



УДК 577.2:547.75

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНЫХ АМИНОГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНОЙ ПЛЕНКИ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДЛЯ ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

© 2024 г. Г. Ф. Штылев*, И. Ю. Шишкин*, С. А. Лапа*, В. Е. Шершов*, В. Е. Барский*,
С. А. Поляков*, В. А. Василюков*, О. А. Заседателева*,
В. Е. Кузнецова*, А. В. Чудинов*[#]

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

Поступила в редакцию 16.11.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

Разработан метод получения активных аминокетильных групп на поверхности подложки из полиэтилентерефталата (ПЭТ). Разработан метод количественной оценки концентрации и распределения химически доступных аминокетильных групп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием цианинового красителя Су5 и цифровой флуоресцентной микроскопии. Аминокетильные группы могут быть использованы для дальнейшей химической модификации поверхности ПЭТ, прививки различных функциональных групп и ковалентного связывания с биомолекулами, что открывает перспективы широкого использования недорогого ПЭТ в качестве функциональных подложек в биочипах, биосенсорах, устройствах “лаборатория на чипе” и других биотехнологических приложениях.

Ключевые слова: активация поверхности ПЭТ, флуоресценция, цианиновые красители

DOI: 10.31857/S0132342324050092, **EDN:** LQVIRS

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании белков и нуклеиновых кислот широко используют анализ по связыванию анализируемых компонентов биологических образцов с молекулярными зондами, закрепленными на поверхности твердых подложек. Анализ по связыванию используют в иммунологических исследованиях в формате микротитровальных планшетов [1], индикаторных тестах на беременность [2], иммунохроматографических полосках (стрипах) [3], олигонуклеотидных и белковых биологических микрочипах [4–7]. В методе биочипов набор олигонуклеотидных или белковых зондов иммобилизуют на подложке в микрочастицах по определенным координатам, а затем исследуют одновременное связывание анализируемого об-

разца с набором иммобилизованных зондов. С использованием этого принципа реализован вариант многопараметрического мультиплексного гибридного анализа ДНК [4, 5].

В качестве подложек используют стекло, кварц, кремний и силоксаны. Для них отработаны методы активации поверхности и прививки функциональных групп с использованием различных производных силана [4, 8–10]. В анализах по связыванию, наряду с кремнийсодержащими подложками, используют подложки из синтетических полимеров, для которых доступны методы активации поверхности и прививки реактивных химических групп. Нашли применение подложки из полиметилметакрилата, поверхность которых достаточно легко активируется в реакциях

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат; ПЭТ-Су5 – полиэтилентерефталат с привитым на поверхности красителем Су5; ПЭТ-NH₂ – полиэтилентерефталат с аминированной поверхностью; ЭДА – этилендиамин; Су5-pNP – *para*-нитрофениловый эфир индодикарбоцианинового красителя Су5.

[#] Автор для связи: (эл. почта: chud@eimb.ru).

гидролиза, восстановления, аминирования [11]. Значительный интерес представляют подложки из тонкого полиэтилентерефталата (ПЭТ) [12–14]. ПЭТ биосовместим, прозрачен в видимом и ближнем ИК-свете. Благодаря высокой термостойкости на тонких подложках из ПЭТ возможно выполнение анализов не только при окружающей температуре, но и при температурах до 100°C, что важно для ПЦР. Наличие сложноэфирных групп в составе ПЭТ позволяет изменять химические свойства поверхности без затрагивания полимерного массива.

Иммобилизация зондов на поверхности подложки позволяет получать двумерные ячейки с ограниченной концентрацией зондов, приходящихся на единицу поверхности, и снижает их пространственную доступность для взаимодействия с анализируемыми ДНК. Иммобилизация зондов в трехмерной сетке гидрогелевых ячеек позволяет увеличить их концентрацию. В гидрогелевых ячейках, закрепленных на стеклянных подложках, реализованы варианты гибридного анализа нуклеиновых кислот [4, 5], а также некоторые подходы для проведения ПЦР на чипе [15, 16].

