

Д. Трифонов,
компания
«Lab Next Inc.»



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

Биочип не для внутреннего применения

Для одновременного определения уровня экспрессии множества генов примерно двадцать лет назад были разработаны миниатюрные устройства нового типа. Специалисты используют для их обозначения два термина: «биочип» и «микроэррей» (транслитерация английских слов «biochip» и «microarray»). В России в основном применяют первое название. Его я и буду применять, хотя в англоязычной литературе преобладает второе.

Слово «биочип» знакомо и людям, не занимающимся молекулярной биологией, но связанный с ним образ навеян техническими разработками совсем в другой области или вообще научной фантастикой. Чаще всего биочип ассоциируется с миниатюрным устройством, которое встраивают в тело человека, чтобы изучать его либо воздействовать на какие-то физиологические процессы. Те биочипы, о которых пойдет речь, в организм не вживляются и никоим образом не рассчитаны на непосредственный контакт с ним.

Биочипы возникли не на пустом месте. Они появились в результате слияния методов из разных областей науки и техники. В их основе лежит реакция гибридизации, которая на протяжении десятилетий используется для различных целей, в основном для идентификации фрагментов ДНК и РНК, а также для картирования фрагментов ДНК (определения их места на хромосоме).

Одну из разновидностей реакции гибридизации предложил в 1975 году английский биолог Эдвин Саузерн из Эдинбургского университета, и его метод получил название саузерн-блоттинг, или реакция Саузерна — о ней речь пойдет дальше.

Для изготовления биочипов применяются устройства, похожие на плоттеры для рисования чертежей, а для анализа результатов — оптические сканеры, похожие на те, что используют для сканирования бумажных документов или фотографий. Надо ли говорить, что подобное оборудование, хоть оно и появилось сравнительно недавно, никак нельзя считать экзо-

Десять тысяч генов на пятачке

Гены, задающие программу развития любого организма, — это фрагменты молекулы ДНК. С них синтезируются матричные РНК (мРНК), или информационные РНК (иРНК), с которых, в свою очередь, — белки. Процесс перезаписи информации с генов на белок называется экспрессией генов. Он регулируется работой других генов и сигналами, приходящими в клетку извне, и благодаря такой регуляции с одного и того же гена может считываться больше или меньше белка, а иногда — разные белки.

Определив структуру всех генов организма, набор и количество его белков, способы регуляции их количества в зависимости от внешних условий, мы узнаем об организме очень многое.

Изменения структуры генов называются мутациями и нередко приводят к тяжелым последствиям. Так, ген под названием MYH7 отвечает за построение белка, обеспечивающего сокращение сердечной мышцы. Его мутации приводят к возникновению кардиомиопатии — заболевания, которое может вызывать неожиданные сердечные приступы у людей всех возрастов, без всяких предварительных симптомов. Раннее выявление мутаций в этом гене позволило бы предотвратить множество несчастных случаев, однако сейчас такая диагностика стоит слишком дорого, чтобы ее можно было использовать для всеобщего обследования населения.

Информация об изменениях экспрессии генов в организмах нужна в разных областях фундаментальной науки, медицины, фармацевтики, сельского хозяйства, биотехнологии. Но ее невозможно получить без метода, по-

могающего определить уровень экспрессии: с какой скоростью и в каком количестве синтезируется белок. Задача усложняется тем, что все процессы в организме определяются работой не одного, а многих генов — нескольких десятков, сотен или даже тысяч, экспрессирующихся одновременно или в определенной последовательности. Определять уровень их экспрессии немыслимо без прибора, умеющего делать это автоматически, ведь вручную трудно или невозможно провести столько измерений. Нужно еще учесть, что количество биологического материала для подобных экспериментов нередко весьма невелико. Если прибор не сможет работать с исключительно малыми объемами проб, он не найдет широкого применения.

Точно судить об уровне экспрессии следует по количеству белка, кодируемого данным геном. Однако этот показатель не всегда удается измерить, поскольку некоторых белков синтезируется крайне мало, а кроме того, не всегда известно, какой белок какому гену соответствует.

