Artykuł przeglądowy *Review*

Mikromacierze DNA – nowe narzędzie badawcze w fizjologii i patologii

TOMASZ SADKOWSKI, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Sadkowski T., Motyl T.

DNA Microarray: a new tool in molecular physiology and pathology

Summary

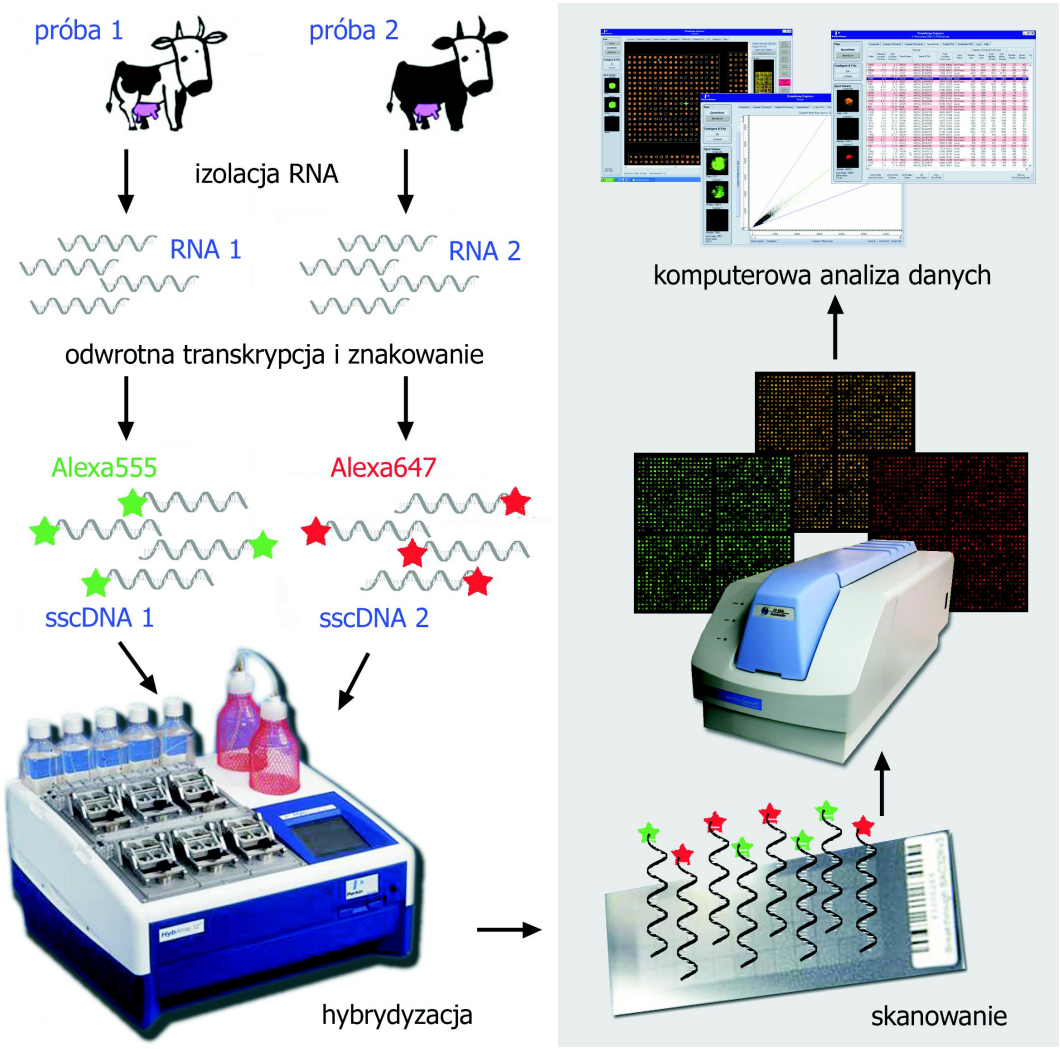
The aim of this review is to explain fundamentals of DNA microarray technique and indicate possibilities of its use in veterinary sciences. DNA microarray technology is a powerful tool for functional and structural genomics. It allows the analysis of an entire genome expression (transcriptomic profile) on one glass or plastic slide in a short period of time. It gives the opportunity to establish genes expression patterns characteristic for different physiological and pathological conditions and allows its use as a diagnostic tool. The use of expression microarrays gives the possibility to examine the influence of new treatment strategies in particular diseases and enables the assessment of advantages and disadvantages of this type of therapy. It also allows finding new targets (key proteins, enzymes) for newly developed drugs and makes possible the adaptation of a drug therapy to individual patients. By using DNA microarray technique it is possible to make a new hypothesis and to validate current ones. In this review the origin of the DNA microarray technique, its molecular basics, different kinds of microarray slides and analysis platform as well as the methodology of labeling and hybridization were described. This review may be very useful for people who are planning to use or are have already begun using DNA microarray technique.

