



ТВЕРДОФАЗНАЯ ПЦР НА ПЛЕНОЧНЫХ БИОЧИПАХ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ, “ЛАБОРАТОРИЯ НА ЧИПЕ”

© 2025 г. И. Ю. Шишкун*, К. А. Синников*, Г. Ф. Штылев*, Р. А. Мифтахов*,
О. А. Заседателева*, В. Е. Кузнецова*, В. Е. Шершов*, С. А. Суржиков*,
В. А. Василиков*, С. А. Лапа*, А. В. Чудинов*,[#]

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН),
Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32/1

Поступила в редакцию 06.12.2024 г.

После доработки 26.12.2024 г.

Принята к публикации 27.12.2024 г.

Разработан многофакторный высокочувствительный анализ нуклеиновых кислот на биологических микрочипах в закрытой от внешней среды системе, без переноса биологического материала из одной емкости в другую и без добавления дополнительных компонентов в ходе выполнения анализа с целью уменьшения вероятности контаминации в ходе выполнения анализа и возможности автоматизации процесса. Подложки из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ), используемые для изготовления биочипов, обрабатывали коронным разрядом; на поверхности подложки при вращении получали тонкий слой фотоактивного поливинилацетата; методом фотоинициируемой радикальной полимеризации мономеров “от поверхности” фотолитографически при УФ-облучении через фотомаску на поверхности получали матрицу ячеек из щеточных полимеров. Реактивные карбоксильные группы на полимерных цепях активировали, в ячейках биочипа иммобилизовали праймеры с С6-аминомодификацией на 5'-конце. Подложки с иммобилизованными в ячейках праймерами использовали для изготовления биочипов. В ячейках биочипа проводили ПЦР с удлинением иммобилизованных праймеров с контролем по встраиванию Су5-флуоресцентно-меченых нуклеотидов. Разработан метод анализа нуклеиновых кислот твердофазной ПЦР с удлинением иммобилизованных праймеров в закрытом пленочном биочипе при термоциклировании, с контролем по встраиванию Су5-флуоресцентно-меченых нуклеотидов методом цифровой флуоресцентной микроскопии по конечной точке. Разработан “пленочный” биочип, изготовленный из пленочного ПЭТ, с внутренней камерой, с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованными праймерами, с каналами для подачи и удаления растворов в камеру биочипа, с низкой теплопроводностью и высокой теплопроводностью тонких пленочных компонентов биочипа, с термоциклированием, с регистрацией результатов методом цифровой флуоресцентной микроскопии через крышку и слой промывной жидкости, не разбирая биочип, в изолированной от внешней среды системе, “лаборатория на чипе”. Работоспособность метода и функциональная пригодность пленочного биочипа продемонстрированы при анализе образцов, содержащих ДНК патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Legionella pneumophila*. “Пленочные” биочипы из доступного пленочного ПЭТ с ячейками из щеточных полимеров представляются перспективными для дальнейшего совершенствования и использования твердофазной ПЦР в мультиплексном анализе нуклеиновых кислот для развития технологий микронализации “лаборатория на чипе” и применения в клинических лабораториях.

Ключевые слова: биочипы, твердофазная ПЦР, щеточные полимеры, иммобилизация олигонуклеотидов

DOI: 10.31857/S0132342325040062, **EDN:** LNBRXD

Сокращения: Су5-NH₂ – 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-кето-тридекан-13-ил)индодикарбониин; EDC – 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлорид; HOSu – N-гидроксисукциниимид; ImD-dU49 – литиевая соль 5-[14-[1,1'-диэтил-3,3,3',3'-триметил-5'-сульфонидогидрофталоцианин-5-ил]-14-сульфо-4,13-диаза-5,12-диоксотетрадец-1-ен-1-ил]-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; БСА – бычий сывороточный альбумин; БФ – бензофенон; ПВАц – поливинилацетат; ПЭТ – полиэтилентерефталат; Трис – три(гидроксиметил)-аминометан.

Автор для связи: (тел.: + 7 (499) 135-98-00; эл. почта: chudhome@rambler.ru; chud@eimb.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Исследование нуклеиновых кислот занимает важное место в различных областях человеческой деятельности. Например, параллельный анализ специфических последовательностей ДНК, реализованный в методе гибридизации ДНК на олигонуклеотидных биочипах, используется в научных исследованиях и клинической диагностике [1, 2]. Анализируемые последовательности ДНК перед гибридизацией на биочипах амплифицируют методом ПЦР в отдельной пробирке. Проведение ПЦР в гомогенном водном растворе осложняется межпраймерными взаимодействиями. В результате интерференции праймеров происходит образование димеров и снижается эффективность амплификации, что в итоге ограничивает возможности многофакторного гибридизационного анализа [3]. При этом необходим перенос биологического материала из одной емкости в другую, что увеличивает риск контаминации и трудоемкость выполнения анализа.

Для увеличения числа мишеней, которые амплифицируют в ходе одной реакции ПЦР, можно использовать пространственное разделение различных пар праймеров путем их иммобилизации на твердую фазу. Микрочипы с матрицей пространственно разделенных ячеек – идеальная платформа для такого анализа. Предложены разные стратегии анализа последовательностей ДНК на микрочипах, направленные на сочетание амплификации нуклеиновых кислот с параллельной многопараметрической регистрацией результатов. Так, на гелевых биочипах проведена амплификация одновременно в растворе, покрывающем матрицу гидрогелевых кросс-сшитых поликарбонатных ячеек, и внутри самих ячеек с иммобилизованными прямыми праймерами. В растворе находились флуоресцентно-меченные обратные праймеры и остальные ПЦР-компоненты. Результаты амплификации оценивали по кривым плавления дуплексов, образованных меченым продуктом амплификации и иммобилизованными в геле праймерами [4]. Для уменьшения взаимного перекрестного переноса биологического материала между ячейками биочипа в процессе параллельной независимой амплификации ДНК было предложено гелевые ячейки биочипа дополнитель но покрывать минеральным маслом [5]. Один из высокоэффективных подходов к проведению твердофазной ПЦР – ПЦР с удлинением

праймеров, что позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности анализа. На примере анализа однонуклеотидных полиморфизмов генов *Mycobacterium tuberculosis* было проведено сравнение гибридизационного анализа, лигазной реакции и аллель-специфичной реакции удлинения иммобилизованных праймеров на гелевых биочипах [6]. Реакция удлинения праймеров методически существенно проще двух других исследованных методов и позволила повысить чувствительность и специфичность анализа. Удлинение праймеров регистрировали гибридизацией с флуоресцентно-меченными пробами. Образование двуцепочечных продуктов в ячейках биочипов также можно эффективно регистрировать по связыванию с неспецифическим интеркалирующим красителем SYBR Green [7]. Эффективный способ разделения праймеров – их ковалентная иммобилизация на поверхности подложек биочипов. Так, в работе [8] проведена ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов в пористый слой кристаллического оксида кремния с привитым слоем гидрофильного поликарбонатного сополимера. Удлинение праймеров регистрировали гибридизацией с флуоресцентно-меченными олигонуклеотидами. В работе [9] проведена мультиплексная твердофазная ПЦР с удлинением праймера на стеклянных биочипах с ковалентно иммобилизованными праймерами для исследования мутаций наследственного заболевания крови талассемии с набором четырех флуоресцентно-меченых дидезоксинуклеотидов. Регистрацию проводили флуориметрически по изменению цветового кода сайтов праймеров. Получено высокое соотношение сигнал/фон. Прочная ковалентная сайт-специфическая иммобилизация олигонуклеотидов позволила использовать их в качестве праймеров твердофазной ПЦР. Твердофазная бридж-амплификация ПЦР способна полностью устранить межпраймерные взаимодействия при мультиплексной ПЦР на чипе. Однако бридж-ПЦР с иммобилизованными парами праймеров в ячейках биочипов при отсутствии праймеров в растворе характеризуется очень низкой эффективностью амплификации [10, 11].

