



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 157 385** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК⁷ **C 08 F 220/56, G 01 N 33/50, C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99115635/04, 19.07.1999
(24) Дата начала действия патента: 19.07.1999
(46) Дата публикации: 10.10.2000
(56) Ссылки: 1. В.А. ВАСИЛИСКОВ и др. Метод получения микрочипов с помощью сополимеризации с акриламидом. Молекулярная биология. - 1988, т.32, N 5, с.923 - 925. 2. US 5412087 A, 02.05.1995. 3. WO 98/39351 A1, 11.09.1998. 4. US 5981734 A, 09.11.1999. 5. US 5837860 A, 17.11.1998.
(98) Адрес для переписки:
117984, ГСП-1, Москва, В-334, ул. Вавилова 32, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

(71) Заявитель:
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
(72) Изобретатель: Мирзабеков А.Д., Тимофеев Э.Н.
(73) Патентообладатель:
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОЧИПОВ НА ОСНОВЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

(57) Реферат:
Изобретение относится к области молекулярной биологии и биотехнологии и касается способа изготовления микрочипов на основе олигонуклеотидов, иммобилизованных в органических полимерных гелях, получаемых полимеризацией неопределенных мономеров. Такие микрочипы могут найти применение в молекулярной биологии и биотехнологии, при секвенировании и картировании ДНК, в генетическом анализе, при детектировании мутаций, в медицине и для других приложений. Описывается способ изготовления микрочипа на основе олигонуклеотидов, иммобилизованных в органическом геле, приготовленном путем сополимеризации неопределенных производных

олигонуклеотидов с ненасыщенными мономерами, причем водно-солевые растворы, содержащие ненасыщенные мономеры, модифицированные неопределенными фрагментами олигонуклеотиды и компонент каталитической системы, индуцирующей полимеризацию, растворимый только в воде, наносят на стеклянную подложку в виде микрокапель и проводят сополимеризацию мономеров погружением сформированной матрицы в не смешивающийся с водой органический растворитель, содержащий растворенный другой компонент каталитической системы. Технический результат - упрощение способа изготовления микрочипов с высокой плотностью элементов матрицы. 5 з.п. ф-лы, 2 ил.

RU 2 1 5 7 3 8 5 C 1

RU 2 1 5 7 3 8 5 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 157 385** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 08 F 220/56, G 01 N 33/50,**
C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 99115635/04, 19.07.1999

(24) Effective date for property rights: 19.07.1999

(46) Date of publication: 10.10.2000

(98) Mail address:
117984, GSP-1, Moskva, V-334, ul. Vavilova
32, Institut molekularnoj biologii im. V.A.
Ehngel'gardta RAN

(71) Applicant:
Institut molekularnoj biologii im. V.A.
Ehngel'gardta RAN

(72) Inventor: Mirzabekov A.D.,
Timofeev Eh.N.

(73) Proprietor:
Institut molekularnoj biologii im. V.A.
Ehngel'gardta RAN

(54) **METHOD OF OLIGONUCLEOTIDE-BASE MICROCHIP MAKING**

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology, biotechnology.
SUBSTANCE: invention relates to method of making oligonucleotide-base microchips immobilized in organic polymeric gels obtained by polymerization of unsaturated monomers. These microchips can be used in DNA sequencing and mapping, genetic analysis, mutations detection, in medicine and for other aims. Invention describes method of making microchip based on oligonucleotides immobilized in organic gel prepared by copolymerization of unsaturated derivatives of oligonucleotides with

unsaturated monomers. Aqueous-saline solutions containing unsaturated monomers, oligonucleotides modified with unsaturated fragments and water-soluble component of catalytic system that induces polymerization are applied on glass baking as micro-drops. Copolymerization of monomers is carried out by immersion of formed matrix in water-insoluble organic solvent containing other dissolved component of catalytic system. EFFECT: simplified method of making microchips with high density of matrix members. 6 cl, 2 dwg, 1 ex

RU 2 1 5 7 3 8 5 C 1

RU 2 1 5 7 3 8 5 C 1

Изобретение относится к области молекулярной биологии и биотехнологии и касается способа изготовления микрочипов на основе олигонуклеотидов, иммобилизованных в органических полимерных гелях, получаемых полимеризацией непредельных мономеров. Такие микрочипы могут найти применение в молекулярной биологии и биотехнологии, при секвенировании и картировании ДНК, в генетическом анализе, при детектировании мутаций, в медицине и для других приложений.