Поэтому о степени экспрессии гена судят косвенно, по количеству образующей с него мРНК — оно в целом отражает активность гена. Измерить количество информационных РНК тоже непросто. Сначала эти молекулы выделяют из клеток, затем с ними проводят реакцию обратной транскрипции. В ней образуются фрагменты ДНК с такой же последовательностью нуклеотидов, что и гены, с которых были синтезированы определяемые мРНК. Количество этих фрагментов ДНК пропорционально количеству исходных молекул мРНК.

тическим. Удачная компоновка этих элементов и несколько специализированных технических решений привели к появлению биочипов. Наша статья посвящена биочипам для работы с нуклеиновыми кислотами, но подобные устройства разработаны и для анализа белков.

Гибриды на подложке

Для идентификации генов — фрагментов ДНК — используются свойства этой молекулярной структуры. Во-первых, ДНК — это полимер, состоящий из нуклеотидов четырех типов: аденина, гуанина, тимина и цитозина (А, Г, Т и Ц). Во-вторых, нуклеотиды последовательно связаны друг с другом, образуя длинные нитевидные молекулы. Структура таких молекул записывается в виде последовательности букв — символов нуклеотидов, например АГТЦАТГЦЦАГ. Часто фрагменты ДНК называют просто последовательностями. В генах важен порядок расположения нуклеотидов — это и есть тот код, которым записана программа развития и строение организма.

Последовательность нуклеотидов в ДНК определяет другую последовательную структуру — белок, состоящий из аминокислот. Ген — это последовательность нуклеотидов в цепи ДНК, которая несет информацию для построения того или иного белка. Задача идентификации гена сводится к нахождению определенной последовательности нуклеотидов. Для этого используется еще одно важное свойство ДНК: она состоит из двух цепочек, соединенных между собой по всей длине. Образовав цепь, нуклеотиды сохраняют возможность устанавливать водородные связи с нуклеотидами из другой цепи. При этом А может связаться только с Т, а Ц — с Г, так что образуются пары А-Т и Ц-Г (их называют комплементарными). Фрагмент ДНК может быть, например, таким:

АГТЦАТГЦЦАГ
ТЦАГТАЦГГТЦ

При определенных условиях две цепи ДНК можно разделить. Для этого достаточно нагреть раствор с ДНК до некоторой температуры, после чего водородные связи между половинками распадутся и в растворе окажутся одноцепочечные фрагменты. Этот процесс называется денатурацией. Он обратим. При понижении температуры цепи вновь соединяются, причем в строгом соответствии с правилами образования комплементарных пар. Одноцепочечные фрагменты ДНК находят свои ответные (комплементарные) последовательности и связываются только с ними. К примеру, последовательность АГТЦ не сможет со-

единиться с последовательностью ГГТЦ, она будет искать свою ответную часть, ТЦАГ, и, найдя ее, образует структуру

АГТЦ
ТЦАГ

Так произойдет со всеми соответствующими последовательностями независимо от их длины. Фрагменты ДНК, не нашедшие ответных последовательностей, останутся в одноцепочечном состоянии. Процесс связывания двух одноцепочечных фрагментов ДНК вследствие нахождения комплементарных пар нуклеотидов называется гибридизацией. На этом эффекте и основана детекция фрагментов ДНК в биочипах и некоторых других методах. (См. статью С.Н.Щербо «Краски и золото гибридизации» в № 11 «Химии и жизни» за 1997 год.)

Связывание цепочек может произойти и при неполном совпадении, но прочность такого соединения существенно меньше, чем при полном совпадении. Этот эффект называется неспецифическим связыванием, и с ним борются различными способами.

А как можно обнаружить интересный нас ген в пробе, приготовленной из клеток исследуемого организма, где содержатся тысячи разнообразных последовательностей ДНК? Для этого следует закрепить на жесткой поверхности какой-либо подложки фрагменты искомого гена, достаточно длинные, чтобы избежать случайного связывания. Потом нужно поместить подложку в раствор, содержащий множество неизвестных нам фрагментов ДНК, и создать условия для их денатурации (рис. 1а). На подложке и в растворе цепочки разделяются и смогут связаться с другими, комплементарными им цепочками. Поскольку молекулы пробы подвижны, те из них, которые найдут свою ответную часть, свяжутся с ней и останутся прикрепленными к подложке (рис. 1б). А раствор с пробой

