

Материалы для подготовки

по лекции «Мультиплексные и метаболомные технологии в медицинской энзимологии»

С.С.Шишкин

Институт биохимии
им. А.Н. Баха РАН,



Российский университет
Дружбы народов



Общие представления о мультиплексном анализе

Мультиплексный анализ – это важнейший вид биохимических исследований, позволяющий одновременно (параллельно) измерять несколько аналитов (десятки и более десятков тысяч) за один проход / цикл анализа

Аналитами (т.е. объектами анализа и различных измерений) могут быть самые разные соединения – нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), белки (в том числе, ферменты), пептиды, промежуточные метаболиты

Основой для мультиплексного анализа стали технологии, использующие для узнавания аналитов:

- ◆ высокую специфичность взаимодействий между комплементарными последовательностями в нуклеиновых кислотах;
- ◆ специфичные белок-белковые взаимодействия;
- ◆ другие виды специфичных взаимодействий (фермент – субстрат и др.)

Для обеспечения мультиплексного анализа были разработаны особые технологии – array technologies (поточные технологии) и создано высокопроизводительное ("High-throughput") оборудование

Общие представления о мультиплексном анализе

Основные виды мультиплексного анализа

I. Мультиплексный анализ нуклеиновых кислот

- ◆ ДНК-microarray для определения продуктов генной экспрессии или однонуклеотидных замен (SNP's)
- ◆ Высокопроизводительное параллельное секвенирование коротких ДНК-фрагментов
- ◆ Мультиплексная ПЦР для параллельного анализа (или секвенирования) фрагментов ДНК или РНК

II. Мультиплексный анализ белков

- ◆ Белковый-microarray на основе белок-белковых взаимодействий или связывания малых молекул
- ◆ Антительный-microarray для анализа спектра антител
- ◆ Мультиплексное определение белков на основе иммуноферментного анализа (ELISA и др.)
- ◆ Мультиплексное определение аналитов с помощью множественной флуоресцентной кодировки и цитометрии (Luminex technologies)

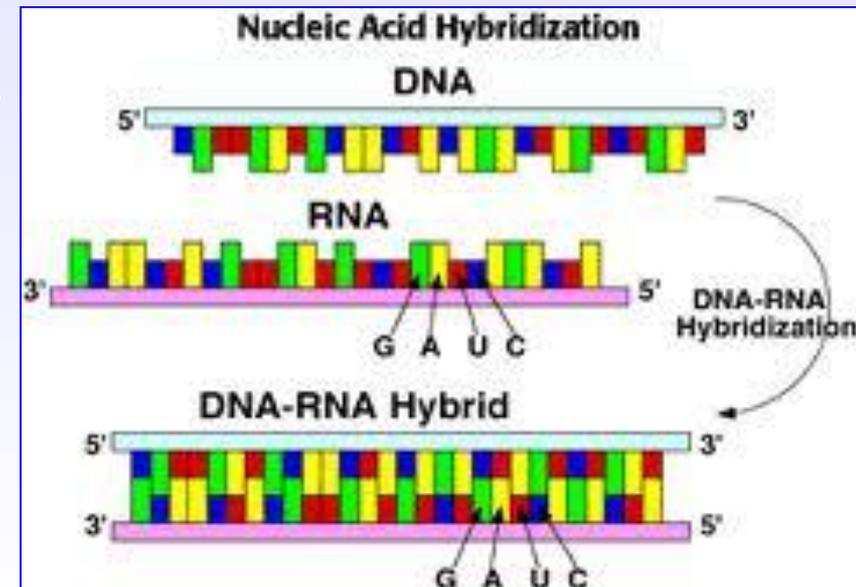
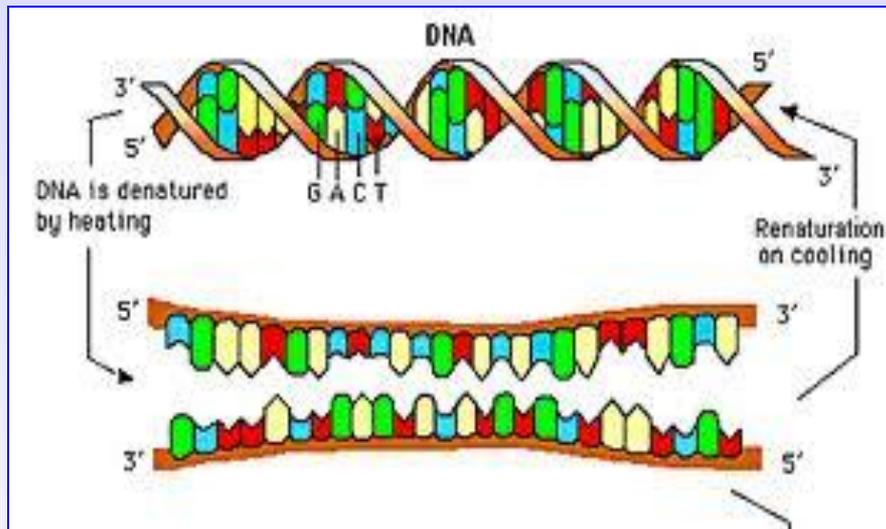
III. Другие мультиплексные методы

