

12. CHIPY DNA, PCR ORAZ DO PROTEOMIKI

Ilona Grabowska, Natalia Górniak, Zbigniew Brzózka

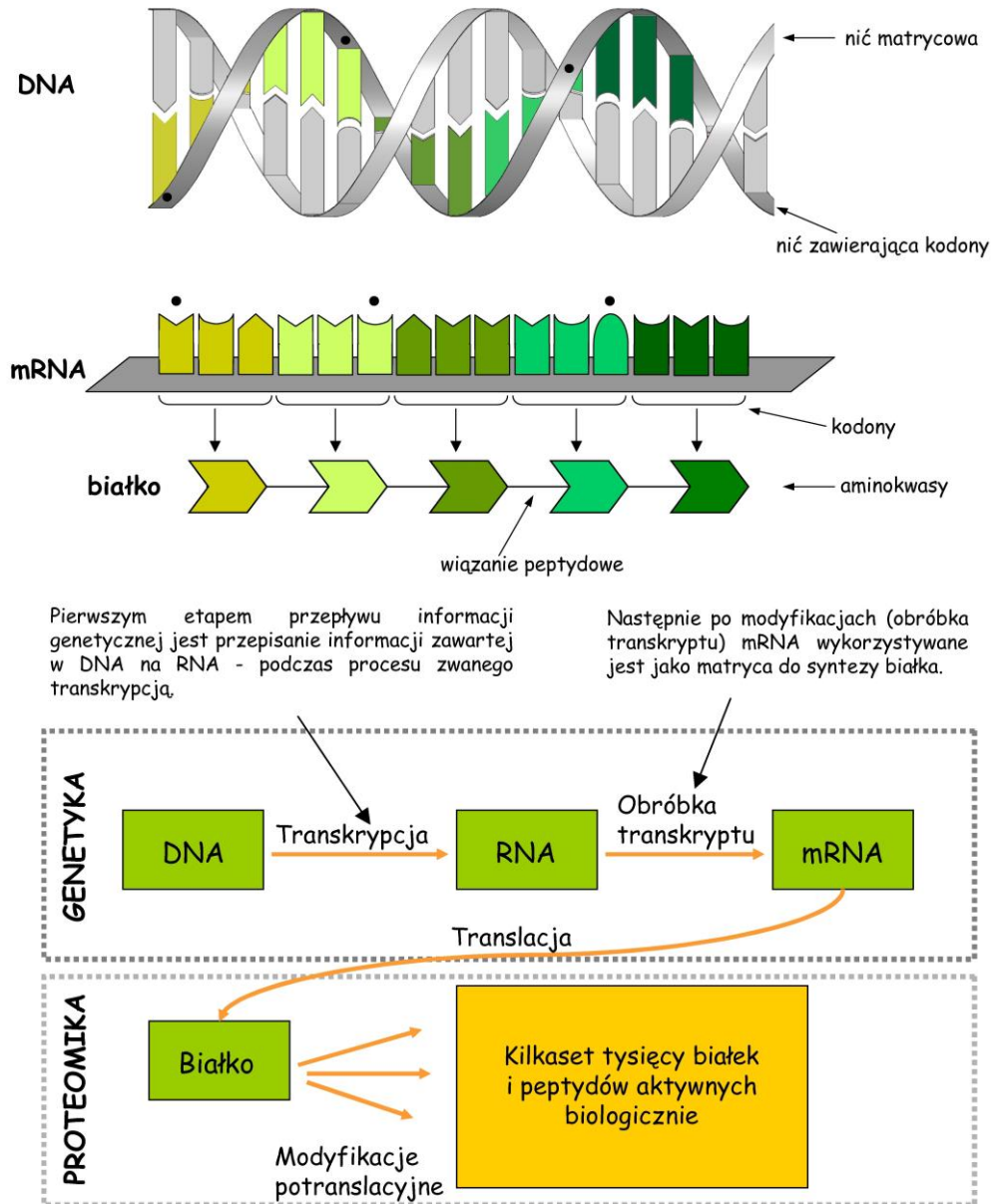
Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

12.1. GENOMIKA A PROTEOMIKA – OBSZARY BADAŃ

Obecnie na całym świecie intensywnie prowadzone są badania w dziedzinie genomiki i proteomiki. Ich wyniki mogą zrewolucjonizować diagnostykę medyczną i przemysł farmaceutyczny. Poprzez badanie zmian w cząsteczkach DNA lub białek organizmu mogą być pozyskiwane precyzyjne informacje o stanie zdrowia. Dzięki tego typu badaniom może zostać opracowana selektywna terapia, która będzie miała na celu dotarcie leku do podstaw choroby, czyli działanie na poziomie biologii molekularnej.

Przyczynę rozwoju genomiki należy upatrywać w tym, iż dotychczas prowadzone badania z dziedziny genetyki nie dawały odpowiedzi na pytanie, jak zawarta w genie informacja przekłada się na rozwój i funkcjonowanie całego organizmu. Celem genetyki jest badanie działania danego genu, podczas gdy genomika zajmuje się kompleksową analizą genomu, czyli zestawu wszystkich genów organizmu oraz jego przemianami. To właśnie te badania pozwalają zrozumieć i analizować procesy biologiczne zachodzące w organizmie w szerszym niż dotychczas kontekście, uwzględniając wzajemne powiązania i oddziaływania między genami. Na podstawie badań genomu ludzkiego udało się zebrać wiele informacji na temat organizmu ludzkiego. Znając strukturę DNA można określić potencjalne zjawiska mogące zachodzić w żywej komórce, natomiast RNA informuje o tych spośród nich, które w danym momencie są najbardziej prawdopodobne. Jednak, jak się okazało, dopiero poznanie występujących tam białek może dać odpowiedź na pytanie, co tak naprawdę dzieje się w komórce. Tak więc rozwój genomiki spowodował zwiększone zainteresowanie proteomiką - dziedziną badań obejmującą analizę budowy i funkcjonowania wszystkich występujących w przyrodzie białek i ich fragmentów. Na rys. 12.1 a przedstawiono zależność występującą między parami zasad DNA, nukleotydami RNA i aminokwasami białka. DNA zawiera specyficzną sekwencję nukleotydów, która stanowi podstawę do syntezy RNA, zachodzącej podczas procesu zwanego transkrypcją. W ten sposób sekwencja nici RNA odpowiada sekwencji deoksyrybonukleotydów w DNA. Z tym jednak, że obecnemu w DNA nukleotydowi T (tymina) odpowiada nukleotyd U (uracyl) oraz to, że RNA składa się z rybonukleotydów, podczas gdy w DNA są deoksyrybonukleotydy. Jednostką kodującą

aminokwasu jest odpowiednia sekwencja trzech nukleotydów w DNA/RNA, która nazywana jest kodonem. Dwadzieścia aminokwasów zakodowane jest w postaci 61 tripletów nukleotydowych. Tak więc więcej niż jeden kodon wyznacza dany aminokwas. Na rys. 12.1. b zostały przedstawione obszary badań genomiki i proteomiki.



