



LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY
Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno
Centrum molekulární biologie a genové terapie



Technologické aspekty čipových technologií

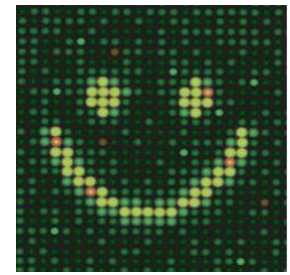
Boris Tichý
18.9.2012



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

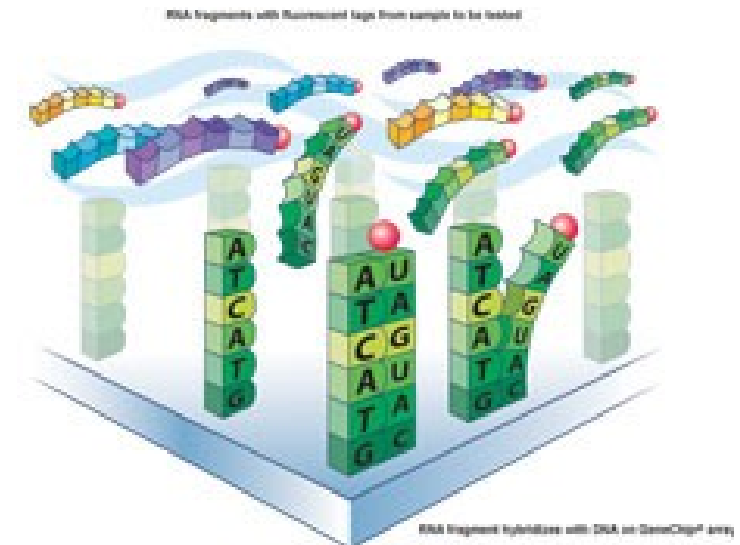
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Čipové technologie



Princip – sondy vázané na nosný podklad

- DNA
- Proteinové (proteiny, protilátky)
- Buněčné
- Tkáňové
- Chemické látky (malé chemické látky, karbohydráty – glycoarrays)



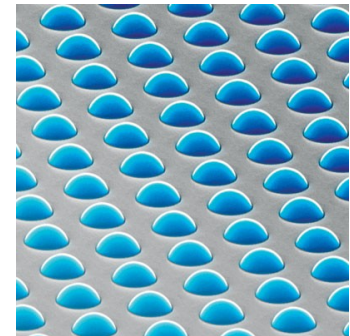
DNA microarrays

Různé dělení podle...

- Typu sond
- Velikosti a hustoty
- Technologie výroby
- Značení
- Aplikace
- Atd.

Nosný podklad

- Sklo
 - mikroskopické sklíčko (25 x 75 mm)
 - speciální formáty
 - různé úpravy povrchu – aminosilan, epoxy atd.
- Nylonová nebo nitrocelulózová membrána
- Plast, gel
- Mikrokuličky
 - BeadArrays® (Illumina)
 - xMAP (Luminex)