- ◆ Тканевой-microarray для параллельного анализа образцов тканей
- ◆ Клеточный-microarray для анализа клеточных ответов на различные БАВ

Биочипы для мультиплексного анализа ДНК

Технологии на основе гибридизации нуклеиновых кислот

Гибридизация нуклеиновых кислот — это процесс высокоспецифичного соединения *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности соединение происходит достаточно быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК



Геномный период развития методов мультиплексного анализа нуклеиновых кислот

Технологии на основе гибридизации нуклеиновых кислот



Progress in the Application of DNA Microarrays

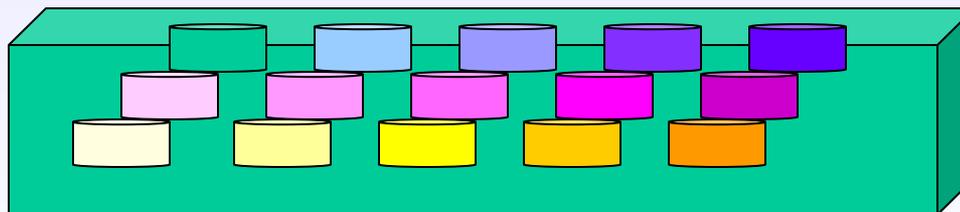
Edward K. Lobenhofer, Pierre R. Bushel, Cynthia A. Afshari, and Hisham K. Hamadeh

Laboratory of Molecular Carcinogenesis, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA

Microarray technology has been applied to a variety of different fields to address fundamental research questions. The use of microarrays, or DNA chips, to study the gene expression profiles of biologic samples began in 1995. Since that time, the fundamental concepts behind the chip, the technology required for making and using these chips, and the multitude of statistical tools for analyzing the data have been extensively reviewed. For this reason, the focus of this review will be not on the technology itself but on the application of microarrays as a research tool and the future challenges of the field. *Key words:* DNA chips, gene expression profiling, microarray, toxicogenomics. *Environ Health Perspect* 109:881–891 (2001). [Online 16 August 2001] <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2001/109p881-891lobenhofer/abstract.html>

Биочип (биологический микрочип, англ. biochip) — специальная матрица с нанесёнными молекулами нуклеиновых кислот или белков или других биомолекул для одновременного проведения на ней большого числа анализов

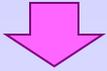
Биочипы с плотностью более 100 тест-объектов на 1 см² стали основой для microarray технологий



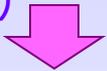
Лидером в изготовлении и продаже ДНК-чипов для мультиплексного анализа нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) многие годы является компания Affymetrix

Общая схема применения биочипов для мультиплексного анализа нуклеиновых кислот

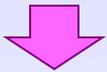
1. Изготовление нужного биочипа



2. Получение анализируемого набора нуклеиновых кислот (например, набора кДНК)