Rys. 12.1. a) Zależność występującą między parami zasad DNA, nukleotydami RNA i aminokwasami białka, b) obszar genetyki a proteomiki

Białka pełnią funkcje sterujące procesami życiowymi. W organizmie ludzkim istnieje około 30.000 genów, kodujących bezpośrednio trzykrotnie więcej białek dzięki procesom regulacji transkrypcji i translacji. Podczas przemian potranslacyjnych, białka te różnicują się już w kilkaset tysięcy różnych rodzajów cząsteczek. Wiele spośród procesów zachodzących w organizmie (t.j. starzenie się lub chorowanie) ma charakter multigeniczny, przez co

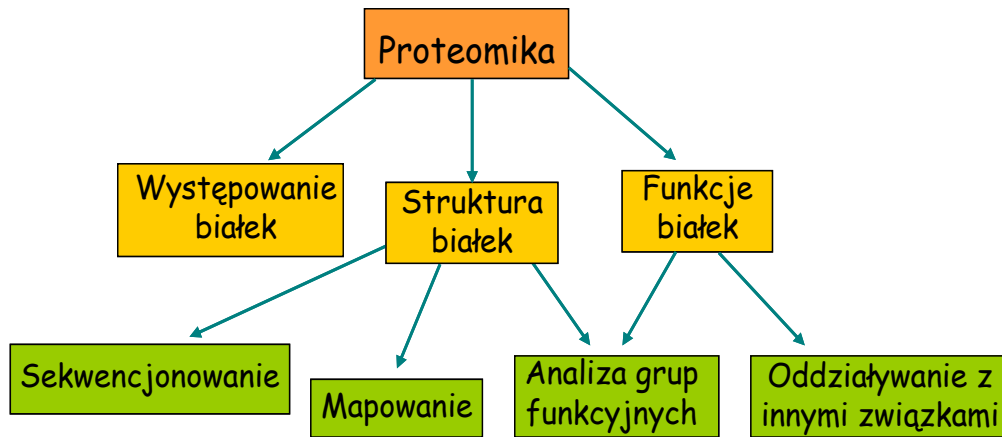
znalezienie odpowiedzialnych za nie genów nie jest łatwe. W takich przypadkach zdecydowanie bardziej celowym wydają się badania grupy białek i peptydów bezpośrednio związanych z przebiegiem poszczególnych etapów tych zjawisk. Genom człowieka stanowi stały, wyjściowy zapis wszystkich potencjalnych zjawisk. Przejawem zmian zachodzących w organizmie jest natomiast proteom, dynamicznie zmieniający się na skutek metabolizmu białek i ich transportu pomiędzy komórkami i tkankami. Część zmian w organizmie rozpoczyna się jednak już na poziomie genomu, ze względu na oddziaływanie niektórych czynników zewnętrznych bezpośrednio na cząsteczki DNA. Z tego względu konieczne jest wzajemne przenikanie i uzupełnianie się badań proteomicznych i genomicznych.

12.1.1. GŁÓWNE KIERUNKI BADAŃ W GENOMICIE

Genomika zajmuje się badaniem genomu, czyli pełnej zawartości DNA w danym organizmie oraz związanymi z jego funkcjonowaniem procesami. Zatem wśród kierunków badań genomicznych wyróżnić można przede wszystkim: badanie struktury DNA, jego sekwencjonowanie, poznawanie kodu w nim zawartego, wykrywanie występowania mutacji czy odcinków charakterystycznych. W większości analiz wykorzystywane są reakcje przebiegające normalnie w żywym organizmie oraz fakt wzajemnego powinowactwa poszczególnych zasad w cząsteczkach DNA i zdolności do łączenia się pojedynczych nici przy wystąpieniu komplementarnych sekwencji. W ten sposób nauka wykorzystuje mechanizmy opracowane przez naturę. Najwidoczniejsze wydaje się to w przypadku łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) – stanowiącej proste przeniesienie naturalnego procesu z żywej komórki do probówki, ale również będącej, po niewielkich usprawnieniach, jedną z głównych i najskuteczniejszych metod analiz DNA.

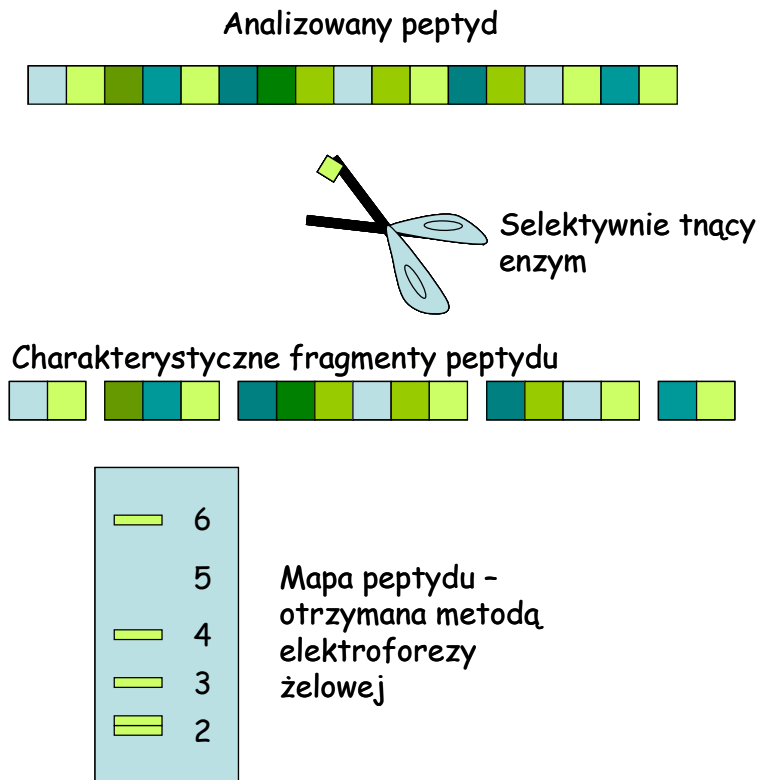
12.1.2. GŁÓWNE KIERUNKI BADAŃ W PROTEOMICIE

Proteomika jest bardzo obszerną dziedziną badań nie tylko ze względu na ilość i zróżnicowanie analitów jakich dotyczy, ale również pod względem różnorodności rozbudowanych technik analitycznych jakimi operuje.



Rys. 12.2. Kierunki badań proteomiki

Do głównych kierunków badań z dziedziny proteomiki (rys. 12.2.) zaliczyć można przede wszystkim analizę występowania poszczególnych białek i peptydów. Ustalana jest zależność ich ilości od miejsca w organizmie. Na tej podstawie można przypuszczać ich potencjalny udział w procesach zachodzących w tych organach. Kolejnym etapem badań jest poznanie budowy białek i peptydów a analizę taką można przeprowadzać na kilka sposobów. Jednym z nich jest rozpoznanie grup funkcyjnych danego białka poprzez ich udział w charakterystycznych reakcjach. Inną metodą jest sekwencjonowanie całej cząsteczki w celu poznania jej dokładnego składu aminokwasowego, łącznie z kolejnością ich ułożenia. Wygodną metodą analizy białek i peptydów jest ich mapowanie (rys. 12.3.).



