



УДК 577.2:547.75

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ЗОНДОВ НА БИОЧИПАХ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. Г. Ф. Штылев*, И. Ю. Шишкин*, В. Е. Шершов*, В. Е. Кузнецова*,
Д. А. Качуляк*, В. И. Бутвиловская*, А. И. Левашова*, В. А. Василисков*,
О. А. Заседателяева*, А. В. Чудинов*, #

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

Поступила в редакцию 09.12.2023 г.

После доработки 28.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Изучены способы получения на поверхности полиэтилентерефталатных полимерных подложек полимерного покрытия из поливинилацетата и последующего получения методом фотоиндуцированной радикальной сополимеризации акрилатных мономеров щеточных полимеров. Методом фотолитографии сформированы матрицы ячеек с многочисленными реактивными химическими группами для последующей иммобилизации белков. Апробированы способы активации карбоксильных групп на щеточных полимерах, прикрепленных к поверхности полиэтилентерефталата. Выполнена иммобилизация модельного белка стрептавидина, маркированного флуоресцентным красителем Су3, для проверки метода активации карбоксильных групп. На модели “стрептавидин – биотинилированный иммуноглобулин” апробирован вариант иммунофлуоресцентного анализа в формате биологического микрочипа. Стрептавидин, иммобилизованный в ячейках из щеточных полимеров, сохраняет функциональность и пространственную доступность для связывания с биотинилированным иммуноглобулином и последующим проявлением антителами, флуоресцентно меченными красителем Су5, что открывает перспективы использования биологических микрочипов с ячейками из щеточных полимеров на подложках из полиэтилентерефталата для иммунофлуоресцентного анализа различных белковых мишеней.

Ключевые слова: биочипы, щеточные полимеры, конъюгирование белков, иммобилизация белков, флуоресцентный иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0132342324050103, EDN: LQSAPV

ВВЕДЕНИЕ

Миниатюризация в электронике оказала огромное влияние на человеческую цивилизацию. Мы находимся в начале аналогичной революции в биотехнологии. Огромный потенциал биочипов для революционного изменения аналитической биохимии был очевиден с момента их изобретения

одновременно несколькими исследовательскими группами, в том числе группой российских ученых под руководством А.Д. Мирзабекова, и получил название метод биочипов [1]. Ключевая задача технологии биочипов заключается в иммобилизации молекулярных зондов в упорядоченных матрицах ячеек с максимальным сохранением аффинности и специфичности зондов, а

Сокращения: ПЭТ – полиэтилентерефталат; ПВАц – поливинилацетат; Bio – биотин; Bio-Su – биотин-ПЭГ4-NHS-эфир; SOMU – (1-циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламиноморфолинокарбениевый гексафторфосфат; Су5-NH₂ – 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-кето-тридекан-13-ил)индодикарбоцианин; Су3-rNP – *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1'-пентаметилкарбоновой кислоты; Су5-rNP – *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндодикарбоцианин-1'-пентаметилкарбоновой кислоты; DMSO – диметилсульфоксид; DSC – ди-(*N,N'*-сукцинимидил)карбонат; EDC – 1-этил-3(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид; HOSu – *N*-гидроксисукцинимид; HBTU – 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоная кислота; Sav – стрептавидин; TSTU – 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат.

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

также с достижением пространственной доступности зондов для взаимодействия с анализируемыми макромолекулами. Вопросам подбора материалов для изготовления биочипов, функционализации поверхности носителей и способам иммобилизации молекулярных зондов уделяется значительное внимание в публикациях последних лет [2–4].

В щеточных полимерах полимерные цепи закреплены на поверхности подложки одним концом и не связаны между собой. Многочисленные реактивные химические группы на щеточных полимерах используются для ковалентной иммобилизации молекулярных зондов [5]. Ячейки из щеточных полимеров могут обеспечить высокую емкость ковалентной иммобилизации молекулярных зондов, соизмеримую с таковой для 3D-гидрогелевых ячеек. При этом динамическая подвижность полимерных цепей, закрепленных на подложке только одним концом, минимально влияет на диффузию анализируемой пробы к молекулярным зондам, иммобилизованным на щеточных полимерах. Потенциальные преимущества биочипов с ячейками из щеточных полимеров могут быть реализованы только при оптимизации всех стадий процесса получения матрицы ячеек из щеточных полимеров и иммобилизации белковых зондов в ячейках.

Ранее мы сообщали о применимости биочипов с ячейками из щеточных полимеров для анализа последовательностей нуклеиновых кислот [6]. Иммобилизация белковых зондов осложняется возможным многоточечным связыванием белковых зондов с носителем, что затрудняет конформационные изменения белковой макромолекулы при взаимодействии с молекулярной мишенью и влияет на результаты анализа.

Цель данной работы – исследование условий иммобилизации белковых зондов на биочипах с ячейками из щеточных полимеров, получаемых методом фотолитографии, на подложках из полиэтилентерефталата и проверка их применимости для иммунохимического анализа белковых мишеней с индикаторным маркированием проявляющих антител флуоресцентным красителем Cy5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полимерное покрытие полиэтилентерефталата (ПЭТ). На подложку из ПЭТ наносили тонкий слой раствора фотоактивного полимера, поливинилацетата, и фотоинициатора полимеризации, бензофенона, в метилэтилкетоне. Нанесение раствора “при вращении” в центрифуге позволяет

получить тонкий ровный слой полимера. При высыхании растворителя образуется тонкое гидрофобное полимерное покрытие, которое не растворяется и не отслаивается в воде.

Матрица ячеек из щеточных полимеров. Ячейки из щеточных полимеров получали методом фотоинициируемой радикальной полимеризации от поверхности. Бензофенон, находящийся в полимерном поливинилацетатном покрытии, при УФ-облучении инициирует радикальную полимеризацию акриловых мономеров, находящихся в растворе в соприкосновении с полимерным покрытием. Образующиеся полимерные цепи закреплены на поливинилацетатном покрытии одним концом, типа щеток. В зоне УФ-облучения также происходит перекрестное сшивание линейных молекул поливинилацетата в трехмерную сетку с одновременным пришиванием полимерного покрытия к поверхности ПЭТ-подложки [7, 8].

Получаемые ячейки из щеточных полимеров прочно держатся на поверхности подложки, не разрушаются и не отслаиваются в воде и в ацетоне в ультразвуковой бане. Фотолитографический метод позволяет получать упорядоченную матрицу гидрофильных ячеек одного размера с четкими краями на гидрофобной подложке.

