



УДК 577.2:577.113.4

БИОЧИП С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ С РЕАКТИВНЫМИ КАРБОКСИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ ДЛЯ АНАЛИЗА ДНК

© 2023 г. Р. А. Мифтахов*, А. Ю. Иконникова*, В. А. Василисков*, С. А. Лапа*,
А. И. Левашова*, В. Е. Кузнецова*, В. Е. Шершов*, А. С. Заседателев*,
Т. В. Наседкина*, А. В. Чудинов*, #

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принята к публикации 15.12.2022 г.

Разработан способ изготовления биочипов методом фотолитографии с гидрогелевыми ячейками из щеточных сополимеров на основе акриловой кислоты и акриламида, закрепленными одним концом на поверхности полимерной подложки. Гидрогелевые ячейки с реактивными карбоксильными группами использовали для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов. Особенно ячеек из щеточных полимеров – высокая емкость ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов и быстрая кинетика гибридизации с комплементарными ДНК-мишенями. Эффективность биочипов продемонстрирована в гибридизационном анализе с ДНК-мишенями различной длины, представляющими собой участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека.

Ключевые слова: биочипы, щеточные полимеры, иммобилизация олигонуклеотидов, гибридизационный анализ ДНК

DOI: 10.31857/S0132342323050044, EDN: ARR VXQ

ВВЕДЕНИЕ

При анализе микроколичеств биологически активных веществ широко используют подход, в котором один из компонентов – зонд – ковалентно иммобилизован на твердом носителе. В методе биочипов набор ДНК-зондов иммобилизован в ячейках чипа по заранее заданным координатам, что позволяет проводить одновременно анализ проб ДНК по связыванию с иммобилизованными ДНК-зондами [1, 2]. Метод биочипов, как многопараметрический анализ микроколичеств ДНК, стал мощным инструментом в биомедицинских исследованиях [3, 4].

Чувствительность и специфичность анализа зависят от концентрации зондов, иммобилизованных в ячейках чипа, сохранности их свойств и пространственной доступности для взаимодействия с анализируемой ДНК. Достижение эффективных параметров иммобилизации зондов – ключевая задача анализа методом биочипов [5].

При непосредственной ковалентной иммобилизации молекулярных зондов на поверхности носителя твердая поверхность затрудняет взаимодействие молекулярной мишени с зондом. Ранее для иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности носителя мы предложили использовать терморасщепляемые линкеры [6].

Для создания расстояния между зондами и поверхностью используют различные линкеры [7, 8]. Получаемые планарные (двумерные) ячейки имеют ограниченную концентрацию зондов, приходящуюся на единицу поверхности подложки, что ограничивает чувствительность метода. Иммобилизация зондов в трехмерной сетке гидрогелей позволяет увеличить их концентрацию в ячейке в ~100 раз. Но трехмерная сетка – сильное кинетическое препятствие в сравнении с планарной иммобилизацией. Для достижения равновесия в связывании анализируемой пробы и иммобилизованного зонда для трехмерных гидрогелевых чипов требуется больше времени, чем для планарных чипов [9].

Альтернативой гидрогелевым ячейкам с трехмерной перекрестно-сшитой сеткой выступают гидрогелевые полимерные ячейки со щеточными полимерами. У щеточных полимеров полимерные цепи закреплены на подложке одним концом и не связаны между собой. Один из способов по-

Сокращения: EDC – этилдиметиламиноэтилкарбодиимид; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; ПЭТ – полиэтилентерефталат; сульфо-NHS – сульфооксисукцинимид; ЦОС – циклоолефиновый сополимер.

