

БИОЛОГИЯ

УДК 616-076:577.21

ТЕХНОЛОГИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ

© 2012 г. В.Б. Бородулин¹, О.В. Шевченко¹, А.А. Свистунов², Н.В. Железинская³, И.А. Горошинская⁴, А.В. Саратцев², Е.Н. Бычков¹, Ю.Б. Барыльник¹, Е.В. Колесниченко¹, Ю.С. Абросимова¹, Е.В. Бобылева¹

¹Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского,
ул. Б. Казачья, 112, г. Саратов, 410012,
meduniv@sgmu.ru

¹V.I. Razumovsky Saratov State Medical University,
Bolshaya Kazachya St., 112, Saratov, 410012,
meduniv@sgmu.ru

²Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова,
ул. Трубецкая, 8, стр. 2, г. Москва, 119991

²I.M. Secheno First Moscow State Medical University,
Trubetskaya St., 8-2, Moscow, 119991

³Главный клинический госпиталь МВД РФ,
ул. Народного Ополчения, 35, г. Москва, 123063

³Main Clinical Hospital of Ministry of Internal Affairs
of Russian Federation
Narodnogo Opolchenija St., 35, Moscow, 123063

⁴Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
ул. 14-я линия, 63, г. Ростов-на-Дону, 344037,
rnioi@list.ru

⁴Rostov Research Cancer Institute,
14-th line, 63, Rostov-on-Don, 344037,
rnioi@list.ru

Молекулярная генетика за последние 20 лет заняла лидирующее место среди всех биологических и медицинских наук. В настоящее время определена структура генома человека, многих животных и растений, открыты тысячи генов, устанавливается их функциональное значение и роль при различных мультифакториальных и онкологических заболеваниях, изучены молекулярные механизмы действия различных ферментов. Однако рутинное использование современных диагностических методик с целью индивидуального генетического анализа пациента не всегда возможно. Это диктует необходимость создания высокоинформативных доступных методик, позволяющих проводить многопараметрическую молекулярную диагностику на качественно новом уровне. В настоящем обзоре описаны основные элементы технологии изготовления ДНК-биочипов, принцип их действия, главные типы биочипов и области их применения.

Ключевые слова: ДНК-биочипы, секвенирование, гибридизация.

Molecular genetics in the past 20 years has taken a leading place among all biological and medical sciences. At present, the structure of the human genome, as well as of many animals and plants ones are determined, thousands of genes are discovered, their functional significance and role in various multifactorial diseases and cancers are established, the molecular mechanisms of action of various enzymes are determined. However, routine use of modern diagnostic methods to individual genetic analysis of the patient is not always possible. This necessitates the creation of high informatics available techniques that allow for multi-parameter molecular diagnostics to a new level. This review describes the basic elements of manufacturing technology of biochips, the principle of their action, the major types of biochips and their applications.

Keywords: DNA biochips, sequencing, hybridization.

Появление в конце XX в. ДНК-чипов стало новой биотехнологической революцией, стоящей по значимости в одном ряду с расшифровкой структуры ДНК в 50-е гг. и исследованием фундаментальных закономерностей молекулярной генетики в 60-е. Интенсивное развитие технологий гибридизации и амплификации нуклеиновых кислот на рубеже 70 – 80-х гг. XX в. ознаменовало новую эпоху в молекулярной биологии и позволило раскрыть природу многих наследственных заболеваний, проанализировать структуру и функцию большого числа генов человека. В настоящее время эти подходы получили широкое распространение не только в научно-исследовательской работе, но и в клинической медицине.

Поистине революционной для развития всей молекулярной биологии стала разработка К. Мюллисом метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в 1983 г. Первые сообщения по практическому применению метода появились в 1985 г. С тех пор количество публикаций, в которых ПЦР используется в качестве од-

ного из основных методов исследования, занимает одно из первых мест наряду с работами, в которых применяются автоматическое определение нуклеотидной последовательности нуклеиновых кислот (секвенирование) и методы их гибридизации [1].

