



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



Technologické aspekty čipových technologií

Expresní DNA microarray

Boris Tichý
7.10.2011



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

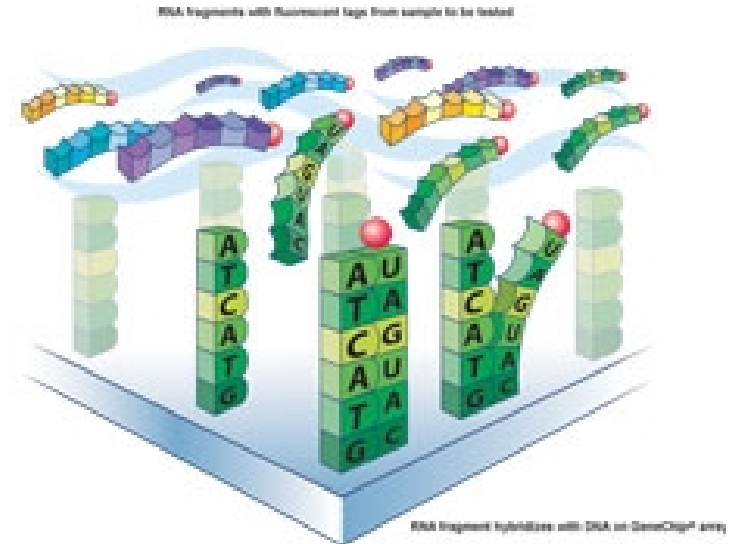
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Čipové technologie



Princip – sondy vázané na nosný podklad

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



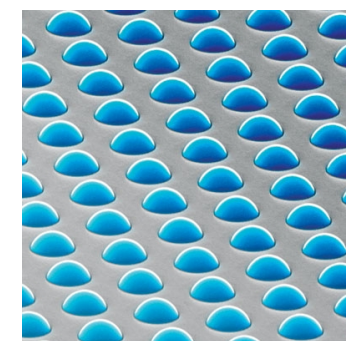
DNA microarrays

Různé dělení podle...

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

Nosný podklad

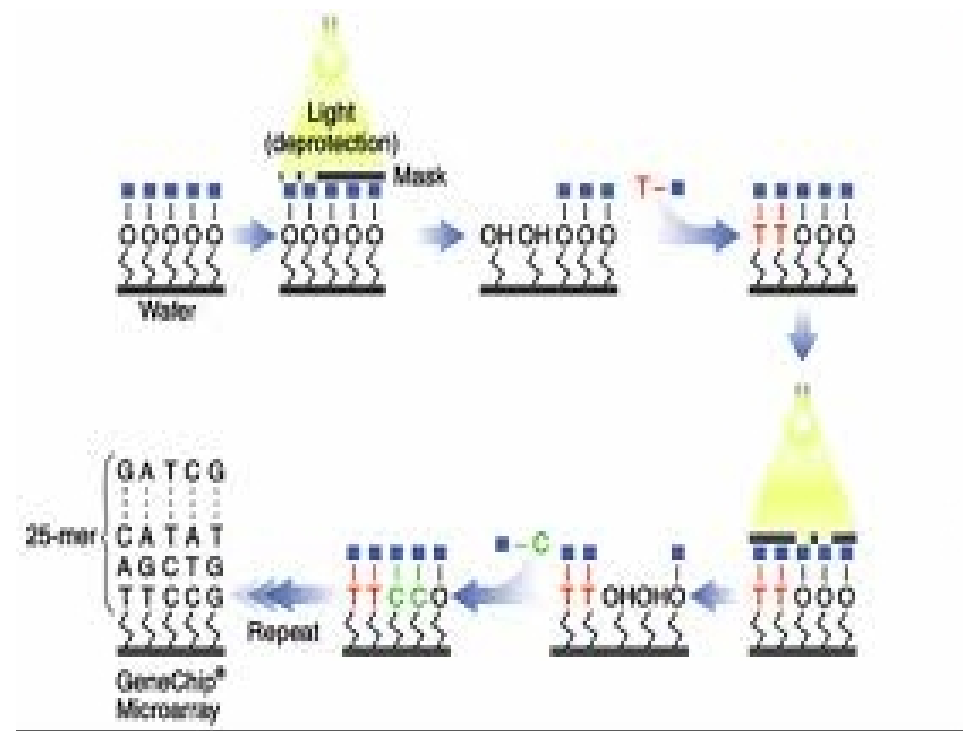
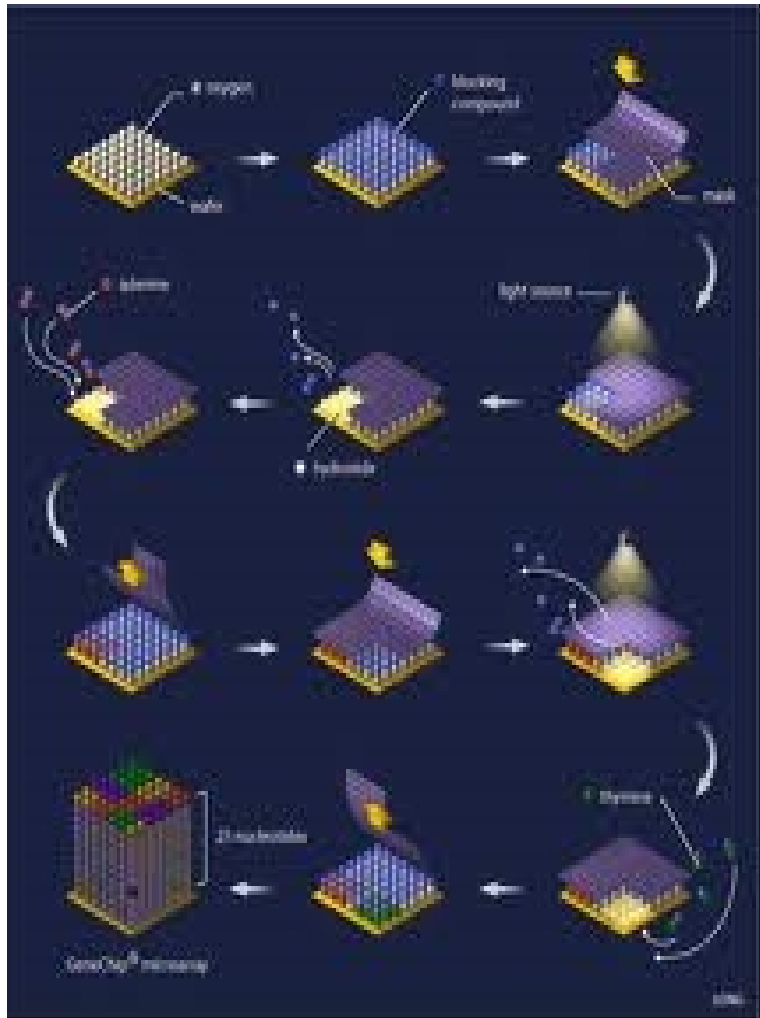
- Sklo
 - mikroskopické sklíčko (25 x 75 mm)
 - speciální formáty
 - různé úpravy povrchu – aminosilan, epoxy atd.
- Nylonová nebo nitrocelulózová membrána
- Plast, gel
- Mikrokuličky
 - BeadArrays® (Illumina)
 - xMAP (Luminex)



