

УДК 577.21 : 535.51

**ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ В МИКРОЧИПОВЫХ LABEL-FREE БИОТЕХНОЛОГИЯХ\***

**В. В. Власов<sup>1</sup>, А. Н. Синяков<sup>1</sup>, Д. В. Пышный<sup>1</sup>, С. В. Рыхлицкий<sup>2</sup>,  
В. Н. Кручинин<sup>2</sup>, Е. В. Спесивцев<sup>2</sup>, И. А. Пышная<sup>1</sup>, Е. В. Костина<sup>1</sup>,  
Е. Д. Дмитриенко<sup>1</sup>, В. П. Бессмельцев<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук  
Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

*E-mail: kruch@isp.nsc.ru*  
<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук  
Институт автоматки и электрометрии Сибирского отделения РАН,  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Коптюга, 1

Методом высокоразрешающей сканирующей эллипсометрии проведён анализ поверхности биочипов, приготовленных на основе пластин кремния для исследования реакций предварительно иммобилизованных олигонуклеотидов и белковых молекул. Проведена детекция гибридационных взаимодействий нуклеиновых кислот (образование дуплекса при реакции ампликона гена матричного белка вируса гриппа А с молекулами-зондами), сорбции белковых молекул и белок-белковых взаимодействий на поверхности биочипов. Показано, что предварительная сорбция наночастиц золота приводит к повышению эффективности иммобилизации молекул белков на биочипе. На основе полученных в работе экспериментальных данных сделан вывод о том, что эллипсометрия представляет собой высокочувствительный, неразрушающий, недорогой label-free метод детекции поверхности биочипов, удобный для количественного анализа реакций биомолекул.

*Ключевые слова:* эллипсометрия, биочипы, label-free диагностика, олигонуклеотиды, белки.

**Введение.** Биочипы — один из новейших и многообещающих инструментов биологии и медицины XXI века, дающий возможность за короткое время определять тысячи различных генетических дефектов, онкогенов, белков и небелковых метаболитов, аллергенов, различных биологически активных веществ и многих других молекул. Биочипы позволяют увеличить в тысячи и десятки тысяч раз производительность диагностических методов и резко снизить себестоимость анализов [1, 2]. Биочиповые технологии применяют не только в диагностических целях, но и для синтеза последовательностей олигонуклеотидов в молекулах ДНК [3].

Несмотря на большое разнообразие конструкций используемых в настоящее время микробиочипов большинство из них представляет собой твёрдую подложку (стеклянная, пластиковая или кремниевая пластинка), на которую секционно нанесены от нескольких десятков и сотен до нескольких тысяч или даже миллионов ячеек с зондами (олигонуклеотидными или белковыми). При взаимодействии молекул исследуемого вещества из

\*Работа выполнена при поддержке Президиума СО РАН (междисциплинарные интеграционные проекты № 41 и № 76), программ Президиума РАН «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» и «Молекулярная и клеточная биология».

раствора и молекул зонда образуется специфический комплекс, который регистрируется анализирующим оборудованием [1–3].

В технологии создания и функционирования биочипов важным моментом является выбор материала подложки и аналитического метода для обнаружения взаимодействия биомолекул. При выборе оптимальной подложки должны быть оценены такие параметры, как размер и морфология точек (спотов), эффективность связывания с антителами (или другими молекулами-зондами), фоновый сигнал, порог чувствительности, воспроизводимость результатов экспериментов с разными чипами. Подложка должна иметь высокую связывающую способность, способность сохранять активность биомолекулярных зондов и высокое соотношение сигнал/шум.

В качестве метода анализа в микробиочипах к настоящему времени наиболее широко используют флуоресцентную оптическую спектрометрию. Этот метод требует введения флуорофора в анализируемый образец, что усложняет эксперимент и удорожает получаемую информацию. Чрезвычайно привлекательными выглядят методы детектирования комплексов, не требующие предварительной модификации анализируемого образца, так называемые label-free (без использования флуоресцентных меток) подходы. К этим методам относят оптическую эллипсометрию [4], которая обладает высокой чувствительностью и неразрушающим характером воздействия на исследуемый образец и удобна для детекции как олигонуклеотидов, так и белков на поверхности твёрдых тел. Например, известно применение эллипсометрии для выявления белок-белковых взаимодействий при использовании кремниевых пластин, покрытых слоем золота и несущих ковалентно присоединённые белковые молекулы [5]. Вместе с тем метод имеет особенность, связанную с параллельной детекцией примесей, способных к неспецифической сорбции на поверхности микрочипа. Для анализа микробиочипов наиболее удобна и информативна отображающая оптическая эллипсометрия [5–7].

Цель данной работы — выверить методику оптической эллипсометрической детекции результатов иммобилизации биомолекулярных зондов, а также регистрации специфических взаимодействий с участием основных биологических маркеров (нуклеотидной и белковой природы) на поверхности кремниевых биочипов.

**1. Методика эксперимента.** 1.1. *Приготовление кремниевых пластин.* Биочипы изготавливали на пластинах кремния Si(100) КДБ-7,5 диаметром 100 мм, обрабатываемых в перекисно-аммиачном травителе. Для нанесения олигонуклеотидов часть пластин термически окисляли до глубины 370 нм и из них вырезали слайды 75 × 25 мм. Для нанесения белковых молекул использовали образцы с естественным слоем оксида кремния 25 × 15 мм.

1.2. *Приготовление биочипов для анализа олигонуклеотидов.* Олигонуклеотидные зонды и праймеры получены на синтезаторе ASM-800 (ООО «Биоссет», г. Новосибирск) по стандартной методике [8].

