**Лекція 7**

**Поліморфізм ДНК. SNP-маркери**. **ДНК-мікроареї.**

**ДНК - поліморфізм** [греч. *poly* – багато і *morphe* - вид, форма, образ] – існування в популяції двох або більшого числа альтернативних форм (алелів) визначеного локуса хромосоми.

Рівень поліморфізму визначається за молекулярними маркерами. **Молекулярні маркери –** генетичні маркери, які аналізуються на рівні ДНК.

**Алелі** маркерних локусів - **різні форми** (нуклеотидні послідовності, які відрізняються за довжиною та/ або за нуклеотидними замінами) одного і того же маркера, розташовані в однакових ділянках (**локусах**) гомологічних хромосом.

Якщо виявляються обидва алеля, кажуть про **кодомінантне успадкування**, якщо виявляється лише один – **повне домінування**.



Рис. 1. Причини варіабельності локуса:

*а* – замена нуклеотида; *б* – делеція [Хлесткина, 2013]

F2 F2

P1 P2 P1 P2

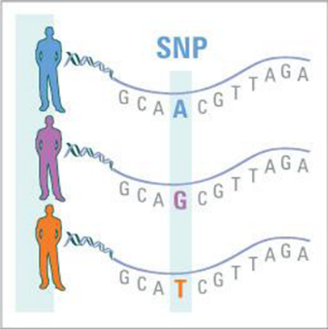
Рис. 2 Кодомінантний (*a*) та домінантній (*б*) тип успадкування [Хлесткина, 2013]

Існує щонайменше **20 різних типів молекулярних маркерів**, які можна класифікувати за основним методом аналізу, що застосовується з їх використанням. Це:

1. Блот-гібридизація: ПДРФ (RFLP) – маркери (використовуються з 80х років XX ст.)
2. ПЛР - RAPD, STS, SSR, ISSR, AFLP – маркери (використовуються з 90х років XX ст.)
3. ДНК-мікроареї: SNP, DArT (використовуються з кінця 90х років XX ст.)

SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидний поліморфізм.

Це однонуклеотидні позиції генома, в яких може існувати декілька варіантів нуклеотидів (алелів). Причому рідкісний алель зустрічається в популяції з частотою не менше 1%. Іноді додатково визначаються "поширені SNPs", для яких частота рідкісного алеля більше 20%.

Наприклад, послідовності AAGCCTA і AAGCTTA відрізняються тим, що сталася заміна цитозина (С) на тимін (Т).

SNP зустрічається як в межах кодуючих послідовностей генів, так і в некодуючих ділянках. Розрізняють SNP синонімічні і несинонімічні: синонімічні не впливають на амінокислотну послідовність білку, а несинонімічні її змінюють.

В принципі, можливе існування двох/бі-, трьох- і чотирьохалельних поліморфізмов. Проте на практиці надзвичайно рідкісні навіть трьохалельні SNP (менше 0.1% усіх SNP людини).

В кожному геномі є величезна кількість SNP (до декількох млн)- щонайменш один на кожні 10 тис. п.н. Тому SNP дозволяють будувати дуже ретельні карти геномів.

