6, no. 5. P. 343-345. DOI: 10.1038/nmeth.1318 (дата звернення: 10.06.2026).
8. Carr P. A., Park J. S., Lee Y.-J., Yu T., Zhang S., Jacobson J. M. Protein-mediated error correction for *de novo* DNA synthesis. *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32, no. 20. P. e162. DOI: 10.1093/nar/gnh160 (дата звернення: 10.06.2026).
9. Matzas M., Stähler P. F., Kefer N. *et al.* High-fidelity gene synthesis by retrieval of sequence-verified DNA identified using high-throughput pyrosequencing.

Nature Biotechnology. 2010. Vol. 28, no. 12. P. 1291-1294. DOI: 10.1038/nbt.1710 (дата звернення: 10.06.2026).

10. Plesa C. DropSynth: scaling protein engineering by orders of magnitude : presentation at 2020 DMS Workshop, Brotman Baty Institute, Seattle. 2020. URL: <https://www.youtube.com/watch?v=qRBL5C1tg9M> (дата звернення: 10.06.2026).

11. Baret J.-C. Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*. 2012. Vol. 12, no. 3. P. 422-433. DOI: 10.1039/C1LC20582J (дата звернення: 10.06.2026).

12. Yao C., Zhao Y., Ma H., Liu Y., Zhao Q., Chen G. Two-phase flow and mass transfer in microchannels: a review from local mechanism to global models. *Chemical Engineering Science*. 2021. Vol. 229. P. 116017. DOI: 10.1016/j.ces.2020.116017 (дата звернення: 10.06.2026).

13. Garstecki P., Fuerstman M. J., Stone H. A., Whitesides G. M. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*. 2006. Vol. 6, no. 3. P. 437-446. DOI: 10.1039/B510841A (дата звернення: 10.06.2026).

14. Anna S. L., Bontoux N., Stone H. A. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters*. 2003. Vol. 82, no. 3. P. 364-366. DOI: 10.1063/1.1537519 (дата звернення: 10.06.2026).

15. Holtze C., Rowat A. C., Agresti J. J. *et al.* Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*. 2008. Vol. 8, no. 10. P. 1632-1639. DOI: 10.1039/B806706F (дата звернення: 10.06.2026).

16. Chowdhury M. S., Zhang J., Amini L. *et al.* Dendronized fluorosurfactants for highly stable water-in-fluorinated oil emulsions with minimal interdroplet surfactant exchange. *Lab on a Chip*. 2019. Vol. 19, no. 24. P. 4082-4093. DOI: 10.1038/s41467-019-12462-5 (дата звернення: 10.06.2026).

17. Ho B., Jin J., Cheong K. H., Yan W. C. Antifouling Pluronic and Tetronic surfactants for microfluidic droplet generation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2023. Vol. 222. P. 113112. DOI: 10.1021/acsami.2c17317 (дата звернення: 10.06.2026).

18. Obermeyer Allie C., Mills Carolyn E., Dong Xue-Hui. H., et al, Effect of complex coacervation of enzymes with polyelectrolytes on the catalytic activity. *RSC Soft Matter*. 2016. Vol. 12, , no. 15. P. 3570-3581. DOI: 10.1039/C6SM00002A (дата звернення: 10.06.2026).
19. Hindson B. J., Ness K. D., Masquelier D. A. *et al*. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 83, no. 22. P. 8604-8610. DOI: 10.1021/ac202028g (дата звернення: 10.06.2026).
20. Huggett J. F. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*. 2020. Vol. 66, no. 8. P. 1012-1029. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa125 (дата звернення: 10.06.2026).
21. Madic J., Zocevic A., Senlis V. *et al*. Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2016. Vol. 10. P. 34-46. DOI: 10.1016/j.bdq.2016.10.002 (дата звернення: 10.06.2026).
22. Macosko E. Z., Basu A., Satija R. *et al*. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*. 2015. Vol. 161, no. 5. P. 1202-1214. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.002 (дата звернення: 10.06.2026).
23. Fluigent. Flow Unit, Flow Unit+, Flowboard : user's manual. Paris : Fluigent, 2025. URL: <https://www.fluigent.com/> (дата звернення: 10.06.2026).
24. Bio-Rad Laboratories. QX200 Droplet Digital PCR System and EvaGreen Supermix : instruction manual. Hercules, CA : Bio-Rad Laboratories, 2025. URL: <https://www.bio-rad.com/> (дата звернення: 10.06.2026).
25. Mazutis L., Gilbert J., Ung W. L., Weitz D. A., Griffiths A. D., Heyman J. A. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*. 2013. Vol. 8, no. 5. P. 870-891. DOI: 10.1038/nprot.2013.046 (дата звернення: 10.06.2026).
26. Nan L., Mao T., Shum H. C. Self-synchronization of reinjected droplets for high-efficiency droplet pairing and merging. *Lab on a Chip*. 2024. DOI: 10.1038/s41378-023-00502-6 (дата звернення: 10.06.2026).