Перекрестно-сшитая трехмерная сетка ограничивает пространственную доступность иммобилизованных зондов и затрудняет диффузию компонентов анализируемых проб, что увеличивает время анализа [17]. Для преодоления пространственных и диффузионных препятствий предложено использовать ячейки из перекрестно-сшитой крупнопористой агарозы с праймерами, иммобилизованными на линкерах, которые расщепляются в ходе термоциклической ПЦР [18].

Другое решение для иммобилизации зондов – использование ячеек из щеточных полимеров [19]. Щеточные полимеры закреплены на подложке только одним концом, без образования перекрестно-сшитой сетки, а реактивные химические группы на полимерных цепях используются для иммобилизации зондов [20]. Непосредственное получение щеточных полимеров на поверхности ПЭТ затруднительно, ПЭТ не фотоактивен. В работе Мифтахова с соавт. [21] подложки из ПЭТ покрывали тонким слоем фотоактивного циклоолефинсополимера с высокой адгезией к ПЭТ. На подложках методом фотолитографии получали ячейки из щеточных сополимеров акриловой кислоты и акриламида. Множественные карбоксильные группы на полимерных цепях использовали для иммобилизации зондов.

Свойства ячеек из щеточных полимеров, предназначенных для анализа макромолекул, должны регулироваться в процессе получения ячеек. Радикальная полимеризация “от поверхности” с фотоинициаторами, находящимися в растворе, затрудняет такое регулирование [20]. Молекулы фотоинициаторов радикальной полимеризации должны быть иммобилизованы на поверхности подложки, и их поверхностная концентрация должна регулироваться [22].

Контролируемый аминолитиз поверхности ПЭТ диаминами в мягких условиях позволяет получать аминокгруппы [23], которые могут использоваться для иммобилизации фотоинициаторов. В работе Avny et al. [24] для контроля аминокгрупп на поверхности ПЭТ использовали “кислотный фукцин”, который связывается с аминокгруппами с образованием солей. Связавшийся краситель затем десорбировали, и его количество определяли спектрофотометрически. В работе Bech et al. [25] для этих целей использовали пикриновую кислоту. Поверхность ПЭТ в значительной мере гидрофобна и физически сорбирует полиароматический краситель. Поэтому количество красителя, связавшегося с поверхностью, зависит не только от концентрации аминокгрупп, но и от условий сорбции отмытки и десорбции. При этом важна не общая концентрация аминокгрупп на поверхности, а концентрация доступных аминокгрупп, способных к ковалентному связыванию с образованием амидных связей.

Цель данного исследования – разработка метода аминолита поверхности ПЭТ-подложки и контроля химически доступных аминокгрупп по связыванию с красителем Су5 с флуоресцентной регистрацией результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе подложки из пленочного ПЭТ обрабатывали растворами этилендиамина (ЭДА). В мягких условиях происходит разрыв части сложноэфирных групп, находящихся на поверхности. Одна из аминокгрупп этилендиамина присоединяется к фрагменту терефталевой кислоты, который связан с полимерной цепью, входящей в состав полимерного массива, а вторая аминокгруппа остается свободной. Получали подложку с аминированной поверхностью, ПЭТ-NH₂ (рис. 1).

Количественный анализ концентрации доступных аминокгрупп на поверхности ПЭТ-NH₂ проводили после ковалентного связывания с флуоресцентным цианиновым красителем Су5 и регистрации флуоресцентных сигналов методом

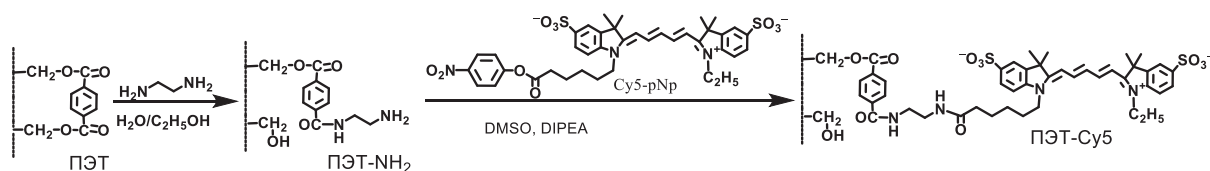


Рис. 1. Схема химической модификации поверхности ПЭТ-пленки.

