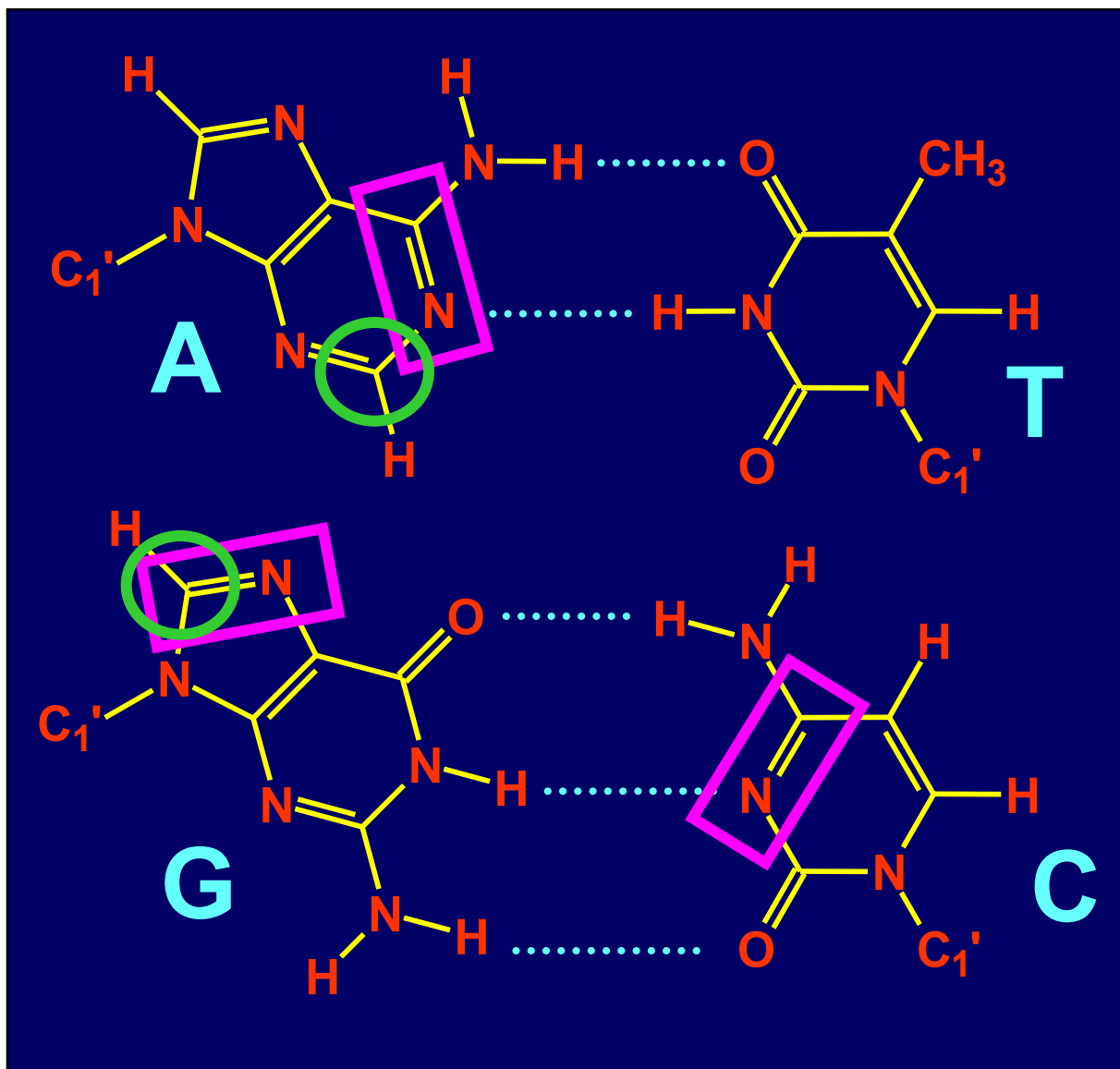


Biosensory s nukleovými kyselinami

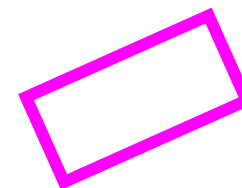
- detekce výskytu známé cílové sekvence ve vzorku



Oxidace a redukce DNA



Oxidační místo

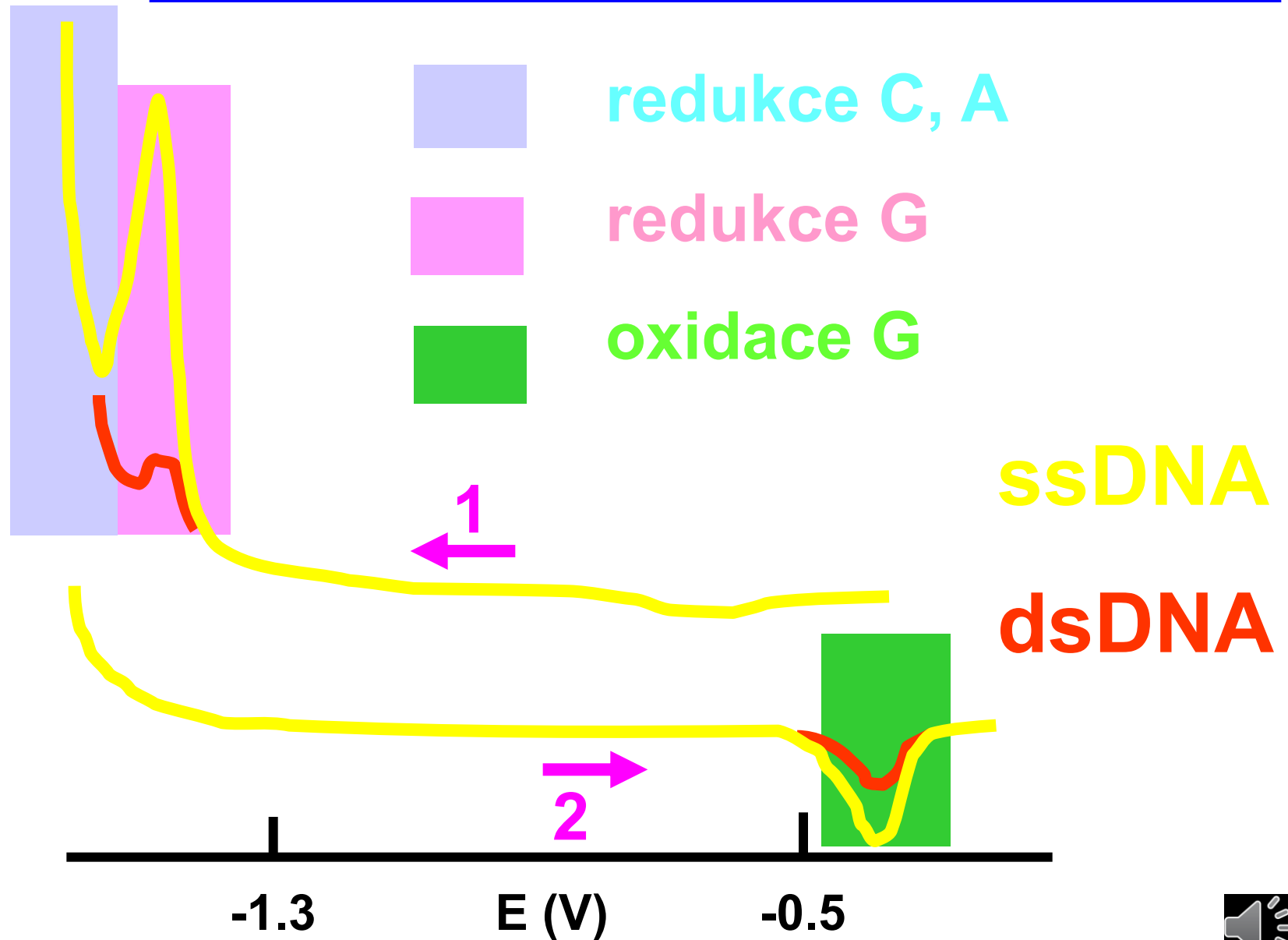


Redukční místo

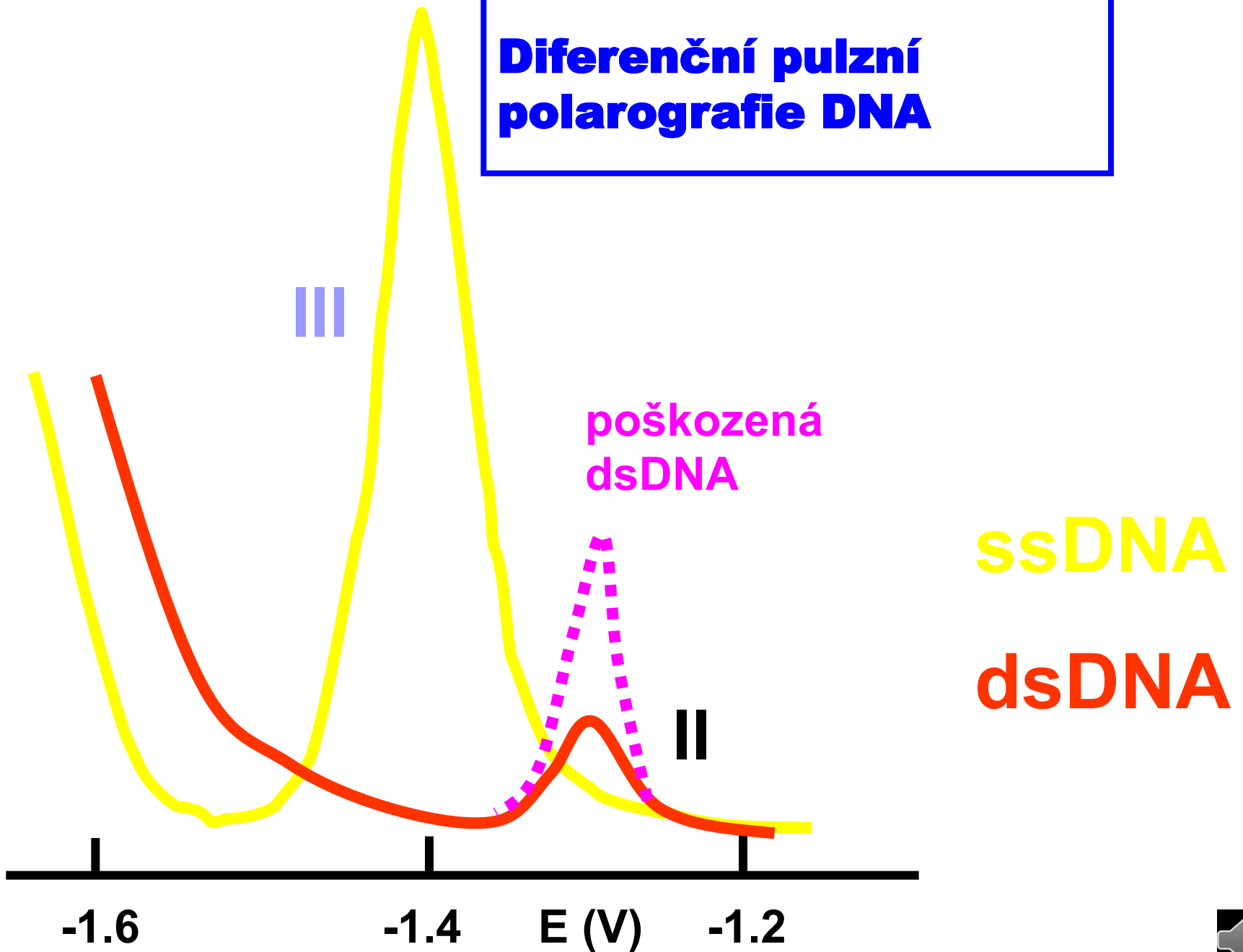
párování bází



Cyklická voltametrie DNA



Diferenční pulzní polarografie DNA



AC polarografie DNA

ssDNA

pozadí

3

1

dsDNA

2

1

0 (pzc)