Отсчет истории создания технологии ДНК-чипа следует вести с 1985 г., когда была принята программа Human Genome Project, целью которой явилось секвенирование генома человека. Human Genome Project стал самым широкомасштабным биотехнологическим проектом, осуществление которого способствовало настоящему биотехнологическому взрыву. В 1987 г. сотрудники Центра генетической инженерии в Белграде R. Drganac (Дрманак) и R.V. Crkvenjakov (Крквенжаков) запатентовали способ секвенирования гибридизацией, альтернативный традиционному, предложенному Ф. Сэнгером еще в 1975 г. [2]. Практически одновременно с учеными из Белграда русские ученые опубликовали статью с изложением этого метода [3]. Авторы предложили новый метод секвенирования ДНК,

основанный на гибридизации секвенированного фрагмента с набором всех возможных олигонуклеотидов определенной длины. Работа имела теоретический характер, этот подход в том виде, каком предлагали его авторы, никогда не был реализован практически. Но все же данную публикацию можно считать первой работой, положившей начало истории ДНК-чипов. Эти работы ставили перед учеными новую цель – секвенирование на одном чипе большого количества генетической информации. Новый этап создания эффективных технологий для детекции полиморфизма (мутационного анализа) начался в 1996 г. Он основан на синтезе с помощью фотолитографии чипов с олигонуклеотидами, специфическими для конкретной исследуемой последовательности. Этот метод позволяет анализировать более длинные последовательности. Но существенным его недостатком является неспособность определять все возможные полиморфизмы. Провал подхода становится очевидным в последние годы, когда такие исследования стали применяться, например, для детекции резистентности ВИЧ к противовирусным лекарственным препаратам [4].

Перспективным направлением технологии ДНК-чипов стал мониторинг генной экспрессии. Именно секвенирование с больших объемов с-DNA последовательностей в виде библиотек expressed sequence tags (EST) различных организмов и даже целых геномов поставило перед исследователями задачу определения функционального значения полученной генетической информации. Это направление получило название функциональной геномики. Стало возможным определять функциональное значение генов. Важное значение это приобрело при изучении патогенетических основ различных заболеваний. Ученые сравнивали экспрессию генов в больных и здоровых тканях и выявляли гены, экспрессия которых изменяется при возникновении заболевания, из чего следует, что эти гены участвуют в его патогенезе. На основании этого стало возможным разрабатывать препараты для лечения этих заболеваний. Но появление функциональной геномики потребовало открытия метода анализа генной экспрессии. Теоретической основой нового подхода явилось обнаруженное еще в начале 50-х гг. Уотсоном и Криком явление комплементарности нуклеотидных оснований. Впервые это уникальное свойство полинуклеотидов было использовано Саузерном еще за 20 лет до появления подобного типа чипов. Он применял олигонуклеотидные пробы для идентификации комплементарных им последовательностей, разделенных при помощи гель-электрофореза [5]. Это качество, дающее возможность идентифицировать исследуемую последовательность на основании последовательности гибридизировавшейся с ней пробы, легло в основу создания ДНК-чипов. Суть метода состоит в том, что пробы иммобилизованы на плоскости и каждой из них соответствует определенная локализация. Технология описана М. Schena в 1995 г. [6].

Самым новым направлением в развитии современной фундаментальной и прикладной медико-биологической науки стало появление во 2-й половине 90-х гг. биологических микрочипов. Метод позволяет проводить реакцию в микрообъемах, использовать сравнительно небольшие количества исходного материала, осуществ-

лять многопараметрический анализ множества генов (белков и других субстанций) у одного и того же объекта одновременно. В зависимости от природы иммобилизуемых зондов выделяют 4 основных вида биочипов: ДНК-чипы, РНК-чипы, белковые и клеточные микрочипы. В настоящее время наибольшее распространение в исследовательской и клинической практике получили ДНК-чипы (рис. 1) [7, 8].

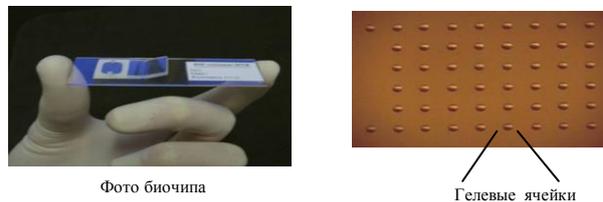


Рис. 1. Биологический микрочип

ДНК-чип представляет собой компактный планшет, содержащий набор зондов, иммобилизованных на плоской поверхности нейлоновых мембран (макроскопические матрицы) на стекле (микроскопические матрицы), либо синтезируемых *in situ* на твердой фазе (стекло, пластик, силикон). В последние годы микрочипы превратились в целое направление биологической науки: десятки фирм предлагают биологические микрочипы, содержащие массивы из тысячи и более зондов [9, 10].