Rys. 12.3. Proces mapowania peptydu

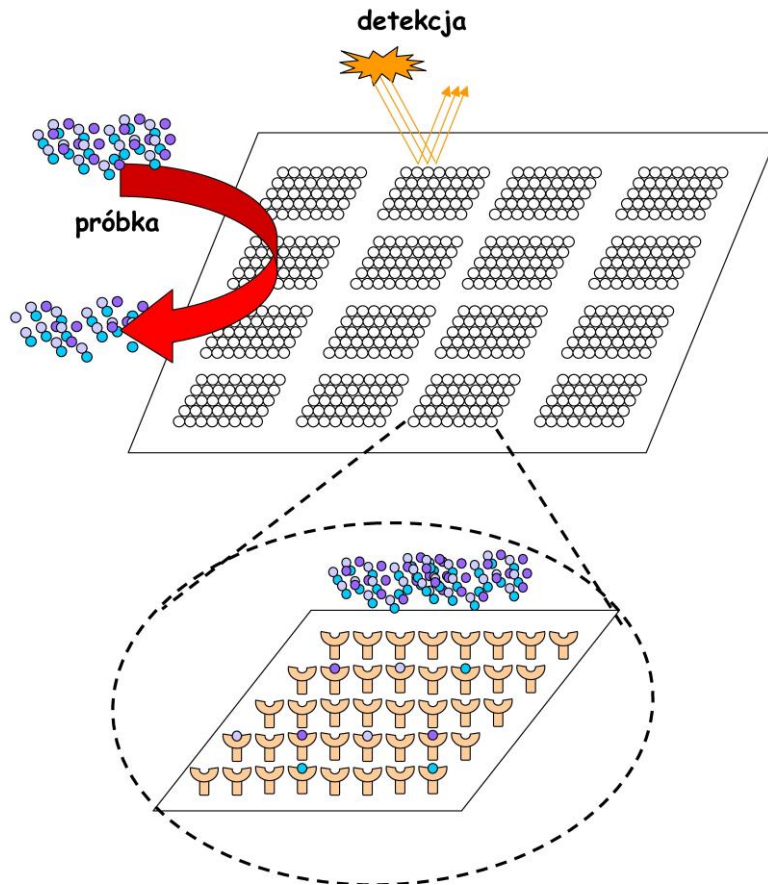
Proces ten polega na trawieniu badanej cząsteczki przez enzym o dobrze znanym działaniu (selektywności cięcia konkretnych połączeń pomiędzy aminokwasami). Uzyskane w ten sposób fragmenty są rozdzielane i analizowane, w wyniku czego otrzymany zostaje zestaw części badanej cząsteczki o znanej w przybliżeniu długości. Jeden enzym jest w stanie pociąć daną cząsteczkę peptydu lub białka tylko w jeden charakterystyczny sposób. Istnienie bazy fragmentów odpowiadających znanym cząsteczkom trawionym tym enzymem (ich map), umożliwia porównanie i zidentyfikowanie analizowanej, bez konieczności badania pełnego jej składu. Widoczne stają się również podobieństwa w budowie różnych związków. Innym kierunkiem badań proteomicznych jest analizowanie oddziaływań pomiędzy poszczególnymi białkami. Większość z analiz proteomicznych ma ostatecznie na celu poznanie funkcji białek umożliwiające lepsze zrozumienie funkcjonowania organizmu, jak też skuteczniejsze zapobieganie procesom chorobowym bądź prowadzenie terapii.

12.2. PROTEOMIKA I GENOMIKA W MINIATUROWYCH UKŁADACH

Miniaturowe układy analityczne stosowane do badań z zakresu proteomiki i genomiki można podzielić na dwie grupy: mikromacierze oraz układy przepływowe. Działanie pierwszych z nich opiera się na selektywnym oddziaływaniu odpowiednio cząsteczek białek lub DNA zawartych w analizowanej próbce ze związkami zaimobilizowanymi na powierzchni miniaturowego układu. W układach przepływowych natomiast poszczególne etapy analizy próbki – reakcje z jej składnikami, ich rozdzielanie, zachodzą w trakcie ciągłego przepływu próbki w obrębie mikrokanałów.

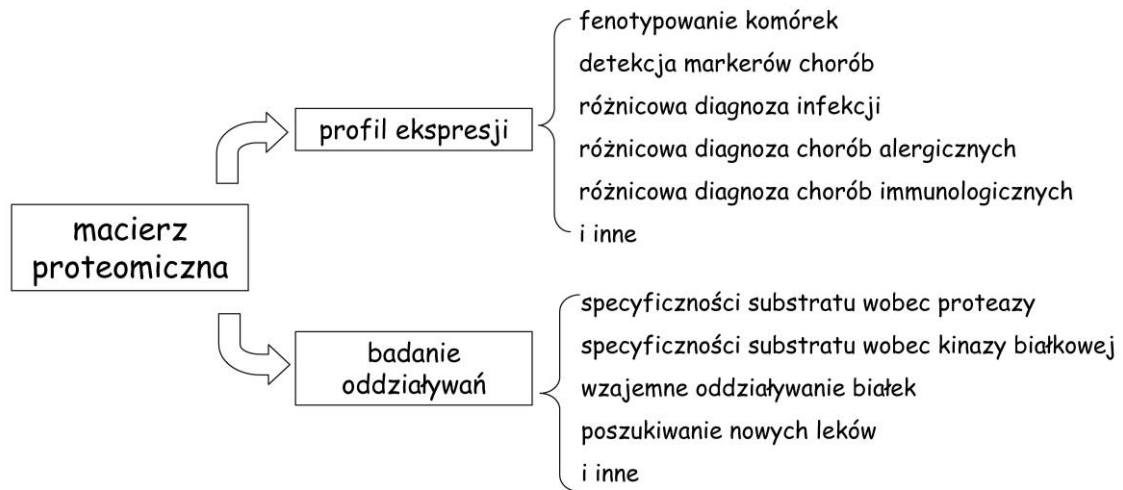
12.3. MIKROMACIERZE PROTEOMICZNE

Mikromacierze proteomiczne wykorzystywane są do badania oddziaływań pomiędzy białkami oraz do oznaczania zawartości charakterystycznych grup białek w próbce. W pierwszym przypadku są to mikromacierze funkcjonalne, w drugim natomiast analityczne. Mikromacierz to miniaturowa płytką pokryta warstwą zaimobilizowanych na powierzchni cząsteczek związków mogących selektywnie przyłączać wybrane białko lub grupę białek. Cząsteczkami tymi mogą być: inne białka (enzymy, przeciwciała) czy polimery z wbudowanymi odpowiednimi grupami funkcyjnymi. Analiza próbki polega na przemyciu mikromacierzy roztworem próbki. Odpowiednie jej składniki ulegają przyłączeniu do jej powierzchni. Następny etap to detekcja polegająca na zaobserwowaniu zmienionych miejsc na powierzchni płytki. Czasem do tego celu stosowane jest przemycie płytki dodatkowym roztworem wywoływacza – np. selektywnego znacznika fluorescencyjnego przyłączającego się wybiórczo bądź tylko w zmienionych, bądź tylko w nie zmienionych miejscach na powierzchni mikromacierzy. Schemat analizy z zastosowaniem mikromacierzy proteomicznej pokazany został na poniższym rysunku (rys. 12.4.). W zależności od zastosowania powierzchnia mikromacierzy może zostać pokryta w całości jednym rodzajem cząsteczek, bądź też podzielona na fragmenty odpowiadające innym rodzajom oddziaływań w celu zanalizowania zawartości różnego rodzaju białek w badanej próbce lub pełnego scharakteryzowania oddziaływań możliwych dla jednego wybranego analitu np. enzymu.