Technologie přípravy

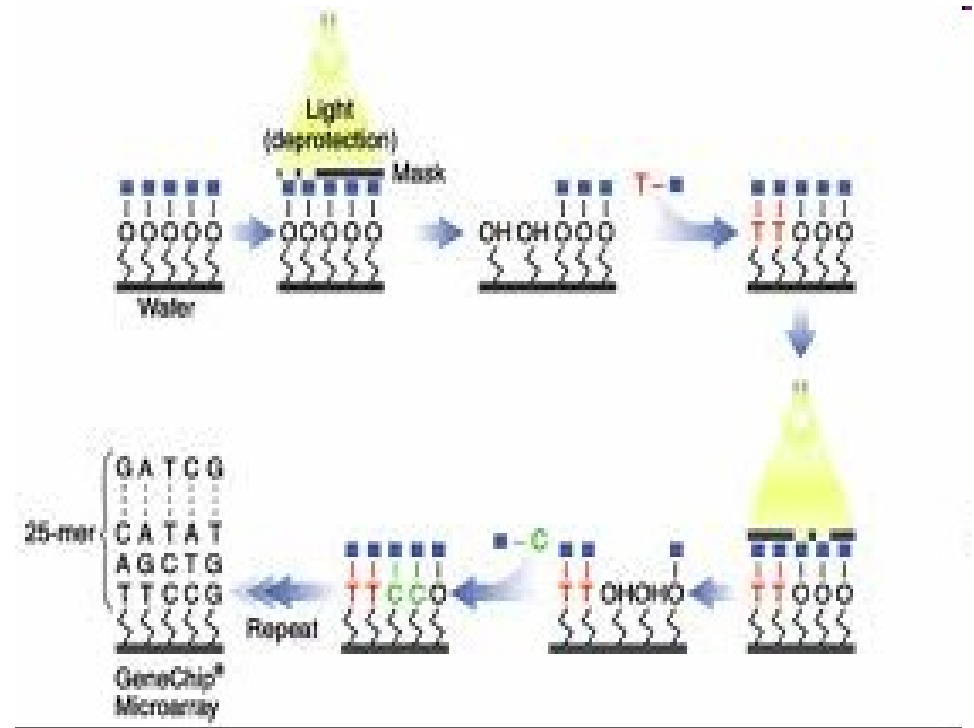
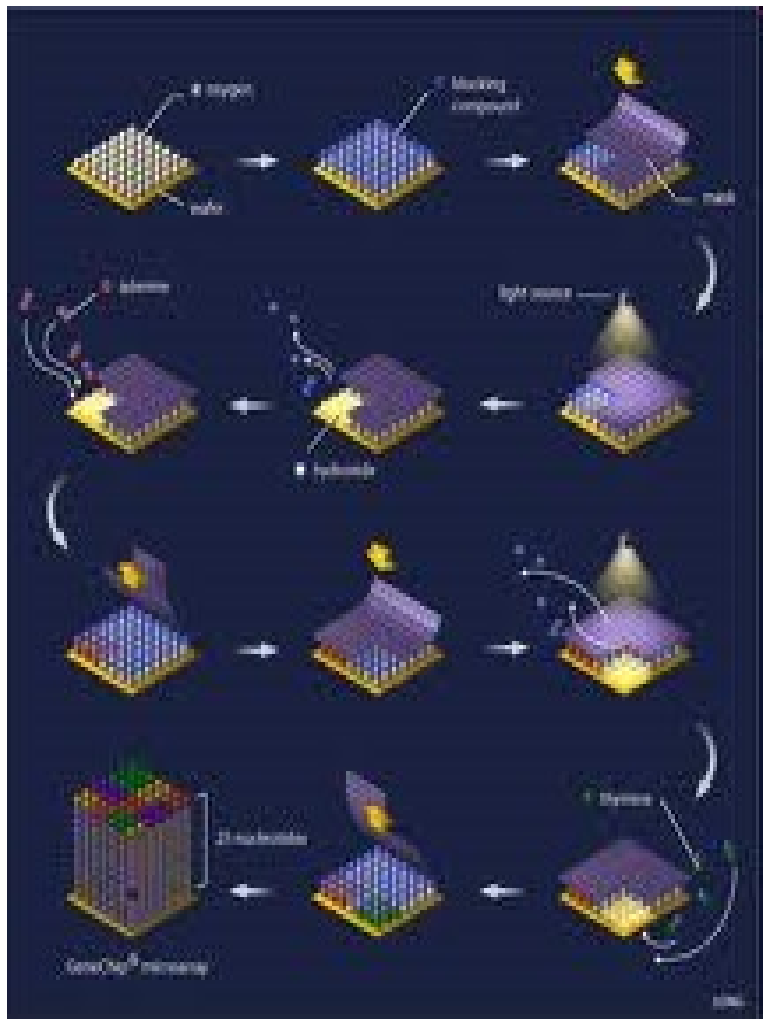
- *in-situ* syntéza sond
 - fotolitografie
 - masky (Affymetrix)
 - mikrozrcátka (Roche/NimbleGen, febit)
 - „ink-jet“ (Agilent)
 - elektrochemie (Combimatrix †)
- deponování sond
 - kontaktní - jehly
 - bezkontaktní
 - mikrokuličky



