

НОВЫЕ КОНСТРУКЦИИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ БИОЧИПОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК

А.В. Шишкин¹, Н.Г. Овчинина¹, С.С. Бессмельцев²

¹ ГОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия, г. Ижевск

e- mail: Shishkin_lab@mail.ru

² Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, г. Санкт- Петербург

E-MAIL: BSSHEM@HOTMAIL.COM

ТЕЛ: (812) 717-58-57

NEW CONSTRUCTIONS OF IMMUNOLOGICAL BIOCHIPS FOR CELL INVESTIGATION.

¹A.V. Shishkin, ¹N.G. Ovchinina, ²S.S. Bessmeltsev

¹ Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk

² Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St- Petersburg

Резюме.

В статье описаны новые конструкции иммунологических биочипов, предназначенных для определения поверхностных антигенов клеток. Их использование позволяет уменьшить трудоемкость проведения анализа, снизить расход реактивов и исследуемого биологического материала. Предложенные варианты конструкций биочипов, имеют следующие преимущества. Биочип 1-го типа дает возможность проведения анализа без применения дополнительных инкубационно-отмывочных приспособлений при низком расходе клеточной суспензии и растворов реактивов. Кроме того, при использовании данного биочипа сводится к минимуму риск повреждения рабочей поверхности, а также имеется возможность приготовления долговременного препарата для микроскопических исследований (с целью защиты рабочей поверхности) при выполнении минимального количества манипуляций. Биочип 2-го типа позволяет упростить процесс контроля качества отмывки от неспецифически связавшихся клеток.

Ключевые слова: иммунологические биочипы, определение поверхностных антигенов клеток, конструкция иммунологического биочипа.

Summary to the article

Some new patterns of immunological biochips for detection of surface cell antigens are reported in this article. Using the biochips allows decreasing the difficulty of analysis, reagent consumption and amount of biological material. The first type of microarray: analysis is provided without using additional devices for incubation and washing with low quantity of cell suspension and minimal reagent consumption. Long-term specimen of biochip for protection from damage may be produced. The second type of microarray: this design permits to simplify the control of washing quality from nonbinding cells.

Key words: immunological biochips, surface cell antigens, constructions of immunological biochips.

Введение

Для иммунологического исследования клеток в настоящее время используются иммунофлуоресцентные [1] и иммуноцитохимические (иммуноферментные) [2] методы, а также проточная цитофлуориметрия. [2,3]. Их основными недостатками является высокая стоимость проведения анализа и сравнительно небольшое количество одновременно определяемых антигенов. Метод проточной цитофлуориметрии требует использования дорогостоящего оборудования.

Многие диагностические антигены имеют поверхностную локализацию, что создает возможность их определения с использованием антител, иммобилизованных на твердой поверхности. В последние годы проводятся работы по созданию тест-систем нового поколения - иммунологических биочипов, позволяющих определять поверхностные антигены клеток [4-16]. Биочипы такого класса предназначены для использования в области гематологии, клинической иммунологии, а также в других отраслях медицины.

Биочипы, разработанные разными исследователями [4-16], имеют примерно одинаковое устройство (рис. 1). На поверхности биочипа имеется множество тестовых участков, в которых иммобилизованы (за счет ковалентного связывания или адсорбции) антитела, специфичные к различным поверхностным антигенам клеток. В процессе проведения анализа в области тестовых участков («пятен») биочипа происходит связывание клеток, имеющих на своей поверхности, определяемые поверхностные антигены. Существующие в настоящее время биочипы позволяют определять десятки, и даже сотни различных поверхностных антигенов на разных клетках.

