

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.2:577.113.4

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ НА АЛЮМИНИЕВОЙ ПОДЛОЖКЕ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. И. Ю. Шишкин^а, Г. Ф. Штылев^а, В. Е. Барский^а, С. А. Лапа^а,
О. А. Заседателева^а, В. Е. Кузнецова^а, В. Е. Шершов^а,
В. А. Василисков^а, С. А. Поляков^а, А. С. Заседателев^а, А. В. Чудинов^а. *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: chud@immb.ru

Поступила в редакцию 29.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

Представлен способ изготовления биологических микрочипов на алюминиевой подложке с гидрофильными ячейками из щеточных сополимеров с формированием матрицы ячеек методом фотолитографии. Поверхность алюминиевых подложек предварительно покрывали тонким, прочным, умеренно гидрофобным слоем перекрестно-сшитого полимера для исключения контакта с поверхностью алюминия компонентов, используемых при анализе нуклеиновых кислот. Алюминиевые подложки биочипов обладают высокой теплопроводностью и малой теплоемкостью, что актуально для мультиплексного ПЦР-анализа на чипе. В ячейках биочипа ковалентно иммобилизовали олигонуклеотидные зонды. Сохранение гибридизационной активности иммобилизованных ДНК-зондов показано в гибридизационном анализе с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека. Представленные методы могут использоваться при разработке технологии параллельного множественного экспресс-микрoанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека

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

DOI: 10.31857/S0026898424030114, EDN: JCDIJI

ВВЕДЕНИЕ

Анализ нуклеиновых кислот, занимающий важное место в клинико-диагностических исследованиях, включает как прямое определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК методом секвенирования, так и методы, основанные на взаимодействии исследуемой молекулы ДНК с другими молекулами ДНК с заданными характеристиками.

Анализ связывания нуклеиновых кислот с матрицей иммобилизованных на твердой подложке ДНК-зондов был предложен одновременно несколькими исследовательскими группами, в том числе и группой российских ученых под руководством А.Д. Мирзабекова, и получил название метода биочипов [1], или “microarray” в англоязычном варианте. Амплификация минимального количества анализируемого генетического материала методом ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием, последующий гибридизационный анализ продуктов ПЦР на микроматрицах олигонуклеотидных зондов и микроскопическая флуоресцентная цифровая регистрация результатов гибридизационного анализа стали мощным

инструментом молекулярной биологии и медицины [2, 3]. Предварительная амплификация ДНК в отдельной пробирке с последующим гибридизационным анализом на биочипе потенциально опасны перекрестной контаминацией, что осложняет выполнение анализа и препятствует широкому практическому использованию метода. Ведутся активные исследования и разработки в области аналитических систем на основе микрочипов, связанные с переводом методологии ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени, в формат микрочипов. Поиску решений для реализации мультиплексной ПЦР на биочипе посвящен ряд публикаций [4–7].

Ранее нами был продемонстрирован вариант твердофазной ПЦР с праймерами, иммобилизованными в ячейках биочипа с регистрацией результатов удлинения праймеров (primer extension) по встраиванию флуоресцентно меченных нуклеотидов [8–10].

Иммобилизация праймеров в перекрестно-сшитых гидрогелевых ячейках затрудняет диффузию ДНК-полимеразы и анализируемой ДНК-мишени к иммобилизованным праймерам. Низкая теплопроводность стеклянной подложки ограничивает

использование мультиплексной ПЦР, проводимой в гидрогелевых ячейках на предметном стекле.

Для эффективной амплификации ДНК подложка чипа должна обладать высокой теплопроводностью и малой теплоемкостью. Чувствительность и специфичность ПЦР на чипе зависят от концентрации праймеров, иммобилизованных в ячейках чипа, сохранности их свойств и пространственной доступности для взаимодействия с компонентами реакционной ПЦР-смеси. При этом иммобилизованные олигонуклеотиды должны быть устойчивы в кипящей воде и не утрачивать гибридационную активность.

В настоящей работе описывается изготовление бичипов с ячейками из гидрофильных щеточных полимеров, закрепленных одним концом на поверхности подложки. Ячейки из щеточных полимеров получали фотоиндуцированной радикальной полимеризацией “от поверхности” подложки при УФ-облучении через фотомаску методом фотолитографии. Подложкой служит алюминиевая фольга с поверхностью, герметизированной прочным полимерным покрытием. В ячейках биочипа ковалентно иммобилизовали олигонуклеотидные зонды. Работоспособность биочипа показана в гибридационном анализе с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали фольгу из алюминиевого сплава марки АД (ГОСТ 618–2014) толщиной 100 мкм с неполированной поверхностью (Россия). Содержание алюминия в сплаве не менее 99.45%. Лист фольги нарезали на части размером 25 × 75 мм и использовали поштучно.

Поливинилацетат (ПВАц) марки М=100, ТУ 2215-001-98514529-2007, Россия. Моющее средство Ultrasonol, 11-Alkalisch (“Carl Roth” Art. 5354.1, Германия). 20 × SSPE-буфер (“Sigma” Art. S2015, США). ТЕ-буфер рН 8.0 (“Thermo Fisher Scientific”, Art. AM9849, США).

Все растворители и исходные реагенты аналитического качества получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Оборудование. Ультразвуковая баня Elmasonic S30 (Германия), мульти-ротатор Multi Bio RS-24 (“Biosan”, Латвия), сушильный шкаф СНОЛ-3 (“ТерМИКС”, Россия), шейкер с нагревом Heating thermoshaker MHR13 (“Hettich”, Германия), робот-манипулятор QArray (“Genetix”, Великобритания), микроскоп Levenhuk Discovery Artisan 32 (Россия), аспиратор FTA-1 (“Biosan”).

Двухканальный портативный анализатор флуоресцентного изображения [11]: канал флуоресценции

красителя Су5 с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 690 ± 40 нм (“Semrock”, США); канал флуоресценции красителя Су3 с лазерным возбуждением при 535 нм, запирающим фильтром 580 ± 27 нм (“Semrock”) и цифровой ПЗС камерой (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

Флуоресцентные изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare “БИОЧИП-ИМБ”.

Подготовка поверхности алюминиевых подложек. Поверхность подложки для удаления возможных загрязнений последовательно промывали: ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин (1); струей деионизированной воды в течение 1 мин (2); 2%-ным раствором моющего средства в деионизированной воде в течение 1 ч (3); промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин (4); ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин (5). Подготовленные подложки сушили на открытом воздухе в течение 30 мин и хранили в эксикаторе до использования.

Модификация поверхности алюминиевых подложек 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС). Поверхности алюминиевых подложек поштучно обрабатывали в закрытой пробирке из полипропилена, содержащей 40 мл раствора АПТЭС. Предварительно вымытые подложки погружали в 16%-ный (об/об) раствор АПТЭС в толуоле и выдерживали в течение 16 ч при комнатной температуре. Затем подложки промывали толуолом в ультразвуковой бане в течение 10 мин, ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин, сушили на открытом воздухе в течение 30 мин, хранили в эксикаторе до использования.

