



УДК 577.2:547.75

СРАВНЕНИЕ АНАЛИЗА ДНК НА БИОЧИПАХ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ И ПЕРЕКРЕСТНО-СШИТЫХ ПОЛИМЕРОВ

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

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

Поступила в редакцию 20.12.2024 г.

После доработки 27.12.2024 г.

Принята к публикации 28.12.2024 г.

Регулирование свойств поверхности подложек в технологии биочипов открывает возможность оптимизации платформ для эффективного распознавания биомолекул. Исследование направлено на изучение возможностей использования щеточных полимеров для повышения чувствительности и скорости анализа ДНК на биочипах. Ячейки из щеточных полимеров для биочипов получали методом УФ-инициируемой полимеризации мономеров от поверхности на подложках из полиэтилентерефталата. Ячейки из перекрестно-сшитых гидрогелевых полимеров для биочипов получали на подложках из полибутилентерефталата методом сополимеризации компонентов геля с ДНК-зондами. Зонды в ячейках из щеточных полимеров иммобилизовали через активированные карбоксильные группы. Для гибридизационного анализа применяли одноцепочечную ДНК-мишень длиной 124 нуклеотида, соответствующую 7-му экзону гена *ABO* человека. Изучали гибридизацию ДНК-мишени на биочипах с ячейками из щеточных полимеров и из перекрестно-сшитых полиакриламидных гидрогелей. Оценку результатов гибридизационного анализа на биочипах проводили методом цифровой флуоресцентной микроскопии. В ячейках из щеточных полимеров наблюдали более высокую интенсивность флуоресцентных сигналов и более высокое отношение сигналов ячеек с совершенными дуплексами к сигналам ячеек с несовершенными дуплексами по сравнению с ячейками из трехмерных перекрестно-сшитых полимеров. Достижение гибридизационного сигнала до 90% от насыщения происходило за одинаковое время в ячейках обоих типов. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью разработки высокоточных и эффективных методов диагностики, позволяющих проводить анализ биомолекул с минимальными затратами времени и реагентов. Разработка биочипов на основе щеточных полимеров позволит повысить точность и чувствительность молекулярных исследований, что особенно важно для ранней диагностики заболеваний.

Ключевые слова: биочипы, гибридизационный анализ, ДНК, гидрогелевые ячейки, ячейки из щеточных полимеров

DOI: 10.31857/S0132342325030078, **EDN:** KQNEUR

ВВЕДЕНИЕ

Гибридизационный анализ в технологии биочипов используется для исследования экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, диагностики инфекционных и генетических заболеваний [1–3].

Обнаружение ДНК на биочипах состоит из этапов иммобилизации олигонуклеотидных зондов, их гибридизации с целевой последовательностью и анализа с преобразованием в измеряемый сигнал. Эффективность этого процесса может ограничиваться электростатическим отталкиванием

Сокращения: EDC – 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлорид; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; TEANC – триэтиламмоний гидрокарбонатный буфер; ПЭТ – полиэтилентерефталат; сульфо-NHS – *N*-гидроксисульфосукцинимид.

[#]Автор для связи: (тел.: + 7 (499) 135-98-00; эл. почта: mr.miftahov20@yandex.ru).

между молекулами ДНК, пространственными препятствиями и адсорбцией анализируемой ДНК на поверхности биочипа [4, 5]. Для эффективного распознавания ДНК необходимо сохранить доступность зондов для комплементарных мишеней, что в технологии двумерных чипов затруднено из-за пространственных ограничений, создаваемых поверхностью [6]. Использование спейсеров доказало свою эффективность в улучшении гибридизации на плоских поверхностях [7, 8].

Альтернативный способ основан на иммобилизации ДНК-зондов в трехмерных гидрогелевых матрицах, которые обладают большей емкостью для иммобилизации олигонуклеотидов [9]. Кроме того, они создают среду, имитирующую условия в растворе [10]. В то время как гидрогелевые платформы благодаря своей пористой структуре и способности удерживать большое количество молекул зарекомендовали себя в качестве перспективной среды для закрепления ДНК-зондов, ограничивающим фактором является размер пор, который может затруднять диффузию крупных биомолекул [11].

