



ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ДНК-МИКРОЧИПОВ

Р.Р. Гарафутдинов¹, А.Р. Сахабутдинова¹, Р.Ф. Талипов², А.В. Чемерис¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

²Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный университет

Резюме

Приведен обзор способов химической иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности твердых подложек, применяемых при изготовлении ДНК-микрочипов. Основное внимание уделено работам, посвященным поиску схем ковалентной пришивки олигонуклеотидов к поверхности стекла. Рассмотрены подходы, направленные на решение вопросов пространственного упорядочения и разрежения иммобилизуемых молекул.

Ключевые слова: ДНК-микрочипы, олигонуклеотиды, подложка, функционализация поверхности, моноякорная иммобилизация, мультиякорная иммобилизация

Введение

Технология ДНК-микрочипов - небольших пластин с нанесенными на их поверхность фрагментами нуклеиновых кислот - насчитывает уже свыше 25 лет. Интерес к созданию подобных устройств обусловлен бурным развитием в последние десятилетия молекулярной биологии и генетики, приведшим к накоплению значительного объема данных о структуре и важной роли нуклеиновых кислот (НК) в живых организмах. Использование ДНК-микрочипов представляется перспективным вследствие возможности проведения на одном чипе аналитической процедуры параллельно для множества специфических ДНК-последовательностей. В основу большинства разновидностей ДНК-микрочипов заложена молекулярная гибридизация олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН), иммобилизованных на твердом носителе, с флуоресцентно меченной анализируемой ДНК (т.н. гибридизационные микрочипы). В качестве носителя (субстрата) для иммобилизации ОДН могут использоваться различные материалы. Ковалентная иммобилизация ОДН достигается за счет химической модификации как поверхности носителя, так и молекулы НК. На практике применяются различные схемы пришивки ОДН к поверхности, при этом критериями поиска удобной схемы иммобилизации выступают прочность

прикрепления и наличие достаточного для гибридизации пространства. Основное внимание в данном обзоре в первую очередь уделено работам, посвященным решению указанных задач.

Способы пришивки ОДН к поверхности

Существует два основных, принципиально различающихся способа изготовления ДНК-микрочипов: с помощью синтеза ОДН непосредственно на чипе (*in situ*) и путем иммобилизации предварительно синтезированных ОДН на твердой поверхности (*non in situ*) [1-4]. Несколько особняком стоит технология гелевых ДНК-микрочипов, разработанная отечественными учеными в ИМБ РАН под руководством академика А.Д. Мирзабекова [5]. Разработанные данным коллективом ДНК-микрочипы не имеют аналогов, поскольку в их основе лежит ковалентная иммобилизация олигонуклеотидов в объеме полиакриламидного геля, закрепленного на поверхности стекла. Гель обеспечивает высокую гидрофильность среды, что ведет к стабилизации иммобилизованных молекул и облегчает их взаимодействие с исследуемой ДНК. При этом количество иммобилизуемых молекул в таких трехмерных микрочипах намного выше, чем в поверхностных, что приводит к более высокой интенсивности сигнала флуоресценции. К настоящему времени созданы ДНК-микрочипы не только для решения исследовательских задач (в

геномике), но и несколько коммерческих наборов, применимых в медицине [6-11]. Однако в данном обзоре отражены работы, посвященные только иммобилизации предварительно синтезированных ОДН, поскольку технологии *in situ* и гелевых микрочипов формально нельзя рассматривать как способ закрепления на твердой поверхности.

Метод *non in situ* в общих чертах заключается в закреплении молекул ОДН на твердой поверхности субстрата (чаще стекла) посредством химических связей, при этом возможна как ковалентная, так и нековалентная фиксация. Нековалентная фиксация достигается путем образования ионных связей, например, между положительно заряженными аминогруппами поверхности и отрицательно заряженными фосфатными группами цепи ОДН [12]. Данный

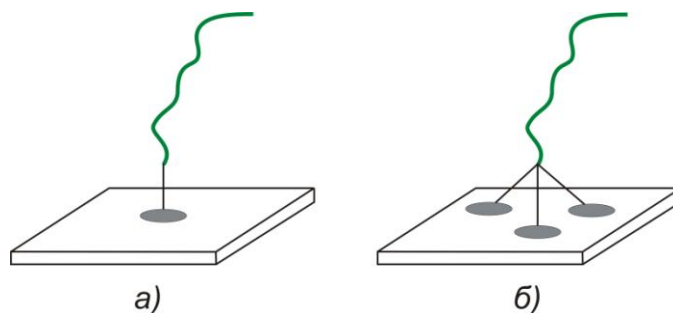


Рис. 1. Способы прикрепления ОДН к поверхности: а) "моноклорная" иммобилизация, б) "мультиклорная" иммобилизация.

