

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 57.088.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

Поступила в редакцию 08.02.2024
Received 08.02.2024

**А. И. Давыденко, А. Ю. Кохан, И. А. Дремук, Е. В. Шамова,
А. В. Осипова, А. Е. Гончаров**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДИКА БИОХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МИКРОЧИПОВ

Аннотация. Белковый микрочип – универсальный инструмент для единовременной диагностики широкого спектра заболеваний человека. Для изготовления микрочипа на подложке иммобилизируют белковые молекулы. Одним из самых распространенных и доступных типов подложек является стекло, однако, поскольку стеклянная поверхность не содержит функциональных групп, которые обеспечивали бы надежное связывание с белками, требуется ее модификация.

Целью данной работы являлась разработка методики химической модификации стеклянной поверхности для изготовления белковых микрочипов. В процессе разработки методики варьировали следующие параметры: растворитель для 3-аминопропилтриэтоксисилана, время проведения реакции силанизации, концентрация глутарового альдегида, состав буфера для печати целевого белка (меченного флуорохромом аллофикоцианином анти-IgE человека) на модифицированную поверхность. Об эффективности иммобилизации белковых молекул судили по интенсивности флуоресценции спотов. В результате исследований установлено отсутствие влияния растворителя для 3-аминопропилтриэтоксисилана на эффективность иммобилизации целевого белка на модифицированной поверхности и определено оптимальное время проведения реакции силанизации – 60 мин, а также показано, что оптимальная концентрация глутарового альдегида – 2,5 % (v/v), а оптимальный состав буфера для печати – фосфатно-солевой буфер с добавлением 4 % (v/v) глицерина. Предложенная методика обеспечивает эффективную иммобилизацию белков, что продемонстрировано на примере флуоресцентно-меченых антител. В дальнейшем планируется использовать данную методику для изготовления белковых микрочипов для аллергодиагностики с целью выявления специфических IgE в сыворотке крови пациентов.

Ключевые слова: микрочип, белки, поверхность, модификация, стекло, буфер, IgE

Для цитирования: Методика биохимической модификации поверхности стекла для изготовления белковых микрочипов / А. И. Давыденко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 198–206. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

**Anastasiya I. Davydenka, Anatoli Yu. Kokhan, Irina A. Dremuk, Ekaterina V. Shamova,
Antanina U. Osipava, A. Ya. Hancharou**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TECHNIQUE OF MODIFYING THE GLASS SURFACE FOR PRODUCTION OF PROTEIN MICROCHIPS

Abstract. Protein microarray consists of a support (usually glass or polymer) and immobilized proteins (ferments, antibodies, etc.). Being one of the most widespread and accessible support material, glass still has a significant disadvantage: its surface doesn't contain functional groups capable of bonding with proteins. Therefore, the glass surface needs to be modified in order to immobilize capture proteins.

The aim of this work was to develop a technique of chemical modification of the glass surface for fabrication of protein microarrays. In our study we varied the following experimental parameters: solvent for 3-aminopropyltriethoxysilane, time of silanization reaction, concentration of glutaraldehyde, composition of a buffer for printing the target protein (allophycocyanin-labelled human anti-IgE) on the modified surface. The efficiency of protein molecule immobilization was quantified using the intensity of spot fluorescence. As a result, it was shown that there was no influence of the solvent for 3-aminopropyltriethoxysilane on the immobilization efficiency of the target protein on the modified surface, and the optimal time for the silanization reaction was 60 minutes. It was also shown that the optimal concentration of glutaraldehyde was 2.5 % (v/v) and the optimal composition of the printing buffer was phosphate-buffered saline with the addition of 4 % (v/v) glycerol.

Keywords: microarray, proteins, surface, modification, glass

For citation: Davydenka A. I., Kokhan A. Yu., Dremuk I. A., Shamova E. V., Osipava A. U., Hancharou A. Ya. Technique of modifying the glass surface for production of protein microchips. *Vestsi Natsyonal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 198–206 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