Технологии разработки и изготовления разных типов ДНК-чипов различаются процедурами гибридизации и системами детекции [11].

Гибридизация – наиважнейший этап операций на ДНК-чипах. От её эффективности и специфичности в огромной мере зависит результат исследований. Низкая эффективность гибридизации обусловлена тем, что взаимодействие иммобилизованного образца и комплементарной ему исследуемой ДНК-последовательности осуществляется только на поверхности чипа, в тонком слое, где иммобилизована ДНК. Объем этого слоя по сравнению с остальным объемом ячейки крайне мал, поэтому лишь небольшая часть молекул ДНК исследуемого субстрата оказывается в ней в каждый момент времени. С целью ускорения процесса гибридизации применяется несколько способов, простейшим из которых является увеличение поверхности взаимодействия иммобилизованной пробы с субстратом путем иммобилизации ее в геле. Способ реализован в биочипах с иммобилизованными в полиакриламидном геле зондами (методика разработана в институте молекулярной биологии (ИМБ) им. Энгельгардта РАН, г. Москва). Зондами могут служить олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белки, рецепторы антител и др. Иммобилизация зондов в геле осуществляется за счет образования ковалентных связей при облучении ультрафиолетовым излучением или с использованием химических реагентов. Анализируемые молекулы в растворе метятся с помощью флуоресцентной или радиоактивной метки [12]. Процесс гибридизации в гелевых микрочипах происходит в результате диффузии анализируемых молекул из раствора в ячейку и последующего образования комплексов. Так как процесс диффузии протекает достаточно медленно, для ускорения кинетики гибридизации используют электрическое поле или стимулируют гидродинамические

потоки с помощью перистальтического насоса, поверхностных акустических волн.

Детекция результатов гибридизации заключается в распознавании тех ячеек чипа, где произошла гибридизация иммобилизованной на поверхности чипа ДНК-пробы и анализируемой ДНК-последовательности. Определение ячеек чипа, в которых произошла гибридизация, заключается в установлении наличия в ячейке анализируемой ДНК. Очевидно, что для этого анализируемая ДНК должна быть меченой. Именно в типе используемой метки и заключается различие методов, используемых для детекции результатов. По конечному этапу детекции микрочипы разделяют на 2 основных типа – гибридизационные и ферментативные. В свою очередь гибридизационные подразделяются на варианты в зависимости от способа считывания сигнала: флуоресцентные («Affymetrix», «Биочип» и т.д.) и электронные («Nanogen»). На флуоресцентных в качестве генератора флуоресцентного сигнала могут использоваться красители (наиболее распространены Су3 и Су5), непосредственно присоединённые к изучаемой последовательности [12]. Для сравнительной оценки обычно используется двухцветная детекция, при которой анализируемая ДНК и тест-ДНК метятся разными красителями. Интенсивность флуоресценции из ячеек измеряется с помощью сканера или люминесцентного микроскопа (разработка ИМБ РАН).

Одна из крупнейших фирм по производству биочипов – «Affymetrix» – производит биочипы таким же способом, как и электронные чипы (находится эта фирма в Силиконовой долине, в Калифорнии). Чипы Affymetrix наращиваются из стеклянной пластинки методом фотолитографии с использованием специальных масок. На одном подобном чипе помещены десятки тысяч пятен размером в несколько микрон, каждое из которых – уникальный фрагмент ДНК длиной в десятки нуклеотидов.

В зависимости от этапа дискриминации мутаций в процессе подготовки пробы выделяют «Applied

Biosystems», «Affymetrix» (до момента гибридизации) и «Биочип» (в процессе гибридизации проб). Для примера проиллюстрируем гибридизационные методы анализа мутаций, используемые фирмами «Affymetrix» и «Биочип».