Очевидно, что в случае "моноклорной" иммобилизации вероятность отщепления определенной доли молекул ОДН от поверхности за счет гидролиза более высока по сравнению с "мультиклорной" (рис. 1б). Эта проблема менее актуальна для гибридационных микрочипов, однако он усиливается при длительных манипуляциях с участием ферментов. Мультиклорные системы представляются более надежными, поскольку при возможном разрыве одной связи остаются еще несколько. Однако они предложены практически только для закрепления ОДН на поверхности позолоченных подложек или наночастиц золота [13-15]. Для стеклянных подложек сообщается об иммобилизации ОДН через дендримерные структуры [16], синтезированные с использованием реагентов "doubler" и "trebler" компании Glen Research [17]. При использовании "мультиклорного" способа решаются сразу две технологические задачи: повышение прочности закрепления и разрежение молекул ОДН на поверхности, что может положительно сказаться на эффективности протекания процессов на микрочипе (молекулярная гибридизация, лигирование, амплификация и пр.).

вариант закрепления не представляет значительного интереса, поскольку ионные связи не обеспечивают прочной иммобилизации и возможности проведения ферментативных манипуляций на микрочипе. Более предпочтительным способом фиксации является ковалентная связь, образующаяся при взаимодействии функциональных групп модифицированных ОДН и поверхности субстрата. Для обеспечения протекания реакции предварительно модифицируют поверхность подложки, а в молекулы ОДН вводят в ходе автоматического синтеза химически активные группы в зависимости от используемой схемы пришивки. В большинстве случаев такая иммобилизация осуществляется путем присоединения ОДН через одну химическую связь ("моноклорная" иммобилизация) (рис. 1а).

В качестве подложек для изготовления ДНК-микрочипов предложены различные материалы: стекло, кремний, золото, полимеры, углеродные материалы [12]. Наиболее часто используется стекло в силу ряда его характерных свойств: нерастворимость в органических и неорганических растворителях, относительная химическая инертность, низкая фоновая флуоресценция, низкая стоимость, прочность и простота в обращении. Перед иммобилизацией ОДН стекло очищают, в результате чего поверхность выравнивается, с нее удаляются возможные загрязнения и генерируются свободные силанольные группы. Затем проводят функционализацию стекла действием алкоксисиланов, которая возможна в газовой и в жидкой фазе [18, 19], с последующей модификацией поверхностных групп различными соединениями. Химические основы прикрепления ОДН к поверхности функциональными группами подробно проработаны [2, 12, 20, 21]. Использование полимерных конструкций (подложек или покрытий) ведет к более высокой плотности функциональных групп на поверхности [22, 23].