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

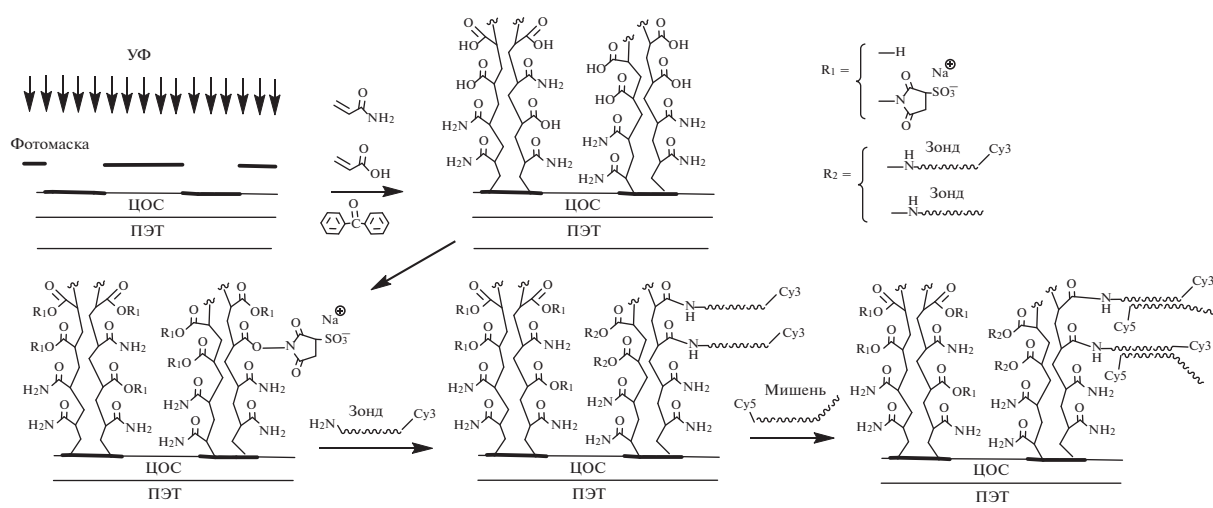


Рис. 1. Схема химической модификации поверхности ПЭТ-пленки.

лучения щеточных полимеров, в том числе с реактивными группами, — фотоиндуцированная полимеризация от поверхности с переносом атома (photoinduced atom transfer surface radical polymerization). Множественные функциональные группы на щеточных полимерах могут обеспечить высокую емкость ковалентной иммобилизации молекулярных зондов [10, 11]. Динамическая подвижность полимерных цепей, закрепленных на подложке только одним концом, минимально влияет на диффузию анализируемой пробы к иммобилизованным молекулярным зондам и приближает к условиям взаимодействия в растворе [5, 12].

Для биомедицинских анализов, включающих проведение ПЦР на поверхности подложки, необходимо использование термостойких материалов с высокой теплопроводностью, малой теплоемкостью и невысокой стоимостью. Пленки из полиэтилентерефталата (ПЭТ) удовлетворяют всем этим условиям [13]. Однако фотоиндуцированная полимеризация от поверхности на промышленных ПЭТ-пленках не происходит, поверхность ПЭТ-пленок не фотоактивна. Фотоиндуцированная полимеризация от поверхности хорошо идет на поверхности циклоолефиновых сополимеров (ЦОС). При УФ-облучении под действием фотоинициатора бензофенона происходит отрыв атома водорода от третичного атома углерода у фрагмента норборнана, который входит в состав ЦОС. На поверхности образуется углеродный радикал, который инициирует полимеризацию мономеров от поверхности [14].

В данной работе представлены результаты получения олигонуклеотидных биочипов с высокой емкостью ориентированной ковалентной иммобилизации ДНК-зондов в гидрофильных гидрогелевых ячейках и быстрой кинетикой гибридизации длин-

ных фрагментов ДНК. Эффективность биочипа продемонстрирована в гибридизационном анализе при определении однонуклеотидного полиморфизма в ДНК-последовательностях различной длины участка 7-го экзона гена *ABO* человека, который детерминирует серологический фенотип группы крови АВО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы, протекающие при химической модификации поверхности ПЭТ-пленки, схематически представлены на рис. 1.

В настоящей работе нами разработан подход направленного изменения свойств поверхности полимерного пленочного материала ПЭТ для использования в качестве подложки при получении олигонуклеотидных биочипов с ячейками из функциональных щеточных полимеров. На первом этапе на поверхности фотоинертной ПЭТ-пленки сделали тонкое покрытие другим, фотоактивным, полимером с высокой адгезией к ПЭТ. Поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилен-2-норборнен) хорошо растворяется в липофильных алифатических и ароматических растворителях и не растворяется в ацетоне и воде, что благоприятно для дальнейшей поэтапной функционализации базовой поверхности полимерной подложки. Затем на поверхности подложки методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации при УФ-облучении через фотомаску получали микроячейки из щеточных сополимеров акриловой кислоты и акриламида. В состав полимерного покрытия входят группы норборнена. Норборненовые группы в комбинации с фотосенсибилизатором бензофеноном обладают высокой способностью к инициации фотоиндуцированной радикальной полимеризации олефиновых мономеров. Если

норборненовые группы находятся на твердой поверхности и удерживаются на ней, то полимеризация идет от поверхности. Фотоиндуцированная полимеризация от поверхности происходит только в зоне УФ-облучения и регулируется химическими и физическими факторами, поэтому она используется для прививки функциональных полимеров по определенной схеме, задаваемой шаблоном фотомаски, что нами и демонстрируется в этой работе на примере получения олигонуклеотидных биочипов с ячейками из щеточных полимеров и их апробации в гибридном анализе продуктов ПЦР различной длины.