Кремниевые пластины со слоем оксида погружали в 1 %-ный раствор 3-аминопропилтриметоксисилана в ацетоне на 2 мин, промывали 3 раза по 5 мин ацетоном и высушивали в сушильном шкафу 45 мин при 110 °С. Далее пластины обрабатывали раствором 0,2 % 1,4-пара-фенилендиизотиоцианата и 10 % пиридина в диметилформамиде в течение 2 ч, затем промывали 3 раза по 5 мин ацетоном и 2 раза в течение 10 мин этанолом.

1.2.1. *Иммобилизация зондов на поверхности слайда.* На поверхность слайда наносили споты из раствора, содержащего 10 мкл 200 мМ карбонатно-бикарбонатного буфера и 10 мкл 100 мкМ растворов зондов. Печать чипа осуществляли на приборе "BioOdyssey" (фирмы "Bio-Rad", США), используя иглу диаметром 360 нм.

1.2.2. *Получение ампликона гена матричного белка вируса гриппа А.* Геномную РНК вируса гриппа А выделяли из 140 мкл клеточной культуры (титр вируса  $10^5$ – $10^7$  БОЕ/мл)

с использованием набора реагентов "QIAquick Viral RNA Kit" (фирмы "QIAGEN", Германия). Обратную транскрипцию проводили следующим образом: смесь, содержащую 1 мкл праймера GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGG (20 мкМ), 9 мкл РНК (из экстрагированного объёма 80 мкл) и 2 мкл dNTP (10 мМ), нагревали 10 мин при 65 °С, охлаждали во льду. Далее добавляли 4 мкл 5× кДНК буфера, 1 мкл дитиотреита (0,1 М), 1 мкл ингибитора рибонуклеазы RNasin (40 ед. акт.) (фирмы "Promega", США), 1 мкл воды, 1 мкл обратной транскриптазы ThermoScript (фирмы "Invitrogen", США). Смесь центрифугировали и инкубировали 5 мин при 55 °С и 55 мин при 60 °С. Для амплификации фрагмента гена матричного белка использовали пару праймеров (5'-3'):

Inf\_M\_Fov 5'-GAGGTHGAAACGTAYGTWCTHTCT-3',

Inf\_M\_Rev 5'-GYTCACTDGGCACGGTGAG-3'.

Длина нарабатываемого ампликона составляла ~200 пар оснований. Для получения преимущественно одноцепочечной ДНК проводили полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) в асимметричном режиме. Состав реакционной смеси (50 мкл, указаны конечные концентрации): буфер для ПЦР ("QIAGEN") (1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Трис-HCl, pH 8,7), 200 нМ dATP, dCTP, dGTP, 70 нМ dTTP, 100 нМ dUTP-Cy3, 80 нМ прямой праймер, 1 мкМ обратный праймер, 1,25 ед. акт. HotStarTaq-полимеразы ("QIAGEN") и 2 мкл раствора ДНК. ПЦР проводили в термоциклере "iCycler" ("Bio-Rad"), используя следующий протокол: 95 °С — 15 мин, затем 35 циклов 94 °С — 30 с, 56 °С — 30 с, 72 °С — 30 с. Нарработку ампликона контролировали электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле с окрашиванием этидийбромидом. Флуоресцентно-меченые ампликоны очищали от избытка меченых трифосфатов на гель-фильтрующих колонках ("QIAGEN"), высушивали досуха на вакуумной центрифуге при 60 °С и использовали для гибридизации.

1.2.3. *Гибридизация ампликонов на биочипе.* Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл 2× гибридизационного буфера (1× гибридизационный буфер: 6× SSC, 5× раствор Денхардта, 0,1 % Твин 20) и перед нанесением на слайд прогревали 2 мин при 97 °С, затем охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в камере фирмы "Arrayit" (США) при температуре 55–60 °С в течение 2 ч. Далее слайд последовательно отмывали в растворах: 2× SSC, 0,2× SSC и 0,3 М ТЕАВ — и центрифугировали.

1.3. *Приготовление биочипов для анализа белковых молекул.* 1.3.1. *Функционализация поверхности кремниевой пластины.* Непосредственно перед экспериментами пластины обрабатывали хромовой смесью, отмывали последовательно бидистиллированной (б/д) водой (5 × 10 мл) и этиловым спиртом (3 × 10 мл), сушили при комнатной температуре. Далее пластины погружали в 5 %-ный раствор 3-аминопропилтриметоксисилана в этиловом спирте и инкубировали 2 ч при постоянном помешивании, затем пластины отмывали последовательно спиртом (3 × 10 мл) и ацетоном (1 × 10 мл) и сушили при температуре 80 °С в течение 45 мин.

1.3.2. *Ковалентная иммобилизация.* Функционализированную поверхность кремниевой пластины помещали в раствор 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазина (цианурхлорида) в ацетонитриле (2 мг/мл) и выдерживали в течение 2 ч. Затем промывали последовательно ацетонитрилом (3 × 10 мл) и б/д-водой (2 × 10 мл). Далее на поверхность кремниевой пластины, содержащую цианурхлорид, наносили раствор белка в буфере 0,15 М NaCl, 0,1 М Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> при pH 8,3 в концентрациях 0,001, 0,01, 0,1 мг/мл по 0,3 мкл на пятно (спот). Иммобилизацию проводили в течение 6 ч при комнатной температуре. Несвязавшиеся молекулы белка удаляли промывкой б/д-водой (5 × 10 мл).

