

Сайдсұлтанова Ж.С., Галиева Л.Д., Тезекбаева Б.К., Шарафутдинова Д.А., Малахова Н.П. Бидайдың клеткалық культураларындағы супероксиддизмутаза (СОД) ферментінің белсенділік деңгейіне қолайсыз жағдайлардың әсері.....	232
Табыс Д., Бейсембаева Р.У., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Топырақ микроорганизмдерін арахидон қышқылының көзі ретінде зерттеу.....	235
Тайпакова С.М., Жанаева А.Б., Бисенбаев А.К. Клонирование и экспрессия КДНК эндо-β-1,4-глюканазы гриба <i>Aspergillus niger</i> в <i>E. coli</i> и характеристика рекомбинантного белка.....	239
Треножникова Л.П., Айткельдиева С.А., Хасенова А.Х., Шакиев С.Ш., Ултанбекова Г.Д., Саданов А.К. Перспективы исследования экстремофильных микроорганизмов в Казахстане.....	244
Ұлтанбекова Г.Д., Саданов А.К., Гаврилова Н.Н., Шорабаев Е.Ж., Усикбаева М.А. Жоғары өнімді азотсіңіретін кең спектрлі бейімделгіш симбиозды өсімдік-микробты жүйені таңдап алу технологиясы.....	247
Шығаева М.Х., Сағындықова С.З., Дүйсекенова А.Б. «Софмайя» шұбат сусынын дайындаудың ғылыми негізі.....	248
Шығаева М.Х., Сағындықова С.З., Дүйсекенова А.Б. Изучение микроорганизмов фарша из осетровых рыб.....	251
НАНОТЕХНОЛОГИЯ	
Gilmanov M. K., Gilmanova S.M., Tutkyshbaev S.O., Kaster, Begzat A.N. The new nanocapsules for succesful therapy of spinal tuberculosis	253
Жандосов Ж.М., Керимкулова А.Р., Бийсенбаев М.А., Мансуров З.А., Жубанова А.А. Возможность использования углеродного материала на основе абрикосовых косточек в процессе гемоперфузии.....	256
Жандосов Ж.М. Синтез углеродных материалов из скорлупы грецких орехов путем карбнизации в присутствии фосфорной кислоты	259
Зарубина А.П., Лукашев Е.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Рубин А.Б., Шойынбекова С.А., Жылқыбаев О.Т. ² , Құрманқұлов Н.Б.. Люминесцентті бактериялардың тест-жүйелерін пайдаланып бір қабатты көміртекті нанотүтікшелердің биологиялық эффектерін биотестілеу.....	262
Заядан Б.К., Маторин Д.Н., Болатхан К., Садвакасова А.К., Усербаева А.А., Балтабекова А.Ж. Влияние наночастиц серебра и золота на параметры флуоресценции хлорофилла мутантов зеленой микроводоросли <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dang	267
Каиров У.Е., Зиновьев А.Ю., Карпенюк Т.А., Раманкулов Е.М. ДНК-микрочипы: от основ технологии к анализу данных	270
Керимкулова А.Р., Султанова Н.А., Гильманов М.К., Мансуров З.А., Абилов Ж.А., Жусупова Г.Е., Бурашева Г.Ш., Жандосов Ж.М., Ескалиева Б.К. Применение наноструктурированных углеродных адсорбентов для выделения биомолекул и лекарственных растительных субстанций	274
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ	
Алдибекова К.Н. Электромагниттік өрісті геоаномальды бөлімдердің техногендік ерекшеліктерін зерттеу.....	278
Атабаева С.Д., Кенжебаева С.С. Трансгенные растения для фиторемедиации.....	280
Атамбаева Ш.А. Свойства онкогенов рака молочной железы	285
Бари А.А., Хайленко В.А., Иващенко А.Т. Характеристики связывания miR414 с mRNA генов хромосомы 4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	288
Берилло О.А., Исабекова А.С., Хайленко В.А., Иващенко А.Т. Характеристики связывания межгенных, интронных и экзонных miRNA с mRNA генов, кодирующих интронные miRNA	292
Богуспаев К.К., Фалеев Д.Г., Перова И.А., Ережепов Д.А. Влияние биогумуса на поглощение тяжелых металлов (Cd, Zn) гиперкумулятором тяжелых металлов <i>Helianthus annuus</i> L	300
Богуспаев К.К., Касымбеков Б.К., Фалеев Д.Г., Оразова С.Б., Ишангалиева С.С., Перова И.А. Влияние эндомикоризы на некоторые биохимические показатели растений <i>Avena sativa</i> L. И <i>Phaseolus vulgaris</i> L. при почвенном загрязнении тяжелыми металлами в условиях лабораторного эксперимента	304
Исабекова А.С., Хайленко В.А., Иващенко А.Т. Связывание межгенных microRNA человека с сайтами mRNA генов, участвующих в развитии рака толстой кишки	307
Карпенюк Т.А., Гончарова А.В., Джокебаева С.А., Бейсембаева Р.У., Оразова С.Б. Поиск микроводорослей и микроорганизмов, синтезирующих арахионовую кислоту и ее производные	312
Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А., Ловинская А.В., Калимагамбетов А.М. Содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в печени лабораторных крыс при воздействии фипронила и фипронил-сульфона	316
Нурмаханова А.С., Атабаева С.Ж., Айдосова С.С., Махашова А., Қалдыбекқызы Г., Кенжебаева С.С., Асрандина С.Ш., Чунетова Ж.Ж. Тұздану және мыс иондарының әртүрлі бидай сорттарының өсуіне әсері	319
Оразова С.Б., Джокебаева С.А., Ақтамбаева А., Джумабаева Л., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Балдырлардың моно- және аралас дақылдарындағы липидтердің жинақталуы	323
Романова С.М. Значение гидрохимических и гидробиологических показателей для исследования качества	327