Для получения фотоактивного полимерного покрытия на поверхности ПЭТ-подложки использовали растворы поли(этилен-со-пропилен-со-5-метил-2-норборнена) в *para*-ксилоле. На поверхность ПЭТ-пленки размером 25 × 75 мм, закрепленной на роторе центрифуги, наносили раствор полимера, затем включали центрифугу. При вращении лишний раствор сбрасывался, на поверхности оставался тонкий слой раствора полимера (spin coating). Варьируя концентрацию полимера, скорость и время вращения, можно регулировать толщину раствора, остающегося на поверхности пленки. Концентрированные вязкие растворы полимера затрудняют получение равномерного покрытия. Низкокипящие растворители быстро высыхают, что также затрудняет получение равномерного покрытия. Равномерная сушка при комнатной температуре с последующим прогревом приводит к прочной адгезии полимерного покрытия на поверхности ПЭТ-пленки. Покрытие не стирается пальцами, не растворяется и не отслаивается в ацетоне и в кипящей воде.

Для получения ячеек методом фотолитографии использовали изготовленный держатель, который позиционирует шаблон ячеек фотомаски по определенным координатам подложки. Ячейки на подложке, в свою очередь, позиционированы к полю зрения портативного флуоресцентного анализатора, который используется для регистрации флуоресцентных сигналов в ячейках биочипа. На поверхность ПЭТ-подложки при вращении наносили тонкий слой раствора фотоинициатора бензофенона в метилэтилкетоне и высушивали. Наличие фотоинициатора на поверхности подложки увеличивает эффективность фотоиндуцированной радикальной полимеризации от поверхности. Фотоинициатор, находящийся в растворе мономеров, способствует разветвлению полимеров, связанных с поверхностью, и образованию полимеров, не связанных с поверхностью, что приводит к запутыванию полимерных цепей. Полимеры, образующиеся в значительном количестве в слое раствора между подложкой и фотомаской, экранируют УФ-облучение поверхности, усложняют отмывку полимеров, связанных с поверхностью, от полимеров, не связанных с поверхностью. Мы использова-

ли слой раствора мономеров толщиной 12 мкм. С увеличением толщины слоя раствора мономеров над подложкой эффективность получения ячеек снижается. Методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации обычно получают слои щеточных полимеров толщиной 20–100 мкм. Полимерные цепи регулярного строения, полученные из мономеров одного типа, акриловой кислоты, склонны к межцепочечному взаимодействию типа “конденсации”, что затрудняет иммобилизацию молекулярных зондов и препятствует диффузии молекулярных компонентов анализируемых проб. Полимерные цепи, получаемые из смеси мономеров, имеют нерегулярное строение и менее склонны к межцепочечному взаимодействию.

Для получения щеточных полимеров использовали смесь мономеров – акриловой кислоты и акриламида. Мы исследовали влияние различных концентраций акриловой кислоты и акриламида, чтобы обеспечить функциональность, гидрофильность и высокую емкость для иммобилизации ДНК-зондов (табл. 1). Звенья акриловой кислоты (AA) использовали для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов по карбоксильным группам, тогда как звенья акриламида (AAm) вводили для отдаления доступных сайтов иммобилизации друг от друга и увеличения специфичности узнавания ДНК-зондами ДНК-мишеней. Олигонуклеотиды с C6-аминомодификацией на 5'-конце связывали амидной связью с карбоксильными группами, находящимися на щеточных полимерных цепях. Карбоксильные группы предварительно активировали реакцией с EDC/сульфо-NHS (рис. 2).

