Достижения генной и белковой инженерии

ДНК: актуальные вопросы, современные технологии

Черенков И.А., Меньшиков И.В.

Содержание:

Введение 1
Что такое ДНК с точки зрения физики и химии? 2
Как получить ДНК? 5
Что такое полимеразная цепная реакция? 9
Что такое аптамеры? 12
Что такое ДНК-сенсоры? 15
Что такое ДНК-чипы? 21
Что такое ДНК-оригами? 24
Как заставить ДНК двигаться? 26
Что почитать? 27

Введение

Наш обзор адресован тем, кто желает расширить свои представления о ДНК в свете современных технологий.

В апреле 2013 года будет отмечаться своеобразный юбилей – 60 лет назад Джеймс Уотсон и Френсис Крик опубликовали свою знаменитую работу, посвящённую анализу структуры молекулы ДНК. Небольшая статья содержала описание основных пространственных параметров молекулы по данным рентгеноструктурного анализа. Эта работа оказалась одним из ключевых открытий XX века, определивших развитие молекулярной биологии.

Сейчас стало очевидным, что достижения в области молекулярной биологии способны сильно изменить практическую медицину, криминалистику, биотехнологию, фармакологию и даже технику.

В современном мире ДНК-технологий открытия происходят настолько быстро, что учебники просто не успевают за прогрессом. К тому же часто

неясно, к какой именно области науки отнести ту или иную разработку. ДНК интересуются специалисты самых разных профилей. Это и биологи разных специальностей – биохимики, биофизики, генетики, эволюционисты; и врачи клинической диагностики, врачи-генетики; и (удивительно!) специалисты по микроэлектронике, инженеры-материаловеды и нанотехнологи. Поэтому целью нашей работы станет экскурс в те области науки и техники, где применяется ДНК – иногда очевидные, иногда неожиданные, а нередко и парадоксальные.

Изложение материала мы старались построить так, чтобы интересующийся биологией и химией человек смог в нем разобраться и, конечно, узнать что-то новое. Часть текста, набранная мелким шрифтом, несёт вспомогательную функцию (прочитайте, если Вам интересно). В списке литературы приведены не только процитированные источники, но и те, что, на наш взгляд, будет интересно прочитать (или перечитать) – они сгруппированы по степени сложности – популярные (доступные любому читателю), базовые научные и углублённые научные (для пытливого читателя).

Что такое ДНК с точки зрения физики и химии?

Аббревиатура «ДНК» настолько прочно вошла в наш лексикон, что не всякий сразу вспомнит расшифровку – **д**езоксирибо**н**уклеиновая **к**ислота. Название отражает содержание в молекуле остатков сахара (дезоксирибозы) и кислую реакцию, которую проявляет ДНК в растворе. Это химия. А вот «нуклеиновая» – это уже биология: большая часть ДНК клетки сосредоточена в ядре (лат. *nucleus* – ядро).

> Швейцарский исследователь Фридрих Мишер, открывший в 1869 г. ДНК, первоначально назвал новое вещество «нуклеином», а затем – «нуклеиновой кислотой».

С точки зрения химии ДНК представляет собой полимер, мономером которого являются дезоксирибонуклеотиды. Каждый нуклеотид содержит остаток фосфорной кислоты, дезоксирибозу и одно из четырёх азотистых оснований: аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т), цитозин (Ц); А и Г относятся к пуриновым, Т и Ц – к пиримидиновым.

В продольном направлении нуклеотиды ДНК соединены фосфодиэфирными связями. Такая цепочка ДНК получила название одиночной (в англоязычной литературе – *single-stranded DNA* (*ssDNA*)). Обратите на нее внимание – в дальнейшем повествовании она будет играть важную роль. Также заметим, что цепь ДНК имеет направление: один конец молекулы содержит фосфатную группу, присоединённую к 5-му атому углерода дезоксирибозы (5`-конец), а другой конец – гидроксильную группу у 3-го атома (3`-конец).

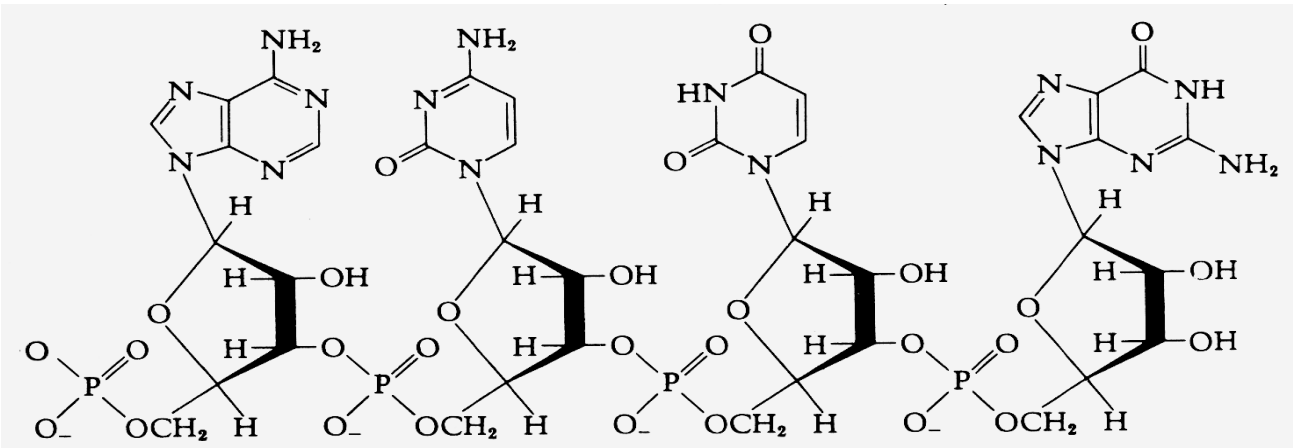

Рис. 1. Фрагмент одиночной цепи ДНК, состоящий из 4-х нуклеотидов. Слева направо – адениловый, цитидиловый, тимидиловый и гуаниловый нуклетоиды. Слева 5`- , а справа 3`- конец цепи.

Удивительное свойство азотистых оснований было открыто американским биохимиком Эрвином Чаргаффом: в ДНК содержится равное количество оснований Т и А и, аналогично, поровну оснований Г и Ц. Установленные им закономерности называют «правилами Чаргаффа». Их химической основой является способность комплементарных азотистых оснований (А и Т; Г и Ц) образовывать водородные связи (рис. 2) – на этом основано формирование устойчивой двойной спирали ДНК.

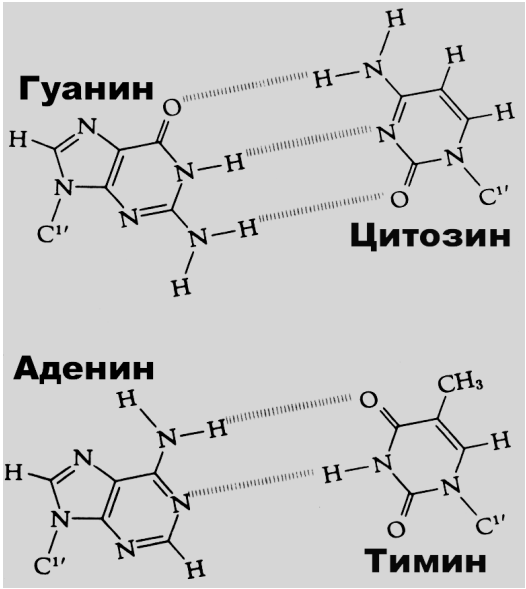

Рис. 2. Водородные связи между пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями.

Полная энергия водородных связей для комплементарных пар оснований: $E_{А\text{-}Т}$ = 7,00 ккал/моль, $E_{Г\text{-}Ц}$ = 16,79 ккал/моль. Это означает, что разрушить связи между гуанином и цитозином сложнее, чем между аденином и тимином.

Модель пространственной организации ДНК была построена Дж. Уотсоном и Ф. Криком на основе анализа дифракции рентгеновских лучей в ДНК.

Основные параметры модели Уотсона и Крика:

1. Две полинуклеотидные цепочки закручены вокруг общей оси таким образом, чтобы сформировалась двойная спираль.

2. Диаметр спирали 2 нм (20 Å). Соседние основания находятся на расстоянии 0,34 нм (3,4 Å) и повёрнуты на 36^0 относительно друг друга. В 1 витке 10 нуклеотидов, что соответствует 3,4 нм (34 Å).

3. Структура спирали стабилизирована водородными связями, возникающими между комплементарными основаниями.

4. Возможны только такие пары оснований, в которых одно является пурином, а второе – пиримидином.

В 60-х годах XX века был выяснен ещё один фактор продольной стабилизации молекулы ДНК – стэкинговые взаимодействия (англ. *stacking* – «укладка в штабель»). Упрощённо – это силы, удерживающие одно основание над другим.

В стэкинг вносят вклад диполь-дипольные, гидрофобно-гидрофильные взаимодействия, π-электронные системы, лондоновские дисперсионные силы. Стэкинг пар оснований зависит также от температуры, электрических и кислотно-основных свойств среды, в которой находится ДНК. Порядок значений энергии стэкинговых взаимодействий показан в таблице (ккал/моль):

Верхняя пара / Нижняя пара	Г-Ц	Ц-Г	А-Т	Т-А
Г-Ц	8,26	14,59	9,81	10,51
Ц-Г	9,69	8,26	6,57	6,78
А-Т	6,57	10,51	5,37	6,57
Т-А	6,78	9,81	3,82	5,37

Видно, что наиболее стабильными будут области спирали, богатые стопками пар Г-Ц, а наименьшей стабильностью характеризуются области с высокой концентрацией пар А-Т.

Напрашивается интересная мысль – область инициации транскрипции (начало гена) богата именно А-Т парами (ТАТА-бокс). Вероятно, ослабленные стэкинг-взаимодействия и меньшая общая энергия водородных связей делают энергетически выгодным локальное расплетание именно этого участка.

Обращает на себя внимание удивительная стабильность молекулы ДНК.

Знаменитый физик Эрвин Шредингер не скрывал своего удивления стабильностью молекул, составляющих основу наследственности: «Присмотревшись к портретам членов семьи [Габсбургов], живших в XVI-XIX столетиях, мы можем уверенно заявить, что материальная генная структура, ответственная за эту ненормальную черту, передавалась из поколения в поколение… …число атомов, заключающихся в этой структуре, вероятно, должно быть того же порядка, как и в случаях, проверенных с помощью рентгеновских лучей. Как понять, что ген остался неизменным в течение столетий, несмотря на стремление теплового движения нарушить порядок в структуре?»