27. Hoover D. M., Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*. 2002. Vol. 30, no. 10. P. e43. DOI: 10.1093/nar/30.10.e43 (дата звернення: 10.06.2026).
28. Hillson N. J., Rosengarten R. D., Keasling J. D. j5 DNA assembly design automation software. *ACS Synthetic Biology*. 2012. Vol. 1, no. 1. P. 14-21. DOI: 10.1021/sb2000116 (дата звернення: 10.06.2026).
29. Грубіян Н. Схема процесу відбору DropSynth 2.0 : внутрішня науково-технічна документація. Київ : ЮРiЯ-ФАРМ, 2025.
30. New England Biolabs. Product catalog and enzyme protocols. Ipswich, MA : NEB, 2025. URL: <https://www.neb.com/> (дата звернення: 10.06.2026).
31. Thermo Fisher Scientific. Dynabeads M-270 Streptavidin and Qubit dsDNA BR Assay Kit : product manuals. Waltham, MA : Thermo Fisher Scientific, 2025. URL: <https://www.thermofisher.com/> (дата звернення: 10.06.2026).
32. Basler AG. ace acA640-750um camera and pylon Camera Software Suite : documentation. Ahrensburg : Basler AG, 2025. URL: <https://www.baslerweb.com/> (дата звернення: 10.06.2026).
33. Stringer C., Pachitariu M. Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation. *Nature Methods*. 2025. Vol. 22, no. 3. P. 592-599. DOI: 10.1038/s41592-025-02595-5 (дата звернення: 10.06.2026).
34. Volk A., Kähler C. J. Density model for aqueous glycerol solutions. *Experiments in Fluids*. 2018. Vol. 59, no. 5. P. 75. DOI: 10.1007/s00348-018-2527-y (дата звернення: 10.06.2026).
35. Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS - mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020. Vol. 412, no. 9. P. 2009-2023. DOI: 10.1007/s00216-020-02490-2 (дата звернення: 10.06.2026).
36. Про охорону праці : Закон України від 14.10.1992 № 2694-XII.

37. ДСанПіН 6.6.1-079-02. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю : затв. наказом МОЗ України від 21.10.2002 № 4.

38. НПАОП 73.1-1.06-77. Основні правила безпеки під час роботи в хімічних лабораторіях. Чинний від 27.07.1977. Київ, 1977.

39. НПАОП 0.00-1.28-10. Правила охорони праці під час експлуатації електронно-обчислювальних машин : затв. наказом Держгірпромнагляду від 26.03.2010 № 65. Київ, 2010.

40. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень : затв. постановою Гол. державного санітарного лікаря України від 01.12.1999 № 42. Київ : МОЗ України, 1999.

41. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку : затв. постановою Гол. державного санітарного лікаря України від 01.12.1999 № 37. Київ : МОЗ України, 1999.

42. ДСТУ 4324:2004. Лабораторії медичні. Загальні вимоги до якості та компетентності. Чинний від 01.07.2005. Київ : Держспоживстандарт України, 2005. 28 с.

43. ДСТУ 2293:2014 «Охорона праці. Терміни та визначення основних понять»

44. ПУЕ. Правила улаштування електроустановок. Вид. 5-те, переробл. і доповн. Київ : Міненерговугілля України, 2017. 760 с.

45. НАПБ А.01.001-2014. Правила пожежної безпеки в Україні : затв. наказом МВС України від 30.12.2014 № 1417. Київ, 2014.

46. Про відходи : Закон України від 05.03.1998 № 187/98-ВР.

47. ДСанПіН 2.2.7.029-99. Гігієнічні вимоги щодо поводження з промисловими відходами та визначення їх класу небезпеки для здоров'я населення : затв. постановою Гол. державного санітарного лікаря України від 01.07.1999 № 29. Київ : МОЗ України, 1999.