цифровой флуоресцентной микроскопии. Для этого аминированную пленку ПЭТ-NH₂ обрабатывали активированным производным красителя, *para*-нитрофениловым эфиром Cy5-pNP, в диметилсульфоксиде. Подложку тщательно отмывали от не связавшегося с пленкой красителя. Ковалентная связь красителя Cy5 с аминными группами, полученными на поверхности ПЭТ-пленки, обеспечивает прочное связывание и возможность исчерпывающей отмывки от несвязавшегося красителя, что увеличивает достоверность и воспроизводимость результатов. Получили ПЭТ-подложку, у которой доступные аминные группы маркированы флуоресцентным красителем, ПЭТ-Cy5 (рис. 1).

Краситель Cy5 и его активное производное, *para*-нитрофениловый эфир, Cy5-pNP предварительно синтезировали по ранее отработанному методу [26]. Схема синтеза представлена на рис. 2.

Для количественной оценки концентрации молекул красителя, связавшихся с поверхностью подложки, был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими тот же самый краситель Cy5 с пошаговой убывающей концентрацией молекул красителя на единицу поверхности. Измерения интенсивности флуоресценции подложек с ячейками, содержащими известную концентрацию красителя на единицу поверхности, показали, что флуоресцентному сигналу в одну относительную единицу (отн. ед.) при выдержке 100 мс соответствует концентрация Cy5 8.44×10^{-4} пмоль/см².

В табл. 1 представлены вычисленные значения концентрации аминных групп на поверхности ПЭТ, полученные реакцией с этилендиамином в различных условиях и последующем связывании с флуоресцентным красителем Cy5. Приведены усредненные значения при трех повторях.

Таблица 1. Результаты обработки поверхности ПЭТ растворами этилендиамина (ЭДА)

Реагенты	Концентрация ЭДА, %	Время, мин	Концентрация NH ₂ -групп, пмоль/см ²
ЭДА/этанол	10	15	0.67
		30	0.78
		60	1.01
		120	1.39
		240	5.49
ЭДА/вода	10	15	0.55
		30	0.59
		60	0.70
		120	0.89
		240	1.69
ЭДА/вода	25	60	1.35
		120	1.71
		240	7.43
ЭДА/этанол	50	15	1.86
		30	10.04
		60	23.13
ЭДА/вода	50	15	1.10
		30	1.77
		60	3.33
		120	4.30

Примечание: концентрация ЭДА приведена в процентах (v/v), температура аминирования 70°C.

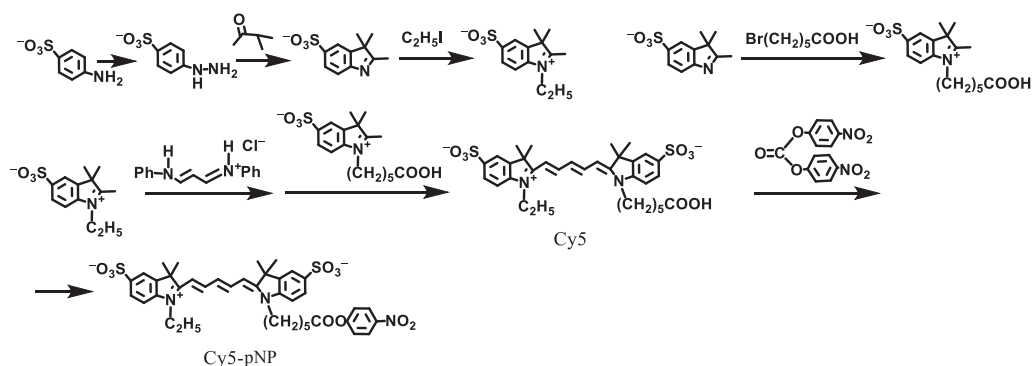


Рис. 2. Схема синтеза флуоресцентного красителя Cy5 и активированного производного *para*-нитрофенилового эфира красителя Cy5-pNP.

Как видно из данных табл. 1, с ростом концентрации этилендиамина концентрация аминогрупп на поверхности возрастает, при этом в спиртовых растворах концентрация аминогрупп выше, чем в водных растворах. Однако при достижении концентрации NH_2 -групп ~ 8 пмоль/ cm^2 начинают наблюдаться следы деградации поверхности ПЭТ-подложки, наблюдаемой визуально в виде помутнения первоначально гладкой и блестящей поверхности.