Введение. Микрочиповые технологии являются незаменимым инструментом в диагностике заболеваний человека, поскольку они представляют собой высокочувствительный метод мультиплексного обнаружения различных биомаркеров [1, 2]. Белковые микрочипы – компактные системы анализа, которые позволяют одновременно определять и анализировать большое количество аналитов-белков из небольших количеств проб в рамках одного эксперимента. Существует три класса белковых микрочипов, каждый из которых имеет уникальную биомедицинскую направленность: аналитические микрочипы, функциональные микрочипы и микрочипы с обращенной фазой [3, 4]. Наиболее распространенными являются аналитические микрочипы, которые обычно используются для профилирования сложной смеси белков с целью измерения аффинности связывания, специфичности и уровней экспрессии белков в смеси. Функциональные белковые микрочипы отличаются от аналитических тем, что они состоят из массивов, содержащих полноразмерные функциональные белки или белковые домены и используются для изучения биохимической активности всего протеома в одном эксперименте [4]. Принципиально противоположным типом чипов являются чипы с обращенной фазой. На подложку таких биочипов наносят лизаты клеток или образцы тканей, а затем обрабатывают их раствором, содержащим специфический к выявляемому веществу лиганд [5].

Белковые биочипы достаточно сложны в изготовлении, что связано с наличием у белков определенной трехмерной структуры, играющей важную роль в обеспечении их функциональной активности и взаимодействия с другими молекулами. Традиционно микрочипы печатаются на стеклянных поверхностях, однако в качестве подложек могут быть использованы и другие типы поверхностей, а выбор различных материалов требует адаптированных методов функционализации поверхности. Поскольку для разных поверхностей требуются индивидуальные протоколы активации, для молекул с разнообразными функциональными возможностями также необходимы индивидуальные стратегии иммобилизации.

Функциональность микрочипов во многом зависит от морфологии поверхности, которая влияет как на чувствительность измерений, так и на реакционную способность иммобилизованных молекул. Для конкретных молекулярных анализов белки, локализованные на поверхности, должны сохранять свою нативную функциональную активность, поэтому молекулярная структура должна быть сохранена. Более того, они должны быть распределены так, чтобы оставаться доступными для связывания. Поддержание определенной ориентации иммобилизованных молекул необходимо также для обеспечения эффективности связывания. Если иммобилизованные белки неправильно ориентированы на поверхности микрочипа или денатурированы, это может существенно повлиять на последующие события биомолекулярного взаимодействия [6, 7].

Большинство материалов, используемых в качестве подложек, не имеют функциональных групп, которые обеспечили бы связывание биомолекул с подложкой, поэтому требуется предварительная их активация [8]. В настоящее время при изготовлении микрочипов осуществляют модификацию подложек физическими либо химическими методами, причем предпочтение отдают, как правило, химической модификации, так как этот способ обеспечивает лучшее связывание биомолекул с поверхностью подложки.

Цель данной работы – разработка методики химической модификации стеклянной поверхности для изготовления белковых микрочипов.

Методика исследования. Модификацию очищенной и активированной поверхности стекла проводили с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) и глутарового альдегида (ГА). В качестве иммобилизованного белка использовали антитело к IgE человека (клон 4H10), меченное флуорохромом APC (аллофикоцианин). Общая схема модификации поверхности стеклянной подложки представлена на рис. 1.

Для иммобилизации белковых молекул на модифицированную поверхность стекла использовали прибор Versa spotter 10. Параметры задавали с помощью специализированного ПО VERSAware. На стекло наносили растворы белков в виде спотов (капель) (от 20 до 200), по 50 нл на каждый спот. Расстояние между спотами – 1,5 мм. После иммобилизации белков подложки помещали на несколько часов во влажную атмосферу и затем в течение 1 ч проводили блокировку поверхности в 1%-ном (масс.) растворе бычьего сывороточного альбумина в PBST

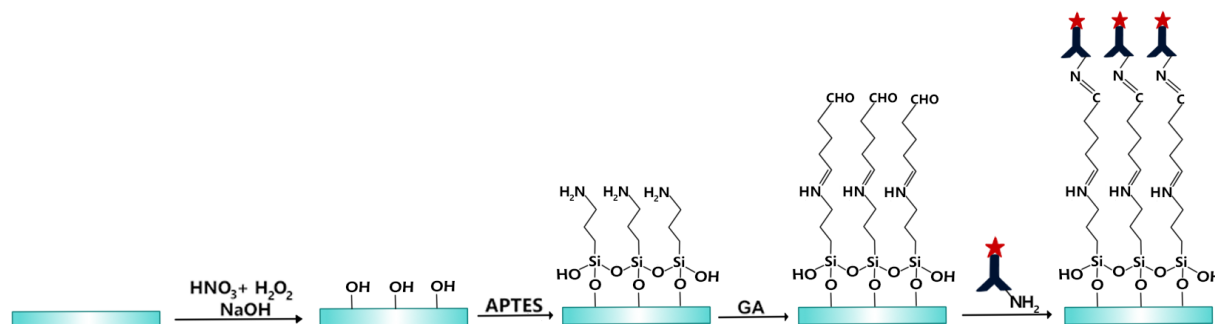


Рис. 1. Схема процесса модификации поверхности стекла для изготовления белкового микрочипа