3. Проведение гибридизации на биочипе



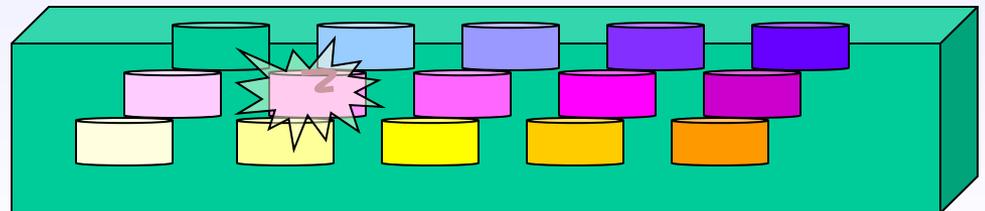
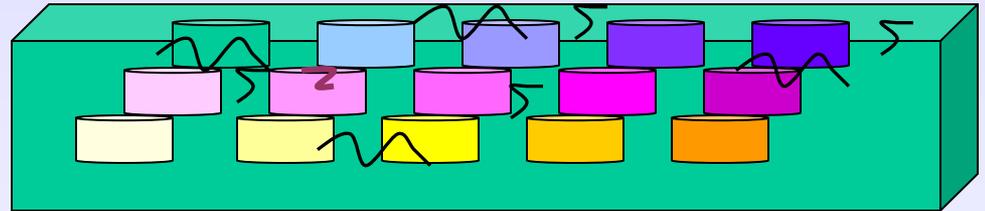
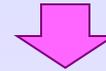
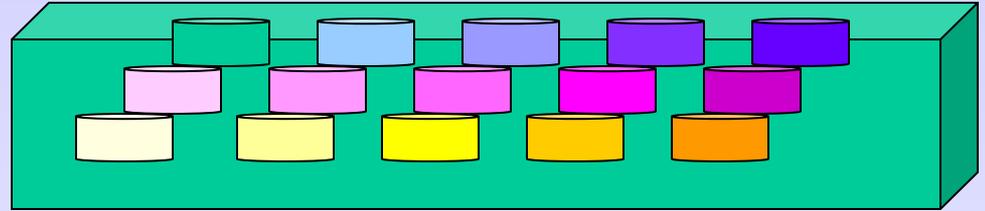
4. Отмывка несвязавшихся макромолекул



5. Регистрация продуктов гибридизации



6. Проведение итогов гибридизации (установление экспрессирующихся генов)



Для эффективной регистрации и анализа результатов, полученных с помощью ДНК-чипов разработано специальное высокопроизводительное оборудование

Методы мультиплексного анализа ферментов и других белков



◆ Мультиплексное определение белков на основе иммуноферментного анализа (ELISA и др.)

Первые публикации о так называемом твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) появились в 70-ые годы 20-ого века

Engvall E, Perlman P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8(9):871-4

Engvall, Eva, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, univ., Diss. Stockholm : Univ., Stockholm, 1975

Твердофазный иммуноферментный анализ, (ELISA) – находит широкое применение в современной клинической биохимии, например, для определения онкомаркеров или наличия бактерии *Helicobacter pylori*; используется также при диагностике язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

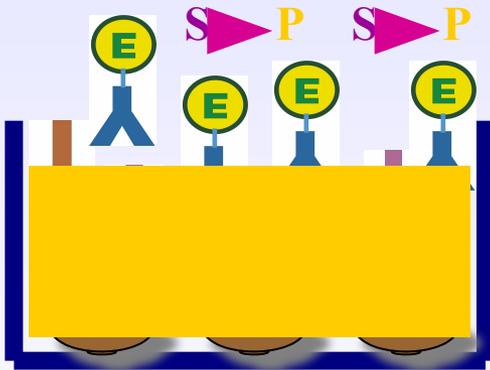
Dr. Eva Engvall earned her Ph.D. from the University of Stockholm in 1975. Her postdoctoral work was done at the University of Helsinki and City of Hope National Medical Center in California. For 1993-1996, Dr. Engvall held joint appointments at Sanford-Burnham Medical Research Institute and as Chairperson of the Department of Developmental Biology at Stockholm University.