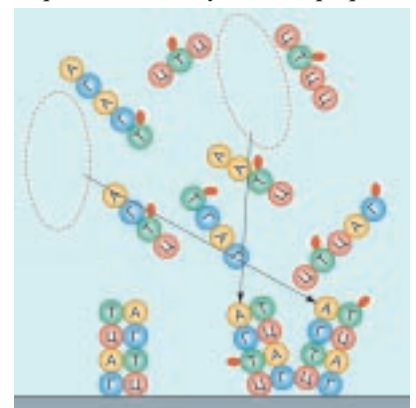
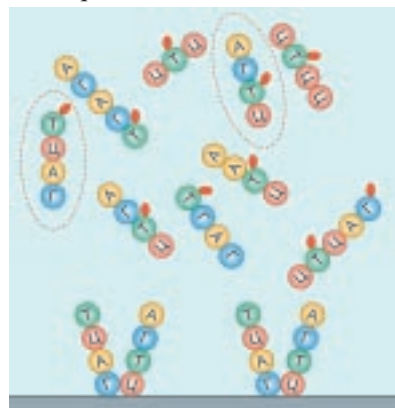
после этого удаляют вместе со всеми несвязавшимися фрагментами.

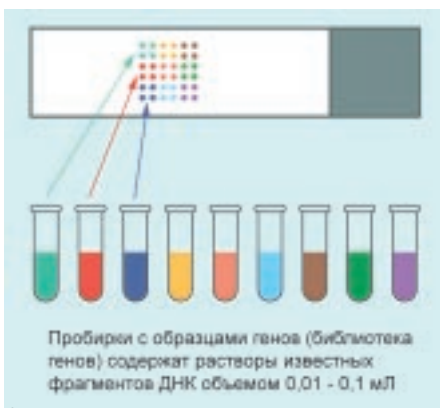
Как же заметить, что часть фрагментов ДНК из пробы нашла пары и осталась на подложке? Для этого во время обратной транскрипции (синтеза фрагментов ДНК, соответствующих мРНК клетки) в ДНК включаются нуклеотиды, меченные маркерами — молекулами, которые либо излучают свет, либо окрашены. Маркер остается на подложке, если помеченный им фрагмент связывается с ответным фрагментом ДНК. Остается только измерить, подают ли маркеры сигнал и насколько он интенсивен. Попросту говоря, зона подложки, на которой присутствуют молекулы из пробы, либо начинает светиться в том или ином диапазоне, либо приобретает определенный цвет. Для детекции создано множество устройств, от фотопленок до современных ПЗС (приборов с зарядовой связью).

Подобный эксперимент дает ответ на два вопроса: во-первых, есть ли в исследуемой пробе фрагмент ДНК, идентичный закрепленному на подложке, и, во-вторых, много ли его там. Серия таких экспериментов покажет, в каких случаях данного фрагмента ДНК в организме больше, в каких меньше. Количественная оценка содержания определенных фрагментов ДНК, как уже было сказано, позволяет судить о степени экспрессии соответствующего гена в организме.

Даже это упрощенное описание показывает, насколько такое измерение трудоемко. У биолога оно займет не менее двух дней. А ведь эксперимент нужно повторять, чтобы обеспечить необходимую точность! При такой производительности трудно в разумные сроки проанализировать экспрессию более чем дюжины генов. Есть, конечно, способы увеличить скорость измерений. Уже упоминавшийся Саузерн-блоттинг очень похож на только что описанный эксперимент и

1
Схема эксперимента по детекции в пробе определенного гена:
а — состояние до гибридизации. Молекулы ДНК находятся в денатурированном состоянии и способны связываться со своими ответными частями;
б — в результате гибридизации часть помеченных молекул из пробы перешла на поверхность подложки. Их наличие можно определить по излучению маркеров





Пробирки с образцами генов (библиотека генов) содержат растворы известных фрагментов ДНК объемом 0,01 - 0,1 мЛ

2
Схема формирования биочипа



3
Фотография биочипа.
На стеклянной подложке видны прямоугольные зоны, состоящие из тысяч микроскопических точек. Каждая точка — это место, где на подложке расположены фрагменты ДНК, соответствующие определенному гену

несколько более производительен. Так или иначе, все эти способы дают выигрыш в скорости в разы, а нужно ускориться в сотни и тысячи раз, особенно если речь идет о медицине. Только тогда можно будет за день-два провести анализ экспрессии сотен или тысячи генов, да еще и не один раз проверить результаты.

