

УДК 542.943.2:615.47

*С. В. ТКАЧЕВ, Е. Г. ФОМИНА, А. С. ВЛАДЫКО*

### **ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИСТИРОЛЬНЫХ ПЛАНШЕТОВ ДЛЯ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОМОЛЕКУЛ**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,  
e-mail: pjc40@mail.ru, feg1@tut.by, vladyc0@belriem.by*

Разработан простой метод химической модификации полистирольных планшетов, в основе которого – окисление полистирола  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  и последующая обработка окисленной поверхности  $\text{NaOH}$ . В результате модификации на поверхности полимера появляются карбоксильные группы, которые могут быть использованы для проведения дальнейшей, более специфичной модификации твердой фазы. В частности, на поверхности модифицированного планшета проведено последовательное связывание соединений с первичной аминогруппой и комплекса производного малеинового ангидрида с лигандом хелатирующим  $\text{Ni}^{2+}$  – N,N-бис(карбоксиметил)лизином. Полученный таким образом активированный планшет после насыщения никелем специфически связывал на своей поверхности рекомбинантный 10 His-tags IgG.

*Ключевые слова:* полистирольные планшеты, персульфат аммония, модификация поверхности, N,N-бис(карбоксиметил)лизин, никель, His-tag пептиды, иммуноферментный анализ.

*S. V. TKACHOU, E. H. FOMINA, A. S. VLADIKO*

### **CHEMICAL MODIFICATION OF POLYSTYRENE PLATES FOR COVALENT IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES**

*The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus,  
e-mail: pjc40@mail.ru, feg1@tut.by, vladyc0@belriem.by*

A simple treatment for surface functionalization and grafting carried out under mild aqueous conditions and suitable for polystyrene immunological plates, has been developed. The two stages are performed separately; the first is oxidative by a 30 % ammonium persulfate aqueous solution and the second is treatment a surface of 1 M sodium hydroxide. The treatment introduced of carboxyl groups onto the plate surface. The carboxyl density is improved as a function of oxidative time and concentration of ammonium persulfate and sodium hydroxide. To demonstrate possible applications of the modification plate we have carried out covalent immobilization of ethylenediamine and pentamine on the plate by carbodiimide method. On this amination surface we bind of N, N-bis[carboxymethyl]lysine coupled with maleic anhydride copolymer. The plate was then charged with  $\text{Ni}^{2+}$  for the capture of the 10 His-tagged IgG.

*Keywords:* polystyrene microtiter plate, ammonium persulfate, surface modification, N,N-bis(carboxymethyl)lysine, nickel, His-tag peptides, enzyme-linked immunosorbent assay.

**Введение.** Полистирол – один из наиболее востребованных полимеров в биомедицинской диагностике. Такие свойства полистирола, как высокая степень светопропускания, легкоплавкость и относительная дешевизна, определяют его роль как основного материала, используемого в качестве твердой фазы при проведении иммуноферментного анализа (ИФА).

Пассивная адсорбция – самый распространенный способ иммобилизации биологического материала на поверхности изделий из полистирола (иммунологические планшеты, шарики) при проведении ИФА. При этом пассивная адсорбция белка на гидрофобной поверхности полистирола сопровождается структурными изменениями молекулы белка и снижением доступности функциональных участков для взаимодействия с антителами или антигеном [1, 2]. В работе [3] показано, что денатурации может подвергаться более 90 % адсорбированных на полистироле

антител. Альтернативой пассивной адсорбции может служить специфическое связывание белка на поверхности твердой фазы. Это позволяет снизить степень денатурации белка, увеличить силу его связывания с поверхностью, сориентировать активные центры молекулы в направлении возможного протекания реакции, увеличить соотношение сигнал/шум при проведении анализа и пр. Химическая иммобилизация биомолекул на полистироле возможна после модификации поверхности полимера различными физическими и химическими методами [4–7].