48. Fluigent. Flow Rate Platform: Flow Unit. Технічний опис продукту. URL: <https://www.fluigent.com/research/> (дата звернення: 10.06.2026).

ДОДАТКИ

ДОДАТОК Б. Реагенти

Додаток містить повні специфікаційні таблиці реагентів, обладнання та компонентів мікрофлюїдної платформи, що застосовувались у роботі. Кожен підрозділ відповідає однойменному пункту в підрозділах 2.1-2.2.

Таблиця Б.1 - Олігонуклеотиди [5]

Назва	Послідовність 5'-3'	Модифікації	Призначення
skpp15-26-F	GCGGCACCACAAACT	-	Універсальний прямий праймер
skpp15-26-F-B	GCGGCACCACAAACT	5'-біотин	Біотинільований прямий праймер для іммобілізації
skpp15-26-R	CGTGGCCTCTGTCCT	-	Універсальний реверсний праймер
AsmF_40bpIT R	TAAGCGCCCTTCTAATAC CCAGGTCTGGCCCTATAT ACGAATCGGGGATGGTA ACTAACG	-	Прямий ITR-праймер ePCR-збірки
AsmR_40bpIT R	TAAGCGCCCTTCTAATAC CCAGGTCTGGCCCTATAT ACGAATAGCTGATTGTCC GTTGGT	-	Реверсний ITR-праймер ePCR-збірки
Suppression_pr imer	AGGTCTGGCCCTATATAC GA	-	Single-primer супресорної ПЛР
Anchor_oligo	TTGTTAGGTTTACTCGCG GAACACGTGCTATTAGAT GCCT	5'-подвійний біотин	Анкерний штрихкод-олігонуклеотид
Ligation_oligo	TCCGCGAGTAAACCTAA CAA	3'-біотин, 5'-фосфат	Лігаційний штрихкод-олігонуклеотид
Barcode_oligo _cp12mer-1	GGCGTTGATATGAGGCAT CTAATAGCACGTGT	-	Штрихкод BRD1 (Набір А)
Barcode_oligo _cp12mer-2	GGGAACACTACAAGGCA TCTAATAGCACGTGT	-	Штрихкод BRD2 (Набір В)
A1, A2, A3	300 нт каркас iHRV-A57	-	Синтетичні фрагменти Набір А
B1, B2, B3	300 нт каркас iHRV-B14	-	Синтетичні фрагменти Набір В

Таблиця Б.2 - Ферменти і реакційні буфери [30]

Реагент	Постачальник, кат. №	Стокова концентрація	Призначення
Q5 Hot Start HiFi DNA Polymerase	NEB M0493	2 од/мкл	Усі ПЛР-стадії
5× Q5 Reaction Buffer	NEB B9027	5×	Буфер Q5 standalone
10 mM dNTPs	NEB N0447	10 mM кожного	Нуклеотиди для ПЛР
Nt.BspQI	NEB R0644S	10 од/мкл	Одноланцюговий розрив біотинільованих PCR-продуктів
BtsI-v2	NEB R0667S	5 од/мкл	In-droplet та in-vitro рестрикція
NEBuffer r3.1	NEB B7203	10×	Буфер для Nt.BspQI
rCutSmart Buffer	NEB B6004	10×	Буфер in-vitro BtsI-v2 QC
Taq DNA Ligase	NEB M0208S	40 од/мкл	Лігація PCR-продуктів на бусинах
10× Taq DNA Ligase Reaction Buffer	NEB B0208	10×	Буфер Taq Ligase
T4 DNA Ligase	NEB M0202L	400 од/мкл	Збірка штрихкод-триплету
10× T4 DNA Ligase Reaction Buffer	NEB B0202	10×	Буфер T4 Ligase
T4 Polynucleotide Kinase	NEB M0201L	10 од/мкл	5'-фосфорилювання штрихкодів
QX200 ddPCR EvaGreen Supermix without dUTP	Bio-Rad 1864033	2×	Еталон проти MDSMM

Таблиця Б.3 - Реагенти емульсії [24]

Реагент	Постачальник, кат. №	Призначення
QX200 Droplet Generation Oil for EvaGreen	Bio-Rad 1864005	Неперервна олійна фаза (HFE-7500 + PFPE-PEG-сурфактант)
Mineral Oil (light, BioXtra grade)	Sigma M5310-100ML	Overlay у PCR-пробірках
1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol (PFO)	Sigma 370533-5G	Емульсійний breaker
Ізопропанол (99,9%)	ACS-grade	Промивання тракту Fluigent після кожного запуску