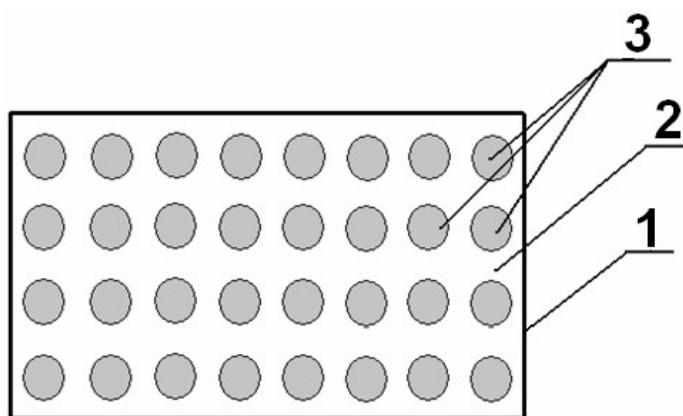


Рис. 1. Устройство иммунологического биочипа для определения поверхностных антигенов клеток.

Примечание. 1) подложка, 2) фоновые участки подложки, не содержащие иммобилизованных антител, 3) тестовые участки («пятна») с иммобилизованными антителами, специфичными к поверхностным антигенам клеток.

Принцип проведения анализа с помощью подобных биочипов заключается в следующем. Закрепленный на дне емкости биочип инкубируют с суспензией исследуемых клеток. Клетки оседают на поверхность биочипа. При этом часть клеток оказывается в области тестовых участков с иммобилизованными антителами. Если на поверхности клетки имеются молекулы антигена, к которому специфичны иммобилизованные антитела, происходит достаточно прочное ее связывание в данном участке. Клетки, не имеющие данного антигена, неспецифически связываются с поверхностью подложки с меньшей прочностью. Далее осуществляют отмывку биочипа. При этом происходит смывание неспецифически связавшихся клеток, а в области пятен биочипа остаются только специфически связавшиеся клетки. Если инкубация биочипа с клеточной суспензией осуществлялась без перемешивания, плотность связывания клеток в пятне биочипа пропорциональна содержанию в исследуемом образце клеток, имеющих данный антиген. [14,16] Зная величину плотности связывания клеток в каждом пятне биочипа можно оценить содержание в исследуемом образце клеток имеющих каждый из определяемых антигенов. Поскольку биочип содержит множество тестовых участков с антителами, имеющими разную специфичность, в процессе анализа одновременно определяется множество разных поверхностных антигенов на разных клетках.

Особенностью ранее созданных биочипов [14-16] было использование прозрачных оптически однородных и химически стойких пластиковых подложек. Прозрачность подложки позволяет проводить исследование связавшихся клеток в проходящем свете.

Химическая стойкость подложек и их слабое прокрашивание цитологическими (гистологическими) красителями позволяет выполнять окрашивание связавшихся клеток, а также проводить их морфологическое и некоторые другие исследования [14-16]. Кроме того, имеется возможность приготовления из биочипов долговременных препаратов для микроскопии, позволяющих проводить многократное исследование связавшихся клеток с использованием иммерсионных объективов без какого-либо повреждения поверхности. Ранее созданные биочипы [14-16] достаточно хорошо зарекомендовали себя. В то же время, несмотря на все свои достоинства, они не были лишены недостатков.

Целью настоящей работы было совершенствование конструкции биочипов.

Материалы и методы.

В данной статье мы приводим описание двух новых разработок (биочип 1-го типа и биочип 2-го типа) и сопоставляем их результативность с использованием существующих биочипов, т.е. биочипов базовой конструкции.

Устройство иммунологического биочипа базовой конструкции было показано на рис. 1. Биочип изготовлен на прозрачной пластиковой подложке, в строго определенных местах (тестовых участках, «пятнах») которой были адсорбированы молекулы антител. В каждом из тестовых участков иммобилизованы антитела, специфичные к одному поверхностному антигену клеток. Разные тестовые участки отличаются друг от друга специфичностью иммобилизованных в них антител. Тестовые участки отделены друг от друга фоновыми участками, не содержащими иммобилизованных антител. Для изготовления биочипа были использованы мышинные моноклональные антитела (IgG), специфичные к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов человека: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD27, CD29, CD31, CD36, CD38, CD41, CD44, CD45, CD45RA, CD56, CD71, CD72, CD95, CD98, HLA-DR, sIgM (ООО «Сорбент», Россия). Размеры подложки составляли 22 x 11 мм.