Технология «Affymetrix» предполагает применение так называемых специальных проб, которые состоят из нескольких фрагментов: H1 и H2 – специфичных для анализируемой последовательности ДНК; P1 и P2 – являющихся универсальными праймерами; tag-последовательности – специфической метки для выявления определенного SNP (Single nucleotide pair – единичная пара нуклеотидов) при гибридизации на микрочипе (рис. 2). Детекция мутаций происходит следующим образом: в исследуемый образец, содержащий одноцепочечную ДНК с искомой мутацией, добавляют специальную пробу. Проба комплементарно гибридизуется с последовательностью ДНК анализируемого образца (фрагментами H1 и H2) (рис. 2а). Далее добавляют термостабильную ДНК-полимеразу и 4 разных нуклеозидтрифосфата (используют соответственно 4 пробирки). ДНК-полимераза достраивает 3-й конец пробы H1 на одно основание, соответствующее вариабельной позиции (рис. 2б). Затем проводят лигазную реакцию, при которой происходит соединение 5-го конца встроенного основания с 3-м концом пробы H2 (рис. 2в). На следующей стадии (рис. 2г) экзонуклеаза разрушает оставшуюся ДНК исходного образца. С целью дальнейшей амплификации кольцевую молекулу пробы разрезают клеазой (рис. 2д). Амплификацию проводят с использованием универсальных праймеров P1 и P2 (рис. 2е). Далее пробы гибридизуют с микрочипом. Специфичность гибридизации достигается за счет специально сконструированного tag-фрагмента (что является одним из «ноу-хау» «Affymetrix» наряду с последовательностями универсальных праймеров).

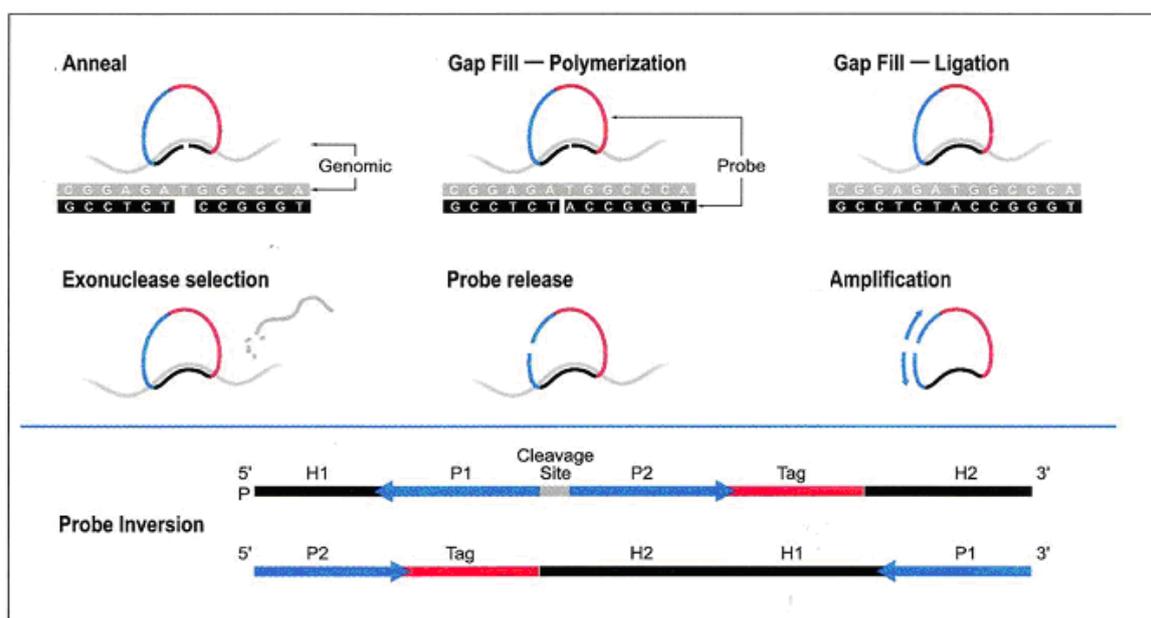


Рис. 2. Метод подготовки проб для анализа однонуклеотидных мутаций фирмы «Affymetrix»

Таким образом, можно однозначно выявлять до 1000 и более SNPs в исследуемом образце. Точность метода при анализе 1000 SNPs составляет около 90 %.