В литературе описаны некоторые методы химической модификации полистирольных планшетов для ИФА [8–10]. Как правило, авторы используют агрессивные среды (смесь концентрированных азотной и серной кислот, хлорсульфоновую кислоту, раствор  $\text{KMnO}_4$  в серной кислоте) для введения в молекулу полистирола функциональных групп. В результате этого возможны снижение прозрачности полистирола и его деформация. В то же время известно, что полистирол может эффективно окисляться водными растворами солей пероксодисерной кислоты (персульфатами аммония, натрия и калия) без повреждения поверхности и снижения оптических свойств [11]. В процессе окисления, в зависимости от условий, поверхность полистирола обогащается различными функциональными группами. Например, термическая диссоциация персульфатов в водном растворе в отсутствие кислорода приводит преимущественно к гидроксильному полистиролу [11, 12]. Присутствие кислорода в среде окисления смещает процесс в сторону образования на поверхности полимера гидропероксидных, пероксидных, карбоксильных, карбонильных и сложноэфирных групп [13].

Модифицированный персульфатом полистирол может стать удобной инженерной платформой для создания на его основе диагностических тест-систем, в которых биологический компонент (антиген или антитело) будет специфически связан с твердой фазой, что создаст условия для оптимального протекания иммунологической реакции.

Цель данного исследования – разработать простой метод химической модификации персульфатом аммония 96-луночного полистирольного планшета, предназначенного для иммуноферментного анализа, а также продемонстрировать возможность специфического связывания на поверхности модифицированного планшета рекомбинантного гистидинсодержащего IgG (10His-tag IgG).

**Материалы и методы исследования.** *Использовали следующие материалы и реактивы:* персульфат аммония  $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ , 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК), метилвиниловый эфир малеинового ангидрида (пМВМА), этилендиамин (ЭДА), 1- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид, N-гидроксисукцинимид (ГС), N,N-бис(карбоксиметил)лизин (БКМЛ), бычий сыроточный альбумин, Твин 20, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, поликлональные кроличьи антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой хрена, имидазол производства Sigma-Aldrich (США), неорганические соли, тетраэтиленпентамин (ТЭПА), гидроксид натрия, уксусную кислоту, диметилсульфоксид, гуанидин тиоцианат и толуидиновый синий (ТС) производства Karl Roth (Германия). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q, 18 МОм·см).

Модификации подвергали 96-луночные полистирольные планшеты производства Greiner (Германия). В качестве контроля связывания His-tag пептида использовали 96-луночные никель-активированные полистирольные планшеты Pierce Nickel Coated Plates (Nickel Plate) производства Thermo Fisher Scientific (США). Оптическую плотность растворов измеряли на планшетном фотометре производства DAS (Италия).

*Окислительная модификация полистирольного планшета.* В лунки планшета вносили по 200 мкл 10 %-ного или 30 %-ного водного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Окисление планшета проводили при температуре 80 °С в течение 2, 4 и 6 ч. После процедуры окисления планшет многократно промывали  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Степень модификации планшета* оценивали по количеству карбоксильных групп, образовавшихся на поверхности полистирола в результате воздействия  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Карбоксильные группы определяли по реакции с ТС [14]. Для этого в лунки планшета вносили по 200 мкл 0,5 мМ раствора ТС, приготовленного на 10 мМ NaOH (рН 10). Реакцию проводили в течение 5 ч при

20 °С, не связавшийся с поверхностью краситель удаляли, промывая планшет 10 мМ NaOH и H<sub>2</sub>O. Десорбцию связавшегося ТС проводили в 50 %-ном растворе уксусной кислоты в течение 30 мин, затем пробы переносили в лунки чистого планшета и измеряли оптическую плотность при 630 нм. Концентрацию карбоксильных групп определяли по калибровочному графику, принимая при этом, что 1 моль карбоксилатов связывается с 1 молекулой ТС.

*Активирование карбоксильных групп и аминирование планшета.* Карбоксильные группы поверхности активировали смесью ЭДК/ГС (по 100 мМ каждого реагента). Реакцию проводили в H<sub>2</sub>O при 20 °С в течение 60 мин. После промывки планшета в лунки вносили по 100 мкл 50 мМ ЭДА или ТЭПА (рН 8,0–8,5), инкубацию осуществляли в течение ночи при 20 °С. Далее планшет последовательно промывали 0,25 %-ным додецилсульфатом натрия, 1 М NaCl и фосфатно-солевым буфером (ФСБ; 10 мМ, рН 7,4, 0,15 М NaCl).