Чтобы разделить цепи (разорвать водородные связи), необходимо приложить значительную энергию. Это явление получило название «плавление ДНК» – необходимая для него температура приближается к 100°С. Для большинства биологических молекул такая температура экстремальна!

Известно, что температура плавления конкретного образца ДНК зависит от содержания гуанил-цитидиловых пар и определяется по формуле:

$$T_{пл} = 69{,}3+0{,}41(\%Г+\%Ц)$$

Получены данные о температуре денатурации ДНК, выделенной из разных объектов: *Staphylococus aureus* – 83°*C*; клетки тимуса теленка – 86°*C*; *Escherichia coli* – 91°*C*; *Brucella abortis* – 93°*C*; *Streptomyces griseus* – 98°*C*.

Важно, что при понижении температуры молекула ДНК восстанавливает свою структуру – цепочки соединяются в соответствии с принципом комплементарности. Явление соединения комплементарных цепей получило название «гибридизация». Именно способность к молекулярному распознаванию, заложенная в самой структуре и свойствах ДНК, служит основой сенсорных устройств, о которых – далее…

Как получить ДНК?

Первая задача, которая встаёт перед исследователем – получение достаточного для работы количества ДНК.

Существует два источника ДНК: собственно живые организмы и синтетические образцы ДНК, полученные химическим наращиванием полинуклеотидных цепочек из набора нуклеотидов.

ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра. Этапы выделения ДНК:

- быстрый лизис клеток;
- удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования;
- ферментативное разрушение белков протеазами;
- экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа;
- осаждение ДНК этанолом;
- ресуспендирование в буферном растворе.

Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового (280 нм) и нуклеинового (260 нм) спектров поглощения. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть больше 1,8.

Молекула ДНК одной хромосомы среднего размера содержит 150×10^6 пар нуклеотидов и имеет длину около 4 см. Молекулы такого размера чувствительны к механическим воздействиям, возникающим в растворе в процессе выделения, и часто фрагментируются. В ходе выделения получают молекулы ДНК значительно короче исходных, но всё равно очень длинные –

тысячи и десятки тысяч пар нуклеотидов. Такие молекулы неудобны для исследований, и их приходится дополнительно фрагментировать.

Для фрагментирования используют выделенные из бактериальных клеток рестриктазы – ферменты, «разрезающие» нить ДНК (название их происходит от сокращения термина «**рестрик**ционные эндонукле**азы»**).

> *In vivo* рестриктазы участвуют в узнавании и разрушении чужеродных для бактерий ДНК, расщепляя внутренние участки молекулы на сравнительно небольшие фрагменты. Это своеобразная защитная система, охраняющая целостность ДНК бактериальной клетки.

Известно более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения. Каждая рестриктаза узнаёт специфические лишь для неё последовательности (4-6, реже 8-12 нуклеотидов) в двуцепочечной молекуле ДНК. Такие последовательности называют «сайты рестрикции». Рестриктаза разрезает ДНК именно в области «своих» сайтов. Количество образующихся рестрикционных фрагментов ДНК при использовании одной рестриктазы зависит от количества сайтов рестрикции, а размер фрагментов определяется положением этих сайтов по всей длине исходной молекулы ДНК.

С помощью набора рестриктаз можно разрезать молекулу ДНК на фрагменты желаемой длины. Например, для изучения последовательности нуклеотидов (секвенирования) удобны фрагменты размером приблизительно 300 пар нуклеотидов. Следовательно, ДНК одной хромосомы в 150×10^6 пар нуклеотидов нужно разрезать на 500 000 фрагментов, и затем каждый из фрагментов изучать отдельно.

Получение ДНК из природных объектов необходимо молекулярным биологам и генетикам, решающим фундаментальные биологические проблемы или анализирующим особенности ДНК конкретного вида организмов.

В медицинской генетике выделение ДНК – необходимый этап разнообразных методов молекулярной диагностики наследственных заболеваний, установления родства или идентификации личности.

Совсем другое дело, если исследователю требуется не просто фрагмент ДНК, а полидезоксирибонуклеотид со строго определённой последовательностью – например, для изготовления ДНК-чипа или ДНК-

сенсора. В таком случае единственным приемлемым подходом является химический синтез ДНК «в пробирке».

В настоящее время наиболее распространён фосфорамидитный метод. Исходными веществами в нём являются модифицированные дезоксирибонуклеозиды. К аминогруппе дезоксиаденозина и дезоксицитидина присоединяют бензольную группу, а к аминогруппе дезоксигуанина – изобутирильную. Смысл модификаций состоит в защите аминогрупп от любых нежелательных реакций. Тимидин, у которого нет аминогруппы, не модифицируют.

Синтез ведут на твёрдой подложке – растущая цепь ДНК фиксирована на носителе (обычно это пористые стеклянные шарики с порами одинакового размера). Это позволяет вести весь синтез в одной ёмкости и автоматизировать его. Первый (3`-концевой) нуклеотид химически «пришивают» к носителю. Чтоб обеспечить присоединение к подложке именно 3`-конца, 5`-гидроксильную группу защищают диметокситритильной группой. Такую же защиту имеет каждый вводимый в реакцию последующий нуклеотид. В процессе промывки колонки-реактора удаляются вода и кислород, которые могут мешать синтезу. Затем последовательно вводят в колонку растворы нужных нуклеотидов, не забывая химически блокировать непрореагировавшие нуклеотиды и стабилизировать фосфодиэфирные связи.

Рис. 3. Установка для химического синтеза полинуклеотидов *ASM*-2000 (http://www.sibai.ru).

Общая схема химического синтеза ДНК приведена на рисунке 4. Тем, кто знаком с информатикой, она напомнит алгоритм компьютерной программы. Действительно, в настоящее время химический синтез ДНК автоматизирован и идёт под управлением специальной программы. Появились лаборатории, ведущие коммерческий синтез полинуклеотидов любой последовательности (см. таблицу 1). Это позволяет говорить о технологии производства ДНК – а, значит, переводит знаменитую молекулу в разряд производственных продуктов – биоматериалов. В научной литературе появился термин «ДНК-материалы», а ведущие мировые журналы по материаловедению публикуют обзоры, посвящённые ДНК (см., например, *Liu D. et al., 2011*, или *Penga S. et al., 2012*).

Рис. 4. Общая схема синтеза полинуклеотидов (по Б. Глику и соавт., 2002).

Таблица 1. Примерная стоимость и сроки синтеза полинуклеотидов на заказ

Длина ДНК (пар оснований)	Стоимость (руб.)	Срок синтеза (дней)
<300	1000	14-18
300-1000	34/п.о.	18-21
1000-1500	34/п.о.	21-24
1500-2000	41/п.о.	24-29
2000-3000	41.6/п.о.	По запросу
3000-5000	43,9/п.о.	По запросу
5000-8000	По запросу	По запросу

Из таблицы видно, что пока производство полинуклеотидов довольно дорого и требует времени. Однако технологии синтеза постоянно совершенствуются, скорости растут – а когда производство ДНК-материалов станет массовым, стоимость синтеза неизбежно снизится.

Что такое полимеразная цепная реакция?

Одним из первых технологических (в полном смысле этого слова) подходов к работе с ДНК стал метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предложенный в 1983 г. Карри Муллисом. За своё открытие Муллис удостоен Нобелевской премии (1993 г.). В XXI веке ПЦР стала широко распространённым методом диагностики инфекционных болезней и наследственной патологии. Биологи ценят ПЦР за возможность определения видов и разновидностей простейших, бактерий, одноклеточных водорослей и других организмов, классификация которых по морфологическим и физиологическим признакам невозможна или затруднена. ПЦР применяется и для отбора аптамеров, о которых речь пойдёт в следующей главе.

Принцип метода прост. Сначала выбирается небольшая (15-30 пар нуклеотидов) специфическая (характерная только для данного гена) последовательность нуклеотидов ДНК. Эту последовательность выясняют путём секвенирования. Затем синтезируют праймеры – фрагменты ДНК, соответствующие искомой последовательности.

Для дальнейшей работы потребуются: анализируемые образцы, содержащие ДНК (поразительно, но для данного метода достаточно присутствия в пробе одной-единственной молекулы ДНК!), фермент ДНК-полимераза (он соединяет нуклеотиды ДНК в цепочку) и набор дезоксирибонуклеотидтрифосфатов:

дАТФ, дГТФ, дТТФ и дЦТФ (это мономеры для синтеза ДНК, а три остатка фосфорной кислоты необходимы как источник энергии для полимеризации). Все процедуры проводятся в специальном буфером растворе, содержащем ионы магния.

Успех в разработке метода в значительной степени обусловлен использованием термофильной ДНК-полимеразы (*Taq*-полимеразы), выделенной из бактерий, живущих в горячих источниках, и потому устойчивой к действию высоких температур. Дело в том, что в ходе проведения ПЦР должна циклически меняться температура – то повышаясь до 90-97°С (плавление ДНК), то снижаясь до 50-60°С (гибридизация ДНК). Обычные ферменты не выдержат таких жёстких условий.

Термостабильную ДНК-полимеразу впервые выделили и исследовали советские учёные С.И. Городецкий, А.С. Каледин, А.Г. Слюсаренко. Их статья вышла в 1980 г. в журнале «Биохимия». С.И. Городецкий и его сотрудники в то время занимались изучением так называемых термофильных бактерий, обитающих в воде гейзеров и горячих источников. Для выяснения причин необыкновенной устойчивости бактерий к высокой температуре они выделяли их ферменты. Так и была найдена та самая термостабильная ДНК-полимераза, которая с подачи Карри Муллиса нашла применение в ПЦР.

Цикл ПЦР состоит из трёх стадий:

1. **Плавление**: реакционную смесь нагревают до температуры 90-97°С. Исследуемая двуцепочечная ДНК денатурирует и переходит в однонитевую форму.

2. **Гибридизация** (отжиг) ДНК с праймерами. Температуру снижают до 50-60°С: происходит комплементарное связывание праймеров с цепями матричной ДНК и образование двуцепочечного участка на каждой из нитей ДНК. Это ключевой момент – если в пробе нет фрагментов ДНК, комплементарных выбранным праймерам, то гибридизация не произойдёт и последующие этапы станут невозможными.

3. **Элонгация:** удлинение нитей ДНК, комплементарных матричной ДНК, катализирует *Taq*-полимераза в направлении от 5'- к 3'-концу.