У.Е. Каиров^{1,3}, А.Ю. Зиновьев², Т.А. Карпенюк¹, Е.М. Раманкулов³
ДНК-МИКРОЧИПЫ: ОТ ОСНОВ ТЕХНОЛОГИИ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ

(¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы Казахстан, ²«Институт Кюри», г. Париж, Франция, ³РГП «Национальный центр биотехнологии РК», г. Астана, Казахстан)

В статье приведены данные о технологиях создания и использования ДНК-микрочипов для изучения качественных и количественных характеристик генома и транскриптома при различных физиологических состояниях клеток и тканей.

В настоящее время развитие биотехнологии и биомедицины тесно связано с реализацией новых подходов в постгеномных исследованиях. Благодаря возможности исследования ДНК и широкому скринингу генной активности с помощью новых методов, не только функциональная характеристика целых геномов, но и диагностика социально значимых заболеваний переходит на новый уровень, позволяющий дифференцировать симптоматически и морфологически неразличимые формы.

Одним из таких инструментов является технология высокоплотных микрочипов (Рисунок 1). ДНК-микрочип – это структурированная матрица с иммобилизованными нуклеиновыми кислотами, называемыми пробами, механически или *in situ* нанесенными на плоский и твердый субстрат в виде стекла или силикона [1-3].