Для получения щеточных полимеров использовали водный раствор акриловой кислоты и акриламида. Из смеси мономеров в ходе полимеризации образуются полимерные цепи нерегулярного строения, что уменьшает вероятность их межцепочечного взаимодействия, “складывания” по типу кристаллизации (рис. 1).

Активация ячеек. Для активации карбоксильных групп, находящихся в ячейках на цепях щеточных полимеров, использовали реакцию с *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии активаторов с получением *N*-гидроксисукцинимидных эфиров. В качестве активаторов использовали производные карбодиимида: 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (НВТУ), 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат (ТСТУ), 1-(циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламинорфолин окарбениевый гексафторфосфат (СОМУ), *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC). Активацию проводили в безводном диметилсульфоксиде (DMSO) и водном буферном растворе при pH 5.0. Образующиеся сукцинимидоксикарбонильные группы анализировали по связыванию с аминоксодержащим цианиновым красителем Cy5-NH₂ с последующей ре-

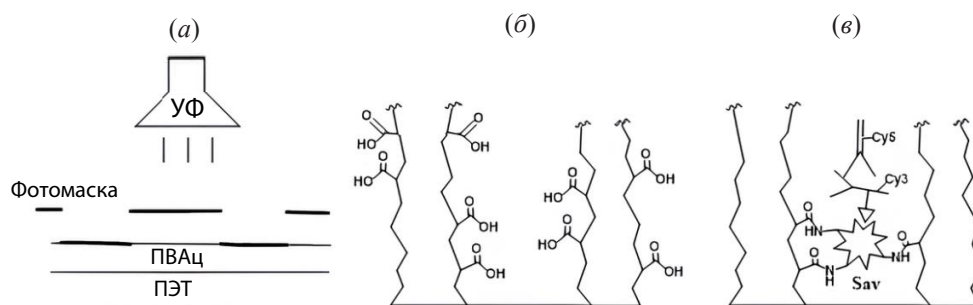


Рис. 1. Схема получения биочипа методом фотолитографии (а), схематичное изображение ячейки из сеточных полимеров (б) и последующей иммобилизации стрептавидина (Sav) и тройного комплекса Sav–Human IgG–Goat anti-Human-Cy5 (в).

гистрацией результатов методом цифровой флуоресцентной микроскопии.

В табл. 1 представлены значения интенсивности флуоресцентных сигналов ячеек биочипа в относительных единицах после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH_2 . Установлено, что во всех случаях активации в безводном органическом растворителе DMSO наблюдается неравномерная активация карбоксильных групп. Изображения ячеек в свете флуоресценции связавшегося красителя очень различаются между собой. В то же время в водном растворе наблюдается равномерная активация карбоксильных групп (рис. 2).

Белки. В работе в качестве модели использовали стрептавидин (Sav), иммуноглобулины человека IgG и специфичные к ним козы антитела (Goat anti-Human IgG). Для контроля иммобилизации белки маркировали предварительно синтезированными флуоресцентными красителями Cy3-pNP и Cy5-pNP . Строение красителей представлено на рис. 3. Красители Cy3 и Cy5 спектрально независимы, что позволяет регистрировать белки, маркированные этими красителями, как индивидуально, так и в смеси. Конъюгаты белков с красителями очищали методом гель-фильтрации.

Концентрацию белка в растворе и количество присоединенных молекул красителя на молекулу белка определяли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента экстинкции $200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (при 280 нм) для стрептавидина, $210\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (при 280 нм) для антител и $150\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (при 550 нм) или $250\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (при 650 нм) для красителей Cy3 и Cy5 соответственно. Конъюгаты Sav-Cy3, Human IgG-Bio-Cy3 и Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5 содержали две молекулы красителя на молекулу белка, а конъюгат Goat anti-Human IgG-Cy5 – три молекулы красителя. Небольшое количество молекул красителя, приходящееся на молекулу белка, незначительно влияет на аффинные и специфические свойства маркированных белков.

Иммобилизация белков в ячейках. Стрептавидин (Sav) и флуоресцентно меченый стрептавидин Sav-Cy3 иммобилизовали в ячейках биочипа при капельном нанесении роботом-манипулятором растворов белков на индивидуальные активированные ячейки по заданной раскладке. В ячейках происходит ковалентное связывание стрептавидина с полимерными цепями амидной связью. После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Таблица 1. Значения интенсивности (I) флуоресцентных сигналов ячеек биочипа на канале Cy5 после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH_2

Параметр	Интенсивность флуоресценции, усл. ед.				
	TSTU/HOSu/DMSO	HBTU/HOSu/DMSO	COMU/HOSu/DMSO	EDC/HOSu/DMSO	EDC/HOSu/MES
$I_{\text{сигнала}}$	6000	4000	5000	2600	35000
$I_{\text{фона}}$	30	30	20	30	80
$\frac{I_{\text{сигнала}}}{I_{\text{фона}}}$	200	133	250	87	438

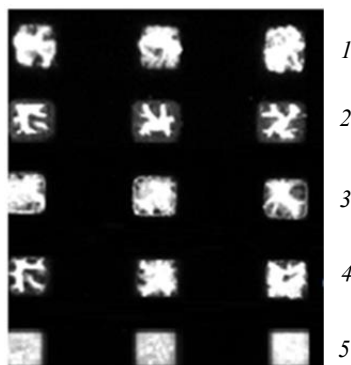


Рис. 2. Флуоресцентное изображение ячеек биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 после активации ячеек различными реагентами и иммобилизации красителя Cy5-NH₂: 1 – активация ячеек EDC/NHS в DMSO, 2 – TSTU/NHS в DMSO, 3 – HBTU/NHS в DMSO, 4 – COMU/NHS в DMSO, 5 – EDC/NHS в MES-буфере.

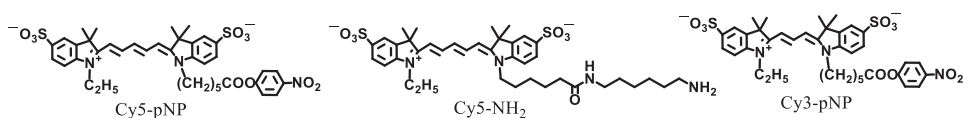


Рис. 3. Схема строения флуоресцентных красителей.