Активный флуоресцентный краситель. Краситель Су5, его активное производное, пара-нитрофениловый эфир красителя Су5-рNP, и аминоксодержащий краситель Су5-NH₂ синтезировали согласно [12].

Флуоресцентное маркирование аминокрупп на алюминиевой подложке по связыванию с красителем Су5. Наличие активных групп на подложке проверяли, используя окрашивание красителем Су5. С этой целью на подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл с площадью подложки в камере 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора активированного красителя Су5-рNP с концентрацией 1 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде (DMSO) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды, 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мм триэтиламмонийгидрокарбонате (рН 7.5) в ультразвуковой бане (10 мин), струей деионизированной воды, сушили струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в холодильнике при 5°C до использования.

Приготовление растворов поливинилацетата.

В пробирку с раствором бензофенона в метилэтилкетоне добавляли ПВАц М-100, пробирку закрывали и помещали в мультиротатор. Смесь перемешивали при 30–40 об/мин в течение 3 ч при комнатной температуре. Все работы с бензофеноном проводили с защитой от прямого солнечного света. Хранили при комнатной температуре.

Первое полимерное покрытие поверхности подложки. Подложки с аминированной поверхностью (Al-NH₂) покрывали раствором 2%-ного ПВАц и 1%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении (2400 об/мин, 2 мин) и сушили на воздухе в течение 1 ч. Для покрытия поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги с дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращался в закрытом кожухе. Полимерное покрытие закрепляли прогревом при 100°C в сушильном шкафу в течение 1 ч, затем облучали УФ-светом с $\lambda = 254$ нм в течение 1 ч. Облучение проводили бактерицидными лампами Philips TUV TL-D15W SLV с максимумом излучения 254 нм. Расстояние от колбы лампы до подложки 5 см. Получали алюминиевую подложку с поливинилацетатным покрытием (Al-ПВАц).

Модификация поверхности алюминиевой подложки, получение ячеек из щеточных полимеров. Подложку с Al-ПВАц покрывали вторым слоем раствора 1%-ного ПВАц и 0.5%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении со скоростью 2400 об/мин в течение 2 мин, сушили на открытом воздухе в течение 10 мин. Затем подложку помещали горизонтально в держатель, сверху на рабочую область помещали рамку, вырезанную из тетрафторэтилена толщиной 10 мкм, внутрь рамки вносили раствор акриловой кислоты и акриламида в деионизированной воде, сверху накладывали фотомаску и плотно зажимали в держателе. Рамка из тетрафторэтилена является кольцевым спейсером, определяющим расстояние от подложки до фотомаски, и формирует камеру высотой 10 мкм. Количество раствора, вносимого внутрь рамки, и накрывание сверху фотомаской обеспечивают отсутствие пузырей воздуха в камере. Фотомаска накладывается рабочей поверхностью вниз, чтобы препятствовать абберрации света при облучении. Фотомаска изготовлена на кварцевом стекле размером 25 × 75 мм и толщиной 1 мм со светонепроницаемым хромовым покрытием с прозрачными квадратными ячейками размером 200 × 200 мкм с шагом 600 мкм.

Камеру с раствором мономеров через фотомаску облучали УФ-светом с помощью осветителя ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой ДРК-120 в течение 10 мин. Расстояние от осветителя до фотомаски составляло 10 см. После окончания облучения камеру разбирали, подложки поочередно

промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин, промывали на шейкере при комнатной температуре ацетоном в течение 10 мин и при 65°C деионизированной водой в течение 3 ч. Сушили струей воздуха при комнатной температуре.

Активация карбоксильных групп ячеек со щеточными полимерами. На подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Готовили активирующий раствор N-гидроксисукцинимид (0.1 М) и EDC [1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодимид-гидрохлорид] (0.2 М) в 0.1 М буферном растворе MES [(2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота)] pH 5.0 при охлаждении на льду. В камеру вносили 35 мкл свежеприготовленного активирующего раствора. Реакцию вели в термостате при 37°C в течение 5 ч. После окончания реакции камеру разбирали, подложки промывали струей буфера MES pH 5.0, затем фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) pH 7.2, содержащим 1% Твин 20, в течение 10 мин. Подложки сушили струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в холодильнике при температуре 5°C до использования.

Флуоресцентное маркирование карбоксильных групп в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке красителем Cy5. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Площадь разборной камеры ограничивает только часть площади матрицы полученных ранее ячеек. Камеру позиционировали на подложке с неизменными заданными координатами относительно границ подложки с помощью держателя. В камеру вносили 35 мкл раствора аминоксодержащего красителя Cy5-NH₂ с концентрацией 1 нмоль/мкл и DIPEA с концентрацией 60 нмоль/мкл в DMSO и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды, 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мМ триэтиламмонийгидрокарбонате (pH 7.5) на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре, струей деионизированной воды, сушили струей воздуха при комнатной температуре.

Синтез ДНК-зондов и синтетической ДНК-мишени. В качестве модели использовали синтетическую ДНК-мишень, соответствующую участку последовательности экзона 7 гена *ABO* человека (GenBank: NM_020469.3), который детерминирует серологический фенотип группы крови *ABO*. ДНК-зонды и синтетическую ДНК-мишень синтезировали по стандартной фосфорамидитной технологии с реагентами “Glen Research” (США) и последующей очисткой ВЭЖХ. Зонды № 268 (5'-NH₂-GCG ACC ACG TGG GC-Cy3-3') и № 269 (5'-NH₂-GCG ACC ATG TGG GC-Cy3-3') содержали на 5'-конце

С6-аминомодификатор, а на 3'-конце краситель Су3. Синтетическая модельная ДНК-мишень № 273: (5'-GCC CAC GTG GTC GC—Су5—3') содержала на 3'-конце краситель Су5. ДНК-мишень № 273 образует совершенный дуплекс с зондом № 268, а с зондом № 269 несовершенный, с заменой одного нуклеотида (подчеркнуты). Структура красителя Су3 и его активного производного Су3-pNP представлена на рис. 2.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов, маркированных красителем Су3, в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке (рис. 5з). Растворы ДНК-зондов с С6-аминомодификатором на 5'-конце с концентрацией 1 нмоль/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (рН 9.0), содержащем 10% формамида и 5% глицерина, наносили роботом-манипулятором с иглой диаметром 200 мкм в ячейки с активированными карбоксильными группами 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. Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1/7. После окончания реакции подложки промывали струей деионизированной воды, дистиллированной водой, промывали в 50%-ным ацетонитрилом в 0.05 М триэтиламонийгидрокарбонате (рН 8.0) в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 300 об/мин 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.