Когорты микропроб

Для ускорения анализа на подложке размещают не один, а сразу сотни или тысячи известных генов. Располагают их в определенном порядке, чтобы впоследствии по положению метки можно было определить, какой ген «попался». Обычно ДНК наносят на подложку в виде небольших точек, расположенных в форме прямоугольной сетки. Отсюда и произошло название «эррей» — массив, матрица, а слово «микро» отражает миниатюрность всей конструкции. Размер точек, содержащих тот или иной ген, измеряется десятными долями миллиметра, такого же порядка и расстояния между ними. При высокой плотности нанесения на одном квадратном сантиметре можно расположить несколько тысяч образцов различных генов. Размеры подложек составляют несколько квадратных сантиметров, чаще всего используются микроскопные стекла 25 x 75 мм. Их покрывают специальным составом, с которым ДНК может химически связаться. Биочип — это и есть небольших размеров подложка, на которую в строгом порядке нанесены образ-

цы различных фрагментов ДНК. К каждому биочипу прилагается аннотация — документ с информацией о том, какой ген в какой ячейке находится. Без нее биочип бесполезен.

Слово «микроэррей» в большей степени отражает суть предмета, его синоним в данном контексте — «биочип» — произошел, скорее всего, из-за аналогии с электронными чипами. И там и здесь на поверхности подложки формируется микроскопическая структура, в одном случае из атомов кремния, в другом из отрезков молекул ДНК. В обоих случаях эту операцию невозможно выполнить вручную.

При изготовлении биочипов специальный робот переносит растворы образцов ДНК из пробирок, где они хранятся, на подложки (рис. 4 и на стр.13). Инструменты, похожие на иглы, наносят на поверхность капельки объемом всего в несколько нанолитров. Они высыхают, и молекулы ДНК связываются с веществом, покрывающим поверхность подложки. Одновременно программа, управляющая роботом, создает файл аннотации, содержащий координаты всех находящихся на биочипе генов.

Описанный выше метод нанесения образцов называется контактным. Ту же процедуру можно выполнять и с помощью прибора, напоминающего струйный принтер. Принтер обстреливает бумагу микроскопическими каплями краски, а при изготовлении биочипа наносит капли раствора ДНК (это бесконтактная печать).

Метод, применяемый компанией «Affymetrix», основан на технологии фотолитографии, которую используют для производства многослойных печатных плат электронных устройств. Подложку биочипа покрывают слоем раствора одного гена, а затем слоем фоторезиста (материала, меняющего свойства при освещении, обычно ультрафиолетом). Затем фоторезист засвечивается и становится растворимым везде, кроме маленького участка

4
Робот для изготовления биочипов — микроэррейер



ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

5
Биочип компании «Affymetrix», содержащий треть человеческого генома.
Стеклянная подложка с точками ДНК (черный квадрат) закреплена в пластмассовой кассете

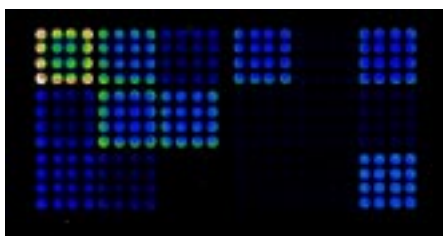


поверхности — точки, где ген останется на чипе. Все остальное смывается. Потом поверхность покрывается слоем раствора другого гена и еще раз слоем фоторезиста. Этот слой защищает другую точку на биочипе. И так много тысяч раз. Таким образом на поверхности под слоем фоторезиста закрепляются в разных точках разные гены. После этого уже весь фоторезист засвечивается и смывается, а точки с генами остаются открытыми для гибридизации.

Эта технология позволяет создавать биочипы самой большой плотности, где на одной подложке расположены десятки тысяч генов. На таком чипе можно разместить все гены большинства организмов и соответственно исследовать их экспрессию в одном эксперименте (рис. 5). Человеческий геном (набор всех генов человеческого

организма) помещается всего на трех подобных чипах.

