

Буглак Андрей Андреевич, Стриж Ирина Георгиевна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ДНК-МИКРОЧИПОВ, ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЧАСТНЫХ ЗАДАЧ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Адрес статьи: [www.gramota.net/materials/1/2010/9/14.html](http://www.gramota.net/materials/1/2010/9/14.html)

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

**Альманах современной науки и образования**

Тамбов: Грамота, 2010. № 9 (40). С. 52-55. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: [www.gramota.net/editions/1.html](http://www.gramota.net/editions/1.html)

Содержание данного номера журнала: [www.gramota.net/materials/1/2010/9/](http://www.gramota.net/materials/1/2010/9/)

**© Издательство "Грамота"**

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: [www.gramota.net](http://www.gramota.net)

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: [almanac@gramota.net](mailto:almanac@gramota.net)

МЕДИЦИНА, ХИМИЯ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ,  
БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ, НАУКИ О ЗЕМЛЕ

УДК 57.087

Андрей Андреевич Буглак, Ирина Георгиевна Стриж  
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ДНК-МИКРОЧИПОВ,  
ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЧАСТНЫХ ЗАДАЧ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ<sup>©</sup>

**Введение.** Во многих областях современной биологии, в том числе и в физиологии растений, существует потребность в быстром получении и анализе генетической информации, однако, технологии секвенирования ДНК медленные и трудоемкие. В последнее время в биологии широко используются ДНК-чипы для анализа параллельной гибридизации ДНК, которые дают точную информацию о последовательности нуклеотидов [7, р. 5022]. Основное применение микрочипов состоит в полном одновременном анализе экспрессии генов, а также в анализе мутаций и полиморфизмов генов. Технология ДНК-микрочипов (ДНК-микроррэй от англ. *microarray*) на сегодняшний день является ключевым элементом в инструментарии функциональной геномики. Преимущество метода в его миниатюризации, автоматизации и возможности параллельного течения масштабного исследования с обхватом целого генома за счет информации от многочисленных образцов. Немаловажно, что использование ДНК-микрочипов приводит к появлению огромных массивов данных, которые хранятся в многочисленных базах данных и являются общедоступными. Таким образом, интересующие исследователей частные данные могут быть найдены среди валовой информации, полученной методом ДНК-микроррэй даже в других лабораториях. Целью настоящей работы был поиск и анализ данных полученных методом микроррэй и выявление изменения экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые могут участвовать в продукции активных форм кислорода (АФК) в корнях проростков *Arabidopsis thaliana*, выращенных в различных условиях освещения.

**ДНК-микрочипы: принципы метода.** Под организацией или архитектурой чипа подразумевается система, согласно которой строится взаимодействие чипа и пробы как целого. Существуют два типа архитектуры чипов: геноспецифический и универсальный. Геноспецифический - это способ архитектуры, который предусматривает синтез олигонуклеотидов, последовательность которых комплементарна исследуемой последовательности, и используется, как правило для мутационного анализа. Универсальный - это тип архитектуры чипов основанный на синтезе олигонуклеотидов всех возможных последовательностей данной длины. Количество их равно  $4^n$ , где  $n$  - длина нуклеотида [1]. В настоящий момент существуют два подхода к созданию микрочипов: синтез олигонуклеотидов *in situ* или помещение заранее синтезированных к ДНК на твердые поверхности [3, р. 99]. Исторически первыми были методы размещения на чипах предварительно химически синтезированных олигонуклеотидов или полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) одно-цепочечных фрагментов ДНК. Эти методы просты в использовании, необходимое оборудование доступно и относительно дешево. Главным преимуществом является высокая гибкость этих методов, позволяющая создать чип с любыми требующимися последовательностями, но этот подход имеет труднопреодолимые недостатки, сильно ограничивающие его использование. Прежде всего, это огромные затраты труда, времени и средств на синтез требуемого количества различных олигонуклеотидов или ДНК. Другим, более перспективным, направлением является применение разработанных для нужд микроэлектроники литографических технологий с использованием ультрафиолетового излучения. Такая технология позволяет синтезировать олигонуклеотиды непосредственно на поверхности чипа [4, р. 10].

Основной этап микроррэй, общий для обоих типов чипов, заключается в специфической гибридизации меченного образца с иммобилизованной нуклеиновой кислотой на поверхности чипа. Гибридизация является самым важным этапом операций на ДНК-чипах. От её эффективности и специфичности в определяющей мере зависит успех исследований. Принципиальные трудности гибридизации связаны с фундаментальными особенностями взаимодействующих молекул и ДНК-чип технологий. Низкая эффективность гибридизации и её крайне низкая скорость, требующая многочасовой экспозиции, обусловлена тем, что взаимодействие иммобилизованной пробы и комплементарной ей исследуемой ДНК последовательности осуществляется только на поверхности чипа, в тонком слое, где иммобилизована ДНК. Объём этого слоя по сравнению с остальным объёмом ячейки крайне мал. Поэтому лишь очень небольшая часть молекул ДНК исследуемого субстрата оказывается в ней в каждый момент времени.