Fig. 1. Scheme of the process of glass surface modification for protein microchip fabrication

(фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,1 % v/v ПАВ Tween 20). Затем подложки трижды отмывали в TBST (трис-буфер с добавлением 0,05 % v/v ПАВ Tween 20), в воде и высушивали.

Детектирование белковых молекул осуществляли с помощью лазерного сканера микрочипов LuxScan 10K/A (CapitalBio, КНР). Возбуждение флуоресценции осуществляли на длине волны 635 нм, регистрацию – в канале Cy-5 (фильтр 675 ± 10 нм). Об эффективности иммобилизации белковых молекул судили по интенсивности флуоресценции спотов.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Origin 2021 (OriginLab, США), для оценки достоверности различий – критерий Манна–Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для эффективной иммобилизации белковых молекул на поверхности стеклянных подложек процедура модификации поверхности стекла должна быть оптимальной. Наиболее часто используемым и коммерчески доступным способом является обработка поверхности стеклянных и кремниевых подложек силанами (силанизация). Модификация amino- и хлорсиланами приводит к формированию гидрофобной поверхности и обеспечивает физическую адсорбцию белков к поверхности [5]. Дополнительная модификация поверхности альдегидными группами способствует ковалентному связыванию белков с поверхностью при их иммобилизации [6].

На первом этапе процесса модификации подложек стекла очищали с помощью смеси концентрированной азотной кислоты и пероксида водорода (соотношение объемов 3 : 1). Инкубация стекол в данном растворе в течение 1–2 ч позволяет удалить органические загрязнения, а также провести механическую очистку за счет выделения газообразного кислорода при разложении H_2O_2 в кислой среде. Связывание с APTES требует наличия свободных гидроксильных групп, поэтому целесообразной представляется дополнительная обработка подложки (называемая также активацией) с целью увеличения количества OH-групп на поверхности. Существуют различные способы увеличения количества поверхностных OH-групп, при этом одни требуют дополнительного оборудования (плазменная печь), другие же крайне небезопасны в использовании (смесь концентрированной серной кислоты и пероксида водорода, известная как раствор Пирани). Нами был выбран наиболее безопасный и достаточно эффективный метод активации поверхности стекла: подложки помещали в раствор гидроксида натрия (1 ммоль/л) при температуре 80 °C на 30 мин.

Второй этап – модификация поверхности с использованием 1%-ного (v/v) раствора APTES. Эффективность модификации поверхности аminosилами может зависеть от растворителя, однако имеющиеся в литературе данные на этот счет противоречивы. Нами изучено влияние двух типов растворителей на эффективность модификации поверхности: 96%-ного этанола (полярного протонного растворителя) и ДХМ (малополярного апротонного растворителя). Для иммобилизации белков чипы, покрытые APTES, инкубировали в течение 30 мин в 2,5%-ном растворе (v/v) ГА.

На рис. 2 представлены показатели интенсивности флуоресценции спотов, соответствующих иммобилизованным флуоресцентно-меченым белковым молекулам. Как видно из графика, при