Rys. 12.4. Schemat działania macierzy proteomicznej

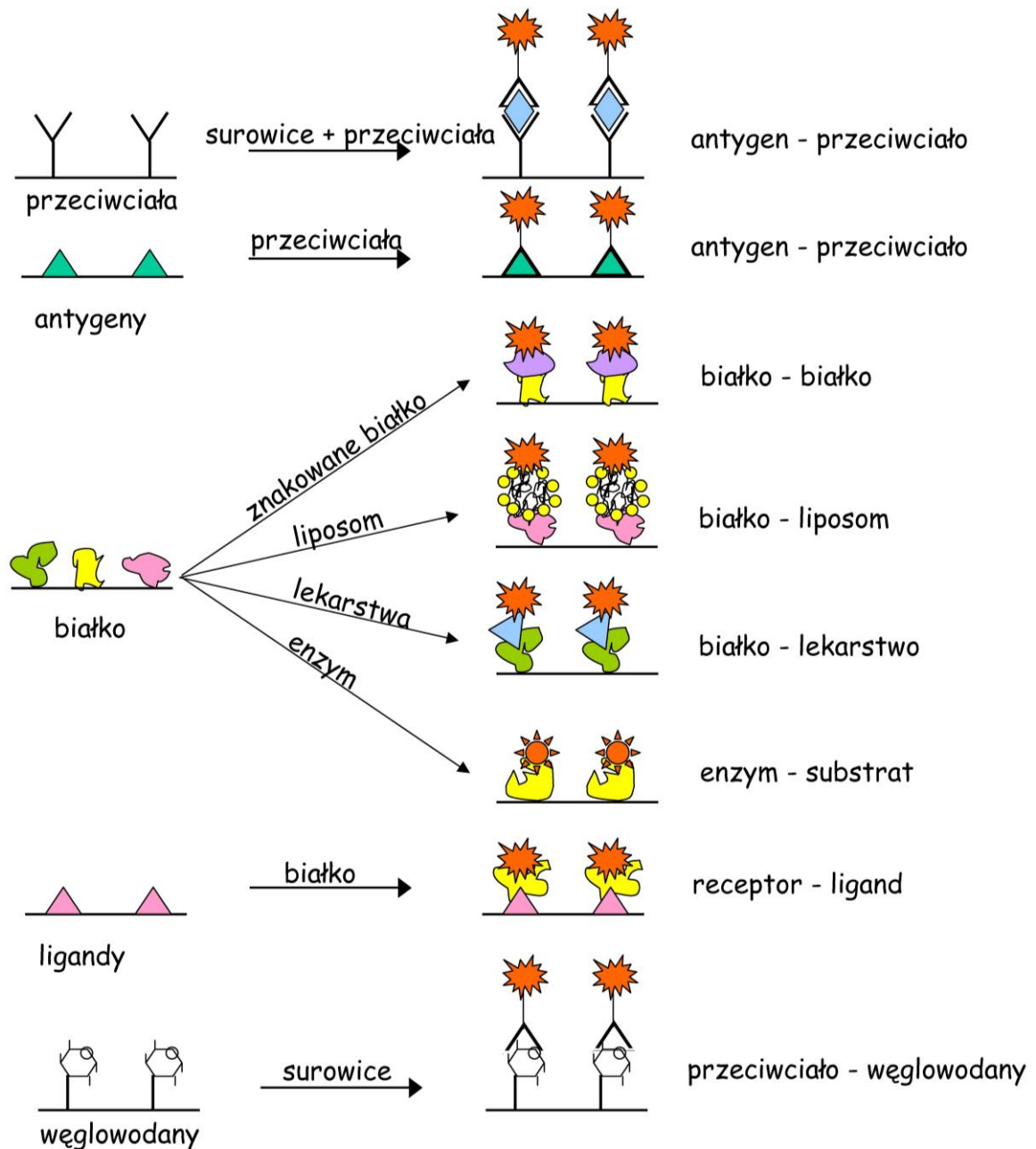
Mikromacierze mają bardzo wiele zastosowań w badaniach proteomicznych (rys. 12.5.). Mikromacierze analityczne stosowane są do: ustalania fenotypu komórek, oznaczania markerów chorób we krwi, diagnozy różnego rodzaju infekcji, alergii czy problemów o podłożu immunologicznym. Układy funkcjonalne służą między innymi do badania specyficzności substratowej niektórych enzymów, oddziaływań pomiędzy różnymi białkami w tym przeciwciałami, opracowywaniu mechanizmu działania nowych leków.



Rys. 12.5. Zastosowania macierzy proteomicznych

Metody immobilizacji odpowiednich związków na powierzchni mikromacierzy są analogiczne do opisanych w rozdziale 7, pt.:” Mikroreaktory enzymatyczne i ich zastosowania” na przykładzie enzymów w miniaturowych układach. Rodzajów związków i oddziaływań, które mogą zostać wykorzystane przy projektowaniu mikromacierzy do analiz proteomicznych jest bardzo wiele – większość z nich została schematycznie przedstawiona na poniższym rysunku (rys. 12.6.).

Ze względu na to, że chipy białkowe są narzędziem badawczym, który umożliwia bezpośrednie i dokładne poznanie typów jak i określenia ilości białek występujących w komórce oraz sprawdzenie tego które z nich wzajemnie oddziałują ze sobą, spodziewać się należy tego że będą one niebawem niezastąpionym i powszechnie stosowanym narzędziem. Z praktycznego punktu widzenia ich stosowanie pozwoli na lepsze diagnozowanie chorób. Poprzez analizę osocza krwi z wykorzystaniem chipu białkowego możliwe będzie uzyskanie informacji o większości bądź nawet wszystkich, występujących w niej białkach, co z obecnie stosowanymi urządzeniami analitycznymi ogranicza się do wykrywania jednego lub kilku białek specyficznych dla danej choroby.



Rys. 12.6. Różne macierze proteomiczne

12.4. MINIATUROWE UKŁADY PRZEPLYWOWE W PROTEOMICIE

Pośród miniaturowych układów przepływowych stosowanych do analiz proteomicznych główną grupę stanowią układy służące do rozdzielania próbek. Będą to mikrochipy chromatograficzne, mikrokanały ze specjalnymi wypełnieniami selektywnie zatrzymującymi poszczególne składniki próbki oraz najszerzej stosowane mikroukłady do elektroforezy

kapilarnej. Do proteomicznych układów przepływowych można zaliczyć również różnego rodzaju mikroreaktory enzymatyczne opisane szerzej w rozdziale 7.

12.5. PCR

Techniką szczególnie często wykorzystywaną w badaniach genetycznych jest technika PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. polymerase chain reaction). Koncepcja tej reakcji, wymyślona przez H. Ghobind Khorana, powstała już w 1971 roku. Jednak dopiero 15 lat później została ona praktycznie wykorzystana przez K. Mullisa, który też nadał jej obecną nazwę. Za swoje badania uhonorowany został on nagrodą Nobla w 1993 roku.

Technika PCR pozwala powielić wybrany fragment nici DNA, który jest wykorzystywany w dalszych badaniach. Namnożenie fragmentu DNA zawartego w próbce wykonywane jest przy użyciu enzymu (polimerazy), który w naturze powiela DNA podczas podziału komórki. Powielenie fragmentu łańcucha jest wyjątkowo proste i praktycznie ogranicza się do zmieszania składników mieszaniny reakcyjnej oraz późniejszego sterowania cyklicznymi zmianami temperatury, w celu umożliwienia przebiegu kolejnych etapów reakcji.

Do wykonania PCR potrzebne są:

- analizowane DNA (templat),
- startery (primery) – krótkie jednoniciowe fragmenty DNA (najczęściej 20 nukleotydowe) komplementarne do końcowych odcinków sekwencji templat, która będzie powielana,
- polimeraza (np. polimeraza Taq, która izolowana jest z bakterii **Thermus aquaticus**),
- pojedyncze nukleotydy,
- odpowiedni bufor z jonami magnezu.

