

VZNIK A ROZMACH ČIPOVÝCH TECHNOLOGIÍ

THE RISE AND EXPANSION OF BIOCHIP TECHNOLOGIES

BRDIČKA R., BRUCHOVÁ H.:

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Biočipové technologie se začaly rozvíjet zhruba před 10 lety a jejich použití stále vzrůstá a rozšiřuje se množství jejich aplikací. Od základní aplikace na problematiku molekulárně genetickou, kdy analyzovanou substancí byly nukleové kyseliny, se postupně jejich používání rozšířilo i na bílkoviny, cukry a alespoň co se týká používaného označení i na buňky a tkáně. Vývoj se ubíral v zásadě dvěma směry, směrem k neustálému zvětšování počtu současně prováděných detekcí a směrem k čipům specializovaným na řešení určitých specifických otázek.

Klíčová slova: Nové technologie v molekulární diagnostice, aktivní a pasivní DNA čipy, mikroarraye a makroarraye, genomové nanoprocesory.

Abstract

Biochip technologies have arisen and expanded during the last decade and the scope of them is now very broad. At the very beginning the analyzed substance was nucleic acid, but also proteins and carbohydrates (sugars) became the targets and the same term covers also cells and tissues now. The technology evolved by increasing the number of detections made simultaneously on one chip and reached the possibility to test all human genes at once, the other way led to specific sets with limited number of probes e.g. all known mutations of one gene, or genes participating in one pathway or function.

Keywords: New technologies in molecular diagnostics, active and passive DNA chips, microarrays and macroarrays, genomic nanoprocesors.

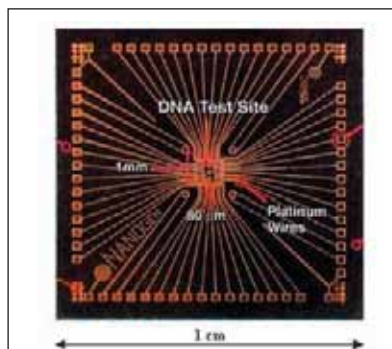
Od původních začátků konstrukce biočipů, kterým dominovaly otázky technické, které byly a jsou neustále řešeny především díky různým patentovým ochranám (<http://www.biochipnet.com/patents>), nabyly na důležitosti otázky vyhodnocení a interpretace.

Budeme-li se pokládat za pozorovatele a do jisté míry i za účastníky rozvoje této technologické revoluce od samého jejího začátku, přisvojíme si i právo kritického pohledu a odhadu jejího dalšího směřování. Prehistorické začátky jsou kladeny do různě vzdálené minulosti a záleží na tom, zda budeme brát v úvahu spíše stránku technickou – pak patrně se zmíníme o reversním dot blotingu používaném např. firmou Innolipa k původně velice skromnému určování alel systému HLA. Nebo k mnohočetné imunologické reakci, která mohla znamenat jakousi ideologickou přípravu (1). Spokojíme-li se však se vzpomínkou na skutečné „prototypy“ dnešních „biočipů“, nebudeme se muset vracet do příliš vzdálené minulosti a budeme nám na to stačit prakticky jen jedno desetiletí. Během tohoto návratu zjistíme, že některé realizační přístupy jsou používány stále.

Není bez zajímavosti, že některé principy se ukázaly jako dlouhodobě nosné a jsou používány dodnes. Na prvním místě je třeba jmenovat firmu Affymetrix a její technologii výroby mikročipů pomocí fotolitografické metody, při níž jsou reagující oligonukleotidy syntetizovány přímo na místě (in situ). Její přístup charakterizuje tzv. pasivní čipy tj. takové, kde pracovní podmínky pro všechny „sensory“ – pracovní plošky čipu jsou stej-