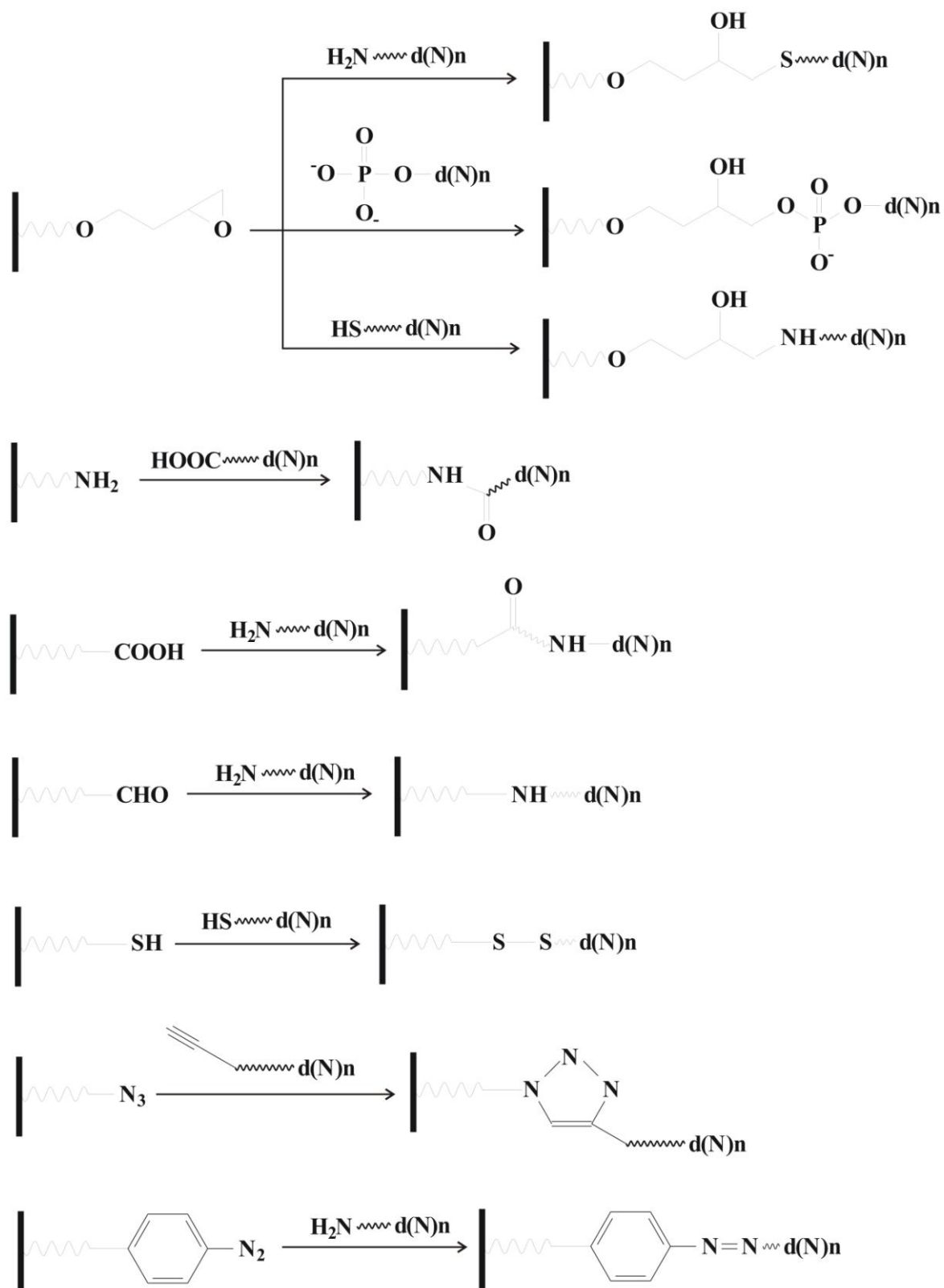


Рис. 2. Наиболее часто используемые схемы реакций иммобилизации ОДН на поверхности стекла.

"Моноякорная" иммобилизация ОДН

При "моноякорной" иммобилизации осуществляется химическое взаимодействие между одной функциональной группой в молекуле ОДН, располагающейся по ее концу (чаще 5'-концу), и одной функциональной группой на поверхности подложки. В результате реакции в якорном фрагменте образуется одна цепочка связующих атомов. Основные виды ковалентной пришивки ОДН к поверхностным функциональным группам стеклянных подложек представлены на рис. 2. На практике наиболее часто используют amino-, эпокси- и альдегид-модифицированные поверхности.

Иммобилизация ОДН на эпоксицирированные поверхности достаточно часто используется в производстве ДНК-микрочипов. Для создания слоя эпокси-групп субстрат обрабатывается 3-глицидоксипропилтриметоксисилоном (GOPS). Способ пришивки на эпокси-поверхности относительно прост и обеспечивает высокую эффективность иммобилизации при использовании ОДН, содержащих фосфатные группы [24]. Высокая плотность эпокси-групп достигается при использовании глицидилового эфира бисфенола А (реagenta SU-8) [25]. Широко распространенным способом прививки является иммобилизация с участием таких электрофильных функциональных групп как карбоксильная или альдегидная. В этом случае в паре с ними используется, например, аминогруппа. Имеется достаточно широкий круг статей, посвященных характеристике и выбору наиболее подходящих аминоксодержащих силанов для функционализации стеклянных подложек, например [26-28]. В данных работах представлены результаты, отражающие влияние структуры силанов на стойкость иммобилизованных систем.

Значительно реже для иммобилизации ОДН на стекле используются реакции образования тио-содержащих химических связей. Так, авторами работ [29-32] предложены гетеробифункциональные реагенты, способные по одному концу вступать в реакцию с тио-модифицированными ОДН, а по другому – ковалентно связываться с поверхностью. Иммобилизацию при этом можно проводить по двум альтернативным схемам. Согласно первой схеме гетеробифункциональным реагентом обрабатывают ОДН, что приводит к образованию триэтоксисилил-ОДН, которые затем присоединяются к немодифицированной поверхности стекла. По второй схеме гетеробифункциональный реагент сначала связывается с поверхностью, давая стеклянную подложку с функциональными группами, которая затем используется для иммобилизации ОДН. Применимость указанных реагентов была исследована авторами путем гибридизации иммобилизованных

ОДН с флуоресцентно мечеными ДНК-пробами. Оказалось, что предложенные реагенты обеспечивают стабильность образующихся между ОДН и поверхностью связей и высокую специфичность гибридизации.

