



УДК 577.2:547.75

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ИММОБИЛИЗАЦИЮ БИОМОЛЕКУЛ В ЯЧЕЙКАХ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2025 г. Г. Ф. Штылев*,[#], И. Ю. Шишкин*, Р. А. Мифтахов*, С. А. Поляков*,
В. Е. Шершов*, В. Е. Кузнецова*, С. А. Суржиков*, В. И. Бутвиловская*,
В. Е. Барский*, В. А. Василисков*, О. А. Заседателева*, А. В. Чудинов*

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Россия, 11999 Москва, ул. Вавилова, 32/1

Поступила в редакцию 17.12.2024 г.

После доработки 27.12.2024 г.

Принята к публикации 28.12.2024 г.

Биочипы с белковыми и олигонуклеотидными зондами используются для анализа образцов белков и нуклеиновых кислот. Ключевые задачи технологии – подбор материалов для подложек и функционализация поверхности. В данной работе проводили модификацию подложек из полибутилентерефталата, покрывая их фотоактивными полимерами: поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилтен-2-норборненом), ацетилцеллюлозой, поливинилацетатом и поливинилбутиралем. Покрывают наносилированием методом центрифугирования и высушивали. Исследовали влияние покрытия на характеристики биочипов. Методом фотоинициируемой радикальной полимеризации получали матрицу гидрофильных ячеек из щеточных полимеров с эпоксидными группами для иммобилизации ДНК-зондов и иммуноглобулинов человека. Функциональность зондов исследовали гибридным анализом и реакцией со специфичными антителами. Оценивали эффективность связывания зондов с молекулярными мишенями на биочипах с различными покрытиями. Ячейки на подложках с покрытиями поливинилбутиралем и поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилтен-2-норборненом) продемонстрировали лучшую эффективность связывания и слабую адсорбцию мишеней, обеспечивая высокую контрастность флуоресцентного изображения после связывания зондов. Биочипы на таких подложках перспективны для технологии микроанализа “лаборатория на чипе”.

Ключевые слова: полимерные поверхности, биочипы, щеточные полимеры, иммобилизация олигонуклеотидных зондов, иммобилизация белков, гибридный анализ, флуоресцентный иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0132342325030062, **EDN:** KQDHOH

ВВЕДЕНИЕ

Технология биочипов продолжает активно развиваться, предлагая новые возможности для диагностики, научных исследований и персонализированной медицины. Концепция анализа на биологических микрочипах основана на механизме молекулярного распознавания анализируемых молекул молекулярными зондами, нанесенными

на чип. Это распознавание может происходить путем взаимодействия антител с антигенами [1] или гибридизации комплементарных цепей ДНК [2]. Параллельный анализ множества биомолекул, маленькие объемы образца, высокая точность и специфичность анализа представляют огромное преимущество, что делает эту технологию востребованной в медицинской практике и научных исследованиях.

Сокращения: АЦ – ацетилцеллюлоза; ГМА – глицидилметакрилат; ГЭМА – гидроксиэтилметакрилат; ДМАПС – [2-(метакрилоилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил)аммоний гидрохлорид; ПБТ – полибутилентерефталат; ПВАц – поливинилацетат; ПВБ – поливинилбутираль; ЦОС – циклоолефиновый сополимер; Human-IgG – иммуноглобулины человека класса G; goat anti-human IgG – козы античеловека против иммуноглобулинов человека класса G.

[#] Автор для связи: (эл. почта: gosha100799@mail.ru).

Несмотря на значительные достижения в развитии технологии биочипов, существует ряд проблем, которые по сей день остаются актуальными. Одни из главных – повышение чувствительности анализа и оптимизация процесса иммобилизации зондов. В погоне за решением этих проблем создается множество способов, позволяющих кардинально менять свойства поверхности, добившись при этом более высоких показателей чувствительности и равномерности иммобилизации зондов.

Группа Матео [3] представила носитель с функциональными эпоксидными группами, предназначенными для ковалентной иммобилизации белков. Процесс иммобилизации включает сначала физическую адсорбцию белков на поверхности носителя, а затем их ковалентную иммобилизацию между нуклеофильными группами белка и эпоксидными группами поверхности. Такой механизм значительно улучшает реакционную способность эпоксидных групп и обеспечивает прочность образуемых связей. Благодаря такой модификации возможна иммобилизация белков в условиях низкой ионной силы.

Очень часто в качестве материала для иммобилизации биомолекул используется поверхность золота. Иммобилизация на таких подложках может происходить как путем физической адсорбции [4], так и ковалентно, через самособирающиеся монослои с функциональными активными группами [5]. Однако обнаружено, что золото обладает эффектом тушения флуоресценции [6], что затрудняет его применение в качестве подложки для анализа с помощью метода флуоресценции.

Для иммобилизации молекулярных зондов могут использоваться полисахариды, такие как хитозан [7], целлюлоза [8], декстран [9], агароза [10]. Биосовместимость, низкая токсичность и низкая неспецифическая адсорбция белков делают эти материалы перспективными в разработке систем диагностики.

В работе [11] использовали гидрогель на основе поливинилового спирта. Белки ковалентно иммобилизовали в геле путем модификации гидроксильных групп поливинилового спирта гексаметилендиизоцианатом и бромангидридом цианистой кислоты. Оба способа модификации геля показали высокую эффективность в иммобилизации белковых молекул без изменения свойств подложки.

В работе Исобе используется пористый гель на основе целлюлозы, который наносят на поверхность стекла [12]. Гидроксильные группы целлюлозы окисляли периодатом натрия. Иммобилизация белков проходила через образование основания Шиффа между альдегидной группой целлюлозы и аминок группой белка. Образовавшуюся в результате реакции иминосвязь восстанавливали цианоборогидридом натрия. Иммобилизованные белки в ходе такого связывания сохраняли свою активность.