1.3.3. *Сорбция.* Функционализированную аminosиланом поверхность кремниевой пластины помещали в коллоидный раствор золота (концентрация наночастиц золота 1,2 нМ) в 3,8 мМ цитрата натрия на 30 мин при комнатной температуре, промывали б/д-водой (3 × 10 мл). Суспензию наночастиц золота получали по методу [9]. Средний диаметр наночастиц и их ζ-потенциал были оценены с использованием прибора "Zetasizer

Nano ZS" фирмы "Malvern Instruments" (Великобритания) и составили 20 нм и  $-42,8$  мВ соответственно. Затем на модифицированную поверхность кремниевой пластины наносили водный раствор белка в концентрациях 0,001, 0,01, 0,1 мг/мл по 0,3 мкл на пятно. Сорбцию проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Несвязавшиеся молекулы белка удаляли промывкой б/д-водой ( $5 \times 10$  мл).

1.3.4. *Образование белкового комплекса.* При исследовании белок-белковых взаимодействий в качестве иммобилизованных маркеров использованы антивидоспецифичные антитела (антитела кролика против иммуноглобулинов мыши — RAM (Rabbit anti Mouse)), иммобилизацию осуществляли по сорбционному механизму. После инкубации и удаления несвязавшихся антител оставшиеся на поверхности реакционные сайты были блокированы 0,2 М раствором глицина (рН = 8). Эллипсометрический анализ проводили до и после обработки образцов видоспецифическим иммуноглобулином, конъюгированным с пероксидазой хрена (IgG-ПХ). (Препараты антител предоставлены П. П. Лактионовым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).)

1.4. *Методика анализа.* 1.4.1. *Флуоресцентная оптическая спектрометрия.* Флуоресцентный анализ чипа осуществлялся на сканере "ScanArray Express 2.0" фирмы "PerkinElmer Life Sciences" (США) при длине волны возбуждающего лазера, равной 543 нм. Изображение анализировали с использованием программы "ScanArray Express", входящей в математическое обеспечение сканера.

1.4.2. *Эллипсометрия.* Измерения проводили на сканирующем эллипсометре высокого пространственного разрешения «МИКРОСКАН-М» (Институт физики полупроводников (ИФП) СО РАН) на  $\lambda = 632,8$  нм при  $\varphi_0 = 60^\circ$ . Прибор снабжён микрооптикой для фокусировки лазерного пучка в пятно размером 10 мкм,  $20 \times$  микроскопом-автоколлиматором для визуальной настройки образца и двухкоординатным сканирующим столиком для перемещения образца в процессе измерений по двум координатам в пределах 0–150 мм. Результаты измерений считывали непрерывно с интервалом 1 мс в процессе движения столика и отображали в реальном времени в виде цветной топограммы или трёхмерного образа. Программное обеспечение прибора (пакет "AnResG") позволяло проводить статистическую обработку и систематизирование результатов измерений в целях очищения от случайного шума и выделения полезной информации в виде конечных значений концентрации биомолекул на поверхности биочипа.

Для обработки результатов эллипсометрических измерений решали обратную задачу эллипсометрии с использованием оптической модели среда—плёнка (биомолекулы)—подложка. Получаемая информация о плёнке (показатель преломления и толщина) была представлена в виде эффективных величин, пропорциональных количеству (концентрации) иммобилизованных на поверхности молекул и фрагментов: эффективная толщина равна отношению суммарного объёма иммобилизованных фрагментов и молекул к анализируемой площади. В случае предварительного покрытия поверхности чипа золотыми наночастицами для анализа результатов эллипсометрических измерений использовали двухслойную модель: среда—плёнка (биомолекулы)—плёнка (золото)—подложка. Для изучения оптических свойств тонких покрытий золотых наночастиц были проведены измерения образцов с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771» (ИФП СО РАН) в диапазоне длин волн 250–1100 нм с разрешением 2 нм, угол падения луча света на образец составлял  $70^\circ$  [10].

## 2. Результаты исследования и обсуждение. 2.1. Детекция олигонуклеотидов.

Для образования ковалентной связи олигонуклеотидных зондов с поверхностью слой диоксида кремния на поверхности биочипов модифицировали, применяя для этой цели поверхностные силанольные группы. Стадии процесса получения активированных слайдов приведены на рис. 1.