Synteza wielu kopii wybranego odcinka DNA następuje w wyniku cyklicznego powtórzenia się reakcji, której trzy etapy prowadzone w temperaturach: 95°C, 45-70°C i 72°C. W pierwszym etapie analizowana podwójna nić DNA rozplata się (topnieje, denaturuje) na nici pojedyncze pod wpływem wzrostu temperatury do około 95 stopni. W drugim etapie temperatura zostaje obniżona (ok. 68 stopni) do wysokości umożliwiającej przyłączenie się starterów do odpowiednich miejsc na niciach analizowanego DNA. Trzeci i ostatni etap to dobudowanie reszty odcinka DNA (reakcja polimeryzacji) zawartego pomiędzy starterami poprzez przyłączanie pojedynczych nukleotydów przez polimerazę. To wydłużenie nici DNA zachodzi zwykle w temperaturze około 72 stopni. W wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy stężenie materiału powielonego wzrasta wykładniczo po każdym przeprowadzonym cyklu. W kolejnych powtórzeniach reakcji powieleniu ulega nie tylko DNA zawarte początkowo

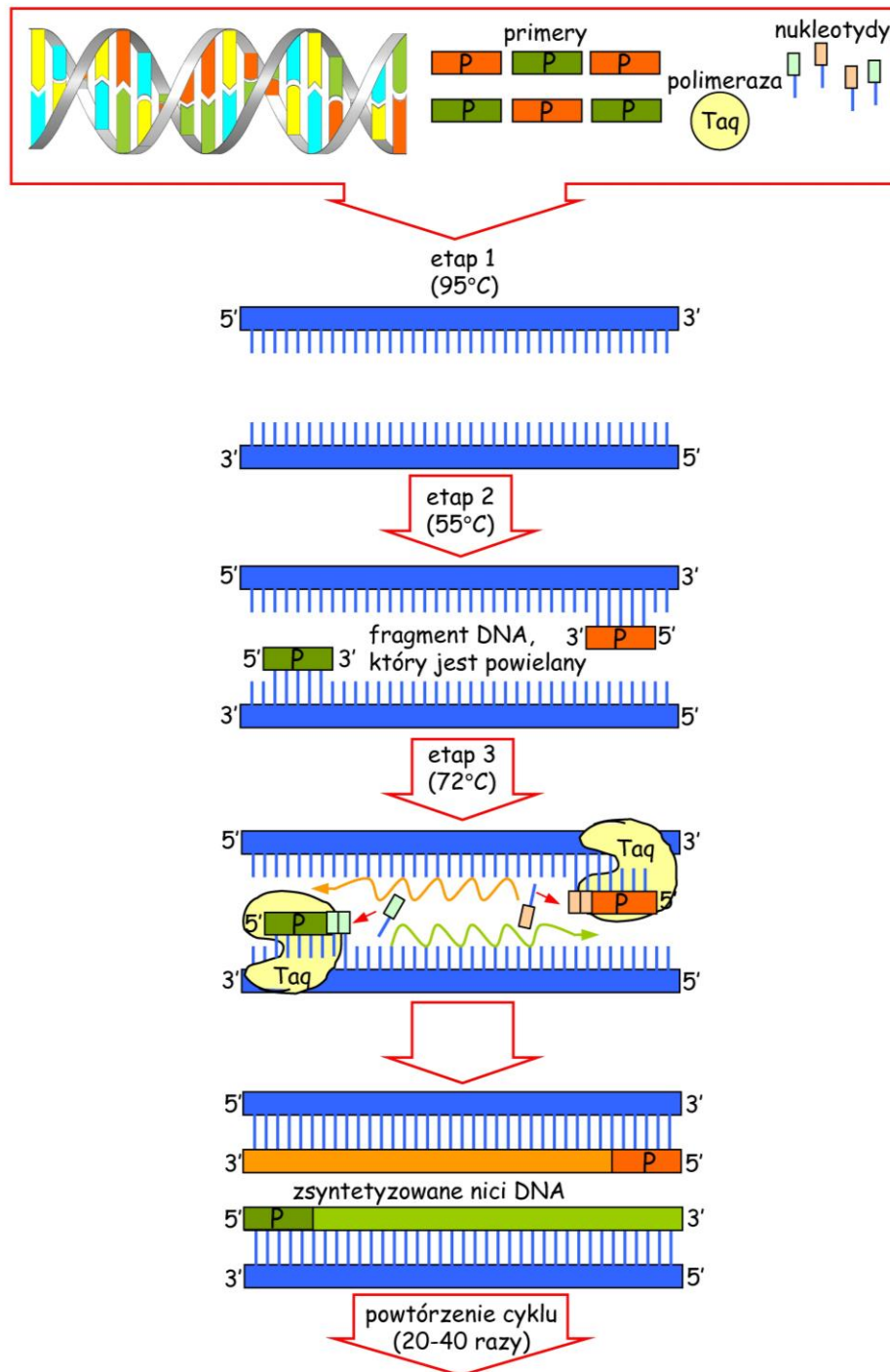
w próbce ale również powstałe w poprzednich cyklach jego kopie. Z tego względu przyrost ilości DNA jest bardzo duży i szybki. Przebieg reakcji PCR pokazany został na poniższym rysunku (rys. 12.7.).

PCR wykonywane jest w urządzeniach zwanych termocyklerami. Poprzez programowanie temperaturowych zmian bloku grzejącego, w którym umieszczone są próbówki, przeprowadzona zostaje reakcja. Zwykle wykonywanych jest od 20 do 30 cykli, gdyż wówczas otrzymuje się wystarczającą ilość materiału do dalszych badań.

Najistotniejsze zalety techniki PCR to: szybkość, względna prostota, wybiórczość, możliwość badania struktury różnych alleli genu (różne wersje genu, różniące się nukleotydami) w sytuacjach, w których nie można uzyskać dużej ilości materiału oraz ułatwienie klonowania odcinków DNA, które występują w genomie bardzo rzadko.

Znane i stosowane są również inne odmiany PCR, m.in. takie jak: Real Time PCR, Reverse-Transcription PCR czy RAPD-PCR. Wybór odpowiedniej z nich zależy od celu prowadzonych badań.

Aktualną popularność PCR zawdzięcza postępowi w sekwencjonowaniu DNA oraz syntezy zaprojektowanych sekwencji, jak również odkryciu termostabilnych odmian polimerazy umożliwiającej prowadzenie wielu cykli PCR w podwyższonej temperaturze bez konieczności dodawania nowego enzymu.



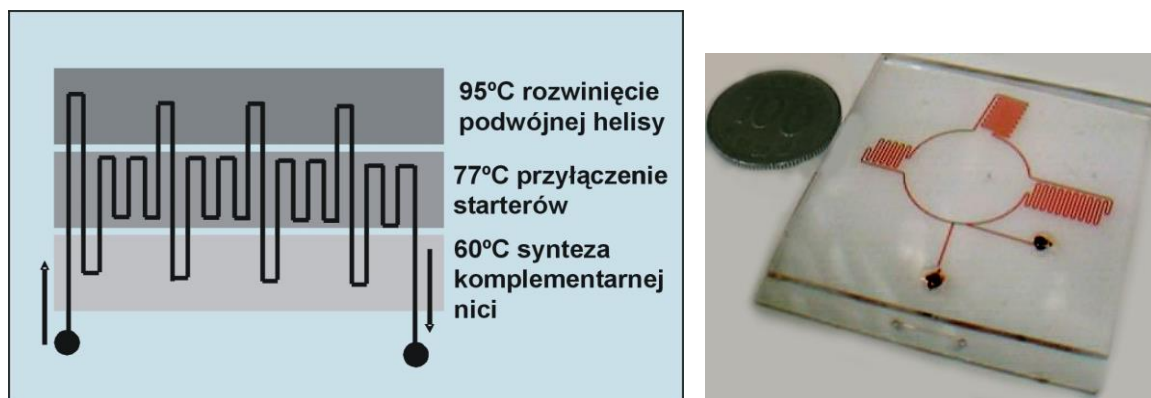
Rys. 12.7. Schemat przebiegu PCR

12.5.1. μ PCR

Pojawiły się mikroreaktory o specjalnie zaprojektowanej konstrukcji w których można prowadzić PCR. W takich mikroreaktorach reakcja prowadzona jest w objętościach rzędu mikrolitrów. Tak wielka popularność miniaturowych chipów do PCR wynika z ich licznych zalet, takich jak: przenośność, krótszy czas trwania cyklu (więcej cykli w tym samym czasie),

zmniejszenie ilości reagentów jak również wygodniejsza integracja amplifikacji DNA z przygotowaniem próbki i detekcją produktu (czyli możliwość miniaturyzacji badań genetycznych).

