

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНОЙ ПЛЕНКИ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭТИХ ГРУПП С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2018 г. Р.А. Мифтахов, С.А. Лапа, В.Е. Шершов, О.А. Заседателева, Т.О. Гусейнов, М.А. Спицын, В.Е. Кузнецова, Д.Д. Мамаев, Ю.П. Лысов, В.Е. Барский, Э.Н. Тимофеев, А.С. Заседателев, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: chud@eimb.ru

Поступила в редакцию 14.05.18 г.

На основе цифровой люминесцентной микроскопии с использованием цианинового флуорохрома Су5 разработан метод количественной оценки поверхностной концентрации химически доступных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки. Разработан метод получения активных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки и ковалентной иммобилизации аминокислотсодержащей молекулярной конструкции.

Ключевые слова: флуоресценция, цианиновые красители, активация поверхности ПЭТ.

DOI: 10.1134/S000630291804004X

При исследовании биологически активных макромолекул используют разные форматы проведения анализа. Один из таких форматов основан на регистрации результатов анализов, проведенных на поверхности твердой подложки с использованием микроколичеств исследуемого вещества. На этом принципе работают диагностические полоски для определения уровня сахара в крови [1], индикаторные тесты на беременность [2], иммунохроматографические полоски (стрипы) [3], олигонуклеотидные и белковые биологические микрочипы [4–6]. Подложки выполняют технологические функции, обеспечивая удобство выполнения анализа. Однако чаще подложки используются функционально, когда один или несколько компонентов, участвующих в анализе, ковалентно связаны с поверхностью подложки. В качестве подложек используют различные материалы: стекло, кварц, кремний, различные природные и синтетические полимеры. Для традиционно используемых материалов – стекла, кварца и кремния – хорошо отработаны методы химической активации поверхности и пришивки функциональных групп с использованием различных производных силана [7,8]. При этом весьма важным оказывается количественный анализ кон-

центрации активных групп на поверхности подложки.

Для биомедицинских анализов, включающих проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) на поверхности подложки, необходимо использование термостойких материалов с высокой теплопроводностью и малой теплоемкостью, что может быть достигнуто уменьшением толщины подложки. Тонкие подложки из кремнийсодержащих материалов хрупкие, что затрудняет работу с ними. Альтернативой стеклянным, кварцевым и кремниевым подложкам могут быть подложки из синтетических полимерных материалов. При этом должна быть осуществлена пришивка на поверхности полимерной подложки реактивных функциональных химических групп, необходимых для ковалентной иммобилизации компонентов биоанализа. По физическим и химическим параметрам материал подложки должен быть совместим с процедурой и компонентами, используемыми для проведения анализа. В процессе ПЦР используются температуры до 95°C, поэтому полимерный материал не должен размягчаться при температурах до 100°C.

Для проведения ПЦР с термоциклированием традиционно используются пробирки из полипропилена с толщиной стенок 0,2 мм. Полипропилен имеет температуру размягчения 140°C и плавления 175°C, его теплопровод-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, ПЭТ – полиэтилентерефталат.

ность – 0,16 Вт/МК, а удельная теплоемкость – 1,93 кДж/кг[°]С. Полипропилен оптически прозрачен в видимом диапазоне длин волн и слабо поглощает в ближнем ИК-диапазоне, имея коэффициент пропускания 0,22 при 980 нм. Он представляет собой полиолефин с различной степенью разветвления и не содержит реактивных химических групп. Активация поверхности полипропилена с целью прививки функциональных групп достаточно сложна. Для активации поверхности полипропилена, так же как и полиэтилена, используют жесткое ионизирующее излучение [9], фотоиндуцируемую прививку молекул с реактивными химическими группами [10], окисление в жестких условиях [11].

Альтернативой полипропилену может быть полиэтилентерефталат (ПЭТ). Он имеет температуру размягчения 245[°]С и плавления – 260[°]С. Коэффициент теплопроводности ПЭТ 0,14 Вт/МК, удельная теплоемкость – 1,03 кДж/кг[°]С. ПЭТ является высококристаллическим термопластичным полимером, прозрачным в видимом и ближнем ИК свете (коэффициент пропускания 0,898 при 980 нм), химически стоек, биосовместим [12]. По спектральным и теплофизическим свойствам ПЭТ не уступает полипропилену. Пленки из ПЭТ недорогие и практически доступны различной толщины. Для модификации поверхности ПЭТ используют различные физико-химические методы, включающие обработку плазмой [13], коронным разрядом [14], бомбардировку ионами с высокой энергией [15], лазерное облучение [16], фотоиндуцируемую прививку полимеров с реактивными химическими группами [17].