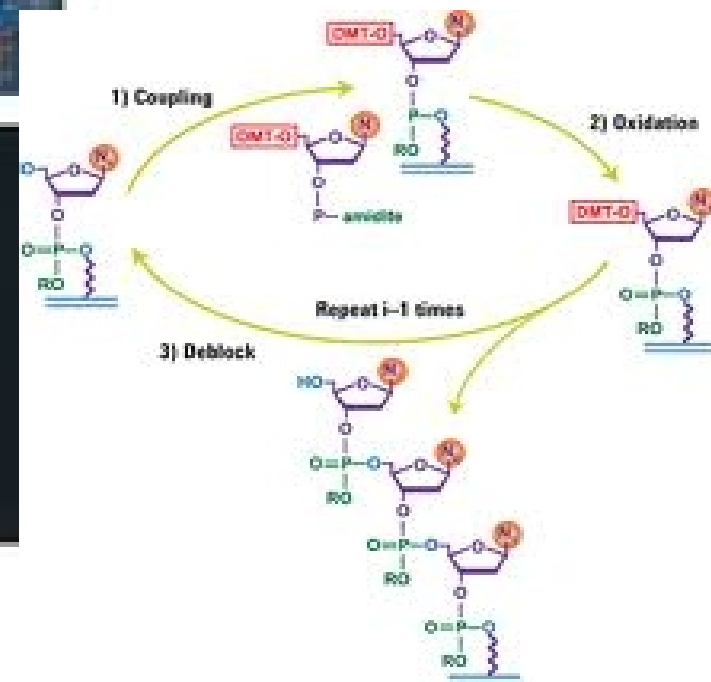
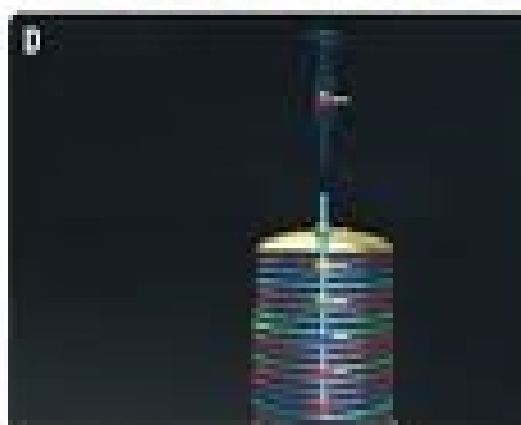
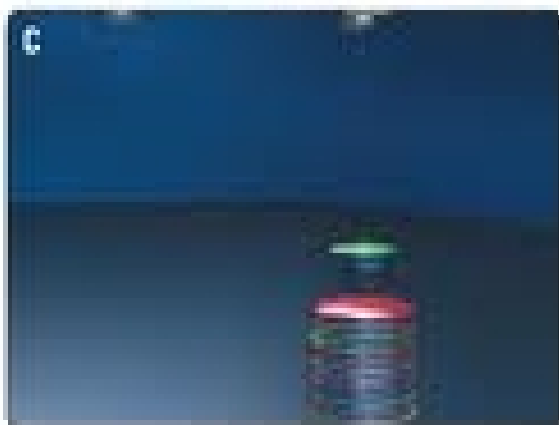
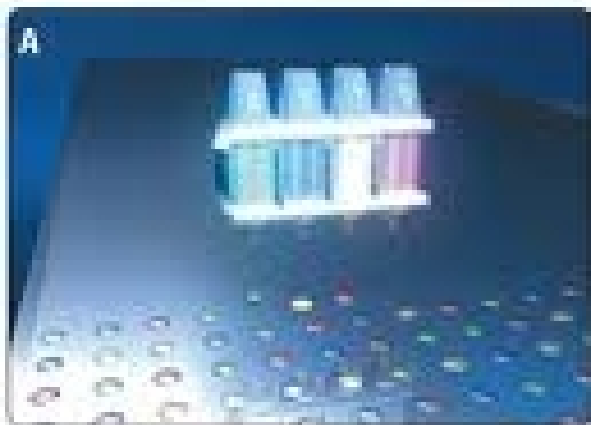
Technologie přípravy