Оптимальные условия для получения аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки наблюдались для 10%-ной объемной концентрации этилен-

диамина в водном растворе и времени реакции до 8 ч, а в спиртовом растворе – до 4 ч. В этих условиях, при визуальном контроле, поверхность ПЭТ-подложки остается гладкой и блестящей, без видимых повреждений.

На рис. 3 представлена микрофотография ПЭТ-подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после аминирования 10%-ным водным раствором этилендиамина в течение 8 ч при $70^\circ C$ и связывания аминогрупп с флуоресцентным красителем Cy5-pNP. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении подложки.

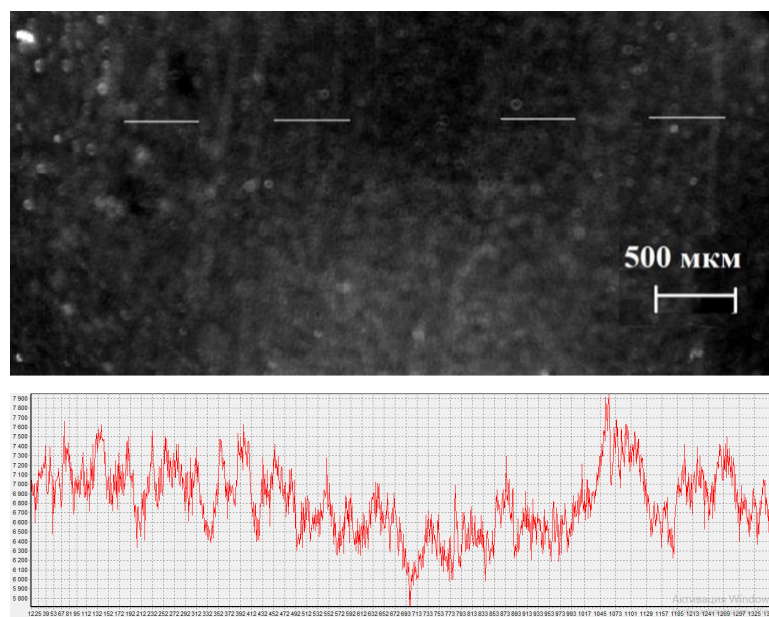


Рис. 3. Микрофотография ПЭТ-подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после аминирования 10%-ным водным раствором этилендиамина в течение 8 ч при $70^\circ C$ и связывания аминогрупп с флуоресцентным красителем Cy5-pNP. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении подложки.

Как следует из данных, представленных на рис. 3, аминокруппы на поверхности распределяются неравномерно, что, видимо, связано с наличием аморфных и кристаллических участков на поверхности ПЭТ-подложки. При получении ячеек со щеточными полимерами будет наблюдаться химическая неоднородность по площади ячеек. Для нивелирования неоднородности химических свойств подложки под ячейкой следует увеличивать площадь ячейки, чтобы под ячейкой оказывалось несколько разнородных микроучастков. Для чипов повышенной плотности с супермелкими ячейками нужны подложки с химически более однородной поверхностью, например, кристаллический кремний.

Флуоресцентные сигналы вдоль проведенной линии колеблются в диапазоне 5900–7900 отн. ед., что после вычислений с вычетом фонового сигнала соответствует концентрации аминокрупп 4.1–5.7 пмоль/см² при среднем значении 4.9 пмоль/см². На выдержке 100 мс фоновый сигнал составляет 1100 отн. ед., он суммируется из темного сигнала видеокамеры 1000 отн. ед., собственной флуоресценции ПЭТ 50 отн. ед. и флуоресценции сорбировавшихся к подложке молекул красителя 50 отн. ед. Разница концентрации аминокрупп на поверхности значительная. При получении ячеек со щеточными полимерами будет наблюдаться неоднородность концентрации щеточных полимеров в ячейках в зависимости от положения ячеек на поверхности подложки. Соответственно, будет наблюдаться неоднородность концентрации иммобилизованных зондов в разных ячейках на одной подложке. Для нивелирования влияния неоднородности иммобилизации зондов от ячейки к ячейке следует зонды дополнительно маркировать спектрально независимыми красителями, и сигналы, полученные от индикаторной флуоресцентной метки, нормировать на количество иммобилизованного зонда в ячейке: для сэндвич-иммуноанализа это нормировка сигнала индикаторной метки на проявляющих антителах на сигнал от метки на первичных захватывающих антителах, для ПЦР на чипе – нормировка сигналов от встроенных маркированных нуклеотидов на сигнал от иммобилизованных в ячейках праймеров.