Таблиця Б.4 - Реагенти електрофорезу і PAGE

Реагент	Стокова форма	Призначення
Агароза	Молекулярно-біологічний клас	AGE 1% у 1× TBE
Tris base + борна кислота + 0,5 М EDTA pH 8,0	5× TBE буфер (54 г Tris, 27,5 г H ₃ BO ₃ , 20 мл EDTA на 1 л)	Робочий буфер AGE / PAGE
Acrylamide : Bis 29:1, 30% T 2,67% C	Готовий розчин	Native PAGE
Acrylamide : Bis 19:1, 30% T 2,67% C	Готовий розчин	Urea-PAGE
TEMED	Чистий рідкий	Каталізатор полімеризації
Ammonium persulfate (APS)	10% водний маточний	Ініціатор полімеризації
Урея	Тверда, ACS-grade	8 М денатурант у Urea-PAGE
Етидій бромід (EtBr)	10 мг/мл маточний	Візуалізація ДНК
HiDi Formamide	Thermo Fisher	Основа - формамідний буфер для нанесення
Bromphenol Blue	Тверда сіль	Tracking dye
6× DNA Gel Loading Dye	Готовий розчин	Лоадинг-буфер AGE
1 kb plus DNA Ladder	Готовий розчин	Розмірний маркер
100 bp DNA Ladder	Готовий розчин	Розмірний маркер
Low Range DNA Ladder	Готовий розчин	Розмірний маркер коротких фрагментів

Таблиця Б.5 - Бусини і допоміжні реагенти [31]

Реагент	Постачальник, кат. №	Призначення
Dynabeads M-270 Streptavidin	Invitrogen 65305	Носій штрихкод-олігонуклеотидів
NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M EDTA pH 8,0	ACS-grade	Компоненти 2× B&W-буфера
Qiagen Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5)	Qiagen 19086	Елюція з бусин
AmpliClean Magnetic Beads	NimaGen	SPRI-очищення PCR-продуктів
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen Q32850	Флуорометричне кількісне визначення ДНК
Етанол 99% / 70%	ACS-grade	Свіжо-приготовлені промивки SPRI
Ультрариста вода (Type I)	Direct-Q Millipore	Розведення усіх буферів
1× TE-буфер (Tris-Acetate pH 8,0, EDTA)	10 mM / 1 mM	Елюція AmpliClean

Таблиця Б.6 - Обладнання

Обладнання	Модель / постачальник	Призначення
PCR-термоциклер з градієнтним блоком	Applied Biosystems ProFlex	Всі термоциклювальні стадії
Флуориметр	Qubit 4 (Invitrogen)	Кількісна оцінка ДНК
Інвертований мікроскоп	Euromex Oxion + док-станція	Моніторинг утворення крапель в реальному часі
Мікроскоп для післяемульсійного аналізу	EVOS FL Auto 2 + LUNA Cell Counting Slides	Вимірювання діаметрів і CV
Гемоцитометр	Improved Neubauer	Підрахунок штрихкодovаних бусин
Гель-документатор	Azure Biosystems Gel Imager 200	Зйомка AGE та PAGE
Термомікшер з нагрівом	Стандартний benchtop	Підготовка штрихкодovаних бусин
Аналітичні ваги	0,1 мг роздільна здатність	Гравіметричне калібрування Flow Units
Центрифуга	MiniSpin (Eppendorf)	Короткі відцентрифугування
Personal Vortex з відцентрифугуванням	FVL-2400N (Biosan)	Поєднання вихрового струшування і відцентрифугування
Набір автоматичних піпеток	Eppendorf Research Plus P10-P5000	Дозування
Холодильник комбінований	+4 °C / -20 °C відсіки	Зберігання реагентів
Система ультрачистої води	Direct-Q (Millipore), Type I	Підготовка буферів
Тубо-ротатор	Hula Mixer (Thermo Fisher)	Гомогенізація штрихкодovаних бусин

Таблиця Б.7 - Мікрофлюїдична система Fluigent Drop-Seq [23]