W wyniku prowadzenia PCR w chipach, czas potrzebny na otrzymanie odpowiedniej ilości powielonego DNA został skrócony z kilku minut do 30 sekund. Osiągnięto to poprzez zwiększenie szybkości cyklicznych zmian temperatury, co skróciło czas cyklu a w konsekwencji całkowity czas procesu. Chipy PCR wykonywane są z takich materiałów jak: szkło, krzem, ceramika czy też powstają układy hybrydowe (krzem-szkło, PDMS-szkło). Przykład takiego układu do PCR przedstawiono na Rys. 12.8. Jest to jedna z wielu opracowanych konstrukcji, które różnią się m.in.: kształtem kanału i trybem działania. W przedstawionym przykładzie roztwór przepływa poprzez strefy o różnych temperaturach i w ten sposób następują kolejne etapy procesu replikacji i powielenie badanego materiału. Chipy PCR należy traktować jako specyficzne mikroreaktory do wykonania tej konkretnej reakcji. Mogą one być stosowane samodzielnie lub stanowić część wielofunkcyjnego zintegrowanego systemu. Wyróżnia się dwa rodzaje chipów PCR: statyczny (reaktor zbiornikowy) i przepływowy. W chipie statycznym zmiany temperatury realizowane są poprzez szybkie nagrzewanie i chłodzenie całego chipu. Układy te charakteryzują się względnie łatwą kontrolą cyklicznych zmian temperatury i jej modyfikacją przy PCR różnych próbek DNA. Natomiast w chipach przepływowych nie ma cyklicznych zmian temperatur, szybsze są cykle gdyż reagenty przepływają przez 3 strefy temperaturowe.



Rys. 12.8. a) Schemat chipu PCR, dzięki trzem obszarom o różnych temperaturach (95°C, 77°C, 60°C) możliwe jest powielenie DNA w krótkim czasie, b) zdjęcie chipu PCR

12.6. CHIPY DNA

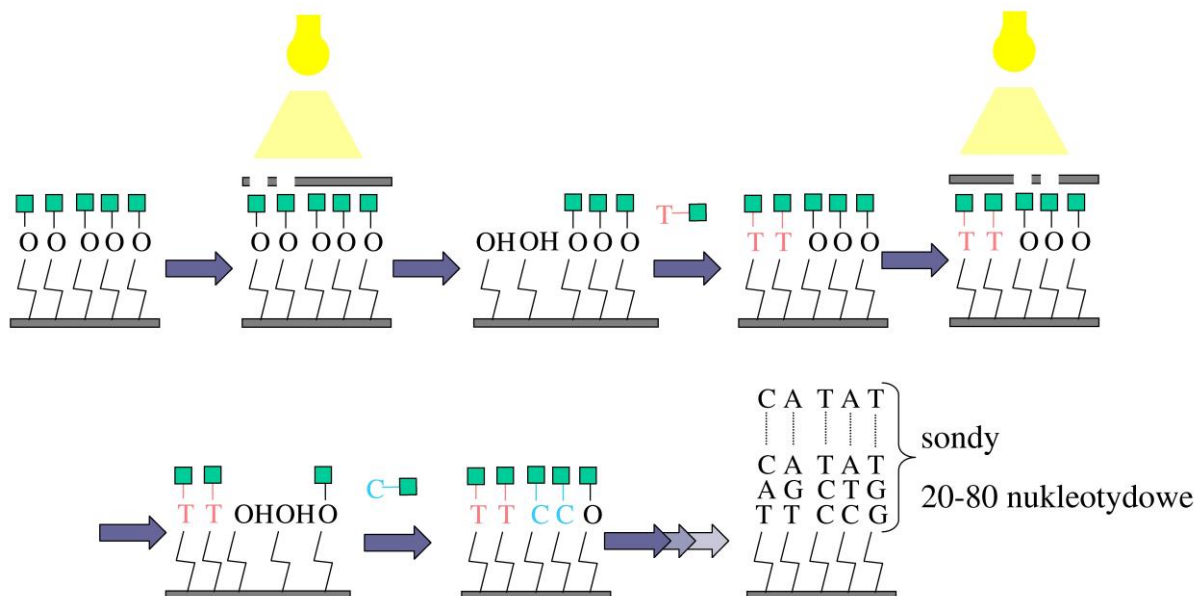
Zasada działania mikromacierzy DNA jest analogiczna do wcześniej już opisanych mikromacierzy proteomicznych, z tym wyjątkiem że podstawą ich funkcjonowania jest komplementarność (i hybrydyzacja) kwasów nukleinowych. Mikromacierze te są to niewielkich rozmiarów chipy o powierzchni rzędu 1-2 cm². Na powierzchni tej znajdują się uporządkowane fragmenty genów (tzw. sondy molekularne), które zostały unieruchomione na nylonowych membranach bądź szklanych (lub plastikowych) płytkach. Fragmenty genów występują w postaci jednoniciowego DNA lub oligonukleotydów, które umieszczone zostały w ściśle określonych miejscach chipu. Fragmenty te są sondami, które mogą się połączyć tylko z komplementarnymi do siebie cząsteczkami DNA. Analiza z wykorzystaniem takich płytek polega na umieszczeniu na nich uprzednio znakowanej fluorescencyjnie próbki DNA. Fragmenty DNA przyłączają się w odpowiednie (komplementarne) miejsca na chipie. Następnie niezwiązane fragmenty zostają odmyte. Uzyskiwany obraz (różne intensywności fluorescencji w różnych polach macierzy) odczytywany jest za pomocą lasera lub mikroskopu a następnie komputerowo analizowany. Dzięki miniaturyzacji możliwe jest jednoczesne badanie w próbce wielu genów, gdyż sondy umieszczane są w mikrometrowych odstępach. Macierze wykorzystywane są m.in. do badania sekwencji genów (genotypowania) lub badania ich ekspresji. Często zamiennie dla chipów DNA stosowane są nazwy takie jak: mikrosiatki DNA, mikroprocesory DNA, macierze DNA, gen chip, genom chip lub chipy DNA, z których ta ostatnia najczęściej jest spotykana. Biorąc pod uwagę to, jakie są możliwości prowadzenia badań z wykorzystaniem macierzy, najbardziej odpowiednia wydaje się nazwa genom chip, gdyż ona najlepiej oddaje działanie chipu, dzięki któremu można poznawać cały genom.

Ze względu na rodzaj sond, które umieszczane są na płytkach, wyróżnia się dwa typy chipów:

- **mikromacierze cDNA** (ang. DNA microarray), w których długość sondy to 500-5000 nukleotydów, a technologia ich została opracowana na uniwersytecie Stanford;
- **mikromacierze oligonukleotydowe**, nazywane chipami DNA (ang. DNA chip), w których długość sond jest rzędu 20-80 nukleotydów. Tego typu macierze zostały opracowane przez firmę Affymetrics.