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

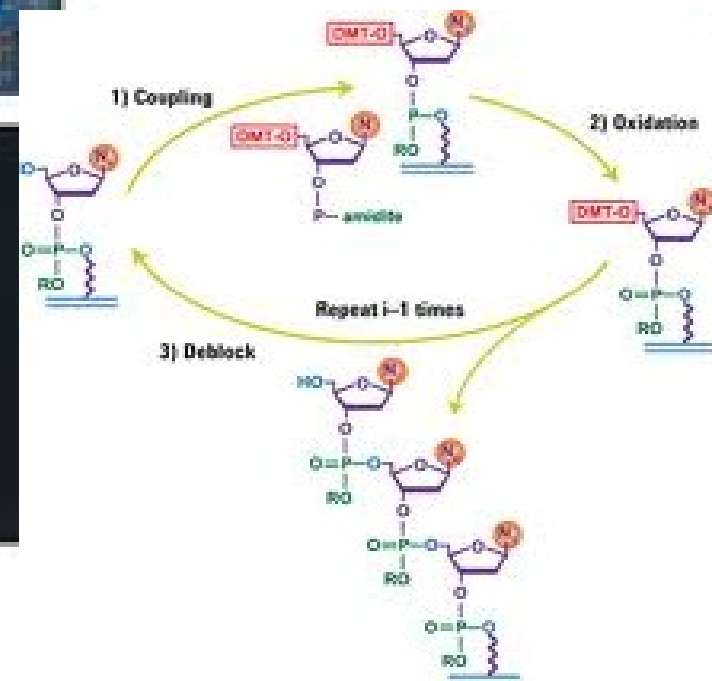
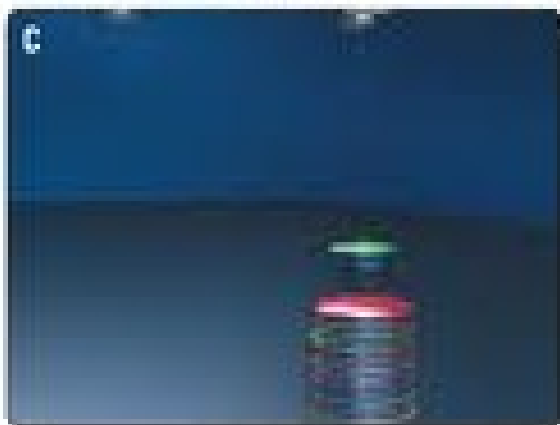
Fotolitografie



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

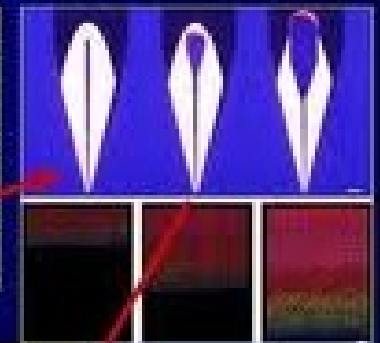
“Ink-jet” syntéza



Spotování (tisk)