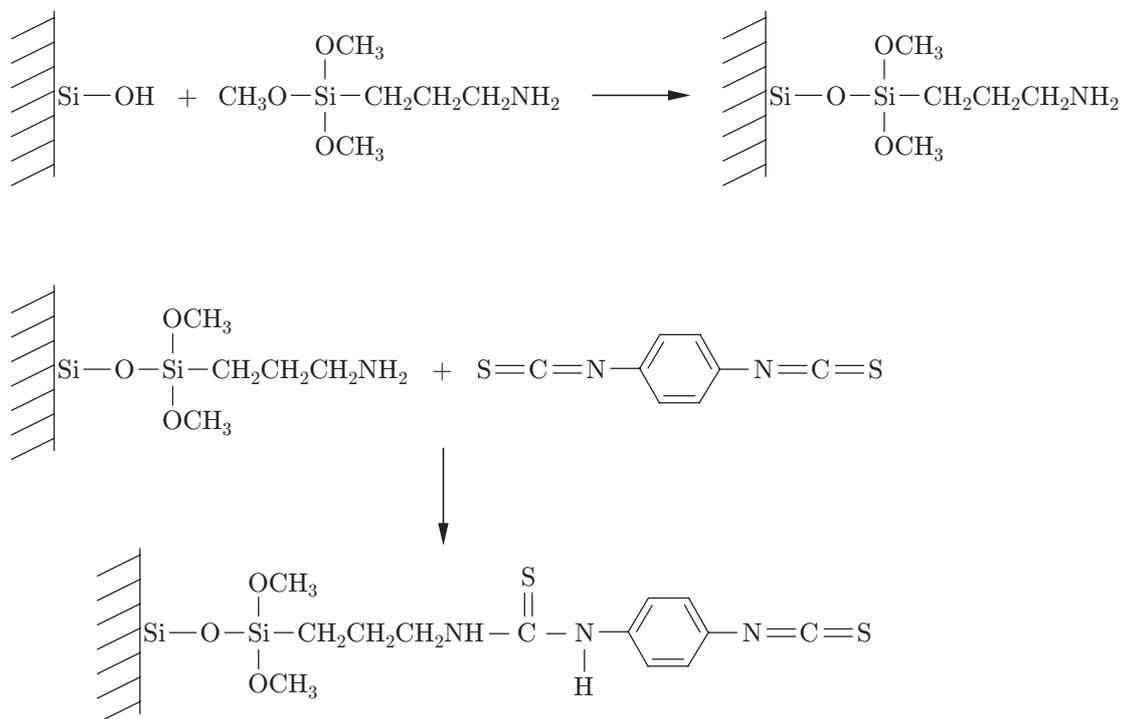


Рис. 1. Схема получения активированных слайдов

На первом этапе поверхность обрабатывали 1 %-ным раствором 3-аминопропил-триметоксисилана в ацетоне. Силанизированные слайды отмывали от избытка реагента и высушивали 45 мин при температуре 110 °С. Затем слайды выдерживали 2 ч в 0,2 %-ном растворе 1,4-фенилендиизотиоцианата, промывали ацетоном, метанолом и высушивали в вакууме. Полученные слайды содержали на поверхности диоксида кремния изотиоцианатные группы, способные легко взаимодействовать с аминогруппами гибридизационных зондов.

Для иммобилизации гибридизационных зондов на слайде использовали производные олигонуклеотидов, содержащие на 5'-конце аминогексильную группу. На рис. 2 дана схема иммобилизации на слайде олигонуклеотида Si. На поверхность слайда, содержащего изо-

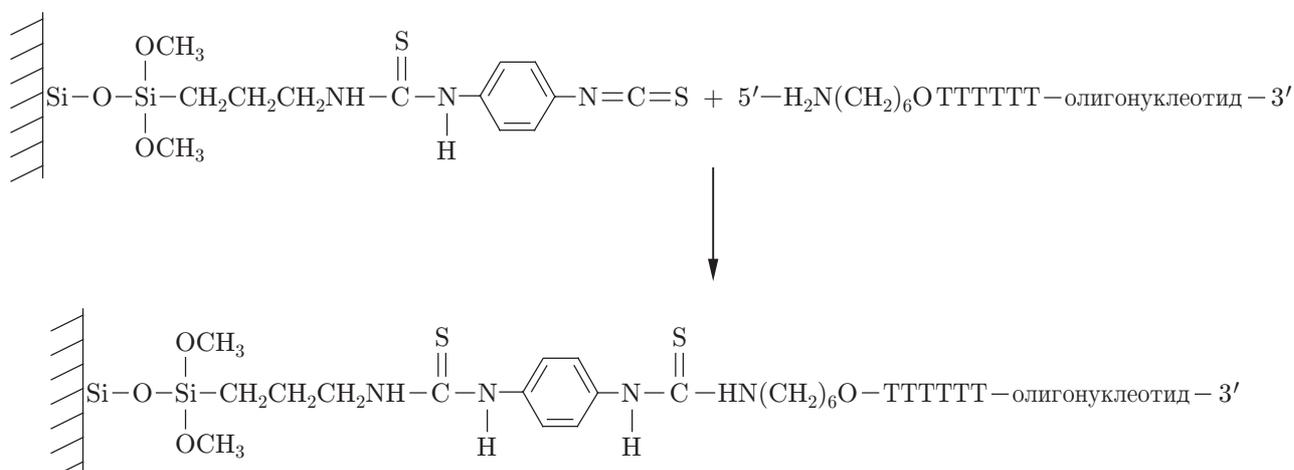
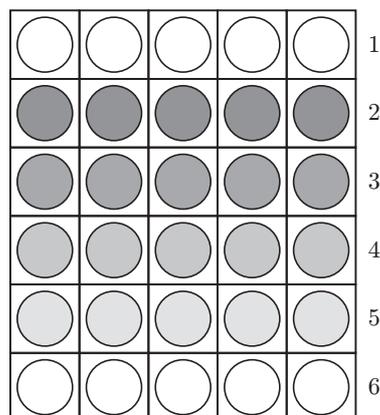


Рис. 2. Схема иммобилизации олигонуклеотида на микрочипе



*Рис. 3.* Схема расположения зондов на биочипе: 1, 6 (5'-TAMRA-TTTTTTTT-3') — контроль; 2 (5'-CTCATGGAGTGGCTAAAGACA-3'~(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>) — зонд 7 Matr и 3 (5'-ACAAGACCAATCCTGTCACCT-3'~(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>) — зонд 5 Matr (зонды, выявляющие ген матричного белка вируса гриппа); 4 (5'-GCCAGGAATTCTTG-3') — зонд HSV2, выявляющий ген US5 вируса герпеса второго типа; 5 — карбонатно-бикарбонатный буфер

тиоцианатные группы, наносили споты из 50 мкМ раствора зонда в 100 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере. В процессе печати в споттере поддерживалась 60 %-ная влажность, что позволяло аминокислотному олигонуклеотиду ковалентно связаться со слайдом, прежде чем спот высохнет.