Keywords: DNA microarray, gene expression, functional genomics, transcriptomic profile

Przełom XX i XXI wieku był nie tylko początkiem nowego tysiąclecia, stał się również początkiem nowej ery w dziedzinie badań transkryptomicznych – globalnej analizy ekspresji genów. Pomysł jednoczesnego badania ekspresji dużej liczby genów nie pojawił się jednak nagle. Naukowcy od wielu lat próbowali stworzyć metody badawcze, które pozwolą na analizę ekspresji wielu genów w jednym czasie, co umożliwiłoby nie tylko masową analizę ich stanu funkcjonalnego, ale również odczytanie ich wzajemnych relacji. Już w 1987 r. opublikowano pracę, której przedmiotem była analiza kilku tysięcy genów. Augenlicht i wsp. (2, 3) nanieśli na paski nitrocelulozy 4000 sklonowanych sekwencji cDNA, a badane próby pochodzące ze zmian nowotworowych w obrębie okrężnicy i zdrowej tkanki jelita wyznakowali radioaktywnie. Efektem ich pracy było opisanie różnic pomiędzy profilami transkryptomicznymi (transcriptomic profile) różnych typów histologicznych raka okrężnicy. Macierze tego typu nazywane są obecnie makromacierzami. W 1995 roku naukowcy ze Stanford University, USA (12), zaproponowali nowe narzędzie badawcze – mikromacierze DNA (DNA microarray) w formie jaką znamy dzisiaj – szklanej płytki z nadrukowanymi sekwencjami cDNA. Metoda analizy ekspresji genów przy pomocy mikromacierzy pozwoliła na jednoczesną ocenę aktywności kilkudziesięciu tysięcy genów w kilku powtórzeniach podczas jednej analizy. Nowe narzędzie w rękach badaczy pozwoliło na przeprowadzenie doświadczenia, do wykonania którego jeszcze kilka lat temu konieczne byłoby zaangażowanie kilkudziesięciu grup badawczych i czas mierzony w latach. Metoda ta otworzyła drogę do dynamicznego rozwoju genomiki funkcjonalnej (functional genomics).

Zasada metody

Analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA została przedstawiona światu w 1995 r., kiedy to w czasopiśmie Science opublikowano pionierską pracę zespołu prof. Patricka Browna (12). Metoda w swej istocie nie była jednak metodą nową. W połowie lat 70. Southern (13) wprowadził do biologii molekularnej metodę hybrydyzacji DNA (łączenia komplementarnych odcinków DNA). Metoda Southerna polega na rozdziale metodą elektroforezy w żelu DNA pochodzącego z próby, przeniesieniu DNA na membranę nitrocelulozową, a następnie hybrydyzacji roz-



Ryc. 1. Schemat analizy ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA

dzielonego elektroforetycznie DNA z wyznakowaną radioaktywnie sondą o znanej sekwencji, dodawaną do buforu hybrydyzacyjnego. Metoda ta pozwala na identyfikację aktywności pojedynczych genów. Analiza transkryptomu metodą mikromacierzy DNA polega dokładnie na tej samej zasadzie, z wyjątkiem kilku szczegółów. Sondy nie są dodawane do roztworu hybrydyzacyjnego, a są umieszczane na szklanej płytce. Badany materiał (cDNA) nie jest poddawany rozdziałowi elektroforetycznemu, a jest znakowany fluorochromami i dodawany do buforu hybrydyzacyjnego. Próby cDNA znakuje się najczęściej fluorochromami (Cy3 & Cy5, Alexa 555 & Alexa 647), rzadziej radioaktywnie czy innymi metodami. Podstawową różnicą jest jednak możliwa do zbadania w jednej analizie liczba prób. W klasycznej metodzie Southerna są to pojedyncze geny, w metodzie mikromacierzy DNA – cały genom lub znaczna jego część.

Analiza transkryptomu metodą mikromacierzy cDNA polega na przeprowadzeniu następujących etapów oddzielnie dla każdej próbki (na jedną mikromacierz nakłada się 2 próbki) (ryc. 1): pobranie materiału i właściwe przechowywanie, izolacja RNA i jego walidacja, odwrotna transkrypcja i uzyskanie cDNA, płukanie i pozbywanie się RNA, znakowanie fluorochromami, płukanie i odpłukiwanie nadmiaru fluorochromów, łączenie próbek i poddawanie ich hybrydyzacji (w międzyczasie, przed hybrydyzacją, należy przygotować szkiełka – prehybrydyzacja), odpłukanie szkiełek po hybrydyzacji, skanowanie i obróbka komputerowa uzyskanych wyników. Cały proces polega na przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji *in vitro*, przepisaniu informacji z mRNA na cDNA, wbudowaniu w powstałe, jednoniciowe odcinki cDNA (sscDNA – single strand complementary DNA) fluorochromów, a następnie poddaniu zmieszanych prób procesowi hybrydyzacji, podczas którego wyznakowane odcinki cDNA próby połączą się komplementarnie z sondami na mikromacierzy. Połączone z sondami cDNA fluorochromy, pod wpływem impulsów światła wzbudzanego przez lasery w skanerze ulegają świeceniu, które odczytywane jest przez specjalne wysokoczułe detektory i zamieniane na sygnał elektroniczny – obraz, który podlega dalszej analizie (ryc. 1).