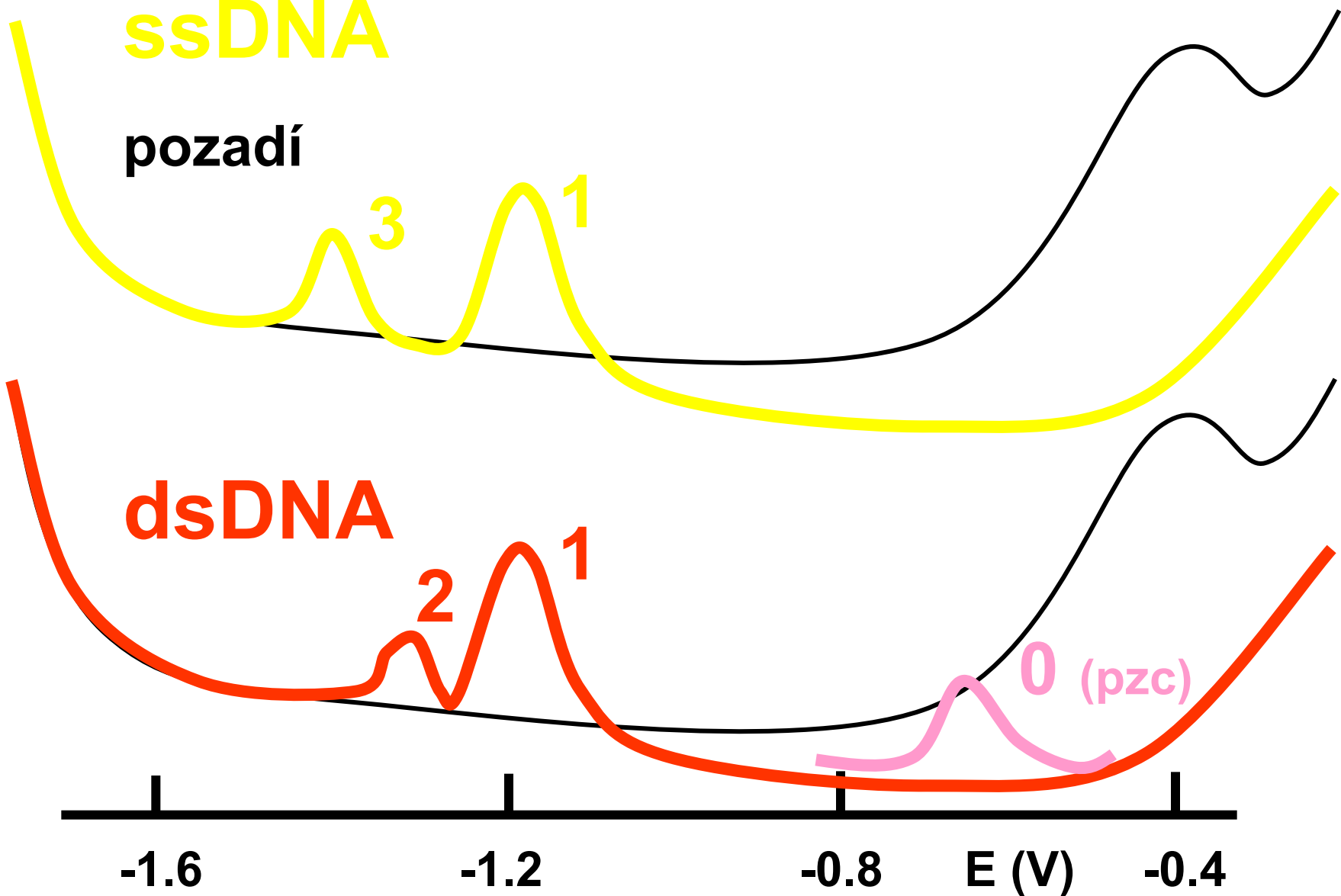
-1.6

-1.2

-0.8

E (V)

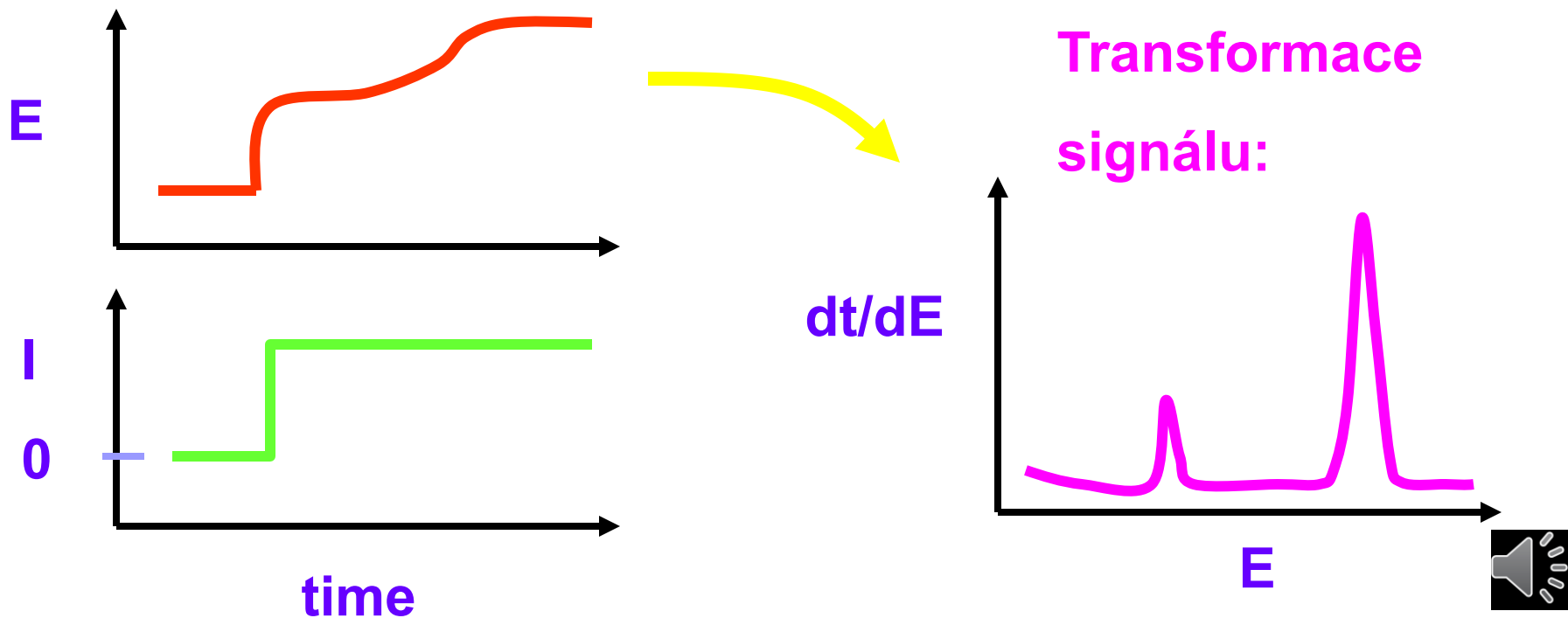
-0.4



Chronopotenciometrie

Princip: kontrolovaný **konstantní proud je aplikován** mezi pracovní a pomocnou elektrodu a měří se časová závislost **napětí** mezi pracovní a referenční elektrodou. Odezva je vyvolána koncentračními změnami elektroaktivních látek v průběhu elektrolýzy.

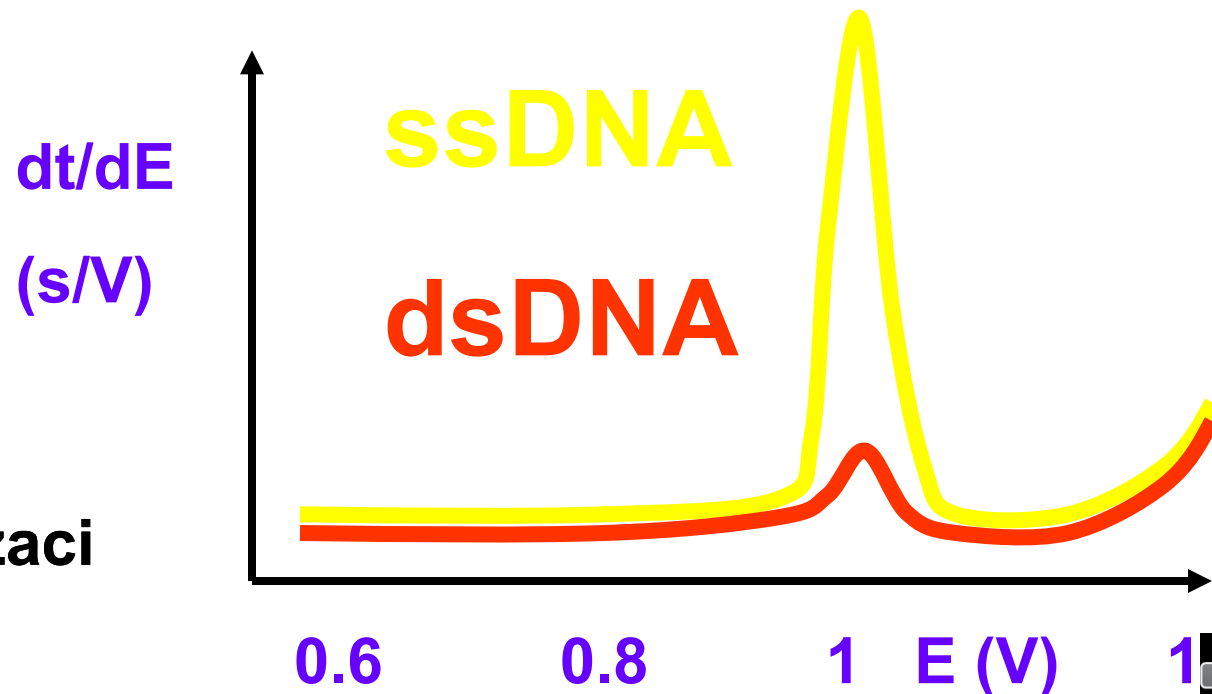
Instrumentace: potentiostat v galvanostatickém modu



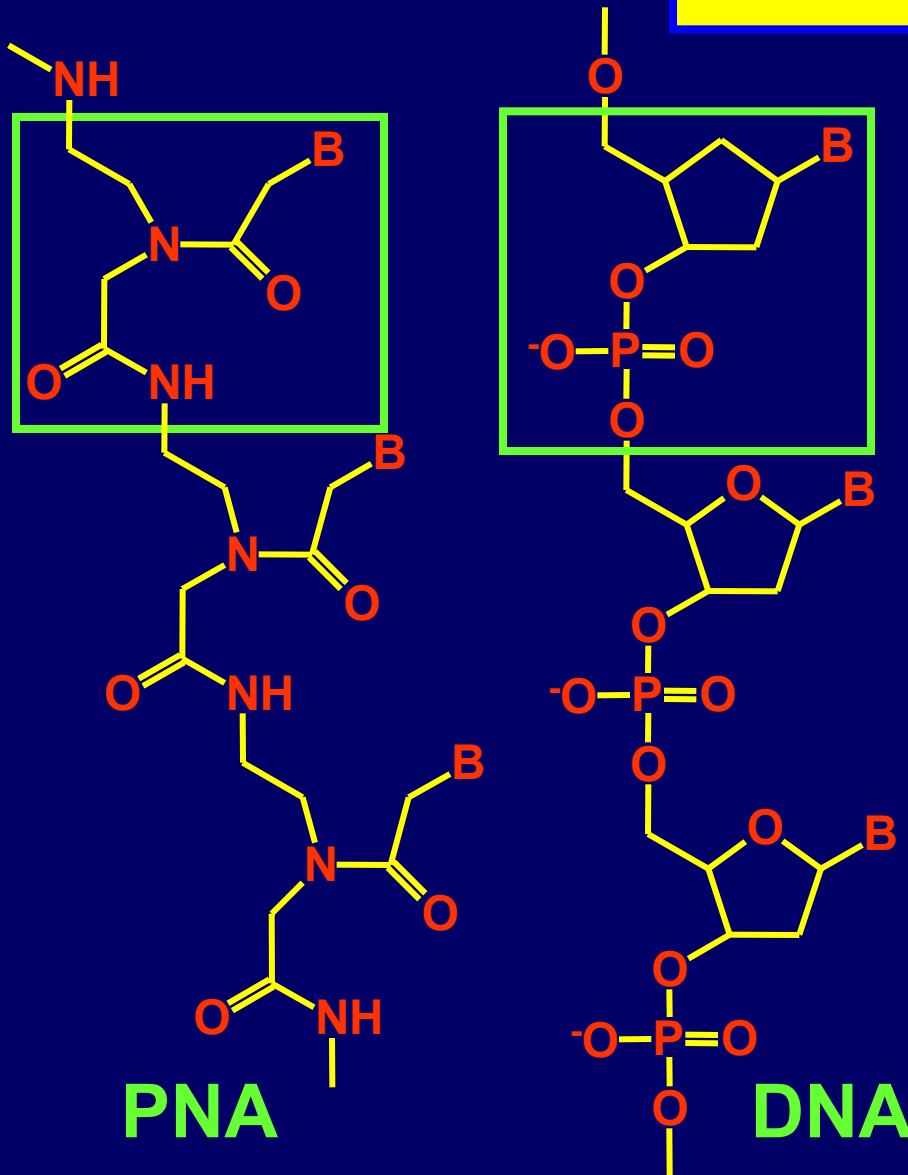
Potenciometrická „stripovací“ analýza

- Procedura:**
1. Imobilizace próby adsorpcí
 2. Promytí, přenos do čistého pufru
 3. Inkubace se vzorkem - hybridizace („stripování“)
 4. Chronopotenciometrické měření