Функциональность стрептавидина, иммобилизованного в ячейках из щеточных полимеров, и его пространственную доступность анализировали по связыванию с биотинилированными козьими антителами, маркированными красителем Cy5. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Биотинилированные иммуноглобулины человека иммобилизовали в ячейках биочипа через специфическую связь биотин–стрептавидин. Изготавливали биочипы с ячейками из щеточных полимеров. Карбоксильные группы на полимерных цепях активировали, иглой робота-манипулятора наносили растворы стрептавидина по заданной раскладке. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов получали биочипы с ковалентно иммобилизованным стрептавидином. Ковалентно иммобилизованный стрептавидин использовали для мягкой нековалентной иммобилизации биотинилированных иммуноглобулинов человека, маркированных красителем Cy3. После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

Проявление иммобилизованных белков. Иммуноглобулины человека, нековалентно иммобилизованные в ячейках биочипа, проявляли козьими антителами, специфичными к иммуноглобулинам

человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5). После инкубации и отмывки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек. На рис. 1в представлено схематичное изображение ячейки из щеточных полимеров для последующей иммобилизации стрептавидина и тройного комплекса Sav-Human IgG-Goat anti-Human-Cy5.

Обсуждение полученных результатов. Подложки из кремния, стекла, полисилоксанов и золота наиболее популярны в исследованиях, связанных с технологией биочипов, что обусловлено легкостью функционализации поверхности и ковалентной иммобилизацией молекулярных зондов [2–4]. Подложки из доступных синтетических полимеров химически и фотохимически достаточно инертны.

Ранее мы сообщали о получении на поверхности полиэтилентерефталата якорных химических групп (без изменения свойств полимерного массива) щелочным гидролизом и аминированием [9, 10]. Подложки из ПЭТ использовали для получения биочипов с двумерными поверхностными ячейками [11] и с трехмерными агарозными ячейками с термоотщепляемыми праймерами [12]. Ранее мы сообщали [6] об использовании подложек из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ) с модификацией поверхности для изготовления биочипов с ячейками из щеточных полимеров. Поверхность ПЭТ покрывали пленкой из циклоолефинсополимера. В ячейках биочипа иммоби-

лизовали ДНК-зонды и продемонстрировали их применимость для анализа нуклеиновых кислот.

В данной работе поверхность ПЭТ модифицировали пленкой из фотоактивного поливинилацетата (ПВАц). Для этого ПЭТ-подложки покрывали тонким слоем раствора поливинилацетата (ПВАц) и бензофенона в органическом растворителе. После высыхания на поверхности ПЭТ образуется полимерная пленка, которая не растворяется в воде и удерживает бензофенон. Сверху наливали раствор мономеров и облучали УФ-светом. Происходит радикальная полимеризация с образованием полимеров в растворе и одновременно полимеризация с образованием щеточных полимеров, связанных одним концом с подложкой. ПВАц-покрытие удерживает бензофенон и препятствует его выходу в водный раствор, что приводит к уменьшению доли полимеров в растворе и увеличению доли щеточных полимеров, связанных с подложкой.

Варьирование условий получения покрытия из ПВАц, органического растворителя, концентрации ПВАц и бензофенона, типа и концентрации мономеров, условий УФ-облучения позволило получить на ПЭТ-подложке ячейки из щеточных полимеров. Ячейки держатся за ПЭТ, не отщепляются и не разрушаются в ацетоне, в котором ПВАц растворим.

Химическая доступность карбоксильных групп, расположенных на полимерных цепях, зависит от ряда факторов. Так, получение щеточных полимеров только из акриловой кислоты позволяет получать отчетливые ячейки, но резко снижается емкость химически доступных карбоксильных групп. Видимо, это связано с межцепочечными взаимодействиями, “складыванием” цепей по типу кристаллизации.

При активации карбоксильных групп, расположенных на цепях щеточных полимеров, наблюдается неравномерность активации в органическом безводном растворителе и более равномерная активация в водном буферном растворе.

Средние значения сигналов и отношение сигнал/фон при активации ячеек в водном растворе существенно выше, чем в безводном DMSO (табл. 1).

Возможная причина неравномерности окрашивания ячеек заключается в том, что карбоксильные и амидные группы на щеточных полимерах способны образовывать водородные связи, и гидрофильные цепи щеточных полимеров в безводных условиях “складываются” по типу

кристаллизации. В водных условиях этот эффект реализуется в меньшей степени. Нерегулярное строение полимерных цепей за счет использования смеси акриловой кислоты и акриламида также уменьшает эффект “складывания”. В пользу этого предположения свидетельствует то, что при использовании только акриловой кислоты на подложке получают отчетливые ячейки, но резко снижается емкость химически доступных карбоксильных групп. В дальнейшем для уменьшения этого эффекта нужно изменять состав мономеров, используемых для получения щеточных полимеров.

Концепция изготовления биочипов с белковыми зондами, иммобилизованными в ячейках из щеточных полимеров, основана на двухэтапном методе. Первоначально в жестких условиях методом фотолитографии получали матрицу гидрофильных ячеек одного размера с четкими границами, регулярно расположенными на гидрофобной поверхности подложки, прочно связанных с подложкой. Затем капельно роботоманипулятором наносили растворы стрептавидина в заранее сформированные ячейки по координатам ячеек. Игла робота-манипулятора забирает из емкости микрокаплю раствора белкового зонда и переносит ее в ячейку. Раствор всасывается гидрофильной ячейкой и не растекается по гидрофобной поверхности, окружающей ячейку. В ячейках белок связывается с предварительно активированными карбоксильными группами амидной связью.

После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек.

На рис. 4 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя $Cy3$ после иммобилизации стрептавидина (Sav) и стрептавидина, маркированного $Cy3$ (Sav- $Cy3$). На графике распределения флуоресцентных сигналов на канале $Cy3$ вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении рядов 2 и 5 со стрептавидином, маркированным красителем Sav- $Cy3$, видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены не совсем равномерно. Так, вычисленные средние сигналы по рядам 2 и 5 с Sav- $Cy3$ составляют 720 и 914 отн. ед. соответственно.