Mikromacierze DNA

Mikromacierzami DNA nazywamy szklane lub plastikowe płytki wielkości mikroskopowego szkiełka podstawowego, na których w znanej kolejności (w rzędach i kolumnach tworzących submacierze), metodą kontaktową lub piezoelektryczną (podobną do tej stosowanej w drukarkach atramentowych) nanoszone zostają jednoniciowe sondy cDNA (w przypadku macierzy cDNA) lub metodą fotolitografii syntetyzowane są bezpośrednio na płytkach kilkudziesięcionukleotydowe sondy, w przypadku macierzy oligonukleotydowych, tzw. chipów DNA (GeneChip® Affymetrix). Długość sond cDNA waha się w granicach 500-5000 nukleotydów. Przygotowanie sond do umieszczenia na mikromacierzy cDNA jest stosunkowo proste, lecz, niestety, bardzo pracochłonne. W celu wykonania własnej mikromacierzy cDNA należy stworzyć bibliotekę EST (expressed sequence tag). Najpierw izoluje się

całkowity mRNA z komórek, dla których konstruuje się bibliotekę, następnie przeprowadza się reakcję odwrotnej transkrypcji i klonowanie uzyskanych fragmentów cDNA w kompetentnych komórkach. Odzyskane z wektorów wstawki cDNA amplifikuje się i umieszcza w postaci spotów na płytce mikromacierzy. Szklane płytki powleka się z reguły poli-L-lizyną, do której cDNA zawieszone w 3xSSC wiąże się spontanicznie podczas procesu drukowania mikromacierzy (9). Wadą tej metody jest konieczność przygotowania każdej sondy oddzielnie, co pochłania olbrzymie ilości czasu. Zaletą natomiast jest fakt, iż płytki przygotowane w ten sposób są stosunkowo tanie i można przy ich użyciu identyfikować aktywność nie opisanych do tej pory genów, nawet tych o nieznanej sekwencji nukleotydowej. Z reguły na jednej płytce cDNA umieszcza się od kilkuset spotów (płytki profilowane) do kilkunastu (ogólny profil transkryptomiczny) tysięcy sond DNA. Geny reprezentowane są zwykle przez jedną lub dwie sondy, a więc jedno lub dwa powtórzenia w ramach jednej płytki.

Mikromacierze oligonukleotydowe zbudowane są z oligomerów, 25-70 oligonukleotydowych sond syntetyzowanych metodą fotolitografii bezpośrednio na plastikowej płytce. Metoda fotolitografii polega na specyficznej aktywacji światłem lasera ostatnich nukleotydów syntetyzowanych sond i przyłączaniu żądanych nukleotydów tworzących w ten sposób specyficzną dla danej próby sondę. W przypadku mikromacierzy tego typu gęstość zadruku jest bardzo duża. Firma Affymetrix produkuje obecnie chipy DNA, na których umieszcza ponad milion oligonukleotydowych sond, występujących w kilku powtórzeniach typu perfect-match (właściwa sekwencja sondy, komplementarna z próbą) i miss-match (sondy różniące się jednym nukleotydem od sondy właściwej, służące do określenia specyficzności hybrydyzacji odcinków wyznakowanego cDNA pochodzącego z badanej próby do sond na szkiełku). Agilent, kolejna z wiodących firm na rynku mikromacierzy, przygotowała ostatnio mikromacierze zawierające 244 tysiące sond i umieściła cztery odrębne kopie takich macierzy na jednym szkiełku, co pozwala na jednoczesne przeprowadzenie czterech różnych analiz lub powtórzeń eksperymentalnych. Niewątpliwą zaletą macierzy oligonukleotydowych jest ich specyficzność i gęstość, a przez to możliwość stosowania wielu sond (powtórzeń) dla jednego genu. Sondy takie umieszcza się w różnych miejscach na płytce, aby jednocześnie móc wnioskować o jakości przygotowania mikromacierzy i odrzucić takie dane, które mają charakter artefaktów powstałych w wyniku złej jakościowo analizy – spoty (sondy) zawierające tę samą sekwencję nukleotydów powinny hybrydyzować podobnie niezależnie od lokalizacji na macierzy. Dodatkowo na każdym z wymienionych typów mikromacierzy umieszcza się spoty kontrolne, negatywne – zawierające sam bufor wiążący sondę ze szkiełkiem (spotting buffer) oraz spoty będące kontrolą pozytywną. DNA użyte jako próba pozytywna nie może występować w badanym organizmie. W innym rodzaju spotów kontrolnych typu alien znajduje się obce dla danego organizmu DNA, najczęściej na macierzach zwierzęcych jest to DNA roślinne, a na macierzach roślinnych – zwierzęce. Odcinki DNA służące do przygotowania sond typu alien muszą być specyficzne dla organizmów, z których pochodzą i muszą posiadać sekwencje nukleotydowe nie spotykane u organizmów, dla których skonstruowano daną mikromacierz. Powszechne jest zastosowanie wielokrotnych powtórzeń sond reprezentujących sekwencje genów, które niezależnie od tkanki i stanu fizjologicznego charakteryzują się podobnym poziomem ekspresji, tj. genów odpowiedzialnych za podstawowe przemiany czy takich, których produkty biorą udział w budowie struktur komórkowych (housekeeping genes). Porównanie intensywności hybrydyzacji badanych prób z sondami specyficznymi dla housekeeping genes może być doskonałym narzędziem normalizacji wykonywanych niezależnie mikromacierzy.