Биочип, с которым проведена гибридизация, выглядит как массив микроскопических светящихся точек. Светятся они или нет, не увидишь невооруженным глазом, и для детекции применяются специальные сканеры. Они похожи на сканеры для бумаги или фотопленки, но отличаются спектральным диапазоном и чувствительностью. Сканер выдает изображение поверхности биочипа — цифровую фотографию, на которой видны светящиеся точки, соответствующие различным генам. Светимость точек пропорциональна уровню экспрессии генов (рис. 6).



6
Сильно увеличенное изображение фрагмента поверхности биочипа, полученное с помощью сканера. В реальности диаметр каждой точки около 0,2 мм

Существуют программы обработки изображений, которые измеряют яркость каждой точки на поверхности биочипа и соотносят ее с геном, который в этой точке находится. Они выдают список, в котором каждому названию гена соответствует светимость точки на биочипе. Поскольку применение биочипа позволяет получить данные об уровне экспрессии множества генов организма, вплоть до всего генома, совокупность таких данных называют профилем экспрессии.

Дифференциальный эксперимент

Описанная выше техника гибридизации предполагает получение изображения биочипа при одной длине волны, то есть монохромное. Однако есть маркеры, излучающие при различных длинах волн, и сканеры, способные детектировать сигнал в узкой полосе, соответствующей цвету того или иного маркера. Использование разноцветных маркеров позволяет многократно увеличить чувствительность метода. Наиболее часто используются флуоресцентные маркеры Су3 («сай 5») и Су5 («сай 3»). Это сложные цианиды, которые прикреплены к нуклеотиду и излучают свет в зеленом и красном диапазонах волн. С двумя маркерами можно приготовить две различные

пробы и пометить молекулы ДНК в каждой из них своим цветом.

Этот метод целесообразно применять, изучая воздействие лекарственного препарата на организм. Одну пробу приготавливают из клеток, обработанных лекарственным препаратом, а другую — из клеток, не прошедших обработку. Обе пробы, меченные маркерами различных цветов, смешивают и наносят на поверхность биочипа. Молекулы ДНК, несущие различные маркеры, способны связаться со своими ответными частями на поверхности биочипа (это называется конкурентной гибридизацией). В результате на поверхности биочипа останутся молекулы ДНК, пришедшие из различных проб и помеченные как зеленым маркером, так и красным. Точки биочипа, в которых расположены различные гены, начнут светиться одновременно двумя цветами, причем соотношение интенсивности красного и зеленого цвета будет соответствовать соотношению количества молекул ДНК, пришедших из одной и другой пробы. Оно, в свою очередь, пропорционально уровню экспрессии генов в клетках до и после обработки лекарственным препаратом (рис. 7).

Изображение поверхности биочипа, гибридизованного с пробами различных цветов, делается в многоканальном сканере, где каждый канал детекции настроен на длину волны соответствующего маркера. Точки, интенсивность свечения которых в красном и зеленом цвете одинакова, соответствуют генам, уровень экспрессии которых не изменился от воздействия лекарственного препарата. Если же уровень экспрессии изменился, то интенсивность свечения в красном и зеленом диапазоне у точки различна.

Всего один эксперимент подобного рода позволяет определить, какие гены и какие процессы в организме были подавлены или, наоборот, индуцированы лекарственным препаратом. На основании этих данных можно судить и о нежелательных побочных эффектах лекарства. Точно так же можно сравнить уровень экспрессии генов в здоровом организме и при болезни, а тем самым определить перечень генов, влияющих на появление и развитие данного заболевания.

Простой биочип можно проанализировать на глазок, для более сложных применяются инструментальные средства и программы, которые предоставляют численные данные о дифференциальной экспрессии генов в изучаемом организме, а также о достоверности этих данных.

Таким образом, биочипы позволяют сравнить в одном эксперименте уровень экспрессии множества генов при

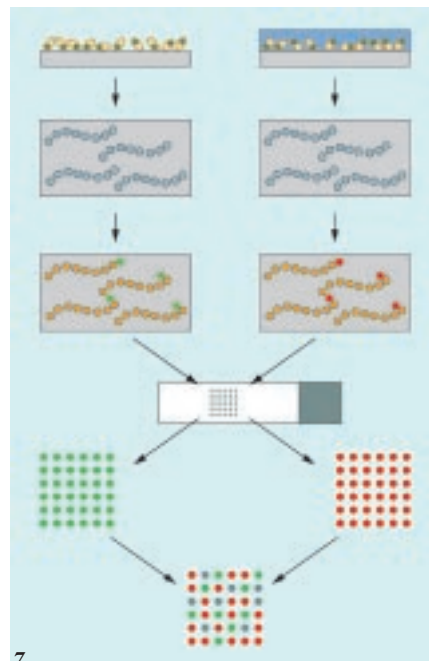
различных условиях и служат исключительно эффективным средством генетического анализа.