Твердофазная ПЦР на биочипах в варианте удлинения иммобилизованных праймеров представляет значительный интерес для исследователей в качестве привлекательного метода анализа нуклеиновых кислот, совмещающего чувстви-

тельность, обусловленную амплификацией, и множественную параллельную регистрацию результатов [6–9, 12, 13]. Чувствительность и специфичность анализа ДНК методом твердофазной ПЦР зависит от концентрации праймеров, иммобилизованных в ячейках биочипа, сохранности их свойств и пространственной доступности для взаимодействия с анализируемой мишенью и компонентами реакционной смеси ПЦР, способа регистрации удлинения праймеров. В работе [14] удлинение иммобилизованных в кросс-сшитых ячейках биочипа праймеров регистрировали по встраиванию флуоресцентно-меченых нуклеотидов. Для этого использовали флуоресцентно-меченные красителем Су5 производные трифосфата дезоксиуридина. Такой способ регистрации позволил провести отмытку после реакции при высокой температуре и полностью избавиться от неспецифического связывания компонентов реакционной смеси, что привело к снижению фонового сигнала и увеличению чувствительности анализа. Также для проведения твердофазной ПЦР важную роль играет соотношение прямых и обратных праймеров. Часто для образования преимущественно одноцепочечных продуктов в растворе, специфичных к иммобилизованным на биочип праймерам, используют их асимметричное соотношение. Такой подход применяется в гнездовой твердофазной ПЦР [15].

Недостаток иммобилизации праймеров в кросс-сшитые гидрогелевые ячейки или в сплошной слой пористого носителя – кинетическое препятствие для диффузии анализируемой пробы и других ПЦР-компонентов, а предметные микроскопные стекла толщиной 1 мм, обычно используемые в качестве подложки гелевых биочипов, имеют низкую теплопроводность и высокую теплоемкость, что отрицательно влияет на эффективность ПЦР. Эффективность амплификации определяется точностью поддержания температуры внутри ячейки-микрореактора и скоростью термоциклирования [16]. Альтернативой трехмерным кросс-сшитым полиакриламидным ячейкам выступают трехмерные ячейки из щеточных полимеров, закрепленных на подложке только одним концом. Ячейки биочипов из щеточных полимеров с реактивными группами обладают потенциалом высокой емкости благодаря своей трехмерной структуры для иммоби-

лизации молекулярных зондов и пространственной доступности за счет динамической подвижности полимерных цепей, не связанных между собой, в отличие от кросс-сшитых гидрогелевых ячеек [17, 18]. Ранее мы сообщали об использовании щеточных биочипов на подложках из полиэтилентерефталата (ПЭТ) и алюминия с матрицей ячеек из щеточных полимеров для проведения гибридизационного анализа нуклеиновых кислот [19, 20].

Из литературных источников известно, что анализ ДНК в закрытой системе биочипа демонстрирует сокращение времени проведения исследований и предотвращает риск контаминации образцов. Технология “лаборатория на чипе”, активно применяемая для анализа ДНК, основывается на проведении всех этапов анализа на одном чипе, что обеспечивает высокую степень изоляции и использование минимальных объемов реагентов и проб [21, 22]. В качестве основных материалов для производства биочипов в формате “лаборатория на чипе” выступают полидиметилсилоксан, полиметилметакрилат, стекло [23, 24].

Цель данной работы – проверка применимости пленочных биочипов из ПЭТ с ячейками из щеточных полимеров для анализа нуклеиновых кислот методом твердофазной ПЦР с удлинением праймера с контролем по встраиванию флуоресцентно-меченых нуклеотидов в закрытой системе, “лаборатория на чипе”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полимерное покрытие полиэтилентерефталатной подложки. Подложки из ПЭТ отмывали от возможных загрязнений, а затем обрабатывали коронным разрядом в окружающей воздушной атмосфере. На подложку при вращении на центрифуге наносили раствор поливинилацетата (ПВАц) и бензофенона (БФ) в метилэтилкетоне. После испарения растворителя на поверхности остается тонкая полимерная пленка, которая не растворяется и не отслаивается в воде. Тонкий слой ПВАц, получаемый при вращении на центрифуге, удерживается на поверхности ПЭТ лучше, чем при погружении пленки ПЭТ в раствор (данные не приведены).

Матрица ячеек из щеточных полимеров. Ячейки из щеточных полимеров на поверхности подложки получали методом фотоинициируемой радикальной полимеризации мономеров “от

поверхности" при УФ-облучении через фотомаску, методом фотолитографии. Схема получения ячеек из щеточных полимеров представлена на рис. 1. Подложку ПЭТ, покрытую пленкой ПВАц с БФ, помещали в держатель, наносили водный раствор мономеров акриламида и акриловой кислоты, накрывали фотомаской. Высоту слоя раствора мономеров регулировали спейсером между ПЭТ и фотомаской. После облучения УФ-светом ($\lambda = 254$ нм) через фотомаску получали регулярную матрицу квадратных ячеек 200×200 мкм с шагом 600 мкм. Полученные ячейки из щеточных

полимеров прочно держатся на поверхности подложки, не разрушаются и не отслаиваются в воде.

Для подтверждения целесообразности обработки ПЭТ-подложек коронным разрядом контролировали прочность связывания ячеек с подложками в заведомо жестких условиях. Обработка биочипов ацетонитрилом в ультразвуковой бане в одинаковых условиях показывает, что на ПЭТ-подложках, обработанных коронным разрядом, ячейки прочнее держатся на поверхности и меньше разрушаются (данные не приведены).

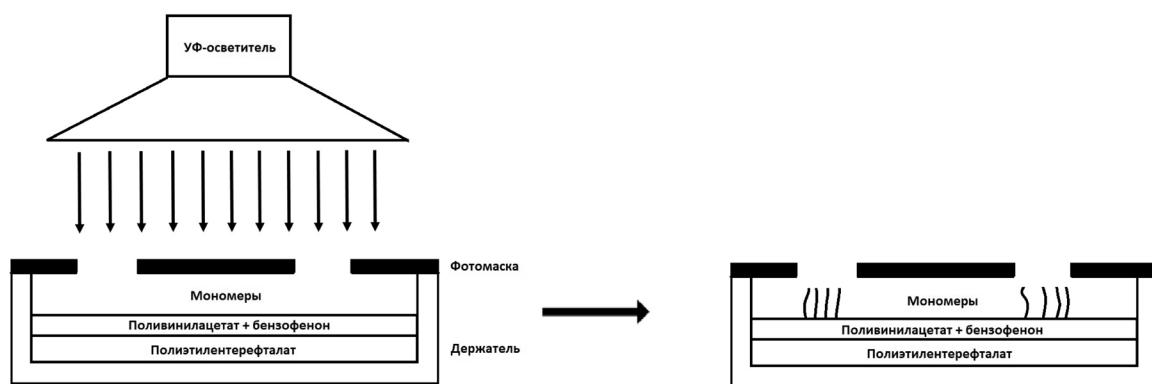


Рис. 1. Схема получения ячеек из щеточных полимеров на поверхности подложки из ПЭТ методом фотополимеризации мономеров "от поверхности" при УФ-облучении через фотомаску, методом фотолитографии.

Активация ячеек и иммобилизация маркера и праймеров. Реактивные карбоксильные группы на полимерных цепях в ячейках, полученных фотополимеризацией акриламида и акриловой кислоты, активировали реакцией с *N*-гидроксисукцинимидом (HO*Su*) и *N*-этил-*N*-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC) в MES-буфере (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота) по методу [19]. Получали привитые полимерные цепи с активными карбоксильными группами в виде сукцинимидных эфиров (рис. 2).

На рис. 3 представлены флуоресцентные картины ячеек биочипов с подложкой, обработанной коронным разрядом (рис. 3 a), и без обработки (рис. 3 b) в свете флуоресценции красителя Су5 ($\lambda_{\text{возб.}} = 650$ нм) с ячейками после активации HO*Su* и EDC и связывания с индодикарбоцианиновым флуоресцентным красителем с первичной аминогруппой Су5-*NH*2 в одинаковых условиях. Ячейки биочипа на подложках, обработанных коронным разрядом, имеют большую емкость по связыванию с аминосодержащим красителем. Представленные

данные демонстрируют целесообразность обработки поверхности ПЭТ-подложек коронным разрядом, и все дальнейшие эксперименты проводили на предварительно коронированных подложках.