Micro Spotting Device Sub-nanoliter Volume Dispensing



Patent # 6101946



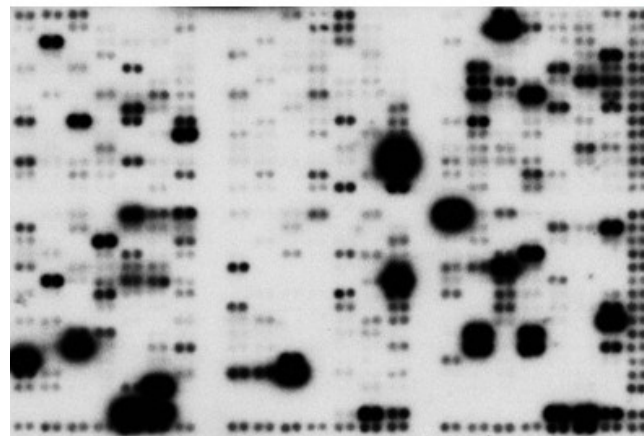
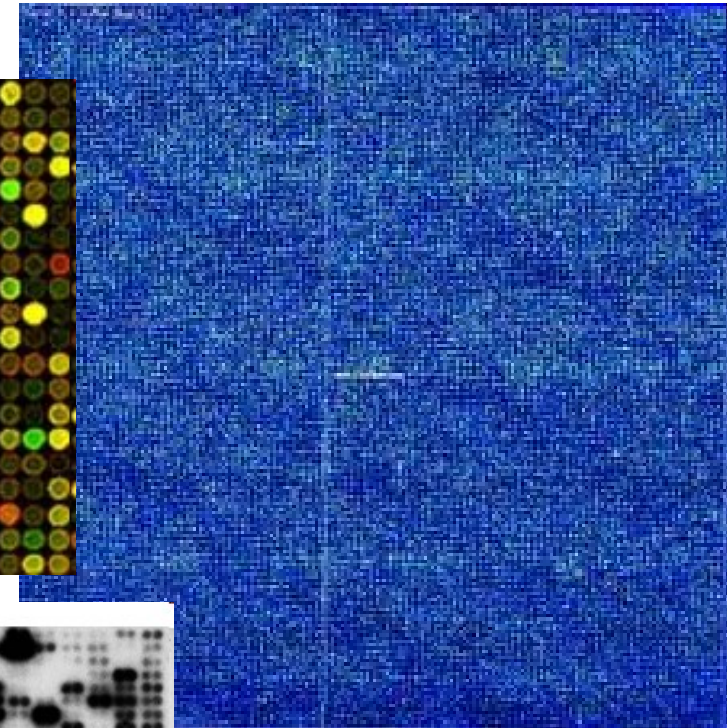
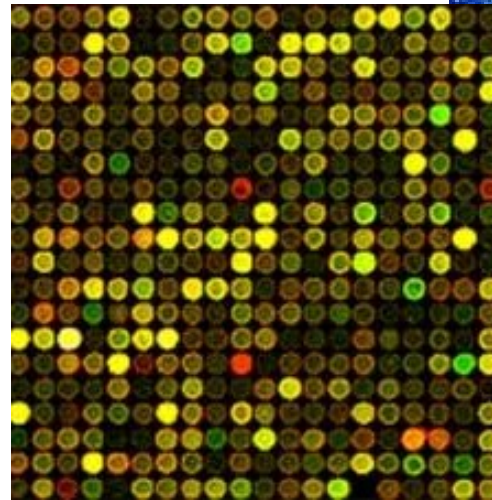
355X

Typy DNA sond

- BAC (bacterial artificial chromosome), PAC (P1-derived AC)
- cDNA
- oligonukleotidy
 - krátké (~ 25 mery)
 - dlouhé (~ 60 mery)
 - LNA („locked nucleic acid“)

Značení vzorků

- fluorescence
 - jednokanálové
 - vícekanálové
- autoradiografie
- chemiluminiscence
- kolorimetrie