Биочипы с ячейками из щеточных полимеров предлагают новый подход к созданию платформ для анализа ДНК. Щеточные полимеры представляют собой трехмерные структуры, состоящие из гибких полимерных цепей, ковалентно закрепленных одним концом на поверхности с высокой плотностью покрытия [12]. Такие структуры формируются преимущественно методом УФ-полимеризации, который заключается в инициировании роста полимерных цепей непосредственно с функционализированной поверхности. Такой подход обеспечивает их равномерное распределение и высокую концентрацию функциональных групп [13]. Благодаря своей гибкости и пространственной организации, щеточные полимеры создают оптимальную среду для иммобилизации биомолекул, минимизируя пространственные препятствия и обеспечивая их доступность для исследуемых молекул [14, 15].

Цель данной работы – исследование доступности ДНК зондов в гибридизационном анализе на биочипах с ячейками из щеточных полимеров на основе акриловой кислоты и акриламида и трехмерных перекрестно-сшитых ячеек на основе акриламида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе сравнивали кинетику гибридизации ДНК на биочипах с ячейками из щеточных полимеров и с ячейками из перекрестно-сшитого полиакриламида. Основное различие между этими типами биочипов заключается в структуре микроячеек (рис. 1). Щеточные полимеры закреплены на поверхности с помощью одного конца цепи, при этом боковые цепи остаются свободными и не соединены между собой. Такая структура делает систему гибкой и динамичной, что позволяет полимерным цепям активно взаимодействовать с биомолекулами. В отличие от щеточных полимеров, перекрестно-сшитые полимеры образуют прочную трехмерную сеть, где полимерные цепи связаны не только с поверхностью, но и между собой. Это придает матрице жесткость и устойчивость.

Ячейки из щеточных полимеров получали на полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложке, покрытой фотоактивным полимером, методом фотоинициируемой радикальной полимеризации от поверхности. Подбор оптимальной концентрации и соотношения мономеров акриловой кислоты и акриламида описан в работе [16]. Иммобилизация олигонуклеотидов в ячейки из щеточных полимеров включала предварительную активацию карбоксильных групп. Активация карбоксильных групп с использованием EDC и сульфо-NHS была выбрана благодаря высокой эффективности метода [17].

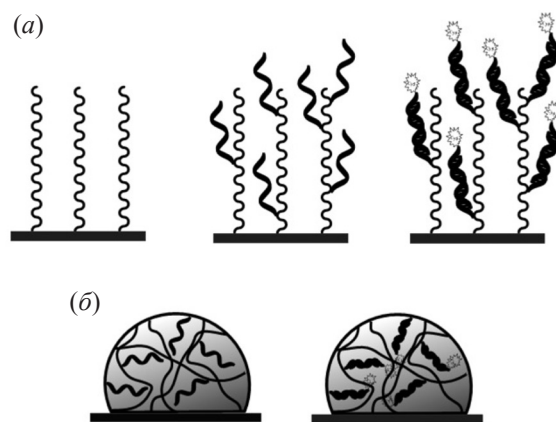


Рис. 1. (а) – Схематичное представление гибридизации ДНК в ячейке из щеточных полимеров; (б) – схематичное представление гибридизации ДНК в перекрестно-сшитой гидрогелевой ячейке.

Акриламидные ячейки получали на полибутилентерефталатной подложке в одну стадию. Процесс полимеризации раствора осуществляли под воздействием УФ-излучения (312 нм) для образования перекрестно-сшитой структуры геля, подробная методика описана в работе [16].

Для проведения исследования кинетики гибридизации в ячейках из щеточных полимеров выбрали пару ДНК-зондов, представленную в четырех различных модификациях, с однонуклеотидной мутацией (табл. 1). Эти модификации включали следующие олигонуклеотиды: 270, 271 с аминогруппой (NH_2) на 5'-конце и красителем Cu3 на 3'-конце; 53, 54 с NH_2 -группой на 5'-конце и свободным 3'-концом; 824, 825 с дополнительным линкером C18, NH_2 на 5'-конце и красителем Cu3 на 3'-конце; 264, 265 с линкером C18, NH_2 на 5'-конце и свободным 3'-концом.