Еще один пример трехмерной структуры – полимерные щетки, состоящие из длинных полимерных цепей с функциональными группами. Один конец цепи прикреплен к подложке, второй конец цепи, в отличие от кросс-сшитых гелевых структур, не закреплен [13, 14]. В контексте диагностики полимерные щетки представляют собой перспективный материал, обладающий рядом преимуществ, таких как повышенная чувствительность, за счет большей емкости иммобилизованных молекул в трехмерной структуре, меньшего времени анализа вследствие лучшей пространственной доступности молекулярных зондов. Метод радикальной полимеризации “от поверхности”, перспективный способ получения полимерных щеток, заключается в возбуждении фотоинициатора УФ-светом и переходе его в активное состояние, при котором он отрывает от поверхности протон, образуя свободный радикал, от которого начинается рост полимерных щеток. Свойства поверхности оказывают существенное влияние на морфологию, структуру и характеристики полученных полимерных цепей.

Цель данной работы – исследовать влияние фотоактивных свойств полимерных поверхностей на процесс полимеризации полимерных щеток путем оценки емкости и контрастности ячеек, сформированных из полимерных щеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе рассматривается влияние полимерного покрытия на процесс роста полимерных щеток методом фотоиндуцируемой радикальной полимеризации от поверхности и последующей иммобилизации в ячейках из щеточных полимеров различных биомолекул. Схема получения ячеек из щеточных полимеров приведена на рис. 1.

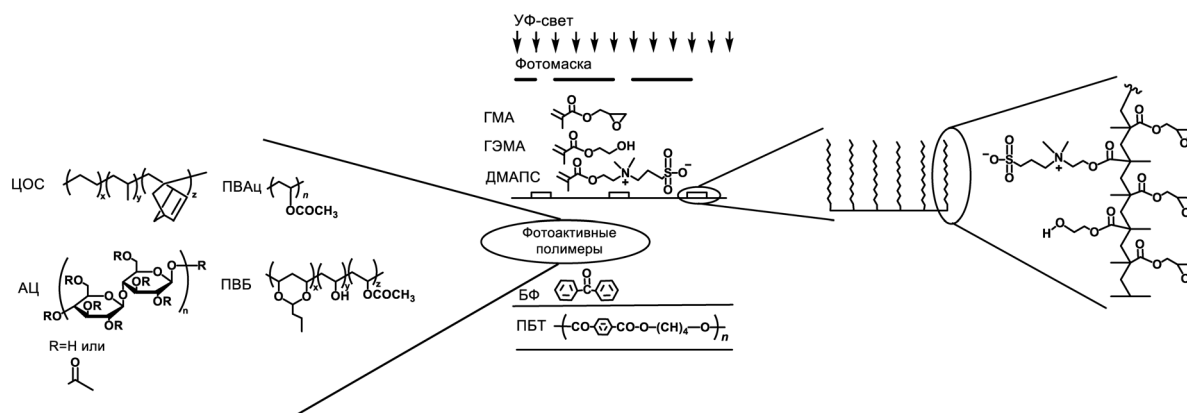


Рис. 1. Схема химической модификации полибутилентерефталата.

В качестве покрытия для придания фотоактивных свойств полибутилентерефталату использовали четыре полимера: поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилден-2-норборнен) (ЦОС), ацетилцеллюлозу (АЦ), поливинилацетат (ПВАц) и поливинилбутираль (ПВБ). Перечисленные полимеры в сочетании с фотоинициатором бензофеноном проявляют высокую эффективность в иницировании процесса полимеризации благодаря наличию третичных атомов углерода. Под воздействием УФ-излучения бензофенон переходит в триплетное состояние, при котором он легко отрывает третичные атомы от полимерной поверхности. Образующийся радикал служит точкой роста для новых синтезируемых полимерных цепей. Наличие фотоинициатора в полимерном покрытии минимизирует полимеризацию акрилатных мономеров в растворе, исключая образование полимеров, не связанных с подложкой. Процесс полимеризации происходит исключительно под воздействием УФ-излучения в соответствии с предварительно заданным шаблоном, определяемым фотомаской.

Для получения фотоактивного покрытия полимеры растворяли в соответствующих растворителях и добавляли инициатор полимеризации. ЦОС растворяли в *para*-ксилоне, ПВБ – в циклопентаноне, ПВАц и АЦ – в метилэтилкетоне. Подбор растворителей и концентрации полимеров осуществляли экспериментально, чтобы обеспечить равномерное распределение полимера в растворе и последующее равномерное распределение щеточных полимеров по площади ячейки биочипа в процессе полимеризации мономеров (данные не приведены). Нанесение

полимеров на подложку происходило посредством центрифугирования, что позволило создать тонкий равномерный слой, который не растворяется и не отслаивается в воде. Для формирования полимерных щеток использовали водно-метанольную смесь, в состав которой входили акрилатные мономеры: глицидилметакрилат, гидроксиэтилметакрилат и [2-(метакрилоилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил)аммоний гидрохлорид. Полимерные щетки, полученные фотоиндуцированной полимеризацией мономеров, демонстрируют исключительно прочное связывание с подложкой как в водных растворах, так и в органических растворителях. Эпоксидные группы, присутствующие в полимерных цепях, не требуют предварительной активации и могут быть непосредственно использованы для иммобилизации различных биомолекул, содержащих свободные аминокислотные группы.

Полимеризация, несмотря на то что ее механизм одинаков, приводит к различным результатам на разных полимерных покрытиях. Это обусловлено различной способностью атомов водорода в полимерах отрываться от поверхности под воздействием бензофенона в возбужденном триплетном состоянии и УФ-излучения. Помимо этого, полимерные покрытия характеризуются различной способностью к адсорбции биополимеров, белков и нуклеиновых кислот. Поэтому главная задача данного исследования – выявить наиболее подходящее покрытие для проведения анализа ДНК и белков. В процессе исследования полимерных щеток, полученных на различных покрытиях, были выделены два ключевых критерия для оценки их характеристик. Первый кри-

терий – количество иммобилизованных биомолекул, служащее индикатором емкости ячеек. Вторым критерием выступает контрастность – соотношение сигнала к фону, отражающее способность полимеров к неспецифической адсорбции молекулярных мишеней.