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

Fotolitografie



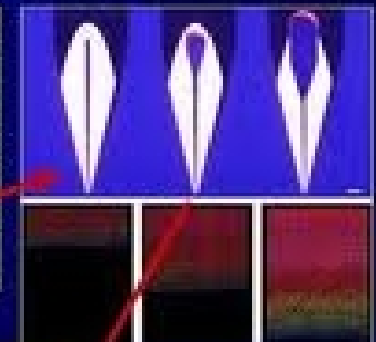
“Ink-jet” syntéza



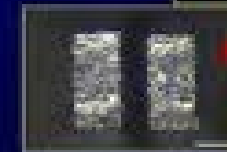
Spotování (tisk)



Micro Spotting Device Sub-nanoliter Volume Dispensing



Patent # 6101946



355X



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

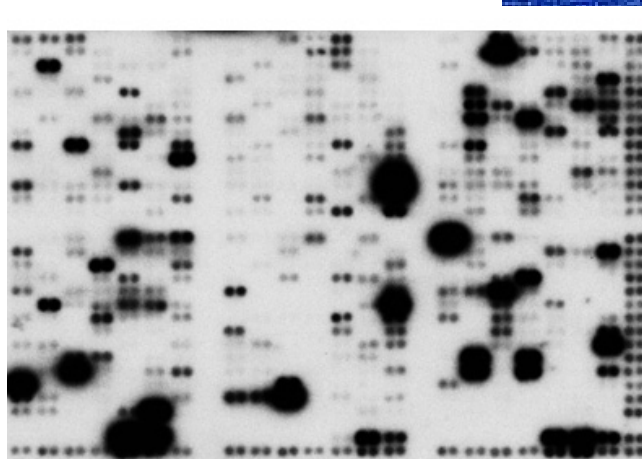
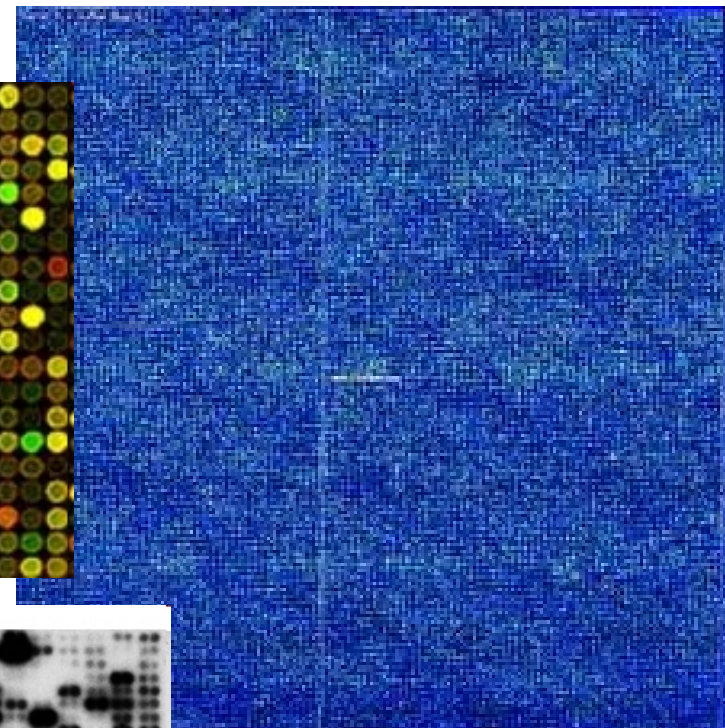
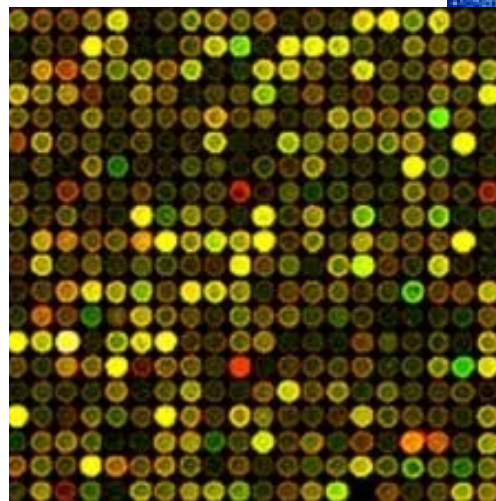
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