Известны способы изготовления микрочипов на основе олигонуклеотидов. Эти способы используют либо олигонуклеотидный синтез непосредственно на поверхности матрицы [Fodor S.P.A., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu. A.T., and Solas D. (1991) *Science* 251, 767-773], либо иммобилизацию предварительно синтезированных олигонуклеотидов на микроматрице, модифицированной функциональными группами [Timofeev E. N., Kochetkova S.V., Mirzabekov A.D., and Florentiev V.L. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 3142-3148].

Известен также способ изготовления олигонуклеотидных микрочипов с помощью фотоиницируемой сополимеризации модифицированных непредельными фрагментами олигонуклеотидов с акриламидом и N,N'-метиленабисакриламидом [Василисков В.А., Тимофеев Э.Н., Суржигов С.А., Дробышев А.Л., Шик В.В., Мирзабеков А.Д. (1998) *Молекулярная биология.* 32, 923-925]. В соответствии с этим способом готовят растворы индивидуальных модифицированных олигонуклеотидов, содержащие также акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, солевой буфер, глицерин, тетраметилэтилендиамин и метиленовый синий, где глицерин служит для повышения вязкости раствора, а метиленовый синий является источником радикалов, генерируемых при облучении смеси светом. В качестве модифицированных олигонуклеотидов используют их аллильные производные. Полученные растворы используют при изготовлении микрочипов по следующей методике. Растворы олигонуклеотидов, разделенные физически с помощью перегоронок (спейсеров), помещают между двумя стеклами, одно из которых (верхнее) является маской, и под прозрачными окошками маски проводят одновременную фотоиницируемую полимеризацию растворов, расположенных в разных зонах.

Описанный способ изготовления олигонуклеотидных микрочипов имеет следующие недостатки, а именно:

1) необходимость проведения многочисленных циклов полимеризации растворов олигонуклеотидов;

2) сложность обеспечения герметичности зон при использовании многочисленных спейсеров;

3) возможность взаимного загрязнения элементов матрицы;

4) необходимость изготовления масок;

5) способ не обеспечивает изготовление микрочипа с высокой плотностью элементов матрицы.

В основу изобретения положена задача

упрощения способа изготовления микрочипов с высокой плотностью элементов матрицы.

Задача решена тем, что изобретением предлагается способ изготовления микрочипа на основе олигонуклеотидов, иммобилизованных в органическом геле, приготовленном путем сополимеризации непредельных производных олигонуклеотидов с ненасыщенными мономерами, причем водно-солевой раствор, содержащий ненасыщенные мономеры, модифицированные непредельными фрагментами олигонуклеотиды и компонент каталитической системы, индуцирующей полимеризацию, растворимый только в воде, наносят на стеклянную подложку в виде микрокапель и проводят сополимеризацию мономеров погружением сформированной матрицы в не смешивающийся с водой органический растворитель, содержащий растворенный другой компонент каталитической системы.

Предпочтительно в качестве одного из ненасыщенных мономеров использовать акриламид.

Олигонуклеотиды, модифицированные непредельными фрагментами, могут содержать одну или несколько групп общей формулы $R^1R^2C=CR^3R^4$, где R^1 , $R^4 = H$ или алкил C_1-C_3 , $R^2 = (CH_2)_n-O-Y$ и $R^3 = (CH_2)_n-O-Y$, $n=1-6$, X и $Y =$ фосфодиефирные группы, связывающие непредельные фрагменты с соседними нуклеотидными звеньями или соседними непредельными фрагментами, или одна из групп X или Y представляет собой атом водорода, которые вводят в олигонуклеотид в ходе стандартного фосфорамидитного олигонуклеотидного синтеза с использованием фосфорамидитов общей формулы $R^5R^6C=CR^7R^8$, где $R^5, R^8 = H$ или алкил C_1-C_3 , $R^6 = (CH_2)_n-O-P(OCH_2CH_2CN)(N(C_3H_7)_2)_2$, $n=1-6$, $R^7 = -(CH_2)_n-O-DMT$, $n=1-6$ ($DMT = 4,4'$ -диметокситритил).

Желательно в качестве инициатора полимеризации использовать систему персульфат аммония - тетраметилэтилендиамин (TEMED), в которой персульфат аммония является компонентом, растворимым только в воде, а TEMED растворим и в воде и в не смешивающемся с водой органическом растворителе.

Целесообразно в качестве органического растворителя использовать гексан.

Предпочтительно для нанесения раствора в виде микрокапель использовать струйное подающее устройство, позволяющее с высокой скоростью распределять микрообъемы большого числа растворов по плоской поверхности.

Предлагаемый способ позволяет в одну стадию изготовить микрочип с высокой плотностью элементов матрицы, что необходимо для параллельных манипуляций с тысячами проб нуклеиновых кислот, что дает возможность использовать микрочипы для картирования генома, скрининга клонов, диагностики вирусных и бактериальных инфекций, секвенирования.