Количественная оценка концентрации биомолекул в ячейке биочипа. Для точного измерения концентрации биомолекул в ячейках их предварительно маркировали флуоресцентными красителями (рис. 2). Концентрацию зондов определяли путем измерения концентрации красителей в ячейке и последующего расчета, учитывая количество молекул красителя на одну молекулу зонда. Для измерения интенсивности флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии. Чтобы точно

определить концентрацию биомолекул в ячейках биочипа, меченных флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5, был создан калибровочный чип с ячейками объемом 0.5 нл. Этот чип содержал красители Cy3 и Cy5 в постепенно уменьшающейся концентрации на единицу площади поверхности. Измерение интенсивности флуоресценции ячеек с известной концентрацией красителя позволило определить концентрацию Cy3 и Cy5 для каждой относительной единицы показаний прибора. Для каждой выдержки были определены значения интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации красителей на единицу площади подложки. Из флуоресцентных сигналов ячеек вычитали сигналы автофлуоресценции подложки и темнового тока видеокамеры. Результаты представлены в табл. 1.

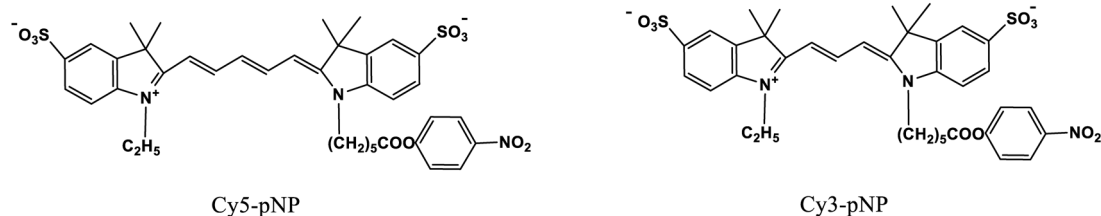


Рис. 2. Схема строения флуоресцентных красителей.

Таблица 1. Значения концентрации красителей Cy3 и Cy5, приходящейся на 1 относительную единицу поверхности подложки под ячейкой биочипа

Выдержка, с	Концентрация красителя, пмоль/см ²	
	Cy3	Cy5
1	6.37×10^{-1}	3.27×10^{-4}
10	4.88×10^{-2}	—
30	1.34×10^{-2}	—

Иммобилизация ДНК-зондов и их гибридизация с синтетической мишенью. В работе [15] наша группа проводила анализ ДНК в ячейках из щеточных полимеров с карбоксильными группами. В ходе исследований была продемонстрирована высокая эффективность определения однонуклеотидных полиморфизмов на таких чипах. В данной работе гибридизационный анализ был проведен в ячейках, полученных из смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС, изготовленных на покрытиях ЦОС, АЦ, ПВАц и ПВБ (рис. 3). Нуклеотидные

последовательности ДНК-зонда и синтетической мишени приведены в табл. 2.

На рис. 4 представлены флуоресцентные картины биочипов, полученных путем полимеризации смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС на фотоактивных покрытиях поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборнена) (ЦОС), ацетилцеллюлозы (АЦ), поливинилацетата (ПВАц) и поливинилбутирата (ПВБ), после иммобилизации ДНК-зонда. На графике распределения флуоресцентных сигналов на канале Cy3 видно, что иммобилизация ДНК-зондов на щеточных полимерах, полу-

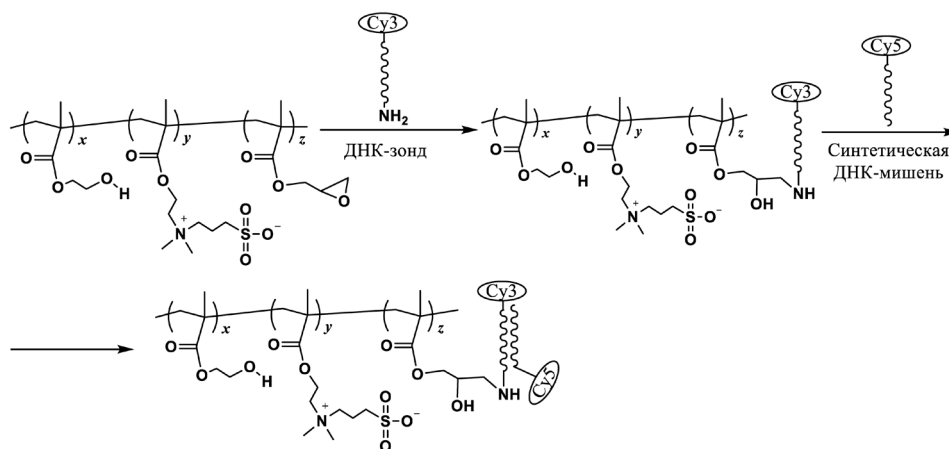


Рис. 3. Схема иммобилизации ДНК-зонда и его гибридизации с синтетической мишенью в ячейках биочипа, полученных полимеризацией смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС.

Таблица 2. Нуклеотидная последовательность ДНК-зонда, иммобилизованного в ячейке, и синтетической ДНК-мишени

Название	Последовательность (5'–3')
ДНК-зонд	NH ₂ -CTGACTCCACTGTTCCGG-Cy3
Синтетическая мишень	CCGAACAGTGGAGTCAG-Cy5