Доступность иммобилизованных ДНК-зондов первоначально оценивали по гибридации с синтетической ДНК-мишенью длиной 19 нт, маркированной флуоресцентной меткой Cy5 (табл. 1). Подбор концентрации и соотношения мономеров акриловой кислоты и акриламида позволил получить гибридационные сигналы в диапазоне 3000–12000 у.е. с сигналами фона 1200 у.е. и дискриминационным отношением 1.2–5.9 для зондов с однонуклеотидной заменой (табл. 1). Гибридационные сигналы на канале Cy5 были выше для зондов без красителя Cy3 (данные не представлены). Наличие флуоресцентной метки на зонде отражается на конфигурационной подвижности иммобилизованного ДНК-зонда и снижает эффективность гибридации с синтетической мишенью. Максимальные значения дискриминационного отношения при выявлении однонуклеотидной замены на ДНК-зондах наблюдались у ячеек с полимерными щетками, полученными из смеси акрилатов с суммарной концентрацией 0.6 М и соотношением концентраций акриловой кислоты к акриламиду, равным 1 : 5.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности ДНК-зондов, иммобилизованных в щеточных ячейках биочипа, и синтетической ДНК-мишени

№	Нуклеотидные последовательности	
	ДНК-зондов	синтетической ДНК-мишени
270	5'-NH ₂ -CTGACTCC <u>G</u> CTGTTCG-Cy3-3'	5'-CGAACAGCGGAGTCAGGAT-Cy5-3'
271	5'-NH ₂ -CTGACTCC <u>A</u> CTGTTCGG-Cy3-3'	
53	5'-NH ₂ -CTGACTCC <u>G</u> CTGTTCG-3'	
54	5'-NH ₂ -CTGACTCC <u>A</u> CTGTTCGG-3'	
824	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCC <u>G</u> CTGTTCG-Cy3-3'	
825	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCC <u>A</u> CTGTTCGG-Cy3-3'	
264	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCC <u>G</u> CTGTTCG-3'	
265	5'-NH ₂ -Sp-CTGACTCC <u>A</u> CTGTTCGG-3'	

Примечание: подчеркнуты варьируемые нуклеотиды.

Оценка концентрации ДНК-зондов в ячейках чипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенями. Оценивали концентрацию ДНК-зондов в щеточных ячейках биочипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенью. На ячейки чипа с активированными карбоксильными группами наносили растворы зонда № 53 (табл. 1) с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1 и 2 нмоль/мкл. Затем проводили гибридизацию с раствором синтетической ДНК-мишени, маркированной красителем Cy5, с предельно высокой концентрацией 5 пмоль/мкл, достаточной для исчерпывающей гибридизации

зондов с мишенью. После инкубации и отмывки регистрировали сигналы на канале Cy5 на выдержке 100 мс. Гибридизационная картина представлена на рис. 2. По интенсивности сигналов на канале Cy5 вычислили концентрации связавшейся ДНК-мишени с зондами в ячейках. Значительное увеличение интенсивности сигналов наблюдали для ячеек, в которые наносили раствор зондов с концентрациями до 1 нмоль/мкл, далее интенсивность сигналов увеличивалась незначительно.

По концентрации связавшихся ДНК-зондов вычислили концентрации ДНК-зондов в ячейках чипа, доступных для взаимодействия с ДНК-мишенями. Она составила 14.23 пмоль/см².

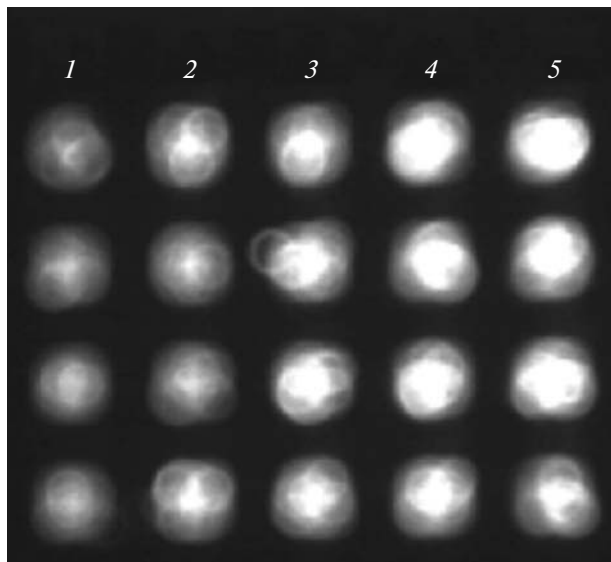


Рис. 2. Флуоресцентная картина чипа на канале Cy5, полученная после гибридизации синтетической ДНК-мишени длиной 19 нт, маркированной красителем Cy5, с ячейками, в которые наносили раствор зонда № 53 с концентрацией 0.125 нмоль/мкл (1), 0.25 нмоль/мкл (2), 0.5 нмоль/мкл (3), 1 нмоль/мкл (4) и 2 нмоль/мкл (5) при выдержке 100 мс.