Для проведения исследования кинетики гибридизации в перекрестно-сшитых акриламидных ячейках использовали олигонуклеотиды 53, 54 с аминогруппой на 5'-конце и свободным 3'-концом [18].

Интенсивность флуоресцентных сигналов ячеек с иммобилизованными зондами измеряли методом цифровой флуоресцентной микроскопии на канале красителя Cu3 (рис. 2). Интенсивность сигналов по ДНК-зондам с линкером была соизмерима с интенсивностью сигналов по ДНК-зондам без линкера, что свидетельствовало о равномерной ковалентной иммобилизации ДНК-зондов. Флуоресцентные сигналы по олигонуклеотидам без флуоресцентной метки соизмеримы с сигналами в пустых ячейках.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов для иммобилизации в ячейках биочипов

№	Последовательность зонда (5'–3')
270	NH_2 -CTGACTCCGCTGTTCG-Cu3
271	NH_2 -CTGACTCCACTGTTCGG-Cu3
53	NH_2 -CTGACTCCGCTGTTCG
54	NH_2 -CTGACTCCACTGTTCGG
824	NH_2 -Sp-CTGACTCCGCTGTTCG-Cu3
825	NH_2 -Sp-CTGACTCCACTGTTCGG-Cu3
264	NH_2 -Sp-CTGACTCCGCTGTTCG
265	NH_2 -Sp-CTGACTCCACTGTTCGG

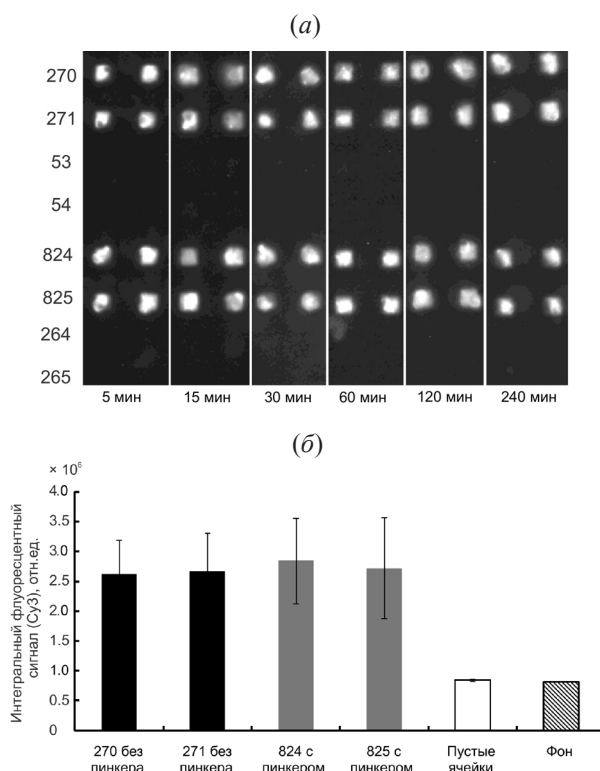


Рис. 2. (а) – Флуоресцентные снимки по ячейкам из щеточных ячеек на канале Cu3 после иммобилизации олигонуклеотидов; (б) – гистограмма интенсивности флуоресцентных сигналов после иммобилизации олигонуклеотидов.

Гидрогелевые ячейки содержат иммобилизованные олигонуклеотиды, т.к. компоненты геля и ДНК-зонды были включены в раствор для полимеризации.

ДНК-мишень для гибридизации была наработана с использованием метода асимметричной ПЦР, при которой избыток одного из праймеров способствует преимущественной амплификации одной из цепей ДНК, что значительно облегчает гибридизацию с одноцепочечными зондами и повышает эффективность гибридизации [19]. Полученная ДНК-мишень представляла собой последовательность длиной 124 п.н., соответствующую участку 7-го экзона гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3).