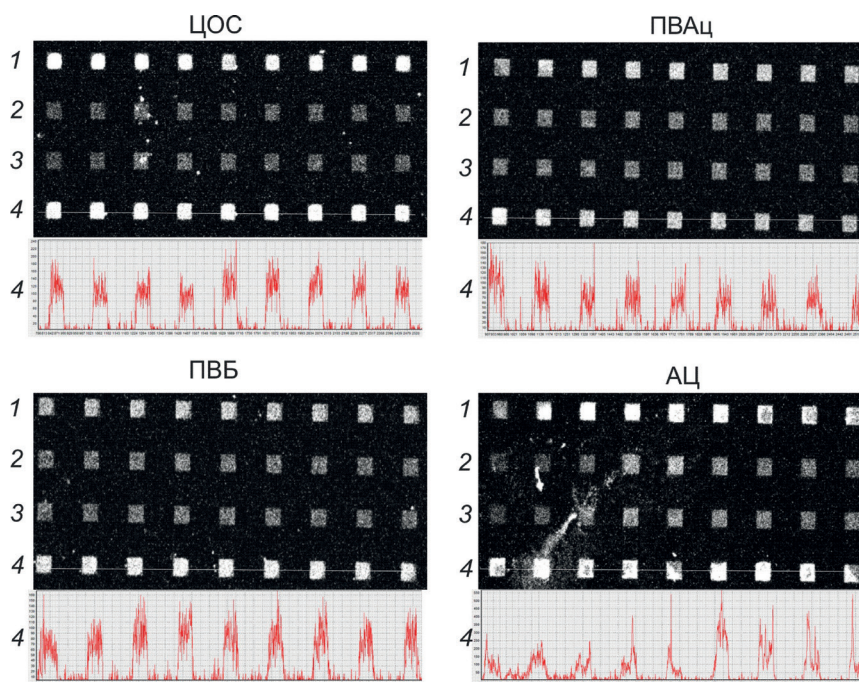


Рис. 4. Флуоресцентные картины ячеек биочипов, полученных на разных фотоактивных поверхностях из смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС, после иммобилизации ДНК-зонда на канале Cy3 при выдержке 10 с (ряды 1 и 4 содержат ДНК-зонд, маркированный Cy3, ряды 2 и 3 – пустые ячейки). Показаны графики распределения сигналов вдоль проведенных линий.

ченных на покрытиях из ЦОС, ПВАц и ПВБ, прошла равномерно. Интенсивности сигналов, полученных на АЦ, распределены неоднородно, несмотря на их максимальное среднее значение. Результаты иммобилизации ДНК-зондов представлены в табл. 3.

На рис. 5 показаны флуоресцентные картины биочипов, полученных путем полимеризации смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС на фотоактивных покрытиях ЦОС, АЦ, ПВАц и ПВБ, после гибридизации ДНК-зонда с синтетической мишенью (табл. 2). Показаны графики распределения сиг-

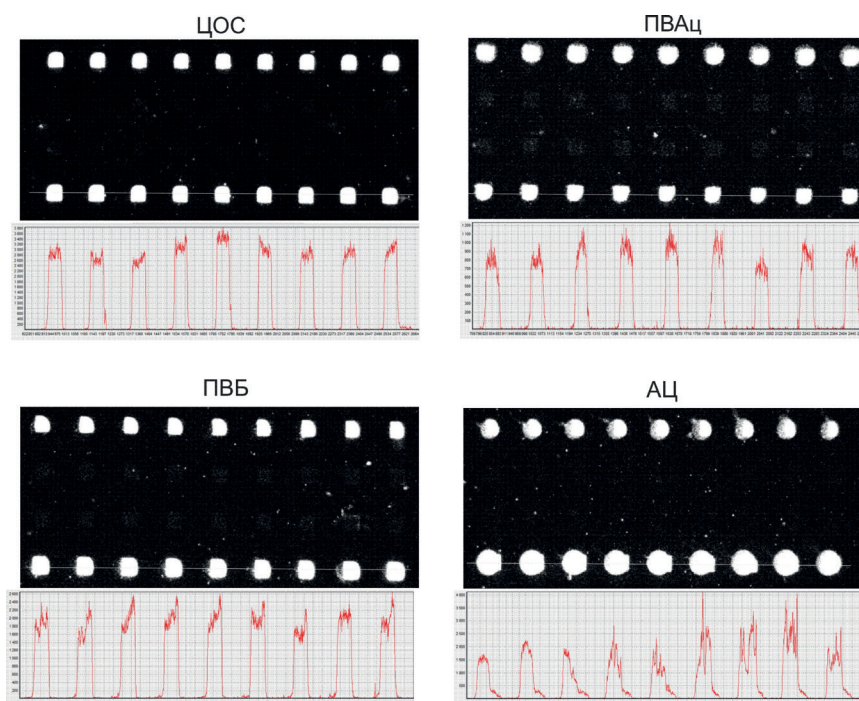


Рис. 5. Флуоресцентные картины ячеек биочипов, полученных на разных фотоактивных поверхностях из смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС, после гибридизации с синтетической мишенью на канале Су5 при выдержке 1 с. Показаны графики распределения сигналов вдоль проведенных линий.

Таблица 3. Результаты иммобилизации ДНК-зонда и его гибридизации с синтетической мишенью в ячейках из щеточных полимеров, полученных на различных полимерных поверхностях

№	Параметр	Фотоактивные полимеры, используемые для получения щеток			
		ЦОС	ПВАц	ПВБ	АЦ
Иммобилизация ДНК-зондов					
1	I _{ср. сигн.} , отн. ед.	116	77	84	147
2	Фон, отн. ед.	31	39	33	45
3	Контрастность	3.7	2.0	2.5	3.3
4	Концентрация молекул, пмоль/см ²	5.66	3.76	4.10	7.17
Гибридизация с синтетической мишенью					
5	I _{ср. сигн.} , отн. ед.	2874	838	2321	1497
6	Фон, отн. ед.	10	11	14	12
7	Контрастность	287.4	76.2	165.8	124.8
8	Концентрация молекул, пмоль/см ²	0.94	0.27	0.76	0.49
9	Отношение концентраций молекул гибридизованной мишени к иммобилизованному ДНК-зонду, %	16.6	7.2	18.5	6.8

налов вдоль проведенных линий. Стоит отметить, что почти во всех ячейках, полученных на разных покрытиях, сигналы равномерные. Результаты гибридизационного анализа представлены в табл. 3.

Согласно приведенным данным, интенсивность сигналов, полученных на ЦОС, после гибридизации превосходит интенсивности сигналов ячеек, полученных на других покрытиях (табл. 3, строка 5). Однако доступных для связывания ДНК-зондов с гибридизованной мишенью оказалось больше на покрытии из ПВБ (табл. 3, строка 9). На АЦ, в ячейках которой произошла наилучшая иммобилизация ДНК-зондов, комплементарно связывается лишь 6.8% биомолекул. Следует также подчеркнуть, что сорбция ДНК на всех покрытиях незначительная, что объясняет высокие соотношения сигнала к фону для всех полимеров, на которых были созданы щетки.