Для сравнительного анализа эллипсометрической и флуоресцентной детекции гибридизации на биочипах нами был напечатан модельный чип, содержащий зонды к гену матричного белка вируса гриппа, зонд к гену US5 вируса герпеса второго типа, а также октатимидилат, содержащий флуоресцентный краситель TAMRA, используемый в качестве стандарта. Схема расположения зондов на биочипе приведена на рис. 3.

На полученном биочипе гибридизовали ампликон, синтезированный с помощью ПЦР гена матричного белка вируса гриппа. В процессе амплификации в этот ампликон была введена флуоресцентная метка Су3. Таким образом, результаты гибридизации можно было анализировать как с помощью оптической флуоресценции, так и эллипсометрии. Следует заметить, что информация, полученная такими методами, принципиально различна: флуоресцентная спектрометрия фиксирует только те биомолекулы, которые помечены флуоресцентной меткой, причём интенсивность флуоресцентного сигнала пропорциональна содержанию (концентрации) этих фрагментов, тогда как эллипсометрия фиксирует все молекулы и фрагменты, иммобилизованные на поверхности, а эффективная толщина слоя при этом пропорциональна общему количеству иммобилизованных молекул.

На рис. 4 приведены результаты сканирования участков поверхности со спотами по схеме рис. 3. На рис. 4, *a* (и далее на всех последующих рисунках, где показано сканированное изображение поверхности) участки с более высокой интенсивностью флуоресцентного свечения светлее других, тогда как на рис. 4, *b* более светлыми выглядят споты и участки поверхности, у которых значения эффективной толщины слоя выше. Средние значения (по рядам спотов) интенсивности флуоресцентного сигнала и эффективной толщины слоя приведены на рис. 5, *a, b* в виде гистограмм.

Как и следовало ожидать, флуоресцентное сканирование наиболее эффективно выявляет строки 1 и 6 флуоресцентного маркера 5'-TAMRA-TTTTTTTT-3', а также строки 2 и 3, содержащие специфичные для гена матричного белка вируса гриппа зонды с высокой концентрацией флуоресцентного маркера. Строки 4 и 5, на которых иммобилизованы

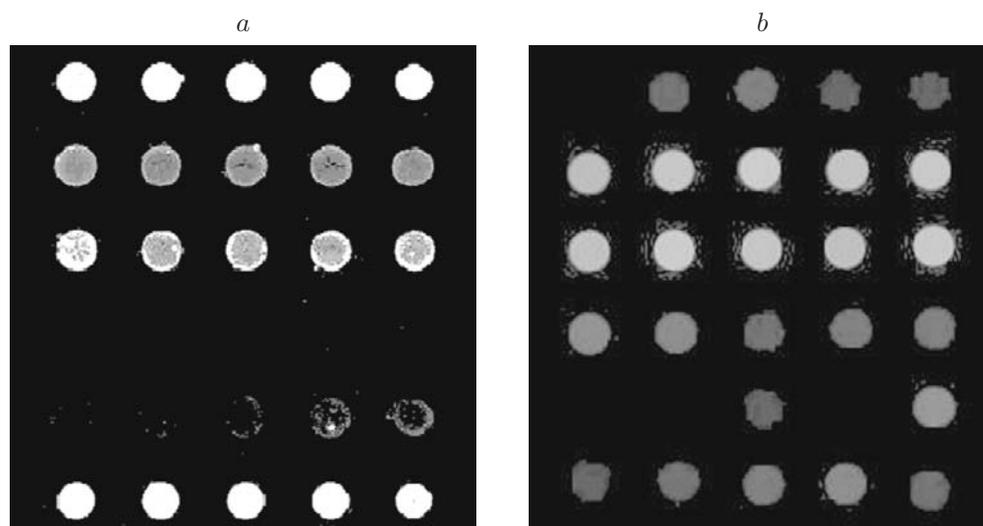


Рис. 4. Результаты сканирования биочипа после проведённой гибридизации ампликона гена матричного белка вируса гриппа А: *a* — флуоресцентная спектроскопия, сканер "ScanArray Express 2.0"; *b* — эллипсометрия, сканер «МИКРОСКАН-М»

специфичный зонд к гену US5 вируса герпеса второго типа и буфер соответственно, не выявляются. Эллипсометрическое сканирование биочипа надёжно регистрирует строки 2 и 3 с гибридизованными ампликонами, так как при взаимодействии биомолекул эффективная толщина слоя заметно увеличивается. Строки 1, 4, 6, содержащие только олигонуклеотидные зонды, выявляются слабо. Интенсивности сигналов от точек в ряду 4 намного слабее, чем в рядах 2 и 3 как по данным флуоресценции, так и по данным эллипсометрии, что связано, по-видимому, с малой массой образующегося комплекса по сравнению с ампликоном (30 и 200 нуклеотидных звеньев соответственно).

Отметим заметное расхождение результатов измерений, полученных методами флуоресцентной спектрометрии и эллипсометрии для строк чипа 2 и 3, содержащих ампликон с зондами 7 Matr и 5 Matr. По данным эллипсометрии значения эффективной толщины (а значит, и размер, и концентрация ампликона) в этих случаях практически одинаковы,