Pod względem funkcjonalności na rynku występują dwa systemy analizy mikromacierzy: zamknięte i otwarte. Systemy zamknięte (np. Affymetrix) charakteryzują się tym, iż zarówno urządzenia, jak i chipy DNA pochodzą z jednej tylko firmy, są przez nią produkowane i dystrybuowane. W systemach takich nie można używać chipów innych dystrybutorów. Te oferowane przez producenta systemu zamkniętego są najczęściej wysokiej jakości, zawierają różnego rodzaju sondy (spoty) kontrolne, są wszechstronnie zwalidowane, posiadają doskonale zorganizowane wsparcie techniczne. Niestety, są one drogie, i – co ważniejsze, tworzone dla głównych organizmów modelowych – np. człowiek, mysz, szczur. W konsekwencji jeśli badany przez nas organizm nie należy do tej grupy, platforma taka będzie nieużyteczna. Chipy DNA produkowane dla systemów zamkniętych są mikromacierzami oligonukleotydowymi, a więc syntetyzowanymi *in situ* na podstawie znanych sekwencji DNA, stąd też przygotowywane są dla organizmów, których genom całkowicie lub w dużym stopniu został już zsekwencjonowany. Systemy otwarte (np. Agilent, Perkin-Elmer, Axon, Bio-Rad) charakteryzują się tym, że jeśli zajdzie taka potrzeba, możemy zakupić macierz w dowolnej firmie, dla dowolnego organizmu i po ustawieniu metody hybrydyzacji analizować ekspresję genów interesującego nas organizmu. Użytkowanie takich systemów jest z reguły tańsze i pozwala na większą swobodę działania. Niestety, nie ma w tym przypadku korzyści, jakie daje praca w systemie zamkniętym, ponieważ często brak jest cennej pomocy ze strony producenta i częściej trzeba polegać na własnych umiejętnościach i doświadczeniu. Firmy biotechnologiczne zajmujące się projektowaniem, drukowaniem i dystrybucją mikromacierzy wychodzą ostatnio coraz bardziej naprzeciw klientowi, proponując tworzenie szkiełek z własnym profilem genowym. Przykładem

takiego serwisu jest portal eArray udostępniony przez firmę Agilent. Z poziomu przeglądarki internetowej możemy tu zaprojektować macierz z wybranym przez nas zestawem genów, a następnie wysłać zamówienie na wydrukowanie takich płytek. Niestety, użycie w ten sposób przygotowanych mikromacierzy nie jest możliwe w systemach zamkniętych.