В ячейках биочипа, активированных HO*Su* и EDC, иммобилизовали олигонуклеотидные зонды и обратные праймеры, специфичные к бактериальным возбудителям пневмонии человека – *Staphylococcus aureus* и *Legionella pneumophila*, с С6-аминомодификацией по 5'-концу (рис. 2). Последовательности праймеров подобраны нами ранее и представлены в табл. 1. Праймеры R1 и R2 – обратные праймеры, специфичные к *S. aureus*, а праймеры R6 и R7 – к *L. pneumophila*. Праймеры и маркерный олигонуклеотид иммобилизовали в ячейках биочипа при капельном нанесении роботом-манипулятором на индивидуальные активированные ячейки по заданной раскладке (рис. 4 a). В ячейках происходит ковалентное связывание олигонуклеотидов с полимерными цепями амидной связью. После инкубации и отмыки от несвязавшихся компонентов на анали-

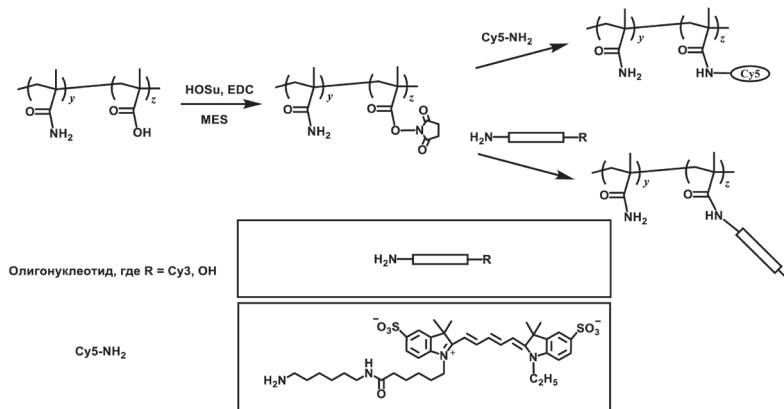
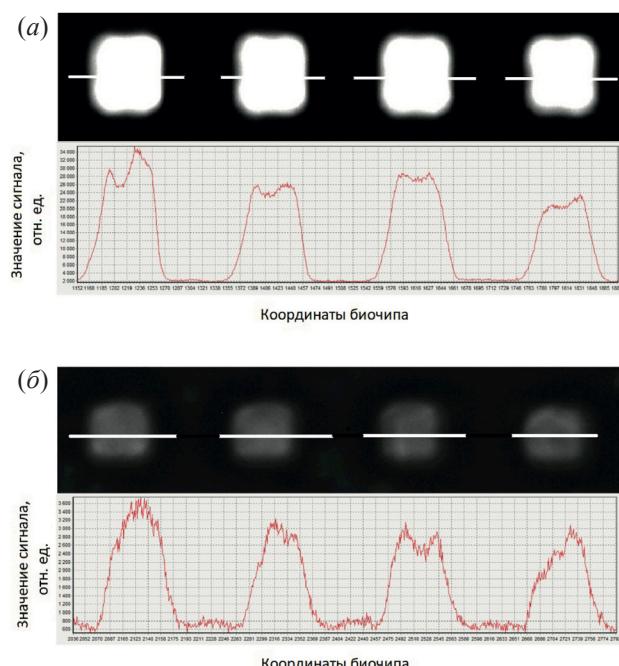


Рис. 2. Схема активации карбоксильных групп на полимерных цепях в ячейках, полученных фотополимеризацией акриламида и акриловой кислоты, связывания с красителем Cy5-NH₂ и с праймерами.



заторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентную картину биочипа в свете флуоресценции красителя Су3 ($\lambda_{\text{возб.}} = 535$ нм) (рис. 4б). Наличие флуоресцентных сигналов ячеек с маркерным зондом может служить свидетельством иммобилизации в ячейках биочипа соответствующих праймеров.

Для реализации твердофазной ПЦР необходимо, чтобы праймеры, иммобилизованные в ячейках биочипа, выдерживали температуры термоциклирования и не отщеплялись от носителя [8]. Отщепление олигонуклеотидов на биочипе в ячейках из щеточных полимеров контролировали по флуоресцентным сигналам иммобилизованного маркерного олигонуклеотида с флуоресцентной

меткой Су3 при дополнительном нагревании подложки в водном буферном растворе при 95°C и перемешивании на шейкере. Периодически подложку вынимали из раствора, ополаскивали водой, сушили обдувкой струей воздуха и измеряли флуоресцентные сигналы ячеек на канале Су3.

На рис. 5 представлен график зависимости среднего сигнала флуоресценции ячеек биочипа с иммобилизованным маркерным зондом с меткой Су3 в свете флуоресценции красителя Су3 от времени нагрева биочипа в ТЕ-буфере при 95°C. Учитывали среднее значение интенсивности сигнала в относительных единицах (отн. ед.) в ячейках биочипов. Большой разброс

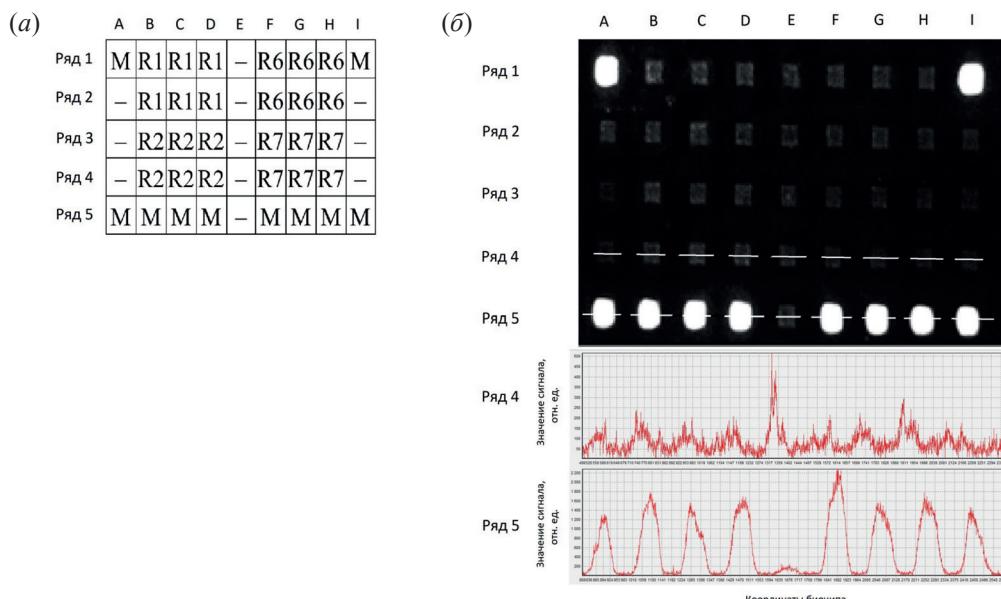


Рис. 4. (а) – Раскладка праймеров и маркерного зонда (М) по ячейкам биочипа. Прочерк – пустая ячейка; (б) – флуоресцентная картина ячеек биочипа после иммобилизации олигонуклеотидов в свете флуоресценции красителя Су3. Показаны графики значений относительных сигналов флуоресценции в относительных единицах (отн. ед.) вдоль линий, проведенных на флуоресцентном изображении для рядов 4 и 5.