Electrochemická oxidace guaninu klesá po hybridizaci



Struktura „peptidových“ nukleových kyselin (PNA)



Výhody PNA:

- nenabitá kostra
- duplex PNA-DNA je stabilnější
- zlepšená citlivost
- zlepšená specifita
- rychlejší hybridizace
- širší hybridizační rozmezí



Indikátory hybridizace

Vazba do malého žlábků

$\text{Co}[(2,2'\text{-bipyridyl})_3]^{3+}$, netropsin

Elektrostatické interakce

s fosfátovou / cukernou kostrou

Interkalátory

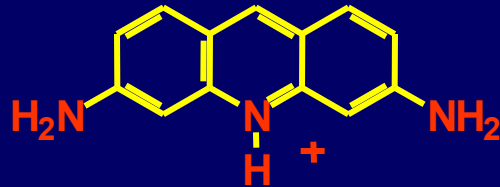
ethidium, propidium, proflavin,
chloroquin, doxorubicin

Kombinovaná interakce

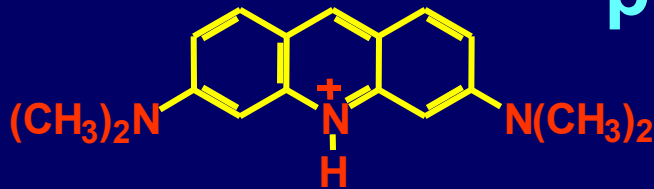
$\text{Co}[(\text{phen})_3]^{3+}$, DAPI (4',6-diamidinofenyl
indol)



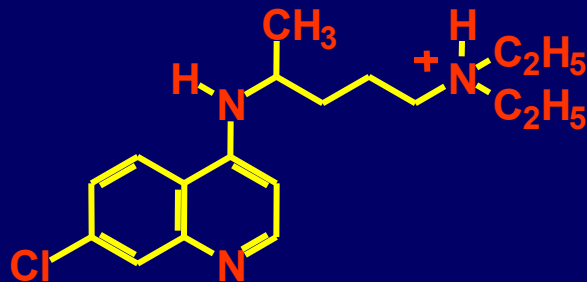
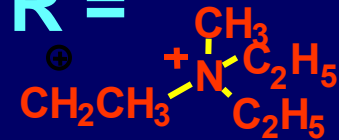
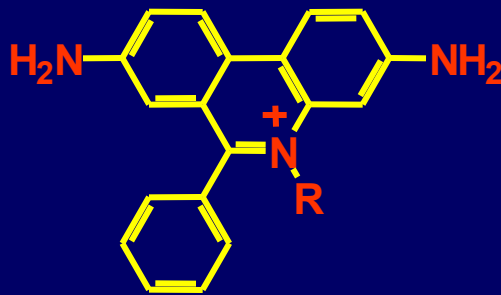
Indikátory hybridizace



akridinová oranž
proflavin



ethidium R = ethyl
propidium R =



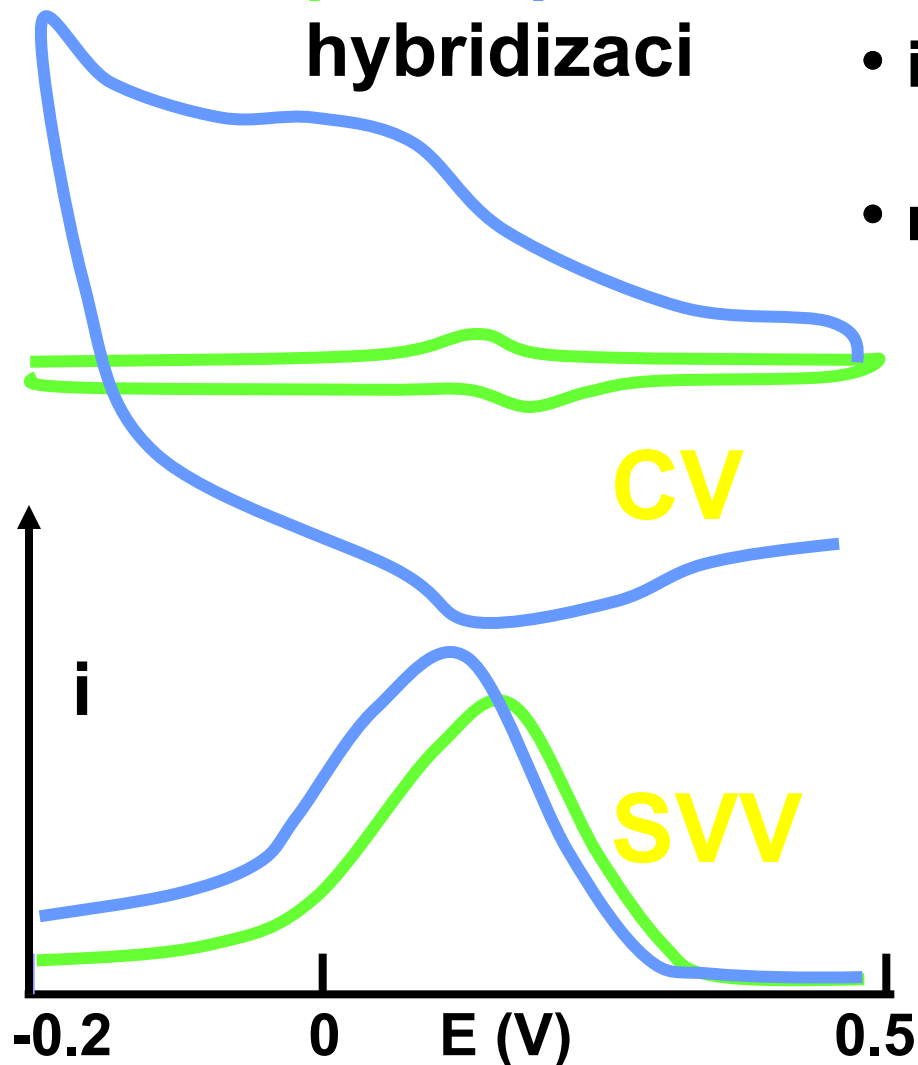
chloroquin



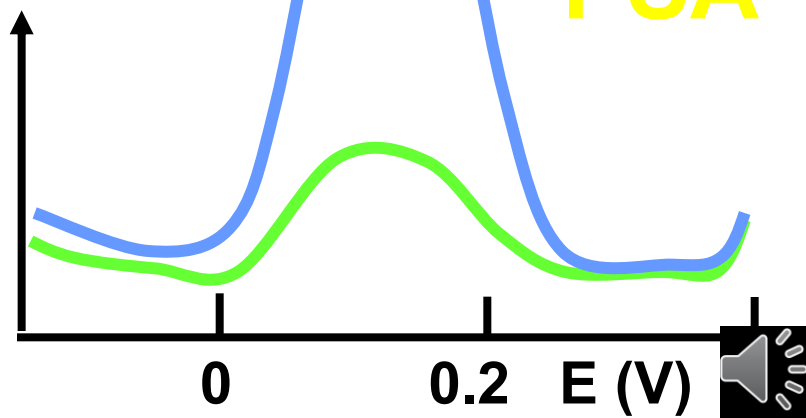
Biosensory pro DNA

- imobilizace próby - 1 min +0.5 V
- hybridizace - 5 min +0.5 V
- interkalace - 1 min, +0.5 V, 50 μM $\text{Co}[(\text{phen})_3]^{3+}$
- měření

před po
hybridizaci



$(dE/dt)^{-1}$
(s/V)



PSA



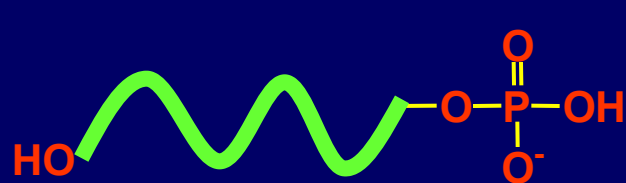
Imobilizace nukleových kyselin a oligonukleotidů

- adsorbe na celulosu
- ultrafialové světlo (kovalentní vazba na celulosu)
- zachycení uvnitř celulosy, agaru, polyakrylamidu
- aktivace :
 - CNBr
 - karbodiimidu
 - diazotací
 - kyanurchlorid
 - epoxy
 - oxidace jodistanem (pro RNA)
- reversibilní komplexace imobilizovanou kys. boritou



Aktivace DNA

Fosforamidová metoda



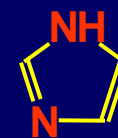
oligonukleotid s 5' fosfoskupinou

+

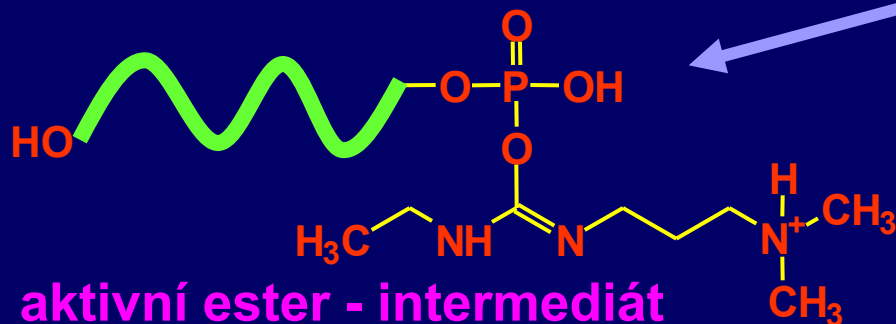


EDC

+



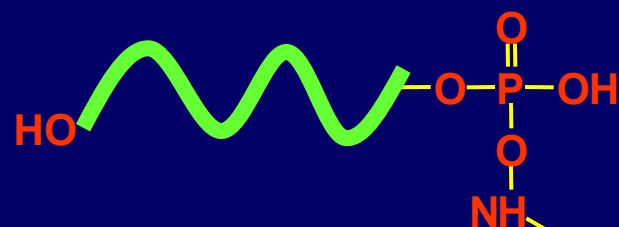
imidazol



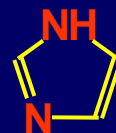
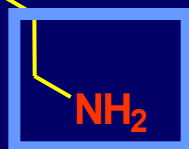
aktivní ester - intermediát



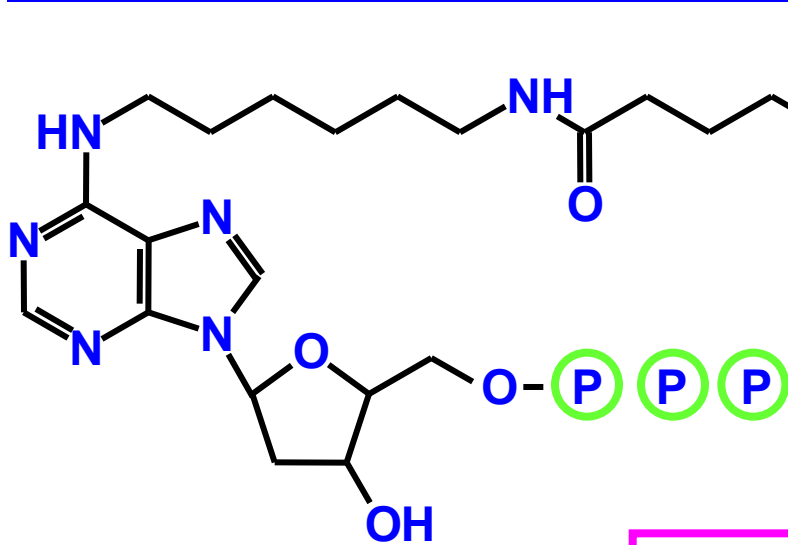
isomočovina



5'-aminoskupina



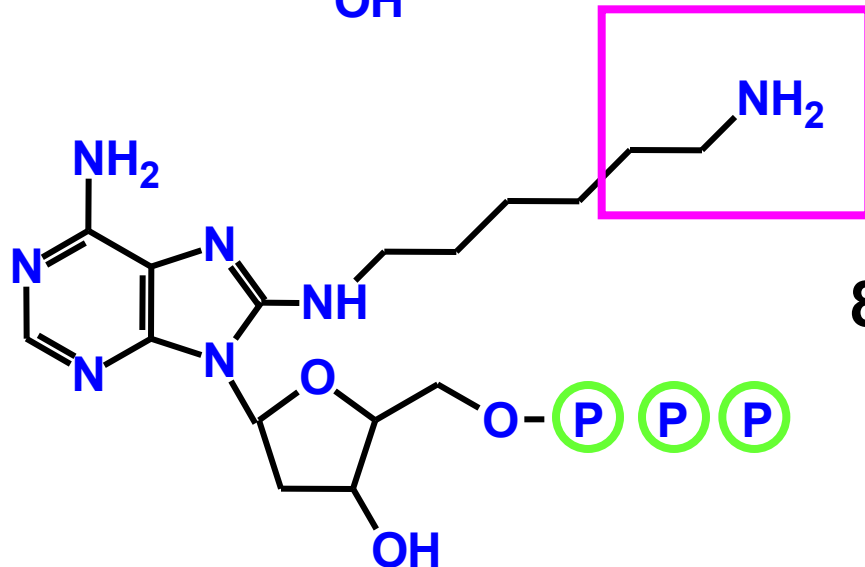
Značení / imobilizace DNA



biotin-14-dATP

(podobně biotin-11-dUTP,
spojení v C-5 pozici)