Затем снова наступает этап плавления, когда за счёт повышения температуры синтез ДНК прекращается, и двунитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК денатурирует. Во втором и последующих циклах праймеры гибридизируются с исходной матричной ДНК и с вновь синтезированными молекулами ДНК, количество которых нарастает в геометрической прогрессии. Происходит амплификация – увеличение числа копий ДНК (от лат. *amplificatio* – усиление, увеличение).

Каждый из этапов цикла имеет продолжительность от десятков секунд до 1-3 минут, в результате полный цикл длится от одной до нескольких минут.

Описанную процедуру амплификации ДНК проводят в автоматическом режиме в приборе циклизаторе (термоциклере, амплификаторе ДНК). Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры.

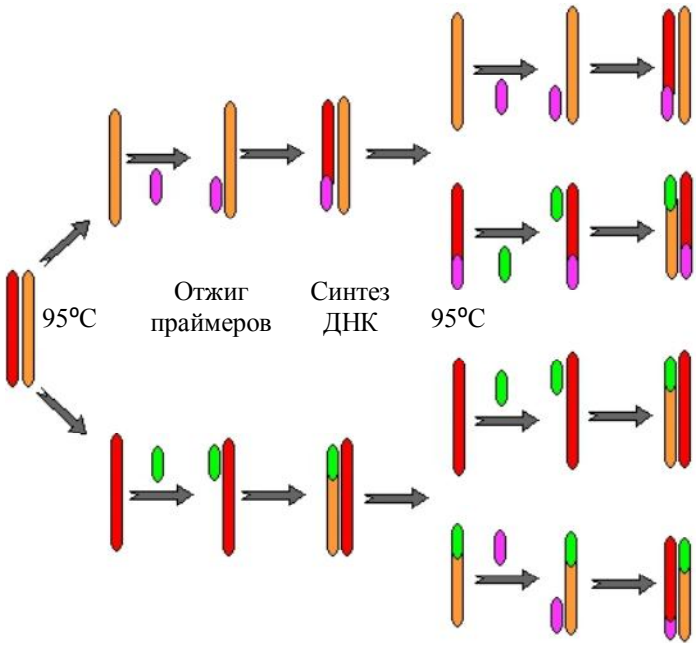

Рис. 5. Схема ПЦР. Слева красным и жёлтым цветом показан исходный образец ДНК; фиолетовым и зелёным – праймеры. Видно, что количество молекул ДНК в ходе ПЦР нарастает в геометрической прогрессии.

Получающиеся копии ДНК называют ампликонами. За 25-30 циклов число ампликонов достигает нескольких миллионов. Такое количество ДНК уже можно исследовать с помощью электрофореза.

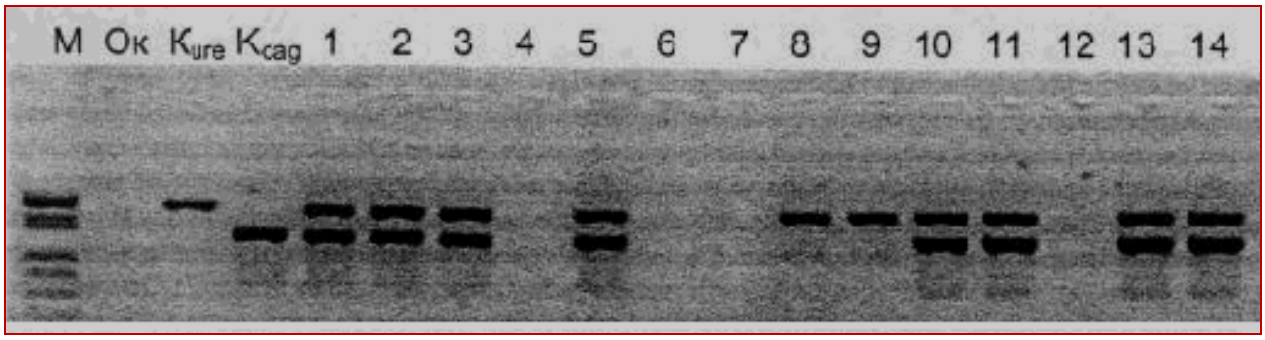

Рис. 6. Результаты ПЦР у больных язвенной болезнью желудка: М – маркер молекулярных масс; *Ok* – отрицательный контроль; *Kure* – положительный контроль на ген *UreC* бактерии *Helicobacter pylori*; *Kcag* – положительный контроль на ген *CagA* бактерии *Helicobacter pylori;* 1-14 – клинические образцы. Видно, что у большинства больных (1-3, 5, 8-11, 13-14) обнаружены *Helicobacter pylori,* а у пациентов 4, 6, 7, 12 заболевание, вероятно, вызвано другими причинами (по http://nature.web.ru).

Разработана технология «ПЦР в реальном времени», которая позволяет обойтись без электрофореза и анализировать данные в ходе циклов ПЦР.

Учитывая исключительную точность и чувствительность метода, для проведения ПЦР необходимы специальные условия для предотвращения случайного загрязнения образца.

Что такое аптамеры?

В 90-х годах XX века исследователи ДНК обратили внимание на способность молекул нуклеиновых кислот формировать трёхмерные пространственные структуры, способные специфически взаимодействовать с разнообразными веществами. Такие структуры назвали аптамерами (от лат. *aptus* – подходить). В основе аптамера – одноцепочечная молекула ДНК, сворачивающаяся так, что буквально «облепляет» какую-либо молекулу или её часть. Аптамеры могут быть получены к белкам, пептидам, нуклеиновым кислотам, полисахаридам, малым органическим молекулам (аминокислотам, нуклеотидам и другим метаболитам), вирусным частицам, целым клеткам и даже тканям.

Представьте себе раствор, содержащий смесь случайных последовательностей одноцепочечной ДНК. Если в него поместить молекулу-мишень, то, вероятно, среди разнообразия цепочек ДНК найдутся такие, которые присоединятся к опредёленному участку мишени, оплетая его. Используя подходы ПЦР, можно амплифицировать подходящие к мишени последовательности нуклеотидов в желаемом количестве.

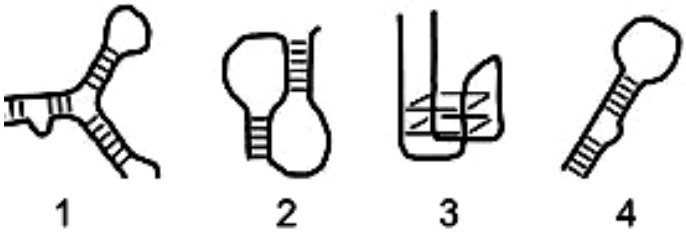

Рис. 7. Наиболее типичные варианты пространственной структуры, образуемые аптамерами: шпильки (1 и 4), псевдоузел (2), *G*-квартет (3) (по Кульбачинскому А.В., 2006).

Для получения аптамеров был разработан метод, названный «*SELEX*» – аббревиатура от английского «***S**ystematic **E**volution of **L**igands by **Ex**ponential Enrichment*», что буквально переводится как «систематическая эволюция лигандов путём экспоненциального обогащения». Технология действительно подобна эволюционному процессу – из смеси случайных фрагментов ДНК или РНК (так называемые ДНК- и РНК-библиотеки) отбираются и воспроизводятся те, которые способны сформировать аптамеры, специфичные для конкретной молекулы.

Каждый цикл отбора состоит из трёх стадий:

1. случайная библиотека, содержащая значительное число коротких последовательностей ДНК, способных к формированию различных структур, инкубируется с молекулой-мишенью;

2. производится разделение связанных и несвязанных олигонуклеотидов;

3. олигонуклеотиды, связавшиеся с мишенью, отделяются и амплифицируются (размножаются).

Очевидно, что уже после первого цикла *SELEX* в растворе остаются молекулы ДНК, специфичные к мишени. Их называют «обогащённой библиотекой ДНК». Такую библиотеку используют для проведения следующего раунда отбора. После окончания селекции обогащённую библиотеку клонируют и определяют последовательности индивидуальных аптамеров.

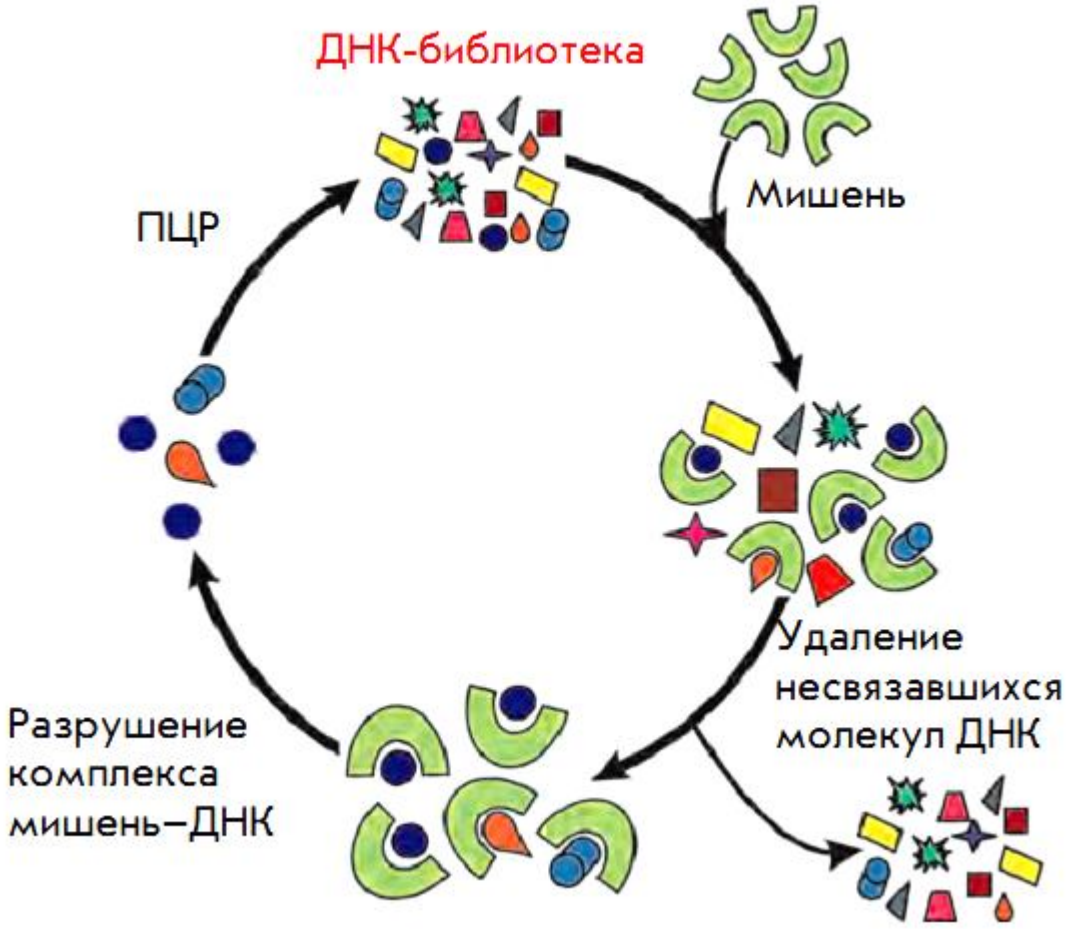

Рис. 8. Схема метода синтеза аптамеров (по Давыдовой А. С. и соавт., 2011).