Разработанная в ИМБ РАН (фирма «Биочип») технология анализа генетического полиморфизма предполагает предварительную мультиплексную амплификацию исследуемых фрагментов ДНК с использованием флуоресцентно меченых праймеров. В результате добавления избытка меченого праймера и за счет проведения 2 раундов ПЦР достигается образование большого количества преимущественно меченого одноцепочечного продукта, который добавляют на биочип, где происходит его гибридизация с иммобилизованными в геле олигонуклеотидными зондами (рис. 3). Если последовательность анализируемой ДНК полностью комплементарна последовательности зонда, то образуется стабильный дуплекс (детектируют сигнал флуоресценции). Если искомого фрагмента нет, или же в нем находится некомплементарное основание, то стабильного дуплекса не образуется (сигнала флуоресценции нет). Данный метод позволяет анализировать до 50 полиморфных вариантов с точностью более 99 %.

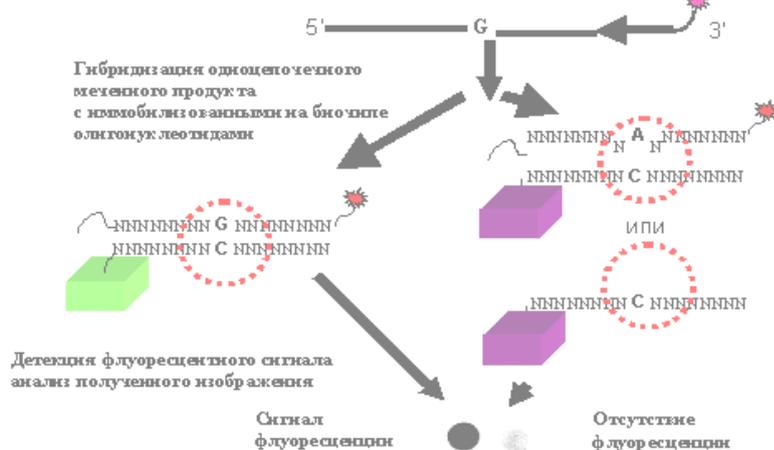


Рис. 3. Метод анализа мутаций на основе аллель-специфичной гибридизации, разработанный в ИМБ РАН

Предложен метод ПЦР на биочипах, позволяющий проводить мультиплексную, но независимую амплификацию участков генома внутри каждой ячейки с последующей детекцией полиморфных вариантов [13]. Праймеры для ПЦР-реакции предварительно иммобилизуют внутри гелевой ячейки в процессе ее полимеризации. Все остальные компоненты реакции, включая ферменты и амплифицируемые фрагменты ДНК, попадают внутри ячейки благодаря диффузии. Затем с помощью специальной ферментативной реакции, проводимой в ячейках, покрытых слоем минерального масла, праймеры отсоединяются от геля. При этом и праймеры, и продукты амплификации остаются внутри индивидуальных ячеек. Дополнительные, не используемые на 1-й стадии праймеры могут быть иммобилизованы в геле, но активированы только на 2-й стадии для проведения 2-го раунда ПЦР. Этот подход мультиплексной ПЦР на чипе также успешно использован для выявления в различных участках генома *M. tuberculosis* мутаций в различных генах,

определяющих устойчивость к рифампицину, стрептомицину и изониазиду [14–16].

Развитие технологии биочипов привело к созданию не только исследовательских, но и к развитию диагностических вариантов тест-систем. Причем в последнее время большинство фирм и научно-исследовательских групп стали переходить от так называемых биочипов высокой плотности (high density) к биочипам низкой плотности (low density). Особый интерес в связи с этим представляют биочипы для анализа полиморфизма сравнительно небольшого числа генов (от 10 до 100), так как для многих медицинских задач имеет значение не столько число проанализированных локусов, сколько высокая точность и специфичность их определения. Важной особенностью однонуклеотидных замен является их ассоциация с рядом наследственных заболеваний, развитие которых ассоциировано с наличием определенных вариантов полиморфизма не одного, а нескольких генов. Большое внимание исследователи и фирмы уделяют сейчас созданию биочипов для анализа полиморфизма генов метаболизма [17, 18]. С массовым внедрением таких биочипов значительно повышается не только точность и скорость анализа, но и увеличиваются возможности изучения значительного числа факторов, влияющих на предрасположенность к различным мультифакториальным заболеваниям: артериальной гипертензии, бронхиальной астме, остеопорозу и др.

На основе биочипов разработан метод ранней диагностики и типирования онкологических заболеваний. В частности, показана связь некоторых хромосомных перестроек с риском развития лейкозов у детей и зависимость метаболизма лекарственных препаратов, назначаемых при лейкозах, от полиморфизма в генах системы биотрансформации [19]. Кроме того, в ИМБ РАН разработаны биочипы для обнаружения возбудителей оспы, сибирской язвы, чумы, разных субтипов вируса гриппа типа А (в том числе вируса птичьего гриппа H5N1), а также типирования вируса гепатита С [20–22].