Компонент	Модель / специфікація	Призначення
Контролер тиску	LineUp Flow EZ (×3, діапазон до 2000 мбар)	Керування тиском у трьох каналах
Flow Unit (водні канали)	FU-M (0-80 мкл/хв, водяне калібрування)	Зворотний зв'язок для Channels 2, 3
Flow Unit (олійний канал)	FU-L (0-1 мл/хв, водяне калібрування)	Зворотний зв'язок для Channel 1
Концентратор	LineUp LINK Module (USB)	Комутація контролерів і сенсорів
Supply Kit	Fluigent LU-SPK-0002	Подача стисненого повітря
P-Cap-ущільнювачі	Fluigent P-Cap	Герметизація резервуарних пробірок
Tubing & Fitting Kit	Fluigent стандартний	Гідравлічне з'єднання вузлів
PDMS-чип	Fluigent Drop-Seq, flow-focusing-геометрія	Місце утворення крапель
Камера	Basler ace acA640-750um (USB 3.0, моно, 640×480, до 750 fps)	Реальночасне захоплення

ДОДАТОК В. Протоколи

Додаток містить детальні покрокові протоколи молекулярно-біологічних процедур та налаштування мікрофлюїдної платформи. Підрозділи відповідають підрозділам 2.4-2.5; для ясності у дужках наведено пов'язаний підрозділ основного тексту.

В.1 Q5-ампліфікація фрагментів (підрозділ 2.4.1) [5]

1. На льоду зібрати реакційну суміш 25 мкл за рецептурою таблиці 2.3: спочатку буфер і dNTPs, потім праймери, матрицю, полімераза в кінці.
2. Перенести в термоциклер Applied Biosystems ProFlex з попередньо нагрітим блоком (>50 °C).
3. Запустити програму:
 - 1) 30 с 98 °C початкова денатурація
 - 2) 10 с 98 °C денатурація
 - 3) 20 с 55 °C відпал
 - 4) 30 с 72 °C елонгація
 - 5) Перехід до кроку 2, 25 циклів
 - 6) 2 хв 72 °C фінальна елонгація
 - 7) Утримання за 4 °C
4. очищення AmpliClean за Б.6.
5. Кількісне визначення Qubit dsDNA BR.

В.2 Рестрикційний аналіз (підрозділ 2.4.2) [5]

Одноланцюговий розрив Nt.BspQI:

1. Зібрати 50-мкл реакцію: 5 мкл 10× NEBuffer r3.1, 2 мкл Nt.BspQI (10 од/мкл) і 43 мкл біотинільованого PCR-продукту (~1-2 мкг).
2. Інкубувати при 50 °C впродовж ночі (≥12 год) на термомікшері з перемішуванням ≥1500 об/хв.
3. Перенести продукт до наступного кроку захоплення на бусини (Б.3).

BtsI-v2 *in vitro* QC:

1. Зібрати 10-мкл реакцію: 1 мкл плазмідної матриці (~400 нг), 0,7 мкл BtsI-v2 (5 од/мкл), 1 мкл 10× Q5 Reaction Buffer, 0,7 мкл 20 мг/мл BSA, відповідний об'єм 10% Pluronic F-68 і вода до 10 мкл.

2. Інкубувати 55 °C, 1 год.

3. Проаналізувати на AGE 1% TBE.

V.3 Підготовка штрихкодovаних бусин (підрозділ 2.4.3) [3]

1. Гібридизація триплету. Змішати Anchor_oligo + Ligation_oligo + Barcode_oligo_cp12mer у 1× T4 DNA Ligase Reaction Buffer (по 100 мкМ кожного, об'єм 20 мкл). Програма відпалу: 70 °C протягом 3 хв, далі 60, 50, 40 і 30 °C по 1 хв на крок (градієнт 0,1 °C/с), з подальшим переносом на лід.

2. Лігація: T4 DNA Ligase 16 °C, ≥1 год; інактивація 65 °C протягом 20 хв.

3. Фосфорилування: T4 PNK 37 °C протягом 40 хв; інактивація 65 °C протягом 20 хв.

4. Імобілізація: на M-270 Streptavidin Dynabeads (тричі промитих у 2× B&W), кімнатна температура, перемішування ≥2000 об/хв впродовж ночі.

5. Промивання: 5 × 2× B&W; повторне суспендування у 2× B&W для зберігання за +4 °C.

V.4 Емульсійна ПЛР DropSynth V2 (підрозділ 2.4.4) [3]

1. Підготувати MDSMM-master-mix для Channels 2 і 3 за рецептурою таблиці 2.4; додати BtsI-v2 (Channel 2) або штрихкодovані бусини (Channel 3) безпосередньо перед запуском.