Иммунохимические исследования белков

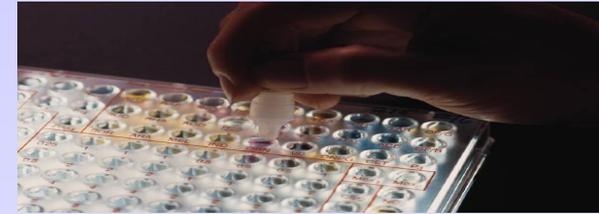
Основные схемы ИФА в модификация ELISA

I. Определение специфичных антител по реакции с соответствующим антигеном

1. Иммунизация антигена на пластике.
2. Обработка препаратом, содержащим исследуемые антитела.
3. Отмывка от неспецифической сорбции.
4. Обработка «вторыми» антителами.
5. Отмывка от неспецифической сорбции.
6. Добавление субстрата и ферментная реакция
7. Фотометрирование.

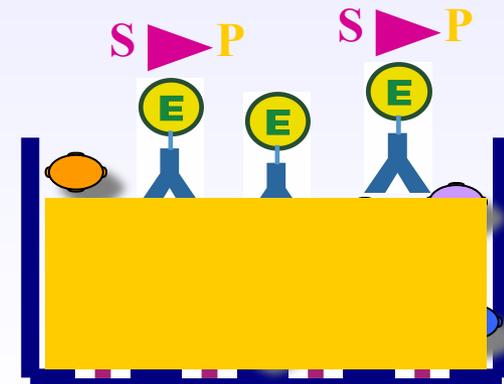


ИФА позволяет количественно измерять различные белки, у которых нет ферментной активности (антитела, гормоны, онкомаркеры, структурные белки и др.)



II. Определение специфичных антигенов по реакции с соответствующим антителами

1. Иммунизация антитела на пластике.
2. Обработка препаратом, содержащим исследуемые антигены.
3. Отмывка от неспецифической сорбции.
4. Обработка «вторыми» антителами.
5. Отмывка от неспецифической сорбции.
6. Добавление субстрата и ферментная реакция
7. Фотометрирование.



Метаболомика – одна из постгеномных научных дисциплин

Метаболомика стала отдельной научной дисциплиной, объектом исследований которой считают так называемые метаболические профили, отражающие содержание различных низкомолекулярных соединений (**Mm 80-1000 Da**, Trock B.J. Urol Oncol. 2011 ; 29(5): 572–581)— участников метаболизма (метаболитов) в клетках и организмах.

Иными словами, метаболомика - это «систематическое изучение уникальных химических „отпечатков пальцев“, которые специфичны для процессов, протекающих в живых клетках».

Термином метаболом обозначают совокупность всех метаболитов, являющихся продуктами обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме.

Метаболомика призвана решать одну из важных задач системной биологии и функциональной геномики — обеспечить с помощью биоинформатики интегрирование данных транскриптомики, протеомики и метаболической информации для получения более целостного представления о живых организмах.

Заключительные положения

- ◆ Мультиплексный анализ – это важнейший вид биохимических исследований, позволяющий одновременно (параллельно) измерять от нескольких десятков до нескольких десятков тысяч аналитов (ДНК, РНК, белки и др.) за один цикл исследования.
- ◆ Для обеспечения мультиплексного анализа широко применяются разные поточные технологии (array technologies) и так называемые биочипы, представляющие собой специальные матрицы с нанесёнными молекулами нуклеиновых кислот или белков или других биомолекул для одновременного проведения большого числа анализов.
- ◆ Мультиплексный анализ осуществляется с помощью высокопроизводительного ("High-throughput") оборудования, включающего, как правило, соответствующие системы детекции (например, планшетные ридеры) и компьютерное обеспечение.
- ◆ В клинической практике применение мультиплексного анализа открывает пути для качественного улучшения биохимического обследования пациентов в интересах ранней диагностики и контроля за результатами лечения.
- ◆ Метаболомика – это одна из динамично развивающихся постгеномных научных дисциплин, которая использует мультиплексный анализ для изучения метаболитов, являющихся субстратами и продуктами ферментных реакций, а также регуляторами активности ферментов.
- ◆ Изучение метаболомных профилей обеспечивает повышение качества диагностики и контроля за результатами лечения различных заболеваний