Kolejny podział mikromacierzy uwzględnia cel ich przygotowania: mikromacierze ekspresyjne (badające ekspresję genów) i służące do genotypowania, np. do wykrywania polimorfizmów typu SNP (single nucleotide polimorphism), aberracji chromosomowych (comparative genome hybridization), interakcji białko-DNA (chromatin immunoprecipitation), identyfikacji alternatywnych form „splicingu", metylacji DNA oraz profili mikroRNA (6, 8). Technicznie istnieją dwa sposoby znakowania i odczytu mikromacierzy DNA. W procesie tym wykorzystuje się np. fluorochromy, które mają zdolność wiązania z kwasami nukleinowymi (Cy3, Cy5; AlexaFluor 555, AlexaFluor 647). Do sond na płytce można hybrydyzować materiał z jednej tylko próby – mikromacierze jednobarwne, jak również z dwóch porównywanych ze sobą prób – macierze dwubarwne. Odczyt w przypadku mikromacierzy jednobarwnych polega na oddzielnym skanowaniu każdej wyznakowanej jednym fluorochromem płytki i łączeniu wyników z dwóch płytek w dalszej analizie porównawczej, zaś w przypadku mikromacierzy dwubarwnych, na następującym po sobie zeskanowaniu każdego fluorochromu i automatycznym oszacowaniu uzyskanych wyników. W wyniku skanowania macierzy dwubarwnej uzyskuje się oddzielne obrazy dla każdej próby, na których spoty „świecą" umownymi kolorami na zielono (pierwsza próba – Cy3/A555) i na czerwono (druga próba – Cy5/A647). Natężenie fluorescencji jest proporcjonalne do liczby ulegających hybrydyzacji do matrycy wyznakowanych cząsteczek cDNA czy cRNA. Komputerowe nałożenie obrazu zielonego na obraz czerwony pozwala na wizualizację różnic w ekspresji genów manifestującej się różnymi kolorami spotów. Świecenie spotu na zielono lub na czerwono oznacza, iż obserwowana jest aktywność danego genu tylko w jednej z badanych prób (wyznakowanej na zielono lub czerwono). Kolory pośrednie (odcienie koloru żółtego i pomarańczowego) oznaczają, iż gen ulega ekspresji w obydwu badanych próbach. Jeżeli ekspresja w obydwu próbach jest bardzo zbliżona lub taka sama, wtedy obserwujemy spoty w kolorze żółtym. Jeżeli w którejś z prób badany gen ulega wyższej ekspresji niż w drugiej, wtedy pojawia się „świecenie" w odcieniach pomarańczowego (gdy dominuje ekspresja genu w tkance wyznakowanej na czerwono) lub żółto-zielonego (gdy dominuje ekspresja genu w tkance wyznakowanej na zielono) (ryc. 1). Różnorodność systemów do analizy mikromacierzy DNA, jak i mnogość alternatywnie przygotowywanych chipów spowodowała, iż aktualnie stosuje się różne metody ich detekcji: fluorescencja, chemiluminescencja, detekcja radioaktywna, kolorymetryczna czy inne.