*Связывание комплекса пМВМА/БКМЛ с аминированным планшетом, насыщение никелем.* Комплекс пМВМА/БКМЛ синтезировали следующим образом. В 3 мл 0,5 %-ного раствора пМВМА, приготовленного на диметилсульфоксиде, вносили 0,25 мл 200 мМ БКМЛ, растворенного в 0,2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, инкубировали 3 ч при 37 °С. В лунки планшета, аминированного ТЭПА, вносили по 100 мкл комплекса пМВМА/БКМЛ. Связывание пМВМА/БКМЛ с поверхностью лунок проводили в течение ночи при 20 °С, после чего планшет промывали 0,05 %-ным Твин 20. Далее в лунки вносили по 200 мкл 2 %-ного раствора БСА в Трис-буфере (рН 7,4, 50 мМ Трис-НСl, 0,15 М NaCl), инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, промывали Трис-буфером (рН 7,4, 50 мМ Трис-НСl, 1,0 М NaCl) и 0,05 %-ным Твин 20. После промывок в лунки вносили по 200 мкл 50 мМ раствора сульфата никеля. Насыщение планшета никелем проводили при 20 °С в течение 30 мин, затем планшет промывали 0,05 %-ным Твин 20 и Трис-буфером (рН 7,4, 50 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl).

*Экспрессия 10His-tags IgG.* В качестве исходного вектора для клонирования и экспрессии рекомбинантного белка была использована плаزمида рJC40, которая содержит фрагмент ДНК, кодирующий 190 а. о. Fc-фрагмента IgG человека. Особенностью данной плазмиды является наличие дополнительного фрагмента, кодирующего 10 остатков гистидина, которые при трансляции локализуются в N-концевой части полипептида. Для экспрессии His-tags IgG плазмида рJC40 была трансформирована в компетентные клетки *E. coli*, штамм BL21(DE3). Для индукции синтеза в среду вносили l-β-D-тиогаляктопиранозид в конечной концентрации 0,4 мМ в момент достижения клеточной культурой OD<sub>600</sub> – 0,3. Клеточную массу объемом 50 мл, содержащую рекомбинантный полипептид, осаждали путем центрифугирования (10 000 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендировали в 1 мл раствора, содержащего 50 мМ Tris-НСl и 0,5 мМ NaCl. Клетки разрушали ультразвуком (20 кГц, 2 раза по 20 с). В лизат добавляли гуанидин тиоцианат до конечной концентрации 2,2 М. Крупные клеточные обломки и нерастворимые агрегаты белков осаждали путем центрифугирования. Электрофоретический анализ осветленного лизата выявил наличие мажорной фракции в области 32–33 кДа, которая отсутствовала в контрольном образце.

*Проведение ИФА.* Полученную суспензию, содержащую His-tags IgG в концентрации ~0,2 мкг/мкл (по данным электрофореза), разводили в 20 раз ФСБ (10 мМ, рН 7,4, 0,15 М NaCl), вносили в лунки планшетов в объеме 100 мкл и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали ФСБ (10 мМ, рН 7,4, 1,0 М NaCl). Далее в лунки вносили поликлональные кроличьи антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, промывали ФСБ и добавляли 100 мкл цитратно-фосфатного буфера, содержащего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Через 15 мин реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность проб измеряли при 450 нм.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе модификации (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> был использован как инициатор окисления поверхности полистирола. Термическая диссоциация (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> сопровождается образованием высокореакционного сульфат-анион радикала (SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>), который иницирует свободнорадикальные реакции, включающие взаимодействие SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> с H<sub>2</sub>O и образование других активных интермедиатов, таких как гидроксильный радикал (HO<sup>•</sup>) и анион пероксимо-

носульфата ( $\text{HSO}_3^-$ ). Реакция радикалов с полистиролом приводит к отрыву водорода от молекулы полимера и образованию макрорадикала полистирола. Дальнейшие реакции с участием радикальных интермедиатов и кислорода сопровождаются появлением на поверхности полистирола кислородсодержащих групп (пероксидных, карбоксильных, сложноэфирных и т. д.) [11–13]. При диссоциации  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  образуется также ион аммония, который может взаимодействовать с макрорадикалом полистирола с образованием амидов [15].