Гибридизация ДНК-мишени в ячейках из щеточных полимеров (рис. 5д). На подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Готовили раствор ДНК-мишени в буфере SSPE с формамидом. Состав гибридизационного раствора: синтетическая ДНК-мишень 2 пмоль/мкл — 2 мкл; формамид 10 мкл; 20 × SSPE — 12 мкл; MgCl₂ 50 мМ — 0.8 мкл; вода без нуклеаз — 15.2 мкл. В камеру вносили 35 мкл раствора ДНК-мишени в гибридизационном растворе. Гибридизацию проводили в течение 16 ч при 37°C. После окончания реакции раствор удаляли аспиратором, в камеру вносили, а затем удаляли аспиратором 6 × SSPE (3 раза по 35 мкл). Камеру разбирали, подложку промывали 6 × SSPE, сушили струей воздуха при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы сообщали о разработке биочипа с ячейками из щеточных полимеров на подложке из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ).

Ячейки получали фотоиницируемой радикальной полимеризацией с переносом атомов, идущей “от поверхности” подложки. Для анализа ДНК методом гибридизации с иммобилизованными в ячейках ДНК-зондами вполне подходят подложки из ПЭТ [14]. Полимерные подложки, в том числе и из ПЭТ, плохо подходят для проведения мультиплексной ПЦР на чипе. Полимерные материалы обладают низкой теплопроводностью и высокой теплоемкостью, что ограничивает скорость термоциклирования и может приводить к неравномерному распределению температур в камере чипа с матрицей ячеек на подложке и, соответственно, будет негативно влиять на результаты ПЦР.

Для ПЦР на чипе хорошо подходят подложки из кремния [15]. Кремний обладает высокой теплопроводностью и низкой теплоемкостью. Получение якорных групп для иммобилизации молекулярных зондов на кремниевых подложках хорошо отработано. Но кремний дорог для одноразового использования, а многократное использование чипов в ПЦР-приложениях осложняется возможной перекрестной контаминацией.

Металлические подложки, прежде всего из алюминия, хорошо подходят по параметрам высокой теплопроводности и низкой теплоемкости. У алюминия теплопроводность даже выше, чем у кремния, а теплоемкость лишь незначительно уступает кремнию.

Но при контакте с алюминиевой поверхностью компоненты ПЦР сорбируются, ДНК начинает разлагаться, а полимеразы дезактивируются. Поверхность алюминиевой подложки, на которой будет проводиться анализ ДНК, нужно герметизировать, чтобы исключить контакт компонентов ПЦР с алюминиевой поверхностью. Поверхность нужно покрыть тонкой герметичной полимерной пленкой. Полимерные материалы не сорбируют и не разлагают компоненты ПЦР, не ингибируют полимеразы. Полимерные покрытия толщиной в несколько сотен нанометров не влияют на теплоемкость и теплопроводность алюминиевой подложки.

Для прочного связывания с полимерным покрытием на поверхность алюминия нужно привить якорные химические группы. Поверхность алюминия в атмосферных условиях всегда покрыта оксидом алюминия. Оксид алюминия — это неорганический полимер, в котором атомы алюминия соединены кислородными мостиками, и имеются гидроксильные группы, связанные с атомами алюминия. Химические свойства гидроксильных групп оксида алюминия на поверхности металлического алюминия близки свойствам на поверхности стекла. Поэтому, используя химические методы модификации поверхности силикатных материалов, можно получить на поверхности алюминия якорные группы для дальнейшей модификации подложки. Модификация поверхности кремния, кварца, стекла, полисилоксанов реакцией с АПТЕС

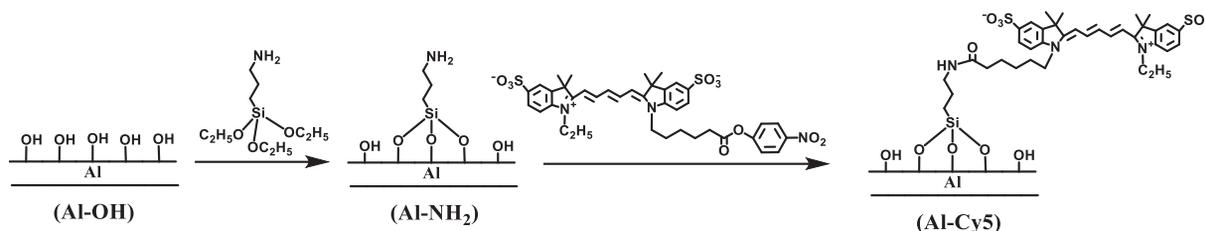


Рис. 1. Схема аминирования и флуоресцентного маркирования поверхности алюминиевой подложки.

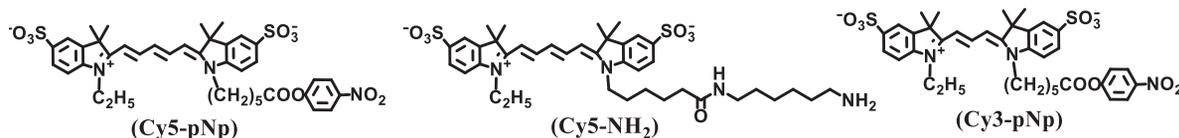


Рис. 2. Структуры флуоресцентных красителей Cy5-pNP, Cy5-NH₂ и Cy3-pNP.

является ключевой стартовой реакцией для последующей функционализации этих материалов. Эту же реакцию используют и для модификации оксида алюминия на поверхности металлического алюминия. Так, для увеличения реактивности оксида алюминия поверхность алюминия обрабатывали кислородной плазмой [16], а также предварительно электрохимически анодировали, а затем прививали аминогруппы реакцией с АПТЕС [17].

В нашей работе стояла задача получения на поверхности якорных аминогрупп для связывания с массивом полимерного покрытия, высокая плотность аминогрупп при этом не обязательна. На поверхности алюминиевой подложки свежий оксид алюминия с гидроксильными группами получали методом травления водным слабощелочным

(pH 11) раствором моющего средства. В результате получали алюминиевые подложки с легким матовым налетом оксида алюминия (рис. 1 (Al-OH)). Затем подложки обрабатывали раствором АПТЕС в толуоле методом погружения в раствор. Получали подложки с аминированной поверхностью, рис. 1 (Al-NH₂).

Наличие привитых аминогрупп, их концентрацию и распределение по поверхности алюминиевой подложки анализировали по связыванию с активным пара-нитрофениловым эфиром индикаторного красителя Cy5-pNP (рис. 1). Структура красителя представлена на рис. 2.

Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной

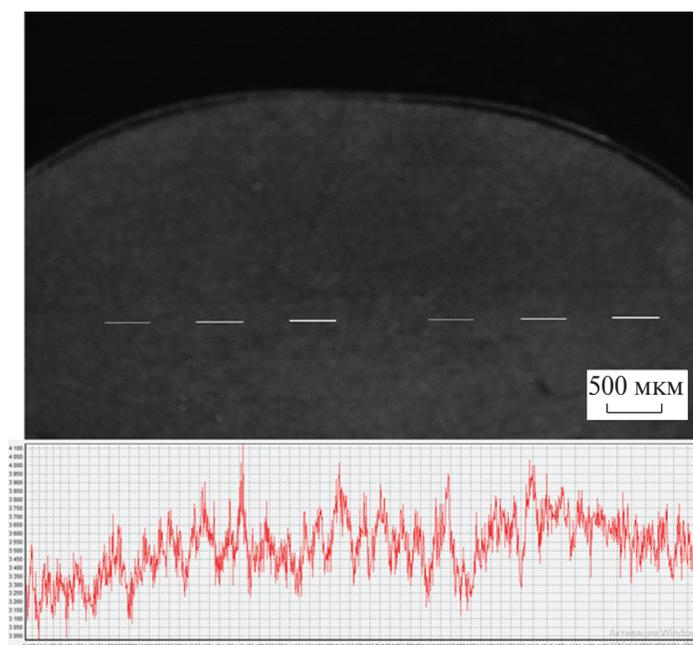


Рис. 3. Микрофотография алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 при выдержке 100 мс после модификации поверхности 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС) и маркирования флуоресцентным красителем Cy5. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении.

