

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЙ БИОЧИП С «УМНЫМИ» ГИДРОГЕЛЕВЫМИ ЯЧЕЙКАМИ

А.М. Золотов, А.Ю. Иконникова, В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Лаборатория на чипе – это устройство, совмещающее несколько лабораторных функций в единый миниатюрный прибор, называемый чипом, на базе которого возможен многопараметрический анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Цель работы – разработка агарозных ячеек биочипа, содержащие термоотщепляемые праймеры. Задача заключается в получении «умного» геля, который при внешнем воздействии отщепляет присоединенные к гелю целевые молекулы, но и сохраняет свои механические свойства.

В данной работе реакцией агарозы с ангидридом метакриловой кислоты часть первичных гидроксильных групп замещается на фрагменты метакриловой кислоты. Затем на первичные гидроксильные группы агарозы конденсируются олигомеры полигликолевой кислоты, как описано в работе [1]. Условия модификации агарозы оптимизировали с контролем степени замещения гидроксильных групп углеводного полимера. Модифицированный агарозный гель сохраняет способность к термозависимому фазовому переходу плавления-гелеобразования. Также в работе представлен метод получения флокулированного осадка модифицированной агарозы, который при растворении в смеси воды, диоксана и диметилформамида приводит к критическому раствору агарозы – раствор способен при комнатной температуре необратимо гелеобразоваться. Раствор солюбилизированной модифицированной агарозы с метиленабисакриламидом и фотоинициатором в виде матрицы микрокапель наносили иглой робота манипулятора на активированную поверхность полимерной подложки при комнатной температуре. Диаметр капель 150 мкм, шаг 300 мкм, капли при стоянии затвердевают. При фотооблучении происходит кросс-сшивание агарозы с образованием плотных ячеек, связанных ковалентными связями с подложкой. Карбоксильные группы на полигликолевых линкерах при этом сохраняются. После активации карбоксильные группы связывали пептидной связью с парой олигонуклеотидов, несущих на 5'-конце первичную аминогруппу и флуоресцентный краситель Су3. Количество олигонуклеотидов, связанных с подложкой контролировали методом цифровой флуоресцентной микроскопии по флуоресценции красителя Су3.

При 95° С олигонуклеотиды, связанные с агарозой, отщепляются и переходят в гель, из которого они легко вымываются водой. По флуоресценции агарозных ячеек в диапазоне Су3 оценивали количественные характеристики термоотщепления олигонуклеотидов от агарозного геля.

Олигонуклеотиды отщепившиеся от агарозных ячеек использовали в качестве праймеров в симметричной ПЦР с фрагментом ДНК участка последовательности 7 экзона гена АВО человека, который детерминирует серологический фенотип группы крови АВО. Результаты ПЦР контролировали методом электрофореза в 4 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. На электрофореграмме четко фиксируются продукт ПЦР, соответствующей длины.

Установлено, что модификация агарозы позволяет получить «умный» гель, который выполняет подаваемую с помощью нагрева команду, отщепляет присоединенные к гелю целевые молекулы ДНК с сохранением их функциональных свойств.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-04-02062а.

ЛИТЕРАТУРА

1 Pinkus A.G., Subramanyam R. New high-yield, one-step synthesis of polyglycolide from haloacetic acids //Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition. – 1984. – Т. 22. – №. 5. – С. 1131–1140.