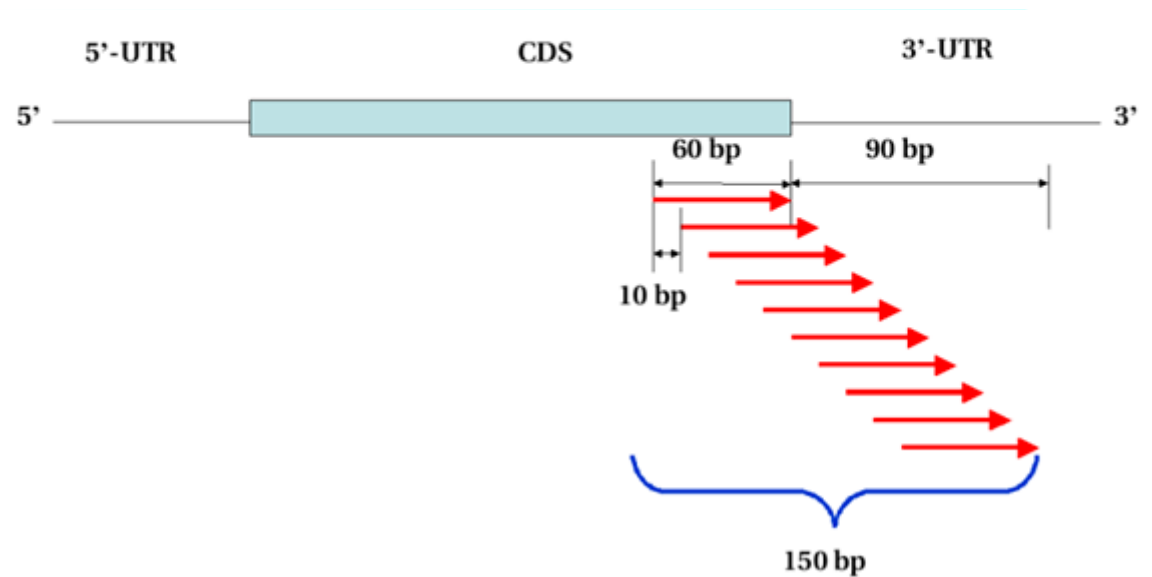
Aplikace

- Genomové aberace

- ArrayCGH
- Tiling arrays

- Epigenetika

- Tiling arrays
- ArrayCGH
- SNP array



Zpracování vzorků - izolace

RNA

fenol-chloroform – Trizol

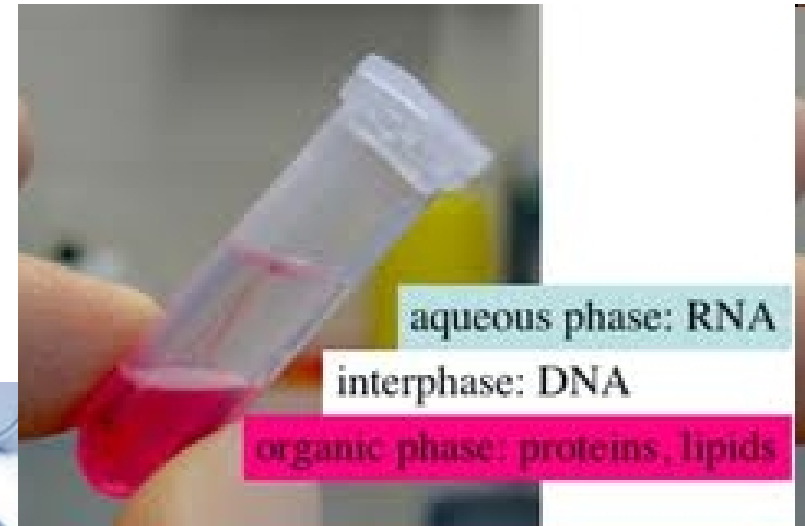
kolonka

poly-A

microRNA

DNA

FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded)