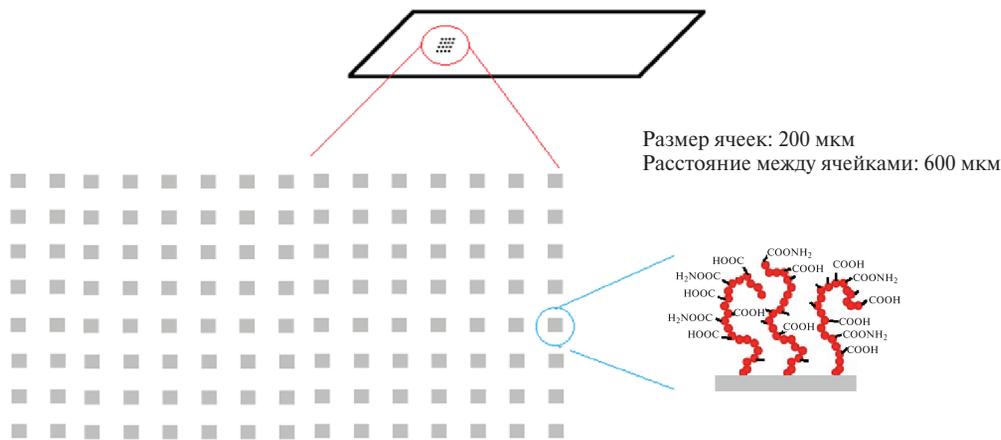


Рис. 4. Схема расположения ячеек на подложке биочипа после УФ-полимеризации через фотомаску.

микроскопии с регистрацией интенсивности сигналов в свете флуоресценции красителя Су5. Флуоресцентная картина представлена на рис. 3.

Для количественной оценки концентрации молекул красителя, связавшихся с поверхностью подложки, был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими краситель Су5 с пошаговой убывающей концентрацией молекул красителя на единицу поверхности. Измерения интенсивности флуоресценции подложек с ячейками, содержащими известную концентрацию красителя на единицу поверхности, показали, что флуоресцентный сигнал в 10000 относительных единиц (о.е.) при выдержке 100 мс соответствует концентрации Су5 8.44 пмоль/см².

Флуоресцентные сигналы при выдержке 100 мс вдоль проведенной линии на рис. 3 колеблются от 3000 до 4300 о.е. С учетом темнового тока, сорбции красителя на поверхности и нулевой линии детектора изображения вычисленная концентрация красителя на поверхности алюминиевой подложки колеблется от 2.3 пмоль/см² в центре до 1.2 пмоль/см² по краям зоны регистрации при среднем значении 1.85 пмоль/см². Снижение интенсивности флуоресценции по краям зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Молекулы красителя связываются с химически доступными аминогруппами в стехиометрическом соотношении 1 : 1. Концентрацию аминогрупп на поверхности алюминиевой подложки принимали равной концентрации красителя, связавшегося с аминогруппами. Погрешность, связанную с концентрационным тушением флуоресценции красителя, в данном случае не учитывали.

Влияние концентрации АПТЕС на концентрацию аминогрупп на поверхности алюминиевой подложки. При постоянном времени реакции АПТЕС с алюминиевой подложкой, равном 16 ч, концентрация аминогрупп на поверхности алюминия увеличивается с пошаговым увеличением концентрации

АПТЕС и достигает максимального значения 2.3 пмоль/см² в присутствии 16% АПТЕС. Дальнейшее пошаговое увеличение концентрации АПТЕС вплоть до 32% не приводит к изменению содержания аминогрупп на поверхности алюминия.

Полимерное покрытие. Полимерное покрытие поверхности подложки должно быть плотным и водонепроницаемым, прочно держаться на алюминиевой поверхности со слоем оксида алюминия. При этом химические свойства покрытия должны позволять ковалентную иммобилизацию ДНК-зондов. Описаны методы покрытия поверхности квантовых точек, магнитных частиц и других наночастиц гидрофильными полимерами для придания им биосовместимости и устойчивости в коллоидном состоянии [19]. Гидрофильные покрытия не обеспечивают герметизацию покрываемой поверхности.

Мы использовали покрытие из умеренно гидрофобного водонерастворимого полимера, ПВАц. Бензофенон использовали в качестве фотоинициатора радикальной полимеризации мономеров и реагента, сшивающего полимерные макромолекулы ПВАц в трехмерную сетку при УФ-облучении [20, 21].

Покрытие делали двухслойным, первый слой предназначен для герметизации поверхности алюминия, второй — для прививки к поверхности щеточных полимеров.

Для первого слоя поверхность подложек покрывали тонким ровным слоем раствора, содержащим 2% ПВАц и 1% бензофенона в метилэтилкетоне, методом “покрытия при вращении” (spin coating). После испарения растворителя на поверхности подложки остается тонкий слой ПВАц. Полимерное покрытие закрепляли на подложке прогреванием с последующим УФ-облучением. При УФ-облучении “массива” ПВАц происходит перекрестное сшивание молекул ПВАц в трехмерную сетку и связывание с аминогруппами на поверхности подложки. Получали подложки с покрытием,