В данной работе одной из задач было оценить возможность образования карбоксильных групп на поверхности полистирольного планшета в процессе окисления его  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Использование карбоксильных групп в качестве химической основы для модификации твердой фазы является широко распространенной лабораторной практикой и подробно описано в литературе [16].

Содержание карбоксильных групп на поверхности планшета после его окисления 30 %-ным водным раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  возрастало в 3,6 раза по сравнению с контролем. Обработка окисленного планшета NaOH приводила к значительному увеличению содержания карбоксильных групп на поверхности, причем их количество увеличивалось пропорционально повышению концентрации NaOH. Уменьшение концентрации раствора персульфата до 10 %, а также изменение времени окисления до 2 ч сопровождалось снижением количества карбоксильных групп на поверхности. Максимального увеличения концентрации карбоксиллов (приблизительно в 51 раз по сравнению с контролем) добивались при окислении полистирольного планшета 30 %-ным водным раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  в течение 6 ч при 80 °С с последующей обработкой поверхности 1 М NaOH (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Концентрация карбоксильных групп на поверхности модифицированного планшета (по результатам реакции с ТС)

Условия модификации	[COOH], нмоль/см <sup>2</sup>
Контроль	0,12 ± 0,01
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 6 ч, H <sub>2</sub> O	0,42 ± 0,03
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 6 ч, 0,01 М NaOH	4,38 ± 0,10
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 6 ч, 0,1 М NaOH	5,04 ± 0,14
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 2 ч, 1 М NaOH	0,55 ± 0,11
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 4 ч, 1 М NaOH	5,24 ± 0,11
10 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 6 ч, 1 М NaOH	0,36 ± 0,10
30 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 6 ч, 1 М NaOH	6,13 ± 0,07

Нами не были проведены исследования по выяснению причин резкого увеличения количества карбоксиллов после обработки окисленной поверхности NaOH. Однако можно предположить, что их количество возрастает в процессе щелочного гидролиза сложных эфиров и амидов, образовавшихся при окислении полистирола  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .

Проверку функциональной активности модифицированной поверхности осуществляли путем иммобилизации на ней соединений, содержащих первичную аминогруппу. Для этого карбоксильные группы активировали смесью ЭДК/ГС и проводили реакцию с ЭДА и ТЭПА. Результат оце-

Т а б л и ц а 2. Концентрация карбоксильных групп на поверхности модифицированного планшета после связывания ЭДА и ТЭПА с неактивированной и активированной ЭДК/ГС поверхностью (по результатам реакции с ТС)

Тип поверхности	[COOH], нмоль/см <sup>2</sup>	
	ЭДА	ТЭПА
Не активированная	4,19 ± 0,08	3,02 ± 0,05
Активированная ЭДК/ГС	0,63 ± 0,02	0,29 ± 0,01

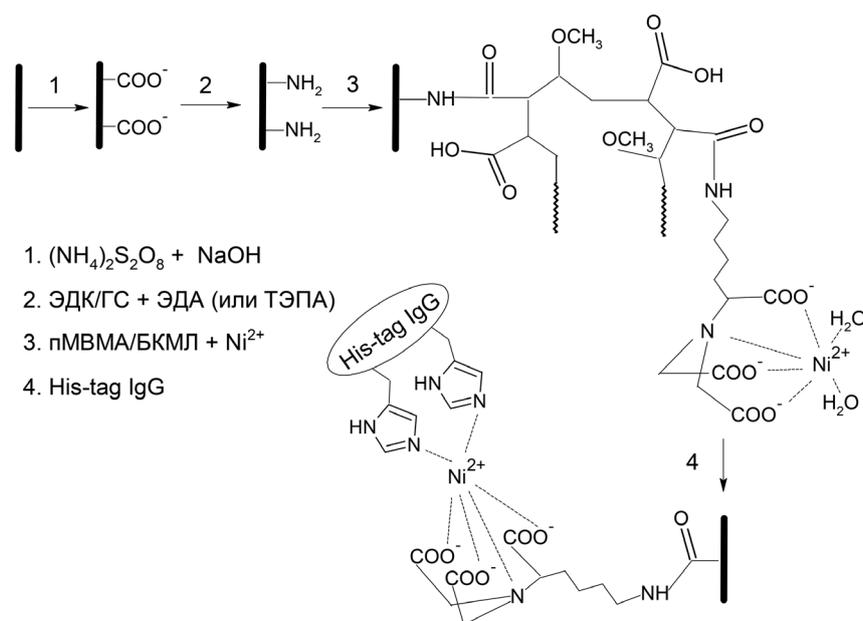


Схема последовательной модификации полистирольного планшета с целью создания никель-активированной поверхности и специфической иммобилизации на ней рекомбинантного гистидинсодержащего пептида

нивали по количеству карбоксильных групп, локализованных на подложке, после связывания ЭДА и ТЭПА с активированной и неактивированной поверхностью.