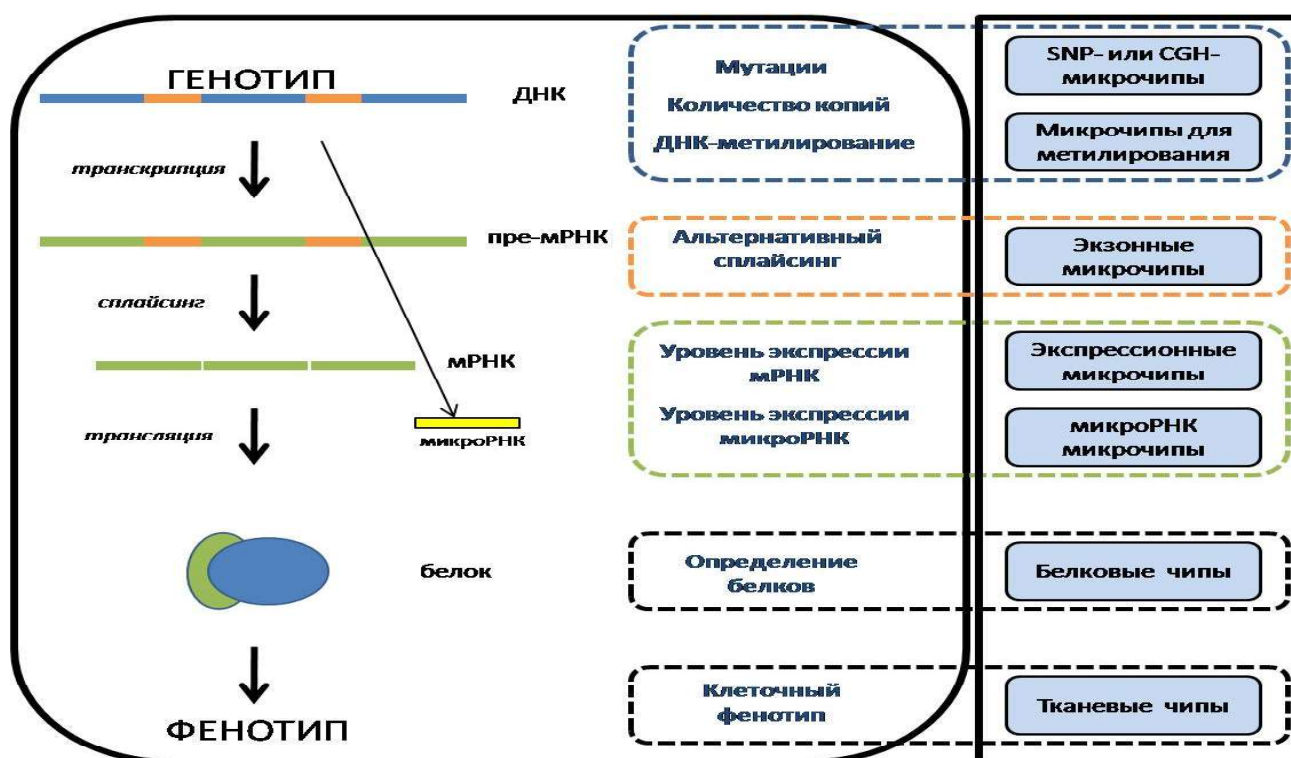


Рисунок 1. Схема разнообразия микрочипов и их ассоциация с клеточными процессами

В настоящее время, существуют четыре доминирующие компании по производству микрочипов (Affymetrix [6], Agilent Technologies [7], Illumina [8] и Roche Nimblegen [9]). Несмотря на то, что каждая компания использует различные методы производства микрочипов, принцип действия и механизм использования остается одинаковым. То есть, для отличия и разделения одного участка нуклеиновой кислоты используется реакция гибридизации нуклеиновых кислот. На основе этой реакции разработаны приложения с использованием микрочипов, которые включают такие подходы, как профилирование генной экспрессии [10], сравнительная геномная гибридизация [11], детекция полиморфизма единичного нуклеотида [12] и детекция взаимодействия между белком и нуклеиновой кислотой [13].