Биочипы и функции генов

Выше утверждалось, что уровень экспрессии генов так или иначе связан с определенными процессами в организме. Для практического применения этих знаний необходима информация о том, какой ген за какой процесс отвечает. Несмотря на то что для некоторых организмов, в том числе и для человека, выявлены нуклеотидные последовательности всех генов, о роли этих генов известно сравнительно немного. Определение задачи каждого гена в организме — функциональный анализ — одно из важнейших направлений генетики.

Функции генов, участвующих в развитии заболеваний, как уже говорилось, определяют сравнением профилей экспрессии здорового и больного организма. Гены, отвечающие за реакцию организма на химическое или физическое воздействие — лекарство, радиацию, недостаток кислорода, присутствие в воздухе вредных веществ, — исследуют, сравнивая профили экспрессии до и после воздействия. Даже влияние времени на организм можно изучать с помощью биочипов. Сравнение профиля экспрессии генов в одних и тех же клетках в разные моменты времени позволит изучать функцию генов, отвечающих за развитие и старение организма.

Функциональный анализ производят с помощью исследовательских биочипов, которые отличаются большим на-



7
Схема дифференциального эксперимента с биочипом

бором генов (тысяч или десятков тысяч). Основная задача при дизайне такого биочипа — охватить как можно более широкий спектр генов в одном эксперименте.

С помощью функционального анализа можно выявить гены организма, которые определяют развитие заболевания или его форму, иными словами — профиль экспрессии, соответствующий той или иной болезни. С ним можно сравнить профиль экспрессии пациента, чтобы поставить диагноз. Такая процедура проводится с помощью диагностического биочипа. Обычно подобные биочипы содержат «все-го» несколько десятков генов, но состоят из нескольких тысяч точек. Гены наносят на биочип с многократными повторениями для проверки результатов. Основная задача в этой ситуации — получить максимально достоверные данные.

Применение биочипов может оказаться очень полезным в диагностике раковых заболеваний. Известно множество форм рака, и каждая требует специфического лечения. Следует заметить, что один из распространенных методов лечения рака, химиотерапия, сопряжен с серьезными побочными эффектами. Исследуя, как гены в клетках пациента реагируют на воздействие веществ, выбранных для химиотерапии, можно до начала лечебных процедур судить об эффективности предложенного курса лечения, а также о тяжести побочных эффектов.

Пригодится применение ДНК биочипов и в диагностике вирусных инфекций. Вирус использует молекулярные механизмы чужого организма для построения своих белков. Существует период, когда клетки уже заражены, но еще не начали синтезировать белки вируса. В это время вирус нельзя обнаружить традиционными методами, но можно найти его ДНК и тем самым подтвердить, что заражение произошло. Биочипы — едва ли не самый перспективный метод для обнаружения вирусной инфекции, поскольку вирусы быстро мутируют, а этот способ позволяет одновременно разыскивать множество разных вариантов вируса, в идеале — все известные и даже прогнозируемые.

Использование биочипов не ограничивается приведенными примерами. Биочипы широко применяются для исследования лекарственных свойств химических соединений. Они принесут много пользы в фармакогеномике, цель которой — подбор медикаментов для конкретного человека с учетом его генетических особенностей.

В России сейчас производятся биочипы для детекции модифицированных, искусственно измененных генов

в продуктах питания, для исследования мутаций ВИЧ, без знания которых невозможно диагностировать эту опасную инфекцию, для определения штаммов туберкулезных бактерий.