Иммобилизация иммуноглобулинов человека (Human-IgG) и их специфическое связывание с мечеными козьими антителами против иммуноглобулинов человека (Goat anti-Human IgG-Cy5). В ячейках, полученных из смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС, изготовленных на покрытиях ЦОС, АЦ, ПВАц и ПВБ, были иммобилизованы Human-IgG, а также Human-IgG-Cy3 (рис. 6).

На рис. 7 представлены флуоресцентные картины ячеек биочипов, полученных фотополимеризацией смеси мономеров ГЭМА–ДМАПС–ГМА на разных фотоактивных поверхностях, после иммобилизации Human-IgG и Human-IgG-Cy3.

Показаны графики распределения сигналов вдоль линий, проведенных на флуоресцентном изображении. Результаты иммобилизации представлены в табл. 4.

На рис. 8 показаны флуоресцентные картины ячеек биочипов, полученных фотополимеризацией смеси мономеров ГЭМА–ДМАПС–ГМА на разных фотоактивных поверхностях, после иммобилизации Human-IgG и связывания с проявляющими антителами Goat anti-Human IgG-Cy5 на канале Cy5 при выдержке 1 с. Показаны графики распределения сигналов вдоль линий, проведенных на флуоресцентном изображении. Результаты специфического связывания представлены в табл. 4.

Из приведенных данных видно, что наибольшей емкостью ячеек, полученных на разных фотоактивных полимерах, обладают поливинилбутираль и циклоолефиновый сополимер. ЦОС показал лучшую доступность связывания с Human-IgG-Cy3 (табл. 4, строка 9, столбец 2), а ПВБ – с иммуноглобулином человека без метки (табл. 4, строка 13, столбец 4). Параметры контрастности для ПВБ и ЦОС тоже наилучшие, что свидетельствует как о высоких сигналах в ячейках биочипа, так и о низкой неспецифической адсорбции белков к подложкам по сравнению с другими фотоактивными покрытиями. На рис. 6 продемонстрировано равномерное связывание иммуноглобулина Human-IgG с goat anti-Human IgG-Cy5, что указывает на пространственную доступность внутренних областей ячеек для крупных глобулярных белков.

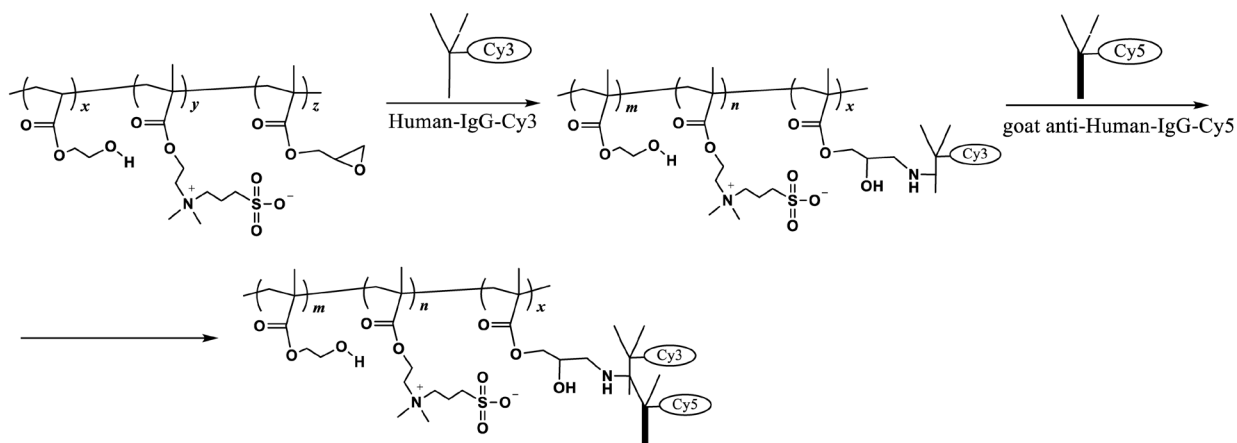


Рис. 6. Схема иммобилизации иммуноглобулина Human-IgG и его специфическое связывание с козьими антителами в ячейках биочипа, полученных полимеризацией смеси ГМА–ГЭМА–ДМАПС.

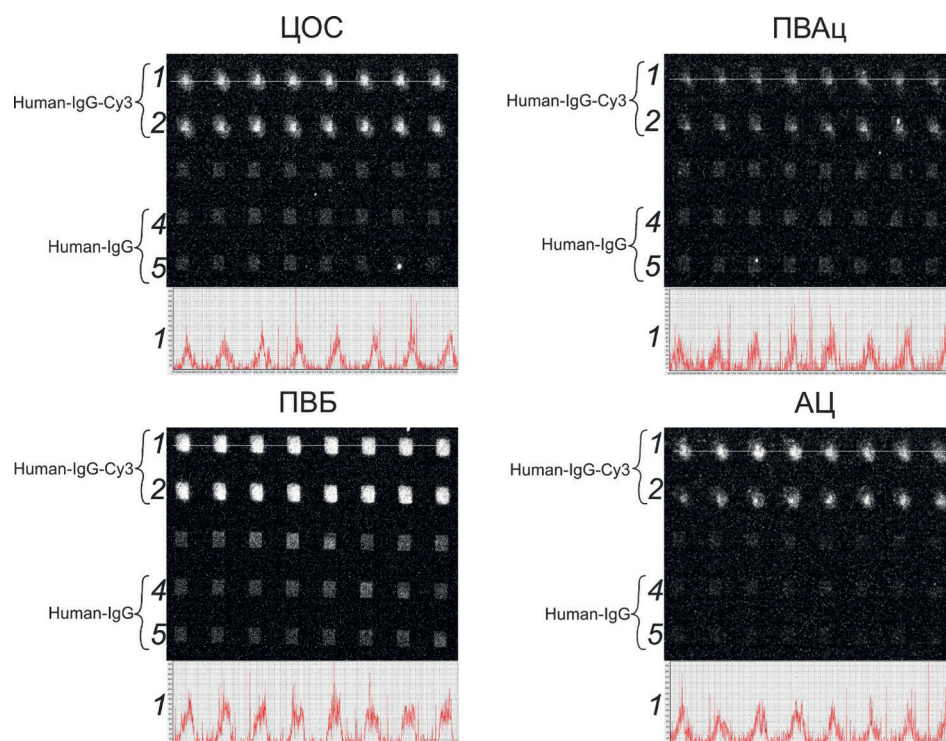


Рис. 7. Флуоресцентная картина ячеек биочипа, полученных фотополимеризацией смеси мономеров ГЭМА–ДМАПС–ГМА, после иммобилизации Human IgG и Human IgG-Cy3 при выдержке 30 с. Показаны графики распределения сигналов вдоль проведенных линий.