Из вычислений следует, что при поверхностной концентрации аминокрупп 5 пмоль/см² расстояние между аминокруппами на поверхности будет ~6 нм. При иммобилизации через аминокруппы фотоинициаторов радикальной полимеризации и последующем получении цепей полимеров методом радикальной полимеризации “от поверхности” расстояние между полимерными цепями будет ~6 нм, что находится в диапазоне предпочтительных значений с тенденцией в сторону увеличения рас-

стояний между аминокруппами. Размер молекул иммуноглобулинов составляет ~10 нм. Для получения небольших концентраций аминокрупп на поверхности ПЭТ лучше подходит 10%-ный водный раствор этилендиамина, реакция идет медленно, легче регулировать концентрацию аминокрупп.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. 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 поверхности 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. Использовали 96%-ный этанол марки х.ч., этилендиамин 99.5% (Fluka, Германия; Art. No 03550).

Синтез активного флуоресцентного красителя Су5-pNP. Краситель Су5 и активное производное, *para*-нитрофениловый эфир красителя Су5-pNP, синтезировали по методу Spitsyn et al. [26]. Схема синтеза представлена на рис. 1.

Аминирование поверхности ПЭТ-подложки. Аминирование пленочных ПЭТ-подложек размером 25 × 75 мм проводили в закрытой пробирке из полипропилена, содержащей 40 мл раствора этилендиамина. Пробирки закрывали и помещали в термостат при 70°C на заданное время. Затем подложки доставали, промывали струей деионизированной воды, сушили в течение 1 ч на открытом воздухе, а затем сушили в вакуум-эксикаторе (Медлабстекло, Россия) над Р₂О₅ в течение 16 ч. Хранили в эксикаторе над свежим Р₂О₅.

Флуоресцентное маркирование аминокрупп на ПЭТ-подложке. На подложке формировали разборную камеру объемом 30 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². В камеру вносили 30 мкл раствора активированного красителя Су5-pNP с концентрацией 1 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде, инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды.

Для удаления красителя, не связавшегося с пленкой, ее тщательно отмывали. Для этого пленку помещали в закрытую пробирку из полипропилена с 40 мл 50%-ного раствора ацетонитрила в 50 мм триэтиламонийгидрокарбонате (рН 7.5), выдерживали на ультразвуковой бане 20 мин. Процедуру повторяли 3 раза со сменой растворителя. Затем промывали струей деионизированной воды, после чего сушили при комнатной температуре в течение 1 ч на открытом воздухе. Ковалентная связь красителя Су5 с аминогруппами, полученными на поверхности ПЭТ-пленки, обеспечивает прочное связывание и возможность исчерпывающей отмывки от несвязавшегося красителя.

Флуоресцентные сигналы. Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии с регистрацией интенсивности сигналов флуоресценции в свете флуоресценции красителя Су5 [27]. Флуоресцентные сигналы на пленке регистрировали на портативном анализаторе (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 716 ± 43 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой. Изображение анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия) [27, 28]. 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 получения активных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки; 2) метод количественной оценки концентрации химически доступных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием индодикарбоцианинового красителя Су5 и цифровой флуоресцентной микроскопии; 3) метод количественной оценки распределения химически доступных аминогрупп на поверхности ПЭТ-подложки с использованием математической программы анализа интенсивностей флуоресцентных сигналов.

Предложенный метод контроля химически доступных аминогрупп на поверхности аминированной ПЭТ-пленки может быть использован применительно к аминированным поверхностям других материалов.

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

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00257).