Oba typy macierzy różnią się nie tylko długością sond, ale również gęstością ich upakowania na powierzchni, co jest konsekwencją stosowania różnych technologii podczas przygotowywania macierzy. Gęstość rozmieszczenia sond jest zdecydowanie większa w przypadku macierzy oligonukleotydowych (ok. 1 000 000 sond na powierzchni 1,6 cm², gdzie rozmiar pola zajmowanego przez pojedynczą sondę wynosi ok. 11µm). Dzięki temu przy wykorzystaniu takiej mikromacierzy możliwe jest wyznaczenie poziomu ekspresji nawet

do kilkudziesięciu tysięcy genów jednocześnie, dokładnie tyle ile reprezentujących je sond naniesiono na podłoże. W przypadku mikromacierzy cDNA zsyntezowane wcześniej sondy (w wyniku powielenia wybranych fragmentów genów z wykorzystaniem techniki PCR), umieszczane są na podłożu z wykorzystaniem specjalnych urządzeń. Zwykle wykorzystywane są do tego mikropipety (sposób kontaktowy) lub w przypadku metody bezkontaktowej np. piezoelektrycznie poprzez zastosowanie techniki analogicznej do tej stosowanej w drukarkach atramentowych. Sondy oligonukleotydowe otrzymuje się na podłożu w wyniku syntezy zaprojektowanego fragmentu łańcucha (rys. 12.9.). Synteza prowadzona przy wykorzystaniu techniki fotolitograficznej bezpośrednio na płytce – synteza *in situ*. Specjalny sposób wytwarzania takiego chipu prowadzi do otrzymania ściśle określonych sekwencji (sekwencji charakterystycznych dla określonych genów). Po odpowiedniej modyfikacji szklanego podłoża, w celu wytworzenia grup hydroksyalkilowych, prowadzona jest synteza podczas której dołączane są linkery chronione przez fotolabilne struktury. Poprzez naświetlenie wybranych obszarów powierzchni płytki, następuje usunięcie z nich grup ochronnych, dzięki czemu w kolejnym etapie będą mogły w tych miejscach przyłączyć się odpowiednie monomery. W ten prosty sposób zasięg reakcji ograniczany jest tylko do wybranych miejsc – tych na które pada światło, zazwyczaj jest to światło ultrafioletowe. Kilkudziesięciokrotne powtórzenie cyklu fotodeprotekcji i dołączenia nukleotydów prowadzi do wytworzenia sond na podłożu.

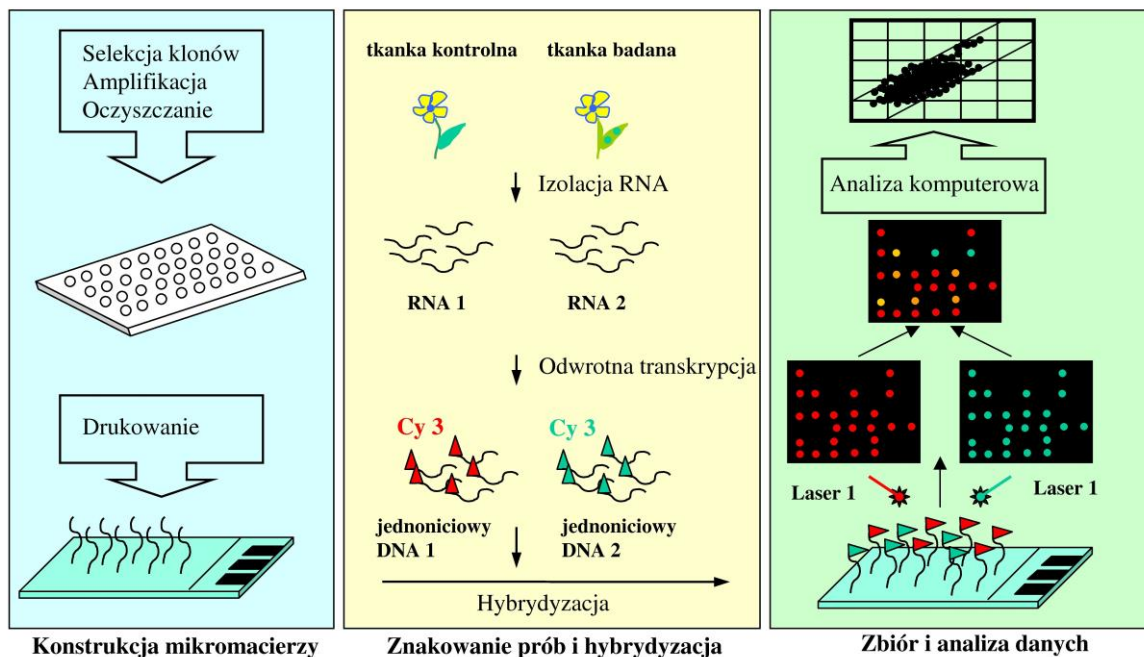


Rys. 12.9. Synteza *in situ* sond oligonukleotydowych typu GeneChip Affymetrix

Badanie z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA, jak i tych oligonukleotydowych, obejmuje etapy takie jak:

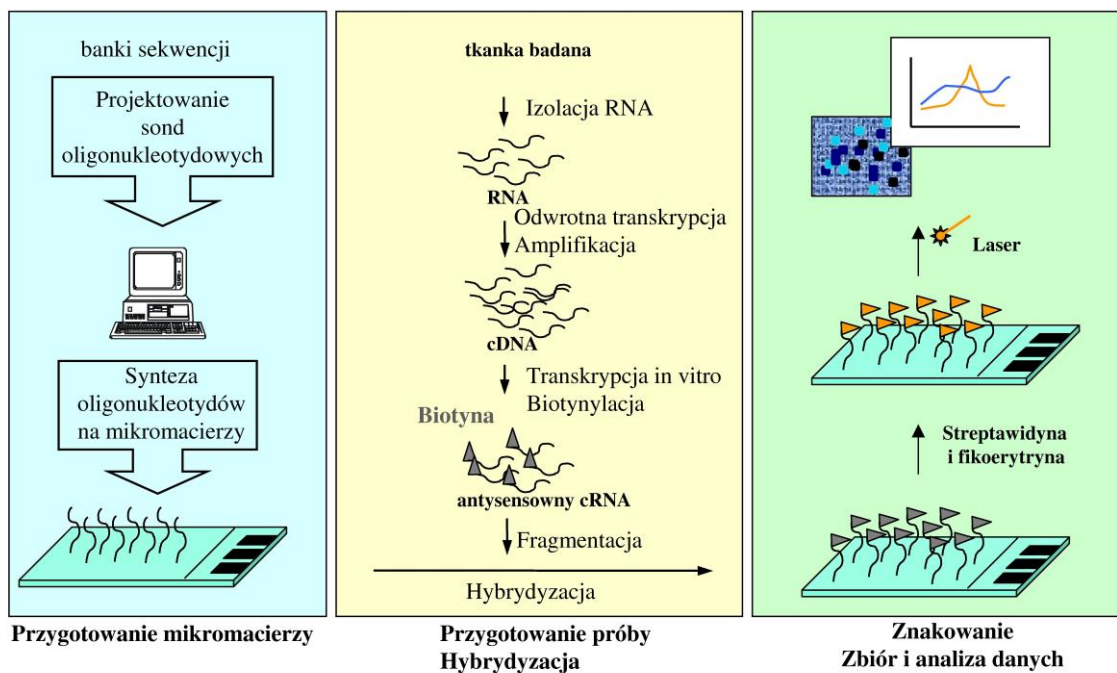
- a) przygotowanie sond DNA i umieszczenie ich na powierzchni podłoża (dotyczy sond cDNA)
- b) wyizolowanie i znakowanie próbki z materiału biologicznego
- c) hybrydyzacja próbki z sondami umieszczonymi na matrycy
- d) skanowanie obrazu mikromacierzy i analiza otrzymanych wyników.