ПЭТ представляет собой продукт линейной поликонденсации терефталевой кислоты и этиленгликоля, он содержит сложноэфирные группы, которые могут быть трансформированы в реактивные группы традиционными химическими методами – щелочным гидролизом [18], аминолизом [19], восстановлением [20], включением в полимерный массив полиэтиленгликоля [21]. При решении биомедицинских задач, связанных с модификацией поверхности пленок из ПЭТ, часто используют гидролиз сложноэфирных групп на поверхности полимера растворами гидроксида натрия или калия [22]. При этом на поверхности пленки образуются реактивные карбоксильные и гидроксильные группы. Карбоксильные группы используют для дальнейшей химической трансформации и ковалентного связывания с биомолекулами [23]. В неконтролируемых или жестких условиях происходит выщепление фрагментов полимерной макромолекулы из полимерного массива, что приводит

к эрозии и деградации поверхности с последующим полным разрушением полимера [24,25].

Визуализация и количественный анализ концентрации карбоксильных групп, образующихся на поверхности пленок ПЭТ при щелочной обработке, является важной задачей, необходимой в случае применения пленок ПЭТ для биомедицинских задач. Для контроля химических групп, расположенных на поверхности полимеров, в том числе ПЭТ, используют метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии [19, 20]. Энергия, которую поглощают атомы, находящиеся на поверхности образца, зависит от других атомов, находящихся в ближайшем окружении, что позволяет определять химические группы и их поверхностную концентрацию. По сути, проводится элементный анализ поверхности. Метод высокочувствительный и точный, но достаточно сложен и требует дорогостоящего оборудования. Не все определяемые этим методом карбоксильные группы могут в дальнейшем вступать в химические реакции. Значительная часть карбоксильных групп, расположенных на поверхности полимерного массива, оказывается стерически недоступной для химических реакций [20]. Методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии определили предельную концентрацию карбоксильных групп, которые можно получить на поверхности ПЭТ щелочным гидролизом. Полученное значение составляет $2,5 \cdot 10^{13}$ групп на 1 см² (или 41,5 пмоль/см²) [20].

Для контроля концентрации карбоксильных групп, находящихся на поверхности полимерной пленки, предложено использовать основной краситель Толуидиновый синий О [26,27]. При рН 10 краситель электростатически сорбируется карбоксильными группами. После отмывки от несвязавшегося красителя пленку обрабатывают 50%-й уксусной кислотой, а десорбированный краситель определяют фотоколориметрически. Количество измеренного красителя зависит не только от концентрации карбоксильных групп на поверхности. Полимерные пленки достаточно гидрофобны и физически сорбируют полиароматический краситель. Поэтому количество красителя, связавшегося с поверхностью, зависит от условий сорбции, отмывки и десорбции. Фотоколориметрический метод является недостаточно воспроизводимым и недостаточно чувствительным [26]. Так, в работе [28] концентрацию карбоксильных групп на поверхности ПЭТ пленки (Dupont, США) при обработке 4 N NaOH при 70[°]С в течение 50 мин оценили по связыванию с красителем Толуидиновый синий О и нашли равной 200 пмоль/см².

Поверхностная концентрация карбоксильных групп, образующихся в результате щелочного гидролиза ПЭТ-пленки, сильно зависит от марки полимера, способа изготовления пленки, условий щелочного гидролиза. При анализе по связыванию с индикаторным веществом измеряемая концентрация карбоксильных групп дополнительно зависит от условий активации карбоксильных групп и условий ковалентного связывания с индикаторным веществом. Химическая доступность карбоксильных групп, находящихся на твердой поверхности, зависит также от геометрических размеров и конформационной гибкости соединения, взаимодействующего с поверхностной карбоксильной группой. В ряде случаев оказывается более важной не общая концентрация карбоксильных групп, а концентрация доступных карбоксильных групп, способных ковалентно связываться с молекулами заданного вещества.