Биоинформатика

Эксперимент с биочипом дает огромный объем численных данных. Для каждого гена на биочипе — это минимум два числа, соответствующих уровню экспрессии этого гена в различных условиях. Эти числа сопровождаются служебными данными, которые описывают условия и качество эксперимента, то есть отношение сигнал/шум в каждой точке, количество точек за пределами динамического диапазона сканера и другие. Подобные сведения позволяют судить о достоверности данных. Кроме того, на чипы наносят контрольные гены, например на человеческий чип — бактериальные, которые не должны давать гибридизацию. Если гибридизация с ними происходит, значит, слишком высоко неспецифическое связывание — эксперимент не удался. Это негативные контроли. Есть и позитивные, когда на чип наносят некоторые фрагменты ДНК и в пробу специально добавляют их ответные пары. Существует еще много-много других контролей. Дизайн биочипа — это обширная и не очень простая задача.

Общий объем данных для каждой точки биочипа — около дюжины чисел, а для всего биочипа — десятки тысяч. Обработка такого количества информации требует автоматизации. Здесь важно, что поведение одного гена зависит от поведения множества других, а сопоставление данных по экспрессии большой группы генов — сложная вычислительная задача.

Кроме того, часть полученной информации может не представлять интереса в рамках какого-то одного исследования, однако быть очень важной для другого. Обмен и совместная обработка данных, полученных с разных биочипов разными учеными, дает возможность проводить биологические и медицинские исследования, не ставя новые эксперименты, а лишь используя уже полученные результа-

ты. Это возможно при организации общественного доступа к хранилищам данных, куда одни исследователи могли бы вносить результаты, полученные при использовании биочипов, а другие черпать эту информацию для вычислительных экспериментов. В настоящее время ведется несколько проектов, направленных на создание общедоступных хранилищ подобных данных, и существует стандарт, которому должны соответствовать сведения, вносимые в такие хранилища. Стандарт обозначается аббревиатурой MIAME — от слов «Minimum Information About a Microarray Experiment» (минимальная информация об эксперименте с биочипом).

Вопросами хранения, доступа и обработки массивов данных, полученных при использовании биочипов и других технологий, занимается биоинформатика — направление, которое привнесит в биологию вычислительные методы исследований.

История биочипов

Первые публикации, в которых упоминаются биочипы как миниатюрные устройства, состоящие из многочисленных биологических элементов, относятся к середине 80-х годов прошлого века. Две приведенные ниже ссылки указывают на примеры подобных публикаций. Р.Хаддон и А.Ламола в 1985 году писали о молекулярных электронных устройствах и компьютерах на биочипах («PNAS USA», т.82, № 7), а Ф.Хонг в 1986 году сравнивал молекулы белка бактериородопсина в мембране фотосинтезирующих галобактерий с элементами молекулярного компьютера («Biosystems», т.19, № 3). В этих статьях биочип рассматривается как устройство, в котором с помощью электрохимических процессов изучаются свойства биологических образцов. В первой из указанных статей обсуждается применение фотолитографии для иммобилизации биологических молекул на подложке.

По всей видимости, первая в мире статья о ДНК-биочипах вышла 9 октября 1989 года в журнале «FEBS Letters». Она описывала технологию гибридиза-





ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ НАУКИ

8

Изображение биочипа, прошедшего гибридизацию с пробями, помеченными метками зеленого и красного цвета. Серые точки соответствуют генам, уровень экспрессии которых не изменился, цветные — генам, экспрессия которых возросла (красные) или уменьшилась (зеленые) после воздействия лекарственного препарата

ции меченой пробы с фрагментами ДНК на поверхности биочипа и принадлежала А.Д.Мирзабекову и его соавторам. Эта группа разрабатывала олигонуклеотидные биочипы с гелевой подложкой, заключавшей в себе образцы ДНК. Мирзабеков хотел создать новый метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК, но потом переключился на более простые приложения (в частности, на детекцию патогенных бактерий). Его последователи в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта и в настоящее время ведут работу над совершенствованием технологии и ее практическими приложениями.

Метод дифференциального эксперимента с пробями, помеченными двумя различными флюоресцентными маркерами, впервые описан в статье профессора Стэнфордского университета Патрика Брауна и соавторов в журнале «Science» за октябрь 1995 года (№ 5235). Многие считают эту статью отправной точкой в экспериментах по количественному измерению профиля экспрессии множества генов, а профессора Брауна — родоначальником технологии ДНК-биочипов.