При изготовлении биочипа капли растворов антител объемом 0,25 мкл наносили на подложку в заранее отмеченные участки. Далее подложку помещали в камеру со 100% влажностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего высушивали на воздухе и замораживали при -26°C в герметичных контейнерах. При таком хранении биочипы не теряли своих свойств, по меньшей мере, в течение 12 месяцев.

Получение клеточной суспензии.

Лейкоциты были выделены из периферической крови путем центрифугирования в растворе фиколла и урографина с плотностью 1,077 г/мл и трижды отмыты PBS. Полученные клетки ресуспензировали в растворе, содержащем 20% (по объему) инаktivированной нагреванием человеческой сыворотки и 1,5мМ ЭДТА в PBS.

Проведение анализа с использованием биочипа базовой конструкции.

После разморозки биочип закрепляли в чашке Петри с помощью прозрачного двустороннего скотча. Биочип ополаскивали 1% раствором BSA в буфере PBS, а затем проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 на шейкере. Далее биочип инкубировали с 1% раствором BSA в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа при перемешивании на шейкере. Затем вновь проводили трехкратную отмывку 0,05% раствором детергента Tween-20 и ополаскивали биочип буфером для удаления следов детергента.

В емкость с биочипом вносили клеточную суспензию и инкубировали в течение 60 минут без какого-либо перемешивания. Концентрация клеток и объем суспензии подбирались таким образом, чтобы при оседании клеток происходило полное покрытие ими поверхности биочипа. При использовании в качестве емкости чашки Петри диаметром 35 мм (площадь поверхности дна 961,6 мм²) требовалось 2,2 мл клеточной суспензии с концентрацией клеток $6,5 \times 10^6$ кл/мл. После завершения инкубации для устранения клеток, не связавшихся в участках с иммобилизованными антителами, биочипы несколько раз ополаскивали PBS. Качество отмывки оценивали при помощи стереомикроскопа МБС-1. Отмывка считалась выполненной качественно, если клетки отсутствовали в фоновых участках подложки, не содержащих иммобилизованных антител. Осуществляли фиксацию связанных клеток метанолом в течение 12 минут, после чего биочип высушивали на воздухе. Связавшиеся клетки окрашивали по Ромновскому- Гимзе. Для этого в чашку Петри с биочипом вносили 2,5 мл раствора азура и эозина. Окрашивание осуществляли в течение 35 минут. После этого биочип промывали водой и высушивали. Окрашивание клеток в дальнейшем делало более удобным определение количества клеток при оценке плотности связывания, а также давало возможность выполнения их морфологического исследования в случае необходимости уточнения результата.

Затем биочип осторожно отделяли от дна кюветы. Из биочипа готовили долговременный микропрепарат для микроскопических исследований. Для этого биочип заключали в композицию «Shandon-Mount» («Thermo-electron corporation») между

тщательно обезжиренными предметным и покровным стеклами. Препарат помещали под пресс до затвердевания композиции.

Каждое пятно биочипа фотографировали на малом увеличении с помощью цифровой фотокамеры смонтированной на микроскопе. В каждом из пятен биочипа определяли плотность связывания клеток (отношение количества клеток к площади поверхности участка на котором они связаны). Для этого на микрофотографии каждого пятна выбирали участки, соответствующие участку подложки размерами 100 x 100 мкм и проводили определение количества связанных клеток не менее чем в 3-4 таких участках. Полученные значения усредняли.

Для удобства использования полученных результатов, значения плотности заполнения поверхности пятен связавшимися клетками выражали в процентах. За 100% принималась средняя плотность связывания клеток в области пятна с антителами, специфичными к антигену CD45, который присутствует на поверхности практически всех лейкоцитов. Исходя из этого, осуществлялся пересчет в проценты плотности связывания клеток в области других тестовых участков биочипа. Ранее было показано [14,16], что при проведении инкубации биочипа с клеточной суспензией без перемешивания, получаемые значения плотности связывания клеток в области тестовых участков биочип оказываются пропорциональны фактическому содержанию в исследуемом образце клеток, имеющих соответствующие антигены. При этом плотность связывания клеток в пятне биочипа, выраженная в процентах, численно хорошо совпадает с фактическим процентным содержанием в исследуемом образце клеток, имеющих определяемый антиген

Иммунологический биочип 1-го типа.