В последнее время для иммобилизации ОДН находят применение реакции «click»-химии, впервые описанные для биомолекул Ростовцевым с соавт. [33]. Большой интерес к ним способствовал появлению работ, в которых реакции подобного типа исследуются на предмет применимости для функционализации твердых носителей, в том числе стекла [34]. В работе [35] реакции «click»-химии были предложены в качестве инструмента для регулирования гидрофильности поверхности частиц микронных размеров. Самой распространенной «click»-реакцией является 1,3-дипольное циклоприсоединение азидов с алкинами. Авторами [36] была описана удобная методика получения модифицированной поверхности кремнезема. Позднее был описан вариант пришивки ОДН к стеклянной подложке посредством «click»-реакции [37].

Большое количество работ посвящено закреплению ОДН на поверхности полимерных носителей, при этом полимерный характер может иметь как исключительно приповерхностный слой подложки, так и вся подложка целиком. В работе [20] описан способ формирования полиаминофениленовой поверхности с последующей иммобилизацией на ней биомолекул (ДНК и белков) через реакцию азосочетания. Сравнение стеклянных подложек, полученных обычной силанизацией, и полимерных поверхностей показало для последних более высокую плотность функциональных групп, приводящую к существенному повышению эффективности пришивки (до 30%) и интенсивности флуоресцентного сигнала [38-40]. Однако следует учесть, что плотность функциональных групп оказывает большое влияние на эффективность ДНК-микрочипов, так как определяет плотность иммобилизуемых молекул, их ориентацию на поверхности и эффективность последующей гибридизации. Так, с помощью фотоэлектронной спектроскопии показано, что эффективность гибридизации ДНК увеличивается с уменьшением плотности ОДН-зондов на поверхности [41]. В той же работе с помощью 32Р-радиометрического анализа авторами выявлено, что полная эффективность гибридизации (100%) достигается при плотности $2.1 \cdot 10^{11}$ молекул/см². При повышении плотности до $6.7 \cdot 10^{12}$ молекул/см² эффективность гибридизации снижается до 75-85%. Плотность иммобилизованных ОДН легко регулируется при изготовлении ДНК-микрочипов *in situ* путем регулирования дозы УФ-облучения, направляемого на место синтеза ОДН [42]. Для большинства схем *non in situ* процесс контроля

плотности иммобилизации ОДН более трудоемко. При этом возможно получение первичных данных о плотности (количестве) функциональных групп поверхности, например, методами спектрофотометрии [43-46].

"Мультиякорная" иммобилизация ОДН

Наиболее очевидным способом повышения стабильности и прочности иммобилизации ОДН является использование молекулярных систем, обеспечивающих не одну, а несколько точек их пришивки к подложке, что было продемонстрировано рядом авторов [13-15]. Дополнительным преимуществом подобной иммобилизации является возможность регулирования плотности ОДН. Однако существующие на сегодняшний день варианты "мультиякорной" иммобилизации предложены только для золотых подложек. В работе [13] авторами описан способ пришивки ОДН к золоту в двух точках через дитиокарбаматную группу, генерируемую взаимодействием аминомодифицированного ОДН с сероуглеродом в щелочной среде. Сравнивая между собой конъюгаты наночастиц золота и ОДН с якорными группировками, содержащими одну, две и три

меркапто-группы, авторы [14] выявили повышение стабильности конъюгатов с увеличением количества связей между ОДН и поверхностью металла. Оказалось, что три атома серы в молекулярном якоре обеспечивают существенно более высокую прочность пришивки. Кроме того, тетраэдрическая структура подобной трехякорной конструкции позволяет управлять ориентацией молекул ОДН, что приводит к повышению эффективности гибридизации. Авторами [47] проведено сравнительное исследование прочности закрепления на наночастицах золота молекул флуоресцентно меченых ОДН с молекулярными якорями, содержащими одну меркапто-группу и один, два и три дитиолановых фрагмента. Ими показано, что наличие дитиолановых фрагментов, в отличие от монотиольных групп, в целом увеличивает стабильность конъюгатов, при этом их количество и порядок в якорном фрагменте не имеет существенного значения.