Специфическая гибридизация является кинетически контролируемым процессом. Различия между гибридизацией полностью и не полностью комплементарных оснований определяются скоростью реакции, а не её термодинамикой. Термодинамически невыгодными, а, следовательно, и не осуществляющимися и не дающими сигнала, являются только те связи, энергия которых меньше, чем кинетическая энергия молекул ДНК при данной температуре. С целью ускорить гибридизацию применяется несколько способов. Простейшим из них является увеличение поверхности взаимодействия иммобилизованной пробы с субстратом. Для этого проба иммобилизуется в трёхмерном матриксе, например, геле [8, p. 34].

Детекция результатов гибридизации состоит в определении тех ячеек чипа, где произошла гибридизация иммобилизованной на поверхности чипа ДНК пробы и анализируемой ДНК последовательности. Поскольку каждая ячейка чипа содержит ДНК пробу одной определенной последовательности, то её гибридизация с анализируемой ДНК однозначно указывает на наличие в составе анализируемой ДНК последовательности комплементарной последовательности ДНК пробы, расположенной в этой ячейке. Для определения анализируемой ДНК должна быть меченой. Наиболее распространённым методом детекции является флуоресцентная. При этом в качестве генератора флуоресцентного сигнала могут использоваться красители, непосредственно присоединённые к изучаемой последовательности, например, введение в её состав с помощью флуоресцентно меченных праймеров. Чаще используется непрямой метод, при котором последовательность содержит биотин, к которому присоединяются красители, соединённые со стрептавидином [12, p. 639].

Сравнительный анализ экспрессии генов с использованием микрочипов проводят с использованием подхода с комбинированием двух по-разному меченных образцов (контроль и тестовый образец). Обычно используется двухцветная детекция при которой анализируемая ДНК и тест-ДНК метятся разными красителями. Для каждого гена сигнал может быть параллельно измерен количественно от обоих образцов. Одновременная детекция обоих сигналов в каждой из ячеек позволяет прямо сравнить их интенсивность и избежать ошибок, связанных с неполной воспроизводимостью результатов. Метод используется для проведения анализа экспрессии генов с использованием чипов с иммобилизованной на них ДНК полученной методом ПЦР, поскольку для этого типа чипов возможен только сравнительный анализ экспрессии, то разными красителями метятся наборы к ДНК, картину экспрессии которых и нужно сравнить. Стратегия использования коэффициентов экспрессии вместо абсолютных значений доказала свою силу и позволила преодолеть многие ошибки экспериментов. Соотношение интенсивности флуоресценции между двумя образцами одного гена в итоге не будет зависеть от количества гибридизованной нуклеиновой кислоты [3, p. 99].

Для анализа флуоресценции используют два типа детекторов. Первый основан на использовании матричного детектора, основой для которого служит прибор с зарядовой связью, на который непосредственно проецируется флуоресцентный сигнал с поверхности чипа. В качестве источника света вызывающего флуоресценцию используется мощная ксеноновая лампа. Для выделения требуемого сигнала служат светофильтры. Другим направлением, получившим большее распространение, является сканирующая конфокальная лазерная микроскопия. При этом источником света является лазер с длиной волны соответствующей пику поглощения флуорохрома. Детекция осуществляется с использованием конфокального сканирующего микроскопа. Далее поочередная детекция флуоресцентного сигнала при определенных длинах волн позволяет получить данные от различных красителей в смешанных образцах. Когда результаты получены и нормированы, получают коэффициент экспрессии для каждого гена, отражающий относительный уровень экспрессии для исследуемых образцов [9, p. 603]. Знание основ метода микроэррей необходимо для грамотного анализа данных, полученных этим методом.