Основной принцип технологии микрочипов состоит в следующем: участки ДНК, РНК или белок (проба) наносятся на твердую основу (чип), выполненную из стекла, пластика или силикона [1-3]. Такой комплекс может выступать как специфический репортер для определения количества копий ДНК или для измерения экспрессии известного гена или количества белка. Пробы, как правило,

отбираются специфично с целью последующего количественного определения сигналов с исследуемых образцов. В случае ДНК или РНК проб, специфичность обеспечивается благодаря комплементарности между последовательностью пробы и исследуемой последовательностью, в случае белков – комплементарностью с соответствующим антителом. Пробы амплифицируют и размещают на микроскопическом участке чипа (ячейка). Затем, ДНК, РНК или белки выделяют из экспериментального образца и проводят гибридизацию на чипе. Если участок ДНК или РНК или белок представлен в образце, то произойдет фиксация с соответствующей пробой. Тысячи и даже миллионы таких ячеек на микрочипе, представляют собой высокопроизводительное средство для масштабного геномного скрининга.

Разработки в области технологии микрочипов стремительно развиваются и регулярно описываются новые методы и возможности исследования геномов.

Разнообразие микрочипов заключается в применении различных типов исследуемых источников, в использовании различных материалов для подложки чипа, в количестве проб на чипе, а также способе производства таких микрочипов.

Методы производства микрочипов можно разделить на четыре основных категории:

- *in situ* синтез проб с нуклеиновыми кислотами фотолитографическим методом;
- *in situ* синтез методом ink-jet или бесконтактной печати;
- роботизированное нанесение пресинтезированных нуклеиновых кислот методами контактной или бесконтактной печати;
- рандомизированное размещение пресинтезированных нуклеиновых кислот, прикрепленных к бусинам.

В технологии, названной фотолитографией, используется набор светонепроницаемых масок для селективного блокирования или экспозиции света на участки с твердым субстратом (подложка). С помощью селективной экспозиции ультрафиолета проводят синтез нуклеиновых кислот или других молекул через направленные фотохимические реакции (Рисунок 2, адаптирован из [4]). Данную технологию в своих микрочипах GeneChips реализует компания Affymetrix. Олигонуклеотиды синтезируются посредством нескольких повторяемых этапов химических реакций. На первом этапе, подложка незащищена от ультрафиолетового света, который удаляет фоточувствительные защитные группы на концах олигонуклеотидных проб. Только те олигонуклеотиды на подложке, которые не заблокированы светонепроницаемой маской, не защищены от ультрафиолетового света. Такие незащищенные участки подложки активируются для следующего этапа. Олигонуклеотиды на защищенных участках подложки остаются все еще неактивными. На втором этапе или реакции связывания, нуклеотидные мономеры с фоточувствительными защитными группами наполняют твердую поверхность микрочипа. Мономеры вступают в реакцию только с незащищенными гидроксильными группами предыдущего этапа. На каждом цикле добавляется только один тип мономера А, Т, G или С. Затем фотолитографическая маска заменяется на другую маску для разблокирования следующей группы нуклеотидов, которая необходима для наращивания участков олигонуклеотидных проб. Избыток реагентов смывается после каждого этапа и процедура повторяется до тех пор, пока не будут синтезированы все пробы на микрочипе.

Affymetrix микрочип обычно состоит из 25-мерных олигонуклеотидных проб (Рисунок 3). Каждый ген на Affymetrix микрочипе обычно состоит из множества проб, упорядоченных парами. Каждая пара состоит из двух олигонуклеотидных последовательностей, одна из которых комплементарна исследуемому транскрипту, называемая «PM – perfect match» проба точного соответствия и вторая «MM – mismatch» проба несоответствия. В «MM – mismatch» пробе тринадцатый нуклеотид изменен и отличается от последовательности в пробе точного соответствия. «MM – mismatch» проба используется для корректировки и дискриминации неспецифичной гибридизации, а также для оценки шума. Уровень экспрессии оценивается с использованием оцифрованных значений со всех проб для конкретного транскрипта или гена.