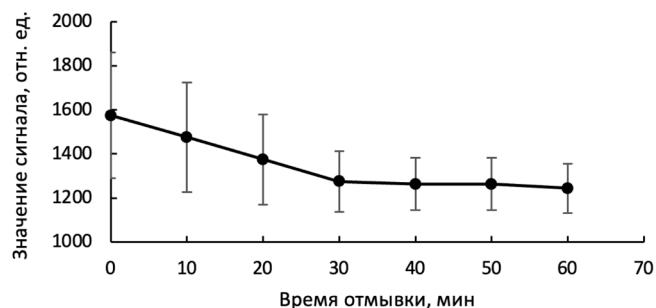


Рис. 5. График зависимости среднего сигнала флуоресценции в относительных единицах (отн. ед.) ячеек биочипа в свете флуоресценции красителя Су3 с иммобилизованным маркерным зондом с меткой Су3 от времени отмычки биочипа в ТЕ-буфере при 95°C.

значений интенсивности объясняется неравномерностью облучения ячеек при полимеризации. Представленные данные демонстрируют, что спустя 30 мин нагрева отщепление олигонуклеотидов от ячеек биочипа полностью прекращается. Для дальнейших экспериментов использовали ПЭТ-подложки с иммобилизованными в ячейках праймерами, предварительно отмытыми в ТЕ-буфере при 95°C в течение 40 мин.

При проведении твердофазной амплификации нуклеиновых кислот на наиболее популярных кремнийсодержащих подложках при термоциклировании отщепляется от носителя 20–40% иммобилизованных праймеров [8].

Твердофазная ПЦР на биочипах с ячейками из щеточных полимеров. Для реализации твердофазной ПЦР необходима термостойкость конструкции биочипа в условиях термоциклирования. ПЭТ в виде пленок идеально подходит в качестве конструкционного материала для отдельного изготовления компонентов биочипа и по-

следующей сборки путем склеивания. Из пленочного ПЭТ изготовили подложку с праймерами, иммобилизованными в матрице ячеек из щеточных полимеров, корпус с камерой и каналами для подачи и удаления растворов в камеру, крышку с отверстиями для подачи растворов в каналы корпуса биочипа. После склеивания компонентов получали прочный термостойкий пленочный биочип с высокой теплопроводностью и низкой теплоемкостью. Пленочный биочип позволяет проводить в ячейках из щеточных полимеров твердофазную ПЦР с иммобилизованными праймерами и регистрировать флуоресцентные сигналы ячеек на каналах Су3 и Су5 через крышку и слой промывной жидкости (рис. 6), “лабораторию на чипе”.

В камере биочипа одновременно происходит мультиплексная ПЦР в растворе и твердофазная ПЦР с праймерами, закрепленными в ячейках, в присутствии флуоресцентно-меченого трифосфата дезоксиуридина ImD-dU49 (рис. 7). Наличие прай-

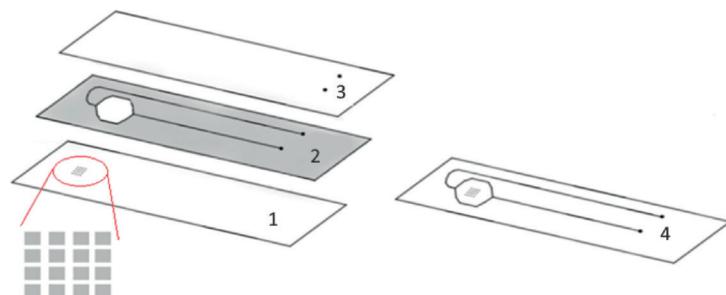


Рис. 6. Схема строения пленочного биочипа. 1 – подложка с ячейками, толщиной 125 мкм; 2 – корпус с прорезями под каналы и камеру, толщиной 200 мкм; 3 – крышка с отверстиями для подачи и удаления растворов в каналы, толщиной 125 мкм. Высота камеры 200 мкм, объем 25 мкл. Толщина биочипа – 450 мкм; 4 – биочип в сборе. Размер биочипа 25 × 75 мм.

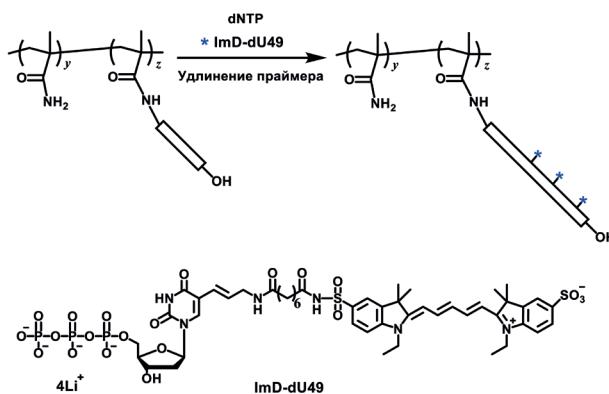


Рис. 7. Схема проведения твердофазной ПЦР с удлинением праймеров на биочипах с ячейками из щеточных полимеров с ковалентно иммобилизованными праймерами. dNTP – набор дезоксинуклеозидтрифосфатов (TCAG), ImD-dU49 – флуоресцентно-меченный модифицированный красителем Су5 дезоксиуридинтрифосфат.

меров в растворе ускоряет удлинение праймеров, иммобилизованных в ячейках биочипа. Последовательности праймеров представлены в табл. 1. При удлинении праймеров наряду с природными нуклеотидами в цепь встраиваются флуоресцентно-меченные нуклеотиды. После завершения процесса камеру чипа промывали без контакта с внешней средой. Продукты ПЦР в растворе удаляли. Продукты твердофазной ПЦР сохраняются в ячейках биочипа. Результаты анализировали флуориметрически. Возбуждение и регистрацию флуоресценции производили в ближнем инфракрасном диапазоне, в диапазоне флуоресценции красителя Су5. В этом диапазоне наблюдается минимальная собственная флуоресценция материалов биочипа и компонентов раствора. Анализируемые ДНК-мишени определяли по координатам ячеек биочипа с возросшей флуоресценцией, по конечной точке.

Праймеры, находящиеся в растворе, использовали в асимметричном соотношении, что повышает эффективность удлинения праймеров, иммобилизованных в ячейках биочипа. Праймеры ebpS-f1 и ebpS-r1 – фланкирующие для *S. aureus*, а праймеры sidA-f1 и sidA-r1 – фланкирующие для *L. pneumophila*. Ранее твердофазная ПЦР была реализована нами на биочипах с кросс-сшитыми полиакриламидными ячейками на стеклянной подложке с камерой Frame-Seal 25 мкл (Bio-Rad, США) [14].

Предварительная вакуумная дегазация ПЦР-смеси позволяет избежать образования пузырей в камере биочипа в процессе термоциклирования от выделения растворенного в воде воздуха. При вакуумной дегазации происходит частичное испарение воды. Для сохранения исходной концентрации ПЦР-компонентов перед дегазацией в смесь добавляли рассчитанное количество десионизированной воды. Процедура дегазации реакционной ПЦР-смеси при использовании Hot Start Taq ДНК-полимеразы не отражается на результатах при проведении ПЦР в пробирке (данные не приведены).

После проведения ПЦР камеру биочипа промывали, подавая и удаляя растворы через отверстия в крышке, не разбирая биочип. Флуоресцентные сигналы ячеек регистрировали через крышку и слой промывной жидкости.

На рис. 8 представлена флуоресцентная картина ячеек биочипа на канале Су5 при выдержке

5 с после проведения твердофазной ПЦР с матрицей *S. aureus* (а) и *L. pneumophila* (б). Показаны графики распределения сигналов вдоль линий, проведенных на флуоресцентном изображении для рядов 1–4. В ячейках биочипа наблюдаются сигналы, соответствующие раскладке последовательностей и специфичных праймеров к *S. aureus* и *L. pneumophila* (табл. 1, рис. 4а). Присутствует незначительная остаточная адсорбция меченых нуклеотидов и продуктов амплификации на внутренних поверхностях камеры биочипа.

На матрице *S. aureus* при выдержке 0.1 с отношение среднего сигнала ячеек к фону от целевых праймеров, специфичных к *S. aureus*, составляет 4 : 1, при выдержке 1 с – 8 : 1, а при выдержке 5 с – 25 : 1. Увеличение отношения сигнала к фону при увеличении выдержки регистрации объясняется низкой автофлуоресценцией подложки из ПЭТ.