Таблица 4. Результаты специфического связывания Human-IgG с goat anti-Human IgG-Cy5 в ячейках из щеточных полимеров, полученных на различных полимерных покрытиях

№	Параметр	Фотоактивные полимеры, используемые для получения щеток			
		ЦОС	ПВАц	ПВБ	АЦ
Иммобилизация Human-IgG-Cy3					
1	I _{ср. сигн.} , отн. ед.	91	46	133	77
2	Фон, отн. ед.	17	14	36	13
3	Контрастность	5.4	2.7	3.7	5.9
4	Концентрация молекул, пмоль/см ²	0.61	0.31	0.89	0.52
Связывание Human-IgG-Cy3 с goat anti-Human IgG-Cy5					
5	I _{ср. сигн.} , отн. ед.	1668	378	1370	792
6	Фон, отн. ед.	110	109	108	169
7	Контрастность	15.2	3.5	12.7	4.7
8	Концентрация молекул, пмоль/см ²	0.18	0.04	0.15	0.09
9	Отношение концентраций молекул связавшихся goat anti-Human IgG-Cy5 к иммобилизованным Human-IgG-Cy3, %	29.5	12.9	16.9	17.3
Связывание Human-IgG с goat anti-Human IgG-Cy5					
10	I _{ср. сигн.} , отн. ед.	5225	3876	6672	6068
11	Фон, отн. ед.	110	109	108	169
12	Контрастность	47.5	35.6	61.7	35.9
13	Концентрация молекул, пмоль/см ²	0.65	0.48	0.83	0.75

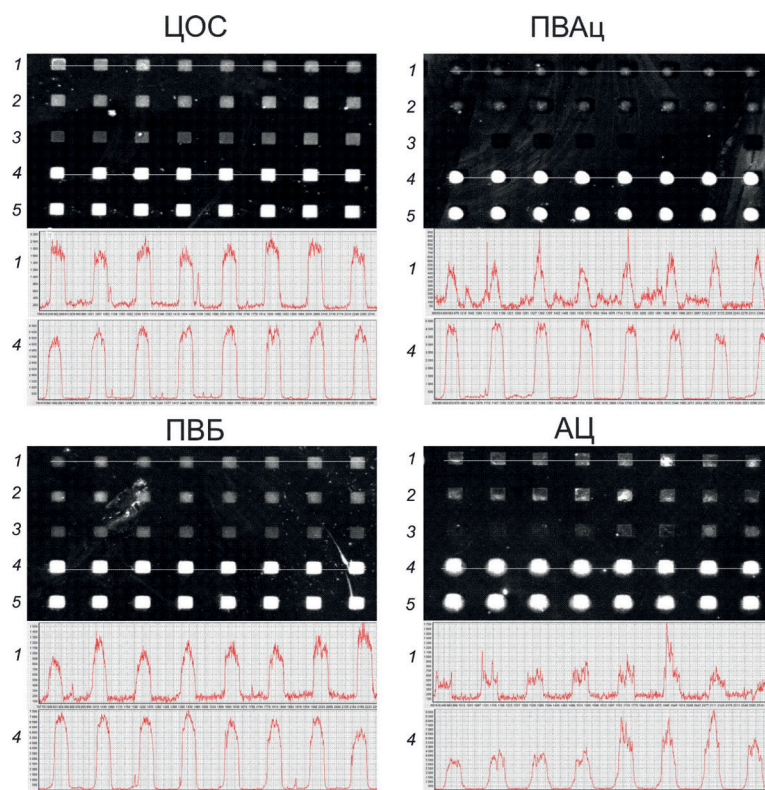


Рис. 8. Флуоресцентная картина ячеек биочипа, полученных фотополимеризацией смеси мономеров ГЭМА–ДМАПС–ГМА, после иммобилизации Human IgG и связывания с проявляющими антителами Goat anti-Human IgG–Cy5 на канале Cy5 при выдержке 1 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка поверхности ПБТ. Использовали пластины из черного полибутилентерефталата (ПБТ) [16]. Для удаления возможных загрязнений поверхность подложки промывали ацетоном в течение 10 мин, затем потоком дистиллированной воды. Сушили при 60°C и хранили в вакуум-экситаторе до использования.

Модификация поверхности ПБТ фотоактивными полимерами. Готовили 2%-ные (об.) растворы полимеров: поливинилацетата (ПВАц) (марка М = 100, ТУ 2215-001-98514529-2007, Россия) и ацетилцеллюлозы (АЦ) (М 50 000, Aldrich, США) в метилэтилкетоне, ПВБ (марка КА, ГОСТ 9439-85, Россия) в циклопентаноне, поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборнене) (ЦОС) (Aldrich, США) в *para*-ксилоле. Каждый раствор полимера содержал 0.5% масс. бензофенона (Acros, Бельгия). Растворы поли-

меров наносили при вращении 1000 об/мин в течение 5 мин. Затем подложки сушили при комнатной температуре в течение 1 ч.