Технология «ink-jet» была разработана для печати красок или чернил на бумаге [12] и используется при производстве микрочипов компанией Agilent Technologies. В отличие от Affymetrix с фотолитографическим олигонуклеотидным синтезом, Agilent использует модифицированную «ink-jet» технологию для доставки и разделения химических реагентов на стеклянный субстрат. Эта технология очень гибка в отличие от технологии с использованием масок. Несмотря на общие этапы реакций связывания и диссоциации, *in situ* химический синтез олигонуклеотидов по технологии Agilent, отличается от принципов производства компании Affymetrix.

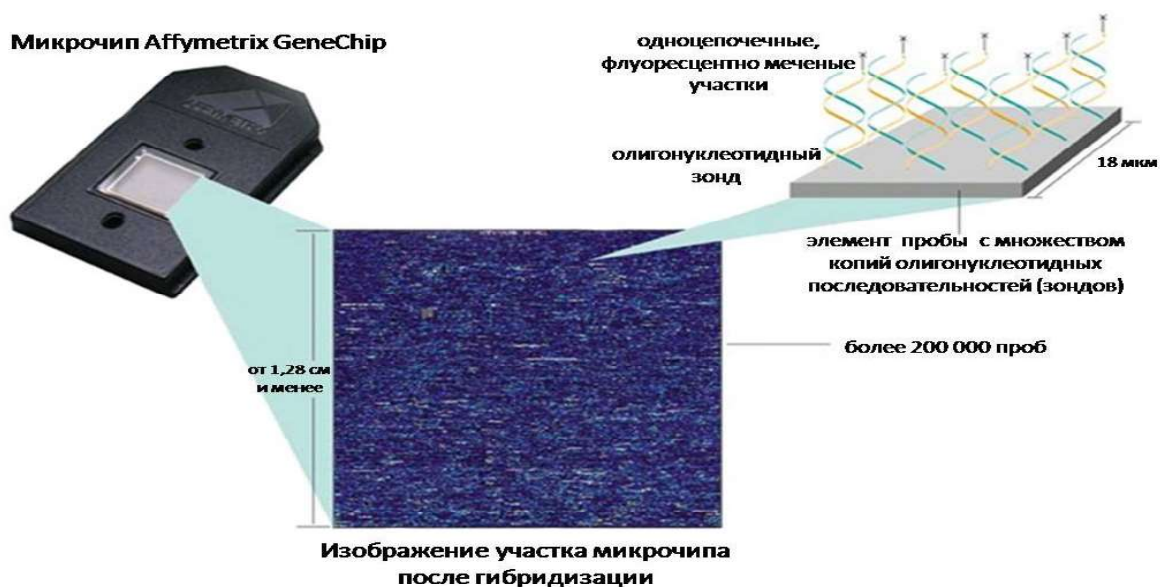


Рисунок 2. Общее представление структуры микрочипа на примере Affymetrix GeneChip (адаптирован из [4])