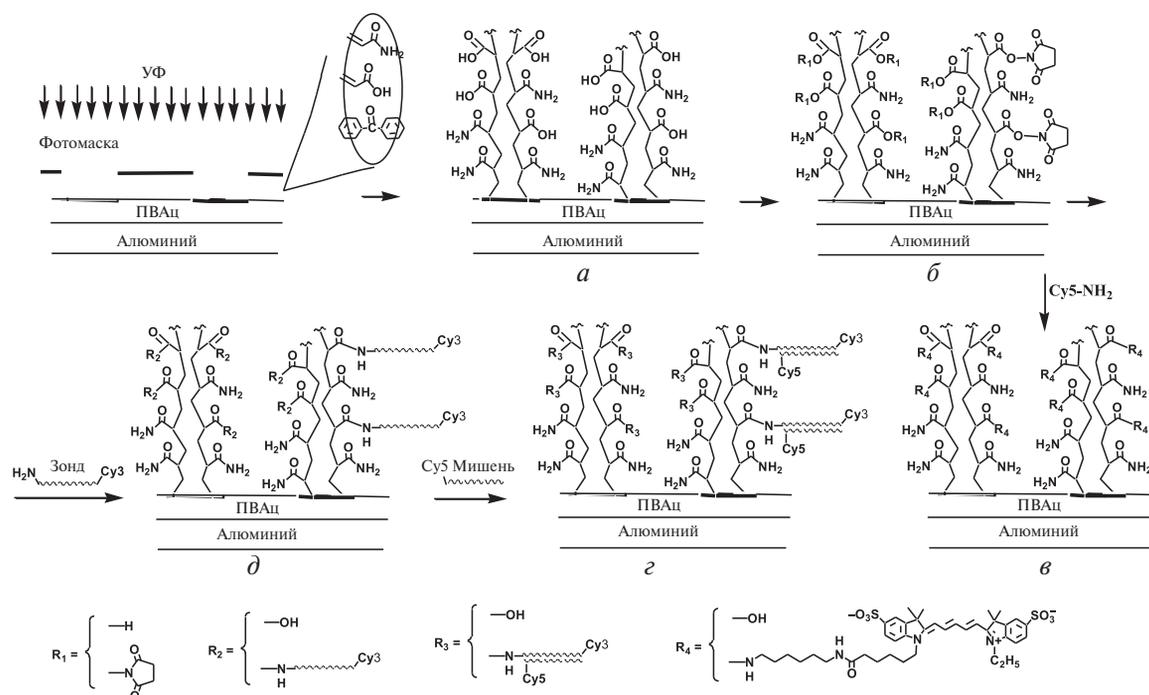


Рис. 5. Схема получения ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки (а), активации карбоксильных групп (б), флуоресцентного маркирования карбоксильных групп (в), иммобилизации олигонуклеотидных зондов (г) и гибридизации с ДНК-мишенью (д).

которое не растворяется в органических растворителях, не отслаивается в воде при 100°C и практически не флуоресцирует в оптическом диапазоне красителей Cy3 и Cy5.

Получение на алюминиевой подложке ячеек из щеточных полимеров. Для получения второго слоя поверхность подложек покрывали тонким слоем раствора, содержащего 1% ПВАц и 0.5% бензофенона в метилэтилкетоне, методом покрытия при вращении. Второй слой сушили только на воздухе. Назначение второго покрытия – прививка щеточных полимеров [22]. Подложки с двухслойным нанесением ПВАц использовали для получения ячеек из щеточных полимеров методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации “от поверхности” подложки.

В нашей работе для получения ячеек из щеточных полимеров на подложке с помощью кольцевого спейсера и крышки формировали реакционную камеру. Крышкой в данном случае была поверхность фотомаски. В камеру вносили раствор акриловой кислоты и акриламида в деионизированной воде. Облучали УФ-светом через фотомаску в течение 10 мин. После отмывки от несвязавшихся компонентов получали матрицу ячеек из щеточных полимеров (рис. 4, 5а).

При микроскопическом контроле на поверхности подложки в отраженном видимом свете видны светлые ячейки на темном фоне (рис. 6). При смачивании подложки водой с последующим удалением капель воды центрифугированием видно, что на

гидрофобной подложке находятся гидрофильные ячейки одинакового размера с четко очерченными краями с координатами, соответствующими ячейкам фотомаски.

Полимерное покрытие и ячейки не растворяются и не отслаиваются от подложки при нагревании в деионизированной воде и в ТЕ (Трис-EDTA)-буфере (pH 8.0, 95°C) в течение 2 ч.

Активация карбоксильных групп ячеек со щеточными полимерами. Карбоксильные группы щеточных полимеров переводили в активные N-гидроксисукцинимидные эфиры. Реакцию проводили с N-гидроксисукцинимидом и водорастворимым карбодиимидом EDC в MES-буфере при pH 5.0 (рис. 5б). Получали подложки с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами (рис. 5б).

Флуоресцентное маркирование карбоксильных групп в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке красителем Cy5 (рис. 5в). Условия получения ячеек со щеточными полимерами и активацию карбоксильных групп оптимизировали по связыванию с красителем **Cy5-NH₂**. При микроскопическом контроле в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, картина аналогична представленной на рис. 6. На рис. 7 показаны ячейки из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после активации карбоксильных групп и присоединения красителя **Cy5-NH₂**. Показан график распределения сигналов

вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении. Видно, что ячейки на чипе достаточно однородные. Однородность ячеек сохраняется также от чипа к чипу.

На выдержке 10 мс среднее значение флуоресцентного сигнала после вычета фона составляет 20600 о.е., фоновое значение 1400 о.е. Отношение сигнал/фон (контрастность) равно 15.7. Этому значению при данной выдержке соответствует концентрация карбоксильных групп 170 пмоль/см². Ранее на поверхности полиэтилентерефталатных ПЭТ-подложек методом щелочного травления удалось получить карбоксильные группы с концентрацией только 8 пмоль/см² [23].

Подбор условий иммобилизации ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров. Мы использовали двухэтапное изготовление матрицы ДНК-зондов. Первый этап включает получение гидрофильных ячеек одного размера с четкими границами, регулярно расположенными на гидрофобной поверхности подложки с высокой емкостью ковалентного связывания ДНК-зондов. При этом между ячейками имеется гидрофобная поверхность с низкой неспецифической сорбцией нуклеиновых кислот. Второй этап включает микрокапельное нанесение индивидуальных ДНК-зондов в заранее сформированные ячейки, по координатам ячеек, с раскладкой ДНК-зондов по заданной программе.

Для точного позиционирования микрокапельного нанесения робот-манипулятор дополнительно оснастили видеокамерой и управляющим

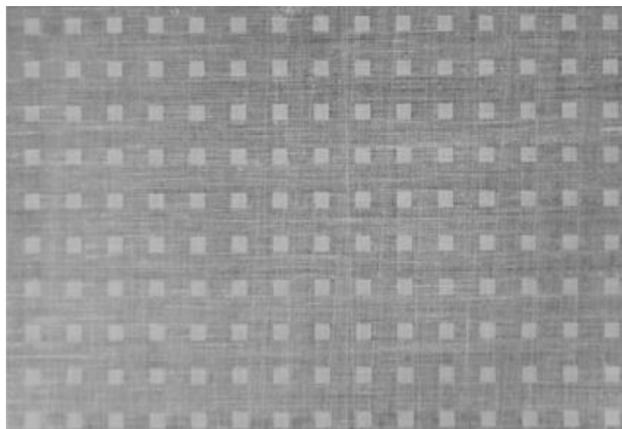


Рис. 6. Микроскопическое изображение ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в отраженном видимом свете. Ячейки размером 200×200 мкм с шагом 600 мкм.