В литературе нам не удалось найти работ, в которых бы описывалась схожая модификация ОДН и их иммобилизация на стекле, хотя для подобной пришивки в двух или трех точках могут быть использованы коммерческие реагенты (рис. 4).

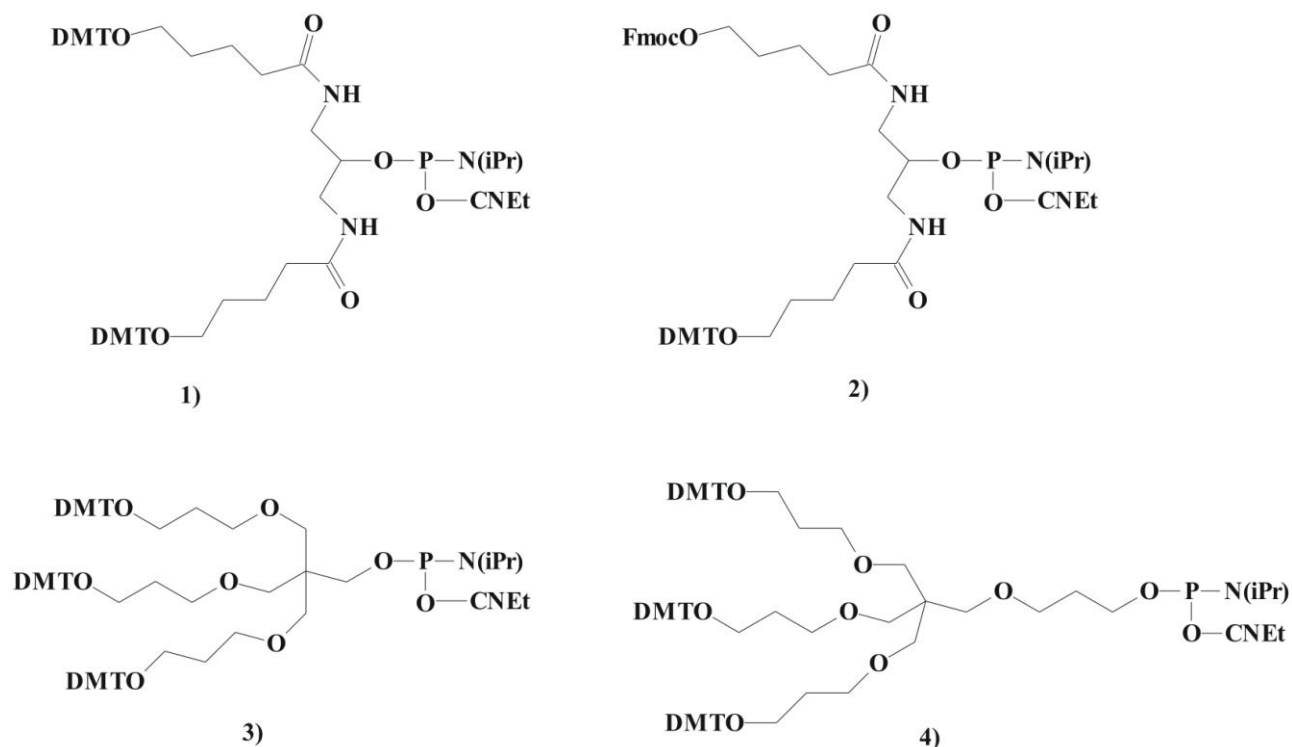


Рис. 4. Модификаторы ОДН фирмы Glen Research: 1) "symmetric doubler", 2) "asymmetric doubler", 3) "trebler", 4) "long trebler".

Известно их использование для синтеза олигонуклеотидных дендримерных структур [16, 48], что обеспечивает за счет большего количества функциональных групп увеличение флуоресцентного сигнала [49]. Однако, как уже отмечалось выше, высокая плотность иммобилизации неблагоприятно сказывается на эффективности гибридизации за счет стерических затруднений [50]. Другие исследователи предложили использовать для иммобилизации ОДН подложки с конусообразными дендримерными структурами, несущими равноудаленные друг от друга функциональные группы [51-54]. Иммобилизация ОДН с несколькими центрами связывания позволяет контролировать расстояние между соседними молекулами ОДН, однако ее недостатком является снижение чувствительности микрочипового анализа за счет уменьшения загрузки поверхности.