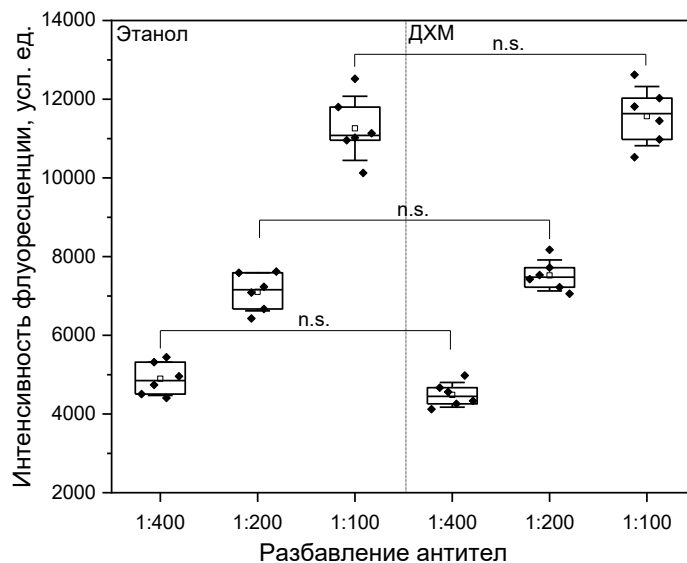


Рис. 2. Влияние растворителя для APTES на эффективность связывания белков (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл), 1 : 100 (1 мкг/мл). Здесь и на рис. 3–8 данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом [25-й процентиль; 75-й процентиль] и стандартного отклонения

Fig. 2. Effect of solvent for APTES on the protein binding efficiency (antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome 1 : 400 (0.25 µg/ml), 1 : 200 (0.5 µg/ml), 1 : 100 (1 µg/ml) was immobilized onto the surface of the microarrays). Here and in Fig. 3–8 data is presented as median with interquartile ranges [25th percentile; 75th percentile] and standard deviation

использовании данных растворителей эффективность связывания белков статистически не отличается для всего диапазона разбавлений флуоресцентных антител (от 1 : 100 до 1 : 400).

Следует отметить, что процесс утилизации ДХМ очень сложный, поэтому, учитывая коммерческую доступность этанола, целесообразным является использование данного растворителя для модификации поверхности APTES.

Изучено также влияние продолжительности реакции силанизации на эффективность иммобилизации белков (рис. 3). Показано, что проведение реакции силанизации в течение 60 мин обеспечивает более эффективную иммобилизацию белков на поверхности модифицированной подложки ($p < 0,05$).

Третий этап – взаимодействие силанизированной поверхности подложки с ГА. Для реакции использовали фосфатно-солевой буфер для стабилизации ГА, так как при отклонении pH от нейтрального уровня увеличивается вероятность протекания нежелательных реакций внутри- и межмолекулярной конденсации.

В данной работе изучена эффективность иммобилизации белковых молекул при различных концентрациях ГА. Установлено, что увеличение концентрации ГА с 1 до

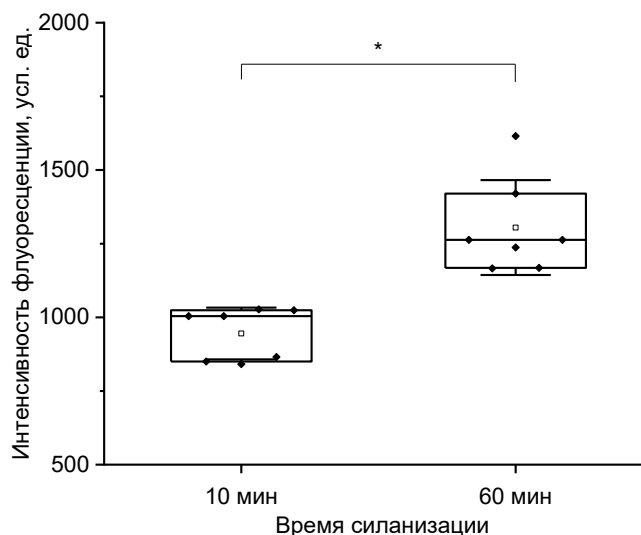


Рис. 3. Влияние продолжительности реакции силанизации на эффективность связывания белков. Здесь и на рис. 3–6 на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC (0,4 мкг/мл). * – $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

Fig. 3. Effect of silanization reaction duration on the protein binding efficiency. Here and in Fig. 3–6 antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome (0.4 µg/ml) was immobilized onto the surface of the microarrays. * – $p < 0.05$ (Mann–Whitney test)