Высокая плотность элементов матрицы обеспечивается нанесением растворов в виде микрокапель.

Способ осуществляется следующим

образом.

Стекло, используемое в качестве подложки для проведения полимеризации, обрабатывают реагентом, который модифицирует поверхность стекла ненасыщенными группами. Таким реагентом может являться, например, N-[3-(триэтоксисилил)пропил] акриламид, [3-(триэтоксисилил)пропил] (мет)акрилат, аллилтриэтоксисилан и другие.

Водно-солевые растворы, содержащие ненасыщенные мономеры, модифицированные непредельными фрагментами олигонуклеотиды, глицерин и персульфат аммония, наносят на подготовленное описанным выше образом стекло в виде микрокапель требуемого размера (определяемого задаваемой плотностью элементов матрицы) с помощью наносящего устройства, такого как, например, микропипетка, пиновый наноситель, струйный принтер и др. с образованием матрицы мономеров заранее заданной топологии. Каждая микрокапля содержит индивидуальный олигонуклеотид с присоединенным к нему непредельным фрагментом, способный к химически индуцированной сополимеризации с другими ненасыщенными мономерами.

Полученную матрицу погружают в органический растворитель, который не смешивается с растворами мономеров и обладает меньшей, чем у воды плотностью (что препятствует смешиванию растворов мономеров) и который содержит TEMED в качестве другого компонента каталитической системы, индуцирующей радикальную сополимеризацию мономеров. В результате диффузии инициатора полимеризации (TEMED) из органического растворителя в микрокапли происходит одновременная полимеризация всех элементов олигонуклеотидной матрицы, в результате чего получают микрочип с заданной топологией матрицы.

Микрочип, изготовленный описанным способом, представляет собой жесткую подложку, например, стекло, на которой расположены олигонуклеотиды, иммобилизованные в гель путем сополимеризации ненасыщенных мономеров (фиг. 1) и образующие матрицу с заданной топологией и плотностью ее элементов.

Изобретение поясняется конкретным примером его выполнения и фигурами, где на фиг. 1 представлена схема химически индуцируемой иммобилизации олигонуклеотидов,

на фиг. 2 - использование микрочипа для гибридизации.

Пример 1. Способ изготовления микрочипа химически индуцируемой сополимеризацией олигонуклеотидов.

Микрокапли раствора, содержащего 5% смеси акриламид - N,N'-метиленабисакриламид (19:1), 0,1 М натрий фосфатный буфер, рН 7,0, 40% глицерин, 0,05% персульфата аммония, и 0,3 мМ олигонуклеотида, модифицированного непредельными фрагментами, объемом 0,2 микролитра наносят микродозатором на поверхность стекла. Стекло предварительно

обрабатывают [(3-триэтоксисилил)пропил] метакрилатом. Сформированную матрицу растворов погружают в 80 мл 0,5% раствора TEMED в гексане. Полимеризация обычно занимает 1 час при комнатной температуре. Полученный микрочип отмывают водой в течение 1 часа при 60°C и высушивают. Контроль иммобилизации осуществляют, наблюдая связывание комплементарного флюоресцентно меченного олигонуклеотида (фиг. 2).

Формула изобретения:

1. Способ изготовления микрочипа на основе олигонуклеотидов, иммобилизованных в органическом геле, приготовленном путем сополимеризации непредельных производных олигонуклеотидов с ненасыщенными мономерами, отличающийся тем, что водно-солевые растворы, содержащие ненасыщенные мономеры, модифицированные непредельными фрагментами олигонуклеотиды и компонент каталитической системы, индуцирующей полимеризацию, растворимый только в воде, наносят на стеклянную подложку в виде микрокапель и проводят сополимеризацию мономеров погружением сформированной матрицы в несмешивающийся с водой органический растворитель, содержащий растворенный другой компонент каталитической системы.

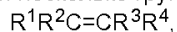
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве одного из ненасыщенных мономеров используют акриламид.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инициатора полимеризации, растворимого и в воде, и в органическом растворителе, используют тетраметилэтилендиамин.

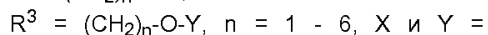
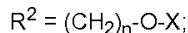
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве органического растворителя используют гексан.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве одного из компонентов раствора, наносимого в виде микрокапли, используют глицерин.