В большинстве экспериментов по отбору аптамеров используют ДНК-библиотеки, содержащие случайный район длиной 20–60 нуклеотидов (в

некоторых случаях от 8 до 220 нуклеотидов). Логично предположить: чем длиннее случайный район библиотеки, тем большее разнообразие различных структур может сформироваться на его основе. Упрощённо – чем больше нуклеотидов в случайном районе ДНК-библиотеки, тем лучше.

Оказалось, что это не совсем так – количество ДНК или РНК, используемое при отборе, обычно составляет 10^{-8}–10^{-10} М, что соответствует 10^{14}–10^{16} молекул. Такого разнообразия можно достичь, используя последовательность всего из 25 нуклеотидов ($4^{25} \approx 10^{15}$). Таким образом, библиотеки со случайным районом длиннее 25 нуклеотидов оказываются избыточными.

Области применения аптамеров весьма широки. Во-первых, аптамеры – новый тонкий инструмент для изучения механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. При исследовании белков, узнающих специфические последовательности нуклеиновых кислот *in vivo,* использование *SELEX* позволяет выявить природные нуклеотидные последовательности, отвечающие за связывание белков с РНК или ДНК. Анализ трёхмерной структуры аптамер-белковых комплексов используется для исследования структуры РНК- и ДНК-связывающих сайтов белков-мишеней.

Во-вторых, на основе аптамеров могут быть получены высокоэффективные и специфичные ингибиторы белков-мишеней. Такие ингибиторы можно использовать для «выключения» белка в живой клетке, что позволит глубже понять его функции. Блокируя аптамерами белки микроорганизмов, можно будет заменить антибиотики. А воздействуя на онкогенные белки – лечить опухолевые заболевания.

> Ряд аптамеров уже проходит различные стадии клинических испытаний, а препарат *Macugen* (компаний «*Eyetech Pharmaceuticals*» и «*Pfizer*») на основе аптамера, связывающего человеческий фактор роста сосудистого эндотелия (*VEGF*), утверждён в качестве средства, эффективного при возрастной макулодистрофии – тяжёлом заболевании, приводящем к слепоте.

В-третьих, эскорт-аптамеры обеспечат направленную доставку лекарственных препаратов, узнавая специфические белки клеток-мишеней.

В-четвёртых, перспективно применение аптамеров в аналитических системах – ИФА, блоттинге, гибридизации *in situ*, биосенсорах. Оптимисты утверждают, что вскоре аптамеры вытеснят моноклональные антитела – традиционный инструмент в медицинских лабораторных технологиях.

Таблица 2. Сравнительная характеристика аптамеров и моноклональных антител (по Давыдовой А. С. и соавт., 2011). Звёздочками выделены пункты, по которым аптамеры превосходят антитела.

	Аптамеры	**Моноклональные антитела**
Способ получения	Селекция *in vitro*	Гибридомная технология, включающая иммунизацию животных
Способ производства*	Химический или ферментативный синтез	Производство с использованием клеточных культур или лабораторных животных
Ограничения молекулы-мишени*	Не выявлены	Невозможно получить антитела на неиммуногенные или токсичные соединения
Сродство к мишени	$K_d \approx 10^{-10}$–10^{-7} M	$K_d \approx 10^{-10}$–10^{-7}M
Специфичность	Высокая	Высокая
Стабильность*	Могут ренатурировать после нагревания; возможно длительное хранение	Необратимая денатурация при нагревании; более чувствительны к условиям хранения
Иммуногенность*	Не показана	Высокая
Возможности введения химических модификаций	Широкие	Ограниченные

Что такое ДНК-сенсоры?

Идея использования биологических молекул в качестве компонентов сенсорных систем возникла в 60-е годы XX в. Однако в полной мере её реализация происходит в последние десятилетия. В общем виде биосенсор можно представить как систему, состоящую из биологического распознающего элемента и физического преобразователя (трансдьюсера). В качестве

распознающего элемента выступают биологические молекулы (ДНК, ферменты, антитела), клетки, органы или даже целые организмы. Биологический объект в составе биосенсора обеспечивает специфичность распознавания анализируемого сигнала. Задача физического трансдьюсера – преобразование сигнала биокомпонента, его обработка и представление в цифровой форме.

Конечно, создатели биосенсоров не могли обойти вниманием такой замечательный природный распознающий элемент, как ДНК. Сегодня можно выделить не менее 3-х подходов к конструированию ДНК-сенсоров (в зависимости от механизма распознавания):

1. **гибридизационные** ДНК-сенсоры основаны на способности одноцепочечной ДНК узнавать и специфически взаимодействовать с комплементарными последовательностями нуклеотидов;
2. **интеркаляционные** ДНК-сенсоры используют способность ДНК к включению (интеркаляции) в свою структуру некоторых химических веществ;
3. **аптамерные** ДНК-сенсоры используют синтетические трёхмерные структуры из ДНК, специфичные к веществу-мишени.

Рассмотрим принципы функционирования **гибридизационных** ДНК-сенсоров. Распознавание в таких устройствах обеспечивается процессом восстановления структуры двуцепочечной ДНК на основе комплементарных взаимодействий. На сенсоре закрепляют (процесс носит название «иммобилизация») одноцепочечные ДНК-зонды известного состава – их нуклеотидные последовательности комплементарны целевой молекуле ДНК (той, которую мы предполагаем найти в пробе). Если таковая найдётся, то по законам физики и химии она провзаимодействует с зондом, и количество ДНК на поверхности сенсора возрастёт. А затем, отмыв несвязавшиеся компоненты пробы, производят определение количества ДНК. Например, электрохимически определяется ток окисления пуринов (при потенциале $E \approx +1000$ - $+1200$ mV) – он пропорционален количеству ДНК в пробе.

ДНК-сенсор *Motorola eSensor*™ реализует «сэндвич»-технологию ДНК-анализа (см. рис. 9). На электроде закреплён олигонуклеотид ДНК известного состава – ДНК-зонд-1 (красный цвет), подобранный комплементарно одной из частей целевой молекулы ДНК. ДНК-зонд-2 (синий цвет) комплементарен другой части целевой молекулы. Его метят электроактивным веществом – например, ферроценом (оранжевая звёздочка). При наличии в пробе целевой последовательности ДНК (зелёный цвет) происходит гибридизация, и электроактивное вещество оказывается на поверхности электрода, где подвергается окислительно-восстановительным превращениям, что вызывает увеличение силы тока пропорционально содержанию целевой молекулы в пробе.

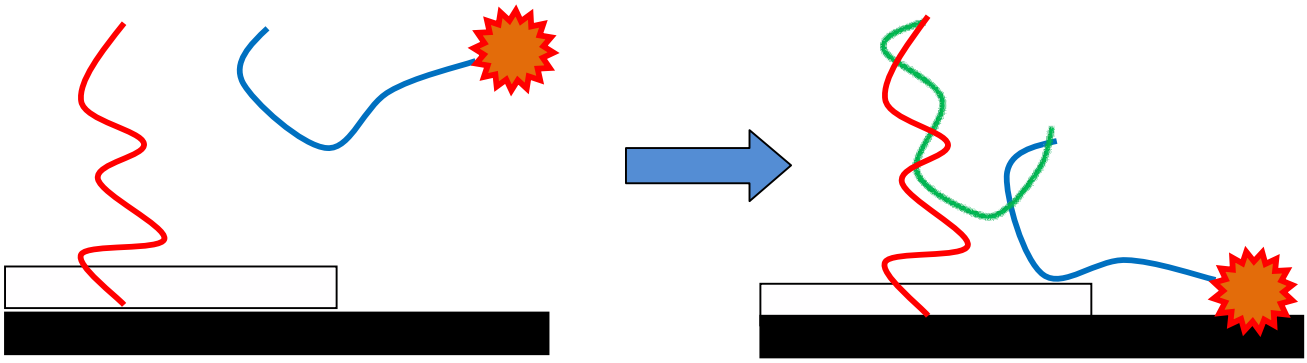

Рис. 9. Схема ДНК-сенсора *Motorola eSensor*™ (пояснения в тексте).

Предложены электрохимические сенсоры на основе ДНК-шпилек (см. рис. 10). Зонд такого сенсора содержит «самокомплементарную» последовательность ДНК и электрохимическую метку. При отсутствии целевой молекулы ДНК регистрируется фоновый уровень тока, обусловленный окислением электроактивного вещества. Затем температуру повышают (напомним – это приводит к плавлению ДНК) и вводят пробу. Если в пробе есть целевая молекула ДНК, при охлаждении она займёт комплементарные последовательности и не даст шпильке замкнуться. Электрохимическая метка окажется далеко от поверхности электрода и не сможет эффективно окисляться. Следовательно, степень снижения тока будет показателем количества целевой последовательности ДНК в пробе.