Заключение

ДНК-микрочипы представляют для исследователей значительный интерес, поскольку являются удобными инструментами биологических и медицинских исследований. Их широкое внедрение в практику сдерживается, в первую очередь, неудовлетворительной точностью анализа, недостаточной однозначностью получаемых данных. Это обусловлено тем, что решены еще далеко не все вопросы, связанные с чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью анализа на чипах. В качестве наиболее острых задач продолжают оставаться обеспечение однородности морфологии спотов, повышение соотношения сигнал/шум, количественная оценка аналитического сигнала, оптимизация протоколов проведения анализа и ряд других. Ключевые проблемы ДНК-микрочипов связаны с недостатками методической основы анализа нуклеотидных последовательностей, заключающегося в молекулярной гибридизации цепей нуклеиновых кислот на поверхности чипа. Проблемы, связанные с чувствительностью и воспроизводимостью, преимущественно обусловлены физическими и химическими факторами. Поскольку разработка ДНК-микрочипов представляет собой комплексную задачу, для ее решения должны быть объединены усилия специалистов разного профиля: биологов, химиков, медиков, инженеров. Развитие ДНК-микрочиповых технологий как результата междисциплинарных исследований зависит от прогресса в других сферах знаний. Бурный рост числа публикаций по микрочипам, произошедший в начале 2000-х, через десятилетие сменился стабилизацией,

свидетельствующей о переходе в новую фазу накопления научных данных для последующего прорыва. Есть все основания полагать, что такой рывок произойдет в ближайшем будущем с появлением новых знаний и технологических решений в области наук о материалах.

Цитированная литература:

1. <http://dna.punny.ru>
2. Гарафутдинов Р.Р., Шепелевич И.С., Чемерис А.В., Талипов Р.Ф. Химические аспекты создания ДНК-чипов // Вестн. Башк. ун-та. 2005. Т. №1. С. 49-54.
3. Beaucage S.L. Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications // Curr. Med. Chem. 2001. V. 8. P. 1213-1244.
4. Ramsay G. DNA chips: state-of-the art // Nat. Biotechnol. 1998. V. 16. P. 40-44.
5. Четкин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики // Росс. нанотехнол. 2006. Т. 1. №1-2. С. 13-28.
6. Mikhailovich V., Gryadunov D., Makarov A.A., Zasedatelev A., Kolchinsky A. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases // Bioassays. 2008. V. 30. P. 673-682.
7. Грядун Д.А., Гетман И.А., Чижова С.И., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Романов Г.А. Идентификация генно-модифицированных источников растительного происхождения в пищевых продуктах и сырье с использованием гидрогелевого олигонуклеотидного микрочипа // Мол. биол. 2011. Т. 45. № 6. С. 973-983.
8. Gryadunov D., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Nicot F., Dubois M., Izopet J. Hepatitis C virus genotyping using an oligonucleotide microarray based on the NS5B sequence // J. Clin. Microbiol. 2010. V. 48. P. 3910-3917.
9. Emelyanova M.A., Chudinov A.V., Surzhikov S.A., Nasedkina T.V., Amossenkov F.A., Kazubskaya T.P., Lubchenko L.N. Detection of Kras mutations in tumor cells using biochips // Mol. Biol. 2011. V. 45. P. 797-803.
10. Низамутдинов И.И., Андреева Т.В., Степанов В.А., Марусин А.В., Погаев Е.И., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. Биочип для выявления генетических маркеров риска развития sporadic формы болезни Альцгеймера у славянского населения России // Мол. биол. 2013. Т. 47. № 6. С. 949.
11. Belosludtsev Y., Iverson B., Lemeshko S., Eggers R., Wiese R., Lee S., Powdrill