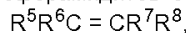
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что олигонуклеотиды, модифицированные непредельными фрагментами, содержат одну или несколько групп общей формулы



где $R^1, R^4 = H$ или алкил C_1-C_3 ;



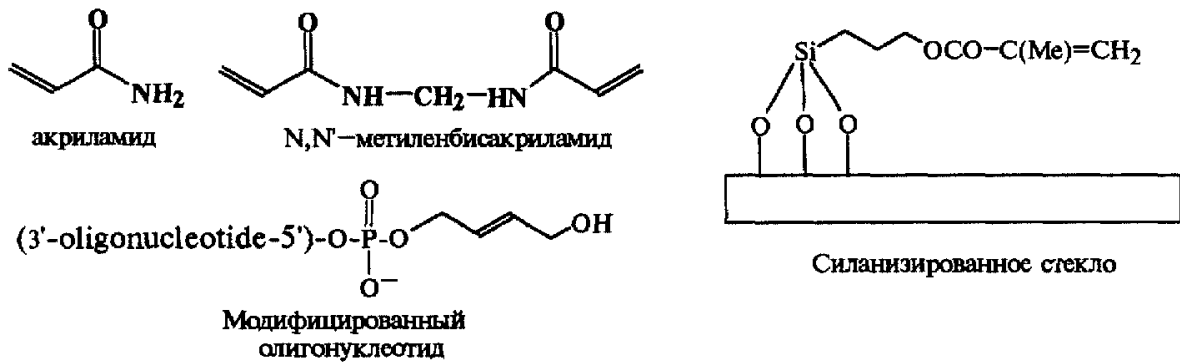
фосфодиэфирные группы, связывающие непредельные фрагменты с соседними нуклеотидными звеньями или соседними непредельными фрагментами, или одна из групп X или Y представляет собой атом водорода, которые вводят в олигонуклеотид в ходе стандартного фосфорамидитного олигонуклеотидного с использованием фосфорамидитов общей формулы



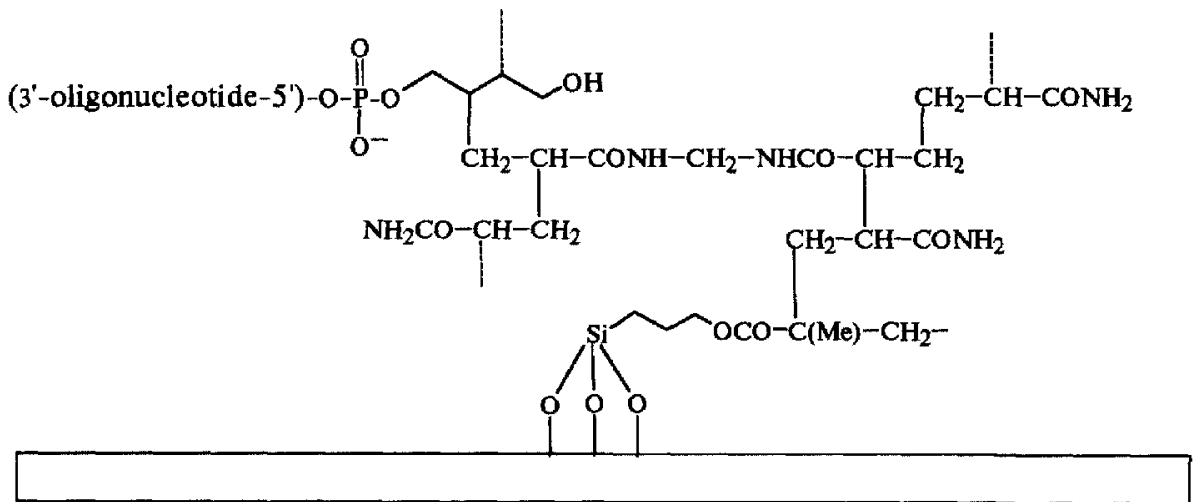
где $R^5, R^8 = H$ или алкил C_1-C_3 ;

$R^6 = (CH_2)_n-O-P(OCH_2CH_2CN)(N(C_3H_7)_2)_2,$
 $n = 1 - 6;$

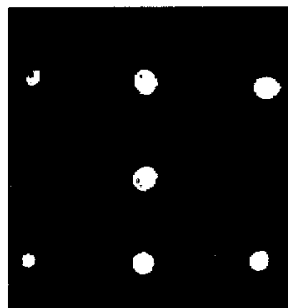
$R^7 = -(CH_2)_n-O-DMT, \quad n = 1 - 6,$
 DMT-4,4'-диметокситритил.



Химически индуцируемая сополимеризация



Фиг. 1



Результаты гибридизации олигонуклеотида 5'-d(T)₁₀-3', флуоресцентно меченного Техаским Красным по положению 3', с иммобилизованным олигонуклеотидом, полученным химически индуцированной сополимеризацией 5'-(4-гидроксипут-2-енил)-d(A)₁₀-3' с акриламидом и N,N'-метиленбисакриламидом.

Фиг. 2