Многие достоинства иммунологических биочипов достигаются за счет миниатюризации. Но малые размеры биочипов создают определенные неудобства при работе с ними. Перед проведением анализа биочип должен быть закреплен в емкости, где будет проводиться инкубация с клеточной суспензией и обработка соответствующими растворами. При неаккуратном выполнении данной манипуляции рабочая поверхность биочипа может получить механические повреждения. Кроме того, если площадь дна емкости значительно превышает площадь поверхности биочипа, исследуемый биологический материал расходуется очень неэкономно, так как при инкубации далеко не все клетки оседают именно на поверхность биочипа. Все перечисленные недостатки могут быть устранены при использовании биочипа 1-го типа (патент на полезную модель RU 86091).

Биочип данного типа изготовлен на подложке из прозрачного пластика. На подложке были адсорбированы такие же антитела, как на биочипе базовой конструкции. Устройство биочипа 1-го типа показано на рис. 2. Подложка 1 содержит рабочую область 2 (имеющую малые размеры) и края 3, значительно выступающие за ее пределы. Размеры подложки 1 соответствуют размерам предметного стекла, что делает удобным выполнение различных манипуляций с биочипом и проведение микроскопического исследования. Рабочая область 2 содержит тестовые участки 4 («пятна» биочипа) с иммобилизованными антителами, которые отделены друг от друга фоновыми участками 5, не содержащими иммобилизованных антител. Рабочая область 2 ограничена по периметру бортиком 6, в результате чего образуется емкость 7. Бортик 6 выполнен съемным, что в процессе анализа позволяет убирать его после того, как в нем исчезнет необходимость.

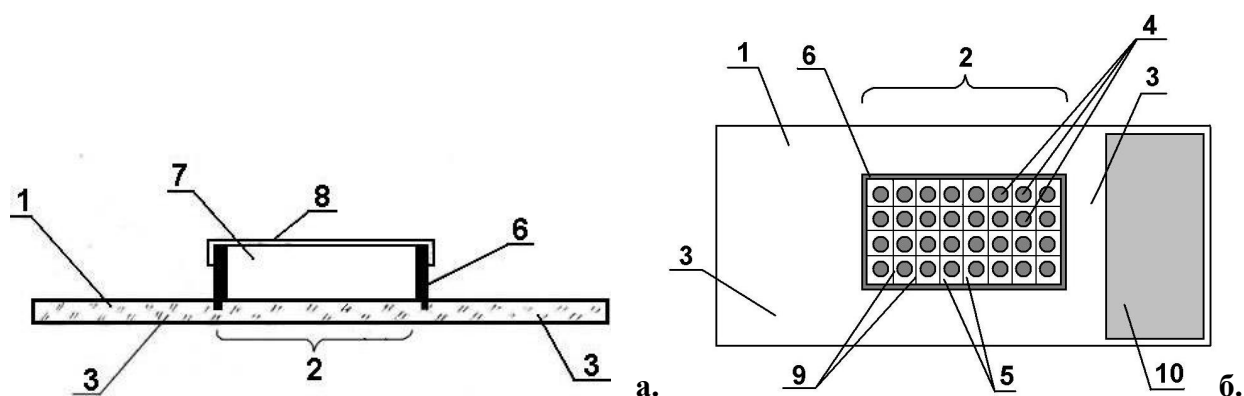


Рис. 2. Устройство биочипа 1-го типа.

Примечание. а) вид сбоку в разрезе, б) вид сверху (со снятой крышкой); 1) подложка, 2) рабочая область биочипа, 3) выступающие края подложки, 4) тестовые участки с иммобилизованными антителами (пятна биочипа), 5) фоновые участки, не содержащие иммобилизованных антител, 6) съемный бортик, 7) емкость биочипа, 8) съемная крышка, 9) линии разметки, 10) этикетка для записи сведений об исследуемом образце клинического материала.