DNA polymerasa a
terminální transferasa



8-aminohexyl-dATP

terminální transferasa



Genová analýza s biosensory

Cílová DNA

- přidání vhodných primerů
 - amplifikace pomocí PCR
-
- fluorescenční značení
 - inkubace s próbami
 - hybridizace
-
- naskenování fluorescence
-
- konverse údajů o fluorescenci na informaci o sekvenci

Kit s
reaktanty

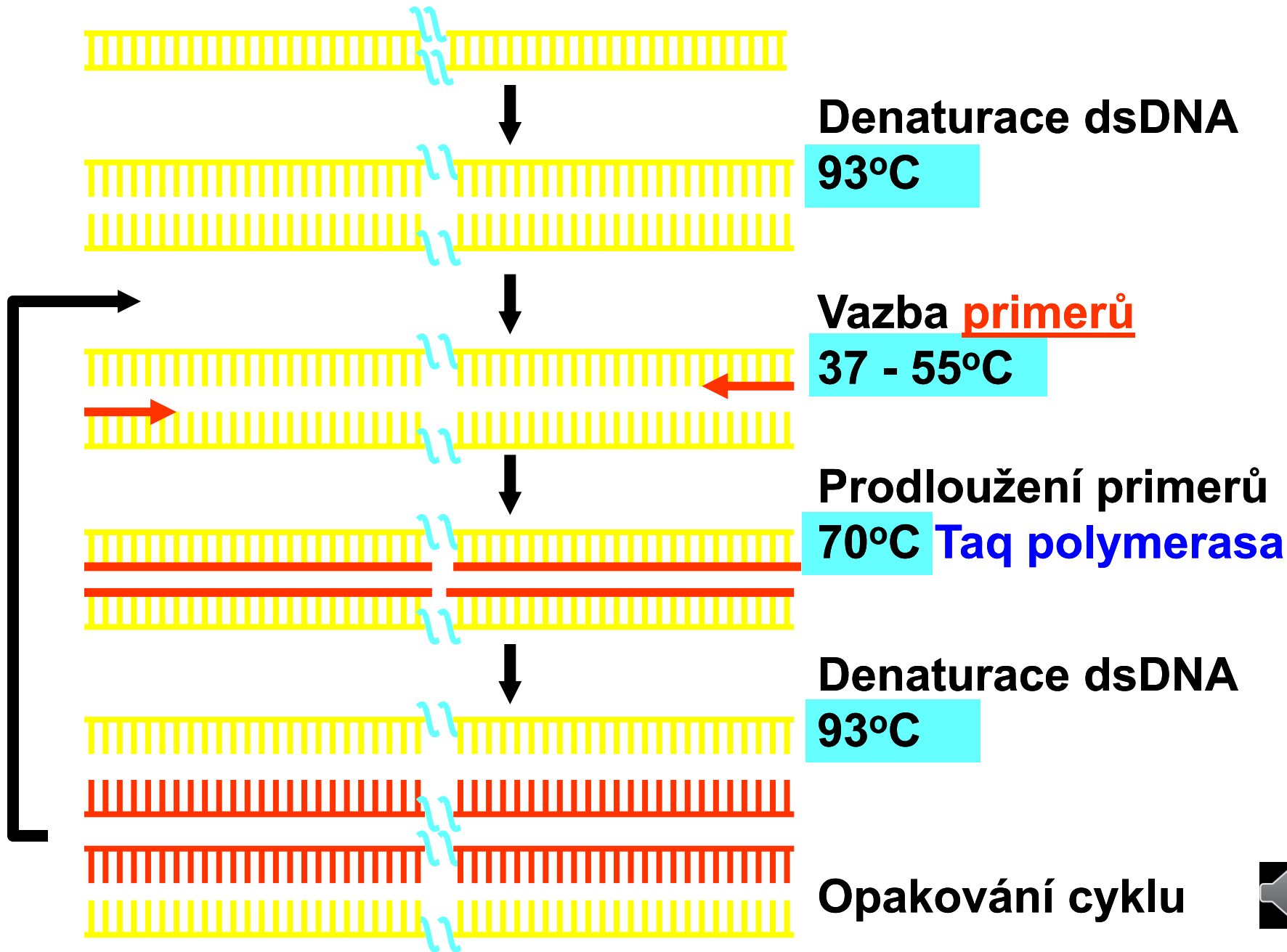
Průtočná
stanice

Skener

Software

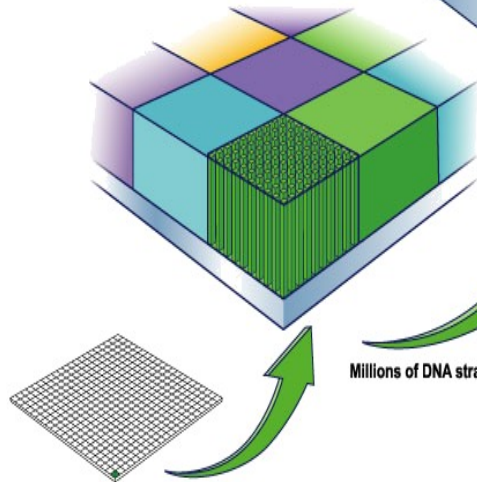
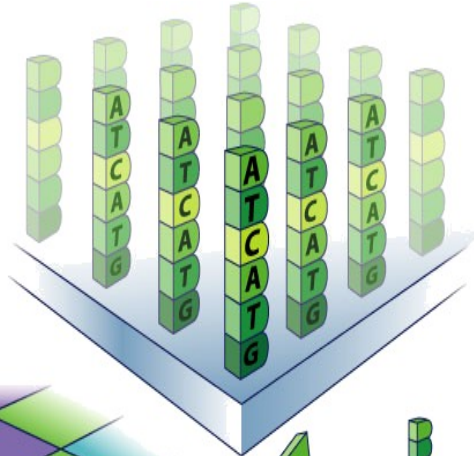


PCR - polymerasová řetězová reakce



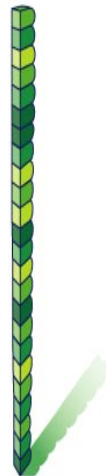
Úvod do DNA čipů

- DNA Arrays are composed of probes where each probe is a sequence of 25 nucleotides



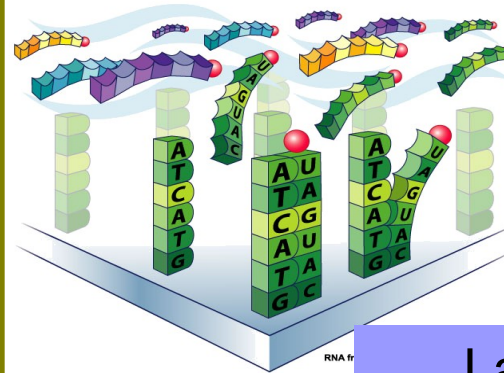
500,000 cells on each GeneChip™ array

Millions of DNA strands built up in each cell

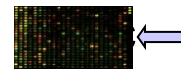
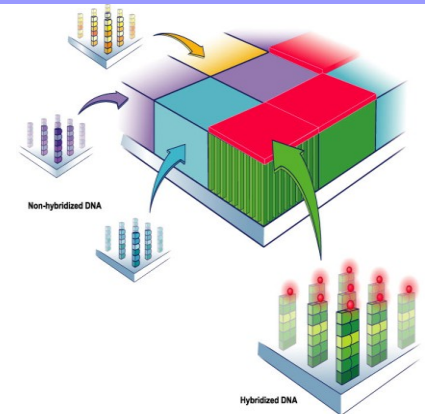


Actual strand = 25 base pairs

Tagged fragments flushed over array



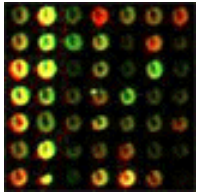
Laser activation



al
scan
ning

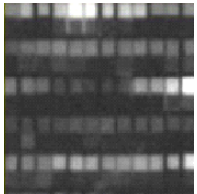


Dva přístupy



I. cDNA (500~5000 bází) je imobilizována na pevný povrch (sklo) a exponována souboru cílových sekvencí buď separátně nebo ve směsi

Vyvinuto **Stanford University**, „**DNA microarray**“



II: používá se soubor **oligonukleotidů** (20~80-merů) nebo peptidových NA (PNA) prób