- T., Hogan M. DNA microarrays based on noncovalent oligonucleotide attachment and hybridization in two dimensions // *Anal. Biochem.* 2001. V. 292. P. 250-256.
12. Tjong V., Tang L., Zauscher S., Chilkoti A. "Smart" DNA interfaces // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 1612-1626.
 13. Wang L., Wang X., Chen X., Liu J., Liu Sh., Zhao C. Development of an electrochemical DNA biosensor with the DNA immobilization based on in situ generation of dithiocarbamate ligands // *Bioelectrochem.* 2012. V. 88. P. 30-35.
 14. Sakata T., Maruyama S., Ueda A., Otsuka H., Miyahara Y. Stable immobilization of an oligonucleotide probe on a gold substrate using tripodal thiol derivatives // *Langmuir.* 2007. V. 23. P. 2269-2272.
 15. Li Z., Jin R., Mirkin C.A., Letsinger R.L. Multiple thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates // *Nucleic Acids Research.* 2002. V. 30. N. 7. P. 1558-1562.
 16. Shchepinov M.S., Mir K.U., Elder J.K., Frank-Kamenetskii M.D., Southern E.M. Oligonucleotide dendrimers: stable nanostructures // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 3035-3041.
 17. <http://www.glenresearch.com>
 18. Phaner-Goutorbe M., Dugas V., Chevolut Y., Souteyrand E. Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols: a comparative study // *Mater. Sci. Eng.: C.* 2011. V. 31. P. 384-390.
 19. Yadav A.R., Sriram R., Carter J.A., Miller B.L. Comparative study of solution-phase and vapor-phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces // *Mater. Sci. Eng.: C.* 2014. V. 35. P. 283-290.
 20. Berthelot T., Garcia A., Le X.T., Morsli J.E., Jegou P., Palacin S., Viel P. "Versatile toolset" for DNA or protein immobilization: Toward a single-step chemistry // *Appl. Surf. Sci.* 2011. V. 257. P. 3538-3546.
 21. Solomun T., Mix R., Sturm H. Immobilization of silanized DNA on glass: influence of the silane tether on the DNA hybridization // *ACS Appl. Mater. Interf.* 2012. V. 2. P. 2171-2174.
 22. Li X., Wang M., Wang L., Shi X., Xu Y., Song B., Chen H. Block copolymer modified surfaces for conjugation of biomacromolecules with control of quantity and activity // *Langmuir.* 2013. V. 29. P. 1122-1128.
 23. Demirci S., Caykara T. RAFT-mediated synthesis of cationic poly[(arylvinylbenzyl)trimethylammonium chloride] brushes for quantitative DNA immobilization // *Mater. Sci. Eng.: C.* 2013. V. 33. P. 111-120.
 24. Mahajan S., Kumar P., Gupta K.C. Oligonucleotide microarrays: immobilization of phosphorylated oligonucleotides on epoxytated surface // *Bioconj. Chem.* 2006. V. 17. P. 1184-1189.
 25. Sethi D., Kumar A., Gandhi R.P., Kumar P., Gupta K.C. New protocol for oligonucleotide microarray fabrication using SU-8-coated glass microslides // *Bioconj. Chem.* 2010. V. 21. P. 1703-1708.
 26. Oh S.J., Cho S.J., Kim Ch.O., Park J.W. Characteristics of DNA microarrays fabricated on various aminosilane layers // *Langmuir.* 2002. V. 18. P. 1764-1769.
 27. Metwalli E., Haines D., Becker O., Conzone S., Pantano C.G. Surface characterizations of mono-, di-, and tri-aminosilane treated // *J. Coll. Interf. Sci.* 2006. V. 298. P. 825-831.
 28. Zhu M., Lerum M.Z., Chen W. How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 416-423.
 29. Choithani J., Kumar P., Gupta K.C. N-(3-Triethoxysilylpropyl)-6-(N-maleimido)-hexanamide: An efficient heterobifunctional reagent for the construction of oligonucleotide microarrays // *Anal. Biochem.* 2006. V. 357. P. 240-248.
 30. Misra A. N-(3-Triethoxysilylpropyl)-4-(N'-maleimidylmethyl)-cyclohexanamide (TPMC): A heterobifunctional reagent for immobilization of oligonucleotides on glass surface // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. P. 3749-3753.
 31. Misra A., Dwivedi P. Immobilization of oligonucleotides on glass surface using an efficient heterobifunctional reagent through maleimide-thiol combination chemistry // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. P. 248-255.
 32. Misra A., Shahid M. Immobilization of self-quenched DNA hairpin probe with a heterobifunctional reagent on a glass surface for sensitive detection of oligonucleotides // *Bioorg. Med. Chem.* 2009. V. 17. P. 5826-5833.
 33. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes // *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002. V. 41. P. 2596-2599.
 34. Prakash Sh., Long T.M., Selby J.C., Moore J.S., Shannon M.A. "Click" modification of silica surfaces and glass microfluidic channels // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. P. 1661-1667.