Адсорбированного белка Sav- $Cy3$ вне границ ячеек рядов 1 и 5 нет. При этом сигналы рядов 1 и 4 с иммобилизованным Sav составляют 46 и 53 отн. ед., что близко к среднему сигналу пустых ячеек ряда 3 – 23 отн. ед. Примечательно, что фоновый

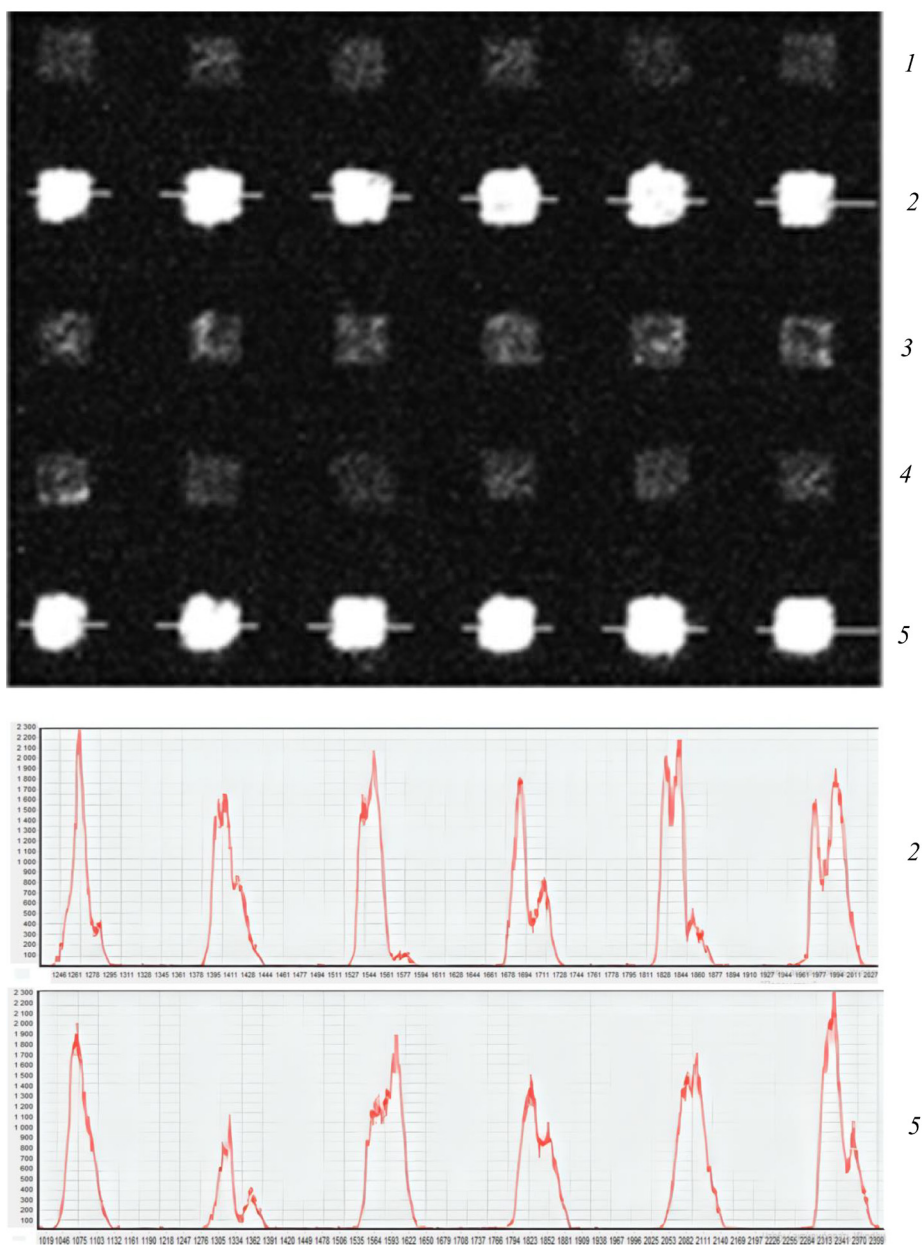


Рис. 4. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cu3 после иммобилизации стрептавидина (Sav) и стрептавидина, маркированного Cu3 (Sav- Cu3): 1 и 4 – Sav, 2 и 5 – Sav- Cu3 , 3 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 2 и 5 на флуоресцентном изображении.

сигнал подложки между ячейками составляет 7 отн. ед. Отношение сигнала к фону, контрастность составляет более 100, отношение сигнала ячеек с иммобилизованными Sav- Cu3 к сигналу пустых ячеек – более 30.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что капельное нанесение раствора белка в заранее сформированную матрицу активированных ячеек из щеточных полимеров вполне применимо.

Иммобилизация белков в ячейках из щеточных полимеров с многочисленными активированными карбоксильными группами может сопровождаться множественным связыванием по аминокетам, экспонированным на поверхности белковой глобулы. В результате аффинность иммобилизованного белка может быть снижена.

На биочип с иммобилизованным Sav- Cu3 и Sav наносили раствор козьих антител против иммуноглобулина человека, маркированных

биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). После инкубации и отмытки от несвязавшихся компонентов на анализаторе флуоресцентного изображения регистрировали флуоресцентные сигналы ячеек. На рис. 5 представлена флуоресцентная картина биочипа на канале Cy5 с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным Cy3 (Sav-Cy3), после инкубации с козьими антителами против иммуноглобулина человека, маркированными биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 4 и 5 на флуоресцентном изображении рядов 4 и 5.

На графике распределения флуоресцентных сигналов на канале Cy5 вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении рядов 4

и 5 со стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным красителем Sav-Cy3, видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Вычисленные средние сигналы по рядам 2 и 5 с иммобилизованным Sav-Cy3 составляют 1034 и 2029 отн. ед. соответственно, для рядов 1 и 4 с иммобилизованным Sav без флуоресцентной метки – 1267 и 1675 отн. ед. соответственно. Средний сигнал ряда 3 с пустыми ячейками составлял 57 отн. ед., отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек – более 18. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 9 отн. ед., что свидетельствует о низкой неспецифической сорбции козьих антител, маркированных биотином и красителем Cy5.