Zpracování vzorků - QC

RNA

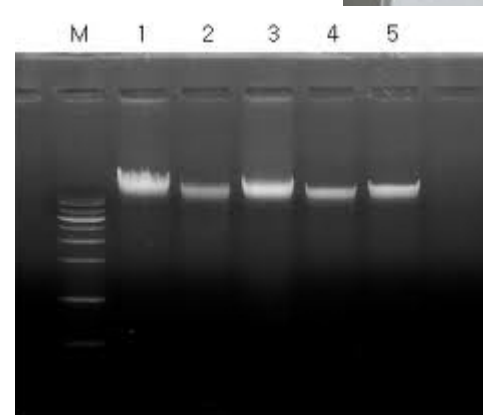
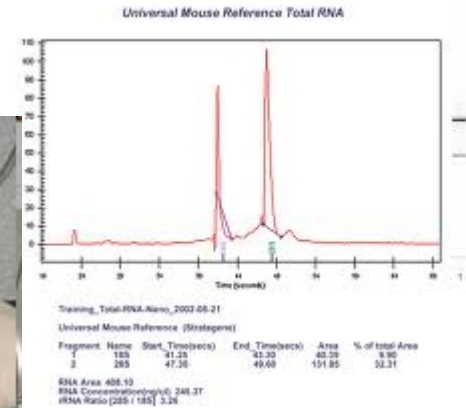
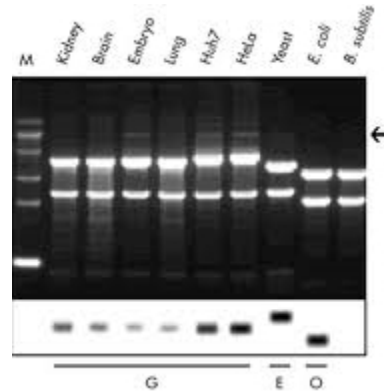
elektroforéza

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)

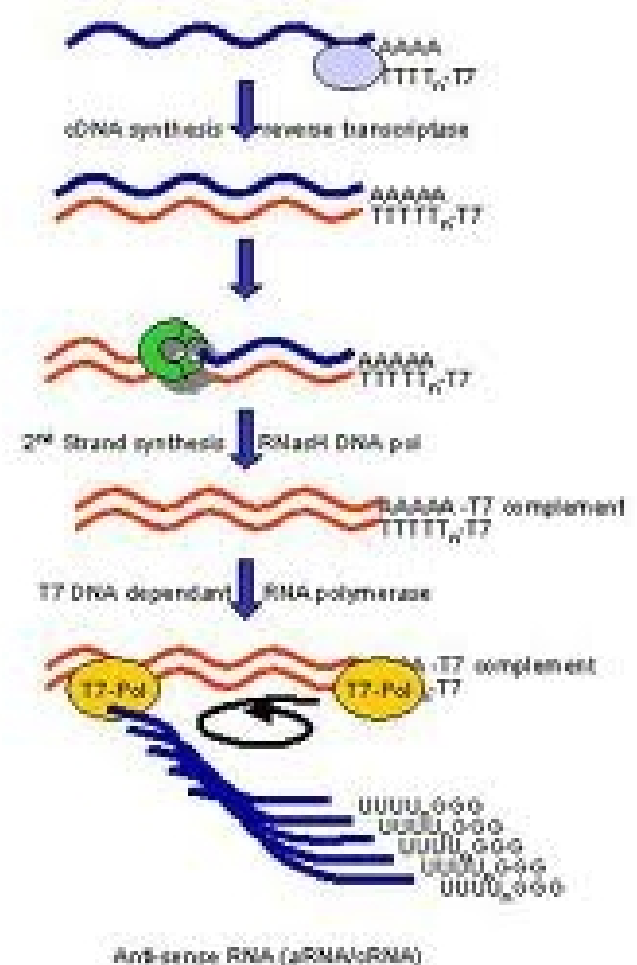
Ribo-SPIA

DNA

whole genome amplification (WGA)