precizní technologie, srovnatelnost výsledků

krátké próby – menší specifita a citlivost; vysoká cena

Vyvinula firma **Affymetrix**, „**GeneChip**“



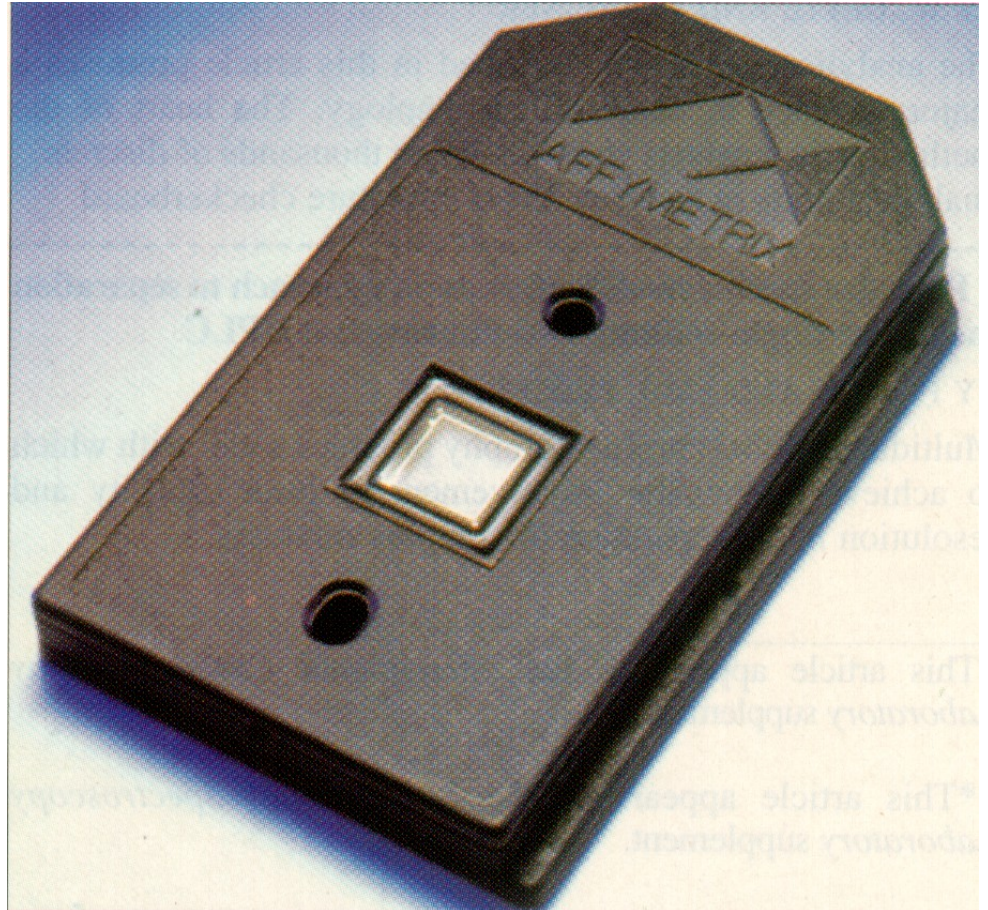
GeneChip

oligonukleotidové próby
soubor o známých
sekvencích navázaný na
skleněný čip

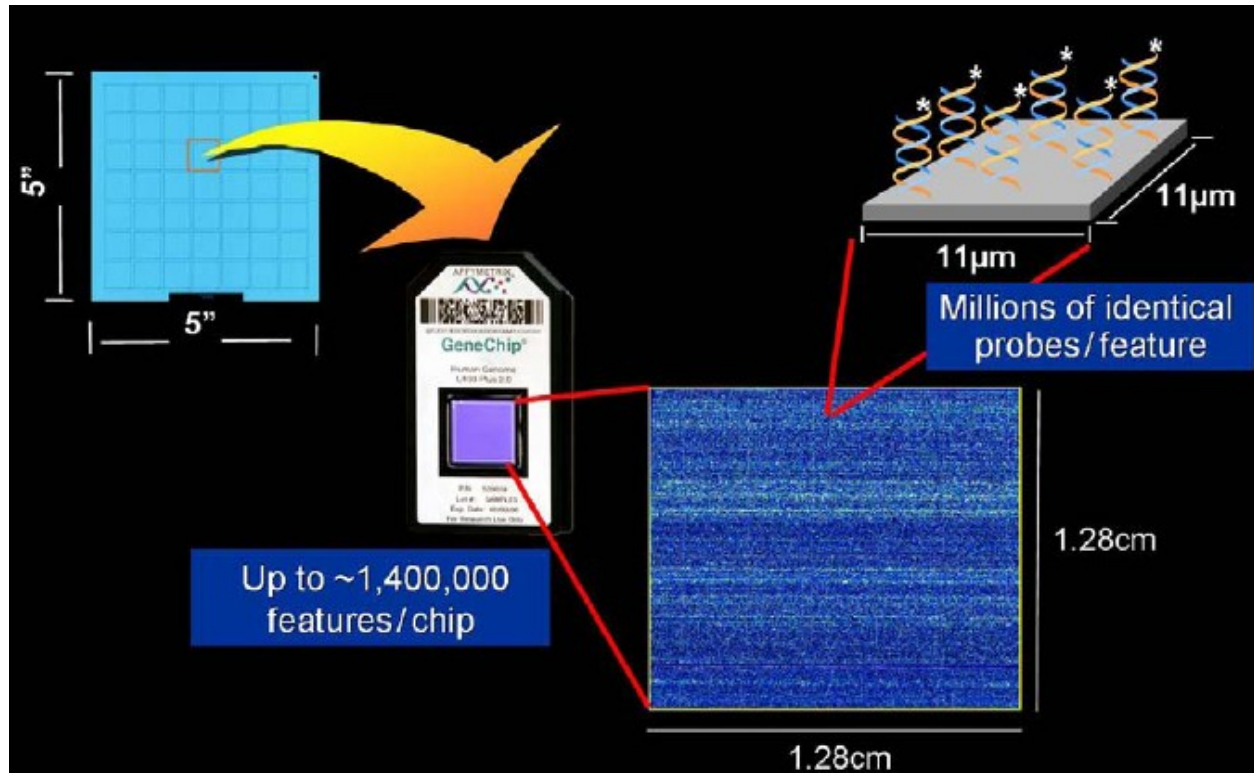
zapouzdření do plastu
(snadná manipulace)

kombinatorická syntéza
souboru přímo na čipu

výrobce: [Affymetrix](#)



Rozměry elementů

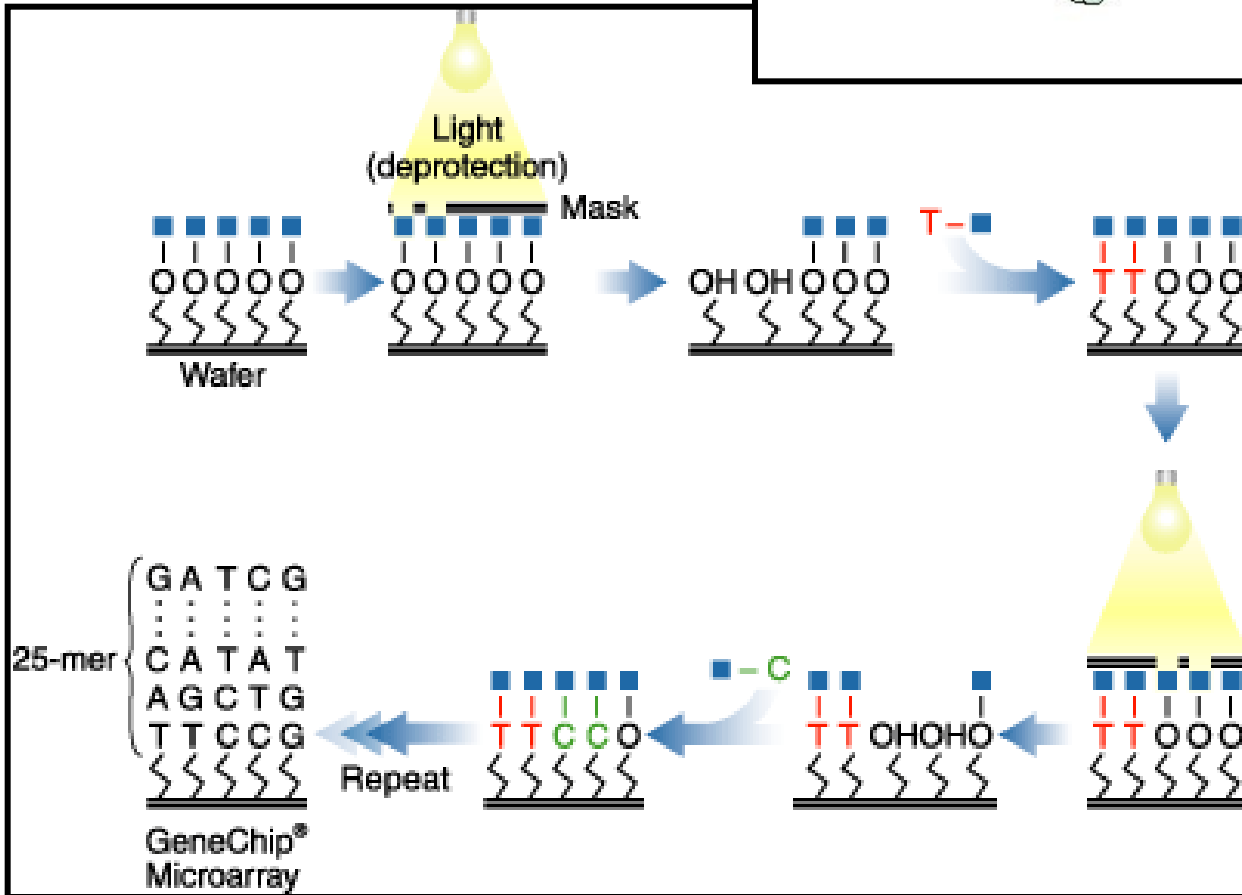
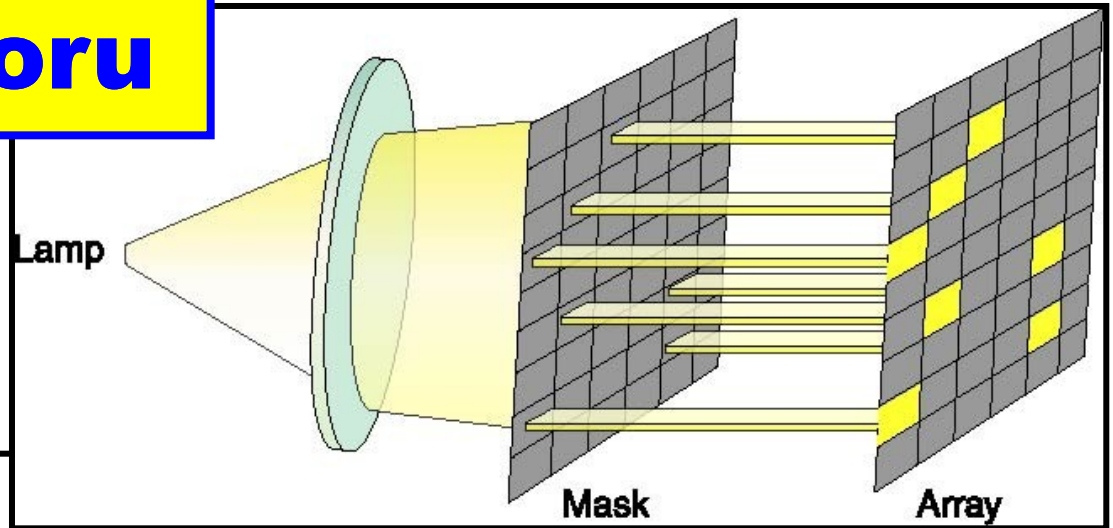


- plátek křemíku (wafer, 5x5 inch, tj. 12.5x12.5 cm)
- z něho 49 až 400 jednotlivých sensorů (chips, 1.28x1.28 cm)
- na každém čipu až 1.4 milionu pozic (features, 11x11 µm)
- v každé pozici několik milionů kopií stejné oligonukleotidové próby s danou známou sekvencí

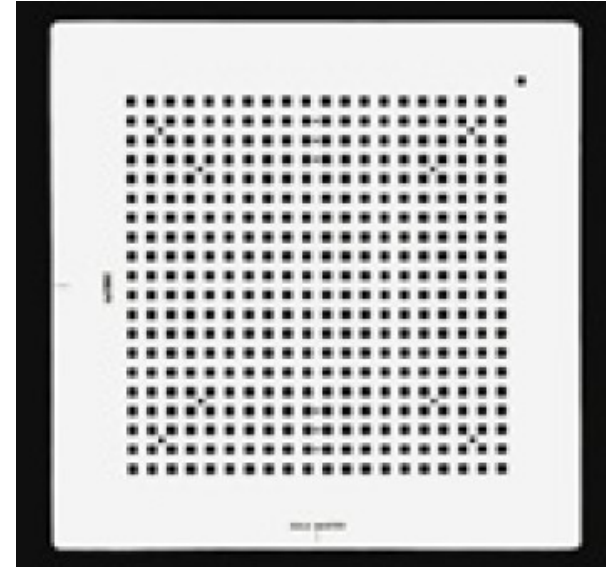


Výroba sensoru

- kombinace chemické reakce a UV ozařování
- fotolitografie, fotosenzitivní imobilizační procedura