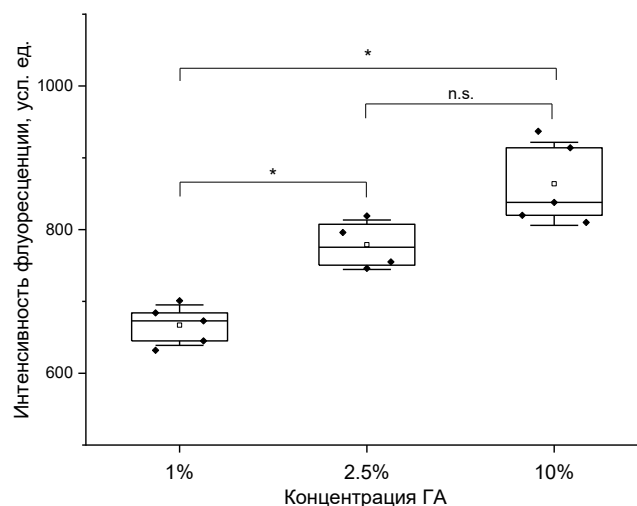


Рис. 4. Влияние концентрации ГА на эффективность связывания белков

Fig. 4. Effect of GA concentration on the protein binding efficiency

10 % (v/v) (рис. 4) приводит не только к улучшению иммобилизации белков ($p < 0,05$), но и к повышению интенсивности фона, что снижает значение соотношения сигнал/шум, а следовательно, и чувствительность системы. В связи с этим в дальнейших экспериментах для модификации поверхности целесообразнее было использовать концентрацию ГА 2,5 % (v/v).

Далее была поставлена задача подобрать оптимальный состав буфера для нанесения белков на подложку (печать белковых молекул). Согласно литературным данным [9], при изготовлении белковых микрочипов наиболее часто используют буферные растворы PBS и CBV, а для более эффективной иммобилизации белковых молекул в буферный раствор добавляют глицерин.

Нами проведен сравнительный анализ буферных растворов PBS (pH = 7,4) и CBV

(pH = 9,6) для печати, а также подобрана оптимальная концентрация глицерина в растворах.

Изучено влияние состава буферного раствора для печати на эффективность связывания белков (рис. 5). В исследованиях использовали глицерин в фиксированной концентрации 10 % (v/v). Из представленных данных следует, что оптимальный состав буферного раствора для печати – фосфатно-солевой буфер (pH = 7,4) с добавлением глицерина (10 % v/v). Такой буферный раствор поддерживает физиологический уровень pH, оптимальный для сохранения структурной организации белков, а присутствие глицерина уменьшает испарение воды (что благоприятно влияет на процесс иммобилизации), а также улучшает морфологические характеристики спотов.

Следующим этапом исследований стало определение оптимальной концентрации глицерина в буферном растворе для печати. На рис. 6 представлены данные об эффективности иммобилизации белков на поверхности микрочипов при варьировании концентрации глицерина (v/v) 0, 10, 20 и 30 % в буферном растворе для печати. Показано, что концентрация глицерина более 10 % снижает интенсивность флуоресценции спотов с иммобилизованными белками, что, вероятно,

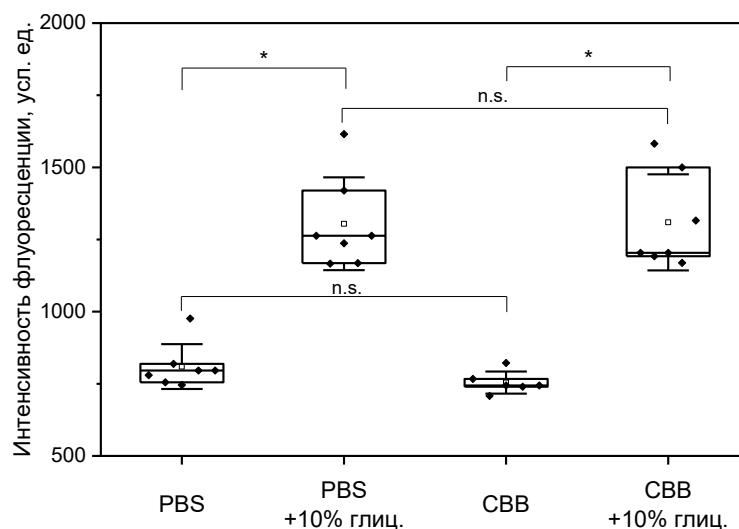


Рис. 5. Влияние состава буферного раствора для печати на эффективность связывания белков

Fig. 5. Effect of printing buffer solution composition on the protein binding efficiency