Istnieją jednak pewne różnice związane ze stosowaniem obu rodzaju macierzy, o wyborze odpowiedniego z nich decyduje cel i obiekt prowadzonych badań. I tak macierze cDNA wykorzystywane są do określania intensywności ekspresji genów (poziomu ich aktywności) Są to badania porównawcze, tzn. uzyskiwany wynik analizowany jest w stosunku do próbki odniesienia, co pozwala na różnicowanie badanego materiału na ten pochodzący ze zdrowej bądź chorej tkanki/organizmu. Przy wykorzystaniu tego rodzaju mikromacierzy określa się również jakie geny występują w badanych fragmentach DNA. przebieg eksperymentu z wykorzystaniem takiej mikromacierzy przedstawiono schematycznie na rys. 12.10. Pierwszym etapem jest przygotowanie próbki czyli wydzielenie z komórek mRNA. Następnie RNA podczas odwrotnej transkrypcji zostaje przepisany na komplementarny i bardziej stabilny DNA (cDNA). W czasie tego procesu do powstających cząsteczek DNA włączane są znakowane nukleotydy. Jest to wykonywane przy użyciu barwników fluorescencyjnych, z których najczęściej stosowana jest para fluoroforów: Cyanine-3 (Cy-3) i Cyanine-5 (Cy-5)). Poprzez znakowanie dwóch różnych prób (zwykle zmienionej chorobowo i zdrowej) w pojedynczym eksperymencie określana i porównywana jest ekspresja genów w próbce kontrolnej i eksperymentalnej. Próbki umieszczone zostają na mikromacierzy, gdzie zachodzi hybrydyzacja cDNA z sondami. Intensywność sygnału emitowana przez każdą z prób jest zliczana niezależnie, gdyż widma emisji barwników praktycznie nie pokrywają się ze sobą.



Rys. 12.10. Schemat przebiegu eksperymentu z wykorzystaniem macierzy cDNA

Na rys. 12.11. przedstawiony został przykład eksperymentu prowadzonego z wykorzystaniem macierzy oligonukleotydowej. Wyizolowany z materiału biologicznego RNA przepisywany jest na cDNA, który stanowi matrycę do transkrypcji *in vitro*. Podczas niej, do tworzącego się cRNA, dołączana jest biotyna. W kolejnym etapie biotynylowany cDNA znakowany jest fluorescencyjnie (fikoerytryna) przy użyciu streptawidyny. Po hybrydyzacji próbki z mikromacierzą chip jest odmywany a obraz uzyskiwany w wyniku różnej fluorescencji poszczególnych pól jest skanowany i analizowany. Położenie pól i ich intensywność dostarczają informacji o genach badanych komórek. Podczas eksperymentu prowadzonego z tym rodzajem macierzy można stwierdzić jakie geny są obecne w próbce lub określić kolejność zasad w niezsekwencjonowanych fragmentach DNA.



Rys. 12.11 Schemat przebiegu eksperymentu z wykorzystaniem macierzy cDNA

W przypadku stosowania obu mikromacierzy ważne jest aby zadbać o odpowiednie warunki podczas hybrydyzacji. Przebiega ona podczas kilkunastogodzinnej inkubacji w odpowiedniej komorze zapewniającej równomierny dostęp próbki do całej powierzchni mikromacierzy. Po wzbudzeniu znaczników fluorescencyjnych źródłem światła o odpowiedniej długości (laser) dane zbierane są z wykorzystaniem czytnika konfokalnego. Intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości cząsteczek zhybrydowanych do danego elementu mikromacierzy. Dla macierzy oligonukleotydowych analiza polega na porównaniu intensywności fluorescencji w obrębie każdej pary sond oraz zebranie wyników otrzymanych dla wszystkich sond, które reprezentują dany gen. Dzięki temu, można określić obecność i brak ekspresji genu, jak również porównać poziomy ekspresji wielu genów. Natomiast w przypadku mikromacierzy cDNA otrzymuje się dwa obrazy, tzn. niezależnie zbierane są sygnały pochodzące od dwóch barwników (różne barwniki dla próby eksperymentalnej i odniesienia). Obrazy te mogą zostać na siebie nałożone i porównywane mogą być intensywności sygnałów poszczególnych genów. Należy tutaj wspomnieć o tym, że główna zaleta mikromacierzy, jaką jest możliwość uzyskiwana bardzo dużej liczby danych, stanowi równocześnie problem polegający na skomplikowanej ich analizie.

Rynek mikromacierzy, zarówno tych do badania DNA jak i macierzy białkowych jest duży. Wśród wielu firm wiodące miejsca zajmują m.in.: Affymetrics, Agilent Technologies,

Nanogen, PerkinElmer, Axon Instruments czy też Biosite Diagnostic i Biacore International w przypadku macierzy białkowych.

12.7. MIKROMACIERZE A DIAGNOSTYKA I LECZENIE

Ze względu na swe liczne zalety mikromacierze cieszą się rosnącym zainteresowaniem. Wynika to z usprawnienia prowadzonych badań dzięki temu, że możliwe jest wykonywanie do kilkudziesięciu tysięcy analiz równocześnie z wykorzystaniem pojedynczego chipu. Istotne wydaje się być ich zastosowanie w diagnostyce a także leczeniu chorób, to właśnie dzięki nim możliwe będzie precyzyjne i szybsze diagnozowanie chorób, badanie ich przyczyn i mechanizmów powstawania, jak również wybór najwłaściwszej metody leczenia. Wykorzystując mikromacierze będzie można opracowywać specyficzne lekarstwa w schorzeniach będących wynikiem zmian genetycznych. To właśnie w tego typu analizach widzi się możliwość znalezienia lekarstw w takich chorobach jak: AIDS, choroba Alzheimer'a, nowotwory. Ich użyteczność została już potwierdzona w badaniach klinicznych, których celem było przewidywanie skutków choroby nowotworowej u pacjentów poddawanych określonej terapii. Są już komercyjnie dostępne chipy m.in. do analiz sekwencji wirusa HIV czy też do analizy mutacji w genie p53 (który kontroluje prawidłowe podziały komórek i pozwala określić predyspozycje do nowotworów). I mimo, że koszt zakupu pojedynczego chipu diagnostycznego w AIDS to koszt rzędu względnie niski bo wynoszący kilkadziesiąt dolarów, to zakup urządzenia do odczytu i interpretacji danych to ponad 100 tysięcy dolarów. Ponadto dzięki chipom DNA możliwe jest jednoznaczne wskazanie choroby, w wyniku określenia ekspresji genów. Przykładem takim może być rozpoznawanie różnych odmian nowotworów - ostrej białaczki limfatycznej od ostrej białaczki szpikowej, które nie jest możliwe przy wykorzystaniu metod zwykle stosowanych w diagnostyce. Jak wiadomo brak właściwego rozpoznania to w konsekwencji niemożliwość podjęcia niewłaściwego leczenia, co wydaje się niezwykle istotne ze względu na zupełnie inne leczenie, które stosowane jest w tych dwóch przypadkach. Miniaturowe macierze usprawnią badania toksykologiczne jak również będą dogodnym narzędziem w badaniach nad ewolucją gatunków. Badania z ich wykorzystaniem pozwolą na mapowanie genów i określenie rzeczywistej ich funkcji.

Podziękowania

Autor pracy Ilona Grabowska jest stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu START (Stypendium Krajowe dla Młodych Uczonych edycja 2008).

LITERATURA

- [1] P. Berg, M. Singer, Język genów poznawanie zasad dziedziczenia, Prószyński i S-ka, Warszawa 1997.
- [2] Seung-yong Seong, Cheol-young Choi, Current status of protein chip development in terms of fabrication and application, *Proteomics* 2003, 3, 2176–2189
- [3] G. A. Marko-Varga, J. Nillson, T. Laurell, „New directions of miniaturization within the biomarker research area”, *Electrophoresis*, (2004), 25, 3479-3491