В работе [29] концентрацию реакционно-способных карбоксильных групп на поверхности ПЭТ (Mylar, Dupont, ASTM D1505-66 M.W. 88800) оценивали по ковалентному связыванию с радиоактивно-мечеными ^3H глицином и ^3H лизином при соблюдении условий проведения предыдущих стадий. Количество связавшихся индикаторных аминокислот определяли радиометрически. Щелочную обработку пленки проводили 0,25 N NaOH при 60°C в течение 18 ч. При маркировании глицином концентрация реакционно-способных карбоксильных групп составляла примерно 14,4 $\mu\text{моль}/\text{см}^2$, а при маркировании лизином – примерно 6,3 $\mu\text{моль}/\text{см}^2$. Более чем двукратное различие между результатами может быть объяснено различием пространственных размеров аминокислот.

Для оценки свойств поверхности используют методы сканирующей электронной микроскопии, отражательной инфракрасной Фурье-спектроскопии, флуоресцентной микроскопии, измерение контактного угла смачивания водой [30]. В работе [31] для относительной оценки концентрации карбоксильных групп, находящихся на поверхности пленки ПЭТ, предложен метод ковалентного связывания карбоксильных групп с аминокислотами индикаторными флуоресцентными молекулами с последующим флуоресцентным анализом. Количественная оценка концентрации карбоксильных групп в зависимости от условий щелочной обработки не приводится.

В работе [23] ПЭТ пленку обрабатывали 1 M водным раствором NaOH в течение 2 ч при комнатной температуре. Для оценки поверхностной концентрации карбоксильных групп на пленке ПЭТ карбоксильные группы

активировали и ковалентно связывали с биотиновым производным, несущим первичную аминогруппу. Затем связанный с поверхностью биотин проявляли стрептавидином, меченным флуоресцентным красителем Alexa 488 или радиоактивно-меченым ^{15}N стрептавидином. Количественную оценку концентрации карбоксильных групп не проводили, но оценивали контрастность ячеек, связанных со стрептавидином, относительно фона. Эта величина составляла 5,04 для флуоресцентного контроля и 4,34 для радиометрического. Наличие связанного с поверхностью ПЭТ стрептавидина определяли масс-спектрофотометрически (TOF-SIMS) [32].

В настоящей работе с помощью количественного флуоресцентного анализа исследовали процесс получения активных карбоксильных групп на поверхности ПЭТ пленки при обработке растворами гидроксида калия в 96%-м этаноле. Образующиеся в результате гидролиза карбоксильные ($-\text{COOH}$)-группы ковалентно связывали с производным флуоресцентного красителя Cu5 , несущим первичную аминогруппу (Cu5-NH_2). Для регистрации флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии. Использованный подход позволил разработать удобный метод контроля химически доступных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали образцы бесцветной пленки кристаллического полиэтилентерефталата ПЭТ Э (ГОСТ 24234-80, плотность 1,39 $\text{г}/\text{см}^3$, молекулярная масса 20000–40000, водопоглощение до 0,7%) толщиной 200 $\mu\text{м}$. Химическую обработку поверхности пленки проводили в разборной камере, монтируемой на поверхности пленки. В камере к пленке сверху прижимали специальную крышку, имеющую кольцевой выступ высотой 0,45 мм. Между крышкой и пленкой образуется ячейка объемом 30 $\mu\text{л}$ и площадью 65 мм^2 , доступная для реагентов. В крышке имеются два отверстия для внесения растворов и выхода вытесняемого воздуха. Положение обрабатываемой поверхности на образце пленки относительно ее краев всегда было одинаковым и соответствовало зоне регистрации флуоресценции на поверхности пленки в кюветном отделении флуоресцентного анализатора.

Для удаления возможных загрязнений на поверхности пленок их промывали 2%-м раствором моющего средства (Ultrasonol 7 Neutral,