Биочипы сегодня

Технология биочипов нова, ей немногим более десяти лет. Стандарты еще не выработались, и, хотя производство

биочипов автоматизировано, работа с ними требует немало ручного труда. Здесь уместна аналогия с фотографией в большей части XX века. Тогда производили весьма совершенные камеры, серийно выпускали фотоматериалы (пусть и не столь «быстрые», как сейчас), но получение отпечатков требовало длительной работы в темной комнате с красным фонарем и известной доли сноровки. Книга знаменитого фотографа Анселя Адамса «Примеры», в которой автор рассказывает историю создания ряда своих работ, свидетельствует о том, что фотографа той поры технологические вопросы проявления, обработки пленки и печати снимков заботили значительно больше, чем наших современников. Это не помешало Анселю Адамсу создать замечательные произведения фотоискусства, но было препятствием на пути массового применения фотографии. Проблема была решена введением стандартов фотоматериалов и разработкой автоматизированных станций по проявлению пленки и печати снимков. Фотография стала доступной каждому. Нечто подобное сейчас происходит с биочипами. Несмотря на очевидную эффективность метода, получение результатов требует существенных затрат, ручного труда и специальных навыков.

Экономически рынок биочипов и оборудования, связанного с ними, можно назвать нишевым в сравнении с технологиями массового применения, но есть вероятность, что в течение ближайшего десятилетия технологические проблемы будут преодолены и биочипы получат такое же широкое распространение, как, например, современные электронные устройства. Как изменится при этом сама технология, как эволюционирует в результате наш мир, предсказать трудно.

Автор выражает благодарность своим коллегам: доктору Ирине Григорян, Владимиру Новичкову и Денису Казнадзею за участие в подготовке материалов этой статьи.

В статье использованы изображения биочипов и оборудования для их изготовления, предоставленные компанией "Lab Next Inc".

Что еще можно почитать о биочипах

И.Григорян, В.Макеев «Биочипы как пример индустриальной биологии» <http://offline.computerra.ru/2001/413/12805/>.

«Biomediale. Современное общество и геномная культура». Сост. и общ. ред. Д.Булатов. Калининград: КФ ГЦСИ, ФГУИПП «Янтарный сказ», 2004.

Нанотрубки

Начнем с самого красивого — с картинок. На рис. 1 показаны построенные с помощью программы гидрированная (слева) и фторированная (справа) А-нанотрубки, на рис. 2 — гидрированная (слева) и фторированная (справа) Z-нанотрубки (А — от armchair, Z — от zigzag — трубки разной хиральности, полученные из листа, свернутого под разными углами, — «Химия и жизнь», 2004, № 6, с. 22).

Углеродные скелеты гидрированных и фторированных нанотрубок состоят из насыщенных атомов углерода. Сравнение расположения атомов водорода (слева) и фтора (справа) в гидрированной и фторированной нанотрубках обнаруживает целый ряд различий. В гидрированных нанотрубках взаимное отталкивание атомов водорода не столь велико (вандерваальсов радиус водорода 1,1 Å, расстояние между ближайшими атомами водорода 2,44 Å превышает удвоенный вандерваальсов радиус водорода), поэтому атомы H, как и атомы углерода, располагаются вдоль «параллелей» на поверхности нанотрубки. Связи С—Н направлены перпендикулярно оси нанотрубки и образуют заслоненные конформации, тем самым гидрированная, как и исходная, нанотрубка сохраняет ось симметрии.

Иное дело — атомы фтора (их вандерваальсов радиус равен 1,35 Å) во фторированной нанотрубке. Они не могут расположиться, подобно атомам водорода, вдоль параллелей и образуют более сложную сетку, соседние ряды которой, как правило, смещены друг относительно друга и находятся в заторможенной конформации. Это частично ослабляет взаимное отталкивание соседних атомов фтора, но создает напряжения валентных углов: связи С—F направлены уже не перпендикулярно, а под углом 79° к оси нанотрубки. В результате ее симметрия оказывается сниженной, а валентные углы С—С—F варьируют в пределах 87–105° вместо 109–111° в перфторуглеводородах с раскрытой цепью и ~102° в перфторфуллерене C₆₀F₆₀. Фторированные нанотрубки уже получены и стали предметом исследования ученых.

В особых условиях нанотрубки удерживают некоторое количество