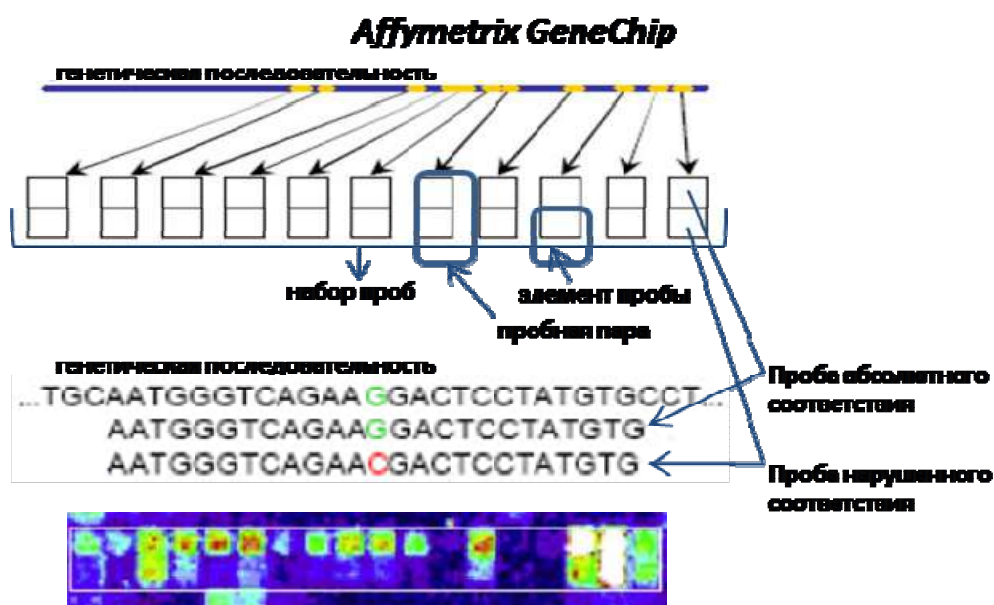


Рисунок 3. Структура элементов микрочипа Affymetrix GeneChip (адаптирован из [4])

Во-первых, мономеры размещаются на определенных участках стеклянного субстрата с использованием чернильно-струйной технологии «ink-jet». На каждый участок наносится один из четырех предшественников нуклеотидов А, Т, G или С. Размещенные предшественники вступают в реакцию с незащищенными сайтами связывания на растущем олигонуклеотиде. После реакции проводится смывание избытка мономеров. Затем субстрат помещается в раствор с кислотой для разблокирования последнего нуклеотидного предшественника, который был добавлен в течение последнего шага. Таким образом, олигонуклеотид активируется и становится готовым к добавлению следующей партии предшественников А, Т, G или С с помощью чернильно-струйной печати «ink-jet».

Используя данную технологию очень легко изменить олигонуклеотидную последовательность одной или всех проб на микрочипе. Гибкость «ink-jet» технологии позволяет создавать и модифицировать дизайн проб для интересующих генов.

Метод создания микрочипов, называемый "BeadChips", используется компанией Illumina. Он основан на случайном распределении большого количества олигонуклеотидных проб на субстрате. В этом методе олигонуклеотидные пробы длиной 70 нуклеотидов синтезируются с применением

технологии Illumina Oligator, в которой используется центрифугирование для создания большого количества олигонуклеотидов [13,14]. Каждая олигонуклеотидная проба состоит из 50 нуклеотидов для исследуемого гена и 20 нуклеотидов для определения позиции бусины на микрочипе. Олигонуклеотиды, ковалентно связанные с силиконовыми бусинами, размещаются на субстрате с лунками. Бусины в случайном порядке распределяются по отдельным лункам на субстрате. Из-за случайности распределения проб на микрочипе, каждый созданный микрочип, имеет разную картину распределения и число олигонуклеотидных проб.

В отличие от других микрочиповых платформ, в Illumina каждый микрочип уникален и перед использованием требует точного определения позиции каждой бусины. Для определения распределения бусин на матрице, каждый микрочип проходит серию реакций гибридизации для деконволюции распределения проб на субстрате [15]. В течение каждого этапа процесса, две флуоресцентные метки гибридизируют на матрице, экспонируют и затем удаляют с матрицы для следующей реакции гибридизации с другими наборами флуоресцентных меток. После очередной реакции, каждая проба имеет одно из трех состояний, основанных на последовательности двух меток, красный, зеленый или без цвета. С соответствующим набором флуоресцентных меток, спроектированных для 20-мерных последовательностей на пробах, становится возможной идентификация каждой бусины или пробы на матрице.

Поскольку размещение проб уникально на каждом микрочипе Illumina, исключаются смещения и ошибки связанные с расположением проб на матрице (в центре или по краям). Каждая проба на каждой матрице также экспериментально тестируется в течение декодирования реакций гибридизации, которые дают дополнительную информацию о контроле качества для производства матриц и проб.

Схема эксперимента с использованием микрочипов типична для различных платформ и производителей микрочипов и различается применением разных красителей, реагентики или типа микрочипа. Существуют две основные схемы проведения эксперимента для получения данных и их дальнейшего анализа (Рисунок 4).