На матрице *L. pneumophila* на выдержке 5 с отношение средних сигналов ячеек к сигналу фона составляет 6 : 1, что вполне достаточно для идентификации бактериальной ДНК в анализируемом образце.

Контроль продуктов ПЦР в реакционном растворе в камере биочипа. Эффективность твердофазной ПЦР может ограничиваться неспецифической адсорбцией компонентов ПЦР к поверхности подложки [8], что может приводить к наработке побочных продуктов в растворе над иммобилизованными праймерами и, в конечном итоге, может отразиться на скорости удлинения иммобилизованных праймеров.

Для блокирования неспецифической адсорбции на поверхности полимерных носителей широко используется предварительное блокирование поверхности раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) [25]. Проверили эффективность обработки поверхности камеры биочипа раствором БСА. Раствор БСА в концентрации 1 мг/мл в 0.01 М Трис-буфере (три(гидроксиметил)-аминометан) (рН 7.2) инкубировали в камере биочипа с праймерами, иммобилизованными в ячейках, при комнатной температуре в течение 12 ч. Камеры промывали 0.01 М Трис-буфере (рН 7.2), раствор удаляли продувкой камеры биочипа воздухом через отверстия в крышке. Затем в камеру подавали реакционную ПЦР-смесь с матрицей *S. aureus* и проводили термоциклизацию по заданной программе. Для

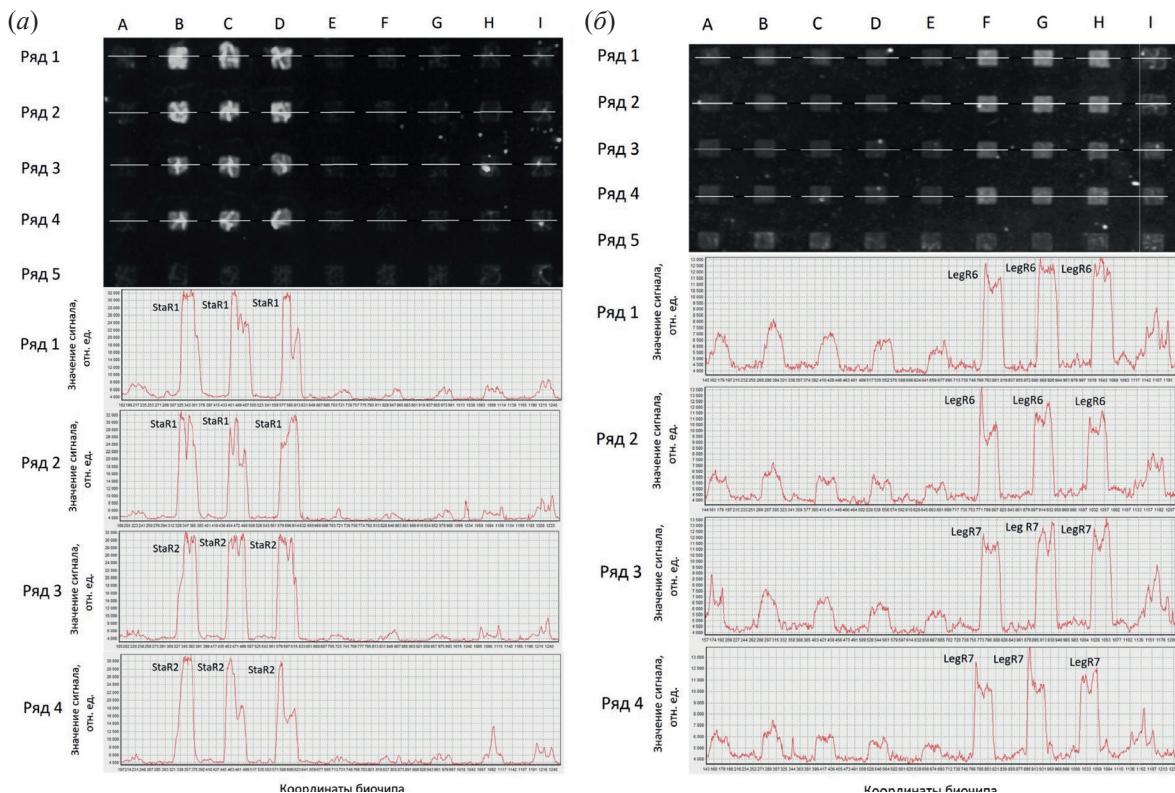


Рис. 8. Флуоресцентная картина ячеек биочипа на канале Су5 при выдержке 5 с после проведения твердофазной ПЦР с матрицей *Staphylococcus aureus* (а) и *Legionella pneumophila* (б). Показаны графики распределения сигналов в относительных единицах (отн. ед.) вдоль линий, проведенных на флуоресцентном изображении для рядов 1–4.

контроля использовали биочипы, камеры которых не обрабатывали раствором БСА. После окончания процесса термоциклирования растворы из камер биочипов отбирали через отверстия в крышке и анализировали методом электрофореза в 4%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

На рис. 9 представлена электрофореграмма растворов, отобранных из камер биочипов после проведения твердофазной ПЦР с праймерами, иммобилизованными в ячейках из щеточных полимеров, где оценивали продукты ПЦР из камеры биочипа с обработкой раствором БСА в концентрации 1 мг/мл и без обработки. В качестве отрицательного контроля выбраны продукты ПЦР в камере с блокированием раствором БСА без матрицы *S. aureus* и без блокирования.

Как следует из данных, представленных на рис. 9, в камере биочипа без обработки БСА присутствует только основной продукт длиной 300 п.н., в то время как в камере с предварительной обработкой БСА в продуктах наряду с основным продуктом дополнительно присутствуют



Рис. 9. Электрофореграмма растворов, отобранных из камер биочипов после проведения твердофазной ПЦР с праймерами, иммобилизованными в ячейках из щеточных полимеров: L – маркер длины фрагментов днДНК DNA Ladder 50 bp (жирным полосам маркера соответствуют длины 300 п.н. днДНК); 1 – продукты ПЦР из камеры биочипа без обработки раствором БСА; 2 – продукты ПЦР из камеры биочипа с обработкой раствором БСА; 3 и 4 – отрицательные контроли, продукты ПЦР в камере без блокирования поверхности БСА и с блокированием раствором БСА без матрицы *Staphylococcus aureus*.

высокомолекулярные продукты амплификации. При этом в ячейках обоих типов биочипов после промывки и заполнения камер промывной жидкостью при регистрации флуоресцентных сигналов в свете флуоресценции красителя Су5 наблюдается соизмеримое отношение сигнала к фону (данные не приведены).

Таким образом, неразборный пленочный биочип с внутренней камерой пригоден для проведения ПЦР, а материалы, используемые при его изготовлении, не ингибируют ПЦР и не требуют дополнительного блокирования от неспецифической адсорбции ПЦР-компонентов с помощью БСА. В данной работе исследовано влияние БСА в концентрации 1 мг/мл.

Для эффективного проведения ПЦР в режиме непрерывного термоциклизирования необходимо добиться прочного связывания подложки биочипа с фотоактивным полимером. Обработка поверхности полимеров коронным разрядом позволяет изменить поверхностную энергию полимеров, увеличить энергию связей полимеров с покрытиями, увеличить адгезию покрытий на поверхности полимеров [26, 27]. Обработка поверхности ПЭТ коронным разрядом позволила получить покрытие из поливинилацетата, которое не отслаивается в условиях ПЦР при многократном изменении температуры реакционной ПЦР-смеси. Ячейки биочипов, получаемые на подложках, обработанных коронным разрядом, имеют большую емкость по связыванию с аминосодержащим индодикарбоцианиновым красителем (рис. 3). Праймеры, иммобилизованные в ячейках, получаемых на подложках, обработанных коронным разрядом, после тщательной отмычки полностью перестают отщепляться от ячеек биочипа (рис. 5), что чрезвычайно важно для дальнейшего развития и практического применения предлагаемого метода твердофазной ПЦР на биочипе.