Прививка щеточных полимеров. На модифицированную фотоактивными полимерами подложку наносили смесь мономеров глицидилметакрилата (ГМА) (Aldrich, США) с концентрацией 0.225 М, гидроксиэтилметакрилата (ГЭМА) (Aldrich, США) с концентрацией 0.075 М и 0.015 М [2-(метакрилоилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил)аммоний гидрохлорида (Aldrich, США) в смеси растворителей метанола и деионизированной воды в соотношении 1 : 1. Закрывали кварцевой фотомаской размером 125 × 125 мм и толщиной 1 мм, имеющей светонепроницаемое хромовое покрытие с прозрачными квадратными окнами размером 200 × 200 мкм, расположенными с шагом 600 мкм. Проводили облучение УФ-светом в течение 30 мин с использованием осветителя ОИ-18А, оснащенного кварцевой ртутной

лампой ДРК-120 (Россия). Расстояние от источника света до фотомаски составляло 10 см. После окончания полимеризации подложки промывали ацетоном в течение 10 мин, затем в водно-солевом буфере PBS (0.15 М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2) с добавлением 1% Tween-20. Подложки сушили при 60°C и хранили в вакуум-эксикаторе до использования. Схема получения ячеек представлена на рис. 1.

Получение конъюгатов белков с красителями. Конъюгаты белков получали в соответствии с методикой, описанной в работе [17]. Конъюгат белка Human IgG-Cy3 синтезировали реакцией иммуноглобулина человека Human IgG с красителем Cy3-pNP. Конъюгаты антител козы Goat anti-Human IgG-Cy5 получали путем реакции антител козы с красителем Cy5-pNP. Строение красителей Cy5-pNP и Cy3-pNP представлено на рис. 2. К раствору белков с концентрацией 100 мкМ в 0.1 М карбонатном буфере при pH 8.5 и охлаждении на льду добавляли красители Cy3-pNP и Cy5-pNP в молярном соотношении 100 : 1 маркера к маркируемому белку. Флуоресцентные красители к раствору белка добавляли в виде растворов в DMSO с концентрацией 100 мкг/мкл. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 2 ч. Конъюгаты очищали методом гelfiltrации на колонке с Sephadex G-25 Superfine, элюировали PBS-буфером (0.15 М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2). Спектрофотометрически определяли количество молекул красителя, приходящееся на молекулу белка. Конъюгат Human IgG-Cy3 содержит две молекулы красителя, а конъюгат Goat anti-Human IgG-Cy5 – три молекулы красителя.

Синтез олигонуклеотидов. Синтез ДНК-зонда и ДНК-мишени осуществляли фосфитамиditным методом с последующей очисткой ВЭЖХ. ДНК-зонд содержал C6-аминомодификатор на 5'-конце и флуоресцентный краситель Cy3 на 3'-конце.

Ковалентная иммобилизация ДНК-зонда в ячейках биочипа. ДНК-зонд с C6-аминомодификатором на 5'-конце и флуоресцентным красителем Cy3 на 3'-конце с концентрацией 1 мМ наносили в 0.1 М карбонатном буфере (pH 10.0), содержащем 10% формамида, 12.5% глицерина и 2% триэтиламина, наносили иглой робота-манипулятора (QArray, Genetix, Великобритания) диаметром 150 мкм в ячейки с эпоксид-

ными группами по заданной раскладке. После нанесения проводили инкубацию в закрытой камере, содержащей 50% глицерина и 2% триэтиламина, при 4°C в течение 16 ч. Затем чипы с иммобилизованными ДНК-зондами промывали потоком деионизированной воды и 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мМ триэтиламмоний-гидрокарбонате с pH 8.5. Сушили обдувкой струей воздуха. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Ковалентная иммобилизация Human-IgG в ячейках биочипа. Иммуноглобулин Human-IgG и конъюгат белка с красителем Human-IgG-Cy3 с концентрациями 0.1 мкг/мкл в PBS (pH 7.4), содержащие 30% глицерина и 2% триэтиламина, наносили иглой робота-манипулятора диаметром 150 мкм в ячейки с эпоксидными группами по заданной раскладке. После нанесения инкубацию проводили в камере, содержащей 50% глицерина и 2% триэтиламина, при 4°C в течение 16 ч. Затем чипы с иммобилизованными белками промывали потоком деионизированной воды и буфером PBS (pH 7.4), содержащим 1% Tween-20, в течение 40 мин. Промывали деионизированной водой и хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Гибридизация ДНК-мишени в ячейках биочипа. Готовили раствор ДНК-мишени с конечной концентрацией 1 пмоль/мкл. Состав гибридизационного раствора: 2 мкл синтетической мишени с концентрацией 20 пмоль/мкл, 10 мкл формамида, 10 мкл 20× SSPE-буфера, 18 мкл деионизированной воды. Подложки с нанесенными в ячейки биочипа ДНК-зондами обрабатывали гибридизационным раствором. Реакцию проводили в термостате в течение 2 ч при 37°C. После инкубации подложки промывали 6× SSPE-буфером в течение 5 мин. Чипы хранили в закрытой коробке при 5°C.

Проявление козьими антителами иммуноглобулинов человека, иммобилизованных в ячейках биочипа. Чипы с иммобилизованными иммуноглобулинами Human IgG-Cy3 и Human IgG обрабатывали 100 мкл раствора 0.01 мкг/мкл конъюгата Goat anti-Human IgG-Cy5 в PBS-буфере с pH 7.4. Затем инкубировали при 37°C в течение 3 ч. После инкубации подложки отмывали в PBST с pH 7.4 при комнатной температуре в течение 40 мин при перемешивании на шейкере. Подложки сушили обдувкой струей воздуха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На биочипах с различным полимерным покрытием в ячейках из щеточных полимеров с функциональными эпоксидными группами проведено исследование функциональности иммобилизованных молекулярных зондов гибридизационным анализом со специфичной ДНК-мишенью и реакцией со специфичными козьими антителами соответственно, проведена оценка эффективности связывания иммобилизованных молекулярных зондов с ответными молекулярными мишенями.