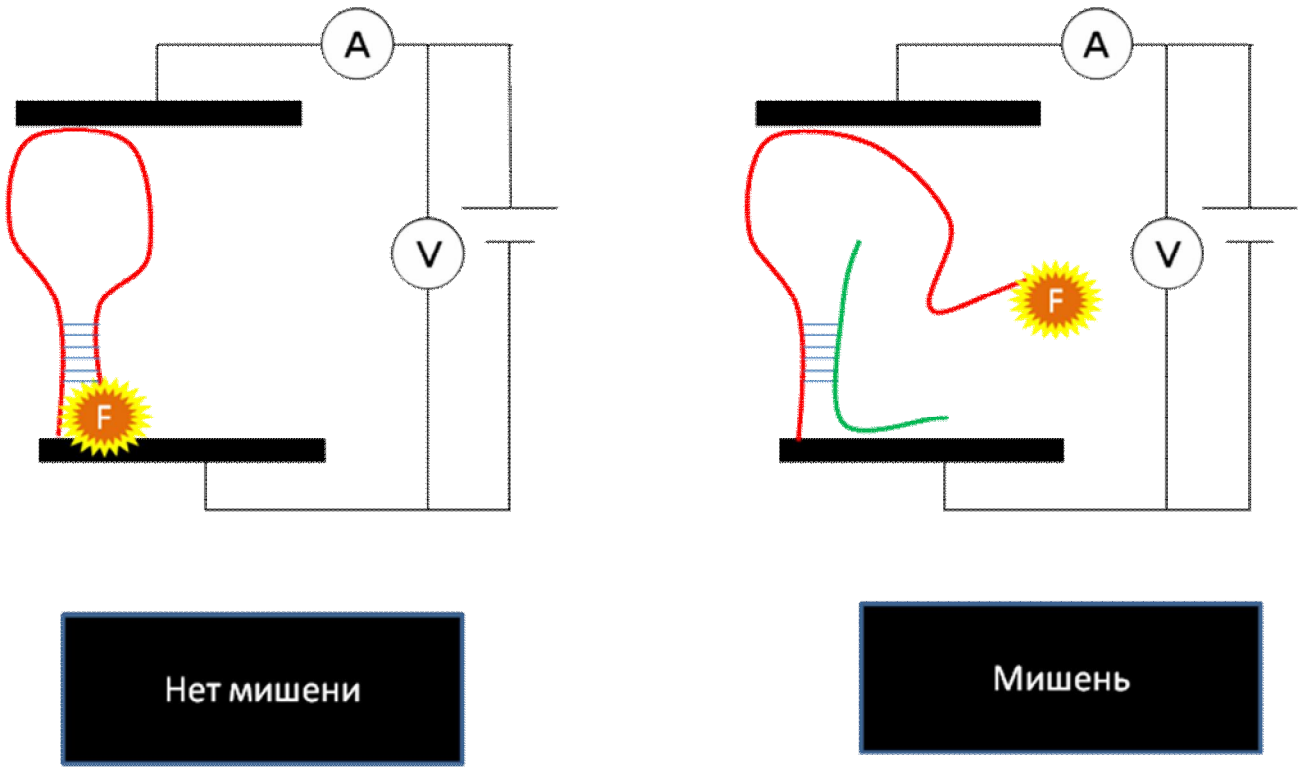

Рис. 10. Схема ДНК-сенсора на основе шпилек (пояснения в тексте).

На сайте *nanometer.ru* опубликован реферат статьи о ещё одном подходе к конструированию электрохимических ДНК-сенсоров. Схема работы устройства весьма проста: основой сенсора является пористая мембрана из оксида алюминия; к стенкам пор пришивают молекулы морфолино, которые обладают способностью связывать молекулы ДНК. В результате содержащиеся в пробе молекулы ДНК накапливаются в порах и снижают их проницаемость для крупных ионов (в работе использовали красную кровяную соль). Очевидно, что сила тока, обусловленного переносом ионов сквозь такую мембрану, будет падать пропорционально содержанию ДНК в образце. Подбирая размеры пор и режимы измерений, можно фиксировать наличие в образце 10^{-10} моль/л ДНК.

Морфолино – искусственные молекулы, используемые для изменения экспрессии генов. Антисмысловые олигомерные морфолино применяют для блокировки доступа других молекул к специфическим последовательностям нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Морфолино блокируют небольшие одноцепочечные участки (приблизительно 25 нуклеотидов) на поверхности молекул РНК. Выключение экспрессии генов используют для изучения функции определённого белка; изменение характера сплайсинга может показать функцию конкретного экзона гена. Морфолино используются также при создании фармакологических препаратов для лечения бактериальных и вирусных заболеваний и уменьшения фенотипических проявлений наследственных болезней. Впервые морфолино были синтезированы Дж. Саммертоном и Д. Веллером в 1997 г.

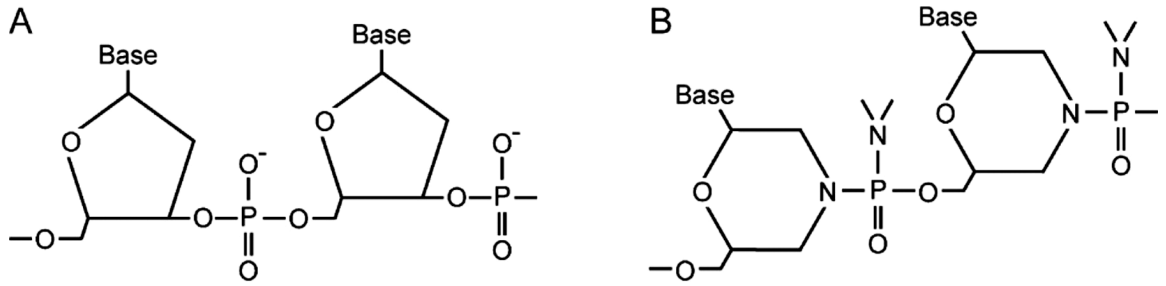

Рис. 11. Фрагмент цепи ДНК (А) и морфолино (В). *Base* – любое азотистое основание.

Очевидно, что гибридизационные ДНК-сенсоры найдут применение в молекулярной генетике, микробиологии, диагностике инфекционных болезней и в других областях, где имеет значение поиск и анализ специфических последовательностей ДНК.

Интеркаляционные ДНК-сенсоры построены на принципе внедрения какого-либо вещества в структуру двойной цепи ДНК.

Идея интеркаляционных взаимодействий разнообразных веществ и ДНК принадлежит Л. Лерману (1961 г.). Он предположил, что некоторые лекарства могут встраиваться между соседними азотистыми основаниями ДНК. Причём вещество-интеркалятор вступает с основаниями ДНК в ван-дер-ваальсовские и гидрофобно-гидрофильные взаимодействия, которые, с одной стороны, стабилизируют комплекс «ДНК-интеркалятор», а с другой – приводят к искажениям структуры ДНК.

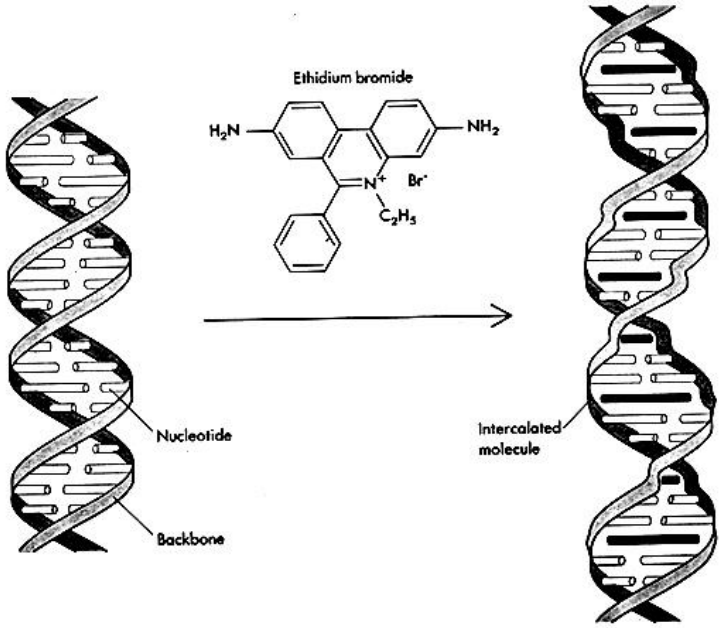

Рис. 12. Интеркаляция красителя бромида этидия (чёрные линии) в ДНК (http://cmgm.stanford.edu/biochem201).

В основе интеркаляционного ДНК-сенсора лежит двуцепочечная молекула ДНК. Последовательность нуклеотидов такой ДНК не является ключевым моментом анализа. Например, для определения сульфонамидов (в эту группу входят некоторые лекарственные препараты) был предложен ДНК-сенсор с иммобилизованным ферментом – пероксидазой. В качестве маркера

использовали известный краситель метиленовый синий. Этот краситель связывается с молекулой ДНК и одновременно является субстратом для пероксидазы. При добавлении метиленового синего и перекиси водорода в сенсоре возникает каталитический ток, т.к. краситель с помощью ДНК концентрируется около пероксидазы. Если в пробе содержатся определяемые вещества (сульфонамиды), понижающие сродство ДНК к метиленовому синему, происходит вытеснение красителя с поверхности ДНК – его концентрация снижается, следовательно, снижается и скорость работы пероксидазы, что приводит к уменьшению силы тока пропорционально концентрации интеркалятора в пробе. Такие сенсоры планируют применять для оценки качества лекарственных препаратов.

Новейшими разработками в области ДНК-сенсоров являются **аптамерные сенсоры**. Исследователи из МГУ разработали аптамерный ДНК-сенсор для определения субнаномолярных количеств тромбина. Для этого на поверхность пьезокварцевого кристалла были иммобилизованы аптамеры к тромбину. Присутствие целевого белка изменяет частоту колебаний пьезокристалла пропорционально концентрации анализируемого белка. Изначально сенсор показал предел обнаружения порядка 25 нМ тромбина, который авторы посчитали недостаточным, и смогли значительно улучшить чувствительность сенсора (до 1,5 пМ в модельном растворе) путём «утяжеления» целевой молекулы наночастицами золота и серебра. Оптимистично выглядят и операционные характеристики сенсора – он проработал более 2-х месяцев, а аптамеры после измерения можно регенерировать.

На рис. 13 показана схема действия аптамерного сенсора для определения тромбоцитарного фактора роста (*PDGF*) – молекулярного маркера некоторых опухолей. Чувствительность сенсора составляет 5 пМ.