Оценка кинетики гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с комплементарными ДНК-мишенями. Оценивали кинетику гибридизации иммобилизованных ДНК-зондов с комплементарными ДНК-мишенями различной длины. ДНК-мишени соответствовали участку последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3). На чипах с ДНК-зондами (табл. 1), иммобилизованными в ячейках со щеточными полимерами, проводили гибридизацию с синтетической ДНК-мишенью длиной 19 нт (табл. 1) и с мишенями длиной 124, 295 и 576 нт, которые получали методом асимметричной ПЦР с праймерами, представленными в табл. 2, и геномной ДНК человека. С увеличением длины ДНК-мишеней до 576 нт время, необходимое для комплементарной гибридизации, увеличивается незначительно (данные не приведены). На рис. 3 представлены флуоресцентные картины чипов, полученные для продуктов ПЦР длиной 576 нт при разных временах гибридизации. Из данных, приведенных на рис. 3, следует, что значимые гибридизационные сигналы на канале Cy5 наблюдали уже через 30 мин гибридизации, при этом можно выявлять однонуклеотидные замены в зондах.

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров

Нуклеотидные последовательности		Длина продукта ПЦР, нт
прямых праймеров	обратных праймеров	
5'-CCGGCGCTCGTAGGTGAA-3'	5'-GTGCGTGGACGTGGACATG-3' 5'-Cy5-NH ₂ -GTGCGTGGACGTGGACATG-3'	124
5'-GTAGTAGAAATCGCCSTCGTCCT-3'	5'-TCGGCAGCTGTCAGTGCTG-3' 5'-Cy5-NH ₂ -TCGGCAGCTGTCAGTGCTG-3'	295
5'-AGAGCACCTTGGTGGGTTTGT-3'	5'-CTTTCCTGAAGCTGTTTCCTGGAGA-3' 5'-Cy5-NH ₂ -CTTTCCTGAAGCTGTTTCCTGGAGA-3'	576
5'-GAGTTTACCCGTTCTGCTAAAACCAAG-3'	5'-AGGACTCGCTCAGGACAGG-3'	922