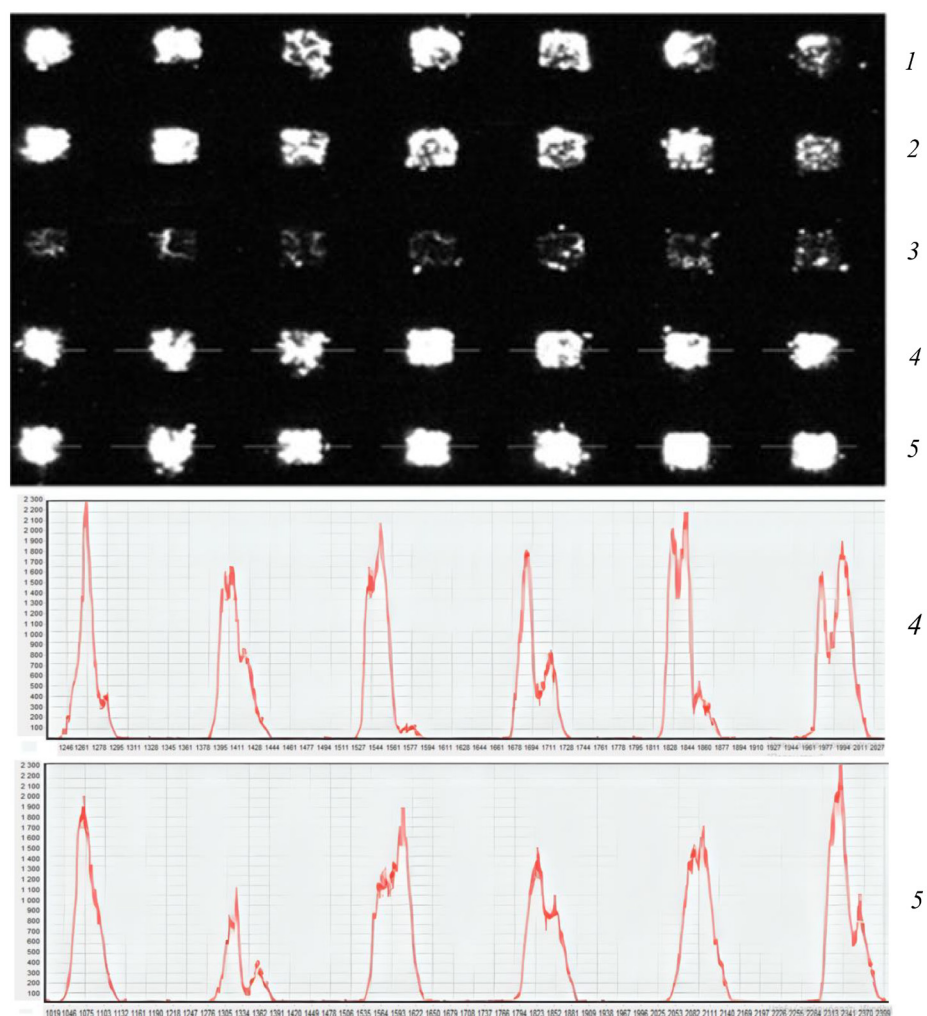


Рис. 5. Флуоресцентная картина биочипа на канале Cy5 с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и стрептавидином, маркированным Cy3 (Sav-Cy3), после инкубации с козьими антителами против иммуноглобулина человека, маркированными биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5). Ряды 1 и 4 содержат Sav, 2 и 5 – Sav-Cy3, 3 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 4 и 5 на флуоресцентном изображении.

В итоге можно сделать вывод о том, что стрептавидин, иммобилизованный в ячейках щеточных полимеров ковалентным связыванием по аминокетам стрептавида, вполне доступен для связывания с биотинилированными антителами. Двойной белковый комплекс может образовываться в ячейках из щеточных полимеров.

Биотинилированные иммуноглобулины человека (Human IgG-Bio-Cy3) нековалентно иммобилизовали в ячейках биочипа через специфическую связь биотин–стрептавидин. На рис. 6 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy3 после иммобилизации Human IgG-Bio-Cy3. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных

линий на флуоресцентном изображении рядов 1 и 3. Видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Средние сигналы для рядов 1 и 3 с иммобилизованным стрептавидином составляют 2190 и 2916 отн. ед. соответственно, средний сигнал ряда 2 с пустыми ячейками – 85 отн. ед., отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек – более 27. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 9 отн. ед., что подтверждает низкую неспецифическую адсорбцию иммуноглобулинов, маркированных биотином и красителем Cy3. Отношение сигнала целевых ячеек к фоновому сигналу составляет более 240.

Затем антитела человека, иммобилизованные в ячейках биочипа, проявляли флуоресцентно

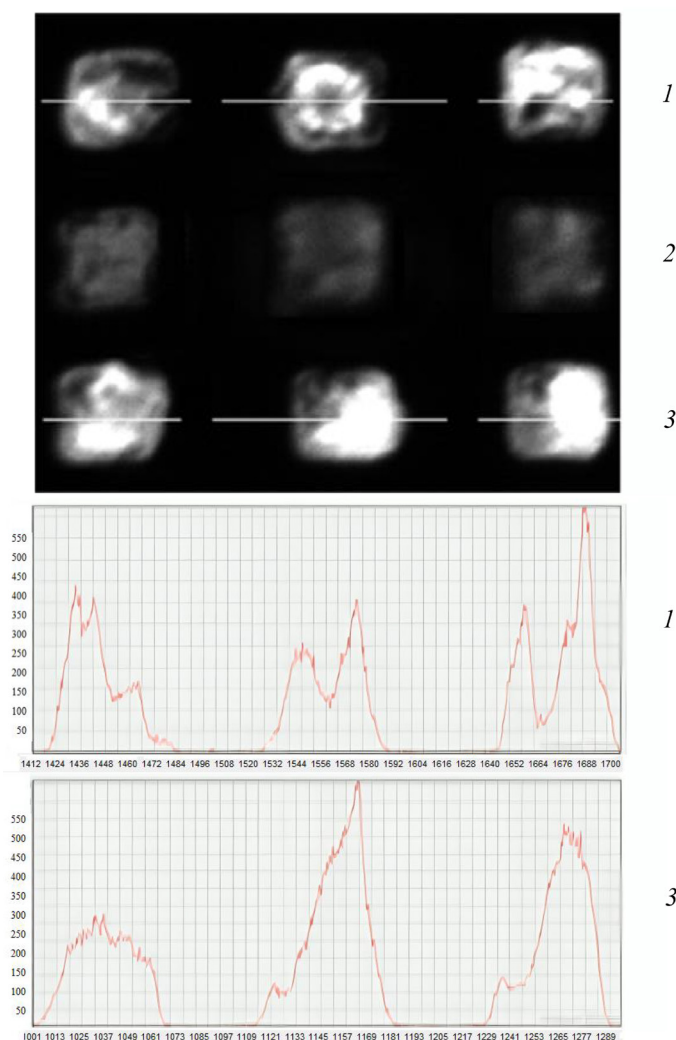


Рис. 6. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy3 с иммобилизованным стрептавидином после инкубации с иммуноглобулинами человека, маркированными биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3) – ряды 1 и 3; ряд 2 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 1 и 3 на флуоресцентном изображении.

мечеными козьими антителами против иммуноглобулинов человека (Goat anti-Human IgG-Cy5). В данном случае иммуноглобулины человека выступают в роли белковой мишени.

На рис. 7 представлена флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 с нековалентно иммобилизованными иммуноглобулинами человека после проявления козьими антителами против иммуноглобулинов человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5). Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении. На графике распределения сигналов вдоль проведенных линий на флуоресцентном изображении видно, что сигналы между ячейками и внутри ячеек распределены неравномерно.