В методах твердофазной ПЦР с удлинением иммобилизованных праймеров ключевая задача – регистрация результатов удлинения праймеров. В данной работе использовалось ранее разработанное нами производное дезоксиуридитрифосфата ImD-dU49, маркированное Су5-флуоресцентным красителем, которое эффективно встраивается в синтезируемую в ходе ПЦР цепь ДНК доступной Taq ДНК-полимеразой [14].

Разработана конструкция биочипа, который изготавливается склеиванием трех пленочных

компонентов в обычных условиях. Перед склейкой компонентов на подложке в “мягких условиях” в ячейках иммобилизовали праймеры сайт-специфически за 5'-конец. Такой способ иммобилизации обеспечивает сохранение специфических свойств праймеров к взаимодействию с комплементарными ДНК-мишениями и доступность 3'-конца праймеров для элонгации в соответствии с последовательностью ДНК-мишени. Ячейки из гидрофильных щеточных полимеров, закрепленные на подложке только одним концом и не связанные между собой, динамически подвижны, что уменьшает кинетические препятствия для взаимодействия иммобилизованных праймеров с ДНК-мишенью и ДНК-полимеразой. При этом многочисленные реактивные карбоксильные группы на полимерных цепях обеспечивают высокую концентрацию праймеров, приходящуюся на единицу площади, занимаемой ячейкой биочипа. Эти два обстоятельства чрезвычайно важны для разработки многофакторных высокочувствительных методов экспресс-анализа нуклеиновых кислот на биочипах.

Разработанная конструкция пленочного биочипа в формате “лаборатория на чипе” характеризуется термостойкостью в условиях ПЦР, позволяет проводить анализ без переноса биоматериала из одной емкости в другую, регистрировать результаты анализа через крышку и слой жидкости, не разбирая биочип, что резко уменьшает риск контаминации и позволяет автоматизировать процесс анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использовали следующие реагенты: пленочный полиэтилентерефталат (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа), лист пленки нарезали на части размером 25 × 75 мм и использовали поштучно; поливинилацетат (марка М = 100, ТУ 2215-001-98514529-2007); моющее средство Ultrasonol, 7-Neutral (Art. No 5356.1, Carl Roth, Германия); N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид гидрохлорид (EDC) (Art. No 22981, Acros, Бельгия); N-гидроксисукцинимид (HOsu) (Art. No AAA1031214, Alfa Aesar, Германия); дезоксиаденозинтрифосфат 100 мМ (Art. No R0141), дезоксицитидинтрифосфат 100 мМ (Art. No R0151),

дезоксигуанозинтрифосфат 100 мМ (Art. No R0161), дезокситимидинтрифосфат 100 мМ (Art. No R0171) (Thermo Scientific, США); триэтиламмоний гидрокарбонат (Art. No 90360, Aldrich, США); бензофенон (Art. No AC219680500); Tween 20 (Art. No 233360050, Acros, Бельгия); акриловую кислоту (Art. No A0141500G, Alfa Aesar, Германия); акриламид (Art. No A1090.0500, Panreac, Испания); MES (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота) (Art. No M8250, Sigma, США); 1× TE-буфер (рН 8.0) (Art. PB026S, Евроген, Россия); L-лизин моногидрохлорид (Art. No 1.05700, Aldrich, США); фосфатный буфер солевой (Art. No P5493, Sigma, США); компоненты 0.01 М Трис-буфера (рН 7.2): тризма гидрохлорид (Art. No 93363), тризма основный (Art. No T1503) (Sigma, США); карбонат-бикарбонатный буфер (рН 10.0) (Art. No SO10101000, Scharlab, Испания); Hot Start Taq ДНК-полимераза 1000 ед. (5 ед./мкл) (Арт. E352, Сибэнзим, Россия); буфер 10× для Hot Start Taq ДНК-полимеразы (Арт. B309, Сибэнзим, Россия); бычий сывороточный альбумин 20 мг/мл (Art. No B14, Thermo Scientific, США); магния хлорид 25 мМ (Арт. B307, Сибэнзим, Россия); олигонуклеотидные зонды и праймеры (ИМБ, Россия); агарозу LE (Арт. B-5000-0,1, Helicon, Россия); 10× TBE-буфер (Арт. PB031, Helicon, Россия); бромид этидия (Арт. EtBr-10, Биолабмикс, Россия). Использовали деконтаминированные полногеномные ДНК штаммов бактерий из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 и *Legionella pneumophila* ATCC 33152 [13]; краситель Cy5-NH₂ (1-этил-3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-оксо-тридекан-13-ил)индодикарбоцианин) (ИМБ РАН, Россия); флуоресцентно-меченный нуклеотид ImD-dU49 (литиевая соль 5-{14-[1,1'-диэтил-3,3,3',3'-триметил-5'-сульфоиндодикарбоцианин-5-ил]-14-сульфо-4,13-диаза-5,12-диоксо-тетрадец-1-ен-1-ил}-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат) (ИМБ РАН, Россия); маркеры длин ДНК, 50 bp DNA Ladder (Art. No SM0371, Thermo Scientific, США); ацетон, метилэтилкетон, фосфора пятиокись, ацетонитрил (Химмед, Россия). Все растворители и исходные реагенты аналитического качества были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Оборудование. В работе использовали фотомаску на кварцевом стекле размером 25 × 75 мм

толщиной 1 мм со светонепроницаемым хромовым покрытием с прозрачными квадратными окнами размером 200 × 200 мкм с шагом 600 мкм в рабочих зонах фотомаски; ультразвуковую баню S30 (Elmasonic, Германия); мини-центрифугу FV-2400 (Biosan, Латвия); УФ-осветитель ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой ДРК-120 (Россия); шейкер с нагревом Heating thermoshaker MHR 13 (Hettich, Германия); спектрофотометр DU 730 (Beckman Coulter Spectrophotometer, США); устройство для электрофизической обработки поверхности пленок коронным разрядом КР-1 300 (КОРОНАТОР, Россия); робот-манипулятор QArray (Genetix, Великобритания); двухканальный портативный анализатор флуоресцентного изображения, канал флуоресценции красителя Cy5 с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 690 ± 40 нм (Semrock, США), канал флуоресценции красителя Cy3 с лазерным возбуждением при 535 нм, запирающим фильтром 580 ± 27 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой (ИМБ РАН, Россия), флуоресцентные изображения биочипов анализировали с помощью программы ImaGeWare v. 3.50 (ИМБ РАН, Россия); термоциклиры GeneExplorer GE-48DG и GE-4I (Bioer, Китай); ДНК-синтезатор ABI 394 DNA/RNA (Applied Biosystems, США); установку для горизонтального электрофореза (Bio-Rad, США); спектрофотометр NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия); гель-документирующую систему ChemiScope 6200 Touch (Clin Science Instruments, Китай); вакуумный концентратор CentriVap DNA Concentrator (Labconco, США).

Подготовка поверхности подложек из ПЭТ.

Для удаления возможных загрязнений с поверхности подложки последовательно промывали 2%-ным раствором моющего средства в деионизированной воде (в ультразвуковой бане в течение 10 мин), струей деионизированной воды (в течение 1 мин) и ацетоном (в ультразвуковой бане в течение 10 мин). Подготовленные подложки сушили при комнатной температуре в течение 30 мин на открытом воздухе и хранили в эксиаторе до использования.

Обработка поверхности коронным разрядом.

Подложки из ПЭТ обрабатывали коронным разрядом в течение 15 с при максимальной мощности разряда коронатора КР-1300.

Полимерное покрытие поверхности подложек.

На подложки после обработки коронным

разрядом наносили раствор 2% ПВАц и 0.5% БФ в метилэтилкетоне при вращении 2000 об/мин в течение 2 мин, сушили на открытом воздухе в течение 30 мин.

Получение ячеек из щеточных полимеров.