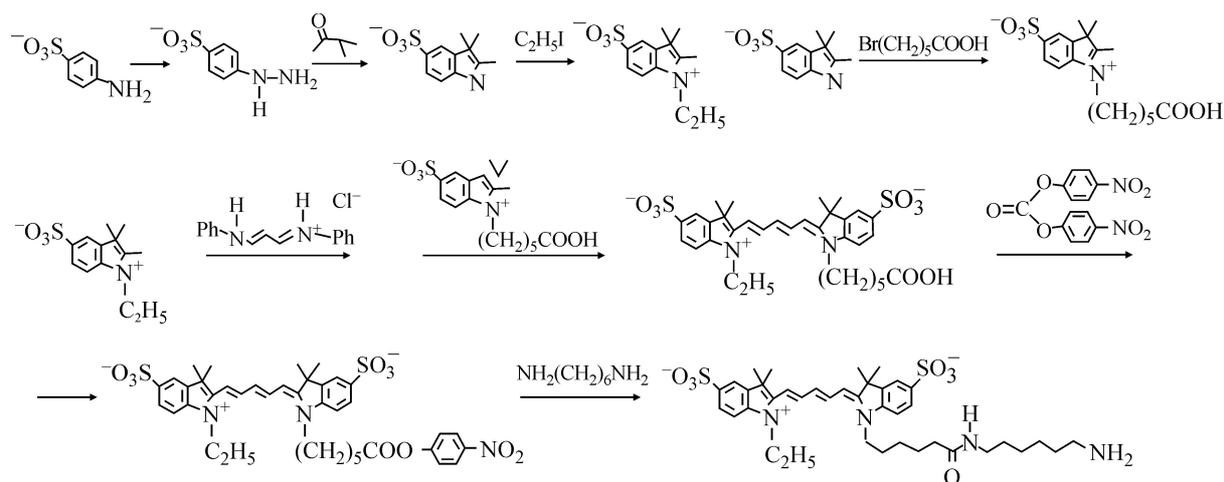


Рис. 1. Схема синтеза флуоресцентного красителя Cy5-NH₂ (1).

Art. Nr. 5356.1, Roth, Германия) в дистиллированной воде в ультразвуковой бане Elmasonic S30 (ELMA, Германия)) в течение 10 мин, затем промывали струей дистиллированной воды, ацетоном в ультразвуковой бане 10 мин, 96%-м этанолом в ультразвуковой бане 10 мин и высушивали при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе.

Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной микроскопии с регистрацией интенсивности флуоресценции (I_{fl}) в свете флуоресценции красителя [33]. 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) [33,34]. В спектральном диапазоне флуоресценции красителя Cy5 полимерная подложка из ПЭТ-пленки практически не флуоресцирует и не влияет на регистрируемые сигналы.

В некоторых случаях относительную оценку концентрации реакционноспособных карбоксильных групп проводили, сравнивая свойства поверхности ПЭТ до и после щелочной обработки.

Для количественной оценки концентрации молекул красителя, связавшихся с поверхностью подложки, был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими тот же самый краситель Cy5-NH₂ 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 условную единиц (у.е.) при выдержке 100 мс соответствует концентрация Cy5-NH₂, равная $8,44 \cdot 10^{-4}$ пмоль/см².

Краситель Cy5-NH₂ синтезировали по модифицированному методу [35]. Схема синтеза представлена на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы, протекающие при химической модификации поверхности ПЭТ-пленки, схематически представлены на рис. 2. Для гидролиза сложноэфирных групп на поверхности ПЭТ-пленки использовали раствор КОН в 96%-м этаноле. Спиртовой раствор гидроксида калия, по сравнению с водным раствором NaOH, лучше смачивает гидрофобную поверхность полимера. Скорость реакции щелочного гидролиза со спиртовыми растворами выше, чем с водными, предельная поверхностная концентрация карбоксильных групп при этом не изменяется [20]. Для этого на поверхности пленки собирали разборную камеру, через отверстия в крышке в ячейку пипеткой вносили раствор КОН заданной концентрации в 96%-м этаноле, ячейку плотно закрывали и инкубировали заданное время (этап 1). Затем пипеткой удаляли раствор, разбирали камеру, пленку промывали дистиллированной водой, выдерживали в 0,1 N HCl 10 мин, промывали струей дистиллированной воды, сушили при 60°C в течение 1 ч на открытом воздухе, а затем в течение ночи в вакуум-эксикаторе над P₂O₅ при комнатной температуре. В результате такой процедуры на поверхности ПЭТ образовывались карбоксильные COOH-группы (этап 2).