2. Помістити олію (Channel 1, QX200) у резервуарну пробірку з P-Cap; резервуари Channels 2 і 3 - з P-Cap і Hula Міхер для бусин.

3. Запустити DropleGEN з попередньо налаштованою конфігурацією QOil = 300, $Q_{BtsI} = Q_{Beads} = 40$ мкл/хв.

4. Активне утворення крапель - 30 с (5 с стабілізації + 25 с збору).

5. Зібрати емульсію у тонкостінні 200-мкл PCR-пробірки, додати 50 мкл мінеральної олії як верхній шар.

6. Термоциклер:

1) 90 хв 55 °C внутрішньокраплинне BtsI-v2

- 2) 30 с 98 °С початкова денатурація
 - 3) 10 с 98 °С денатурація
 - 4) 20 с 55 °С відпал
 - 5) 45 с 72 °С елонгація
 - 6) Перехід до кроку 3, 30 циклів
 - 7) 2 хв 72 °С фінальна елонгація
 - 8) Утримання за 4 °С
7. Емульсію розірвати додаванням PFO 1:1, вихрове струшування 1 хв, центрифугування 15 500 g / 10 хв.
8. Відібрати водну фазу для підрозділів 2.4.5 і 2.4.6.

В.5 Супресорна ПЛР (підрозділ 2.4.5) [5]

1. Зібрати 25-мкл реакцію за таблицею 2.5 (з 5 мкл ePCR-екстракту без розведення).
2. Програма ProFlex:
 - 1) 3 хв 95 °С початкова денатурація
 - 2) 15 с 98 °С денатурація
 - 3) 30 с 55 °С відпал
 - 4) 15 с 72 °С елонгація
 - 5) Перехід до кроку 2, 25 циклів
 - 6) 1 хв 72 °С фінальна елонгація
 - 7) Утримання за 4 °С
3. очищення AmpliClean за Б.6.
4. Аналіз на AGE.

В.6 Очищення ДНК AmpliClean (підрозділ 2.4.6)

1. Перемішати AmpliClean вихровим струшуванням до однорідності.
2. Додати AmpliClean у співвідношенні 1,8 : 1 за об'ємом до зразка; піпетним перемішуванням гомогенізувати.
3. Інкубувати 3-5 хв при кімнатній температурі.
4. Магнітна сепарація 2 хв; відвести надосадову рідину.
5. Двократне промивання - 150 мкл свіжого 70% етанолу, 30-секундна інкубація між циклами.
6. Підсушити ≤5 хв при кімнатній температурі.
7. Зняти з магніту, додати 40 мкл 1× TE-буфера,

повторно суспендувати піпеткою. 8. Магнітна сепарація 1 хв. 9. Перенести елюат у чисту пробірку.

В.7 Гель-електрофорез і PAGE (підрозділ 2.4.7)

AGE 1% TBE: розчинити 0,5 г агарози у 50 мл 1× TBE з нагріванням; залити у форму; додати EtBr; завантажити зразки з 6× Loading Dye; розділити при 100 В / 30-45 хв. Native PAGE: гелева суміш 8 мл - 2666,7 мкл маточного розчину AA (29:1, 30% T), 800 мкл 10× TBE, 5600 мкл H₂O, 40 мкл 10% APS, 4 мкл TEMED; полімеризація RT 60 хв; попередній прогін 30 хв за 50 В; основний прогін 100 В у 0,5× TBE. Urea-PAGE: гелева суміш 7 мл - 2333,3 мкл маточного розчину AA (19:1, 30% T), 1400 мкл 5× TBE, 3,36 г сечовини, вода до об'єму, 35 мкл 10% APS, 3 мкл TEMED; полімеризація 15 хв; попередній прогін + основний прогін 250 В у 1× TBE; денатурація зразків 95 °C / 3 хв з Formamide Loading Dye.

В.8 Калібрування Flow Units (підрозділ 2.5.1) [23]

1. Підключити Flow Unit і Flow EZ до DropleGEN у режимі Q_{cmd} .
2. Задати $V_{cmd} = 100$ мкл при робочій витраті.
3. Тарувати 2-мл пробірку на аналітичних вагах.
4. Запустити дозування - контролер автоматично припиняє потік за досягнення V_{cmd} .
5. Зважити пробірку; розрахувати $V_{real} = \Delta m / \rho$.
6. Коефіцієнт $k = V_{real} / V_{cmd}$.
7. Повторити з $n = 3$ для усереднення дрейфу мертвого об'єму трубок.
8. Внести усереднене k у DropleGEN як а-член лінійного поліноміального калібрування.