Оценку кинетики специфического образования дуплексов ДНК на биочипах проводили методом флуоресцентной микроскопии на канале Cu5 . Для каждого временного интервала применяли отдельные чипы, что обусловлено высокой флуоресценцией раствора, препятствующей точной регистрации сигнала под слоем амплификата.

После гибридизации на биочипах с ячейками из щеточных полимеров наблюдали слабые флуоресцентные сигналы по ДНК-зондам с меткой Cy5 на 3'-конце (рис. 3). Это свидетельствует о том, что наличие метки на 3'-конце олигонуклеотидов может препятствовать образованию двухцепочечного комплекса с мишенью, вероятно, из-за пространственного влияния флуоресцентной группы, которое ограничивает доступность ДНК-зонда для взаимодействия с целевой ДНК. По этой причине гибридизацию в щеточных ячейках оценивали по ДНК-зондам со свободным 3'-концом. ДНК-зонды в ячейках биочипа наносили в двух повторах, поэтому для расчетов использовали среднеарифметическое значение флуоресцентного сигнала. Дискриминационное отношение вычисляли как соотношение значения флуоресцентного сигнала по совершенному дуплексу к значению флуоресцентного сигнала по несовершенному дуплексу.

На биочипах с ячейками из щеточных полимеров интегральная интенсивность флуоресцентного сигнала достигла 90% насыщения за 2 ч, а дискриминационное отношение составило 4.71 без линкера и 5.16 с линкером. Это свидетельствует о дополнительном эффекте линкеров, которые обеспечивают большую гибкость и пространственную доступность для ДНК-зондов. На биочипах с ячейками из перекрестно-сшитых гидрогелевых матриц максимальное дискриминационное отношение составило 1.5, что указывает на более низкую эффективность взаимодействия. Интенсивность флуоресцентного сигнала на гидрогелевых чипах достигла 90% насыщения также за 2 ч, но была в 3.5 раза ниже, чем на чипах с ячейками из щеточных полимеров (рис. 3). Повышенная эффективность диффузии ДНК-мишени через щеточные полимеры может быть обусловлена высокой пространственной доступностью ДНК-зондов.