Fotolitografická maska



- ukázka masky pro celý wafer (vlevo)
- vpravo pak výsek pro 20x20 elementů



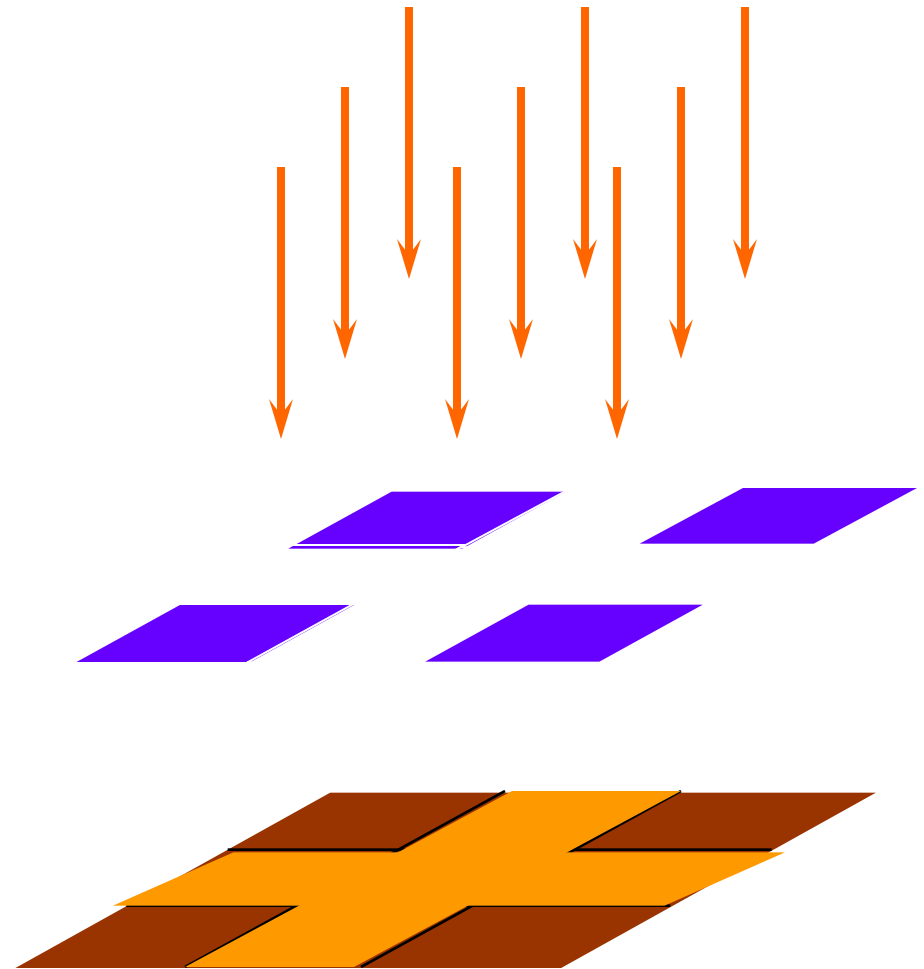
Probe Synthesis

A 3 x 3 array

CG	AC	G
AC	ACG	AG
CG	AG	C

array probes

Nucleotide Deposition Sequence ACG



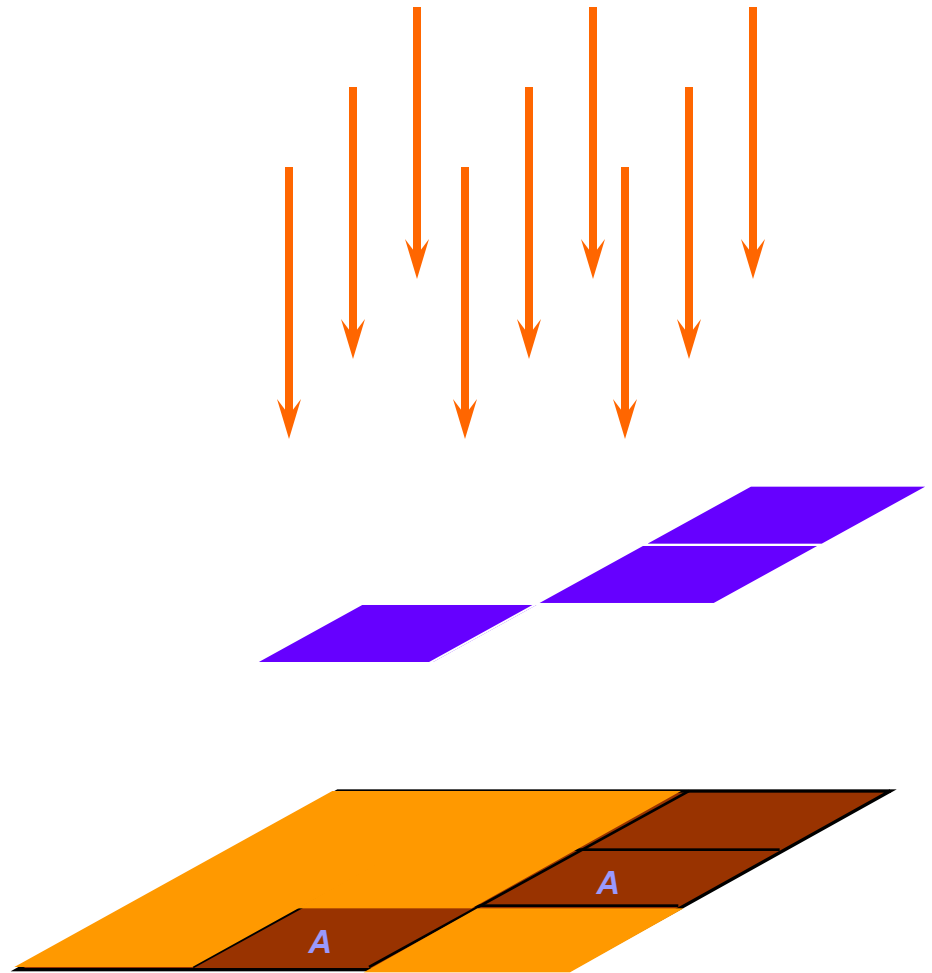
Probe Synthesis

A 3 x 3 array

CG	AC	G
AC	ACG	AG
CG	AG	C

array probes

Nucleotide Deposition Sequence ACG



Probe Synthesis

A 3 x 3 array

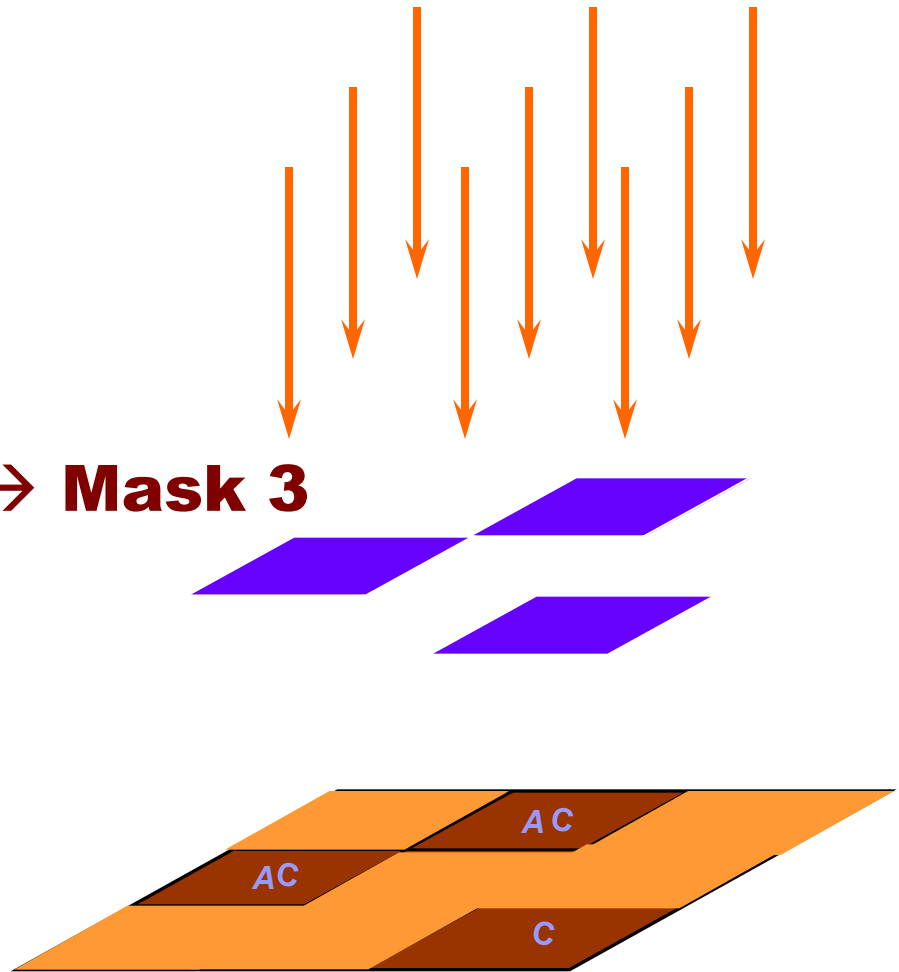
CG	AC	G
AC	ACG	AG
CG	AG	C

array probes

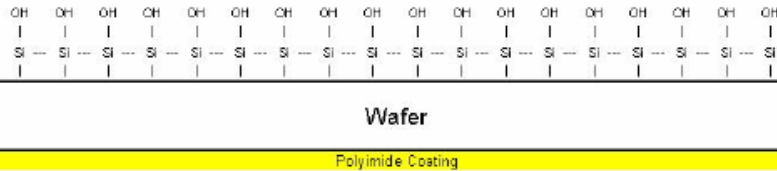
- A *Nucleotide Deposition Sequence* defines the order of nucleotide deposition
- A *Probe Embedding* specifies the steps it uses in the sequence to get placed

Nucleotide Deposition Sequence ACG

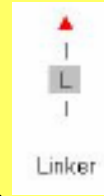
G → **Mask 3**



Výroba DNA čipu



■ silanovaný povrch sensoru, každý atom Si je zárodkem proby



■ navázání spojovací části „linkeru“, ten zakončený fotocitlivou blokovací skupinou

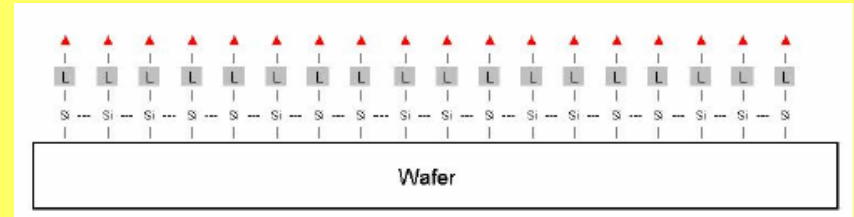
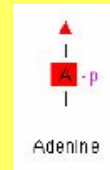
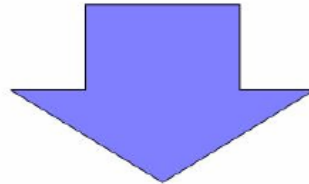
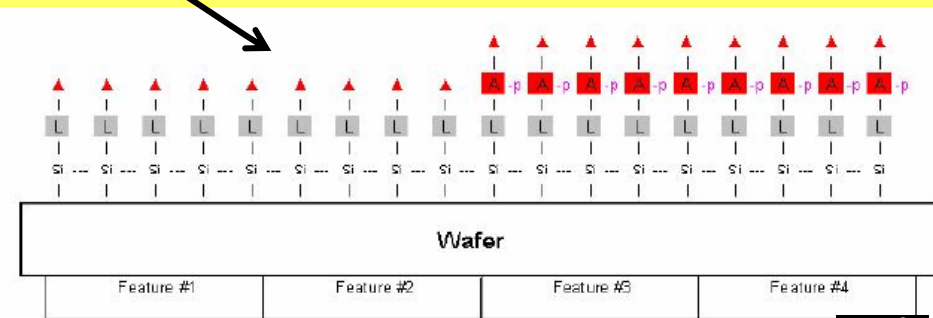
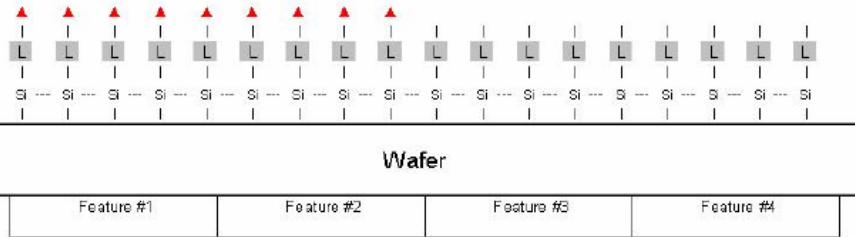


Photo Mask

UV Light



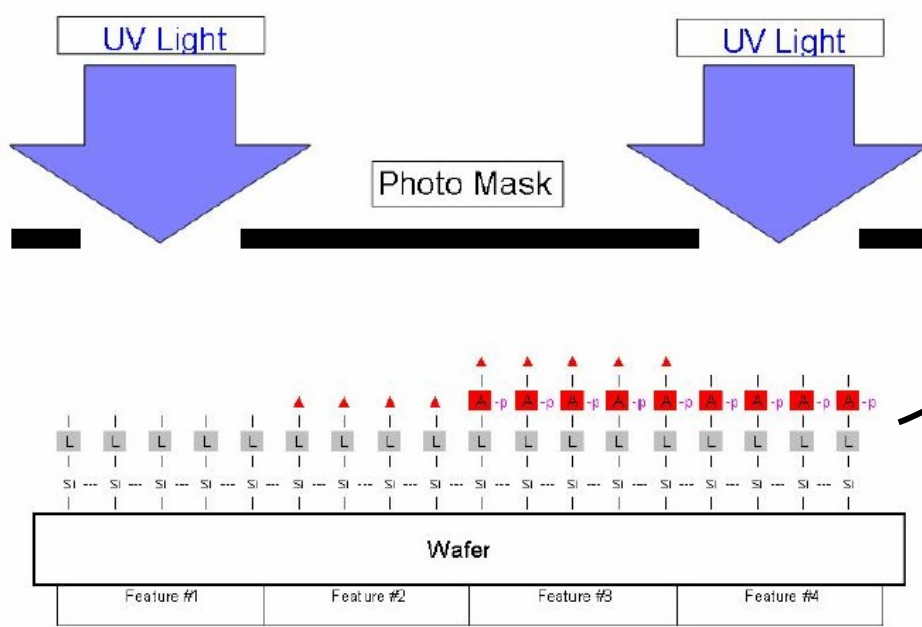
■ navázání prvního nukleotidu (A)



■ ozáření přes masku – odstranění blokujících skupin (deproteckce)

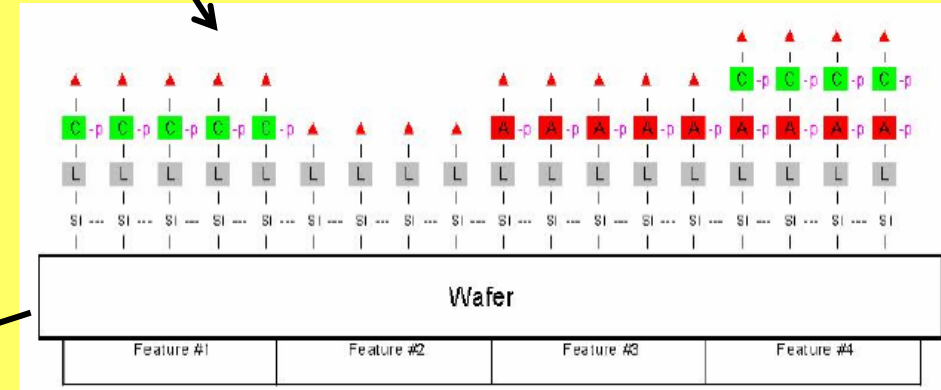


Výroba (2)