Aplikace

- Exprese
 - mRNA
 - microRNA
- Genotypizace
 - SNP array

APEX

Resequencing array



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

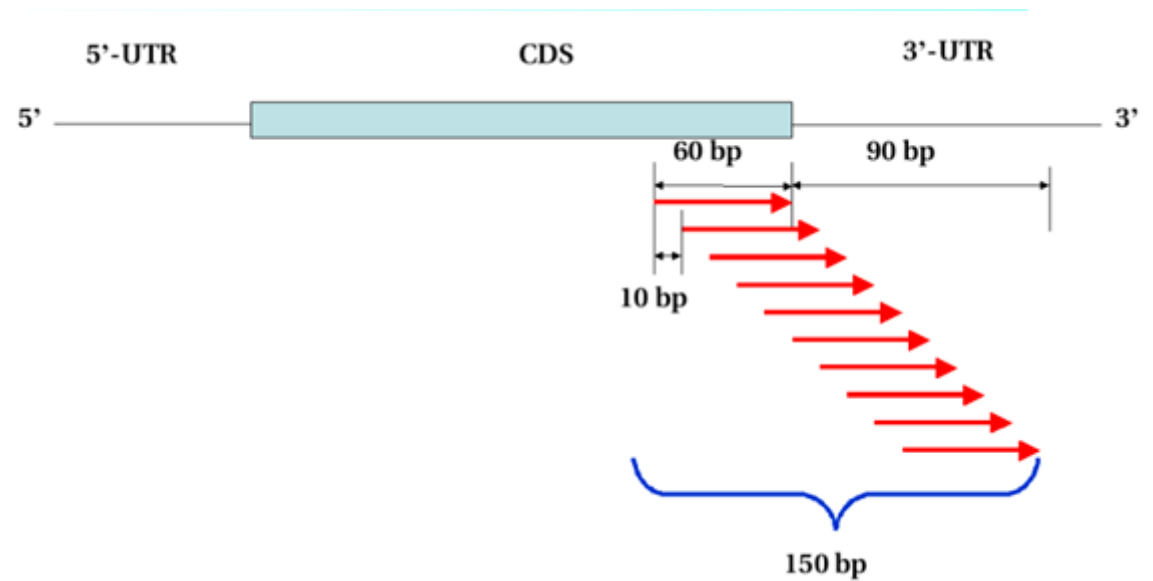


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Aplikace

- Genomové aberace
 - ArrayCGH
 - Tiling arrays
- Epigenetika
 - Tiling arrays
 - ArrayCGH
 - SNP array



Zpracování vzorků - izolace

RNA

fenol-chloroform – Trizol

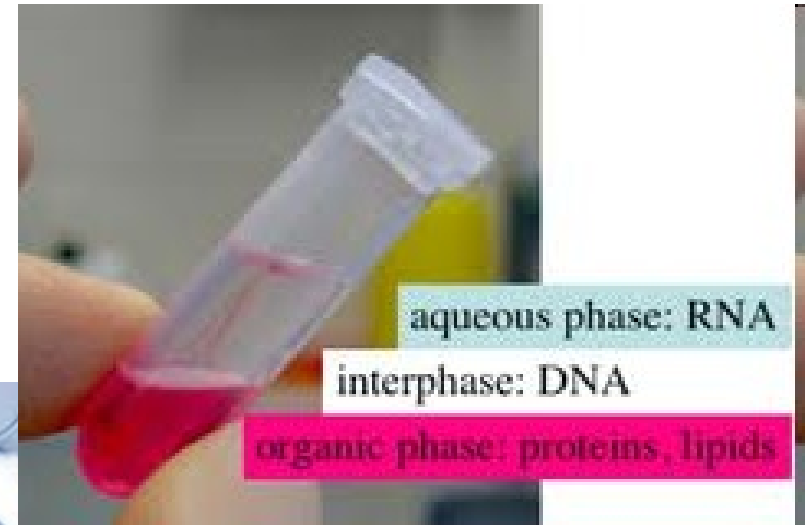
kolonka

poly-A

microRNA

DNA

FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded)