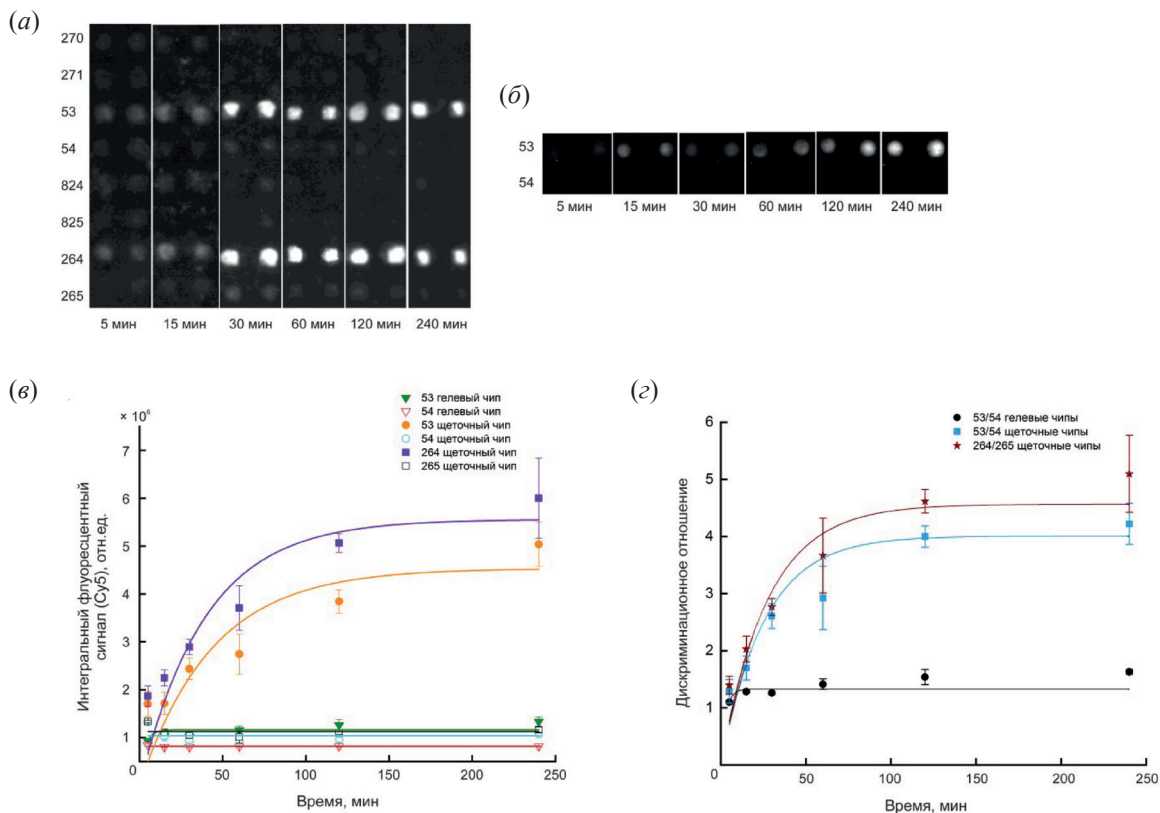


Рис. 3. (а) – Флуоресцентные снимки на канале Cy5 после гибридизации на биочипах с ячейками из щеточных полимеров; (б) – флуоресцентные снимки на канале Cy5 после гибридизации на биочипах с ячейками из перекрестно-сшитых полимеров; (в) – график зависимости интегральных флуоресцентных сигналов от времени гибридизации на биочипах с ячейками из щеточных полимеров и перекрестно-сшитых полимеров; (г) – график зависимости дискриминационного отношения от времени гибридизации на биочипах с ячейками из щеточных полимеров и перекрестно-сшитых полимеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе применяли следующие реагенты: пленки ПЭТ размером 25×75 мм, толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см^3 , молекулярная масса 20–40 кДа, водопоглощение до 0.7%); сополимер поли(этилен-со-пропилен-со-5-метилен-2-норборнен) (50%) (Sigma-Aldrich, США); моющее средство Ultrasonol, 7-Neutral (Carl Roth, Германия); акриловая кислота (Fluka, Германия); *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC) (Acros, Бельгия); *N*-гидроксисульфосукцинимид (Alfa Aesar, Германия); бензофенон (Acros, Бельгия); акрил-амид (Panreac, Испания); 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (Sigma, США); формамид (Acros, Бельгия); ацетон, формамид, *пара*-ксилол, метилэтилкетон, пентаоксид фосфора, дихлорметан, ацетонитрил (Химмед, Россия). Все олигонуклеотиды синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (Россия), последовательности представлены в табл. 1. Все растворители и исходные реагенты аналитического качества были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Получение щеточных ячеек из сополимера акриламида и акриловой кислоты. Ячейки из щеточных полимеров получали на поверхности полиэтилентерефталата методом фотоиницируемой радикальной полимеризации от поверхности на подложках из полиэтилентерефталата, покрытых фотоактивным полимером по методу [16].

Активация –COOH-групп в щеточных микроячейках. Для активации карбоксильных групп EDC с концентрацией 0.019 М и сульфохлорид NHS с концентрацией 0.009 М растворяли в 400 мкл 0.01 М MES-буфера. Раствор вносили в камеру биочипа, активацию проводили в течение 4 ч при 25°C. После окончания реакции пленки промывали MES-буфером. Подложки сушили 30 мин при 60°C и 24 ч в вакууме под P_2O_5 .

Иммобилизация олигонуклеотидов в щеточные микроячейки. Олигонуклеотиды в концентрации 1 нм/мкл растворяли в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 10% (v/v) формамида. Растворы олигонуклеотидов наносили с помощью робота пипетом QArray 2 (Genetix, Великобритания) на активированные микро-

ячейки. Подложки с нанесенными растворами инкубировали при повышенной влажности в течение 12 ч при 4°C, затем в течение 4 ч при 25°C. Пленки отмывали в растворе 0.05 М ТЕАНС с ацетонитрилом в соотношении 1 : 1 в течение 30 мин. Затем пленки инкубировали в водном растворе 0.1 М этаноламина в течение 1 ч для блокирования остаточных реакционноспособных групп.