программным обеспечением. Игла робота-манипулятора забирает из емкости микрокаплю раствора ДНК-зонда и переносит ее в ячейку. Раствор всасывается гидрофильной ячейкой и не растекается по гидрофобной поверхности. Для предотвращения высыхания в раствор добавляли глицерин. В растворах ДНК-зонды могут образовывать внутримолекулярные и межмолекулярные структуры, которые влияют на их химические свойства. Добавление в раствор хаотропных реагентов и поверхность активных веществ снижает такое взаимодействие. На рис. 8 и 9 представлено изображение ячеек микрочипа в свете флуоресценции красителей Су3,

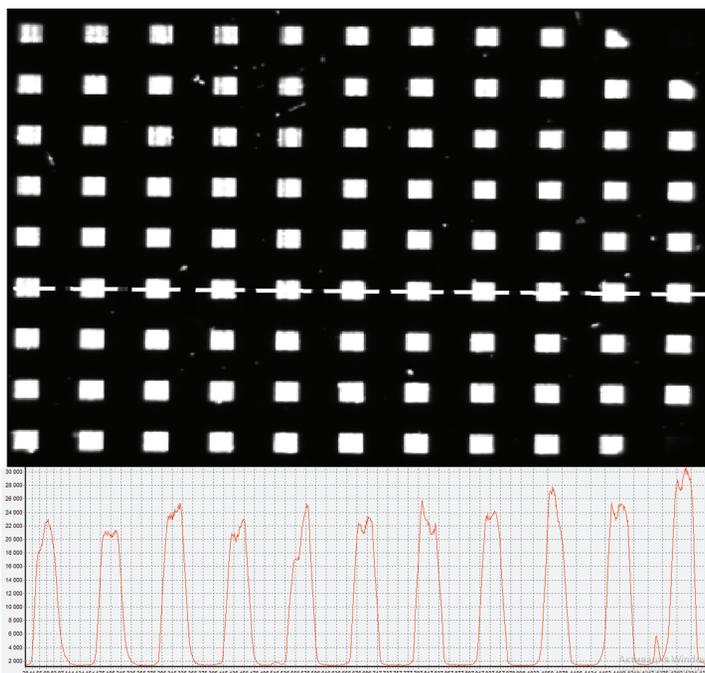


Рис. 7. Картина флуоресценции ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Су5 при выдержке 10 мс после активации карбоксильных групп и присоединения красителя Су5-NH₂. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении.

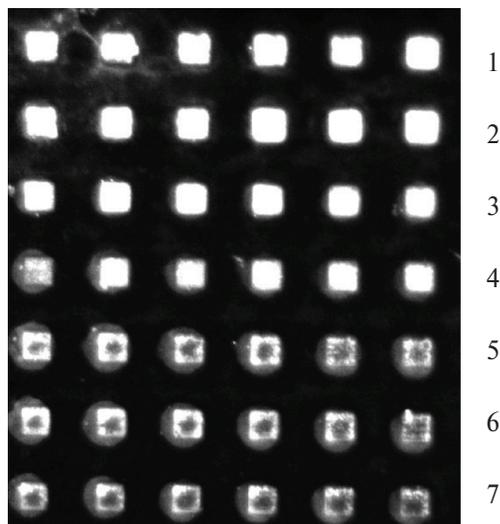


Рис. 8. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале Су3 с иммобилизованными ДНК-зондами при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные хаотропные реагенты. Выдержка 100 мс. Буфер карбонатный, рН 9.0, 5% глицерина. 1 – 10% формамида; 2 – 20% формамида; 3 – 10% DMSO; 4 – 20% DMSO; 5 – 0.01% Твин 20; 6 – 0.1% Твин 20; 7 – без добавок.

связанных с ДНК-зондами, иммобилизованными при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные хаотропные реагенты (рис. 8), или растворов, содержащих различные концентрации глицерина (рис. 9). Видно, что иммобилизация ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров существенно зависит от состава раствора.

Флуоресцентный контроль результатов иммобилизации ДНК-зондов в ячейках чипа позволил оптимизировать рН, температуру, время реакции, а также влажность камеры, в которой идет инкубация. Оптимальный состав раствора для нанесения ДНК-зондов в ячейки и ковалентной иммобилизации в ней: карбонатный буфер (рН 9.0), содержащий 5% глицерина и 10% формамида. При инкубации в сухой атмосфере ячейки высыхают, в избыточно влажной – происходит конденсация влаги в ячейках, и раствор растекается. Оптимальной является инкубация в атмосфере с влажностью, поддерживаемой смесью вода/глицерин в соотношении 1/7.

Иммобилизация ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров (рис. 5з). Растворы ДНК-зондов № 268 и № 269 с помощью робота-манипулятора капельно наносили на активированные ячейки из щеточных полимеров на алюминиевых подложках, инкубировали, отмывали от несвязавшихся компонентов. При микроскопическом контроле биочипов после нанесения ДНК-зондов в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, картина аналогична представленной на рис. 6. На рис. 10 представлено изображение

ячеек биочипа в спектральных условиях, специфичных для красителя Су3 после иммобилизации олигонуклеотидных зондов, меченных Су3. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 2 для зонда № 269. Снижение интенсивности флуоресценции по краям зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Как следует из данных, представленных на рис. 10, края ячеек четко очерчены, ДНК-зонды не выявлены вне границ ячеек. Распределение сигналов в повторяющихся ячейках демонстрирует одинаковую дозировку растворов, нанесенных на заранее сформированную матрицу гидрофильных ячеек, расположенных на гидрофобной поверхности подложки. Гидрофобная поверхность вне границ гидрофильных ячеек является одним из ключевых факторов, приводящим к одинаковой дозировке растворов при их микрокапельном внесении в ячейки биочипа.

Среднее значение сигналов для рядов 1 и 3 зонда № 268 на канале Су3 после вычета фона составляет 22650 о.е. Для зонда № 269 среднее значение сигналов для рядов 2 и 4 на канале Су3 после вычета фона составляет 23150 о.е. Это означает, что количество зондов, иммобилизованных в ячейках, различается. Причины могут быть различными. В том числе, разной может быть степень доступности аминогрупп на С6-аминомодификаторе из-за разницы в образовании внутримолекулярных и межмолекулярных структур ДНК-зондами.

Как следует из полученных данных, ячейки каждого зонда на чипе достаточно однородные как внутри ряда, так и между рядами. Внутри ячеек из щеточных полимеров сигнал распределен равномерно, что свидетельствует о равномерном распределении ДНК-зондов. От чипа к чипу однородность ячеек также сохраняется. Незначительное снижение интенсивности флуоресценции по краям



Рис. 9. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале Су3 с иммобилизованными ДНК-зондами при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные концентрации глицерина. Выдержка 100 мс. Буфер карбонатный, рН 9.0, 10% формамида. 1 – пустые ячейки; 2 – 5% глицерина; 3 – 10% глицерина; 4 – 20% глицерина.