**ДНК-микрочипы в физиологии растений.** Уже на сравнительно ранних стадиях применения ДНК-микрочипов в биологии, их активно стали применять и в физиологии растений для исследования целого набора вопросов: циркадных ритмов [6, p. 2110], защиты растений [10, p. 707], ответов на холодовой стресс и засуху [11, p. 61], развития семени [5, p. 1570], сигнальной системы фитохрома А [13, p. 2485] и ряда других не менее актуальных проблем. Полученные данные позволили прояснить и выявить молекулярные механизмы координации метаболических путей, а также были использованы для построения регуляторных и сигнальных сетей. Технология микроэррей уже позволила совершить глобальный пересмотр биологических механизмов, которые до недавних пор исследовались в манере «ген за геном» [3, p. 99]. Следует подчеркнуть, что ценность технологии микроэррей для нашего понимания биологических процессов зависит не только от количества данных, которые еще будут получены, но и, прежде всего, от грамотного исследования и интеграции с другими биологическими знаниями и умениями. В рамках настоящего исследования, мы предприняли попытку анализа данных, полученных с помощью ДНК-чипов ранее [15, p. 917], исходя из наших исследовательских интересов.

Участие АФК в процессах роста растяжением в корне является хорошо установленным фактом. Мы показали ранее, что АФК продуцируются на свету в зоне элонгации корня *Arabidopsis thaliana*, развивающихся согласно программе фотоморфогенеза. Напротив, у растений, выращенных в темноте, продукция АФК крайне низкая и уменьшается со временем. При освещении этиолированных проростков происходит увеличение продукции АФК [2, с. 146].

В связи с этим, представляется актуальным поиск изменений экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые являются потенциальными кандидатами на роль продуцентов АФК. Для оценки изменения уровня экспрессии соответствующих генов, мы использовали результаты экспериментов по сравнению экспрессии генов в процессе дэтиоляции проростков *Arabidopsis thaliana*, полученные методом ДНК-микроррей [15, p. 917].

Вся информация об эксперименте и все его результаты по 11,500 элементам к ДНК представлены в базе данных TAIR [14]. Для одного гена из базы данных мы брали значения интенсивности флуоресценции зеленой метки, соответствующей опытному образцу (CH1D\_MEAN), интенсивности красной флуоресценции контроля (CH2D\_MEAN), а также отношение CH1D\_MEAN/CH2D\_MEAN, или Green/Red Ratio, то есть отношение интенсивности флуоресценции образца и контроля, которое характеризует изменение уровня экспрессии гена.

Потенциальными кандидатами на роль ферментов, участвующих в образовании АФК являются НАДФН-оксидазы и пероксидазы клеточной стенки. Отсутствие в базе ДНК-микроррей данных относительно экспрессии генов НАДФН-оксидаз, а также отсутствие видимой индукции белков с молекулярной массой около 100 кДа на наших электрофореграммах, не позволяет нам сделать вывод об участии НАДФН-оксидаз в свето-зависимой продукции АФК. Мы проанализировали данные полученные с помощью ДНК-чипов по изменению экспрессии генов семейства пероксидаз, которое насчитывает 73 представителя в *Arabidopsis*. Время дэтиоляции в экспериментах, результаты которых представлены в базе данных TAIR [Ibidem], составляло от 5 до 120 мин, при этом авторы исследовали как влияние белого света, так красного и синего. Мы извлекали числовые значения интенсивности флуоресценции интересующих нас генов, которые соответствовали исходным числовым значениям за вычетом фона в той же ячейке чипа. Были проанализированы данные по всем генам семейства пероксидаз, уровень экспрессии которых меняется при дэтиоляции и была проведена оценка с точки зрения того, экспрессируются ли они в темноте или при освещении. Из всех генов семейства только один, PER56, не экспрессировался ни в темноте, ни на свету у проростков *Arabidopsis*. Все остальные гены экспрессировались в обоих случаях. Была также проанализирована информация о каждом представителе пероксидаз исходя из места локализации их экспрессии. В результате мы выбрали 5 пероксидаз в качестве возможных продуцентов АФК в апопласте зоны элонгации корня, экспрессия которых меняется при освещении проростков белым светом. Это белки PER12, PER47, PER64, PER69, PER71 (Табл. 1).

**Табл. 1.** Предполагаемые продуценты АФК в апексе корня из числа пероксидаз класса III

Ген	Локус	Мол. масса белка	Изменение экспрессии			Описание, местонахождение
			Время дэтиоляции, мин.			
			10	60	120	
per12	AT1G71695	39,6 кДа	1.552	2.144	3.371	клеточная стенка, вакуоль, мембраны
per47	AT4G33420	36 кДа	1.870	3.692	5.613	экспрессируется повсеместно почти на всех стадиях развития
per64	AT5G42180	34,7 кДа	1.172	2.106	3.487	клеточная стенка
per69	AT5G64100	35,7 кДа	3.620	4.826	5.825	клеточная стенка; гипокотиль, корень
per71	AT5G64120	34,9 кДа	2.804	3.829	4.734	клеточная стенка, индуцируется гипоосмолярностью