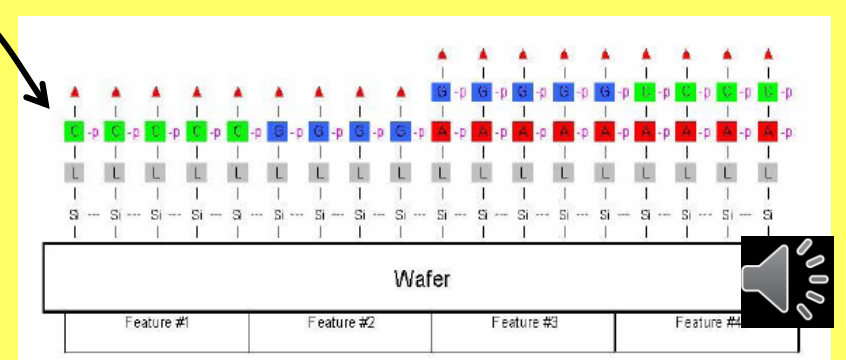
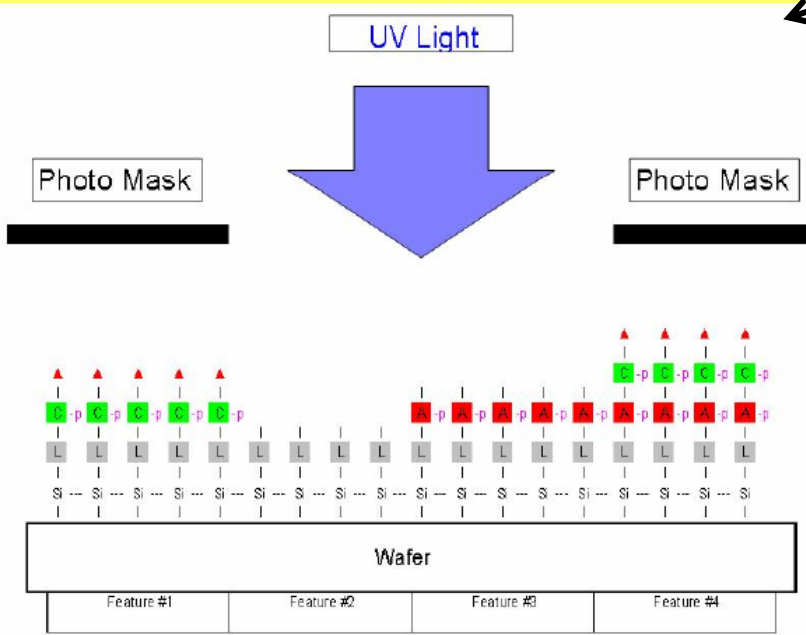


■ navázání dalšího nukleotidu (C)

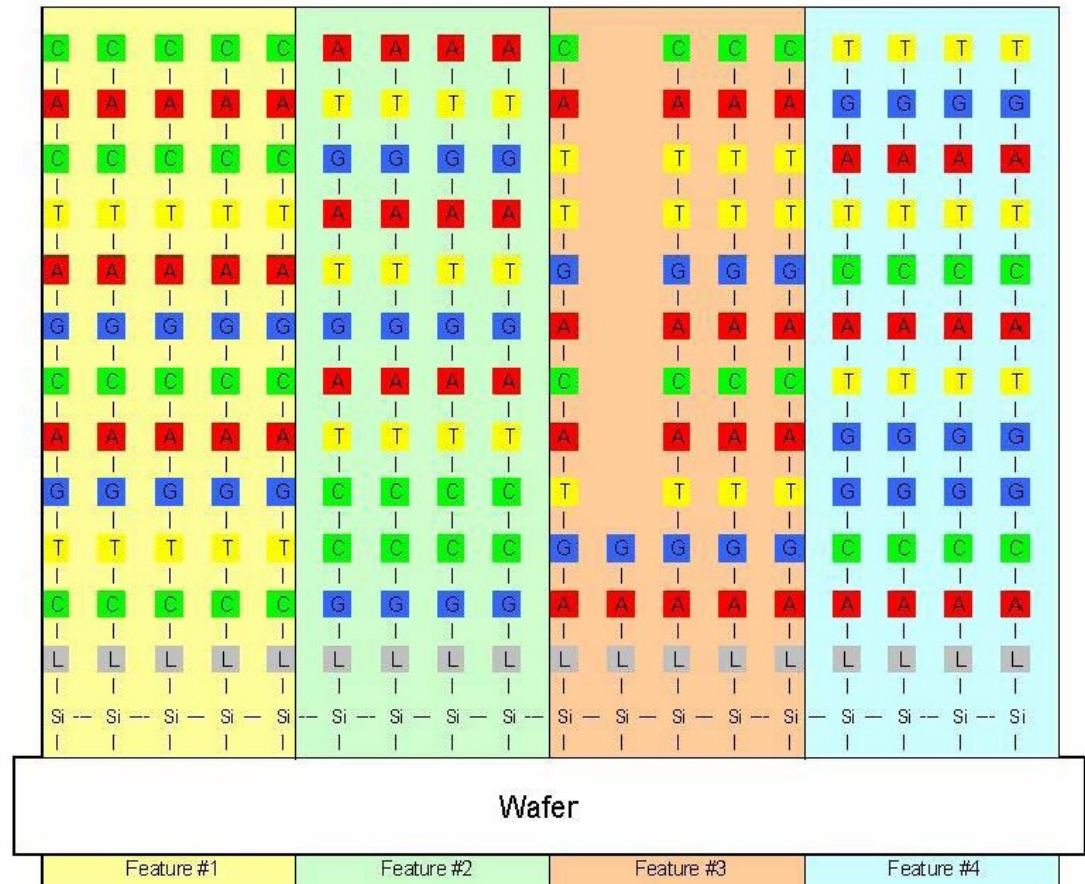
- ozáření přes masku č. 2
- ozáření přes masku č. 3



■ další nukleotid (G)



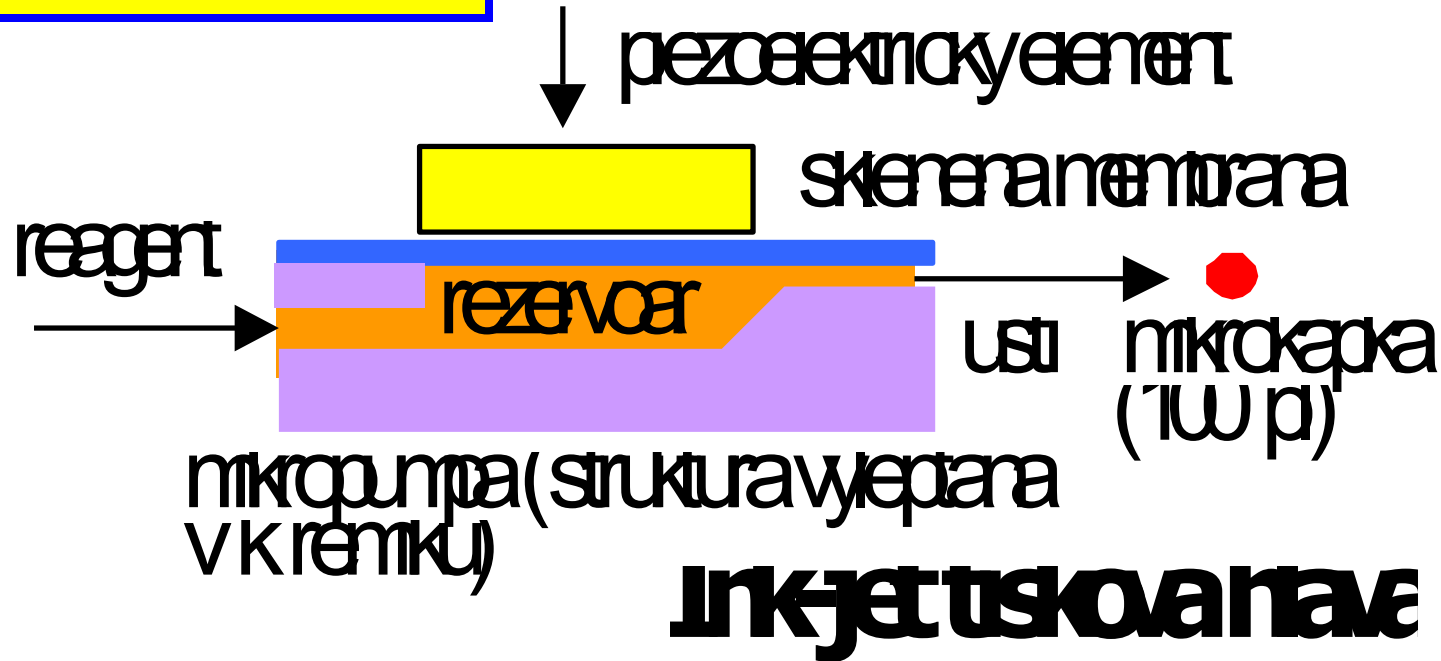
Hotovo!



- konečný stav po odstranění „capping agents“ a postranních protektivních skupin, následuje zabalení („packaging“) do výměnné „cartridge“
- pro 25-mer potřeba obvykle méně než 100 masek (teor. maximum)
- problém: přesahy na hranicích mezi jednotlivými zónami (odrazy, rozptyl, vnitřní ozáření, ...)



Ink-jet printing

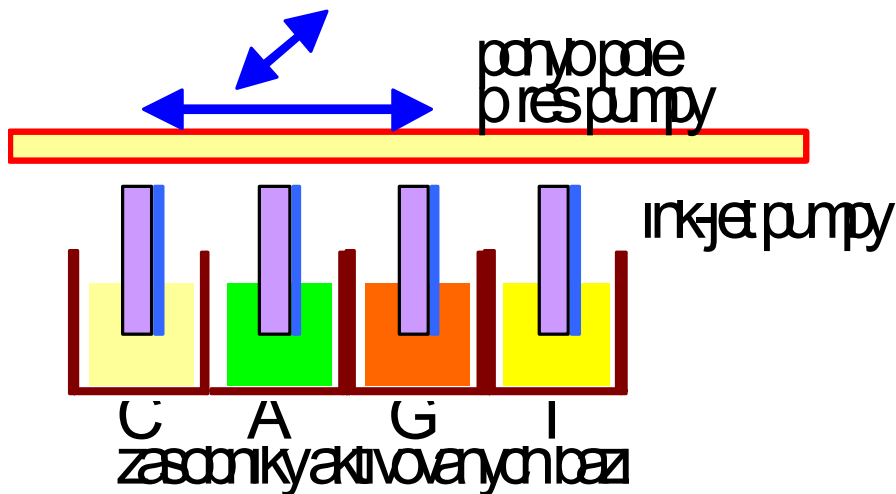
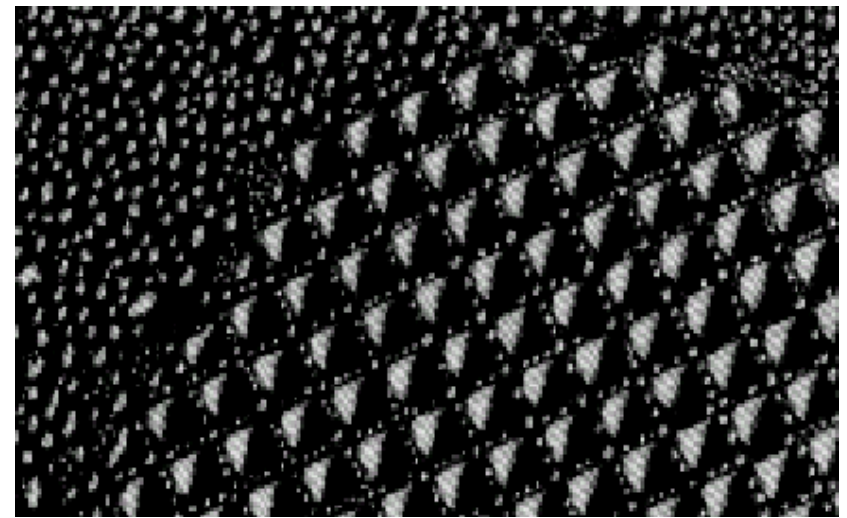


- alternativní metoda přípravy DNA čipů – „tisk“ reagensů na podklad – obdoba inkoustových tiskáren
- základem je struktura rezervoáru vytvořená v křemíku (micromachining), překrytá velmi tenkou skleněnou membránou, na kterou přiléhá piezoelektrický element (aktuátor)
- rezervoár se naplní reagentem, poté nad ústí pumpy posune žádaná pozice čipu, a na piezoelektrický aktuátor se přivede puls napětí
- piezoelement se mechanicky deformuje, zatlačí na membránu, čímž dojde k vystříknutí mikrokapky reagentu
- rychlost „tisku“ je 1 až 6 kHz



Ink-jet printing

- rozptýlení kapky na povrchu brání předcházející modifikace čipu
- hydrofilní místa pro imobilizaci prób navzájem oddělené hydrofobními úseky (surface tension wells)
- nanášené kapky reagentů se nerozpíjí, povrchové napětí je drží uvnitř dané pozice