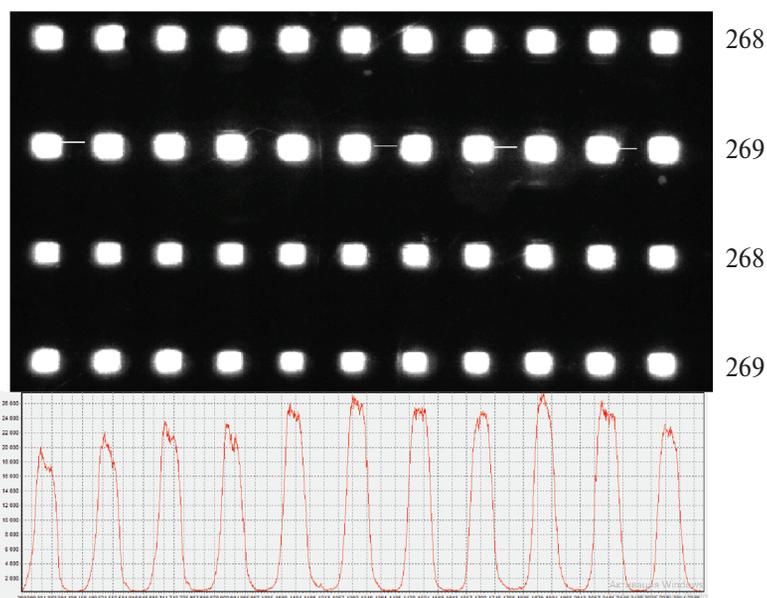


Рис. 10. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале Су3 после иммобилизации олигонуклеотидных зондов, меченных Су3. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 2 для зонда № 269.

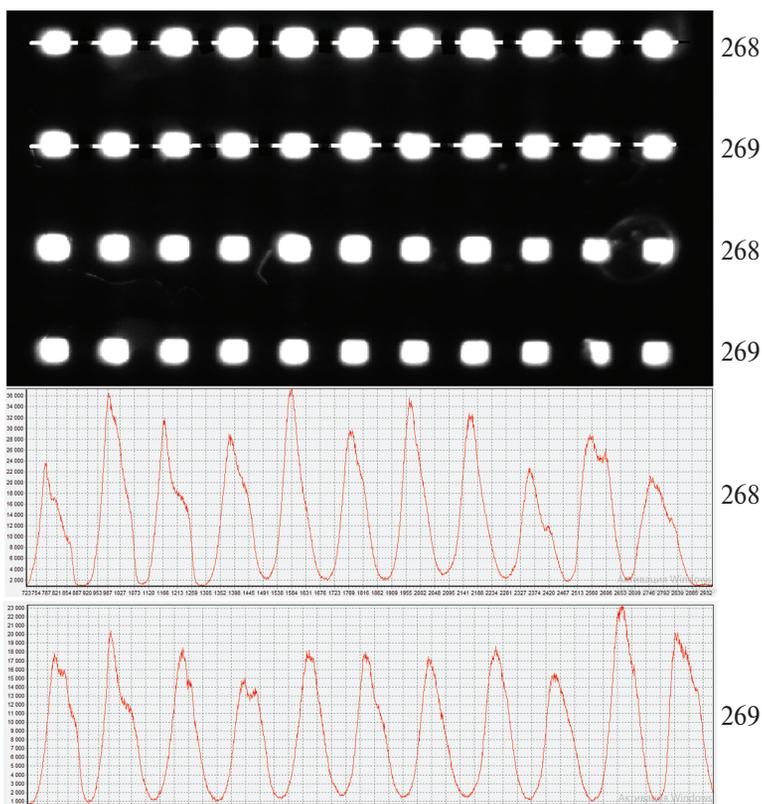


Рис. 11. Картина флуоресценции на канале Су5 ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки после гибридизации с мишенью, маркированной красителем Су5. Показаны графики распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 1 зонда № 268 и ряда 2 зонда № 269.

зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Гибридизация ДНК-мишени в щеточных ячейках. Раствор синтетической ДНК-мишени № 273 с красителем Су5 на 3'-конце гибридизовали с иммобилизованными в ячейках ДНК-зондами, маркированными красителем Су5 (рис. 5*д*).

При микроскопическом контроле в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, полученная картина аналогична картине, представленной на рис. 6.

Изображение ячеек биочипа в свете их флуоресценции в спектральной области, специфичной для Су3, после гибридизации ДНК-мишени идентично изображению, представленному на рис. 10, с полным сохранением интенсивности сигналов в индивидуальных ячейках биочипов. На рис. 11 в спектральной области, специфичной для красителя Су5, показаны ячейки из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки после гибридизации с синтетической ДНК-мишенью № 273, маркированной красителем Су5.

Среднее значение сигналов в рядах 1 и 3 зонда № 268 на канале Су5 после вычета фона составляет 14900 о.е. В случае зонда № 269 среднее значение сигналов в рядах 2 и 4 на канале Су5 после вычета фона составляет 8900 о.е. Дискриминационное отношение сигналов совершенных дуплексов к сигналам несовершенных дуплексов (зонд № 268/2699) на канале Су5 после вычета фона составляет (14900/8900) 1.67.

Гибридизационный сигнал зависит не только от нуклеотидной последовательности ДНК-зондов, но и от их количества в ячейке. Зонды в ячейках иммобилизованы сайт-специфично с аминокислотой С6-аминомодификатора, не затрагивая экзоциклические аминокислотные группы нуклеотидов. Иммобилизованные таким методом ДНК-зонды полностью сохраняют способность к комплементарному взаимодействию с ДНК-мишенями. Поэтому можно вычислить гибридационный сигнал, приходящийся на единицу иммобилизованного в ячейке зонда, т.е. нормировать гибридационный сигнал на сигнал иммобилизованного зонда. Дискриминационное отношение нормированных сигналов более точно определяет разницу между сигналами совершенных и несовершенных дуплексов. Нормированный сигнал для зонда № 268 составляет (14900/22650) 0.658. Нормированный сигнал для зонда № 269 составляет (8900/23150) 0.384. Дискриминационное отношение нормированных сигналов совершенных дуплексов (зонд № 268) к нормированному сигналу несовершенных дуплексов (зонд № 269) составляет (0.658/0.384) 1.71.

Полученные значения дискриминационных отношений позволяют дискриминировать зонды, различающиеся заменой одного нуклеотида. Статистически значимыми принято считать различия зондов,

у которых дискриминационное отношение гибридационных сигналов больше или равно 1.4 [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы получены следующие результаты.

Разработан метод прививки якорных аминокислотных групп на поверхности подложек из алюминиевой фольги реакцией с АПТЭС с контролем концентрации аминокислотных групп по связыванию с флуоресцентным красителем с применением цифровой флуоресцентной микроскопии.

Разработан метод покрытия поверхности алюминиевых подложек тонким прочным умеренно гидрофобным слоем ПВАц, полимерные макромолекулы которого перекрестно сшиты с образованием трехмерной сетки, прочно связанной с поверхностью подложки.

Разработан метод получения ячеек из щеточных полимеров на поверхности подложек фотоиндуцированной радикальной полимеризации "от поверхности" с формированием методом фотолитографии матрицы ячеек размером 200 × 200 мкм с шагом 600 мкм. Гидрофильные ячейки с четко очерченными границами регулярно расположены на гидрофобной поверхности. Полимерное покрытие с ячейками не растворяется и не отслаивается от подложки при нагревании в деионизированной воде и в ТЕ (Трис-EDTA) рН 8.0 при 95°С в течение 2 ч. На полимерных цепях расположены реактивные карбоксильные группы.

Анализ связывания с флуоресцентным красителем позволил оценить концентрацию химически доступных карбоксильных групп в ячейках биочипа (рис. 5*б*), которая составила 170 пмоль/см². Ранее на поверхности ПЭТ-подложек методом щелочного травления удалось получить карбоксильные группы с концентрацией только 8 пмоль/см² [23].