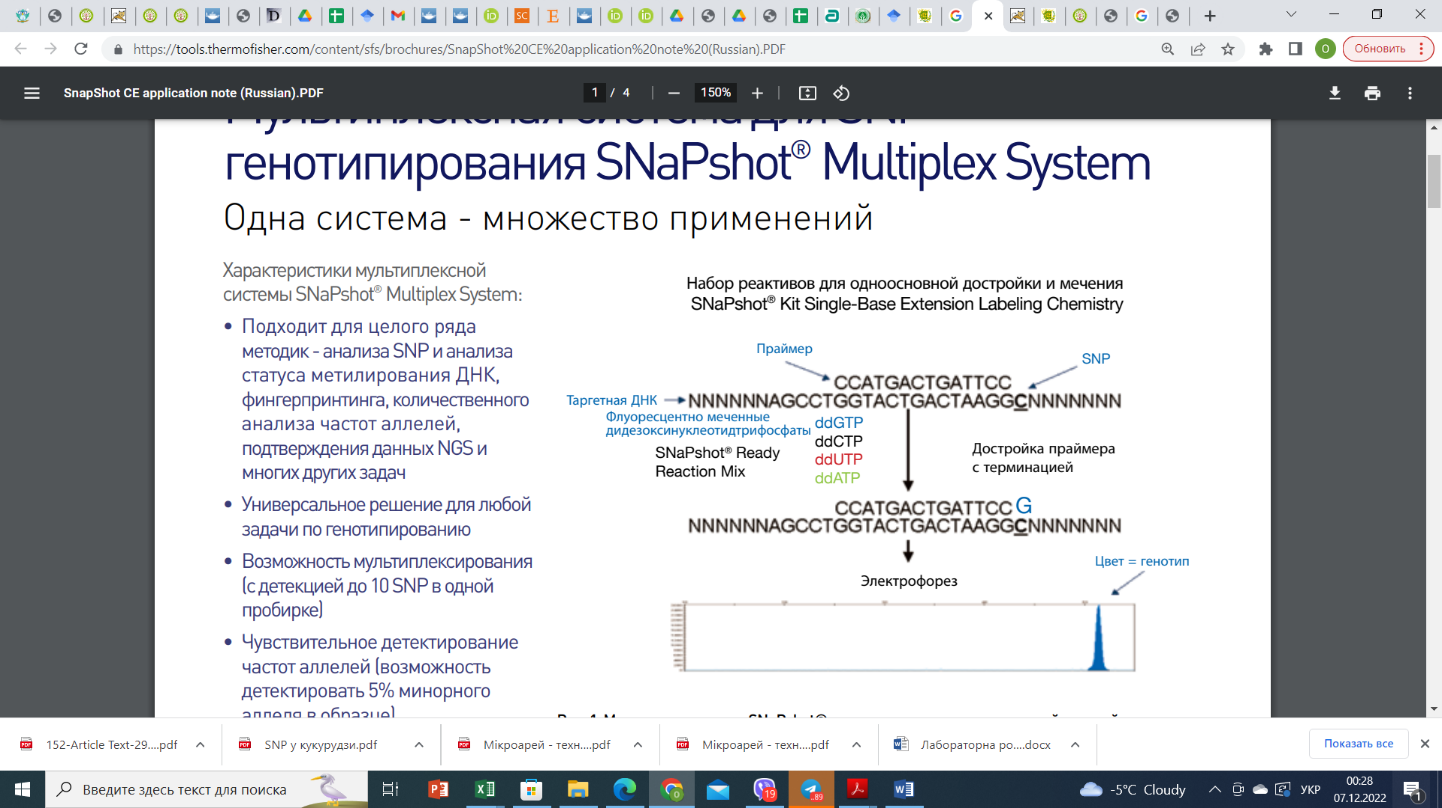
Загальна кількість SNP в геномі людини складає приблизно 10 мільйонів. Існує декілька баз даних по SNP людини. Їх використовують в генетичному картуванні і в дослідженнях повногеномних асоціацій (GWAS). Для частини SNP людини показана їх асоціація з тими або іншими захворюваннями, але більшість, мабуть, є селективно-нейтральними. Поліморфізми можуть призводити до порушень експресії і регуляції генів і появи білків зі зміненими функціональними властивостями. Скринінг SNP дозволяє визначити спадкову схильність до різних мультифакторних захворювань, а також прогнозувати індивідуальну чутливість до фармакологічних препаратів.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  | Наприклад, варіант гена V чинника згортання крові, що називається Лейденською мутацією, пов'язаний з тромбофіліями (схильність до розвитку тромбозів). Ген F5 фактору V зсідання крові) (фактор Лейдена) може мати наступний патологічний поліморфізм G1691A (заміна гуаніну на аденін) або Arg506Gln (замена аргініну на глютамін) або R506Q (R — однолітерне позначення аргініну, Q — однолітерне позначення глютаміна). |