В двухцветном эксперименте (часть А), образцы РНК отбирают из исследуемой и контрольной выборок, отдельно метят флуорофорными красками и гибридизуют на одном ДНК-микрочипе, состоящем из специально подобранных гено-специфичных проб. Относительные уровни генных экспрессий в двух образцах рассчитываются путем измерения интенсивности свечения для каждой пробы. Вектор экспрессии для образца суммирует уровень экспрессии каждого гена в образце, полученном от одного пациента (в сравнении с контрольным образцом). Одноцветный анализ (часть Б), выполняется с использованием технологии GeneChip (Affymetrix). Меченые РНК из каждого биологического образца гибридизируют на отдельный микрочип, на котором нанесены гено-специфичные пробы. Уровень генной экспрессии оценивается измерением интенсивности гибридизации для серий, так называемых проб отличного соответствия (perfect match) и уровнем шума, измеряемого с помощью соответствующего набора проб несоответствия (mismatch). Уровни генной экспрессии, полученные для каждого образца, представляют собой вектор, суммирующий разницу между сигналом и шумом для каждого гена. Результаты эксперимента и дополнительная информация анализируются для интерпретации данных, кроме того, параллельно информация с необработанными данными об эксперименте может размещаться на серверах баз данных GEO, ArrayExpress и других [16,17].

Для понимания скоординированного эффекта множества генов, исследователям необходимо извлекать свойства из разнообразных наборов данных и уменьшать размерность, присущую измеренным данным. Кроме того, для поиска новых функциональных модулей, вовлеченных в генную регуляцию или сигнальные пути, необходимы мощные математические, статистические и вычислительные методы для дальнейшего моделирования и анализа данных (Рисунок 5).

Таким образом, ДНК-микрочипы стали одними из самых полезных и наиболее применяемых инструментов в репертуаре ученого для изучения генома и его функциональных свойств. Микрочипы широко используются в медицине [18]. Важнейшая цель применения микрочипов – это улучшение клинического исхода путем адаптации терапии, основанной на молекулярных характеристиках заболеваний, например, таких как раковые [19,20]. Применение транскрипционных микрочипов и адекватных методов и подходов их анализа расширяет и дополняет наше понимание биологических процессов, протекающих в раковых клетках и дают ключи к получению новых методик для лечения онкологических заболеваний.