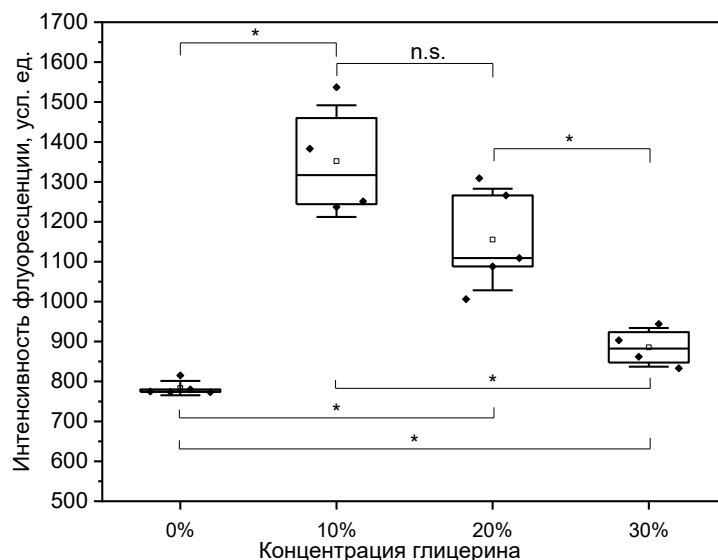


Рис. 6. Влияние концентрации глицерина (диапазон 0–30 % v/v) в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков

Fig. 6. Effect of glycerol concentration (range 0–30 % v/v) in printing buffer solution on protein binding efficiency

является следствием уменьшения эффективности иммобилизации белков из-за повышенной вязкости раствора.

Далее было изучено влияние глицерина в диапазоне концентраций 0 до 10 % (v/v) при различных разведениях иммобилизованных белковых молекул (рис. 7). Из полученных данных следует, что оптимальная концентрация глицерина в составе буфера для печати – 4 % (v/v).

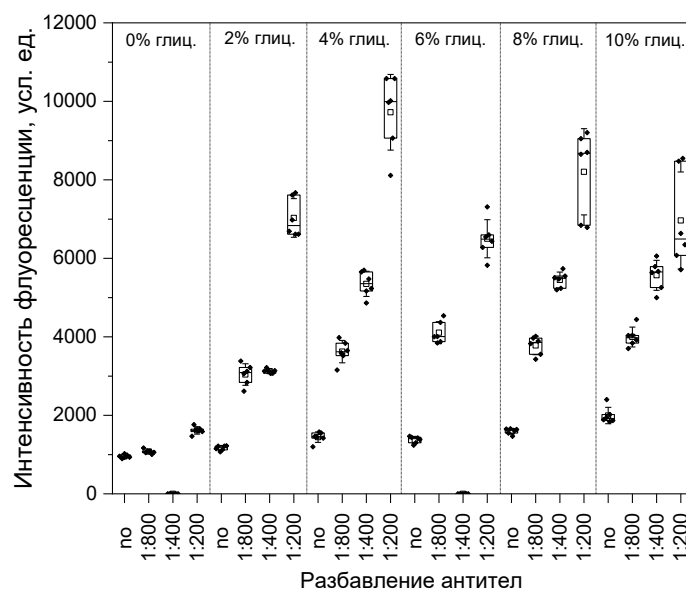


Рис. 7. Влияние концентрации глицерина (диапазон 0–10 % v/v) в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков при различном разбавлении (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 800 (0,125 мкг/мл), 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл). no – споты буфера для печати без добавления флуоресцентно-меченого IgE

Fig. 7. Effect of glycerol concentration (range 0–10 % v/v) in the printing buffer solution on the protein binding efficiency at different dilutions (antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome in different dilutions 1 : 800 (0.125 µg/ml), 1 : 400 (0.25 µg/ml), 1 : 200 (0.5 µg/ml) were immobilized onto the surface of the microarrays). no – spots of printing buffer without the addition of fluorescently labeled IgE

Согласно литературным источникам, добавление детергента Тритон X-100 в буфер для печати улучшает морфологические характеристики спотов (в частности, равномерность нанесения белка на подложку в заданных границах), не влияя при этом на флуоресцентный сигнал [10]. В связи с этим нами изучено влияние тритона в составе буфера для печати на эффективность иммобилизации белковых молекул на поверхность подложки (рис. 8). В буфер для печати добавляли Тритон X-100 в низкой концентрации (0,003 %), чтобы нивелировать его влияние на конформацию белков.