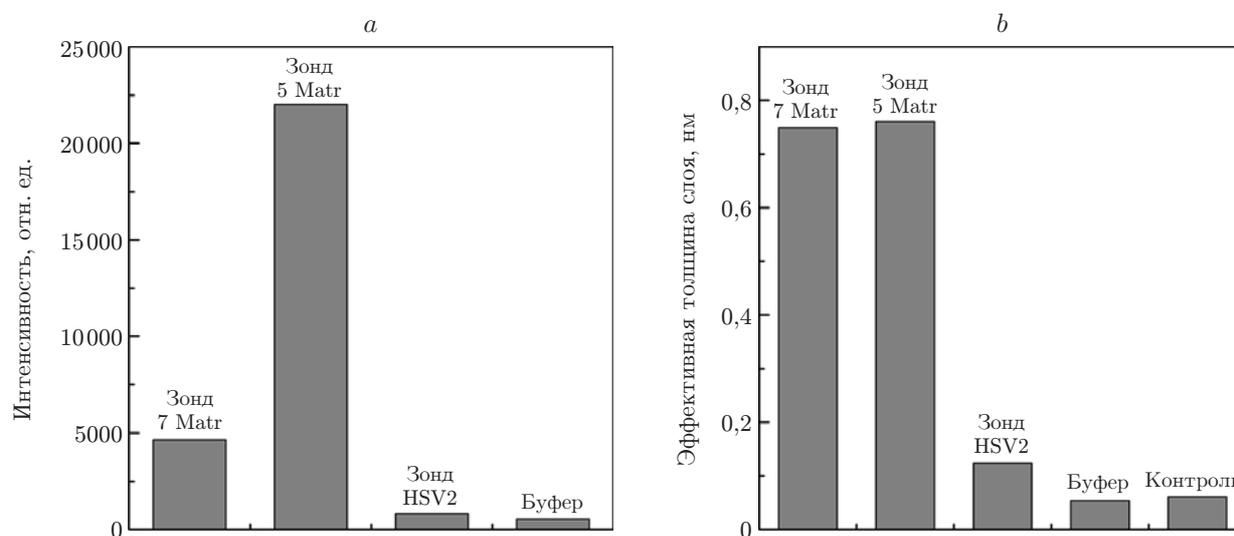


Рис. 5. Гистограммы средних значений: относительной интенсивности флуоресценции (*a*) и эффективной толщины слоев (*b*)

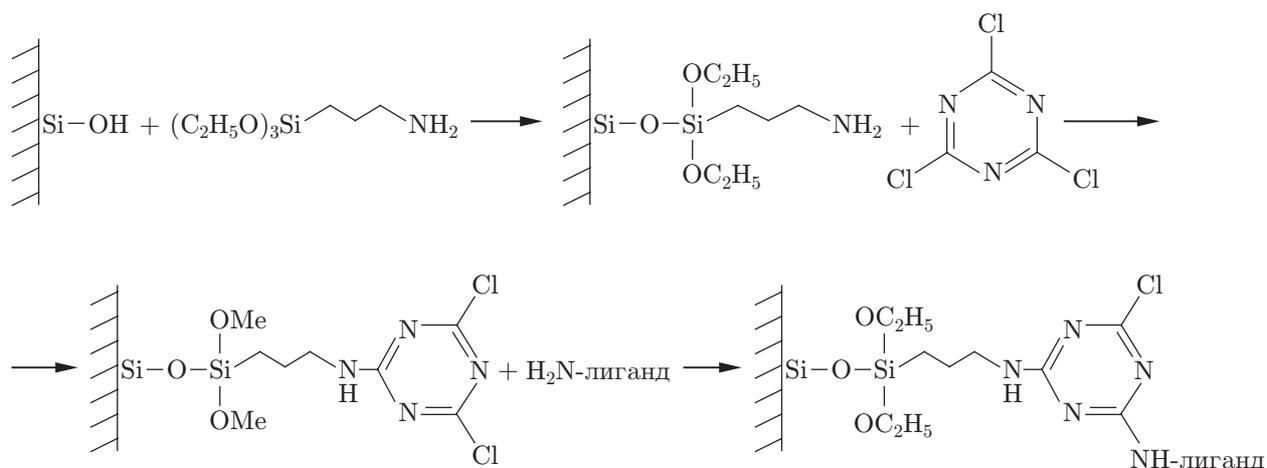


Рис. 6. Схема иммобилизации белкового лиганда на кремниевой поверхности

тогда как по данным флуоресцентной спектрометрии средние значения интенсивности сигнала для зондов 7 Matr и 5 Matr различаются почти в 5 раз. Это может быть связано со специфическим влиянием фрагментов биомолекул в ампликоне на излучательную способность флуоресцентной метки, что и приводит к расхождению в величинах интенсивности сигналов.

2.2. *Детекция белковых молекул и белок-белковых взаимодействий.* В разд. 2.1 было отмечено, что для иммобилизации белковых молекул использовали два способа: 1) кремниевую пластину, содержащую аминопропилтриэтоксисилильные группы, обрабатывали бифункциональным линкером цианурхлоридом (рис. 6) и выдерживали в растворе белка; 2) сорбцию белковых молекул на поверхности носителя проводили после обработки амминосодержащего кремния раствором золотых наночастиц (размер  $\sim 20$  нм).