Емкость 7 снабжена съемной крышкой 8, предотвращающей испарение из нее жидкости при проведении инкубации. Рабочая область 2 имеет разметку 9, облегчающую нахождение нужных тестовых участков биочипа при считывании результата в неавтоматизированном режиме. Рабочая область биочипа 1-го типа, использованного в данной работе, имела размеры 22x11 мм

Проведение анализа с использованием биочипа 1-го типа.

Анализ с помощью биочипа данного типа осуществляется практически так же, как при использовании биочипа базовой конструкции. Отличие заключается в том, что используемые растворы и клеточную суспензию вносят непосредственно в емкость 7 биочипа. В процессе инкубации емкость 7 закрывают съемной крышкой 8 для уменьшения испарения жидкости и исключения возможности ее разбрызгивания. Отмывку биочипа от не связавшихся с антителами клеток осуществляют под контролем микроскопии. При фиксации и окрашивании клеток, связавшихся с биочипом, соответствующие жидкости также вносят в емкость 7.

Также как и из биочипа базовой конструкции из биочипа 1-го типа может быть приготовлен долговременный микропрепарат для микроскопического исследования. Единственное отличие заключается в том, что перед этим должен быть удален съемный бортик 6.

Иммунологический биочип 2-го типа.

В процессе проведения анализа после инкубации биочипа с клеточной суспензией необходимо выполнить отмывку биочипа от клеток, не связавшихся с антителами. После отмывки на поверхности биочипа должны оставаться только те клетки, которые связались с антителами в области тестовых участков. Прочность связывания различных типов клеток в области различных тестовых участков неодинакова, поскольку она зависит от количества антигенов на поверхности клетки и от аффинности антител, иммобилизованных на подложке биочипа. Поэтому необходимо добиться таких условий отмывки, при которых все клетки, связавшиеся с антителами, оставались бы на поверхности биочипа, а все не связавшиеся с антителами клетки удалялись. Чем в большей степени выполняется данное условие, тем выше точность анализа и его чувствительность. Поэтому процесс отмывки должен контролироваться. Наиболее эффективной является отмывка биочипа с точно регулируемой скоростью потока при использовании проточной камеры [15]. Но достаточно высокая трудоемкость делает использование такого подхода целесообразным не во всех случаях.

Гораздо более простой является отмывка биочипа в кювете с нерегулируемой скоростью потока жидкости. Но в некоторых случаях приходится сталкиваться с высокой прочностью неспецифического связывания клеток в области фоновых участков биочипа. Поэтому приходится выполнять отмывку биочипа несколько раз. При контроле качества отмывки каждый раз приходится просматривать всю поверхность биочипа. Это

повышает трудоемкость анализа. Для решения данной проблемы был предложен биочип 2-го типа (патент на полезную модель RU 86090) (рис. 3).

Биочип изготовлен на подложке из прозрачного пластика. Он содержал такую же панель антител, как биочип базовой конструкции. Иммунизация антител на подложке осуществлялась за счет адсорбции. Размеры подложки биочипа 2-го типа, использованного в данной работе, составляли 22x11 мм. Биочип имеет контрольный участок, в котором прочность связывания клеток заведомо больше прочности неспецифического связывания (адгезии) клеток с материалом подложки, но меньше, чем прочность специфического связывания клеток с иммобилизованными антителами любого из тестовых участков. Контрольный участок имеет относительно большую площадь и расположен в отдельной области биочипа. В данном контрольном участке иммобилизованы молекулы антител, способных связываться с поверхностными молекулами, имеющимися на поверхности всех типов клеток, присутствующих в исследуемом образце суспензии. В данном случае биочип был предназначен для исследования лейкоцитов. Поэтому в контрольном участке были иммобилизованы антитела, специфичные к антигену CD45, присутствующему практически на всех лейкоцитах. Для того, чтобы прочность связывания клеток в данном контрольном участке была меньшей, чем прочность специфического связывания клеток в любом из тестовых участков (пятен биочипа), отношение количества иммобилизованных молекул антител к площади поверхности данного участка должно быть небольшим. При изготовлении биочипа это достигалось путем того, что в данном контрольном участке иммобилизация антител выполнялась из раствора с их низкой концентрацией (большим разведением).