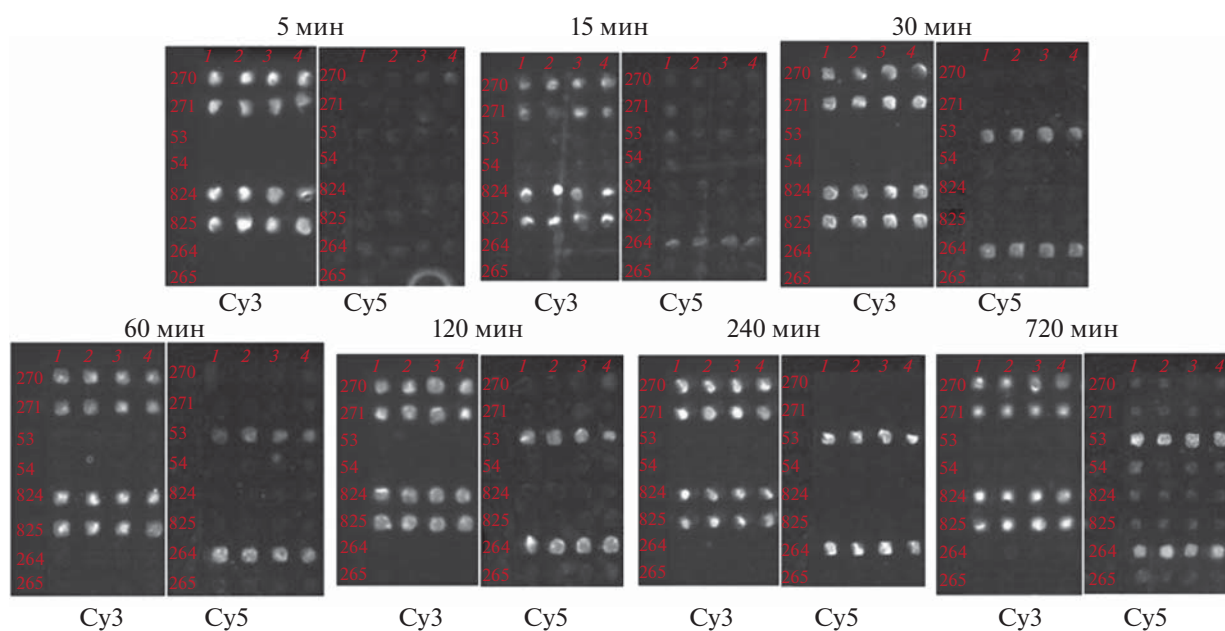


Рис. 3. Флуоресцентные картины чипов, полученные для продуктов ПЦР длиной 576 нт (участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека), на каналах Cy3 и Cy5 при разных временах гибридизации и выдержке 100 мс.

Распределение флуоресцентных сигналов по площади микроячеек. В настоящее время не удалось добиться равномерного распределения сигналов по площади ячеек. Возможные причины могут заключаться в гетерогенном распределении фотоинициатора бензофенона на поверхности ПЭТ-подложки с полимерным покрытием. Проводятся дальнейшие исследования для решения данной проблемы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка поверхности ПЭТ-подложки. Использовали подложки из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа) и размером 25 × 75 мм. Для удаления возможных загрязнений с поверх-

ности подложки промывали 2%-ным раствором моющего средства (Roth Ultrasonol 7 Neutral, Art. No. 5356.1) в дистиллированной воде в ультразвуковой бане (Elmasonic S 30, Elma, Германия) в течение 10 мин, промывали струей деионизированной воды, далее обрабатывали ацетоном в ультразвуковой бане в течение 30 мин и высушивали при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе.

Фотохимическая модификация поверхности ПЭТ-подложки. Подложки покрывали 1%-ным раствором поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилтен-2-норборненем) (Aldrich, США) в *para*-ксилоле при вращении 2400 об/мин в течение 2 мин (spin coating), сушили на открытом воздухе в течение 16 ч, закрепляли полимерное покрытие прогревом при 100°C в сушильном шкафу (СНОЛ-3, ТерМИКС, Россия) в течение 1 ч. Для покрытия

поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги FV-2400 (BioSan, Латвия) с изготовленным дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращается в закрытом кожухе. Слой ЦОС прочно держится на поверхности ПЭТ, не отслаивается в условиях термоциклической ПЦР. Затем подложки покрывали 0.1 М раствором бензофенона в метилэтилкетоне при вращении 2400 об/мин в течение 2 мин, сушили на открытом воздухе в течение 1 ч.

Подложки закрепляли в держателе, наносили раствор акриловой кислоты и акриламида известной концентрации в деионизированной воде, покрывали фотомаской из кварцевого стекла с ячейками 100×100 мкм с шагом 300 мкм. Высоту слоя раствора мономеров устанавливали спейсерами толщиной 12 мкм, проложенными между подложкой и фотомаской. Держатель изготовлен из алюминия, он позволяет фиксировать и закреплять фотомаску относительно ПЭТ-подложки. Облучали УФ-светом с помощью осветителя люминесцентного ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой сверхвысокого давления ДРК-120 в течение 5 мин. Расстояние от осветителя до фотомаски составляло 2 см. После окончания реакции подложки промывали ацетоном, затем прогревали с деионизированной водой при 95°C в течение 12 ч при встряхивании для удаления мономеров и полимеров, не связанных с подложкой. Под микроскопом ($10\text{--}300\times$, Levenhuk Discovery Artisan 32, Россия) в отраженном свете на гидрофобной поверхности подложки видны гидрофильные ячейки, соответствующие шаблону фотомаски. Поверхность подложки вне шаблона фотомаски остается неизменной. Отмытые подложки с ячейками из щеточных полимеров сушили в вакуум-эксикаторе (Медлабстекло, Россия) над P_2O_5 в течение 16 ч при 25°C .

Активация карбоксильных групп в щеточных ячейках. Над ячейками на подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл. В камеру вносили 30 мкл 0.02 М раствора этилдиметиламиноэтилкарбодиимида (EDC) и 0.01 М раствора сульфоексисукцинимиды (сульфо-NHS) в 0.01 М буферном растворе (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), pH 5.0) при 4°C , затем инкубировали при комнатной температуре в течение 6 ч. После окончания реакции подложки промывали MES-буфером (pH 5.0), капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха, затем подложки сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение 16 ч при 25°C .