### При проведенні аналізу на поліморфізм генів досліджується обидва гени для пошуку шуканого поліморфізму (мутації). Варіанти висновків по цьому гену можуть бути : G/G - тобто в обох варіантах генів гуанін, заміни немає, тобто варіант гена без лейденської мутації; G/A - в одному варіанті є поліморфізм, що називається лейденською мутацією, а в іншому немає (гетерозигота); A/A - в обох варіантах генів виявлений поліморфізм G1691A Це одна з "небезпечний" мутацій, яка зустрічається приблизно у 2 чоловік з 100.

SNP разом з іншими генетичними маркерами використовують для побудови філогенетичних дерев.

SNP були виявлені у всіх геномах; їх можна використовувати для цілого ряду досліджень, у тому числі для вивчення мутацій, пов'язаних з різними видами раку, генетичних захворювань, досліджень мітохондріальної ДНК, сприйнятливості до пріонних захворювань у овець, втрати гетерозиготності, оцінки якості при виробництві кормів для тварин, і навіть для диференціації медикаментозних та немедикаментозних форм конопель.

Мічення за допомогою SNP засноване на одноонуклеотидній добудові та термінації ланцюга ДНК.

Аналіз дозволяє досліджувати кілька SNP у процесі лише однієї реакції.

Принцип ґрунтується на добудові неміченого олігонуклеотидного праймера (або праймерів) одним з дидезоксинуклеотидів (ddNTP).

Кожен праймер відпалюється на комплементарній послідовності у присутності флуоресцентно мічених ddNTP та ДНК-полімерази.

Полімераза добудовує праймер одним нуклеотидом, додаючи єдиний ddNTP на його 3’ кінець. Далі ідентифікація кольору флюоресценції дозволяє визначити, яка саме основа була додана.

**ДНК-мікроареї (ДНК-мікрочіпи)**

Нанотехнологія – високотехнологічна галузь, спрямована на вивчення і роботу з атомами і молекулами. Однією зі сфер, в якій використовується нанобіотехнологія, є створення біочіпів (ДНК-чіпи, DNA–microarrays). Біочіп (мікроарей) – це узагальнююча назва технології, що передбачає використання невеликого за розмірами твердого носія, на якому щільно нанесена велика кількість біологічних молекул для різноманітних біохімічних тестів.

### Біологічний мікрочіп (англ. biochip)— 1) матриця з нанесеними молекулами білків або нуклеїнових кислот для одночасного проведення великої кількості аналізів в одному зразку; Основна частка сучасних біочіпів припадає на ДНК-чіпи (94%) та білкові чіпи (6%).

### ДНК-мікрочіп - пристрій, створений по аналогії з електронними мікросхемами (чіпами), призначений для одночасного виявлення безлічі певних послідовностей ДНК.

Частіше за все це пластинка зі скла, оскільки скло має низьку внутрішню флуоресценцію, воно є однорідним та інертним. Іноді використовують й інші матеріали, н., кремній, пластик.

### ДНК-мікрочіп використовується для вивчення експресії генів. Сучасні ДНК-мікрочіпи можуть одночасно виміряти експресію десятків тисяч генів.

Пристрій дозволяє за короткий час визначити декілька тисяч алергенів, онкогенів, різних БАР і навіть генетичні дефекти.

### Отже, ДНК-чіп є компактним планшетом, що містить набір зондів, імобілізованих на плоскій поверхні нейлонових мембран (макроскопічні матриці) або на твердій фазі (скло, пластик, силікон). Кількість зондів - до 300 тис. на 1 см2.

