

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-123

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
НА «ЩЕТОЧНЫХ» БИОЧИПАХ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР*****DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR THE ANALYSIS OF BACTERIAL PATHOGENS
ON “BRUSH” BIOCHIPS BY SOLID-PHASE MULTIPLEX PCR**

И. Ю. Шишкин, К. А. Синников, П. А. Чиркова, С. А. Лапа, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

I. Yu. Shishkin, K. A. Sinnikov, P. A. Chirkova, S. A. Lapa, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ shishkin.iv2017@yandex.ru

Аннотация

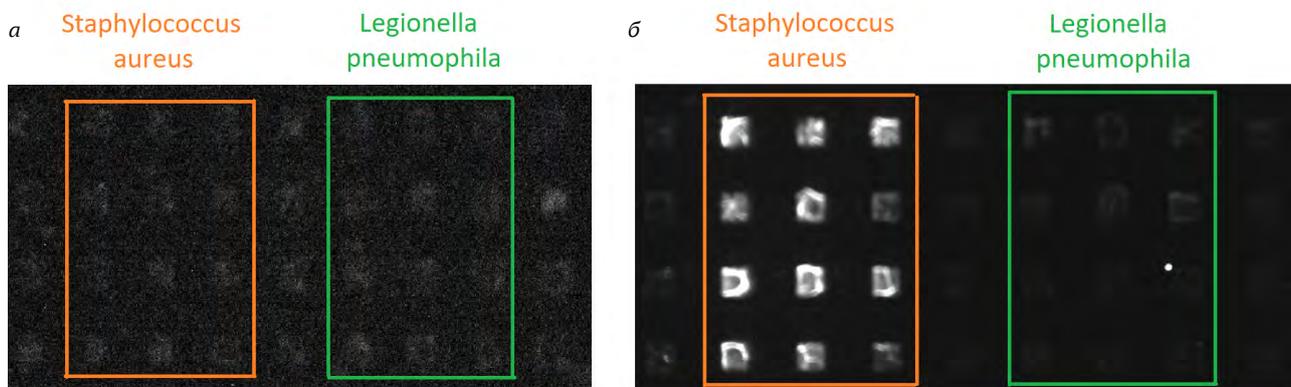
Методом фотолитографии на полимерных подложках получена матрица гидрогелевых ячеек, содержащих полимерные «щетки» с активными группами. Проведена ковалентная иммобилизация обратных праймеров, специфичных к *Staphylococcus aureus* или *Legionella pneumophila*, в соответствующие ячейки с последующей амплификацией в герметичной камере собранных биочипов.

Abstract

A matrix of hydrogel cells containing polymer “brushes” with active groups was obtained by photolithography on polymer substrates. Covalent immobilization of reverse primers specific to *Staphylococcus aureus* or *Legionella pneumophila* into the corresponding cells was performed, followed by amplification in a sealed chamber of the assembled biochips.

В технологии ДНК-биочипов используют коммерчески доступные материалы с низкой автофлуоресценцией, поэтому в качестве материала для подложки был выбран полиэтилентерефталат (ПЭТ). Проведение ПЦР на биочипах позволяет получать результаты параллельного анализа сразу на множество маркеров, что представляет значительный интерес в развитии медицинской диагностики.

Поверхность ПЭТ покрывали слоем фотоактивного полимера поливинилацетата (ПВАц) с фотоинициатором на центрифуге методом сбрасывания избытка раствора (*spin-coating*). Подбор концентрации фотоактивного полимера и фотоинициатора проводился экспериментально. Для получения матрицы ячеек на поверхности биочипов использовали метод фотолитографии. Для этого подложки помещали в специальный кондуктор, приливали раствор мономеров и облучали УФ-светом при длине волны 254 нм через кварцевую фотомаску с металлическим напылением. Размер одной ячейки 200 × 200 мкм, расстояние между ячейками 600 мкм. В качестве фотоиници-



Снимки с флуоресцентного микроскопа «щеточного» биочипа после проведения ПЦР на матрице *Staphylococcus aureus*:
а — до проведения ПЦР; б — после проведения ПЦР и отмывки

* Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ (№ 20-14-00287-П).

атора был выбран бензофенон из-за его эффективной способности при облучении в его диапазоне поглощения отрывать протоны от поверхности фотоактивного полимера с образованием радикалов, необходимых для роста полимерных «щеток». В качестве мономеров использовали акриловую кислоту и акриламид. Подбор концентрации и соотношения мономеров проводился экспериментально. Активацию карбоксильных групп полимерных «щеток» проводили N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом с добавлением N-гидроксисукцинимидом в буфере MES (pH = 5,4). Поверхность дополнительно блокировали от неспецифической сорбции компонентов ПЦР фосфатно-солевым буферным раствором PBS с pH = 7,2, содержащим Твин 20. Праймеры, специфичные к *Staphylococcus aureus* или *Legionella pneumophila*, были нанесены в соответствующие ячейки пином робота-манипулятора. После иммобилизации отмывку от непрореагировавших праймеров проводили в растворе триэтилламмонийгидрокарбоната в MQ/ацетонитрил (1 : 1). Непрореагировавшие сукцинимидные эфиры на полимерных «щетках» блокировали раствором лизина в PBS (pH = 7,4). Таким образом, были получены «щеточные» биочипы с ковалентно иммобилизованными праймерами.

ПЦР проводили в герметичной камере собранных биочипов в специальном термоциклере. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *Staphylococcus aureus* 10⁶ копий. В раствор помимо основных компонентов ПЦР добавляли набор прямых и обратных фланкирующих праймеров к обоим возбудителям в строгом соотношении, а также флуоресцентно-меченный дезоксиридинтрифосфат, необходимый для последующей регистрации. После амплификации чипы отмывали 1X Taq ПЦР-буфером при температуре 95 °С и проводили регистрацию сигналов на флуоресцентном микроскопе (см. рисунок). Среднее соотношение сигнала к фону от целевых ячеек чипов, в которые были иммобилизованы праймеры к *Staphylococcus aureus*, к фону составляло 7 : 1, что является допустимым. Соотношение сигналов от нецелевых ячеек соизмеримо с фоновым. Из результатов видно, что ПЦР на «щеточных» биочипах проходит специфично и не наблюдается сильной сорбции меченого трифосфата и продуктов ПЦР в растворе на их поверхности.