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. *Ahsan H.* // *Comp. Clin. Pathol.* 2022. V. 31. P. 333–345.
<https://doi.org/10.1007/s00580-021-03302-4>
2. *Gnoth C., Johnson S.* // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2014. V. 74. P. 661–669.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1368589>
3. *Mao X., Wang W., Du T.-E.* // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013. V. 186. P. 315320.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.083>
4. *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>
5. *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>
6. *Miller M.B., Tang Y.W.* // *Clin. Microbiol.* 2009. V. 22. P. 611–633.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00019-09>
7. *Zhu H., Qian J.* // *Adv. Genet.* 2012. V. 79. P. 123–155.
8. *Rother D., Sen T., East D., Bruce I.J.* // *Nanomedicine.* 2011. V. 6. P. 281–300.
<https://doi.org/10.2217/nnm.10.159>
9. *Akkoyun A., Bilitewski U.* // *Biosensors and Bioelectronics.* 2002. V. 17. P. 655–664.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00029-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00029-5)
10. *Tu Q., Wang J.-C., Zhang Y., Liu R., Liu W., Ren L., Shen S., Xu J., Zhao L., Wang J.* // *Rev. Anal. Chem.* 2012. V. 31. P. 177–192.
<https://doi.org/10.1515/revac-2012-0016>
11. *Hosseini S., Ibrahim F., Djordjevic I., Koolea L.H.* // *Analyst.* 2014. V. 139. P. 2933–2943.
<https://doi.org/10.1039/c3an01789c>

12. Dimitrievska S., Maire M., Diaz-Quijada G.A., Robitaille L., Ajji A., Yahia L., Moreno M., Merhi Y., Rureau M. // *Macromol. Biosci.* 2011. V. 11. P. 493–502. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000390>
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. 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>
15. 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>
16. Лана С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершова В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. // *Мол. биология.* 2021. Т. 55. С. 944–955. <https://doi.org/10.1134/S0026893321040063>
17. Zubtsov D.A., Savvateeva E.N., Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Konvalova 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>
18. 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>
19. Rendl M., Bönisch A., Mader A., Schuh K., Prucker O., Brandstetter T., Rühe J. // *Langmuir.* 2011. V. 27. P. 6116–6123. <https://doi.org/10.1021/la1050833>
20. Ma Y., Liu L., Yang W. // *Polymer.* 2011. V. 52. P. 4159–4173. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.07.027>
21. 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>
22. Mueller M., Bandl C., Kern W. // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 608. <https://doi.org/10.3390/polym14030608>
23. Bui L.N., Thompson M., McKeown N.B., Romaschin A.D., Kalman P.G. // *Analyst.* 1993. V. 118. P. 463–474.
24. Avny Y., Rebenfeld L. // *J. Appl. Polymer Sci.* 1986. V. 32. P. 4009–4025.
25. Bech L., Meylheuc T., Lepoittevin B., Roger P. // *J. Polymer Science. Part A: Polymer Chem.* 2007. V. 45. P. 2172–2183. <https://doi.org/10.1002/pola.21983>
26. 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. // *Dyes and Pigments.* 2017. V. 147. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
27. 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>
28. Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. // *J. Biomol. Screening.* 2002. V. 7. P. 247–257. <https://doi.org/10.1177/108705710200700308>

Obtaining of Active Amino Groups on a Surface of a Polyethylene Terephthalate Films and Their Quantitative Evaluation

G. F. Shtylev*, I. Yu. Shishkin*, S. A. Lapa*, V. E. Shershov*, V. E. Barsky*, S. A. Polyakov*, V. A. Vasiliskov*, O. A. Zasedateleva*, V. E. Kuznetsova*, and A. V. Chudinov*,#

#E-mail: chud@eimb.ru

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

A method has been developed for obtaining active amino groups on the surface of a polyethylene terephthalate (PET) substrate. A method has been developed to quantify the concentration and distribution of chemically accessible amino groups on the surface of a PET substrate using the cyanine dye Cy5 and digital fluorescence microscopy. Amino groups can be used for further chemical modification of the PET surface, grafting of various functional groups and covalent binding with biomolecules, which opens up prospects for widespread use of inexpensive PET as functional substrates in biochips, biosensors, “laboratory-on-a-chip” devices and other biotechnological applications.

Keywords: fluorescence, cyanine dyes, activation of polyethylene terephthalate surface