Средние сигналы для рядов 1 и 3 с иммобилизованным стрептавидином составляют 9463 и 8980 отн. ед. соответственно, средний сигнал 2-го ряда с пустыми ячейками – 257 отн. ед. Отношение целевого сигнала к сигналу пустых ячеек составляет более 35, что более чем достаточно для уверенной регистрации белковой мишени. При этом фоновый сигнал подложки между ячейками составляет 95 отн. ед., что свидетельствует о низкой неспецифической сорбции иммуноглобулинов, маркированных биотином и красителем Cy5. Отношение сигнала целевых ячеек к фоновому сигналу составляет более 94. В ячейках могло иметь место многоточечное связывание молекул стрептавида с цепями полимеров, но способность стрептавида связываться с биотинилированными иммуноглобулинами сохраняется.

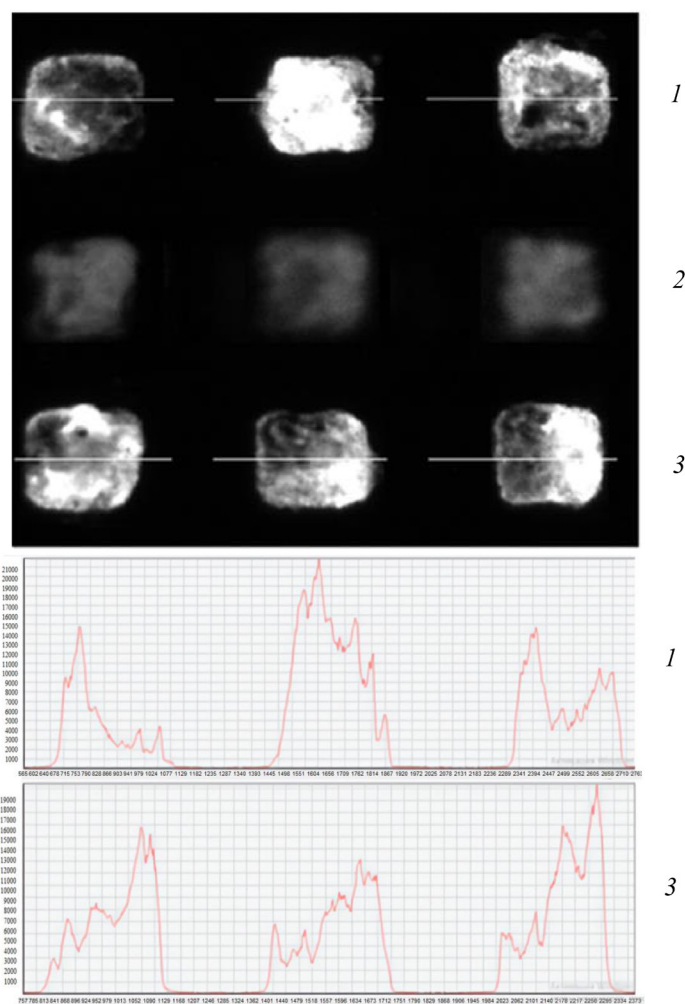


Рис. 7. Флуоресцентная картина биочипа в свете флуоресценции красителя Cy5 с иммобилизованным стрептавидином после инкубации с иммуноглобулинами человека, маркированными биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3), и проявлением козьими антителами против иммуноглобулинов человека, маркированными красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5) – ряды 1 и 3; ряд 2 – пустые ячейки. Показан график распределения сигналов вдоль проведенных линий 1 и 3 на флуоресцентном изображении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использовали пленочный полиэтилентерефталат (ПЭТ) толщиной 125 мкм (ГОСТ 24234-80, плотность 1.39 г/см³, молекулярная масса 20–40 кДа), лист пленки нарезали на части размером 25 × 75 мм и использовали поштучно; поливинилацетат (марка М = 100, ТУ 2215-001-98514529-2007); моющее средство Ultrasonol, 7-Neutral (Art. No 5356.1, Carl Roth, Германия); ди-(*N,N'*-сукцинимидил)карбонат (DSC, Art. No 225827), диметилсульфоксид (DMSO, Art. No D2050000) (Fluka, США); *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDC) (Art. No 22981, Acros, Бельгия); *N*-гидроксисукцинимид (HONSu) (Art. No AAA1031214, Alfa Aesar, Германия); 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU, Art. No AAL1347003), 2-сукцинимидо-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат (TSTU, Art. No AAL1353806), акриловая кислота (Art. No L04280) (Alfa Aesar, Германия); 1-(циано-2-этокси-2-оксоэтиленаминоокси)диметиламино-морфолино-карбениевый гексафторфосфат (COMU, Art. No 8.51085), диизопропилэтиламин (DIPEA, Art. No 496219), триэтиламмоний гидрокарбонат (TEAHC, Art. No 90360) (Aldrich, США); бензофенон (Art. No AC219680500), Tween 20 (Art. No 233360050) (Acros, Бельгия); акриламид (Art. No A1090.0500, Panreac, Испания); 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота (Art. No M8250, Sigma, США); биотин-ПЭГ4-NHS-эфир (Bio-Su) (Lumiprobe, Россия); антитела козы против иммуноглобулинов человека (Goat anti-Human IgG) (Bethyl Laboratoriies, США); иммуноглобулины человека (Human IgG) (Имтех, Россия); стрептавидин (Sav) (Art. No SA101), Sephadex G-25 Superfine (Art. No S5772), фосфатный буфер солевой (Art. No 6506) (Sigma, США); ацетон, метилэтилкетон, фосфора пятиокись, дихлорметан, ацетонитрил (Химмед, Россия); красители: *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндокарбоцианин-1'-пентаметиленкарбоновой кислоты (Cy5-pNP), *пара*-нитрофениловый эфир 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфоиндокарбоцианин-1'-пентаметиленкарбоновой кислоты (Cy3-pNP), 1-этил-3,3,3',3'-тетраметил-5,5'-дисульфо-1'-(1-амино-7-аза-6-кето-тридекан-13-ил) индокарбоцианин (Cy5-NH₂) – синтезировали по методу Spitsyn et al. [13]. Химическое строение красителей представлено на рис. 3. Все растворители и исходные реагенты аналитического ка-