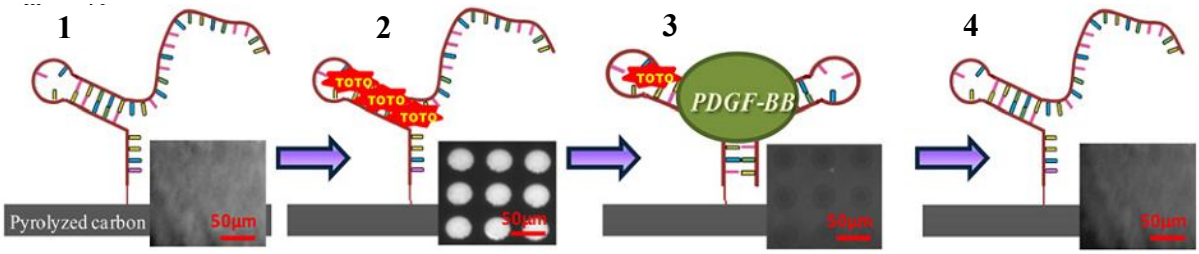

Рис. 13. Аптамерный ДНК-сенсор тромбоцитарного фактора роста: 1 – аптамер, закреплённый на положке; 2 – интеркаляция красителя в ДНК-аптамер вызывает флуоресценцию; 3 – комплекс *PDGF* – аптамер: уменьшение флуоресценции пропорционально концентрации целевой молекулы в пробе; 4 – регенерация структуры аптамера: сенсор готов к следующему анализу (по *V. Penmatsa et al.,* 2012).

Что такое ДНК-чипы?

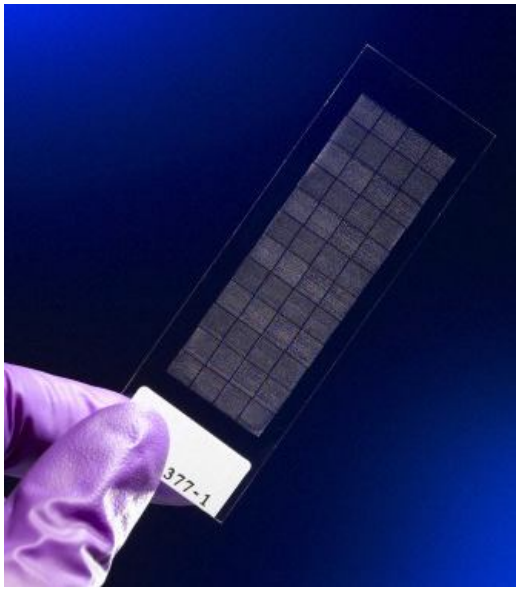

Рис. 14. ДНК-чип *(www.science-museum.org.uk).*

Говоря о ДНК-сенсорных технологиях, нельзя обойти вниманием одно из самых перспективных направлений – ДНК-микрочипы. ДНК-чип (англ. *DNA microarray,* или *DNA-chip, Gene-chip*) – миниатюрная пластина из стекла или кремния с нанесёнными на неё в определённом порядке фрагментами ДНК (ДНК-зондами) с известной последовательностью нуклеотидов для проведения генетического анализа.

ДНК-чип имеет площадь приблизительно 1 см^2. На нём в строго определённом порядке размещены ячейки. Количество ячеек чипа может достигать 1 млн., а размер их сторон обычно не превышает 10 микрометров. Каждая ячейка содержит одноцепочечные полинуклеотиды одной определённой последовательности оснований. Длина полинуклеотидов варьирует от 9-10 до 1000 оснований.

Существуют два основных направления создания ДНК-чипов. Исторически первыми были методы размещения на чипах предварительно химически синтезированных олигонуклеотидов или полученных с помощью ПЦР одноцепочечных фрагментов ДНК. Эти методы просты в использовании, необходимое оборудование доступно и относительно дешево. Самым главным преимуществом является высокая гибкость этих методов, позволяющая создать чип с любыми требующимися последовательностями нуклеотидов. Но есть и труднопреодолимые недостатки, сильно ограничивающие их использование. Прежде всего, это огромные затраты труда, времени и средств на синтез требуемого количества различных олигонуклеотидов. Плотность размещения ДНК на таких чипах не может превышать нескольких десятков тысяч на 1 см^2.

Другим, более перспективным, направлением является применение разработанных для нужд микроэлектроники литографических технологий с использованием ультрафиолетового излучения. Такие технологии позволяют синтезировать олигонуклеотиды непосредственно на поверхности чипа. При этом плотность их размещения составляет несколько миллионов на 1 см^2. Недостатком этих технологий является необходимость изготовления литографических масок, что ограничивает возможность синтеза таких чипов рамками крупных фирм.

ДНК-чипы обычно применяют для анализа экспрессии генов. Один чип может одновременно измерить экспрессию десятков тысяч генов и выявить около миллиона мутаций. Для анализа из клеток выделяют суммарную мРНК (чем больше мРНК данного гена, тем выше его экспрессия). Затем на матрице РНК синтезируют ДНК – процесс называется «обратная транскрипция» и производится ферментом вирусного происхождения обратной транскриптазой. Полученная ДНК обозначается «кДНК» (комплементарная). Перед нанесением на чип её соединяют с радиоактивной или флуоресцентной меткой.

На чипе кДНК гибридизируется с комплементарным ДНК-зондом, и соответствующая ячейка чипа накапливает метку. Чем больше кДНК в образце (а это количественный показатель содержания в клетках определённой мРНК), тем интенсивнее проявляется метка.

Результатом ДНК-микрочипового исследования является матрица из точек, интенсивность свечения которых прямо пропорциональна активности соответствующих генов.

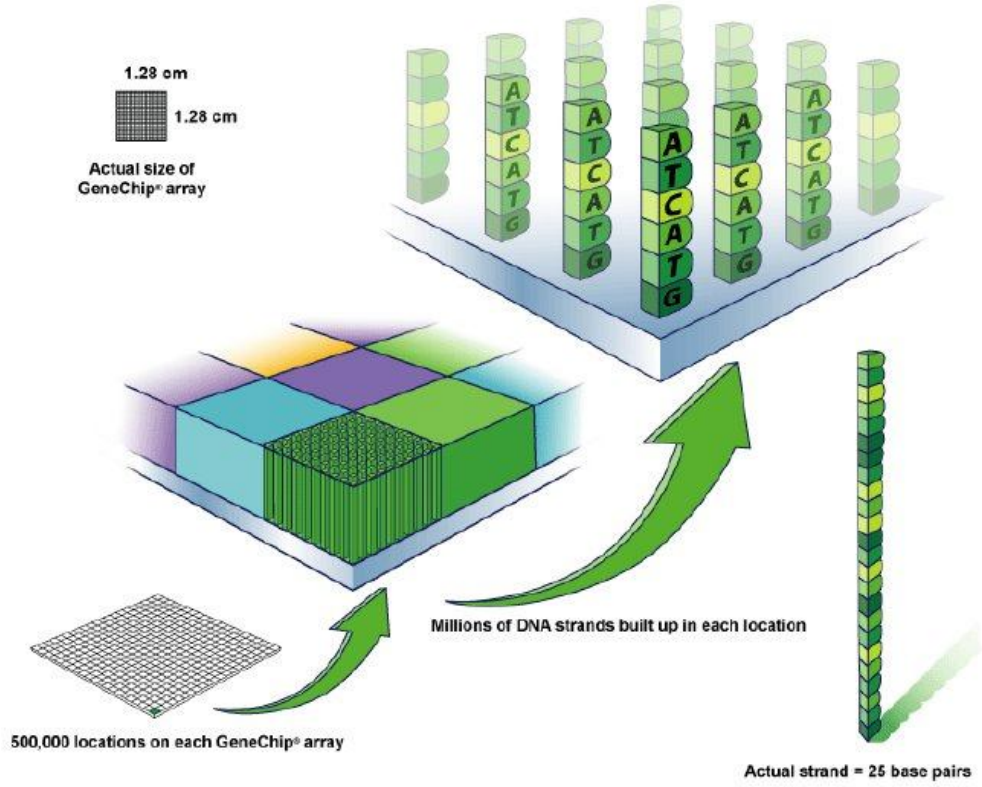

Рис. 15. Схема устройства ДНК-чипа (по http://users-cs.au.dk/chili).

Разработаны специальные лазерные считыватели чипов (чип-ридеры), которые превращают матрицу меток в понятные человеку цифровые данные.

ДНК-чипы применяются в двух основных областях:

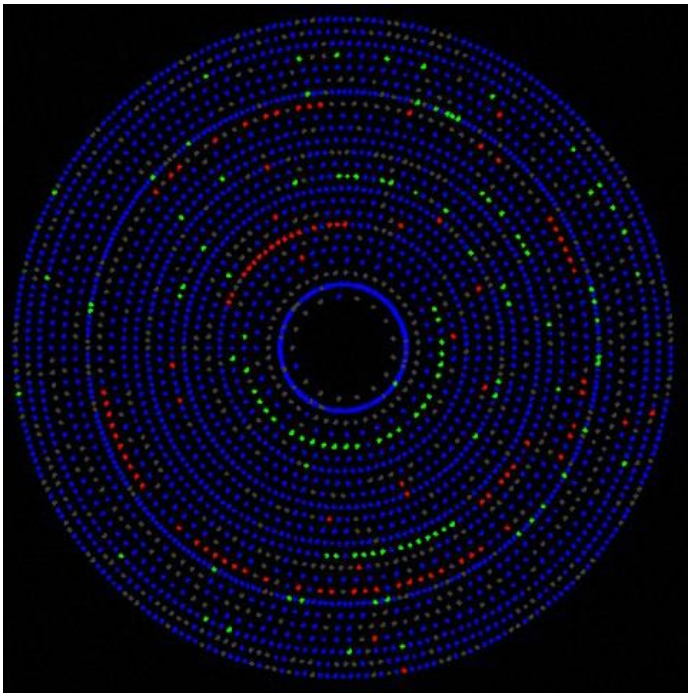

Рис. 16. Кольцевой ДНК-чип после гибридизации (*www.sciencemuseum.org.uk*).

1. Изучение экспрессии генов в норме и при различных патологиях.

Благодаря ДНК-чипам у исследователей появилась ранее недоступная возможность изучать геном как целое. Только применение ДНК-чипов позволяет единовременно количественно определить уровень экспрессии множества генов, а в перспективе – и целого генома.

ДНК-чипы позволяют реализовать новые возможности для изучения мутаций. Так, для анализа всех возможных мутаций во всех генах человека достаточно ДНК-чипа с количеством ячеек, равным 100-200 млн., что технически достижимо.

Безусловно, применение ДНК-чипов просто необходимо в диагностике наследственных заболеваний. Одной из точек приложения, очевидно, станет массовый неонатальный скрининг – обследование новорождённых на наличие наиболее опасных и часто встречающихся наследственных патологий.

2. Диагностика инфекционных заболеваний.

Если в ячейки чипа нанести ДНК возбудителей различных болезней, то можно за одно измерение провести скрининг (просеивание) сразу множества предполагаемых возбудителей. Такой чип сравнительно дёшев, хорошо хранится (несколько лет), быстро подготавливается к анализу.