Для виробництва чіпів використовується складне обладнання та нанотехнології, що дозволяє «пришивати» лазерним випромінюванням аналізатори прямо до гелевої підложки, принцип дії яких заснований на методі одномолекулярної мас-спектрометрії (проведення досліджень на окремих молекулах). На сьогодні створені біочіпи на основі наноструктур (польового кремній-алюмінієвого нанотранзистора, який містить одностінні нанотрубки); на основі графену і наночастинок платини; сенсори на основі нанозондів, які приєднані до полімерних векторів, і мають будову та функції вірусів (призначені для проникнення у клітини людського організму та аналізу клітин); сенсори, що становлять нанотрубки, вкриті ДНК; біочіпи на ДНК-основі, з використанням технології нанодрукування та супрамолекулярного нанодрукування (в основі дії яких лежить існуюча в природі технологія копіювання ДНК і РНК).

Мікроскопічний розмір біочіпів дозволяє розміщувати на невеликій площі величезну кількість різних молекул ДНК і зчитувати з цієї площі інформацію за допомогою флуоресцентного мікроскопа або спеціального лазерного пристрою для читання.

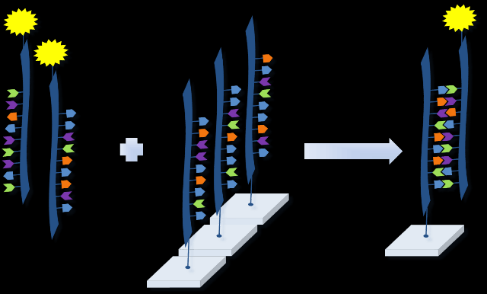
Виділяють 3 основних види ДНК-чіпів: 1. Синтезовані in situ олігонуклеотидні ДНК-чіпи (генні чіпи); 2. Нанесені на скло олігонуклеотидні мікрочіпи; 3. Нанесені на скло ДНК-чіпи.

Існує два підходи до синтезу та нанесення ДНК-мішеней на поверхню ДНК-чіпів: доставка та синтез in situ. У разі застосування методів доставки мішень синтезується стандартним способом, таким як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), та пізніше наноситься на поверхню.

За допомогою методів прямого синтезу мішені створюються безпосередньо на поверхні чіпів шляхом поступового приєднання нуклеотидів до олігонуклеотидного ланцюга. Найбільш прогресивним в синтезі ДНК-чіпів є метод синтезу олігонуклеотидів безпосередньо на поверхні чіпу шляхом поетапного додавання нуклеотидів до наростаючого кінця ланцюга. Цей напрямок більш ефективний, ніж використання попередньо синтезованих полінуклеотидів, оскільки припускає можливість одночасного синтезу всіх полінуклеотидів, які розташовуються на чіпі.

Переваги синтезу in situ полягають у великій щільності ДНК–мішеней, доступній ціні виготовлення чіпів високої складності, надійній ідентифікації олігонуклеотидів на ДНК-чіпах.

В основі проведення аналізу на ДНК-чіпах лежить гібридизація до мішеней на поверхні ДНК–чіпа мічених флуоресцентними барвниками молекул ДНК (зразків). Зразки отримують за допомогою зворотної транскрипції виділеної з клітин мРНК та полімеразної ланцюгової реакції.



### ДНК-мікрочіп використовується для вивчення експресії генів. Використання ДНК-чіпів дозволяє виділяти, детектувати, ідентифікувати та кількісно аналізувати експресію десятків тисяч генів.