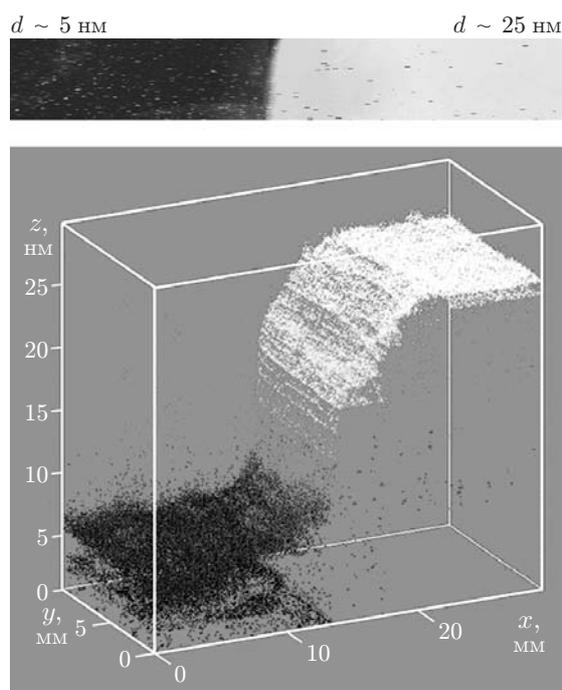


Рис. 7. Трёхмерное изображение кремниевой пластины на основе данных эллипсометрического сканирования до (тёмное поле) и после (светлое поле) обработки наночастицами золота

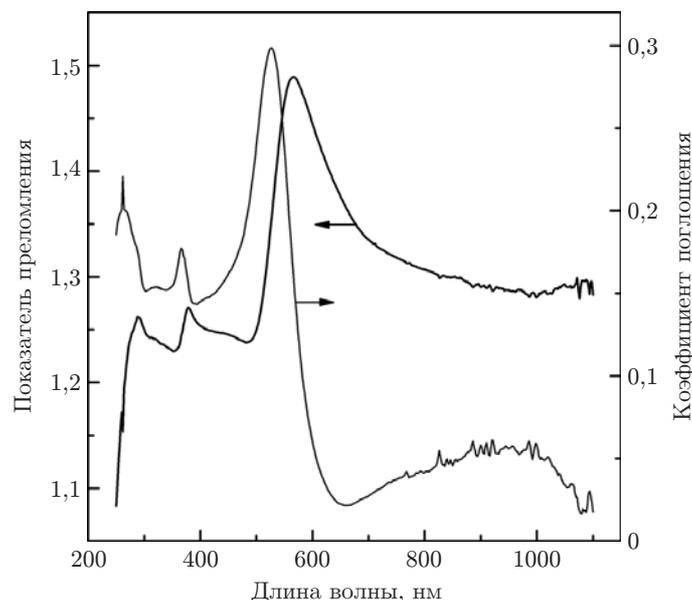


Рис. 8. Зависимости показателя преломления и коэффициента поглощения слоя наночастиц золота от длины волны света

В обоих случаях предобработка носителя приводила к образованию на его поверхности дополнительных слоёв, которые были визуализированы с помощью эллипсометрии. В частности, на рис. 7 видно изменение состояния поверхности носителя после завершения стадий 1 и 2 (левая и правая часть образца соответственно) до момента нанесения белковых молекул. После нанесения золотых частиц наблюдается увеличение эффективной толщины слоя почти до 20–25 нм. Можно утверждать, что наночастицы формируют на поверхности кремния монослой, толщина которого соответствует размеру наночастиц. Следует заметить, что оптические свойства образующегося монослоя золотых наночастиц кардинально отличаются от таковых для толстых (>100 нм) плёнок золота. Данные, полученные с помощью спектральной эллипсометрии, свидетельствуют о наличии дискретных частиц в слое (появление узкой полосы поглощения света в спектре  $k(\lambda)$  при  $\sim 530$  нм, характерной для плазмонного поглощения света отдельными наноразмерными металлическими частицами (рис. 8)).

Используя оба способа иммобилизации белков на кремниевой поверхности, фиксировали различные белковые молекулы (гемоглобин, лизоцим, БСА, антитела). На рис. 9 и 10 на примере гемоглобина и антител РАМ соответственно представлены результаты эллипсометрического сканирования поверхности кремния после фиксации белка в концентрациях 0,001, 0,01 и 0,1 мг/мл с помощью ковалентной иммобилизации и сорбции на золоте. Видно, что повышение концентрации белка в растворе, наносимом на подложку для иммобилизации, приводит к увеличению эффективной толщины фиксированного слоя биомолекул. При этом установлено, что рост молекулярной массы белка, как правило, коррелирует с увеличением толщины формируемой им плёнки на поверхности (данные не приводятся). Сложно дать точные количественные характеристики процессов взаимодействия белковых молекул с поверхностью, но можно предположить, что здесь реализуются как монослойное покрытие поверхности молекулами белка (для низких концентраций), так и сверхмонослойное белок-белковое взаимодействие (для высоких концентраций). Аналогичные результаты получены и для других исследованных в работе белков.

Стоит отметить, что в случае сорбционного механизма фиксации белка возможно

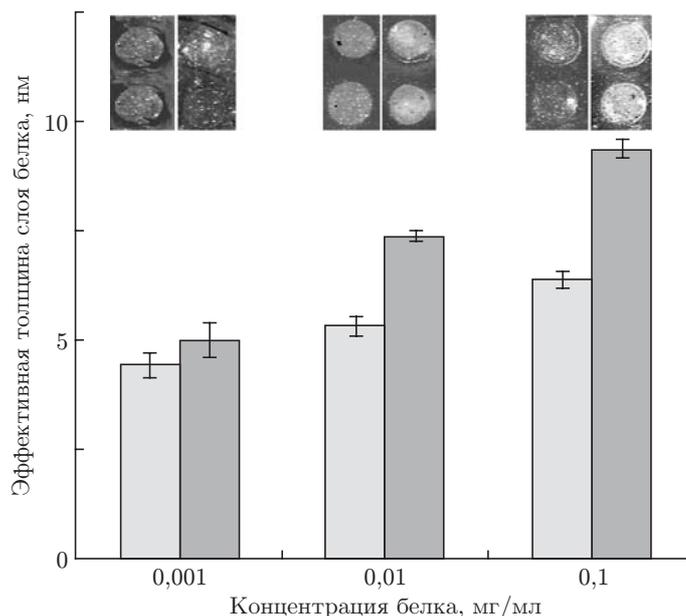


Рис. 9. Гистограмма средних значений эффективных толщин белковых молекул спотов при сорбции гемоглобина на поверхности пластины до (светлые столбцы) и после (тёмные столбцы) повторной обработки коллоидным раствором золота

усиление сигнала путём повторного покрытия пластины золотыми наночастицами (см. рис. 9), а также при ковалентной иммобилизации белков, но это требует проведения дополнительного этапа блокирования поверхности.