Подобран состав растворов ДНК-зондов и условия их микрокапельного нанесения на заранее сформированную матрицу гидрофильных ячеек, обеспечивающие одинаковую дозировку ДНК-зондов и ковалентную иммобилизацию в повторяющихся ячейках.

С использованием гибридационного анализа с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека, показано сохранение гибридационной активности иммобилизованных ДНК-зондов.

Представленные методы могут быть использованы для разработки технологии параллельного множественного экспресс-микрoанализа нуклеиновых кислот "лаборатория на чипе" для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

Авторы выражают благодарность Р.А. Юрасову за помощь в использовании компьютерной программы.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S., Mirzabekov A. (1996) DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 4913–4918.
doi: 10.1073/pnas.93.10.4913
- Beaudet A.L., Belmont J.W. (2008) Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annu. Rev. Med.* **59**, 113–129.
doi: 10.1146/annurev.med.59.012907.101800
- Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. (2011) Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **11**, 839–853.
https://doi.org/10.1586/ERM.11.73
- Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. (2000) PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations. *BioTechniques*. **29**, 844–857.
doi: 10.2144/00294rr01
- Tillib S.V., Strizhkov B.N., Mirzabekov A.D. (2001) Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Analyt. Biochemistry*. **292**, 155–160.
doi:10.1006/abio.2001.50821
- Pemov A., Modi H., Chandler D.P., Bavykin S. (2005) DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. *Nucl. Acids Res.* **33**, e11.
doi:10.1093/nar/gnh184
- Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. (2008) An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *BioTechniques*. **44**, 241–248.
doi 10.2144/000112628
- Chudinov A.V., Kolganova N.A., Egorov A.E., Fesenko D.O., Kuznetsova V.E., Nasedkina T.V., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Timofeev E.N. (2015) Bridge DNA amplification of cancer-associated genes on cross-linked agarose microbeads. *Microchim. Acta*. **182**, 557–463.
doi: 10.1007/s00604–014–1357–8.
- Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Мультиплексная ПЦР на чипе с прямой детекцией удлинения иммобилизованного праймера. *Биоорганическая химия*. **47**, 652–656.
https://doi.org/10.31857/S0132342321050298
- Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Молекулярная биология*. **55**, 944–955.
doi: 10.1134/S0026893321040063
- Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. (2017) Microarray analyzer based on wide field fluorescent microscopy with laser illumination and a device for speckle suppression. *Biomed. Optics Express*. **8**, 4798–4810.
https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798
- Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Synthetic route to novel zwitterionic pentamethine indocyanine fluorophores with various substitutions. *Dyes Pigments*. **147**, 199–210.
http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052
- Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. (2002) Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J. Biomol. Screening*. **7**, 247–257.
https://doi.org/10.1177/108705710200700308
- Мифтахов Р.А., Иконникова А.Ю., Василисков В.А., Лапа С.А., Левашова А.И., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Нasedкина Т.В., Чудинов А.В. (2023) Биочип с ячейками из щеточных полимеров с реактивными карбоксильными группами для анализа ДНК. *Биоорганическая химия*. **49**, 641–648.
doi: 10.31857/S0132342323050044
- Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. (2006) Microchip-based one step DNA extraction and real-time PCR in one chamber for rapid pathogen identification. *Lab. Chip*. **6**, 886–895.
https://doi.org/10.1039/B515876A
- Sin E.J., Moon Y.S., Lee Y.K., Lim J.O., Huh J.S., Choi S.Y., Sohn Y.S. (2012) Surface modification of aluminum oxide for biosensing application. *Biomed. Engin: Applications, Basis, Commun.* **24**, 111–116.
doi: 10.1142/S1016237212500093
- Chai C., Lee J., Takhistove P. (2010) Direct detection of the biological toxin in acidic environment by electrochemical impedimetric immunosensor. *Sensors*. **10**, 11414–11427.
https://doi.org/10.3390/s101211414
- Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Synthetic route to novel zwitterionic pentamethine indocyanine fluorophores with various substitutions. *Dyes Pigments*. **147**, 199–210.
http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052
- Schubert J., Chanana M. (2019) Coating matters: review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms. *Curr. Med. Chem.* **25**(35), 4556–4586.
doi: 10.2174/0929867325666180601101859
- Sim Y.J., Seo E.K., Choi G.J., Yoon S.J., Jang J. (2009) UV-induced crosslinking of poly(vinyl acetate) films containing benzophenone. *J. Korean Soc. Dyers Finishers*. **21**(4), 33–38.

doi:10.5764/TCF.2009.21.4.033

21. Qu B.J., Xu Y.H., Ding L.H., Ranby B. (2000) A new mechanism of benzophenone photoreduction in photoinitiated crosslinking of polyethylene and its model compounds. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **38**(6), 999–1005. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(20000315\)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(20000315)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1)
22. Ogiwara Y., Kanda M., Takumi M., Kubota H. (1981) Photosensitized grafting on polyolefin films in vapor and liquid phases. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **19**, 457. <https://doi.org/10.1002/pol.1981.130190905>
23. Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Шершов В.Е., Заседательва О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофеев Э.Н., Заседатель А.С., Чудинов А.В. (2018) Получение активных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и количественный анализ этих групп с помощью цифровой люминесцентной микроскопии. *Биофизика.* **63**, 661–668. <https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
24. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pan'kov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S. (2014) Discrimination between perfect and mismatched duplexes with oligonucleotide gel microchips: role of thermodynamic and kinetic effects during hybridization. *J. Biomol. Struct. Dynamics.* **22**, 725–734. doi: 10.1080/07391102.2005.10507039

DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MICROCHIPS ON AN ALUMINUM SUPPORT WITH CELLS MADE OF BRUSH POLYMERS

I. Yu. Shishkin¹, G. F. Shtylev¹, V. E. Barsky¹, S. A. Lapa¹, O. A. Zasedateleva¹,
V. E. Kuznetsova¹, V. E. Shershov¹, V. A. Vasiliskov¹, S. A. Polyakov¹, A. S. Zasedatelev¹,
A. V. Chudinov^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: chud@eimb.ru

A method has been developed for manufacturing biological microchips on an aluminum substrate with hydrophilic cells from brush copolymers with the formation of a matrix of cells using photolithography. The surface of aluminum substrates was previously coated with a thin, durable, moderately hydrophobic layer of cross-linked polymer to prevent contact with the aluminum surface of the components used in the analysis of nucleic acids. Aluminum biochip substrates have high thermal conductivity and low heat capacity, which is important for the development of methods for multiplex PCR analysis on a chip. Oligonucleotide probes were covalently immobilized in the cells of the biochip. The preservation of the hybridization activity of the immobilized DNA probes was demonstrated in a hybridization analysis with a synthetic DNA target representing a section of the sequence of the 7th exon of the human *ABO* gene. The developed methods can be used in the development of a technology for parallel multiple rapid microanalysis of nucleic acids “lab on a chip” for the detection of human somatic and infectious diseases

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