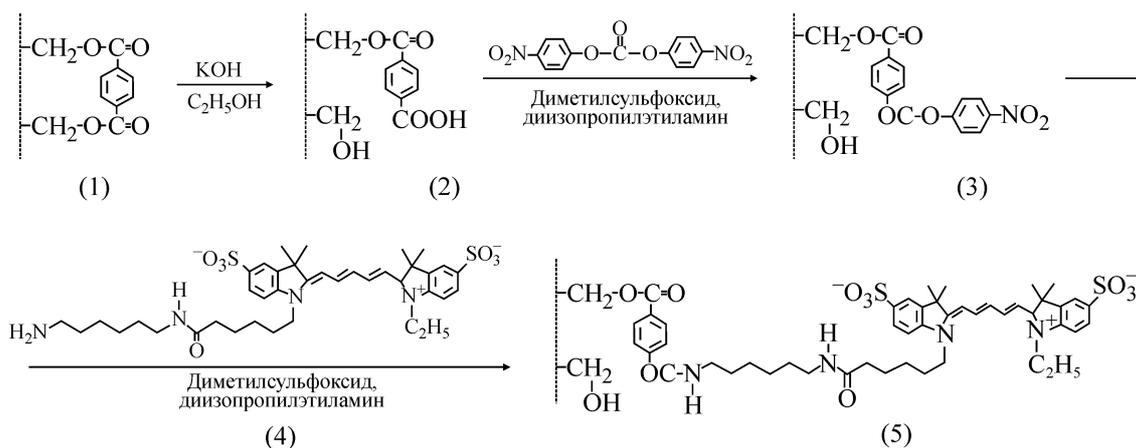


Рис. 2. Схема химической модификации поверхности ПЭТ-пленки.

Для активации карбоксильных групп пленку обрабатывали раствором бис-4-нитрофенилкарбоната в диметилсульфоксиде. Для этого на поверхности пленки вновь собирали камеру с новой крышкой. Через отверстия в крышке в ячейку пипеткой вносили 30 мкл раствора бис-4-нитрофенилкарбоната с концентрацией 30 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде, ячейку плотно закрывали и инкубировали 16 ч при комнатной температуре. Затем пипеткой удаляли раствор, разбирали камеру, пленку промывали диметилсульфоксидом, ацетоном, гексаном и сушили в вакуум-эксикаторе в течение ночи над P₂O₅ при комнатной температуре. В результате такой процедуры на поверхности образовывались 4-нитрофениловые эфиры (этап 3).

Для количественного анализа концентрации активных групп на поверхности ПЭТ их выявляли флуоресцентным красителем Cy5-NH₂. С этой целью пленку обрабатывали раствором флуоресцентного красителя Cy5-NH₂ в диметилсульфоксиде (этап 4). Выбор диметилсульфоксида обусловлен тем, что в нем хорошо растворяются все используемые реагенты, он хорошо смачивает ПЭТ и в нем используемые химические реакции идут быстро. На поверхности пленки вновь собирали камеру с новой крышкой. Через отверстия в крышке в ячейку пипеткой вносили 30 мкл раствора аминоксодержащего индодикарбоцианинового красителя Cy5-NH₂ с концентрацией 1 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде, ячейку плотно закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем пипеткой удаляли раствор, разбирали камеру. Пленку промывали струей дистиллированной воды. На поверхности обра-

зовывались флуоресцентно-меченные активные группы (этап 5).

Для удаления красителя, не связанного с пленкой, ее тщательно отмывали. Для этого пленку помещали в закрытую пробирку из полипропилена с 40 мл 50%-го раствора ацетонитрила в 50 мм триэтиламмонийгидрокарбонате (pH 7,5), выдерживали на ультразвуковой бане 20 мин. Процедуру повторяли три раза со сменой растворителя. Затем промывали струей дистиллированной воды, после чего сушили при комнатной температуре в течение часа на открытом воздухе. Ковалентная связь красителя Cy5-NH₂ с карбоксильными группами, полученными на поверхности ПЭТ-пленки, обеспечивает прочное связывание и возможность исчерпывающей отмывки от несвязанного красителя, что увеличивает достоверность и воспроизводимость результатов.

Интенсивность флуоресценции (I_{fl}) поверхности ПЭТ после разных обработок представлена в табл. 1–3. Даны средние значения из трех повторов.

В табл. 1 представлены данные по I_{fl} в условных единицах (у.е.) поверхности ПЭТ-пленки, обработанной в течение 60 мин при комнатной температуре растворами KOH различной концентрации в 96%-м этаноле с последующим связыванием с флуоресцентным красителем Cy5-NH₂. Обработка ультразвуком позволила полностью удалить краситель, сорбированный поверхностью ПЭТ. Время экспозиции – 100 мс. Концентрация реакционноспособных карбоксильных групп вычислена на основе данных, представленных в разделе «Материалы и методы» при предположении, что одна молекула красителя связывается с одной реакционноспособной карбоксильной группой.