Получение перекрестно-сшитых акрил-амидных ячеек. Полимеризационные растворы состояли из 4.75% метакриламида, 0.25% *N,N'*-метиленисакриламида, 50% глицерина, 5% *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина (TEMED), водных растворов олигонуклеотидов в концентрации 2 нм/мкл. Растворы геля наносили на подложки из полибутилентерефталата с помощью робота пипетом QArray 2 (Genetix, Великобритания). УФ-инициируемую полимеризацию растворов проводили по методу [10].

Гибридизация с ДНК на биочипах с ячейками из щеточных полимеров и с ячейками из перекрестно-сшитых полимеров. Для проведения гибридизационного анализа на биочипах получали последовательность участка гена *ABO* длиной 124 п.н. с помощью асимметричной ПЦР по методу [17]. Использовали прямой праймер: 5'-CCGGCGCTCGTAGGTGAA-3' и две модификации обратного праймера – без флуоресцентного красителя: 5'-GTGCGTGGACGTGGACATG-3' и с флуоресцентной меткой: 5'-Cy5-NH₂-GTGCGTGGACGTGGACATG-3'. Гибридизационный буфер состоял из 10 мкл формамида, 10 мкл 20× SSPE-буфера и 10 мкл реакционной смеси после проведения ПЦР и определения наличия целевого продукта. Раствор вносили в камеру биочипа и проводили гибридизацию в течение 5, 15, 30, 60, 120 и 240 мин. По окончании гибридизации биочипы промывали в 6× SSPE-буфере и высушивали потоком воздуха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены биочипы с двумя типами ячеек: из щеточных полимеров на основе акриламида и акриловой кислоты, а также ячеек из трехмерных перекрестно-сшитых полимеров на основе акриламида. Проведен сравнительный анализ их эффективности в гибридизационном взаимодействии с ДНК-мишенью, полученной методом асим-

метричной ПЦР. Установлено, что достижение гибридизационного сигнала до 90% от насыщения происходило за одинаковое время в обоих типах ячеек, при этом в ячейках из щеточных полимеров полимеров наблюдали более высокую интенсивность флуоресцентных сигналов и большее отношение сигналов совершенных дуплексов к несовершенным.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования щеточных биочипов в анализе ДНК благодаря их высокой чувствительности и специфичности. Эти данные могут найти применение в разработке более эффективных систем для генетической диагностики и исследований в области молекулярной биологии.