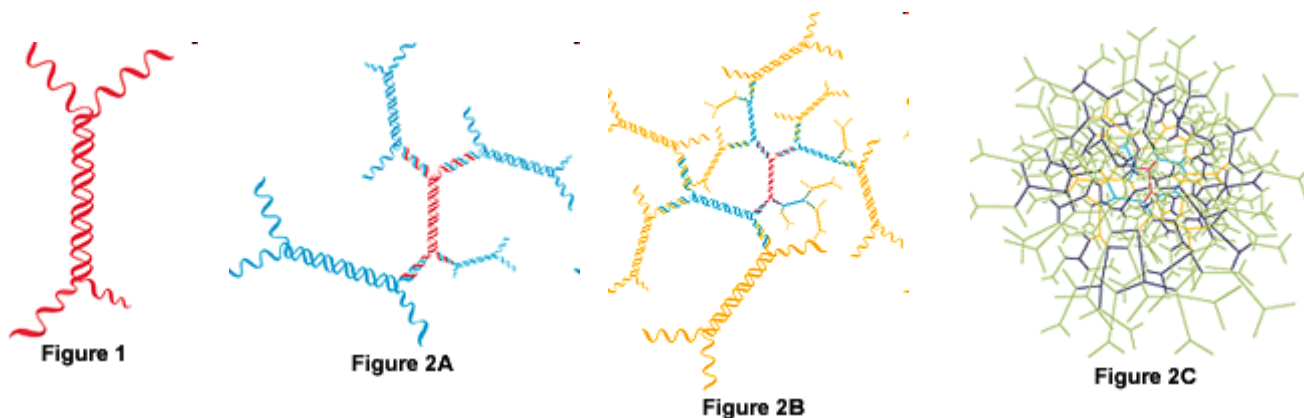
PCR-based

isotermální



Amplifikace signálu

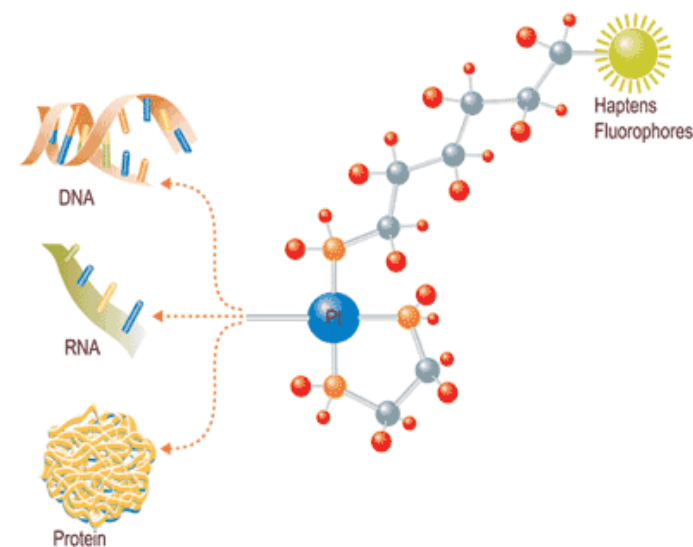
dendrimery



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 (ULS – universal linker system)
- dendrimery
- ligace značených oligonukleotidů, prodlužování řetězce značenými nukleotidy



Hybridizace a odmývání

fragmentace vzorků

enzymatická

ne-enzymatická

hybridizace

teplota

čas

objem

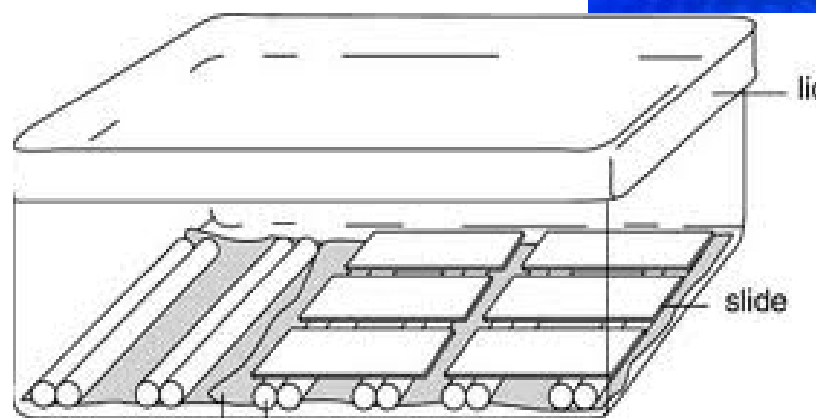
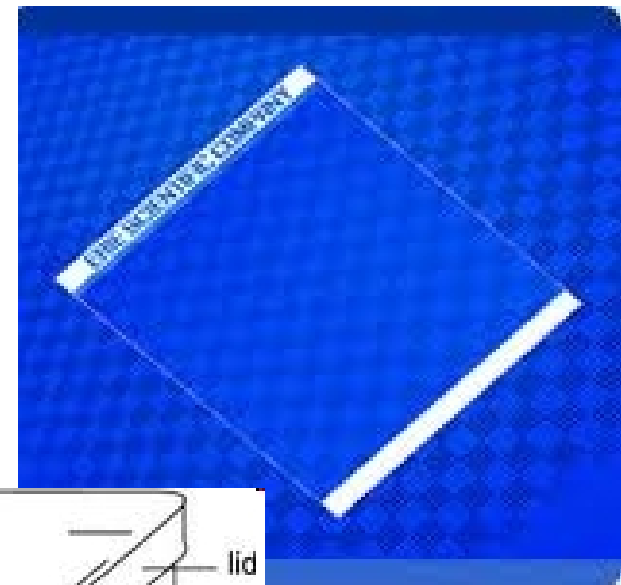
složení pufru

odmývání

teplota

čas

složení pufrů



towels soaked in water or buffer

Hybridizace a odmývání



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 nanášena na sklíčko s jamkami
- Dekódování pomocí hybridizace s barcody
- Každý čip unikát