Ячейки получали, как описано в работе [19], с небольшими изменениями. Для этого на подложку с покрытием поливинилацетатом с бензофеноном со спайсерной рамкой толщиной 10 мкм наносили раствор 0.15 М акриловую кислоту и 0.75 М акриламид в деионизированной воде, закрывали фотомаской, облучали УФ-осветителем в течение 7 мин. Расстояние от осветителя до фотомаски составляло 5 см. Подложки кратковременно промывали погружением в деионизированную воду, ацетон при комнатной температуре. Промывали в деионизированной воде при 95°C в течение 3 ч при перемешивании на термостате. Сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре и хранили в закрытой коробке при 5°C до использования. Схема получения ячеек представлена на рис. 1.

Активация ячеек биочипа. Ячейки с карбоксильными группами активировали получением *N*-гидроксисукцинимидных эфиров, как описано в работе [20], с небольшими изменениями. Подложки обрабатывали раствором 0.2 М EDC, 0.1 М HOSu в 0.1 М MES-буфере (pH 5.0) при комнатной температуре в течение 5 ч (рис. 2). Подложки промывали MES-буфером, затем фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) (pH 7.2), содержащим 1% Tween 20, в течение 10 мин при перемешивании на шейкере (200 об/мин) при комнатной температуре. Подложки сушили обдувкой струей воздуха и хранили в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ при 5°C до использования.

Флуоресцентное маркирование ячеек биочипа. Подложки ПЭТ с покрытием ПВАц с БФ с ячейками из акриловой кислоты и акриламида, активированными *N*-гидроксисукцинимидом (HOSu) с EDC, обрабатывали 25 мкл раствора 1 мМ красителя Cy5-NH₂ в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 10.0). Строение красителя Cy5-NH₂ представлено на рис. 2. После инкубации при комнатной температуре в течение 3 ч подложки промывали 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мМ триэтиламмонийгидрокарбонате (TEAHC) (pH 8.5) в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 300 об/мин, деионизированной водой. Сушили обдувкой струей воз-

духа при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при комнатной температуре до использования.

Иммобилизация праймеров в ячейках биочипа.

Праймеры иммобилизовали в ячейках биочипа по методу, описанному в работе [20], с изменениями. Последовательности праймеров подобраны нами ранее и представлены в табл. 1. Данные праймеры продемонстрировали ранее высокую специфичность в мультиплексном анализе на гелевых биочипах и использовались в данной работе [14]. Растворы праймеров R1, R2, R6 и R7, а также маркерный зонд (M) с C6-аминомодификатором на 5'-конце с концентрацией 1 нмоль/мкл в 0.1 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 10.0), содержащем 10% формамида и 12.5% глицерина, капельно наносили роботом-манипулятором в ячейки с активированными карбоксильными группами по заданной раскладке чипа (рис. 4a). Подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 12 ч при 4°C и дополнительно 4 ч при 25°C. Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1 : 1. После завершения инкубации подложки ополаскивали струей деионизированной воды, отмывали в 50%-ном ацетонитриле, содержащем 0.05 М триэтиламмонийгидрокарбоната, в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 300 об/мин. Затем подложки выдерживали в 1%-ном растворе лизина в 0.01 М Трис-буфере (pH 7.2) в течение 20 мин при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп, промывали 0.01 М Трис-буфером (pH 7.2) при комнатной температуре. Проводили дополнительную отмывку в ТЕ-буфере при 95°C в течение 40 мин, промывали деионизированной водой, сушили обдувкой струей воздуха при 25°C. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Контроль иммобилизации праймеров осуществляли по флуоресцентно-меченому красителю Cy3 маркерному зонду (M) с регистрацией на двухканальном портативном анализаторе флуоресцентного изображения разработки ИМБ РАН (Россия) на канале флуоресценции красителя Cy3.

Изготовление биочипа с камерой для ПЦР.

Разработали неразборный пленочный биочип с внутренней камерой для ПЦР. Биочип склеивали из трех пленок размером 25 × 75 мм, центральной

пленки толщиной 200 мкм с камерой и каналами для внесения и удаления растворов в камеру, подложки с ячейками и крышки, изготовленных из пленочного ПЭТ, каждая толщиной 125 мкм. Общая толщина чипа 0.45 мм. Объем камеры 25 мкл. ПЭТ не флуоресцирует и прозрачен в оптическом диапазоне флуоресценции красителей Су3 и Су5 (рис. 7).

Твердофазная ПЦР на биочипах с ячейками из щеточных полимеров. Для проведения твердофазной ПЦР на чипе использовали смесь следующего состава (50 мкл): 10× ПЦР-буфер Tag 5 мкл, 2 мМ MgCl₂, dNTP в концентрации 200 мКМ каждый. Фланкирующие прямой и обратный праймер брали в асимметричном соотношении (5 : 1) – прямой фланкирующий праймер (0.15 пмоль/мкл), специфичный к *S. aureus*, и прямой фланкирующий праймер (0.15 пмоль/мкл), специфичный к *L. pneumophila*, обратные фланкирующие праймеры добавляли в концентрации 0.03 пмоль/мкл каждого, Hot Start Taq ДНК-полимераза 5 ед., 8 мКМ ImD-dU49. В качестве матрицы добавляли геномную ДНК 10⁴ Matrix *S. aureus* или 10⁴ Matrix *L. pneumophila* в объеме 1 мкл в деионизированной воде. ПЦР-смесь дегазировали на вакуумном концентраторе при 30°C с предварительным добавлением рассчитанного количества деионизированной воды, чтобы к концу процесса дегазации сохранялись первоначальный объем смеси и концентрации реагентов. Смесь объемом 25 мкл вносили в камеру пленочного биочипа и герметизировали. Реакции проводили на ДНК-амплификаторе BIOER GeneExplorer Thermal Cycler GE-4I в следующих условиях: 95°C – 5 мин (начальная денатурация); 36 циклов: 95°C – 20 с, 64°C – 30 с, 72°C – 30 с; завершающая инкубация 72°C – 3 мин. После проведения ПЦР проводили “жесткую” отмытку 1%-ным водным раствором Tween 20 в течение 2 мин при 95–100°C. Пленочный биочип промывали, не разбирая, прокачивали промывную жидкость через отверстия в крышке со скоростью 1 мл/мин.

Регистрация удлинения иммобилизованных праймеров. Контроль удлинения иммобилизованных в ячейках биочипа праймеров осуществляли по встраиванию флуоресцентно-меченых нуклеотидов в достраиваемую часть ДНК непосредственно в ходе ПЦР. Флуоресцентные сигналы регистрировали на двухканальном

портативном анализаторе флуоресцентного изображения разработки ИМБ РАН (Россия) на канале флуоресценции красителя Су5. Сигналы ячеек регистрировали в камере, заполненной жидкостью, через крышку и слой жидкости.

Контроль продуктов ПЦР в реакционном растворе в камере биочипа. После завершения процесса термоциклирования раствор из камеры биочипа отбирали и проводили разделение горизонтальным электрофорезом в 4%-ном агарозном геле в течение 40 мин при 10 В/см. Окрашивание проводили бромистым этидием. Для визуализации продуктов использовали гель-документирующую систему ChemiScope 6200 Touch в диапазоне УФ-света.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод анализа нуклеиновых кислот твердофазной ПЦР с удлинением иммобилизованных праймеров в закрытом “пленочном” биочипе при термоциклировании с контролем по встраиванию Су5-флуоресцентно-меченых нуклеотидов методом цифровой флуоресцентной микроскопии по конечной точке.

Разработан термостойкий в условиях ПЦР “пленочный” биочип, изготовленный из полиэтилен-терефталата (ПЭТ), с внутренней камерой, с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованными праймерами, с каналами для подачи и удаления растворов в камеру биочипа, с низкой теплоемкостью и высокой теплопроводностью тонких пленочных компонентов биочипа, с термоциклированием, с регистрацией результатов методом цифровой флуоресцентной микроскопии через крышку и слой промывной жидкости, не разбирая биочип, в изолированной от внешней среды системе, “лаборатория на чипе”. Формат “лаборатория на чипе” позволяет проводить анализ без переноса биоматериала, что исключает риск контаминации и предоставляет возможность автоматизации процесса.