né. Druhou firmou, která se úspěšně uplatňuje na trhu je firma Nanogen. Její čip je typickým zástupcem tzv. aktivních čipů, u nichž je možné ovlivňovat pracovní podmínky každého senzoru individuálně. Rozdíl obou technických řešení je mnohostranný, zatímco pasivní čipy, k nimž můžeme přiřadit i membránové šíky (arraye), nebo arraye mikroteček (mikrospotů) nanášených na mikroskopická podložní sklička, jsou schopny rozšířit počet senzorů jednoho čipu do deseti- až statisíců, aktivní čipy od svých počátků obsahovaly jen desítky senzorů a dnes se propracovaly ke stovkám. Původní prototyp komerčně vyráběný firmou Nanogen, jehož obrázek by byl jistě vhodný jako vzor na dámské šaty (obr. 1) obsahoval jen 25 pracovních plošek, které byly vodivě spojeny s periferií čipu tak, aby na nich mohlo být upravováno napětí a polarita. Vedle těchto vlajkonošů obou směrů existuje celá řada dalších firem a výrobců a stále vznikají nové a nové. Některé firmy přinášejí i nová technická řešení. Na jejich přehled jen odkážeme - (<http://www.biochipnet.com/companies>), protože se jejich počet, z původních cca 10 v polovině minulého desetiletí, několikanásobně rozrostl. Geograficky je vznik a rozmach biočipových technologií spojen s Kalifornií. Z původních cca 10 firem prakticky všechny vznikly právě tam. Dnes jsou sice roztroušeny po celém světě – dokonce i u nás vzniklo na akademické půdě pracoviště vyrábějící skličkové arraye (www.geneage-tech.com) a lze očekávat, že do prostoru výrobců se všemi důsledky vstoupí i Čína. Dlouho se nedařilo ukojit zvědavou touhu najít nějaké vysvětlení existence kalifornského inkubátoru biočipových firem, až jeden americký kolega nabídl celkem plausi-

bilní vysvětlení. Ponecháme stranou fakt, že v Kalifornii je příjemné podnebí, mnoho přírodních krás a snad i vhodné ekonomické prostředí. Podle jeho vysvětlení došlo ke koincidenci několika příznivých faktorů. Jednak v době vzniku společností zabývajících se vývojem a výrobou biočipů došlo k uvolnění mnoha vysoce kvalifikovaných pracovníků řady výzkumných vojenských zařízení, v Kalifornii byl v té době již také k dispozici značný potenciál specialistů z oblasti výroby počítačů a dostatek odborníků pracujících na universitách v oblasti molekulární genetiky. Co jiného je nezbytnou podmínkou pro rozvinutí takové výroby než vysoce kvalifikovaný personál disponující potřebnými znalostmi. Nesmíme také zapomenout na skutečnost, že v USA je, na rozdíl od nás, zcela běžné propojení universitního výzkumu s výrobou.



Obrázek 1: Původní typ aktivního čipu vyráběného firmou Nanogen s 25 sensory

Co je principem „nástroje“, který biočipová technika nabízí – někdy se také mluví o laboratorii na dlani. Především je to možnost provádět mnoho analýz jednoho vzorku současně – současné čipy firmy Affymetrix mají na ploše zhruba 1.25 x 1.25 cm cca 500 000 sensorů a jsou tedy schopny bez problémů obsáhnout všechny geny, kterými lidský genom disponuje. Tomu se blíží i sklíčkové nebo membránové arraye s dnes běžnými 10 000 - 30 000 teček. Z hlediska použití se nejvíce hodí pro situaci, kdy nevíme co hledáme. Vedle těchto všeobsahujících „universálních“ čipů pak existují čipy s omezenou, ale specializovanou výbavou sond.

Jsou používány pro řešení již konkrétnějších otázek a pokrývají např. alely (mutace) určitého genu např. P53, CYP450, geny související s nějakou funkcí – apoptóza, nebo onemocněním. Změny probíhající v somatických buňkách např. během onkogenézy jsou jedním z nejčastěji zkoumaných otázek (2,3). Kromě změn, které odlišují nádorovou tkáň od zdravé, ale i změny v tkáních, v nichž neprobíhá nádorové bujení jsou předmětem mnoha výzkumných prací.