35. Bayraktar A., Saracoglu B., Golgelioglu C., Tuncel A. Click-chemistry for surface modification of monodisperse-macroporous particles // *J. Coll. Interf. Sci.* 2012. V. 365. P. 63-71.
36. Lummerstorfer T., Hoffmann H. Click chemistry on surfaces: 1,3-dipolar cycloaddition reactions of azide-terminated monolayers on silica // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. P. 3963-3966.
37. Uszczynska B., Ratajczak T., Frydrych E., Maciejewski H., Figlerowicz M., Markiewicz W.T., Chmielewski M.K. Application of click chemistry to the production of DNA microarrays // *Lab Chip.* 2012. V. 12. P. 1151-1156.
38. Shimomura A., Nishino T., Maruyama T. Display of amino groups on substrate surfaces by simple dip-coating of methacrylate-based polymers and its application to DNA immobilization // *Langmuir.* 2013. V. 29. P. 932-938.
39. Li X., Wang M., Wang L., Shi X., Xu Y., Song B., Chen H. Block copolymer modified surfaces for conjugation of biomacromolecules with control of quantity and activity // *Langmuir.* 2013. V. 29. P. 1122-1128.
40. Vigano M., Levi M., Turri S., Chiari M., Damini F. New copolymers of *N,N*-dimethylacrylamide with blocked isocyanates for oligonucleotide immobilization in DNA microarray technology // *Polymer.* 2007. V. 48. P. 4055-4062.
41. Gong P., Harbers G.M., Grainger D.W. Multi-technique comparison of immobilized and hybridized oligonucleotide surface density on commercial amine-reactive microarray slides // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 2342-2351.
42. Chen S., Phillips M.F., Cerrina F., Smith L.M. Controlling oligonucleotide surface density in light-directed DNA array fabrication // *Langmuir.* 2009. V. 25. P. 6570-6575.
43. Шляпникова Е. А., Шляпников Ю. М., Афанасьев В. Н., Афанасьева Г. В., Гаврюшкин А. В., Белецкий И. П. Исследование качества аминированных подложек, используемых для гибридного анализа // *Биоорг. химия.* 2007. Т. 33. №2. С. 261-268.
44. Moon J.H., Shin J.W., Kim S.Y., Park J.W. Formation of Uniform Aminosilane Thin Layers: An Imine Formation To Measure Relative Surface Density of the Amine Group // *Langmuir.* 1996. V. 12. P. 4621-4624.
45. Moon J.H., Kim J.H., Kim K. et al. Absolute Surface Density of the Amine Group of the Aminosilylated Thin Layers: Ultraviolet-Visible Spectroscopy, Second Harmonic Generation, and Synchrotron-Radiation Photoelectron Spectroscopy Study // *Langmuir.* 1997. V. 13. P. 4305-4310.
46. Туктамышева А.Х., Гарафутдинов Р.Р., Талипов Р.Ф. Сравнительный анализ различных вариантов химической модификации поверхности кремнезема // *Вестн. Башк. ун-та.* 2012. т. 17. № 3. С. 1247-1252.
47. Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Чемерис А.В. Повышение стабильности конъюгатов олигонуклеотидов с наночастицами золота // *Биоорг. химия.* 2015. Т. 41. №3. С. 327-335.
48. Shchepinov M.S., Udalova I.A., Bridgman A.J., Southern E.M. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4447-4454.
49. Berre V.L., Trevisiol E., Dagkessamanskaia A., Sokol S., Caminade A.-M., Majoral J.P., Meunier B., Francois J. Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. e88.
50. Shchepinov M.S., Case-Green S.C., Southern E.M. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1155-1161.
51. Hong B.J., Oh S.J., Youn T.O., Kwon S.H., Park J.W. Nanoscale-controlled spacing provides DNA microarrays with the SNP discrimination efficiency in solution phase // *Langmuir.* 2005. V. 21. P. 4257-4261.
52. Hong B.J., Sunkara V., Park J.W. DNA microarrays on nanoscale-controlled surface // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 12. P. 1-8.
53. Hong B.J., Shim J.Y., Oh S.J., Park J.W. Self-Assembly of a Dendron through Multiple Ionic Interaction to Give Mesospacing between Reactive Amine Groups on the Surface // *Langmuir.* 2003. V. 19. P. 2357-2365.
54. Boateng J., Peek J., Zahorchak R., Chittur K. Dendron-modified surfaces provide an ideal environment for stem-loop DNA probes // *Anal. Biochem.* 2012. V. 430. P. 39-44.

**CHEMISTRY OF OLIGONUCLEOTIDES IMMOBILIZATION
DURING DNA MICROARRAYS PRODUCTION**

Ravil R. Garafutdinov¹, Assol R. Sakhabutdinova¹, Rifkat F. Talipov², Alexey V. Chemeris¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Center Russian Academy of Sciences

²Bashkir State University

Resume

The methods of chemical immobilization of oligonucleotides on the surface of solid supports used in DNA microarrays production are reviewed. The main attention is paid for the schemes of oligonucleotides covalent grafting to the glass surface. The techniques for spatial ordering and dilution of oligonucleotide molecules on the surface are considered.

Key words: DNA microarrays, oligonucleotides, support, surface functionalization, single anchor immobilization, multiple anchor immobilization