Таблица 1. Результаты обработки поверхности ПЭТ растворами КОН различной концентрации

№ п/п		Концентрация КОН, М									
		0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
1	Сигнал, $\times 10^{-3}$ у.е.	1,05	4,81	7,87	9,55	8,46	5,71	4,28	4,03	3,87	3,70
2	Контрастность		5,58	8,50	10,10	9,06	6,44	5,08	4,84	4,69	5,27
3	Концентрация		4,06	6,64	8,06	7,14	4,82	3,61	3,40	3,27	3,35

Примечание. Время обработки 60 мин, комнатная температура, растворитель – 96%-й этанол. Сигнал – I_{fl} после вычета фона при выдержке 100 мс; контрастность – отношение I_{fl} с поверхности ПЭТ, обработанной раствором КОН, к I_{fl} с поверхности ПЭТ, не обработанной раствором КОН; концентрация – поверхностная концентрация реакционноспособных СООН-групп в пмоль/см².

Таблица 2. Результаты обработки поверхности ПЭТ растворами 0,5 М КОН в течение различного времени

№ п/п		Время обработки, мин								
		0	10	20	30	40	50	60	70	80
1	Сигнал, $\times 10^{-3}$ у.е.	1,05	1,88	4,26	4,89	6,34	8,79	9,55	7,45	6,65
2	Контрастность		2,79	5,08	5,66	7,04	9,37	10,10	8,10	7,33
3	Концентрация		1,59	3,60	4,13	5,35	7,42	8,06	6,29	5,62

Примечание. Комнатная температура, растворитель – 96%-й этанол. Сигнал – I_{fl} после вычета фона при выдержке 100 мс; контрастность – отношение I_{fl} с поверхности ПЭТ, обработанной раствором КОН, к I_{fl} с поверхности ПЭТ, не обработанной раствором КОН; концентрация – поверхностная концентрация реакционноспособных СООН-групп в пмоль/см².

С ростом концентрации КОН концентрация реакционноспособных образующихся на поверхности ПЭТ карбоксильных групп первоначально возрастает и составляет 8,06 пмоль/см² при 0,5 М. Дальнейшее увеличение концентрации КОН приводит к уменьшению концентрации реакционноспособных карбоксильных групп. При концентрации КОН от 2,0 до 4,0 М концентрация этих групп составляет 3,3–3,4 пмоль/см² (табл. 1). Визуально до концентрации КОН 0,5 М поверхность пленки остается гладкой и блестящей, без видимых повреждений. Затем появляются следы деградации поверхности, и для концентраций 2 М КОН и выше деградация поверхности ПЭТ-пленки видна очень отчетливо. Выщеплению фрагментированных полимерных молекул способствует отмывка в ультразвуковой бане. Так, для образцов ПЭТ-пленки, обработанных 60 мин раствором КОН с концентрацией 2 М и выше наблюдали следующее. Флуоресцентный сигнал, полученный после первой отмывки в ультразвуковой бане в течение 20 мин, дополнительно понижался после второй и третьей отмывки, причем очень значительно. Последующие отмывки в ультразвуковой бане не влияли на величину сигнала. При этом на поверхности становились видны следы деградации. Деградация поверхности пленки происходит с выщеплением фрагментированной полимерной молекулы

из полимерного массива. Максимальные значения концентрации реакционноспособных карбоксильных групп получены для 0,5 М КОН.

В литературе для гидролиза сложноэфирных групп на поверхности ПЭТ описано использование 1 М растворов щелочей с разными временами обработки. Поэтому мы исследовали влияние времени обработки поверхности ПЭТ-пленки растворами КОН с концентрацией 0,5 и 1,0 М. В табл. 2 и 3 представлены данные по флуоресценции поверхности ПЭТ-пленки, обработанной 0,5 М и 1,0 М растворами КОН в 96%-м этаноле при комнатной температуре в течение различного времени с последующим связыванием с флуоресцентным красителем Су5-NH₂. Концентрация реакционноспособных СООН-групп вычислена при выдержке 100 мс. С увеличением времени щелочной обработки пленки концентрация карбоксильных групп на поверхности ПЭТ первоначально возрастает до значения 7,93 пмоль/см² для 1,0 М КОН в течение 40 мин и 8,06 пмоль/см² для 0,5 М КОН в течение 60 мин, а затем уменьшается. Предельная поверхностная концентрация реакционноспособных карбоксильных групп, получаемая обработкой 0,5 и 1,0 М КОН, примерно одинакова, но для 0,5 М КОН зависимость от времени обработки более плавная.