Analiza danych

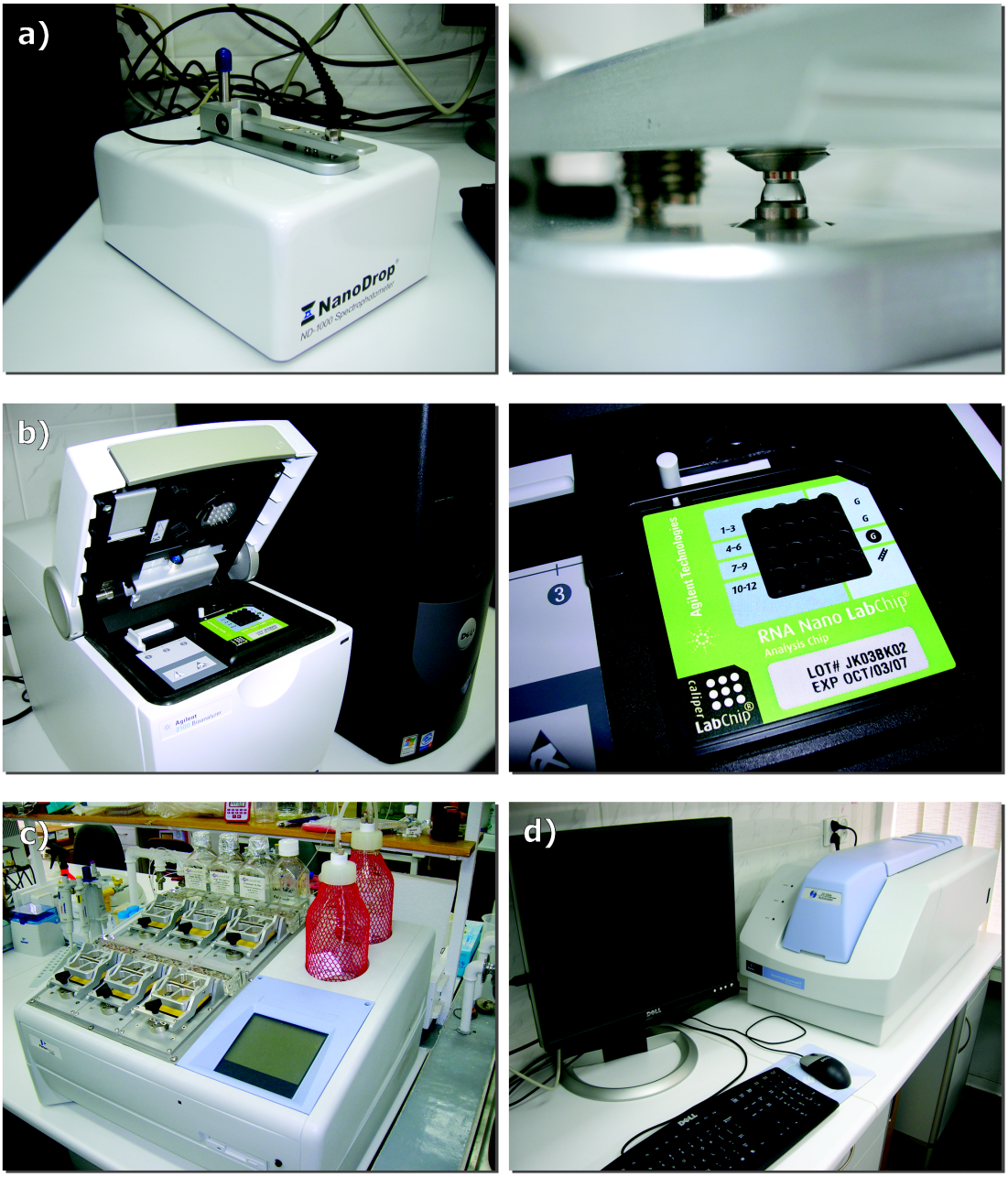
Niestety, ciągle jeszcze nie zostały opracowane standardy analizy, prezentacji i porównywania wyników otrzymanych metodą mikromacierzy DNA. Z tego powodu porównanie wyników uzyskanych z takiego samego materiału, ale w różnych laboratoriach, dokonujących analizy różnymi metodami może być trudne. Dlatego też przed przystąpieniem do obróbki wyników eksperymentu prowadzonego przy pomocy metody mikromacierzy DNA należy zapoznać się z proponowanymi przez specjalistów sposobami normalizacji, analizy i walidacji uzyskanych wyników, i rozważyć te najbardziej adekwatne w stosunku do planowanego eksperymentu. Istnieje wiele komercyjnych i bezpłatnych programów do obróbki, walidacji i prezentacji danych pochodzących z analiz metodą mikromacierzy DNA. Popularnym oprogramowaniem komercyjnym, choć dość drogim jest GeneSpring (Agilent, USA), który wyposażony jest we wszystkie niezbędne do takiej analizy funkcje. W Internecie dostępnych jest również wiele darmowych programów spełniających poszczególne funkcje oprogramowania komercyjnego, umożliwiających odczytywanie wyników (nakładanie siatek identyfikujących geny), ich analizę, walidację czy wreszcie odpowiednią prezentację. Oprogramowanie takie można znaleźć na stronach internetowych poświęconych tematyce mikromacierzy DNA (1, 4).

Pracownia genomiki funkcjonalnej

Jak już wspomniano na wstępie, wiele pracowni na świecie rutynowo analizuje ekspresję genów metodą mikromacierzy DNA. W Polsce są nieliczne laboratoria, które specjalizują się w analizie badanego materiału metodą mikromacierzy DNA. W chwili obecnej skompletowanie pracowni mikromacierzy DNA wymaga dość dużych nakładów finansowych, jako że koszty te kształtują się na poziomie 1 miliona złotych. Przygotowanie własnego laboratorium do analizy metodą mikromacierzy DNA wymaga zaopatrzenia w następujące urządzenia:

a) Urządzenia niezbędne do pobierania i przechowywanie pozyskanego materiału, jak i izolatów RNA (naczynie Dewara, zamrażarka –80°C, homogenizator, blok grzejny, komora laminarna, maszyna do produkcji lodu (o ile to możliwe wszelkie czynności związane z izolacją i pracą z RNA wykonuje się na lodzie), mała, wysokoobrotowa wirówka z chłodzeniem, wydajny zestaw do izolacji i oczyszczania całkowitego RNA.

b) Sprzęt do analizy ilościowej i jakościowej uzyskanego izolatu RNA: spektrofotometr NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA), przy pomocy którego można oznaczyć ilość RNA, DNA czy białka w 1 µl próby. Jest to bardzo oszczędne urządzenie, jeśli chodzi o uszczuplenie badanej próby, co przy objętości roboczej próby rzędu 20 µl nie jest bez znaczenia (ryc. 2a).