Из данных табл. 2 видно, что на активированной ЭДК/ГС поверхности количество карбоксильных групп снижалось в 10 и 6 раз после иммобилизации ТЭПА и ЭДА соответственно по сравнению с количеством карбоксильных групп, доступных для оценки после пассивной сорбции аминосоединений.

На модифицированном планшете было проведено специфическое связывание His-tags IgG и его последующее определение методом ИФА. Схема эксперимента приведена на рисунке. Первоначально планшет окисляли 30 %-ным  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , обрабатывали 1 М NaOH, активировали карбоксильные группы ЭДК/ГС и проводили иммобилизацию ТЭПА, как описано выше. На аминированной поверхности осуществляли связывание комплекса пМВМА-БКМЛ за счет образования амидной связи между свободными ангидридными группами пМВМА и аминогруппами ТЭПА, локализованными на планшете. Далее планшет насыщали ионами никеля и проводили иммобилизацию His-tags IgG.

БКМЛ представляет собой бифункциональное производное нитрилтриуксусной кислоты и лизина, способное образовывать координационный комплекс с ионами никеля, обладающий высоким аффинитетом в отношении His-tags белков ( $K_D \sim 10^{-13}$ ) [17]. В лабораторной практике БКМЛ часто используют для создания металл-аффинных сорбентов, способных хелатировать

Таблица 3. Оценка специфичности связывания рекомбинантного His-tags IgG на поверхности иммунологических полистирольных планшетов

Тип иммунологического планшета	Оптическая плотность, отн. ед.	
	без имидазола	с имидазолом (250 мМ)
Greiner	$1,61 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,04$
Greiner-Ni	$1,96 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,01$
Nickel Plate	$1,41 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,02$

Примечание. Инкубацию с имидазолом (250 мМ, pH 7,8) проводили после связывания His-tags IgG в течение 1 ч при 20 °С. Greiner – планшет производства Greiner, не модифицированный, Greiner-Ni – планшет производства Greiner, модифицированный, как описано в тексте, Nickel Plate – никель-активированный планшет производства Thermo Fisher Scientific.

$Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$ . Образовавшийся комплекс БКМЛ-металл обеспечивает высокоспецифичное и высокоселективное связывание His-tags белков на подложке [18].

Для сравнительной оценки степени связывания His-tags IgG использовали не модифицированный планшет Greiner и коммерческий никель-активированный планшет Nickel Plate. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что количество иммобилизованного His-tags IgG на поверхности модифицированного нами планшета выше, чем на Greiner и Nickel Plate, на 18 и 28 % соответственно. Известно, что имидазол способен вытеснить His-tags белки из комплекса с никелем [18]. Следовательно, обработка лунок имидазолом позволит установить специфичность связывания His-tags IgG с поверхностью исследуемых планшетов. После обработки имидазолом (250 мМ) количество связанного His-tags IgG снижалось в лунках всех типов планшетов. Однако снижение на Greiner составило 12 %, в то время как на Nickel Plate и модифицированном планшете наблюдали падение оптической плотности после обработки имидазолом на 49 и 51 % соответственно. Следовательно, иммобилизация His-tags IgG на модифицированном планшете и Nickel Plate в значительной степени обусловлена специфическим взаимодействием гистидиновых остатков His-tags IgG и никель-активированной твердой фазы.