Максимальная концентрация реакционноспособных карбоксильных групп, полученных

Таблица 3. Результаты обработки поверхности ПЭТ растворами 1 М КОН в течение различного времени

№ п/п		Время обработки, мин								
		0	10	20	30	40	50	60	70	80
1	Сигнал, $\times 10^{-3}$ у.е.	1,05	3,90	4,99	7,46	9,40	6,66	5,71	4,25	4,19
2	Контрастность		4,71	6,04	8,10	9,95	7,34	6,44	5,05	4,99
3	Концентрация		3,29	4,21	6,30	7,93	5,62	4,82	3,59	3,54

Примечание. Комнатная температура, растворитель – 96%-й этанол. Сигнал – $I_{\text{п}}$ после вычета фона при выдержке 100 мс; контрастность – отношение $I_{\text{п}}$ с поверхности ПЭТ, обработанной раствором КОН, к $I_{\text{п}}$ с поверхности ПЭТ, не обработанной раствором КОН; концентрация – поверхностная концентрация реакционноспособных СООН-групп в пмоль/см².

на поверхности ПЭТ-пленки в результате обработки этанольными растворами КОН, измеренная по связыванию с флуоресцентным красителем Су5- NH_2 , составляет около 8 пмоль/см² и находится в диапазоне данных, полученных по связыванию с радиоактивно-мечеными аминокислотами (6,3 и 14,4 пмоль/см² [29]). Концентрация реакционноспособных карбоксильных групп, полученных на поверхности полимерной подложки из полиэтилентерефталата, достаточна для изготовления матрицы химически связанных с поверхностью ДНК-зондов и гидрогелевых ячеек.

Высокая яркость флуоресценции использованного флуоресцентного красителя Су5- NH_2 в сочетании с низкой собственной флуоресценцией ПЭТ-пленки позволяют добиться высокого отношения флуоресцентных сигналов с поверхности ПЭТ со связавшимся красителем к сигналу с такой же поверхности без красителя. Краситель, физически сорбированный поверхностью, нацело удаляется при ультразвуковой отмывке. С увеличением выдержки контрастность флуоресцентных сигналов для малых концентраций СООН-групп возрастает пропорционально выдержке. При высоких концентрациях карбоксильных групп контрастность с увеличением выдержки не изменяется.

Полученные результаты дают основание для использования ПЭТ-пленок в качестве активных подложек в молекулярных методах исследований, в том числе в гибридном анализе нуклеиновых кислот и ПЦР.

ВЫВОДЫ

Разработан метод активации карбоксильных групп, находящихся на поверхности ПЭТ, и ковалентной иммобилизации аминокислотосодержащей молекулярной конструкции. Обработка ПЭТ-пленки растворами КОН в 96%-м этаноле в контролируемых условиях позволяет получить на поверхности карбоксильные группы, при-

годные для ковалентной иммобилизации функционально-значимых молекулярных конструкций.

Разработан удобный метод количественной оценки поверхностной концентрации химически доступных карбоксильных групп на поверхности полиэтилентерефталатной пленки по связыванию с флуоресцентным цианиновым красителем с последующей регистрацией флуоресценции с помощью цифровой люминесцентной микроскопии.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы по теме № 01201363819: «Разработка новых методов молекулярной диагностики заболеваний человека и животных».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. F. Clarke and J. R. Foster, *Brit. J. Biomed. Sci.* **69** (2), 83 (2012).
2. C. Gnoth and S. Johnson, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **74** (7), 661 (2014).
3. X. Mao, W. Wang, and T. Du, *Sensors and Actuators B: Chemical* **186**, 315 (2013).
4. D. Gryadunov, E. Dementieva, V. Mikhailovich, et al., *Expert Rev. Mol. Diagn.* **11** (8), 839 (2011).
5. M. B. Miller and Y. W. Tang, *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 611 (2009).
6. H. Zhu and J. Qian, *Adv. Genet.* **79**, 123 (2012).
7. D. Rother, T. Sen, D. East, and I. J. Bruce, *Nanomedicine* **6** (2), 281 (2011).
8. A. Akkoyun and U. Bilitewskin, *Biosensors and Bioelectronics* **17**, 655 (2002).
9. C. Cai, Q. Shi, L. Li, et al., *Radiat. Phys. Chem.* **77**, 370 (2008).
10. N. Sarkar, S. Bhattacharjee, and S. Sivaram, *Langmuir* **13**, 4142 (1997).