Кроме того, биочип дополнительно имеет второй контрольный участок, свойства поверхности которого, точно такие же, как в фоновых участках. Но данный контрольный участок имеет относительно большую площадь и располагается в отдельной области биочипа.

Биочип имеет разметку, облегчающую нахождение нужных тестовых участков при считывании результата в неавтоматизированном режиме.

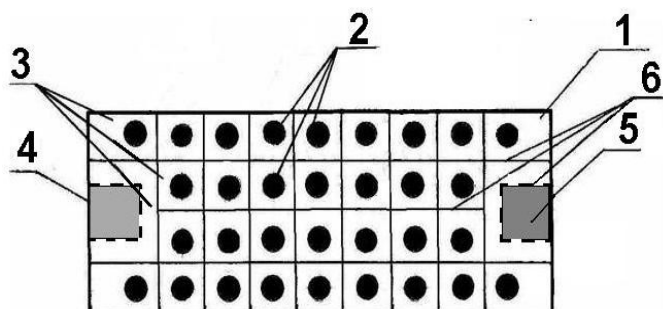


Рис. 3. Устройство биочипа 2-го типа.

Примечание. 1) подложка, 2) тестовые участки (пятна биочипа), содержащие иммобилизованные молекулы антител, 3) фоновые участки, не содержащие иммобилизованных антител, 4) контрольный участок №1, обеспечивающий связывание клеток более прочное, чем в фоновых участках (3), но менее прочное, чем в любом из тестовых участков (2), 5) контрольный участок №2 не содержащий иммобилизованных антител и обеспечивающий такую же прочность связывания клеток как в фоновых участках (3), 6) линии разметки.

Проведение анализа с использованием биочипа 2-го типа.

Проведение анализа с использованием биочипа 2-го типа осуществляется практически так же, как при использовании биочипа базовой конструкции. Но при контроле качества отмывки биочипа от неспецифически связавшихся клеток достаточно просматривать только 2 контрольных участка. При качественно проведенной отмывке клетки должны быть полностью устранены из второго контрольного участка, не содержащего иммобилизованных антител, но еще оставаться в первом контрольном участке, содержащем небольшое количество иммобилизованных антител. Отрыв большого количества клеток из первого контрольного участка будет свидетельствовать о том, что отмывка должна быть прекращена.

Результаты и обсуждение.

С помощью биочипа базовой конструкции и биочипов 1-го и 2-го типов нами были исследованы клетки крови больной Х. 70 лет, страдающей хроническим В-клеточным лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ). Как видно из таблицы 1, полученные результаты оказались весьма близкими ($p > 0,05$).

Таблица 1.

Результат определения содержания клеток, экспрессирующих различные антигены, при исследовании лейкоцитов больной, страдающей В-ХЛЛ.

Антиген	Биочип базовой конструкции	Биочип 1-го типа	Биочип 2-го типа
CD2	16 ± 4	13 ± 4	17 ± 4
CD3	17 ± 4	11 ± 4	10 ± 3