**Заключение.** Таким образом, нами разработан метод химической модификации полистирольных планшетов, в основе которого лежит окисление полистирола  $(NH_4)_2S_2O_8$  и последующая обработка окисленной поверхности NaOH. Модификация приводит к появлению на поверхности полимера карбоксильных групп, которые могут быть использованы для проведения дальнейшей, более специфичной модификации твердой фазы. В частности, на поверхности модифицированного планшета проведено последовательное связывание соединения с первичной аминогруппой (ДЭА или ТЭПА) и комплекса производного малеинового ангидрида с лигандом, хелатирующим  $Ni^{2+}$  – БКМЛ. Полученный таким образом активированный планшет после насыщения никелем специфически связывал на своей поверхности рекомбинантный His-tags IgG. Приведенный в качестве примера способ создания никель-активированного планшета может быть использован для разработки высокочувствительных и специфичных диагностических тест-систем, основанных на рекомбинантных пептидах.

### Список использованной литературы

1. Gray, J. J. The interaction of proteins with solid surfaces / J. J. Gray // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2004. – Vol. 14, N 1. – P. 110–115.
2. Butler, J. E. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays / J. E. Butler // *Methods.* – 2000. – Vol. 22, N 1. – P. 4–23.
3. The immunochemistry of sandwich ELISAs–VI. Greater than 90 % of monoclonal and 75 % of polyclonal anti-fluorescein capture antibodies (cabs) are denatured by passive adsorption / J. E. Butler [et al.] // *Mol. Immunol.* – 1993. – Vol. 30, N 13. – P. 1165–1175.
4. Nonthermal plasma technology as a versatile strategy for polymeric biomaterials surface modification: a review / T. Desmet [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2009. – Vol. 10, N 9. – P. 2351–2378.
5. Novák, I. Study of surface properties of polyolefins modified by corona discharge plasma / I. Novák, V. Pollák, I. Chodák // *Plasma Processes and Polym.* – 2006. – Vol. 3, N 4–5. – P. 355–364.
6. Chemical modifications, mechanical properties and surface photo-oxidation of films of polystyrene / F. A. Bottino [et al.] // *Polymer Testing.* – 2004. – Vol. 23, N 4. – P. 405–411.
7. Goddard, J. M. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds / J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss // *Prog. Polym. Sci.* – 2007. – Vol. 32, N 7. – P. 698–725.
8. Amination of polystyrene microwells: application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays / N. Zammateo [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1996. – Vol. 236, N 1. – P. 85–94.
9. Strategies for direct attachment of haptens to a polystyrene support for applications in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / J. Kaur [et al.] // *Analytica Chimica Acta.* – 2004. – Vol. 506, N 2. – P. 133–135.
10. Transparent polystyrene substrates with controllable surface chlorosulfonation: stable, versatile, and water-compatible precursors for functionalization / A. del Prado [et al.] // *Macromolecules.* – 2012. – Vol. 45, N 6. – P. 2648–2653.
11. Bamfordt, C. H. Polymer surface functionalisation and grafting by a simple and inexpensive method / C. H. Bamfordt, K. G. Al-Lamee // *Macromol. Rapid Commun.* – 1994. – Vol. 15, N 4. – P. 379–384.
12. Bamfordt, C. H. Studies in polymer surface functionalization and grafting for biomedical and other applications / C. H. Bamfordt, K. G. Al-Lamee // *Polymer.* – 1994. – Vol. 35, N 13. – P. 2844–2852.
13. Киреев, В. В. Высокомолекулярные соединения / В. В. Киреев. – М.: Высш. школа, 1992. – 512 с.

14. *Tiraferrì, A.* Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces / A. Tiraferrì, M. Elimelech // *J. Membr. Sci.* – 2012. – Vol. 389. – P. 499–508.
15. Modification of PS films by combined treatment of ozone aeration and UV irradiation in aqueous ammonia solution for the introduction of amine and amide groups on their surface / T. N. Murakami [et al.] // *Appl. Surf. Sci.* – 2005. – Vol. 249, N 1–4. – P. 425–432.
16. *Hermanson, G. T.* Bioconjugate techniques / G. T. Hermanson. – 2nd ed. – Academic Press, Elsevier Inc., 2008. – 1323 p.
17. *Hochuli, E.* New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues / E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher // *J. Chromatogr.* – 1987. – Vol. 411. – P. 177–184.
18. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block [et al.] // *Meth. Enzymol.* – 2009. – Vol. 463. – P. 439–473.

*Поступила в редакцию 07.08.2015*