Zpracování vzorků - QC

RNA

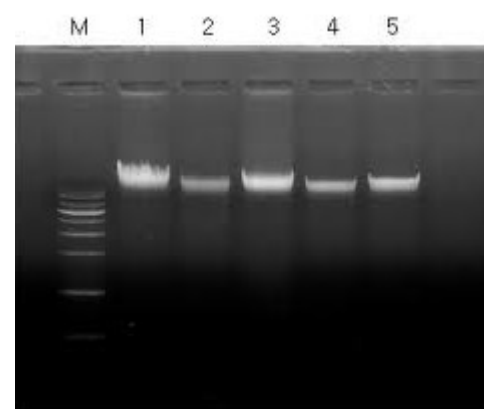
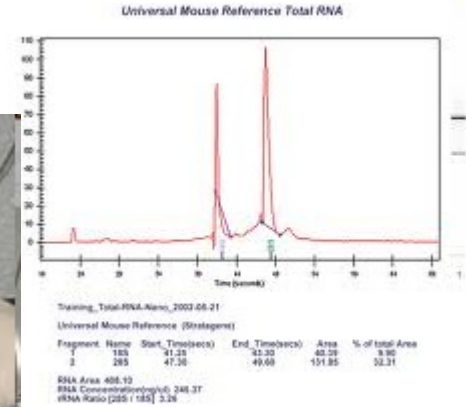
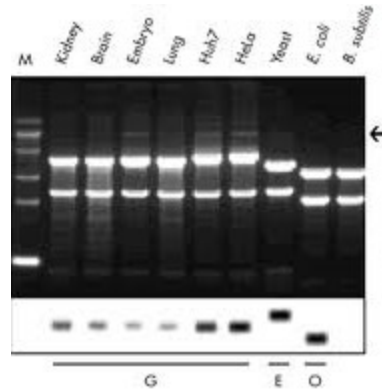
elektroforéza

BioAnalyzer

RT-PCR – 3' a 5' fragment

DNA

elektroforéza



Zpracování vzorků - amplifikace

RNA

in-vitro transkripce („Eberwine“)

jedno i vícekolová

T7 (T3, SP6) RNA polymeráza

oligo-dT primer s promotorem RNA polymerázy

dvouvláknová cDNA !

další metody

PCR-based (template switching PCR, random PCR, 3' tailing with 5' adaptor ligation PCR)

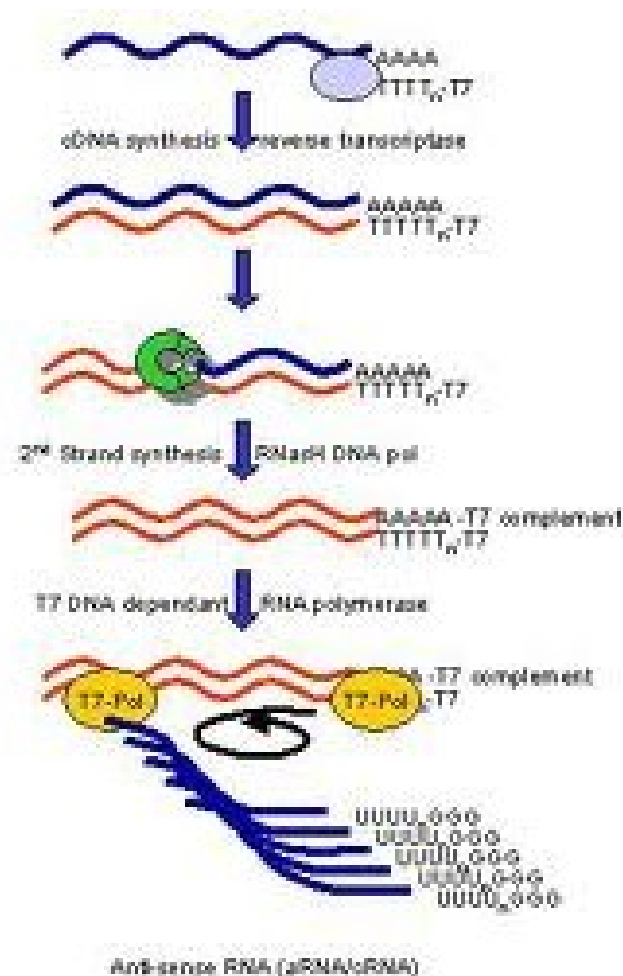
Ribo-SPIA

DNA

whole genome amplification (WGA)