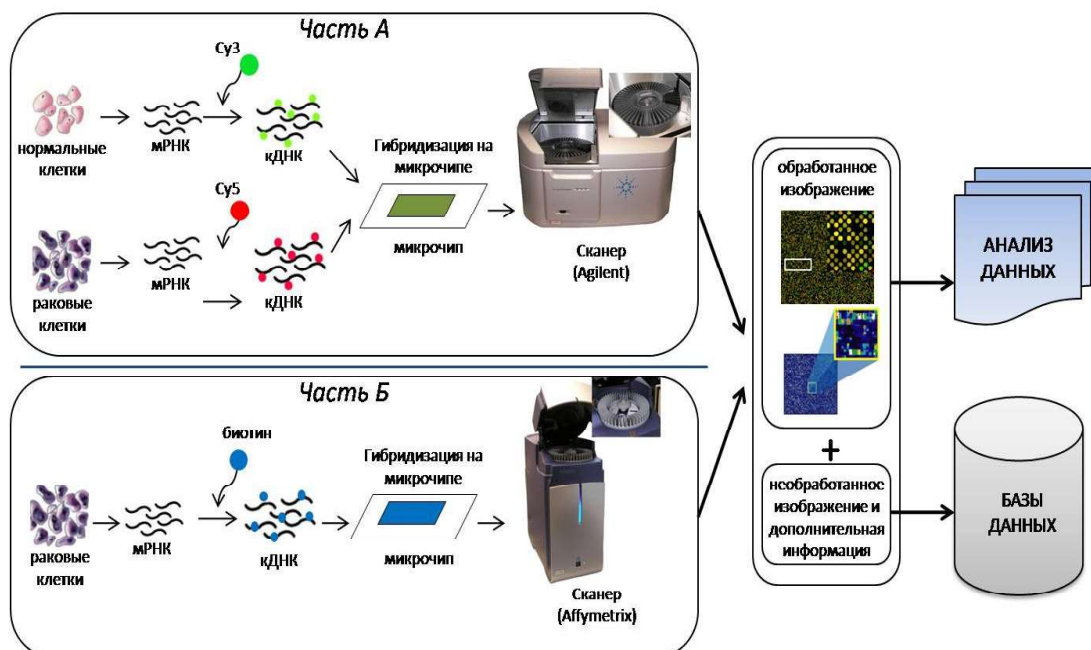


Рисунок 4. Блок-схема эксперимента с применением микрочипов.

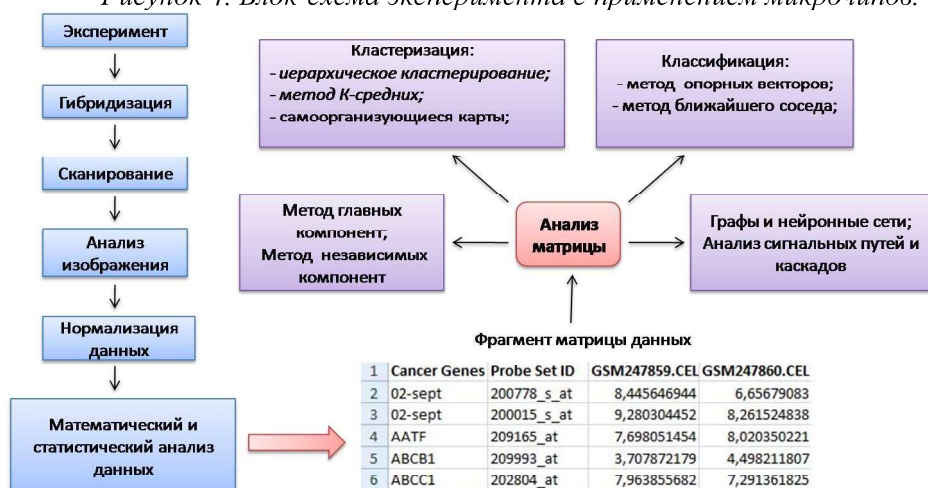


Рисунок 5. Модульная схема основных этапов микрочипового эксперимента, получения данных и типов анализа.

20. эжжжжэ

УДК 543.544.152, 661.666.1, 544.723.21

А.Р. Керимкулова, Н.А. Султанова, М.К. Гильманов, З.А. Мансуров, Ж.А. Абилов, Г.Е. Жусупова, Г.Ш. Бурашева, Ж.М. Жандосов, Б.К. Ескалиева

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫХ АДсорбентов для выделЕНИЯ биомолекул и лекарственных растительных субстанций
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

В статье отражены результаты физико-химических исследований по разработке наноструктурированных углеродных материалов из отечественного сырья. Были получены и испытаны микро-мезопористые углеродные сорбенты для хроматографии молекулярно-ситовых маркеров и исследована применимость углеродных сорбентов для разделения белково-липидного комплекса и лекарственных растительных субстанций.

В последние десятилетия в ведущих странах мира наметилась отчетливая тенденция по увеличению в общем арсенале выпускаемых лекарственных средств доли растительных препаратов и к настоящему времени она достигает более 50 %, в то время как в нашей стране эта цифра крайне низка и колеблется в пределах от 5 % до 10 %. На территории Республики Казахстан сосредоточена уникальная флора, насчитывающая более 100 лекарственных растений, которые относятся к самовозобновляемому дикорастущему сырью и могут служить источником для получения на их основе малотоксичных, высокоэффективных лекарственных средств широкого спектра действия, не