CD4	11 ± 3	12 ± 3	8 ± 2
CD5	95 ± 5	90 ± 4	93 ± 3
CD7	21 ± 4	16 ± 3	24 ± 4
CD8	12 ± 3	9 ± 2	8 ± 3
CD9	72 ± 4	67 ± 5	74 ± 4
CD10	0	0	0
CD11a	30 ± 5	34 ± 3	28 ± 4
CD11b	62 ± 5	67 ± 4	71 ± 5
CD16	6,3 ± 2	8 ± 3	5 ± 2
CD19	82 ± 6	80 ± 4	86 ± 5
CD20	90 ± 7	81 ± 4	88 ± 6
CD21	87 ± 5	83 ± 4	80 ± 4
CD22	58 ± 6	63 ± 5	67 ± 5
CD23	83 ± 5	79 ± 4	85 ± 5
CD27	83,5 ± 5	85 ± 4	80 ± 4
CD29	91 ± 4	89 ± 5	93 ± 6
CD31	95 ± 5	90 ± 4	97 ± 4
CD36	62 ± 5	67 ± 4	70 ± 5
CD38	79 ± 4	73 ± 5	80 ± 5
CD41	0	0	0
CD44	100 ± 3	98 ± 3	98 ± 4
CD45	100 ± 4	100 ± 2	100 ± 5
CD45RA	72 ± 5	78 ± 3	80 ± 5
CD56	3 ± 2	7 ± 3	8 ± 3
CD71	0	0	0
CD72	58 ± 5	64 ± 3	67 ± 5
CD95	0	0	0
CD98	0	0	0
HLA-DR	48 ± 4	51 ± 5	56 ± 6
IgM	0	0	0

Примечание: приводятся ошибки среднего по результатам оценки плотности связывания клеток в тестовых участках биочипов.

Однако необходимо отметить, что проведение анализа с использованием биочипа 1-го типа было значительно более удобным и менее трудоемким, чем при использовании биочипа базовой конструкции. Это связано с тем, что при работе с биочипом 1-го типа не было необходимости выполнения точных манипуляций, создающих риск повреждения поверхности биочипа. Значительно упрощался процесс приготовления из биочипа долговременного микропрепарата, поскольку не требовалось точного дозирования используемой для этого композиции. Ее избыток не растекался по поверхности подложки за пределы рабочей области, а заполнял канавку, в которой ранее крепился съемный бортик. Поэтому не происходило загрязнения краев подложки.

Кроме того, при проведении анализа с использованием биочипа 1-го типа значительно сокращался расход клеточной суспензии, поскольку клетки могли оседать только в рабочей области. Для проведения анализа требовалось в 4 раза меньшее количество клеток, чем при использовании биочипа базовой конструкции, размещенного в чашке Петри диаметром 35 мм. Во столько же раз сократился расход используемых отмывочных и блокирующих растворов, фиксирующей жидкости (метанола) и раствора красителей.

При использовании биочипов 2-го типа стало значительно более удобным выполнение контроля качества отмывки от неспецифически связавшихся клеток. Использование данного подхода значительно уменьшает вероятность отрыва клеток, связавшихся в области тестовых участков биочипа с недостаточно высокой прочностью, обеспечивая при этом полное устранение клеток, не связавшихся с антителами.

Это особенно полезно при работе с клетками, имеющими высокую прочность неспецифической адгезии к материалу подложки. Она часто отмечается при работе с клетками крови больных В-ХЛЛ. Для отмывки устранения неспецифически связанных клеток потребовались достаточно жесткие условия отмывки. Но при излишне грубой отмывке, возникает риск искажения результатов. Использование биочипов 2-го типа позволяет в значительной мере решить эту проблему и сделать оценку качества отмывки более объективной.

Возможно комбинирование технических решений, использованных в конструкции биочипов 1-го и 2-го типа. Преимущества, которые достигаются при использовании биочипов 1-го типа, могут быть достигнуты и при работе с биочипами 2-го типа и биочипами базовой конструкции при применении специальной платформы (рис. 4) (патент на полезную модель RU 90213).

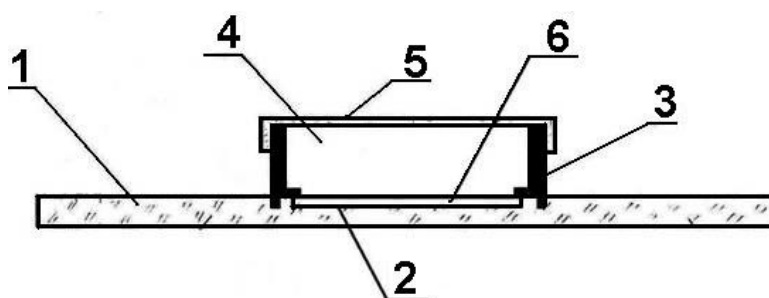


Рис. 4. Устройство платформы для размещения биочипа.