чества были получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Оборудование. В работе использовали ультразвуковую баню S 30 (Elmasonic, Германия), мини-центрифугу FV-2400 (Biosan, Латвия), УФ-осветитель ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой ДРК-120 (Россия), шейкер с нагревом Heating thermoshaker MHR 13 (Hettich, Германия), спектрофотометр DU 730 (Beckman Coulter Spectrophotometer, США), робот-манипулятор QArray (Genetix, Великобритания), двухканальный портативный анализатор флуоресцентного изображения [14], канал флуоресценции красителя Cy5 с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 690 ± 40 нм (Semrock, США), канал флуоресценции красителя Cy3 с лазерным возбуждением при 535 нм, запирающим фильтром 580 ± 27 нм (Semrock, США) и цифровой ПЗС-камерой (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия). Флуоресцентные изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

Подготовка поверхности полиэтилентерефталатных (ПЭТ) подложек. Для удаления возможных загрязнений с поверхности подложки последовательно промывали 2%-ным раствором моющего средства в деионизированной воде (в ультразвуковой бане в течение 10 мин), струей деионизированной воды (в течение 1 мин) и ацетоном (в ультразвуковой бане в течение 30 мин). Подготовленные подложки сушили при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе и хранили в эксикаторе до использования.

Полимерное покрытие поверхности подложек. ПЭТ-подложки покрывали раствором 2%-ного поливинилацета и 0.5%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении 1000 об/мин в течение 5 мин (spin coating), сушили на открытом воздухе в течение 1 ч. Для покрытия поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги FV-2400 (Biosan, Латвия) с изготовленным дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращался в закрытом кожухе.

Получение ячеек из щеточных полимеров. Подложку с поливинилацетатным покрытием помещали горизонтально в держатель, сверху на рабочую область накладывали рамку, вырезанную из тетрафторэтилена толщиной 10 мкм, внутрь рамки вносили раствор 0.15 М акриловой кислоты и 0.75 М акриламида в деионизированной воде, сверху накладывали фотомаску и плотно зажимали в держателе. Рамка из тетрафторэти-

лена – это кольцевой спейсер, который определяет расстояние от подложки до фотомаски и формирует камеру высотой 10 мкм. Количество раствора, вносимого внутрь рамки, и покрытие сверху фотомаской обеспечивают отсутствие пузырей воздуха в камере. Фотомаску накладывали рабочей поверхностью вниз, чтобы препятствовать аберрации света при облучении. Фотомаска изготовлена на кварцевом стекле размером 25×75 мм 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 УФ-осветителя в течение 20 мин. Расстояние от УФ-осветителя до фотомаски составляло 10 см. После окончания облучения камеру разбирали, подложки поочередно промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин, ацетоном в ультразвуковой бане в течение 1 ч и деионизированной водой при 95°C в течение 6 ч. Капли воды с поверхности подложки удаляли обдувкой струей воздуха, сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение 16 ч. Хранили в эксикаторе над свежим P_2O_5 (рис. 1а).

Активация ячеек биочипа. Карбоксильные группы в ячейках биочипа активировали получением *N*-гидроксисукцинимидных эфиров. На биочипе с ячейками из щеточных полимеров формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере составляла 50 мм^2 . В камеру вносили 35 мкл свежеприготовленного активирующего раствора. Реакцию проводили при 37°C в течение 5 ч. После окончания реакции камеру разбирали, подложки промывали DMSO, затем дихлорметаном или MES-буфером (в зависимости от растворителя, используемого при активации). Подложки сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Ковалентная иммобилизация флуоресцентного красителя в ячейках биочипа. На биочипе с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере составляла 50 мм^2 . В камеру вносили 35 мкл раствора красителя Cy5-NH_2 с концентрацией 1 мМ, диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 мМ в DMSO, 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 карбоксильными группами, подложки тщательно отмывали. Для этого пленку помещали в закрытую пробирку из полипропилена с 40 мл 50%-ного раствором ацетонитрила в 50 мМ триэтиламонийгидрокарбонате (pH 8.5), 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 (рис. 3).

Получение конъюгатов белков со стрептавидином и красителями. Конъюгат Sav-Cy3 синтезировали реакцией стрептавидина (Sav) с красителем Cy3-pNP. Конъюгат HumanIgG-Bio-Cy3 получали одновременной реакцией иммуноглобулинов человека (Human IgG) с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина (Bio-Su) и красителем Cy3-pNP. Для синтеза конъюгатов антител козы Goat anti-Human IgG-Cy5 и Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5 использовали реакции антител козы Goat anti-Human IgG с красителем Cy5-pNP или одновременно со смесью Bio-Su и красителем Cy5-pNP. Синтез конъюгатов выполняли по ранее разработанной методике [15].

К раствору белка с концентрацией 10^{-4} М в 0.1 М карбонатном буфере при pH 8.5 и охлаждении на льду добавляли краситель Cy3-pNP, или краситель Cy5-pNP, или смесь красителя Cy3-pNP и биотин-ПЭГ4-NHS-эфира, или смесь красителя Cy5-pNP и биотин-ПЭГ4-NHS-эфира в молярном соотношении 100 : 1 каждого маркера к маркируемому белку. Маркеры к раствору белка добавляли в виде раствора в DMSO с концентрацией 100 мкг/мкл. Реакционную смесь инкубировали при 4°C в течение 2 ч. Конъюгаты очищали методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 superfine, элюировали PBS-буфером (0.15 М NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.2).

Ковалентная иммобилизация стрептавидина в ячейках биочипа. Растворы стрептавидина (Sav) и конъюгата стрептавидина с красителем Cy3 (Sav-Cy3) с концентрацией 1.7 мкг/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 30% глицерина, наносили роботом-манипулятором иглой диаметром 200 мкм в ячейки с активированными карбоксильными группами. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 16 ч при 5°C и дополнительно 4 ч при 25°C . Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1 : 7. После инкубации подложки выдерживали в 0.1 М растворе этанол-

амин в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп. Затем отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1%-ным Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин. Подложки сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Нековалентная иммобилизация биотинилированных козьих антител (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5) в ячейках биочипа. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованным стрептавидином (Sav) и конъюгатом стрептавидина с красителем Cy3 (Sav-Cy3) формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.01 мкг/мкл конъюгата козьих антител с биотином и красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Bio-Cy5) в PBS-буфере, pH 7.4, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Затем биочипы отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1%-ным Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин. Биочипы сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в закрытой коробке при 5°C до использования.