Возможности технологии ДНК-биочипов чрезвычайно велики. Проведение многопараметрического анализа биологического образца позволяет охватить многие области современной медицины. В настоящее время исследователи пытаются интегрировать в единую схему все стадии проведения анализа, включая обработку биологического образца, выделение нуклеиновых кислот, амплификацию специфических мишеней непосредственно на биочипе с количественной идентификацией в режиме реального времени. Подобные «лаборатории на чипе» дадут возможность повысить качество лабораторной диагностики, уменьшить вероятность заражения медперсонала потенциальным инфекционным материалом и снизить количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Литература

1. Грядунов Д.А. Разработка методов полимеразной цепной реакции на олигонуклеотидных микрочипах для видовой идентификации микроорганизмов и определения их лекарственной устойчивости: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2002. 20 с.
2. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method / R. Drmanac [et al.] // *Genomic*. 1989. № 4. P. 114.
3. Определение нуклеотидной последовательности ДНК / Ю.П. Лысов [и др.] // *Докл. АН СССР*. 1988. № 303(6). С. 1508–1511.
4. Performance of the Affymetrix genechip HIV PRT 440 Platform for antiretroviral drug resistance genotyping of human immunodeficiency virus type 1 clades and viral isolates with length polymorphisms / M. Vahey [et al.] // *J. Clinical Microbiology*. 1999. № 37. P. 2533–2537.
5. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* 1975. № 98(3). P. 503–517.
6. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray / M. Schena [et al.] // *Science*. 1995. № 270. P. 467–470.
7. Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы / А.М. Колчинский [и др.] // *Мол. биол.* 2004. № 38. С. 5–16.
8. Evaluation of a microarray for genotyping polymorphisms related to xenobiotic metabolism and DNA repair / S. Landi [et al.] // *Biotechniques*. 2003. № 35(4). P. 816–820, 822, 824–827.
9. Whitcombe D., Newtown C.R. Advances in approaches to DNA-based diagnostics // *Current Opinion in Biotechnology*. 1998. № 9(6). P. 602–608.
10. Analysing genetic information with DNA arrays / S.C. Case-Green [et al.] // *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998. № 2(3). P. 404–410.
11. Gerold D., Rushmore T., Caskey C.T. DNA chips: promising toys have become powerful tools // *Trends. Biochem. Sci.* 1999. № 24. P. 168–173.
12. Новые индодикарбоцианиновые красители для технологии биологических микрочипов / В.Е. Кузнецова [и др.] // *Биоорганическая химия*. 2008. № 34 (1). С. 141–144.
13. Tillib S.V., Mirzabekov A.D. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology // *Current Opinion Biotechnol.* 2001. № 12 (1). P. 53–58.
14. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах / О.В. Антонова [и др.] // *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2008. № 1. С. 115–120.
15. Evaluation of hybridization on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / D. Gryadunov [et al.] // *Clinical microbiology and infection*. 2005. № 11. P. 531–539.
16. Руководство по выявлению микобактерий туберкулеза и определению лекарственной чувствительности с использованием биологических микрочипов / И.М. Сон [и др.]. М., 2009. 56 с.
17. Rapid detection of the known SNPs of CYP2D6 using oligonucleotide microarray / S.Y. Wen [et al.] // *World J. Gastroenterol.* 2003. № 9 (6). P. 1342–1346.
18. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / А.С. Глогов [и др.] // *Молекулярная биология*. 2005. № 39 (3). С. 403–412.
19. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in adult Russian patients / O. Gra [et al.] // *American J. of Hematology*. 2008. № 83(4). P. 279–287.
20. Method for identifying the genotype and subtype of Hepatitis C virus on a biological microchip. Patent WO/2009/022939 (PCT/RU2007/000438), published 19.02.2009, priority from 09.08.2007 / D. Gryadunov [et al.].
21. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus / E. Fesenko [et al.] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2007. № 1 (3). P. 121–129.
22. DNA microarrays in the clinic: infectious diseases / V. Mikhailovich [et al.] // *Bioessays*. 2008. № 30 (7). P. 673–682.