Работоспособность метода и функциональная пригодность пленочного биочипа продемонстрированы при анализе образцов, содержащих ДНК патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Legionella pneumophila*.

“Пленочные” биочипы из доступного пленочного ПЭТ с ячейками из щеточных полимеров представляются перспективными для дальней-

шего совершенствования и использования метода твердофазной ПЦР в мультиплексном анализе нуклеиновых кислот для развития технологий генетического микроанализа в формате “лаборатория на чипе” и применения в клинических лабораториях для экспресс-диагностики.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00287).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ЧАВ, ШИЮ; экспериментальные работы – ШИЮ, СКА, ШГФ, КВЕ, ШВЕ, ССА, ВВА; написание статьи – ШИЮ, ЧАВ; анализ данных – ШИЮ, ЛСА, ЧАВ; администрирование проекта – МРА, ЗОА.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jiang K.R., Huang J.L., Chen C.C., Su H.G., Wu J.C.* // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2011. V. 42. P. 5–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.04.012>
2. *Yeh C.H., Chang Y.H., Lin H.P., Chang T.C., Lin Y.C.* // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. V. 161. P. 1168–1175.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.10.016>
3. *Bourque S.N., Valero J.R., Mercier J., Lavoie M.C., Levesque R.C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 523–527.
<https://doi.org/10.1128/aem.59.2.523-527.1993>
4. *Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D.* // *Biotechniques*. 2000. V. 29. P. 844–857.
<https://doi.org/10.2144/00294rr01>
5. *Tillib S.V., Strizhkov B.N., Mirzabekov A.D.* // *Anal. Biochem.* 2001. V. 292. P. 155–160.
<https://doi.org/10.1006/abio.2001.5082>
6. *Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirovskii M., Perelman M., Chernoussova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A.* // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. P. 2531–2540.
<https://doi.org/10.1128/jcm.39.7.2531-2540.2001>
7. *Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M.* // *Biotechniques*. 2008. V. 44. P. 241–248.
<https://doi.org/10.2144/000112628>
8. *Damin F., Galbiati S., Ferrari M., Chiari M.* // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 78. P. 367–373.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.091>
9. *Pirrung M.C., Worden J.C., Labriola J.P., Montague-Smith M.P.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 11. P. 2437–2440.
[https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00465-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00465-6)
10. *Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod J., Mayer P., Kawashima E.* // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. e87.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.20.e87>
11. *Cheng L., Sun B., Sun Y., Xiao P., Ge Q., Zheng Y., Ke X., Zhou Y., Zhang M., Chen P., Lu Z.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2010. V. 10. P. 479–486.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2010.1727>
12. *Kranaster R., Ketzer P., Marx A.* // *Chembiochem*. 2008. V. 9. P. 694–697.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200700609>
13. *Shapero M.H., Leuther K.K., Nguyen A., Scott M., Jones K.W.* // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 1926–1934.
<https://doi.org/10.1101/gr.205001>
14. *Lapa S.A., Miftakhov R.A., Klochikhina E.S., Ammur Yu.I., Blagodatskikh S.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Mol. Biol.* 2021. V. 55. P. 828–838.
<https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>
15. *Zhu C., Cui J., Hu A., Yang K., Zhao J., Liu Y., Deng G., Zhu L.* // *Chin. J. Anal. Chem.* 2019. V. 47. P. 1751–1758.
[https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61199-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61199-0)
16. *van Pelt-Verkuil E., Van Belkum A., Hays J.P.* // *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science & Business Media, 2008.
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-6241-4>
17. *Aparna G.M., Tetala K.K.* // *Biomolecules*. 2023. V. 13. P. 602.
<https://doi.org/10.3390/biom13040602>

18. *Brittain W.J., Brandsetter T., Prucker O., Rühe J.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. P. 39397–39409.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
19. *Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Y., Vasiliskov V.A., Lapa S.A., Levashova A.I., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2023. V. 49. P. 1143–1150.
<https://doi.org/10.1134/S1068162023050217>
20. *Shishkin I.Yu., Shtylev G.F., Barsky V.E., Lapa S.A., Zasedateleva O.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Vasiliskov V.A., Polyakov S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // Mol. Biol. 2024. V. 58. P. 534–546.
<https://doi.org/10.1134/S002689332470016X>
21. *Hsu Y.M., Chang C.C.* // Optik. 2015. V. 126. P. 2600–2605.
<https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.06.029>
22. *Hung T.Q., Chin W.H., Sun Y., Wolff A., Bang D.D.* // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 90. P. 217–223.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.028>
23. *Sengupta J.* // Green Anal. Chem. 2024. V. 10. P. 100119.
<https://doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100119>
24. *Ren K., Zhou J., Wu H.* // Accounts Chem. Res. 2013. V. 46. P. 2396–2406.
<https://doi.org/10.1021/ar300314s>
25. *Jeyachandran Y.L., Mielczarski J.A., Mielczarski E., Rai B.* // J. Colloid Interface Sci. 2010. V. 341. P. 136–142.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.007>
26. *Louzi V.C., Campos J.S.* // Surfaces Interfaces. 2019. V. 14. P. 98–107.
<https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.12.005>
27. *Owens D.K.* // J. Appl. Polym. Sci. 1975. V. 19. P. 3315–3326.
<https://doi.org/10.1002/app.1975.070191216>

Solid-Phase PCR on Film Biochips with Brush Polymer Cells, “Lab-on-a-Chip”

**I. Yu. Shishkin*, K. A. Sennikov*, G. F. Shtylev*, R. A. Miftakhov*, O. A. Zasedateleva*,
V. E. Kuznetsova*, V. E. Shershov*, S. A. Surzhikov*, V. A. Vasiliskov*,
S. A. Lapa*, and A. V. Chudinov*, #**

#Phone: + 7 (499) 135-98-00; e-mail: chudhome@rambler.ru; chud@eimb.ru

** Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32/1, Moscow, 119991 Russia*

Multifactorial, highly sensitive nucleic acid analysis on biological microarrays in an environmentally sealed system, without transferring biological material from one vessel to another and without adding additional components during the assay, in order to reduce the possibility of contamination during the assay and to enable automation of the process. Polyethylene terephthalate film substrates used for biochip fabrication were treated by corona discharge; a thin layer of photoactive polyvinyl acetate was obtained on the surface by rotation; a matrix of cells made of brush polymers was obtained by photoinitiated radical polymerisation of monomers ‘from the surface’ photolithographically, under UV irradiation through a photomask on the surface. Reactive carboxyl groups on polymer chains were activated and primers with C6-amino modification at the 5'-end were immobilised in biochip cells. Substrates with primers immobilised in cells were used for biochip fabrication. PCR with extension of immobilised primers with Cy5-fluorescence-labelled nucleotides was performed in biochip cells. A method of nucleic acid analysis by solid-phase PCR with immobilised primers extension (primer extension) in a closed film biochip during thermocycling, with control of Cy5-fluorescence-labelled nucleotide incorporation by digital fluorescence microscopy, by endpoint, was developed. A “film biochip”, made of film polyethylene terephthalate, with an internal chamber, with brush polymer cells with immobilised primers, with channels for supply and removal of solutions into the biochip chamber, has been developed, with low heat capacity and high thermal conductivity of thin film components of the biochip, with thermocycling, with registration of results by digital fluorescence microscopy through the lid and the layer of washing liquid without disassembling the biochip, in a system isolated from the environment, “laboratory on a chip”. The performance of the method and functional suitability of the “film biochip” was demonstrated by analysing samples containing DNA from pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Legionella pneumophila*. “Film biochip” made of affordable film polyethylene terephthalate with cells made of brush polymers appear promising for further improvement and use of solid-phase PCR in multiplex analysis of nucleic acids for the development of “lab-on-a-chip” microanalysis technologies and application in clinical laboratories.

Keywords: *biochips, solid-phase PCR, brush polymers, oligonucleotide immobilisation*