11. R. Silva, E. C. Muniz, and A. F. Rubira, *Appl. Surf. Sci.* **255**, 6345 (2009).
12. S. Dimitrievska, M. Maire, G. A. Diaz-Quijada, et al., *Macromolec. Biosci.* **11**, 493 (2011).
13. J. Wang, D. Feng, H. Wang, et al., *J. Appl. Polym. Sci.* **50**, 585 (1993).
14. M. Strobel, C. S. Lyons, J. M. Strobel, et al., *Sci. Technol.* **6**, 429 (1992).
15. P. Bertrand, Y. DePuydt, J. M. Beuken, et al., *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **19–20**, 887 (1987).
16. E. Arenolz, J. Heitz, M. Wagner, et al., *Appl. Surf. Sci.* **69**, 16 (1993).
17. M. Abdolahifard, S. HajirBahrami, and R. M. A. Malek, *ISRN Org. Chem.* **ID 265415**, 1–8 (2011).
18. J. Dave, R. Kumar, and H. C. Srivastava, *J. Appl. Polym. Sci.* **33**, 455 (1987).
19. L. N. Bui, M. Thompson, N. B. McKeown, et al., *Analyst* **118**, 463 (1993).
20. W. Chen and T. J. McCarthy, *Macromolecules* **31**, 3648 (1998).
21. N. P. Desai and J. A. Hubbell, *Macromolecules* **25**, 226 (1991).
22. P. Kingshott, J. Wei, D. Bagge-Ravn, et al., *Langmuir*, **19**, 6912 (2003).
23. J. Hyun, Y. Zhu, A. L. Vinson, et al., *Langmuir* **17**, 6358 (2001).
24. L. Hu, A. Oku, E. Yamada, and K. Tomari, *Polymer J.* **29** (9), 708 (1997).
25. F. Liu, J. Chen, Z. Li, et al., *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **99**, 16 (2013).
26. S. Sano, K. Kato, and Y. Ikada, *Biomaterials* **14** (11), 817 (1993).
27. P. Golshaei and O. Guven, *Reactive Functional Polymers* **118**, 26 (2017).
28. Y. Liu, T. He, and C. Gao, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **46**, 117 (2005).
29. J. Marchand-Brunaert, M. Deldime, I. Dupont, et al., *J. Colloid Interface Sci.* **173** (1), 236 (1995).
30. I. Donelli, P. Taddei, P. F. Smet, et al., *Biotechnol. Bioengineer.* **103** (5), 845 (2009).
31. J. Li, Y. Maekawa, T. Yamaki, and M. Yoshida, *Macromol. Chem. Phys.* **203**, 2470 (2002).
32. A. M. Belu, Z. Yang, R. Aslami, and A. Chilkoti, *Anal. Chem.* **73**, 143 (2001).
33. Y. Lysov, V. Barsky, D. Urasov, et al., *Biomed. Optics Express* **8** (11), 4798 (2017).
34. V. Barsky, A. Perov, S. Tokalov, et al., *J. Biomol. Screening* **7** (3), 247 (2002).
35. M. A. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, V. E. Shershov, et al., *Dyes and Pigments* **147**, 199 (2017).

Obtaining Active Carboxyl Groups on the Surface of Polyethylene Terephthalate Films and Quantitative Analysis of These Groups Using Digital Fluorescence Microscopy

**R.A. Miftakhov, S.A. Lapa, V.E. Shershov, O.A. Zasedateleva, T.O. Guseinov,
M.A. Spitsyn, V.E. Kuznetsova, D.D. Mamaev, Y.P. Lysov, V.E. Barsky, E.N. Timofeev,
A.S. Zasedatelev, and A.V. Chudinov**

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

A method for quantitative measurement of chemically accessible carboxylic groups on the surface of polyethylene terephthalate films was developed using a fluorochrome, cyanine Cy5, and digital fluorescence microscopy. A method for activation of carboxylic groups on the surface of polyethylene terephthalate films and covalent binding with compounds containing amino-groups was developed.

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