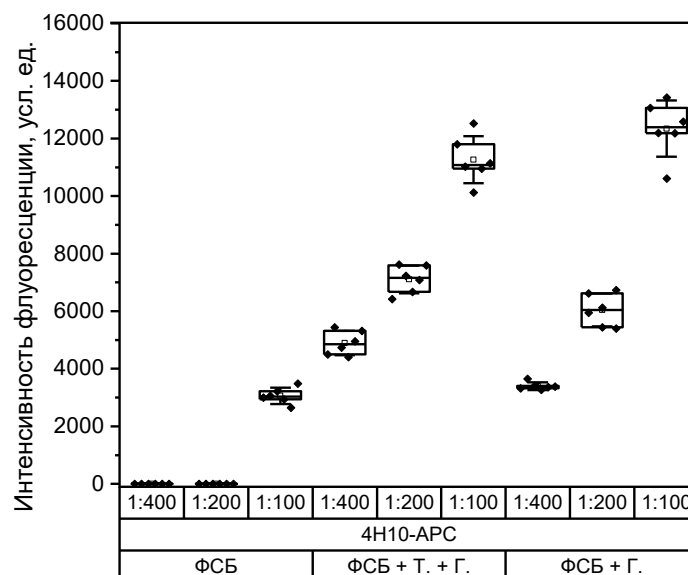


Рис. 8. Влияние добавок глицерина и Тритона X-100 в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков при различном разбавлении (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл), 1 : 100 (1 мкг/мл)). ФСБ – фосфатно-солевой буфер, Т – Triton X-100, Г – глицерин

Fig. 8. Effect of glycerol and Triton X-100 additives in printing buffer solution on protein binding efficiency at different dilutions (antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome in dilutions 1 : 400 (0.25 µg/ml), 1 : 200 (0.5 µg/ml), 1 : 100 (1 µg/ml) was immobilized onto the surface of the microarrays). ФСБ – phosphate buffered saline, Т – Triton X-100, Г – glycerol

Полученные данные (рис. 8) свидетельствуют об отсутствии значительного влияния Тритона X-100 на иммобилизацию белков. При этом улучшения морфологических характеристик спотов не отмечено.

Следовательно, в качестве оптимального состава буферного раствора для печати будет фосфатно-солевой буфер (pH 7,4) с добавлением 4 % глицерина.

На основании полученных данных предложена следующая методика модификации поверхности стеклянной подложки:

1. Очистка в смеси $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (3 : 1 v/v) в течение 30 мин.
2. Активация в 1 моль/л NaOH в течение 30 мин при 80 °C.
3. Силанизация в 1 %-ном (v/v) растворе APTES в 96%-ном (v/v) этаноле в течение 10 мин с последующим выдерживанием при температуре 110 °C в течение 30 мин.
4. Модификация в 2,5%-ном (v/v) растворе ГА в течение 30 мин.
5. Печать с использованием PBS с добавлением 4 % глицерина (v/v).

Закключение. В результате проведенных исследований разработана методика модификации поверхности стекла для эффективной иммобилизации белковых молекул с целью изготовления белковых микрочипов. Методика включает в себя этап очистки и активации поверхности, модификацию поверхности APTES и глутаровым альдегидом, а также подбор оптимального состава буферного раствора для иммобилизации белковых молекул. Предложенная методика обеспечивает эффективную иммобилизацию белков, что продемонстрировано на примере флуоресцентно-

меченых антител. В дальнейшем планируется использовать данную методику для изготовления белковых микрочипов для аллергодиагностики с целью выявления специфических IgE в сыворотке крови пациентов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия 35 «Разработать тест-систему на основе технологии микрочипов для выявления IgE-зависимых аллергических реакций» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии» Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 годы.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of activity 35 “Develop a test system based on microchip technology to detect IgE-dependent allergic reactions” of subprogram 1 “Innovative biotechnologies” of the State program “High-tech technologies and equipment” for 2021–2025.