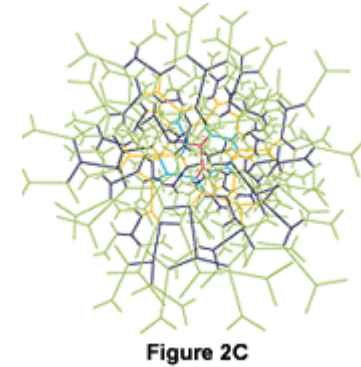
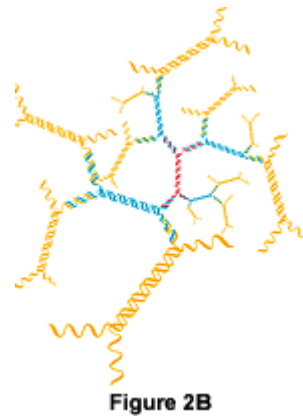
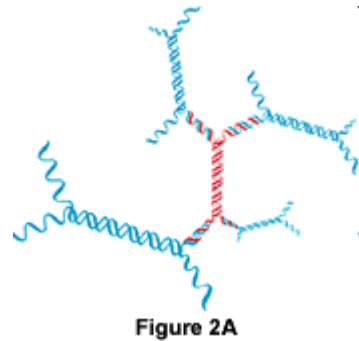
PCR-based

isotermální



Amplifikace signálu

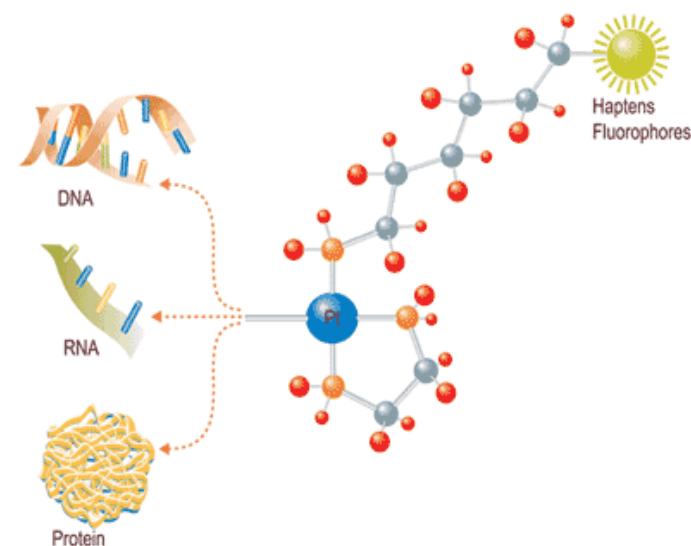
dendrimery



streptavidin + anti-streptavidin Ab značené
biotinem + fluorescenčně značený streptavidin

Značení vzorků

- inkorporace značených nukleotidů (vč. systému streptavidin-biotin)
- inkorporace modifikovaných (aminoallyl) nukleotidů + vazba barvy
- ne-enzymatická reakce vazby na nemodifikované vzorky
- dendrimery
- ligace značených oligonukleotidů, prodlužování řetězce značenými nukleotidy