### Принцип роботи мікрочіпа для вивчення експресії генів полягає в наступному. Активна робота гена в тканині виражається в накопиченні його матричній РНК (мРНК). Всі мРНК екстрагуються із зразка тканини, і за допомогою зворотної транскриптази на них синтезується кДНК, яка значно стійкіше і зручніше в роботі, ніж мРНК. Отриманий набір кДНК мітять за допомогою флуоресцентних або радіоізотопних міток. Кількість індивідуальних кДНК в зразку прямо пропорціонально кількості їх мРНК-матриць і, отже, рівню активності відповідних генів. Суміш кДНК наносять на мікрочіп, в кожній точці якого пришиті ДНК-фрагменти, що відповідають кодуючій послідовності одного з генів. кДНК знаходять "свої" точки і зв'язуються (гібридизуються) з ними за принципом комплементарності. Чим більше в розчині кДНК цього виду, тим більше її прикріпляється до своєї точки. Потім спеціальний скануючий пристрій визначає вміст кДНК в кожній точці мікрочіпа, а програма співвідносить його з назвою гена, представленого цією точкою. Результатом ДНК-мікрочипового дослідження є матриця з точок, інтенсивність яких прямо пропорційна активності відповідних генів.

Для визначення ДНК вона повинна бути міченою. Відмінність методів детекції результатів полягає в використанні типів мічення.

Для детекції інтенсивності флуоресценції кожної плями використовують апаратуру. Рівень детекції залежить від комплементарності молекул ДНК та кількості зразків. Кількісні показники, що одержуються при цьому використовують для визначення вмісту зразків у досліджуваному матеріалі. В більшості випадків кожна пляма на ДНК-чіпах містить ДНК окремого гена, тому інтенсивність плями розглядають як рівень генної експресії.