ДНК-зонды. ДНК-зонды (табл. 1), синтетическую ДНК-мишень (табл. 1) и праймеры (табл. 2) синтезировали по стандартной фосфитамидитной технологии с последующей очисткой ВЭЖХ. Зонды № 824, 825, 264, 265 содержали на 5'-конце

дополнительный гексаэтиленгликолевый спейсер C-18 (Sp) (Glen Research, США).

Иммобилизация ДНК-зондов в щеточных ячейках. Растворы ДНК-зондов с C6-аминомодификатором на 5'-конце с концентрацией 1 нмоль/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 10% формамида, наносили иглой робота-манипулятора (QAgar, Genetix, Великобритания) диаметром 100 мкм в щеточные ячейки по заданной раскладке чипа. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 12 ч при 4°C и дополнительно 4 ч при 25°C . После окончания реакции подложки многократно промывали 50%-ным ацетонитрилом в 0.05 М триэтиламмонийгидрокарбонатном (TEAHC) буфере (pH 8.0) и деионизированной водой. Затем подложки выдерживали в 0.1 М растворе этаноламина в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп, многократно промывали деионизированной водой, капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха, сушили при комнатной температуре в течение 4 ч. Хранили в закрытых полимерных контейнерах при 4°C .

ДНК-мишени. Геномную ДНК выделяли из образцов венозной крови, собранной в пробирки с ЭДТА с помощью набора LumiPure Genomic DNA Blood and Buccal Kit (Lumiprobe RUS Ltd., Россия), концентрацию образцов оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 и флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализируемые модельные фрагменты ДНК соответствуют участку последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3), который детерминирует серологический фенотип группы крови АВО. Последовательность синтетической ДНК-мишени приведена в табл. 1. Продукты ПЦР получали асимметричной гнездовой ПЦР с праймерами, приведенными в табл. 2. На первом этапе в симметричной ПЦР с геномной ДНК нарабатывали продукты длиной 295 и 922 нт, далее их использовали в качестве матрицы для второго этапа ПЦР: 295 нт – для амплификации продуктов 124 и 295 нт, 922 нт – для амплификации продуктов 576 нт. Во втором раунде использовали обратные праймеры с флуоресцентной меткой на 5'-конце (Cy5) в соотношении 1 : 10 с прямыми праймерами для наработки преимущественно одноцепочечного продукта (табл. 2).

Реакцию ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе T-100 (Bio-Rad, США) с использованием Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия), состав реакционной смеси (25 мкл): $1 \times$ ПЦР-буфер (СибЭнзим, Россия), 2 мкл 50 мМ MgCl_2 , dNTP в концентрации 200 мкМ каждого, праймеры (5–50 пмоль), 2.5 ед. полимеразы и геномная ДНК

человека в количестве 10 нг в качестве матрицы. Программа ПЦР: 94°C – 4 мин (начальная денатурация); (94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 60 с) × 35 циклов; далее 72°C – 5 мин (завершающая инкубация).

Гибридизация ДНК-мишени в щеточных ячейках. Над ячейками на подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл. В камеру вносили 30 мкл раствора, содержащего 1.5 пмоль синтетической ДНК-мишени или 15 мкл продуктов ПЦР, 5 мкл 6× SSPE-буфера, 7.5 мкл формамида. Инкубировали в закрытой камере чипа в термостате при 37°C в течение 12 ч. После завершения реакции камеру промывали 6× SSPE-буфером (6 × 30 мкл). Подачу и удаление рабочих растворов производили через отверстия в крышке разборной камеры. Затем камеру разбирали, капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха. Чипы хранили в закрытых полимерных контейнерах при 4°C.

Измерение флуоресцентных сигналов. Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии с регистрацией интенсивности флуоресценции (I_f) в свете флуоресценции красителя [15]. Флуоресцентные сигналы ячеек чипа регистрировали на портативном анализаторе (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм и запирающим фильтром 716 ± 22 нм (Semrock, США; канал Су5), лазерным возбуждением при 532 нм и запирающим фильтром 580 ± 27 нм (Semrock, США; канал Су3), с цифровой ПЗС-камерой. Изображение анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) [16]. В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Су5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании были разработаны следующие методы:

1) метод изготовления биочипов для анализа последовательностей нуклеиновых кислот с высокой емкостью иммобилизации ДНК-зондов в ячейках чипа и быстрой кинетикой гибридизации длинных фрагментов ДНК;

2) метод ориентированной ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов в гидрогелевых ячейках из щеточных полимеров на поверхности полимерной подложки из пленочного полиэтилентерефталата;

3) метод получения гидрогелевых ячеек с реактивными карбоксильными группами из акриловых мономеров методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации от поверхности

способом фотолитографии при УФ-облучении через фотомаску.