Hybridizace a odmyváání

fragmentace vzorků

enzymatická

ne-enzymatická

hybridizace

teplota

čas

objem

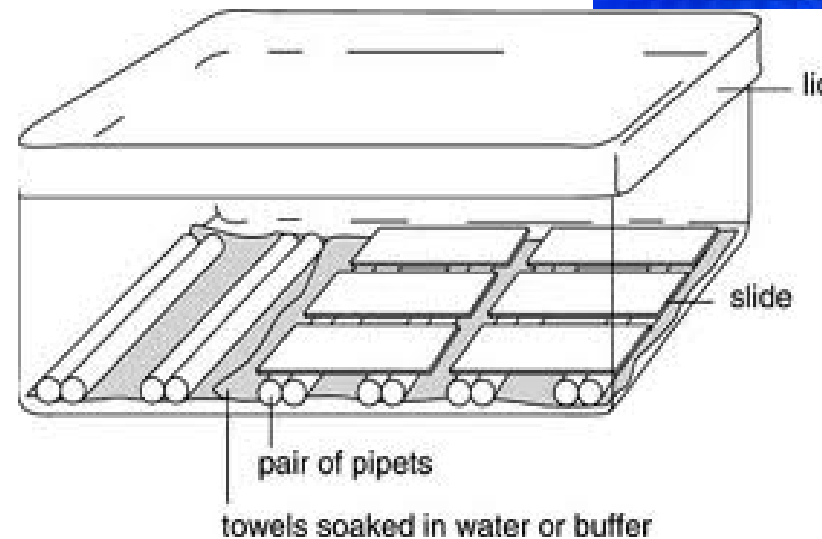
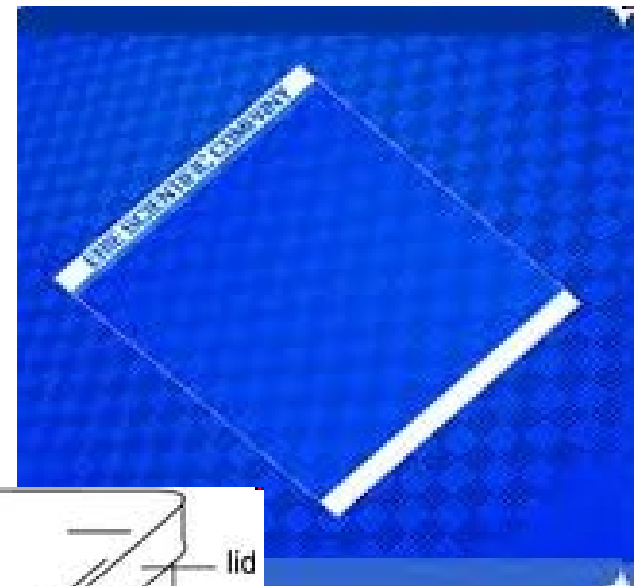
složení pufrou

odmyváání

teplota

čas

složení pufrou



Hybridizace a odmyváání



Skenování

alfaimager, chemiluminiscenční skenery

fluorescenční

rychlost

rozlišení

počet kanálů

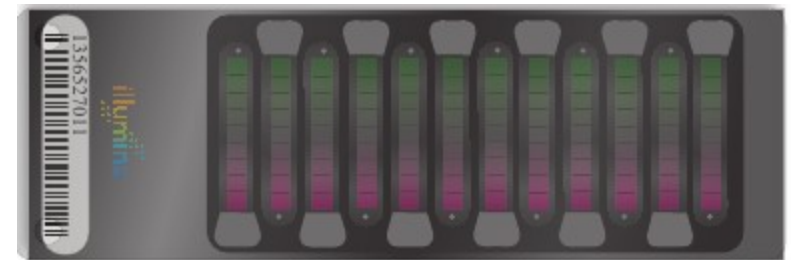
typ detektoru

autofokus, extended depth (16bit -> 20bit)



illumina BeadArray

- Sondy vázané na mikrokuličkách
- Sučástí každé sondy je tzv. barcode
- Směs kuliček s různými sondami je nanesena na sklíčko s jamkami
- Dekódování pomocí hybridizace s barcody
- Každý čip unikát



xMAP

Sondy vázané na kuličkách

Kuličky kódovány pomocí dvou fluoroforů (až 500 kombinací)

Detekce průtokovou cytometrií (kulička – červený laser, analyt – zelený laser)