Примечание. 1) пластина из прозрачного материала; 2) выемка для размещения биочипа, имеющая прозрачное клейкое покрытие; 3) съемный бортик; 4) емкость; 5) съемная крышка; 6) биочип.

Биочипы 1-го типа могут быть снабжены дополнительными контрольными участками, такими же, как на биочипе 2-го типа. Выбор варианта конструкции, который может быть запущен в производство, будет определяться только особенностями технологии серийного изготовления биочипов.

Таким образом, биочип 1-го типа дает возможность проведения анализа без применения дополнительных инкубационно-отмывочных приспособлений при низком расходе клеточной суспензии и растворов реактивов. При использовании данного биочипа сводится к минимуму риск повреждения рабочей поверхности, а также имеется возможность приготовления долговременного препарата для микроскопических исследований при выполнении минимального количества манипуляций. Представляется весьма перспективным использование биочипов 2-го типа при проведении анализа с использованием проточной камеры. В этом случае должна быть сохранена конструкция, представленная на рис. 3. Биочип 2-го типа позволяет упростить процесс контроля качества отмывки от неспецифически связавшихся клеток.

Список литературы.

1. Микроскопическая техника. Руководство для врачей лаборантов/ Под ред, Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова// М.: Медицина, 1996. -544 с.
2. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др. Клетки крови и современные технологии их анализа// М.: «Триада-Фарм», 2002. – 200 с.
3. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов// Тверь, изд-во «Триада», 2005. – 168 с.
4. Chang T.W. Binding of cells of distinct antibodies coated on solid surface// J. Of immunological methods. - 1983. - Vol. 65. - P. 217-223.
5. Belov L, de la Vega O, dos Remedios C.G. et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray//Cancer research. - 2001. - Vol. 61. - P. 4483-4489.
6. Belov L., Huang P., Barber N. et al. Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray //Proteomics.-2003.-Vol.3.-P.2147-2154.
7. Belov L., Huang P., Chrisp J.S., et al. Screening microarrays of novel monoclonal antibodies for binding to T-, B- and myeloid leukaemia cells B// Journal of Immunological Methods. - 2005.- Vol. 305. - P.10-19.

8. White S.L., Belov L., Barber N. et al. Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate//Leukemia Research.- 2005.-Vol.29.- P.1141-1151.
9. Campbell C.J., O'Looney N., ChongKwan M. et al. A cell interaction microarray for blood phenotyping// Anal. Chem. - 2006. - Vol. 78. - P. 1930-1938.
10. Ellmark P., Belov L., Huang P. et al. Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers// Proteomics. - 2006. - Vol. 6. - P. 1791-1802.
11. Woolfson A., Stebbing J., Tom B. et al. Conservation of unique cell-surface CD antigen mosaics in HIV-1-infected individuals// Blood. - 2005. - Vol. 106. 3. - P. 1003-1007.
12. Ko I.K., Kato K. & Iwata H. Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker //Biomaterials. - 2005. - Vol.26. - P. 687-696.
13. Liu A.Y. Differential Expression of Cell Surface Molecules in Prostate Cancer Cells// Cancer Research. - 2000. - Vol. 60. - P. 3429-3434.
14. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для параллельного определения поверхностных антигенов и морфологического исследования клеток// Биологические мембраны. - 2008. - №4. - С. 277-284.
15. Шишкин А.В., Шмырев И.И., Кузнецова С.А. и др. Иммунологические биочипы для исследования эритроцитов человека// Биологические мембраны. - 2008. - №4 - С. 267-276.
16. Шишкин А.В. Иммунологические биочипы для исследования клеток. Собственный опыт разработки. Некоторые новые подходы к проведению анализа// LAP Lambert Academic Publishing & Co. KG- 2010, 158 с.