Нековалентная иммобилизация биотинилированных иммуноглобулинов человека в ячейках биочипа. На первом этапе растворы стрептавидина (Sav) с концентрацией 1.7 мкг/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (pH 9.0), содержащем 30% глицерина, наносили роботом-манипулятором иглой диаметром 200 мкм в ячейки биочипа с активированными карбоксильными группами по заданной раскладке. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 16 ч при 5°C и дополнительно 4 ч при 25°C. Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1 : 7. Биочипы отмывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST) при комнатной температуре (pH 7.4) в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

На втором этапе на подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммобилизованным стрептавидином (Sav) формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.01 мкг/мкл конъюгата иммуноглобулинов человека с биотином и красителем Cy3 (Human IgG-Bio-Cy3) в PBS-буфере (pH 7.4), инкубировали при комнатной

температуре в течение 2 ч. Раствор из камеры удаляли, камеру разбирали. Биочипы промывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

Проявление козьими антителами иммуноглобулинов человека, иммобилизованных в ячейках биочипа. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с иммуноглобулинами человека (Human IgG-Bio-Cy3), нековалентно иммобилизованными через стрептавидин (Sav), формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере – 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора, содержащего 0.005 мкг/мкл конъюгата козьих антител с красителем Cy5 (Goat anti-Human IgG-Cy5) в PBS-буфере (pH 7.4), инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. Раствор из камеры удаляли, камеру разбирали. Биочипы промывали на шейкере в фосфатно-солевом буфере с 1% Tween 20 (PBST), pH 7.4, при комнатной температуре в течение 40 мин, затем сушили обдувкой струей воздуха при комнатной температуре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучали способы получения на поверхности полиэтилентерефталатных (ПЭТ) подложек матрицы ячеек из щеточных полимеров с многочисленными реактивными группами с последующей иммобилизации белков для использования в иммунофлуоресцентном анализе. Поверхность ПЭТ-подложек предварительно покрывали тонким слоем поливинилацетата с добавкой бензофенона, которые не растворимы в воде. Поверхность подложки покрывали водным раствором смеси акрилатных мономеров, акриламида и акриловой кислоты. При УФ-облучении через фотомаску в зоне облучения происходит фотоиндуцированная сополимеризация мономеров. После отмывки на поверхности подложки в зоне УФ-облучения остаются ячейки из полимеров, связанных одним концом с поверхностью подложки, щеточных полимеров. Ячейки прочно держатся на поверхности ПЭТ-подложки, содержат многочисленные реактивные карбоксильные группы, пригодные для ковалентной иммобилизации белковых и иных молекулярных мишеней.

Изучали методы активации ячеек из щеточных полимеров и ковалентной иммобилизации в ячейках белка стрептавидина. Разработан метод, сохраняющий функциональность стрептавидина и

его пространственную доступность для связывания с биотинилированным иммуноглобулином и последующим проявлением антителами. флуоресцентно меченными красителем Cy5.

Биочипы с ячейками их щеточных полимеров на подложке из пленочного полиэтилентерефталата представляются перспективными для дальнейшего совершенствования с целью использования в иммунофлуоресцентном анализе белковых мишеней для развития технологий микроанализа “лаборатория на чипе”.

В настоящее время не решен вопрос с равномерностью иммобилизации крупных белковых молекул в ячейках биочипа. Возможное решение проблемы может заключаться в изменении состава мономеров, используемых для получения щеточных полимеров, регулировании плотности и равномерности распределения полимерных цепей в ячейках биочипа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobitshev A., Dubiley S., Mirzabekov A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 4913–4918. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4913>
2. *Brittain W.J., Brandstetter T., Prucker O., Rühle J.* // ACS Appl. Mat. Int. 2019. V. 11. P. 39397–39409. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06838>
3. *Sangermano M., Razza N.* // Express Polym. Lett. 2019. V. 13. P. 135–145. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2019.13>
4. *Mueller M., Bandl C., Kern W.* // Polymers. 2022. V. 14. P. 608. <https://doi.org/10.3390/polym14030608>
5. *Ma J., Luan S., Song L., Jin J., Yuan S., Yan S., Yang H., Shi H., Yin J.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014. V. 6. P. 1971–1978. <https://doi.org/10.1021/am405017h>
6. *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>
7. *Sim Y.J., Seo E.K., Choi G.J., Yoon S.J., Jang J.* // J. Korean Soc. Dyers Finishers. 2009. V. 21. P. 33–38. <https://doi.org/10.5764/TCF.2009.21.4.033>
8. *Qu B.J., Xu Y.H., Ding L.H., Ranby B.* // J. Polym. Sci. A Polym. Chem. 2000. V. 38. P. 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)
9. *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>
10. *Shtylev G.F., Shishkin I.Yu., Lapa S.A., Shershov V.E., Barsky V.E., Polyakov S.A., Vasiliskov V.A., Zasedateleva O.A., Kuznetsova A.V., Chudinov A.V.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2024. V. 50. P. 2050–2057. <https://doi.org/10.1134/S106816202405039X>
11. *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>
12. *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>
13. *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 Pigments. 2017. V. 147. P. 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052>
14. *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>
15. *Zasedateleva O.A., Mikheikin A.L., Turygin A.Y., Prokopenko D.V., Chudinov A.V., Belobritskaya E.E., Chechetkin V.R., Zasedatelev A.S.* // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. P. e61. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn246>

Immobilization of Protein Probes on Biochips with Brush Polymer Cells

G. F. Shtylev*, I. Yu. Shishkin*, V. E. Shershov*, V. E. Kuznetsova*, D. A. Kachulyak*,
V. I. Butvilovskaya*, A. I. Levashova*, V. A. Vasiliskov*,
O. A. Zasedateleva*, and A. V. Chudinov*,#

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

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

The methods of obtaining a polymer coating from polyvinyl acetate on the surface of polyethylene terephthalate polymer substrates and subsequent production by photoinduced radical copolymerization of acrylate monomers of brush polymers have been studied. Cell matrices with numerous reactive chemical groups were formed by photolithography for subsequent immobilization of proteins. Methods of activation of carboxyl groups on brush polymers attached to the surface of polyethylene terephthalate have been tested. Immobilization of the streptavidin model protein labeled with fluorescent dye Cy3 was performed to test the activation method of carboxyl groups. A variant of immunofluorescence analysis in the format of a biological microchip was tested on the streptavidin – biotinylated immunoglobulin model. Streptavidin, immobilized in brush polymer cells, retains functionality and spatial accessibility for binding to biotinylated immunoglobulin and subsequent manifestation by antibodies fluorescently labeled with Cy5 dye, which opens up prospects for the use of biological microchips with brush polymer cells on polyethylene terephthalate substrates for immunofluorescence analysis of various protein targets.

Keywords: microarray, brush polymers, protein conjugation, protein immobilization, fluorescent immunoassay