ДНК-чип-технологии чрезвычайно привлекательны для внедрения в широкую клиническую практику. Специалисты по ДНК-чипам предсказывают появление новой, очень перспективной сферы высокотехнологичного бизнеса, сравнимого по объёму финансовых средств и темпам роста с *IT*-технологиями.

В России разработкой и внедрением ДНК-чипов занимается «Лаборатория биологических микрочипов» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Исследователям этой лаборатории принадлежат фундаментальные пионерские работы по биочипам – ещё в 1984 году здесь были изготовлены первые в мире биочипы и оборудование для их анализа.

Что такое ДНК-оригами?

В предыдущих главах мы убедились, что из линейных молекул ДНК могут формироваться довольно сложные структуры. Вообще в строении самой молекулы ДНК заложен потенциал самоорганизации – благодаря образованию водородных связей между комплементарными основаниями ДНК обладает способностью к упорядоченной самосборке.

Ещё в начале 80-х годов XX века Н. Симан стал исследовать возможности получения нелинейных форм ДНК из синететических олигонуклеотидов. Обычно ДНК представляют как линейную неразветвлённую молекулу, но на стадии репликации возникает временная разветвлённая структура, так называемая репликативная вилка, в области которой ДНК является нелинейным полимером. Устойчивое подобие репликативной вилки можно создать с помощью трёх олигонуклеотидов, если одна половина последовательности нуклеотидов в первом из них будет комплементарна второму, а другая половина – третьему. Аналогичным образом должны быть подобраны последовательности для второго и третьего олигонуклеотидов из этой связки. В этом случае при температуре отжига из таких олигонуклеотидов будет формироваться простейшая разветвлённая структура в виде трёхлучевой звёздочки.

> Поэкспериментируйте, например, с такими последовательностями нуклеотидов: АААААААГГГТГГГГ, ТТТТТТТТЦЦЦЦЦЦЦЦ, ЦЦЦЦАЦЦЦГГГГГГГГ. Как добиться получения треугольников? Подберите последовательности для формирования более сложных фигур.

Увеличивая путём специального подбора последовательностей нуклеотидов число мест ветвления, возможно создавать весьма сложные конструкции. Причём если олигонуклеотиды будут иметь на своих концах определённым образом подобранные «липкие» участки, с помощью ДНК-лигазы такие олигонуклеотиды можно «сшивать» сначала в основные строительные блоки, из которых затем создавать объёмные наноструктуры в виде решёток, кубов, октаэдров, многогранных катенанов, ротаксанов и др.

В 2006 г. американский биолог Пол Ротмунд освоил технологию получения из синтетических фрагментов ДНК правильных геометрических форм — треугольников, квадратов, звёздочек, смайликов и др. Это несерьёзное на первый взгляд исследование вошло в список 12 самых важных научных открытий года. Технология получила название «ДНК-оригами».

Для получения оригами формируется компьютерная модель ДНК-структуры, которую мы хотим получить. В первом приближении ДНК представляется как тонкий цилиндр. Затем рассчитывается количество и

последовательность нуклеотидов, а также расположение перекрёстных сшивок-кроссоверов – небольших фрагментов ДНК, соединяющих элементы оригами между собой. Олигонуклеотиды помещают на подложку при температуре плавления ДНК. Затем температуру снижают, запуская процесс гибридизации, который приводит к самосборке ДНК-оригами. Сложность получаемых структур иллюстрирует рис. 18, на котором Ротмунд изобразил Северную и Южную Америки. Ведутся работы по получению трёхмерных структур из ДНК.

Забавная картинка, конечно, не самоцель ДНК-оригами. Эта технология уже применяется для конструирования систем доставки лекарств. Например, связывание антибиотика доксирубицина (противораковый препарат) с оригами-жгутом из ДНК позволило повысить эффективность воздействия на клетки опухоли. Оказалось, что новый препарат более активно поглощается клетками и индуцирует в них апоптоз. Причём оригами-конструкция позволяет уменьшить дозу препарата, что должно способствовать снижению токсического влияния доксирубицина на нормальные клетки (а, значит, уменьшить побочные действия лекарства).

Технология ДНК-оригами может быть использована в микроэлектронике для формирования наноразмерных литографических масок, а в перспективе – и создания электронных устройств на основе ДНК.

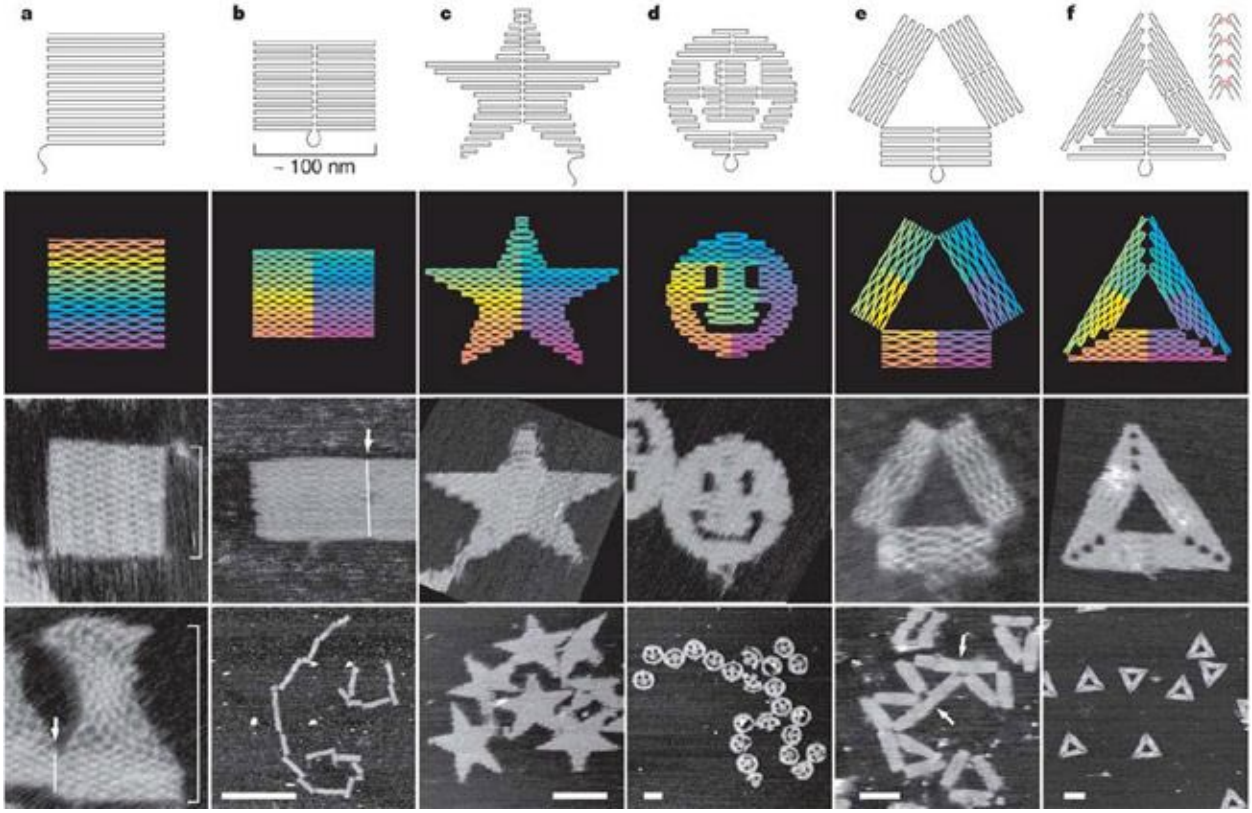

Рис. 17. ДНК-оригами (из работы П. Ротмунда). Верхний ряд – модели ДНК-оригами; цветные рисунки – порядок сборки (красный цвет соответствует первому основанию, а фиолетовый – последнему); два нижних ряда – изображение ДНК-структур в атомно-силовом микроскопе (полоска соответствует 165 нм).

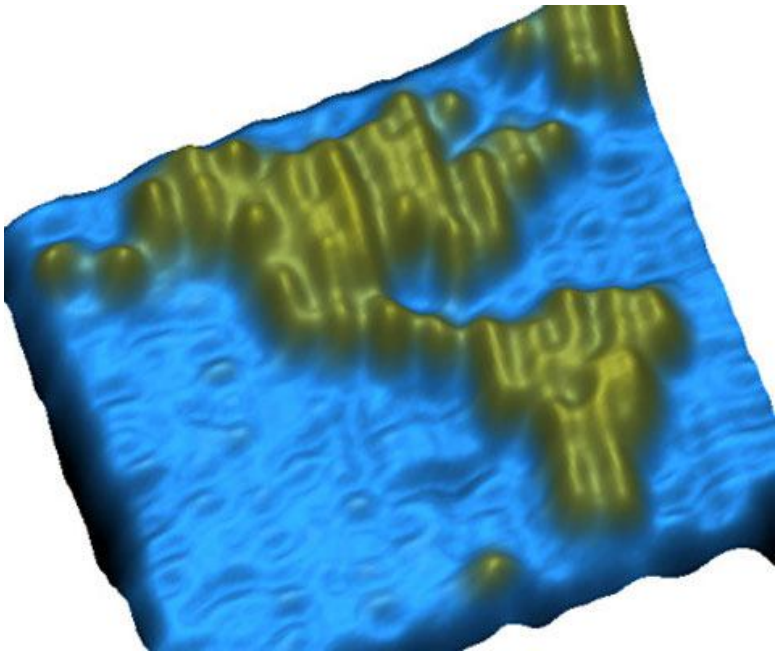

Рис. 18. ДНК-оригами-карта.

Как заставить ДНК двигаться?

Удивительно, но на основе ДНК возможно создание молекулярно-механических устройств. Например, израильские исследователи под руководством Ж.-Г. Ванга в 2011 году предложили ДНК-модель «пешехода». Это уже не просто фигурка из ДНК, а настоящая молекулярная машина. Изменяя pH и концентрацию некоторых ионов, можно заставить конструкцию перемещаться по ДНК-матрице. В одну сторону ДНК-пешеход идёт при чередовании действия ионов ртути и закислении среды, а чтобы заставить его вернуться, нужно ввести в систему цистеин и повысить показатель pH (рис. 20). Дело в том, что ионы ртути образуют комплексы с тимином ДНК, а цистеин приводит к восстановлению структуры молекулы. Повторяя описанные манипуляции, можно добиться последовательного перемещения – шагающих движений ДНК-конструкции.