На следующем этапе работы в качестве иммобилизованных на кремниевой поверхности маркеров были использованы антивидоспецифичные антитела (RAM), иммобилизацию которых осуществляли по сорбционному механизму с помощью золотых наночастиц. После инкубации и удаления несвязавшихся антител блокировали оставшиеся на поверхности реакционные сайты 0,2 М раствором глицина (рН = 8). Пластину сканировали, а затем обрабатывали видоспецифическим иммуноглобулином, конъюгированным с пероксидазой хрена.

При сравнении изображений, представленных на рис. 10, *a, b*, видно, что обработка поверхности раствором, содержащим конъюгат иммуноглобулина, приводит к усилению сигнала, что позволяет говорить о возможности использования эллипсометрического сканирования для label-free детекции белок-белковых взаимодействий.

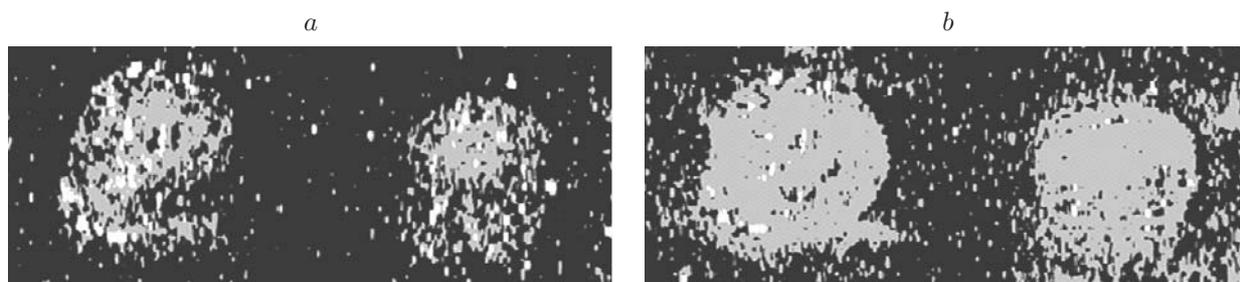


Рис. 10. Фрагмент эллипсометрического изображения пластины с иммобилизованными антителами RAM: до (*a*) и после (*b*) обработки конъюгатом IgG-PIX

**Заключение.** В предложенной работе показано, что метод эллипсометрии может быть успешно применён для анализа гибридизационных взаимодействий нуклеиновых кислот, а также белок-белковых взаимодействий, происходящих на поверхности биочипов. При эллипсометрическом сканировании биочипов возможно не только выявлять сорбированные на поверхности биомолекулы, но и фиксировать изменения толщины, что важно для выявления белок-белковых взаимодействий, реализующихся, например, при образовании комплекса антиген/антитело и широко используемых в иммуноферментном анализе. Эллипсометрическая информация может быть представлена в виде значений эффективных толщин покрытий биомолекул, что позволяет рассчитать количественные характеристики процессов адсорбции и реакций биомолекул на поверхности биочипа.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Ng J. H., Ilag L. L.** Biochips beyond DNA: technologies and applications // *Biotechnol. Ann. Rev.* 2003. **9**. P. 1–149.
2. **Vo-Dinh T., Cullum B.** Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics // *Fresenius Journ. Anal. Chem.* 2000. **366**. P. 540–551.
3. **Srivannavit O., Gulari M., Gulari E. et al.** Design and fabrication of microwell array chips for a solution-based, photogenerated acid-catalyzed parallel oligonucleotide DNA synthesis // *Sensors and Actuators A*. 2004. **116**, N 1. P. 150–160.
4. **Современные** проблемы эллипсометрии /Под ред. А. В. Ржанова. Новосибирск: Наука, 1980. 457 с.
5. **Bae Y. M., Oh B.-K., Lee W., Choi J.-W.** Immunosensor for detection of *Yersinia enterocolitica* based on imaging ellipsometry // *Analytical Chemistry*. 2004. **76**. P. 1799–1803.
6. **Liu A.-H., Wayner P. C. Jr., Plawsky J. L.** Image scanning ellipsometry for measuring nonuniform film thickness profiles // *Appl. Opt.* 1994. **33**, N 7. P. 1223–1229.
7. **Venkatasubbarao S., Beaudry N., Zhao Y., Chipman R.** Evanescent-imaging-ellipsometry-based microarray reader // *Journ. Biomed. Opt.* 2006. **11**, N 1. 014028.
8. **Matteucci M. D., Caruthers M. H.** Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // *Journ. Amer. Chem. Soc.* 1981. **103**, N 11. P. 3185–3191.
9. **Grabar K. C., Freeman R. G., Hommer M. B., Natan M. J.** Preparation and characterization of Au colloid monolayers // *Analytical Chemistry*. 1995. **67**. P. 735–743.
10. **Рыхлицкий С. В., Спесивцев Е. В., Швец В. А., Прокопьев В. Ю.** Спектральный эллипсометрический комплекс «ЭЛЛИПС-1771» // *Приборы и техника эксперимента*. 2007. № 2. С. 160–161.

*Поступила в редакцию 9 августа 2011 г.*