Ryc. 2. Urządzenia niezbędne w pracowni mikromacierzy DNA; a) spektrofotometr NanoDrop; b) Bioanalizator; c) hybrydyzator mikromacierzy; d) skaner mikromacierzy

c) Sprzęt do analizy integralności RNA. Urządzeniem, które jako pierwsze pojawiło się na rynku i wydaje się idealnym do tego celu, jest Bioanalyzer (Agilent, USA). Urządzenie to wykorzystuje technikę Lab-Chip opracowaną przez firmę Agilent. Analiza RNA w czasie rzeczywistym pozwala na oszacowanie jego stężenia, jakości i integralności (RIN – *RNA integrity number*). W zależności od uzyskanych ilości RNA można przejść do właściwego doświadczenia lub przygotować izolat do dalszych analiz poprzez zagęszczenie. W tym celu należy użyć koncentratora. W uzyskanym w ten sposób materiale należy ponownie oznaczyć stężenie RNA (ryc. 2b).

d) Po uzyskaniu RNA o odpowiednim stężeniu i wysokiej jakości można przystąpić do analizy ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA. Niezbędne do tego urządzenia: termocykler, wirówka mała, instalacja sprężonego powietrza lub powietrze w sprayu, wirówka duża na probówki 50 ml (suszenie płytek), zestawy pipet, timer, blok grzejny, automatyczny hybrydyzator (ryc. 2c) lub piec hybrydyzacyjny z komorami hybrydyzacyjnymi, odczynniki do odwrotnej transkrypcji, oczyszczania, znakowania, hybrydyzacji i płukania gotowych mikromacierzy.

e) Odczyt mikromacierzy i analiza danych: skaner mikromacierzy (ryc. 2d), wysoko wydajny sprzęt komputerowy, oprogramowanie do analizy danych uzyskanych metodą mikromacierzy DNA.

Pracownia genomiki funkcjonalnej powinna być podzielona na ciągi technologiczne, tak aby praca wykonywana była sprawnie, a miejsca wykonywania jej poszczególnych etapów były oddzielone od siebie – np. izolacja RNA w przeznaczonej tylko do tego komorze. Stanowisko do oznaczeń stężenia i jakości RNA, stanowisko do pracy z badaną próbką – oczyszczanie, znakowanie, stanowisko do hybrydyzacji. Podział pracowni na ciągi technologicznie znacznie ułatwia pracę i zmniejsza ryzyko pomyłek i kontaminacji. Wiadome jest, iż cyjanina 5 (Cy5, Alexa 647) jest wrażliwa na podwyższony poziom ozonu, dlatego też nie jest wskazane, aby pracownia taka znajdowała się w bezpośredniej bliskości jego źródeł – np. kserokopiarki (5). Pracownia powinna być utrzymywania w należytej czystości, gdyż wszechobecne RNazy oraz kontaminacja pyłem i kurzem powodują, iż podczas odczytu intensywności świecenia hybryd DNA-DNA (DNA-RNA) oprócz właściwych spotów skanowane są także dodatkowe świecące punkty, które uniemożliwiają lub znacznie utrudniają analizę uzyskanych wyników.

Podstawy planowania eksperymentu z użyciem mikromacierzy DNA

Sukces analizy ekspresji genów metodą mikromacierzy DNA uzależniony jest od odpowiedniego zaplanowania eksperymentu. Należy bowiem dokładnie zastanowić się, jakich wyników się oczekuje, jakiego typu macierzy chce się użyć, czy uzyskane wyniki (czasem kilkaset genów) wniosą coś nowego do pracy. Istnieje bowiem ewentualność, że nie będzie zmian na poziomie transkryptomu, a uzyskane wyniki nie będą dotyczyły przewidywanej przez nas grupy genów.

Krytycznym etapem, bezpośrednio wpływającym na jakość analizy jest pobranie materiału i właściwe z nim postępowanie. Jest ono kluczowe dla finalnej jakości eksperymentu, gdyż błąd na tym etapie naraża badaczy na utratę materiału do badań, a w gorszym przypadku, na wykonanie na materiale złej jakości kosztownych oznaczeń, których wyniki będą nadawały się jedynie do wyrzucenia. Dlatego też przed przystąpieniem do pobierania tkanek należałoby zapoznać się z literaturą dotyczącą metod pobierania, przechowywania i izolacji RNA z różnego rodzaju materiałów biologicznych. Zaniechanie tego może już na samym początku zakończyć eksperyment, gdyż złe pobranie, transport, przechowywanie czy też dobranie nieodpowiedniego zestawu do izolacji RNA może spowodować, iż nie uda się wyizolować próby odpowiedniej jakości (degradacja RNA). Pobierając materiał należy również mieć na uwadze fakt, jak duża ilość RNA jest niezbędna do przeprowadzenia analiz. Chodzi nie tylko o liczbę powtórzeń, ale również o to, czy mamy opanowaną metodę izolacji i jak dużo materiału zużyjemy nim zaczniemy izolować RNA dobrej jakości, jaka jest charakterystyka materiału, z którym chcemy pracować (zob. literatura), ile RNA jesteśmy w stanie wyizolować z jednej próbki oraz czy będziemy wykonywać dodatkowe oznaczenia: Real-Time PCR czy Western blot? Odpowiedź na powyższe pytania jeszcze przed przystąpieniem do eksperymentu pozwoli uchronić nas przed błędami, które będą rzutować na ostateczne wyniki eksperymentu. Poruszone powyżej problemy dotyczą jedynie etapu wstępnego analizy ekspresji genów metodą mikromacierzy, gdyż nie ma możliwości opisania ich w szerszej formie na kilku stronach tekstu. Mają one jedynie zasygnalizować, iż proces analizy genów metodą mikromacierzy nie jest tak prosty jak się może wydawać i należy go poprzedzić dobrym przygotowaniem merytorycznym i najlepiej praktycznym. Niestety, do rozwiązań wielu kluczowych dla analizy problemów trzeba dochodzić we własnym laboratorium metodą prób i błędów.