**Табл. 2.** Изменение экспрессии генов пероксидаз при дэтиоляции на свету с различным спектральным составом

Ген	Спектральный состав света		
	белый	синий	красный
per12	3.371	2.356	2.406
per47	5.613	1.9615	1.784
per64	3.487	3.4094	1.702
per69	5.825	7.4561	3.012
per71	4.734	6.7414	2.672

Мы также проанализировали изменение экспрессии выбранных 5 генов при 2 часовом освещении проростков синим и красным светом. Было обнаружено, что влияние синего света наиболее ярко проявляется в изменении экспрессии генов per69, per71 (Табл. 2). Можно предположить, что продукты этих генов участвуют в обнаруженной нами ранее продукции АФК в корне при освещении этиолированных проростков арабидопсис белым или синим светом.

Таким образом, проведенный нами анализ по базе данных TAIR результатов, полученных с помощью метода ДНК-микрочипов, позволяет говорить, что в процессе деэтиляции индуцируется экспрессия определенных пероксидаз. Наиболее вероятными кандидатами на роль свето-зависимых продуцентов АФК являются пероксидазы PER64 (34,7 кДа) и/или PER71 (34,9 кДа). Можно предположить, что обнаруженные нами ранее принципиальные различия в механизмах роста и развития первичного корня растений *Arabidopsis thaliana*, выращенных в различных условиях освещения, могут быть обусловлены активностью пероксидаз, индуцируемых в процессе деэтиляции как белым, так и синим светом.

Список литературы

1. ДНК-чипы [Электронный ресурс]. URL: <http://dna.punny.ru/russian/architect.html>
2. Стриж И. Г., Буглак А. А. Светозависимая продукция супероксида как фактор регуляции роста и развития первичного корня *Arabidopsis thaliana* // Альманах современной науки и образования. 2009. № 5.
3. Aharoni A., Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics // Plant Molecular Biology. 2001. V. 48.
4. Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M. Expression profiling using cDNA microarrays // Nature Genetics. 1999. V. 21.
5. Girke T., Todd J., Ruuska S., White J., Benning C., Ohlrogge J. Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds // Plant Physiol. 2000 V. 124.
6. Harmer S. L., Hogenesch J. B., Straume M., Chang H. S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J. A., Kay S. A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock // Science. 2000. V. 290.
7. Pease A., Solas D., Sullivan E. J., Cronin M., Holmes C. P., Fodor S. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. V. 91.
8. Proudnikov D., Timofeev E., Mirzabekov A. Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips // Anal Biochem. 1998. V. 259.
9. Rensink W. A., Bruell C. R. Microarray expression profiling resources for plant genomics // Trends Plant Science. 2005. V. 10.
10. Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E. E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2000. V. 12.
11. Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray // Ibidem. 2001. V. 13.
12. Shalon D., Smith S. J., Brown P. O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization // Genome Research. 1996. V. 6.
13. Spiegelman J. I., Mindrinos M. N., Fankhauser C., Richards D., Lutes J., Chory J., Oefner P. J. Cloning of the *Arabidopsis* RSF1 gene by using a mapping strategy based on high-density DNA arrays and denaturing high-performance liquid chromatography // Plant Cell. 2000. V. 12.
14. TAIR: the Arabidopsis information resource [Electronic Resource]. URL: <http://www.arabidopsis.org>
15. Wu S. H., Ramonell K., Gollub J., Somerville S. C. Plant gene expression profiling with DNA microarrays // Plant Physiol. Biochem. 2001. V. 39.

УДК 343.982.325:[616.61-004](04)

Александр Александрович Ефимов, Леонид Михайлович Курзин

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского  
Тамбовское областное ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы»

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  
ВНУТРИОРГАНЫХ АРТЕРИЙ ПОЧЕК ЧЕЛОВЕКА НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ  
КЛУБОЧКОВОГО АППАРАТА В ОНТОГЕНЕЗЕ<sup>©</sup>

В последние десятилетия неуклонно возрастает интерес исследователей к морфологическим проявлениям процессов старения организма с применением анализа количественных показателей органов и систем. Взаимозависимость темпов инволюционных процессов в различных органах, а также интенсивность влияния изменений одних структурных составляющих на другие морфологические структуры отдельных органов остается до настоящего времени изученной недостаточно и требует дальнейшей разработки.

Артериальная система в процессе онтогенеза претерпевает значительные изменения, которые наиболее выражены в крупных артериях. Однако возрастные изменения так же интенсивно происходят и во внутриорганных сосудах. Неоспоримо доказано, что возрастные изменения артериальной системы определяют процессы старения органов и организма в целом, так как от морфофункционального состояния артерий зависит трофика тканей, и соответственно активность процессов, происходящих в них.