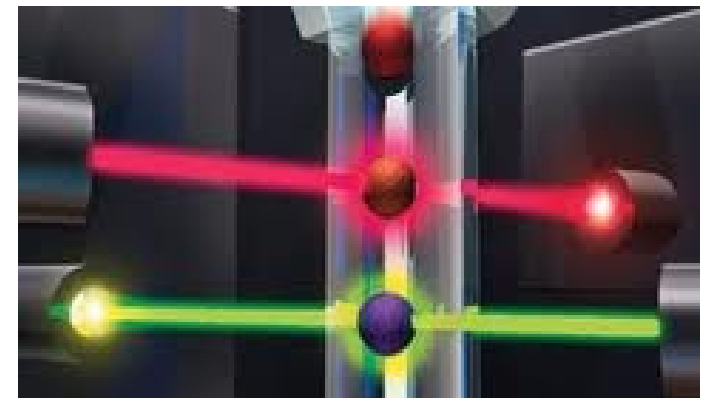
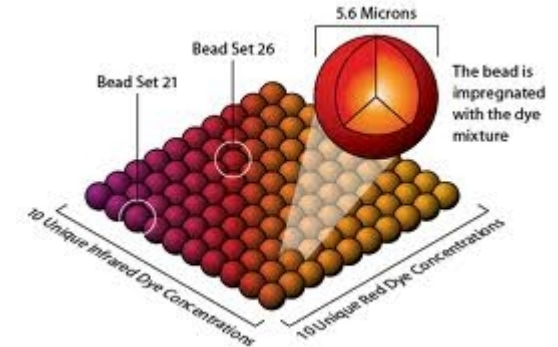


xMAP

Sondy vázané na kuličkách

Kuličky kódovány pomocí dvou fluoroforů (až 500 kombinací)

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





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



Expresní DNA microarray



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Historie

1987 Kulesh et al. - cDNA knihovna na papírovém filtru

Přelom 80./90. - E. Southern – in-situ syntéza oligonukleotidů

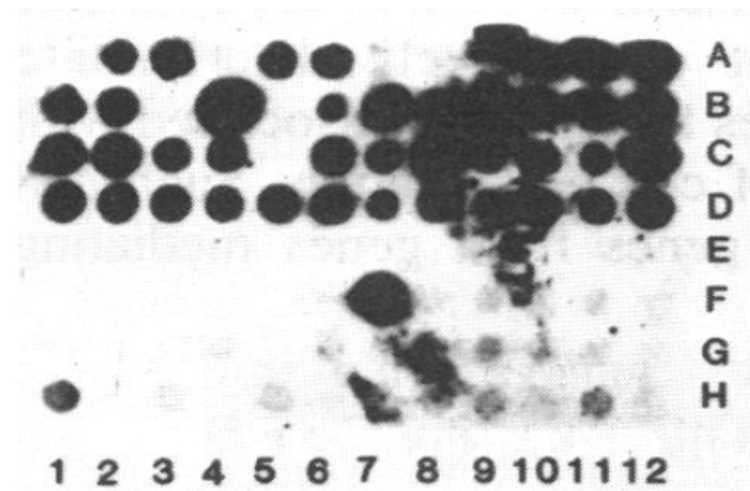
1991 – Fodor et al. - světlem řízená paralelní syntéza

1995 – Schena et al. - cDNA expresní microarray

1996 – lidská cDNA microarray

1997 – celogenomová (kvasinka) cDNA microarray

1997 – celogenomová (kvasinka) oligonukleotidová microarray



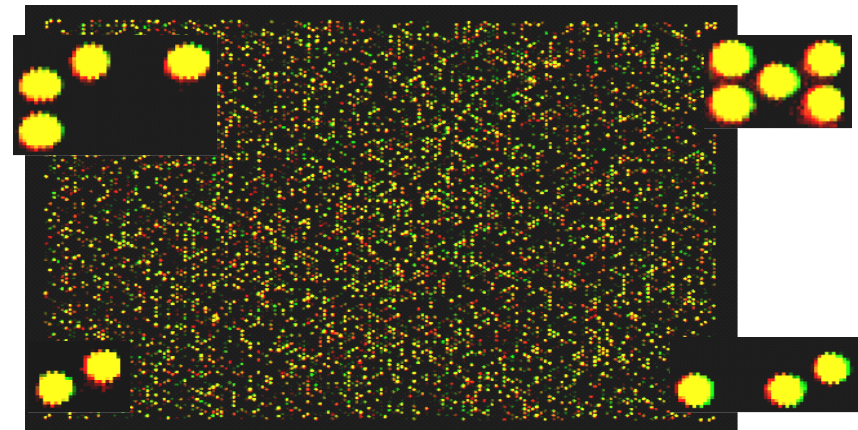
Typy

High- i low- density

Sondy – krátké i dlouhé oligonukleotidy, cDNA

Skříčka, cartridge, mikrokuličky, membrány

Jedno- a dvou- kanálové



Aplikace

mRNA

- Celogenomové
- Exonové (whole transcript)
- Cílené – konkrétní dráhy, diagnózy

microRNA

lincRNA (long intergenic noncoding RNA)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