В ходе проверки были сделаны чипы на подложке из полибутилентерефталата, которые покрывали различными фотоактивными полимерами методом центрифугирования для создания равномерного тонкого слоя. Методом фотолитографии на подложках получены матрицы ячеек из щеточных полимеров, состоящие из мономеров глицидилметакрилата, гидроксипропилметакрилата и [2-(метакрилоилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил)аммония гидрохлорида. В ячейках биочипа иммобилизовали ДНК-зонды и иммуноглобулины человека и проверили их доступность в гибридизационном анализе с синтетической мишенью и специфическом связывании с антителами козы соответственно. Оценку фотоактивных свойств производили по двум параметрам: емкости ячеек и контрастности. Биочипы, изготовленные на подложках из полибутилентерефталата, покрытых поливинилбутиралем и поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборненом), продемонстрировали наилучшую эффективность связывания иммобилизованных молекулярных ДНК-зондов и иммуноглобулинов с ответными молекулярными мишенями по сравнению с покрытиями из поливинилацетата и ацетилцеллюлозы. Полимерные покрытия незначительно адсорбировали анализируемые молекулярные мишени, что обеспечило высокую контрастность флуоресцентного изображения ячеек после связывания флуоресцентно-меченных молекулярных мишеней с молекулярными зондами, иммобилизованными в ячейках биочипов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Р.А. Юрасову за помощь при использовании компьютерной программы ImaGeWare (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

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 – ГФШ, АВЧ; экспериментальные работы – ГФШ, ИЮШ, РАМ, САП, ВАВ, САС; написание статьи – ГФШ, АВЧ, БЕК; анализ данных – ГФШ, ВЕБ, ВЕШ; администрирование проекта – ОАЗ, ВИБ, АВЧ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stumpf A., Brandstetter T., Hübner J., Rühle J.* // PLoS One. 2019. V. 14. P. e0225525.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225525>
2. *Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A.* // Exp. Rev. Mol. Diagn. 2011. V. 11. P. 839–853.
<https://doi.org/10.1586/erm.11.73>
3. *Mateo C., Fernández-Lorente G., Abian O., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M.* // Biomacromolecules. 2000. V. 1. P. 739–745.
<https://doi.org/10.1021/bm000071q>
4. *Chi Q., Zhang J., Andersen J.E., Ulstrup J.* // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. P. 4669–4679.
<https://doi.org/10.1021/jp0105589>
5. *Sullivan T.P., Huck W.T.* // Eur. J. Org. Chem. 2002. V. 2003. P. 17–29.
[https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200301\)2003:1%3C17::AID-EJOC17%3E3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200301)2003:1%3C17::AID-EJOC17%3E3.0.CO;2-H)
6. *Zhi Z.L., Powell A.K., Turnbull J.E.* // Anal. Chem. 2006. V. 78. P. 4786–4793.
<https://doi.org/10.1021/ac060084f>
7. *Yi S.S., Noh J.M., Lee Y.S.* // J. Mol. Catal. B Enzym. V. 57. P. 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.002>

8. Singh V., Ahmad S. // *Cellulose*. 2012. V. 19. P. 1759–1769.
<https://doi.org/10.1007/s10570-012-9749-6>
9. Akkoyun A., Bilitewski U. // *Biosens. Bioelectron.* 2002. V. 17. P. 655–664.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00029-5)
10. Guerrero C., Vera C., Serna N., Illanes A. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 232. P. 53–63.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.003>
11. Kobayashi H., Ikada Y. // *Biomaterials*. 1991. V. 12. P. 747–751.
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90024-5)
12. Isobe N., Lee D.S., Kwon Y.J., Kimura S., Kuga S., Wada M., Kim U.J. // *Cellulose*. 2011. V. 18. P. 1251–1256.
<https://doi.org/10.1007/s10570-011-9561-8>
13. Mueller M., Bandl C., Kern W. // *Polymers*. 2022. V. 14. P. 608.
<https://doi.org/10.3390/polym14030608>
14. Zhao B., Brittain W.J. // *Progr. Polym. Sci.* 2000. V. 25. P. 677–710.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00012-5)
15. Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Yu., 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>
16. Shaskolskiy B., Kandinov I., Kravtsov D., Vinokurova A., Gorshkova S., Filippova M., Kubanov A., Solomka V., Deryabin D., Dementieva E., Gryadunov D. // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 3889.
<https://doi.org/10.3390/polym13223889>
17. Shtylev G.F., Shishkin I.Yu., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Kachulyak D.A., Butvilovskaya V.I., Levashova A.I., Vasiliskov V.A., Zasedateleva O.A., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2024. V. 50. P. 2036–2049.
<https://doi.org/10.1134/S106816202405033>

Effect of Different Coatings on Immobilization of Biomolecules in Brush Polymer Cells

G. F. Shtylev^{*, #}, I. Yu. Shishkin^{*}, R. A. Miftakhov^{*}, S. A. Polyakov^{*}, V. E. Shershov^{*}, V. E. Kuznetsova^{*}, S. A. Surzhikov^{*}, V. I. Butvilovskaya^{*}, V. E. Barsky^{*}, V. A. Vasiliskov^{*}, O. A. Zasedateleva^{*}, and A. V. Chudinov^{*}

[#] E-mail: gosha100799@mail.ru

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

Biochips with protein and oligonucleotide probes are used to analyze protein and nucleic acid samples. The key challenges of the technology are the selection of substrate materials and surface functionalization. Polybutylene terephthalate substrates were modified by coating them with photoactive polymers: poly(ethylene-co-propylene-co-5-methylene-2-norbornene), acetylcellulose, polyvinyl acetate and polyvinyl butyral. The coatings were applied by centrifugation and dried. The effect of the coating on the biochip characteristics was investigated. A matrix of hydrophilic cells made of brush polymers with epoxy groups for immobilization of DNA probes and human immunoglobulins was prepared by photoinitiated radical polymerization. The functionality of probes was investigated by hybridization analysis and reaction with specific antibodies. The binding efficiency of probes to molecular targets was evaluated on biochips with different coatings. Cells on substrates coated with polyvinyl butyral and poly(ethylene-co-propylene-co-5-methylene-2-norbornene) showed the best binding efficiency and weak adsorption of targets, providing high contrast fluorescence images after probe binding. Biochips on such substrates are promising for lab-on-a-chip microanalysis technology.

Keywords: polymer surfaces, biochips, brush polymers, oligonucleotide probe immobilization, protein immobilization, hybridization analysis, fluorescent immunoassay