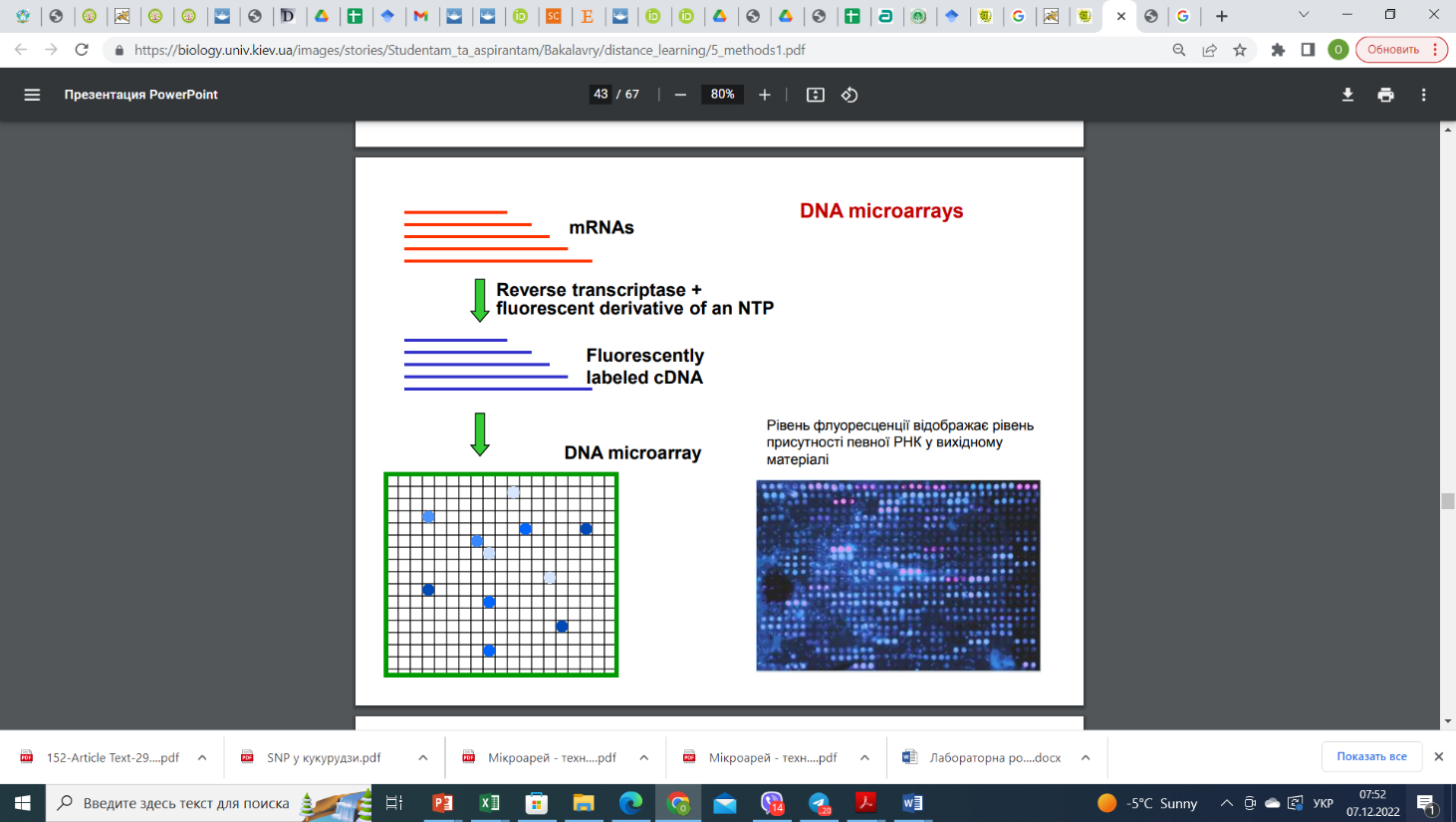


Рис. Флуоресценція на ДНК-мікрочіпі після обробки розчином кДНК. Всього тут приблизно 37500 прикріплених молекул ДНК.

Для вивчення експресії багатьох генів в різних тканинах. Якщо місце флуоресценції співпадає з положенням молекули ДНК, то в цій тканині даний ген експресований. Крім того, помітивши кДНК з різних тканин різними барвниками, можна вивчати експресію відразу двох тканин на одному чіпі: за кольором флуоресценції можна визначити, в якій з тканин він експресується (якщо відразу в декількох — вийде змішаний колір).

Біочіпи широко використовують в in vitro-діагностиці. В основі їх механізму дії є молекулярне розпізнавання молекул, які взаємодіють із біополімерами, нанесеними на чіп. Так, чіпи використовуються для діагностики туберкульозу, кліщових інфекцій, лейкемії, СНІДу, онкозахворювань, а також для експрес-діагностики вірусу грипу та стафілококової інфекції та для раннього виявлення хвороби Альцгеймера. Біочіпи ідентифікують за лічені хвилини сполуки різної хімічної природи: від білків, вітамінів, вірусів, ДНК до живих клітин у біологічному матеріалі, що дозволяє проводити діагностику захворювань на ранніх стадіях.

### Також ДНК-мікрочіпи використовуються для ідентифікації генів і їх мутацій; діагности інфекційних; скринінгу мікроорганізмів. Біочіпи дозволяють аналізувати безліч мутацій (близько мільйона) у однієї особини одночасно, і є зручною і універсальною технологією для масових досліджень генетичного поліморфізму і скринінгу мутацій. Саме ця перевага особливо важлива, наприклад, для персоніфікованої медицини майбутнього (використовуються дані про геном конкретної людини).

Також ДНК-мікрочіпи використовуються **для скринінгу мікроорганізмів**. Рибосоми присутні у всіх живих клітинах, а рибосомальні РНК є одними з найбільш еволюційно консервативними макромолекулами. У р-РНК існують кілька варіабельних ділянок. Відмінності в нуклеотидній послідовності цих ділянок застосовуються для ідентифікації мікроорганізмів і для простежування їх еволюції.

Розроблено ряд мікрочіпів для експресного методу ідентифікації нітрифікуючих бактерій, бактерій груп *Bacillus* та архебактерій. Присутність р-РНК в клітині в кількості тисяч копій дозволяє проводити аналіз у ряді випадків без їх ампліфікації.

Олігонуклеотидні мікрочипи використовують ефективно для одночасної ідентифікації від десятків до тисячі генів і їх структурного аналізу, для виявлення специфічних нуклеотидних послідовностей. ДНК-чіпи використовуються для встановлення спорідненості, визначення генетично модифікованих організмів, ранньої діагностики онкологічних захворювань.