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 – АВЧ, ТВН, АЮИ; экспериментальные работы – РАМ, АЮИ, САС; написание статьи – РАМ, ОАЗ, АВЧ; анализ данных – ВАВ, ГФС, ИЮШ; администрирование проекта – 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. Donatin E., Drancourt M. // *Méd. Maladies Infect.* 2012. V. 42. P. 453–459.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.07.017>
2. Иконникова А.Ю., Яценко Ю.Е., Кременецкая О.С., Виноградова О.Ю., Фесенко Д.О., Абрамов И.С., Овсепян В.А., Наседкина Т.В. // *Мол. биология.* 2016. Т. 50. С. 474–479.
<https://doi.org/10.7868/S0026898416020087>
3. Baum M., Bielau S., Rittner N., Schmid K., Eggelbusch K., Dahms M., Schlauersbach A., Tahedl H., Beier M., Guimil R., Scheffer M., Hermann C., Funk J.-M., Wixmerten A., Rebscher H., Honig M., Andreae C., Buchner D., Moschel E., Glathe A., Jager E., Thom M., Greil A., Bestvater F., Obermeier F., Burgmaier J., Thome K., Weichert S., Hein S., Binnewies T., Foitzik V., Muller M., Stahler C.F., Stahler P.F. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. e151.
<https://doi.org/10.1093/nar/gng151>
4. Ravan H., Kashanian S., Sanadgol N., Badoei-Dalfard A., Karami Z. // *Anal. Biochem.* 2014. V. 444. P. 41–46.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.032>
5. Traeger J.C., Lamberty Z., Schwartz D.K. // *ACS Nano.* 2019. V. 13. P. 7850–7859.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b02157>
6. Sethi D., Gandhi R.P., Kumar P., Gupta K.C. // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4. P. 1513–1529.
<https://doi.org/10.1002/biot.200900162>
7. Miftakhov R.A., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Zolotov A.M., Vasiliskov V.A., Shershov V.E., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 1345–1347.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021060182>
8. Wu Y., Lai R.Y. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. P. 8888–8895.
<https://doi.org/10.1021/ac5027226>
9. Guschin D., Yershov G., Zaslavsky A., Gemmell A., Shick V., Proudnikov D., Arenkov P., Mirzabekov A. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 250. P. 203–211.
<https://doi.org/10.1006/abio.1997.2209>
10. Rubina A.Yu., 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>
11. Sandrin D., Wagner D., Sitta C.E., Thoma R., Felekyan S., Hermes H.E., Janiak C., de Sousa Amadeu N., Kühnemuth R., Löwen H., Egelhaaf S.U., Seidel C.A.M. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. V. 18. P. 12860–12876.
<https://doi.org/10.1039/C5CP07781H>
12. Olivier A., Meyer F., Raquez J.-M., Damman P., Dubois P. // *Progr. Polym. Sci.* 2012. V. 37. P. 157–181.
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.002>
13. Demirci S., Caykara T. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2013. V. 33. P. 111–120.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.015>

14. *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/S1068162024050339>
15. *Cimen D., Caykara T.* // Polym. Chem. 2015. V. 6. P. 6812–6818.
<https://doi.org/10.1039/C5PY00923E>
16. *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>
17. *Wang C., Yan Q., Liu H.-B., Zhou X.-H., Xiao S.-J.* // Langmuir. 2011. V. 27. P. 12058–12068.
<https://doi.org/10.1021/la202267p>
18. *Lapa S.A., Klochikhina E.S., Miftakhov R.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 1122–1125.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021050290>
19. *Wei Q., Liu S., Huang J., Mao X., Chu X., Wang Y., Qiu M. Y., Mao Y., Xie Y., Li Y.* // J. Biochem. Mol. Biol. 2004. V. 37. P. 439–444.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.4.439>

Comparison of DNA Analysis on Biochips with Brush Polymer Cells and Cross-Linked Polymer Cells

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

[#] Phone: + 7 (499) 135-98-00; e-mail: mr.miftahov20@yandex.ru

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

The regulation of substrate surface properties in biochip technology opens the possibility of optimizing platforms for efficient biomolecule recognition. The research is aimed at exploring the use of brush polymers to improve the sensitivity and speed of DNA analysis on biochips. Brush polymer cells for biochips were prepared by UV-initiated polymerization of monomers from the surface on polyethylene terephthalate substrates. Cross-linked hydrogel polymer cells for biochips were prepared on polybutylene terephthalate substrates by copolymerization of gel components with DNA probes. The probes in brush polymer cells were immobilized through activated carboxyl groups. A single-stranded DNA target with a length of 124 nucleotides corresponding to the 7th exon of the human ABO gene was used for hybridization analysis. Hybridization of the DNA target was studied on biochips with cells made of brush polymers and cross-linked polyacrylamide hydrogels. The results of hybridization analysis on biochips were evaluated by digital fluorescence microscopy. Higher intensity of fluorescence signals and higher ratio of signals of cells with perfect duplexes to those of cells with imperfect duplexes were observed in cells from brush polymers compared to cells from 3D cross-linked polymers. Achievement of hybridization signal up to 90% of saturation occurred in the same time in both cell types. The relevance of this work stems from the need for highly accurate and efficient diagnostic methods to analyze biomolecules with minimal time and reagent consumption. The development of biochips based on brush polymers will increase the accuracy and sensitivity of molecular studies, which is especially important for early diagnosis of diseases.

Keywords: *biochips, hybridization analysis, DNA, hydrogel cells, brush polymer cells*