Список использованных источников

1. Interferometric silicon biochips for label and label-free DNA and protein microarrays / M. Cretich [et al.] // *Proteomics*. – 2012. – Vol. 12, N 19–20. – P. 2963–2977. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200202>
2. Wilson, D. S. Functional protein microarrays / D. S. Wilson, S. Nock // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2002. – Vol. 6, N 1. – P. 81–85. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00281-2)
3. Preparation of substrates for microarray protein chips with different ending functional groups / A. Shiue [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2022. – Vol. 502. – Art. 113218. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113218>
4. Hall, D. Protein microarray technology / D. Hall, J. Ptacek, M. Snyder // *Mech. Ageing Dev.* – 2007. – Vol. 128, N 1. – P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.021>
5. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis / R. Speer [et al.] // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2005. – Vol. 7, N 3. – P. 240–245.
6. The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties / A. K. Trilling [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – Vol. 40, N 1. – P. 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.027>
7. Schäferling, M. Protein microarrays: Surface chemistry and coupling schemes / M. Schäferling, D. Kambhampati [Electronic resource] // *Protein Science Encyclopedia* / A. R. Fersht (ed.). – 2008. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/9783527610754.fa04>. – Date of access: 31.05.2024.
8. Surface modification strategies for biomedical applications: Enhancing cell-biomaterial interfaces and biochip performances / S. Roh [et al.] // *BioChip J.* – 2023. – Vol. 17. – P. 174–191. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00104-4>
9. Optimization of printing buffer for protein microarrays based on aldehyde-modified glass slides / Y. Liu [et al.] // *Front Biosci.* – 2007. – Vol. 12, N 10. – P. 3768–3773. <https://doi.org/10.2741/2350>
10. Ramos-de-la-Peña, A. M. Protein A chromatography: challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies / A. M. Ramos-de-la-Peña, J. González-Valdez, O. Aguilar // *J. Sep. Sci.* – 2019. – Vol. 42, N 9. – P. 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>

References

1. Cretich M., Monroe M. R., Reddington A., Zhang X., Daaboul G. G., Damin F., Sola L., Unlu M. S., Chiari M. Interferometric silicon biochips for label and label-free DNA and protein microarrays. *Proteomics*, 2012, vol. 12, no. 19–20, pp. 2963–2977. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200202>
2. Wilson D. S., Nock S. Functional protein microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, vol. 6, no. 1, pp. 81–85. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00281-2)
3. Shiue A., Chen J., Hsiao C., Chang S., Hwa K., Leggett G. Preparation of substrates for microarray protein chips with different ending functional groups. *Journal of Immunological Methods*, 2022, vol. 502, art. 113218. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113218>
4. Hall D., Ptacek J., Snyder M. Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2007, vol. 128, no. 1, pp. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.021>
5. Speer R., Wulfkühle J. D., Liotta L. A., Petricoin E. F. 3rd. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2005, vol. 7, no. 3, pp. 240–245.
6. Trilling A. K., Harmsen M. M., Ruigrok V. J. B., Zuilhof H., Beekwilder J. The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, vol. 40, no. 1, pp. 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.027>
7. Schäferling M., Kambhampati D. Protein microarrays: Surface chemistry and coupling schemes. *Protein Science Encyclopedia*, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1002/9783527610754.fa04> (accessed 31.05.2024).
8. Roh S., Jang Y., Yo J., Seong H. Surface modification strategies for biomedical applications: enhancing cell-biomaterial interfaces and biochip performances. *BioChip Journal*, 2023, vol. 17, pp. 174–191. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00104-4>
9. Liu Y., Li C. M., Yu L., Chen P. Optimization of printing buffer for protein microarrays based on aldehyde-modified glass slides. *Frontiers in Bioscience*, 2007, vol. 12, no. 10, pp. 3768–3773. <https://doi.org/10.2741/2350>
10. Ramos-de-la-Peña A. M., González-Valdez J., Aguilar O. Protein A chromatography: challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of Separation Science*, 2019, vol. 42, no. 9, pp. 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>

Информация об авторах

Давыденко Анастасия Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: asyacm251@gmail.com

Кохан Анатолий Юрьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rrchyp@gmail.com

Дремук Ирина Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Шамова Екатерина Вячеславовна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lubakova@gmail.com

Осипова Антонина Владимировна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aosipova@tut.by

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Information about the authors

Anastasiya I. Davydenka – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: asyacm251@gmail.com

Anatoli Yu. Kokhan – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rrchyp@gmail.com

Irina A. Dremuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Ekaterina V. Shamova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lubakova@gmail.com

Antanina U. Osipava – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aosipova@tut.by

Andrei Ya. Hancharou – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com