ДОДАТОК Д. Програмне забезпечення

Додаток містить деталізовану документацію трьох власних Python-пакетів, описаних оглядово у підрозділі 3.5. Усі пакети - MIT-license, репозиторії на GitHub в обліковому записі merv1n34k.

Д.1 DropDrop

Репозиторій: github.com/merv1n34k/dropdrop.

PyPI: dropdrop.

Залежності: Python 3.12+, Cellpose 3.0, OpenCV, NumPy, PyTorch (CUDA на Linux/Windows, Metal/MPS на macOS).

Робота у двох режимах: одиничний (`dropdrop ./images`) для аналізу однієї серії та мультиплексний (`dropdrop -m ./parent_dir`) для пакетного оброблення підкаталогів. Параметри сегментації налаштовуються через `config.json`: `cellpose_flow_threshold`, `cellpose_cellprob_threshold`, `erosion_pixels`, `kernel_size`, `tophat_threshold`, `min/max_inclusion_area`, `edge_buffer`, `min/max_droplet_diameter`, `px_to_um`. Інтерактивний редактор (`-e`) для ручного коригування включень. Вихід: `data.csv` (sample, frame, droplet_id, center_x, center_y, diameter_px/um, area_px/um², inclusions), `summary.txt`, `report.png`, `size_distribution.png`, `poisson_comparison.png` [33].

Д.2 DropleGEN

Репозиторій: github.com/merv1n34k/droplegen.

PyPI: droplegen.

Документація: merv1n34k.github.io/droplegen.

Залежності: Python 3.12+, PySide6, pyqtgraph, DropletUI, Fluigent SDK (комплектний). На macOS Apple Silicon вимагається x86_64-Python через натівні обмеження Fluigent SDK.

Архітектура: трипотокова з центральним Controller-медіатором - Main Thread (Qt UI: control panel, pipeline panel, monitor panel, реальночасні pyqtgraph-графіки витрати/тиску), Acquisition Thread (100-мс опитування сенсорів, опційний CSV-recording), Pipeline Thread (виконання кроків автоматизації з

тригерами за часом / об'ємом / порогом / умовою). Pipeline-конфігурації зберігаються у JSON. Simulated Mode на симульованих інструментах Fluigent SDK для розробки без апаратного підключення.

Д.3 PylonGuy

Репозиторій: github.com/merv1n34k/pylonguy.

PyPI: [pylonguy](https://pypi.org/project/pylonguy).

Залежності: Python 3.12+, [pypylon](https://pypi.org/project/pypylon) (Basler Pylon SDK), [ffmpeg](https://ffmpeg.org/) у PATH. Архітектура - двофазна: фаза capture (потік кадрів від камери у буфер пам'яті і raw-файли на диск) + фаза обробки ([ffmpeg](https://ffmpeg.org/) збирає raw у відеопотік з довільною заданою частотою відтворення). Адаптивна стратегія захоплення для попереднього перегляду без затримки. Інтерактивна ROI-конфігурація.

Профілі: Default, HighSpeed, FullFrame, Microfluidics (з автоматичним застосуванням при підключенні камери). Waterfall-режим - запис у .wtf-форматі з конвертацією у PNG через [pylonguy.wtf2png](https://pypi.org/project/pylonguy.wtf2png).

Д.4 Допоміжні утиліти

[ffmpeg](https://ffmpeg.org/) - застосовується PylonGuy для постобробки raw-кадрів у відеопотоки H.264 / MJPEG; має бути встановлений у PATH ([brew install ffmpeg](https://brew.sh/) на macOS, [sudo apt install ffmpeg](https://askubuntu.com/questions/113400/how-to-install-ffmpeg-on-ubuntu) на Ubuntu/Debian, окрема інсталяція на Windows). [uv](https://uv.pypi.org/) - менеджер віртуальних середовищ і залежностей для всіх трьох пакетів. [git](https://git-scm.com/) - контроль версій. R-скрипти для статистичного пост-аналізу ([beads_troubleshoot.R](#) та допоміжні) включено у репозиторій проєкту.