Продемонстрирована высокая эффективность определения однонуклеотидных полиморфизмов на чипах с ячейками из щеточных полимеров в гибридизационном анализе продуктов асимметричной ПЦР длиной до 576 нт, представляющих собой участок последовательности 7-го экзона гена *ABO* человека.

Разработанные методы могут быть использованы при разработке технологии параллельного множественного экспресс-микрoанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.010>
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. Naidu C.K., Suneetha Y. // *Trop. J. Pharm. Res.* 2012. V. 11. P. 153–164. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v11i1.20>
4. Beaudet A.L., Belmont J.W. // *Annu. Rev. Med.* 2008. V. 59. P. 113–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.59.012907.101800>
5. Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J. // *ACS Appl. Mat. Int.* 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsmi.9b06838>
6. Золотов А.М., Мифтахов Р.А., Иконникова А.Ю., Лапа С.А., Кузнецова В.Е., Василисков В.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Наседкина Т.В., Чудинов А.В. // *Биоорг. химия.* 2022. Т. 48. С. 599–605. [Zolotov A.M., Miftakhov R.A., Ikonnikova A.Y., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Zasedatelev A.S., Nasedkina T.V., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 858–

- 863.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162022040203>
7. *Shchepinov M.S., Case-Green S.C., Southern E.M.* // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1155–1161.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1155>
 8. *Halperin A., Buhot A., Zhulina E.B.* // *Langmuir.* 2006. V. 22. P. 11290–11304.
<https://doi.org/10.1021/la0616606>
 9. *Zubisov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Konovalova E.V., Moiseeva O.V., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S.* // *Anal. Biochem.* 2007. V. 368. P. 205–213.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.04.040>
 10. *Rohr T., Ogletree D.F., Svec F., Fréchet L.M.J.* // *Adv. Funct. Mat.* 2003. V. 13. P. 264–270.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200304229>
 11. *Ma H., Davis R.H., Bowman C.N.* // *Macromolecules.* 2000. V. 33. P. 331–335.
<https://doi.org/10.1021/ma990821s>
 12. *Barbey R., Lavanant L., Paripovic D., Schüwer N., Sugnaux C., Tugulu S., Klok H.-A.* // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. P. 5437–5527.
<https://doi.org/10.1021/cr900045a>
 13. *Miftakhov R.A., Lapa S.A., Shershov V.E., Zasedateleva O.A., Guseinov T.O., Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Mamaev D.D., Lysov Yu.P., Barsky V.E., Timofeev E.N., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // *Biophysics.* 2018. V. 63. P. 512–518.
<https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
 14. *Jena R.K., Yue C.Y.* // *Biomicrofluidics.* 2012. V. 6. P. 012822.
<https://doi.org/10.1063/1.3682098>
 15. *Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A.* // *J. Biomol. Screen.* 2002. V. 7. P. 247–257.
<https://doi.org/10.1177/108705710200700308>
 16. *Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A.* // *Biomed. Optics Express.* 2017. V. 8. P. 4798–4810.
<https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798>

Biochip with Cells of Brush Polymers Carrying Carboxyl Groups for DNA Analysis

R. A. Miftakhov*, A. Yu. Ikonnikova*, V. A. Vasiliskov*, S. A. Lapa*, A. I. Levashova*, V. E. Kuznetsova*, V. E. Shershov*, A. S. Zasedatelev*, T. V. Nasedkina*, and A. V. Chudinov*.[#]

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

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

A method for manufacturing biochips by photolithography with hydrogel cells made of brush copolymers based on acrylic acid and acrylamide, fixed at one end on the surface of a polymer substrate has been developed. Hydrogel cells with reactive carboxyl groups were used for covalent immobilization of oligonucleotide probes. The effectiveness of the method was demonstrated in the hybridization analysis of DNA by targets of different lengths of the sequence site 7 of the exon of the human *ABO* gene.

Keywords: biochips, brush polymers, immobilization of oligonucleotides, DNA hybridization analysis