Podsumowanie

Dzisiaj, gdy technika mikromacierzy pojawia się już w polskich ośrodkach naukowych, ukazują się pierwsze publikacje (7, 9, 11) i niektóre laboratoria przekształcają się w laboratoria specjalistyczne, rutynowo pracujące tą metodą, wydaje się tylko kwestią czasu, gdy metoda ta trafi do powszechnego użycia i umożliwi lekarzom klinicystom weryfikację stawianych diagnoz i pomoc w leczeniu przypadków, których rozpoznanie jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe, a od którego zależy dalszy sposób skutecznej, rokującej pozytywnie, dostosowanej dla konkretnego osobnika terapii. Mikromacierze DNA mogą okazać się nieocenionym narzędziem molekularnej diagnostyki weterynaryjnej, testowania nowych leków (farmakogenomiki) czy też dietetyki weterynaryjnej (nutrigenomika).

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie jest w posiadaniu w pełni wyposażonej pracowni mikromacierzy DNA. Wszystkich zainteresowanych tematyką mikromacierzy DNA zapraszamy do współpracy, oferując zarówno kompletnie wyposażone laboratorium genomiki funkcjonalnej, jak i specjalistyczną wiedzę w tym zakresie. Informacje i kontakt pod adresem http://www.genomika.info.

Piśmiennictwo

1. *Allison D. B., Cui X., Page G. P., Sabripour M.*: Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. Nature Rev. Genet. 2006, 7, 55-65.
2. *Augenlicht L. H., Taylor J., Anderson L., Lipkin M.*: Patterns of gene expression that characterize the colonic mucosa in patients at genetic risk for colonic cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88, 3286-3289.
3. *Augenlicht L. H., Wahrman M. Z., Halsey H., Anderson L., Taylor J., Lipkin M.*: Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro. Cancer Res. 1987, 47, 6017-6021.
4. *Chaudhuri J. D.*: Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. Med. Sci. Monit. 2005, 11, RA52-62.
5. *Fare T. L., Coffey E. M., Dai H., He Y. D., Kessler D. A., Kilian K. A., Koch J. E., LeProust E., Marton M. J., Meyer M. R., Stoughton R. B., Tokiwa G. Y., Wang Y.*: Effects of atmospheric ozone on microarray data quality. Anal. Chem. 2003, 75, 4672-4675.
6. *Hoheisel J. D.*: Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. Nature Rev. Genet. 2006, 7, 200-210.
7. *Jarzab B., Wiench M., Fujarewicz K., Simek K., Jarzab M., Oczko-Wojciechowska M., Wloch J., Czarniecka A., Chmielik E., Lange D., Pawlaczek A., Szpak S., Gubala E., Swierniak A.*: Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. Cancer Res. 2005, 65, 1587-1597.
8. *Jayapal M., Melendez A. J.*: DNA microarray technology for target identification and validation. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2006, 33, 496-503.
9. *Murawska A., Tyburski J., Budzynski T., Jarkiewicz-Tretyn J., Donderski W., Tretyn A.*: Applying the microarray (chip) DNA technique for bacteriological examinations of food stuffs. Medycyna Wet. 2004, 60, 481-484.
10. *Pawliczak R., Kowalski M. L.*: Badanie ekspresji genów metodą microarray – perspektywy wykorzystania w medycynie. Alergia Astma Immunologia 2001, 6, 77-85.
11. *Sadkowski T., Jank M., Oprządek J., Motyl T.*: Age-dependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile. J. Physiol. Pharmacol. 2006, 57 Suppl 7, 95-110.
12. *Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.*: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995, 270, 467-470.
13. *Southern E. M.*: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 1975, 98, 503-517.

Adres autora: prof. dr hab. Tomasz Motyl, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: tomasz_motyl@sggw.pl