Používají se tedy k identifikaci určitých struktur a to včetně určování sekvence. Jsou také velice užitečné i při sledování aktivity genů jak za fyziologických podmínek, tak při nemoci, nebo pod vlivem léčby (4). Vsuneme-li na toto místo vlastní zkušenosti, pak použití biočipů ukázalo, že inter-individuální variabilita genové aktivity je značná a to jak ve zdraví tak v nemoci (5). Existují značné ontogenetické rozdíly – a zdá se, že existují rozdíly nejen mezi tkáněmi, což nepřekvapuje, ale patrně i mezi buňkami. K analýze genové aktivity na jednobuněčné úrovni zatím naše možnosti biočipových technik nestačí, ale i tímto směrem se nové technologie rozvíjejí.

Nález ziskán biočipovými technikami bývají podrobovány kritice z hlediska jejich věrohodnosti a často je vyžadováno jejich ověření jinou metodou. U kvantifikace genové aktivity pak především RT-PCR a ukazuje se, že někdy dávají oba postupy výsledky shodné, jindy protichůdné či spíše nesouhlasné. Je nepochybné, že citlivost RT-PCR je mnohem větší, nicméně každá z metod zkoumá genovou aktivitu trochu jiným způsobem a za jiných podmínek.

Dnes je valná většina čipů vyráběna komerčně a ani by to jinak nebylo ekonomické, s předem daným souborem sond, ale existují i tzv. zákaznické čipy, kdy si zákazník může vybrat jakými sondami má být čip osazen. Dokonce existují firmy, které čipové analýzy provádějí jako službu s tím, že zákazník pouze dodá vzorek a je mu předán výsledek na úrovni datového zpracování a statistického vyhodnocení. Kupodivu je cena takové služby jen asi dvojnásobná ve srovnání s cenou čipu.

Jestliže obecně vzrůstá množství informací exponenciálně a v podstatě překračuje naši kapacitu je zpracovávat, natož využít, platí to v ještě větší míře o rozvoji technologií v našem případě „biočipových“. Jako vždy produkce informací je nejdříve představována abstrakty přednášek (jejich sborníky) pak časopiseckými články a teprve později monografiemi. I těch je však dnes již poměrně bohatá nabídka, a proto se omezíme na úzký výběr těch, které známe (6,7,8,9,10).

Za použití grantových prostředků VZ 0002373601 a IGA MZ ČR NR /7989-3

Zájemce o podrobnější informace odkazujeme na text, který provádí kurz J.Jonáka pro postgraduální studenty: Bruchová H, Brdička R: Čipové technologie v molekulární biologii. V „Molekulární biologie a genetiky XI: sborník přednášek“ Praha : ÚMG AV ČR, 2004 s. 7-20 případně na absolvování týdenního praktického semináře: http://www.uhkt.cz/vyuka_seminare/seminare/kurz_dnadiag

Literatura

1. Ekins RP, Chu FW: Multianalyte microspot immunoassay—microanalytical „compact disk“ of the future. Clin Chem. 1991 37(11), s.1955-1967
2. Golub TR, et al.: Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999, s.527-531
3. Minn AJ et al.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature 2005, 436, s.518-524
4. Bruchová H, Borovanova T, Klamova H, Brdička R: Gene expression profiling in chronic myeloid leukemia patients treated with hydroxyurea. Leukemia and Lymphoma 2002, 43: s.1289-1295

5. Bruchová H, Brdička R: Inter-individuální variabilita geneové exprese sledovaná pomocí biočipů. Čas.lék.čes., 2004 142(12) :s.847-849
6. Knudsen S: A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data. J.Wiley&Sons, New York 2002
7. Baxevanis AD, Ouellette BFF: Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. J.Wiley&Sons, New York 1998
8. Schena M: DNA microarrays. A practical Approach. Oxford Univ.Press 1999
9. Schena M: Microarray Biochip Technology. Eaton Publ. Natick 2000
10. Warrington JA, Todd R, Wong D :Microarrays and cancer research. Eaton Publ. Westborough 2002 (Chen j, Kricka LJ. Biochip technology. Taylor and Francis, New York 2003)