(1)	5'-AGTGCAATCGTGATC AGAGATTACAGTGACGTTG-3'
(1')	5'-GATCACGATTGCACT AGCGCTGCCT- Cy5 (F_1) -3'
(2)	5'-CAACGTCACTGTAATCTCT CTGGACTCGTCACCTGGTG AGCATGCTATGTCAG-3'
(2')	5'-Cy3(F_2)-CCGGACCCTAACCCTAACCCTAACCC CTGACATAGCATGCT-3'
(3)	5'-TCACACAGTCAGTAC AAACTACGTAGTCCTAAGC CACCAGGTGACGAGTCCAG-3'
(3')	5'-GTACTGACTGTGTGA TCCGTGCGCA – Cy5.5 (F_3)-3'
(4)	5'-GCTTAGGACTACGTAGTTT CGATCACATCACAGATATA TGCTAGACTAGACTG-3'
(4')	5'- ROX (F_4)-CGGACCC AAAAAAAAAAAAAAAAAA CAGTCTAGTCTAGCA-3'
(5)	5'- TATATCTGTGATGTGATCG -3'
(6)	5'-ACCTACTCTCA GGCAGCGCTCGGT-3'
(7)	5'- AGGGTCCG CTGGCGTGCAC-3'
(8)	5'-Q_1 (Iowa Black RQ)-TGAGAGTAGGT AAA GTGCACGCCAG-Q_2 (Black Hole 2)-3'

Рис. 19. Последовательности, из которых Ж.-Г. Ванг и его коллеги построили ДНК-пешехода. Номера соответствуют рисунку 20.

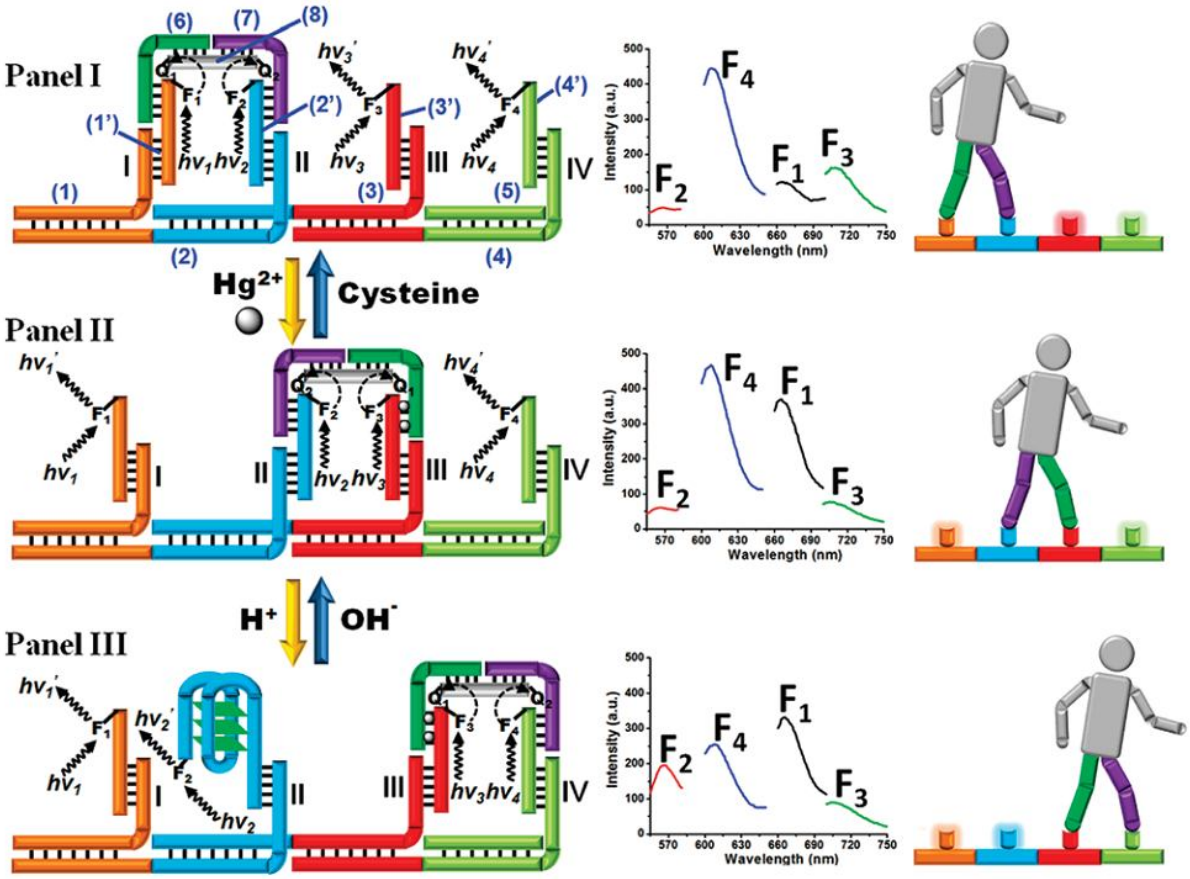

Рис. 20. «ДНК-пешеход». Возможно, так будут работать наномеханические системы будущего (по *Wang Z.-G.et al.,2011*).

Завершая нашу статью, выражаем надежду, что она была интересна и понятна широкому кругу читателей. В дальнейшем мы планируем продолжить публикацию научно-популярных обзоров, посвящённых достижениям генной и белковой инженерии, а также смежных областей знаний.

Что почитать?

Популярно

1. **Батхен, Н**. Химеры. Франкенштейны среди нас: химеры от природы. Человек с двумя ДНК /Н. Батхен, А. Чубенко //Популярная механика: URL: http://www.popmech.ru/article/10443-himeryi-frankenshteynyi-sredi-nas.

2. **Гамов, Г.** Мистер Томпкинс внутри самого себя /Г. Гамов, М. Ичас. – Ижевск: Изд-во УдГУ, 1999. – 328 с.

3. **Тимошенко, А.** 10 материалов, которые поменяют мир / А. Тимошенко //Русский репортёр. – 2012. – №26 (255). URL: http://www.rusrep.ru/article/2012/07/04/materyali.

Базовый уровень (прочти обязательно!)

4. **Будников, Г.К.** Биосенсоры как новый тип аналитических устройств / Г.К. Будников //Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 12. – С. 26-32.

5. **Варфоломеев, С.Д**. Биосенсоры. / С.Д. Варфоломеев //Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 1. – С. 45-49.

6. **Глик, Б.** Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 592 с.

7. **Кольман, Я.** Наглядная биохимия: пер. с нем. / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – М.: БИНОМ, 2009. – 472 с.

8. **Франк-Каменецкий, М. Д.** Век ДНК / М.Д. Франк-Каменецкий. – М.: КДУ, 2004. – 240 с.

9. **Френд, С. Х.** Магия микрочипов / С. Х. Френд, Р. Б. Стафон //В мире науки. – 2002. – № 11. – С. 6-13.

10. **Чемерис, А.В.** Новая старая ДНК. Уникальные черты самой главной молекулы, или Почему учёные разных специальностей в последнее время обращают на ДНК всё больше внимания / А.В. Чемерис, В.А. Вахитов / Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2002. – 80 с.

11. **Шредингер, Э.** Что такое жизнь? Физический аспект живой клетки: пер. с англ. / Э. Шредингер. – Москва-Ижевск: НИЦ «РХД», 2002. – 92 с.

Углублённый уровень (прочти, если заинтересовался!)

12. **Будников, Г.К.** Микроконцентрирование в создании электрохимических сенсоров и биосенсоров для определения ораганических соединений / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин // Рос. хим. журнал. – 2005. – № 2. - С. 22-25.

13. **Будников, Г.К.** Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, В.Н. Майстренко. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – С. 308-314.

14. **Давыдова, А.С.** Эскорт-аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки / А.С. Давыдова, М.А. Воробьева, А.Г. Веньяминова //*Acta naturae.* – Т. 3, № 4 (11). – 2011. – С. 13-31.

15. **Кульбачинский, А.В.** Методы отбора аптамеров к белковым мишеням / А.В. Кульбачинский // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 193-224.

16. **Якушевич, Л.В.** Нелинейная физика ДНК / Л.В. Якушевич. . – Москва-Ижевск: НИЦ «РХД», 2007. – 252 с.

*17. **Wang, Z.-G.** DNA Machines: Bipedal Walker and Stepper / Wang Z.-G., Elbaz J., Willner I. // Nano Lett. – 2011. – № 11. – P. 304–309.*

*18. **Liu, D.** DNA-based switchable devices and materials / Liu D., Cheng E., Yang Z. // NPG Asia Mater. – 2011. – № 3(10). – P. 109–114.*

*19. **Penga, S.** From cells to DNA materials / Penga S., Derriena T. L., Cuia J., Xua C., Luoa D. // Materials Today. – 2012. – V. 15, № 5. – P. 190-194.*

*20. **Penmatsa, V.** Platelet-derived growth factor oncoprotein detection usingthree-dimensional carbon microarrays / Penmatsa V., Ruslinda A. R., Beidaghi M., Kawarada H., Wang C. // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. - № 39. – P. 118–123*

Web-ресурсы

21. URL: http://www.nanometer.ru Сайт факультета наук о материалах МГУ, посвящённый нанотехнологиям и наноматериалам. Содержит информацию и о последних достижениях в ДНК-технологиях.

22. URL: http://www.nanometer.ru/2010/12/06/sensor_237152.html.

23. URL: http://www.nanometer.ru/2011/08/05/kvantovie_provoda_260683.html.

24. URL: http://dna.pynny.ru/russian/main.html Сайт компании «ПИННИ» («Постгеномные и нанотехнологические инновации»). Основное направление деятельности – разработка и внедрение новых технологий в области медицинской генетической диагностики, молекулярной биологии и генной инженерии.

25. URL: http://thesaurus.rusnano.com/wiki/article813 Словарь по нанотехнологиям и смежным областям науки и техники.

26. URL: http://elementy.ru/trefil/dna Материалы сайта о классической и молекулярной биологии, о медицине и истории науки.

27. URL: http://rusnanotech08.rusnanoforum.ru об аптамерном ДНК-сенсоре.

28. URL: http://www.eimb.ru/RUSSIAN_NEW/STRUCTURA/zas.php страница Лаборатории биологических микрочипов Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

29. URL: http://science.compulenta.ru не только компьютерные новости – новинки из всех областей науки и техники.

30. URL: http://biomolecula.ru «Биомолекула» — это научно-популярный сайт, посвящённый молекулярным основам современной биологии и практическим применениям научных достижений в медицине и биотехнологии.