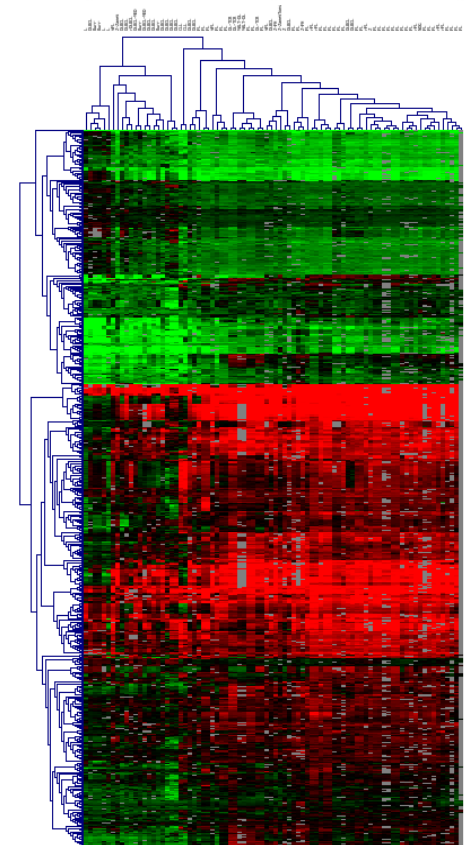
Aplikace

Studium efektů stimulů na genovou expresi

- Chemikálie (např. léčiva)
- Fyzikální faktory (záření)
- Gene knock-out (siRNA)
- Gene transfection (např. transkripční faktory, mutantní alely)

Studium rozdílů mezi vzorky

- Tkáně a orgány
- Diagnózy



RNA

Přepis

- Oligo-dT priming
 - Kvalitní RNA
 - 3' biased sondy
- Random priming – hexa, okta, nona mery
 - I degradovaná RNA
 - Celý transkript

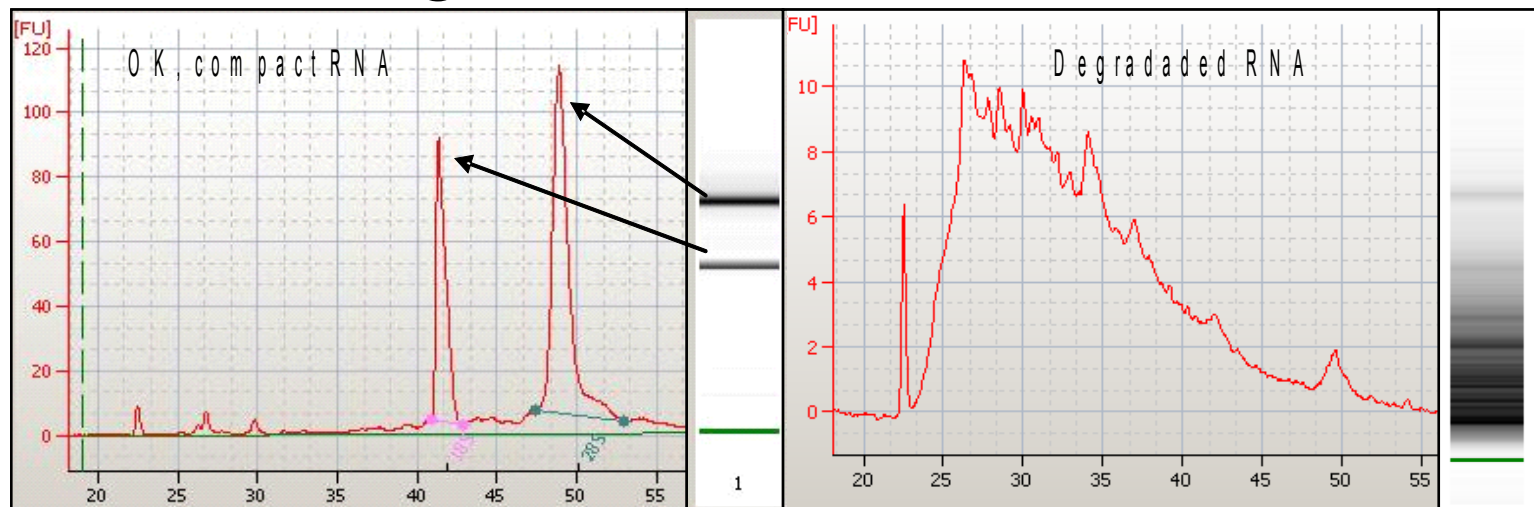
RNA

QC

elektroforéza – 18S a 28S rRNA (1 : 2-3)

BioAnalyzer

RT-PCR – 3' a 5' fragment



Affymetrix GeneChip

Krátké oligonukleotidy – 25mery

=> vysoká míra nespecifické hybridizace

=> probe-set – několik sond pro každý gen (~11)

=> perfect match a mismatch sondy (rozdíl ve 13. nukleotidu) – odhad nespecifické hybridizace

=> speciální metody pro zpracování dat



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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