### Також ДНК-мікрочипи використовуються для порівняльної гібридизації геномів. Для цього створюють ДНК-чіп, що містить бібліотеку фрагментів геномної ДНК (0.1 – 10% генома), отриманої від суміші генотипів. Наступна гібридизація мічної геномної ДНК 2-х різних зразків (один при гібридизації флуоресцирує зеленим, інший – червоним) на даний чип – використовується для виявлення поліморфних елементів. А при порівнянні великої кількості зразків використовується почергова гібридизація міченої геномної ДНК досліджуваного зразка і таким чином здійснюється генотипування.

Застосування ДНК-чіпів дозволяє дуже швидко і ефективно здійснювати безліч процедур аналізу індивідуальних особливостей ДНК організмів, що дуже важливо для вирішення різних практичних завдань.

**Застосування окрім ДНК- мікрочипів інших біочипів (з нанесеними іншими біомолекулами) ще ширше.**

Сучасні біочіпи здатні детектувати навіть одну хімічну сполуку чи вірусну частку. Деякі біочіпи на основі наноструктур за 1 хв. можуть визначати вміст в 1 мм3 рідини до 1000 окремих молекул потрібної речовини, при цьому немає необхідності маркувати розчини радіоактивними чи флуоресцентними мітками. Існують біочіпи для вимірювання рівня глюкози шляхом швидкого та надчутливого аналізу зразків слини, сечі або сліз.

Біосенсори із флуоресцентною фарбою придатні для використання в польових умовах з метою виявлення навіть незначної концентрації сальмонели в харчових продуктах за короткий час.

Біочіпи забезпечують виявлення молекулярної взаємодії між білками вірусів (ВІЛ, гепатиту та ін.) та білками, які синтезуються клітинами людського організму, що піддаються інфекції — це важливо при розробці нових методів боротьби з вірусами. Біочіпи використовують у криміналістиці (для експрес-ДНК-дактилоскопії за межами лабораторії, навіть визначають колір очей точністю 94%).

Особливу групу становлять імунологічні біочіпи (ІБ), які використовують для створення діагностичних тест-систем із метою визначення імунофенотипу для діагностики захворювань, які пов’язані із порушенням клітинної ланки імунітету. ІБ призначені для використання в гематології (для дослідження клітин пухлин лімфатичної системи та клітин мієлоїдних пухлин, що дозволяє визначити не просто наявність захворювання, а і його тип).

Особливе місце посідають біочіпи для імплантації, внутрішньоклітинні та біочіпи для діагностики методом in vivo. Нанобіочіпи можна використовувати для імплантації пацієнтам із хронічними захворюваннями, для ранньої діагностики злоякісних пухлин і небезпечних вірусних захворювань. Біочіпи використовують також для розробки наномедичних знеболювальних систем, які містяться в організмі, реагують на біль та вивільняють дозу лікарської речовини.

Сенсори із нанотрубок, вбудованих у структуру ДНК, здатні виявляти в живій клітині ліки, токсини, вільні радикали і використовуватися для моніторингу забезпечення клітини 306 лікарською речовиною. Існують сенсори, що дозволяють відстежити наявність і виміряти вміст ліпідів у живій клітині або рівень рН клітини.

Отже, технологія біочіпів, що замінює цілі імунологічні лабораторії, дає можливість на кілька порядків підвищити продуктивність більшості діагностичних методів і значно знизити собівартість аналізів; їх використання робить аналіз більш швидким, точним та якісним. Наприклад, нова технологія з використанням передової технології ДНК-чіпів, яка запропонована британськими вченими, дозволить перевести на новий рівень діагностику важких уражень нервової системи, таких як менінгіти і енцефаліти. Якщо раніше на повний аналіз йшло багато днів, то зараз можливе діагностувати захворювання за хвилини.