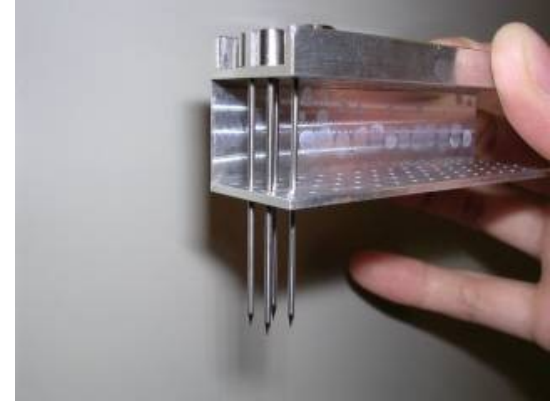
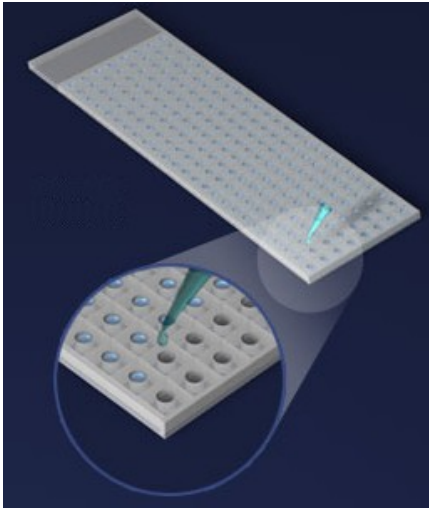


Syntéza souboru DNA prób

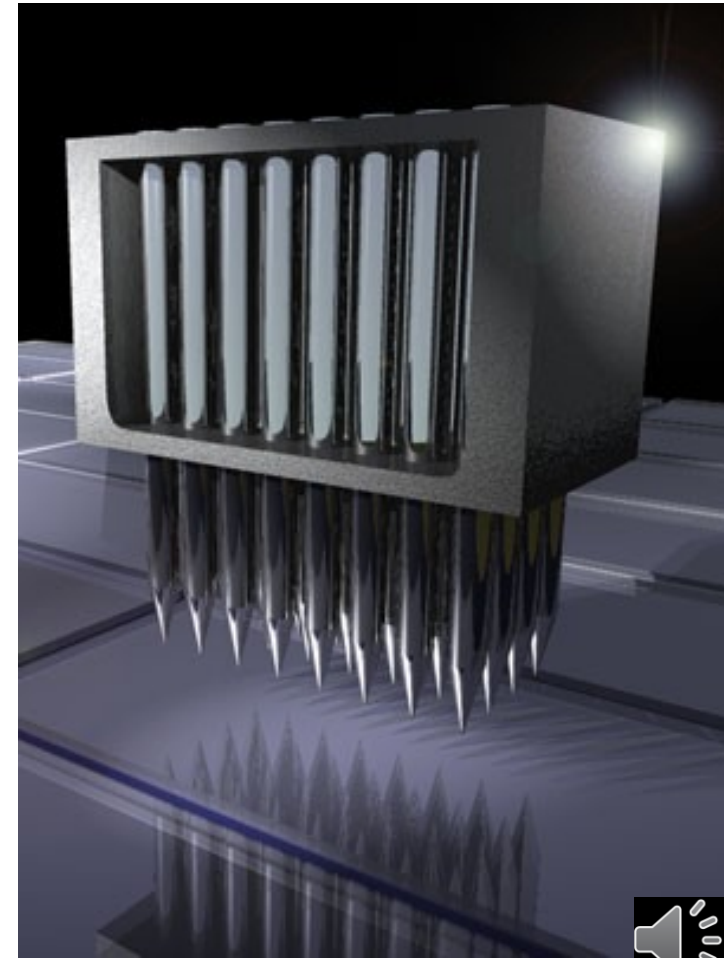
- reakční kroky probíhají naráz na všech pozicích čipu
- promývání a pomocné reakce se provádí pro celý čip společně
- pro 100000 pozic trvá prodloužení o jednu bázi asi 5 minut
- syntéza souboru o délce 25 bází zabere 2 hodiny.



Primitivní postupy



- „pin printing“ – hrot se namočí v roztoku hotové proby a mikropapka se přenesse do žádané pozice na čipu
- 500~5,000 bází dlouhé PCR produkty se generují specifickými primery z cDNA knihoven
- velikost spotů je 100-300 μm , až 10 tisíc prob na čipu
- horší reprodukovatelnost, pomalost
- nízká cena, laboratorní příprava



Průběh analýzy



- **příprava vzorku z buněk (2 dny), nanášení vzorků**
- **hybridizace (až 16 hod)**
- **promývání a fluorescenční značení – Fluidics Station**
4-kanálová - různé pracovní protokoly (1.5 hod)
automatizované přidávání reagentů, míchání, inkubace, promývání-
zvýšená spolehlivost a reprodukovatelnost



GeneArray Scanner

- zasunutí cartridge
- laserové skenování
- zaznamenání fluorescenčního 2D-obrazu

Výrobce: např. HP (Agilent)
rozlišení: lepší než 10 μm
přes 10^6 pozic



Složky GeneArray systému

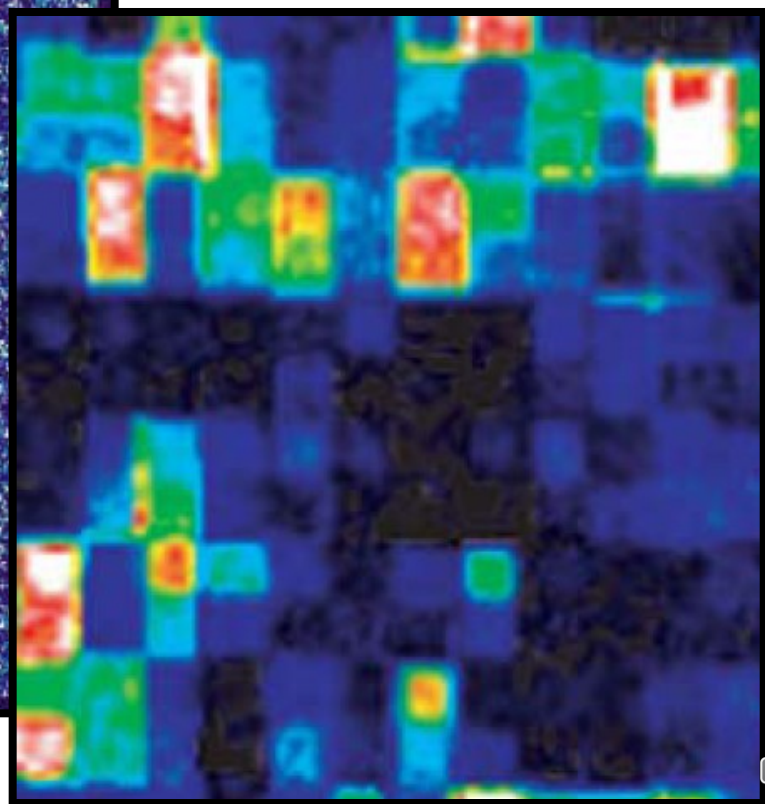
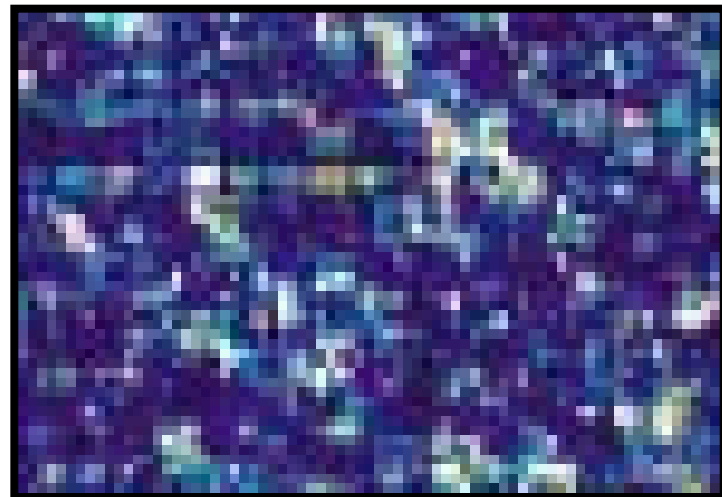
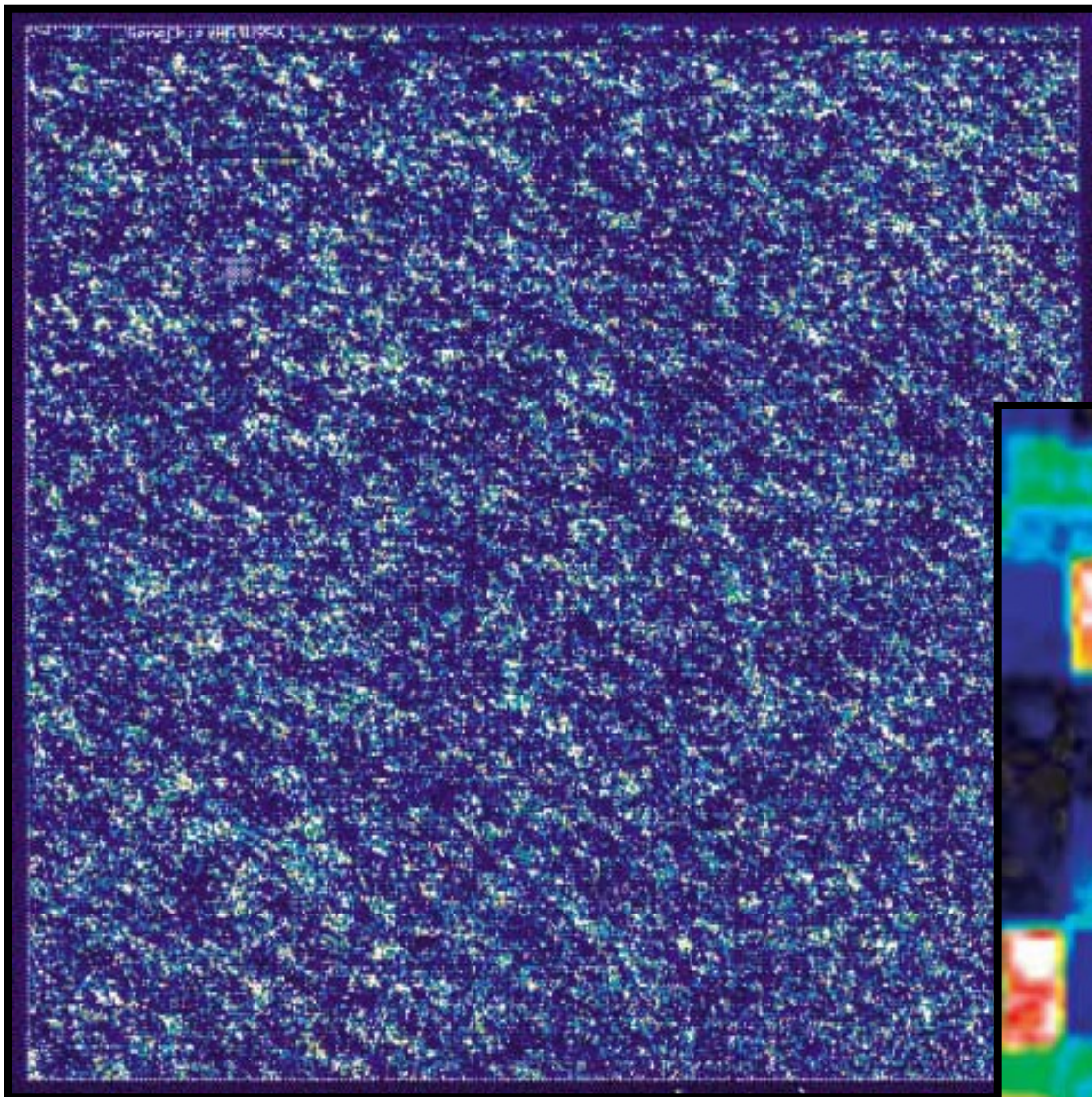
Skener

PC

průtočná stanice

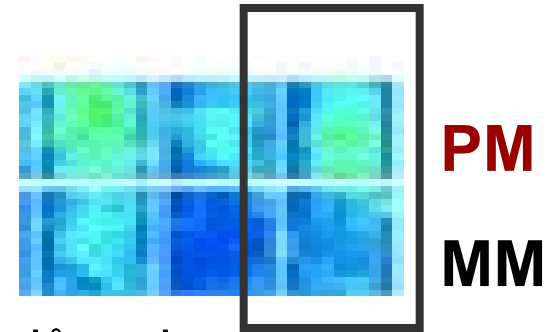


Výsledek

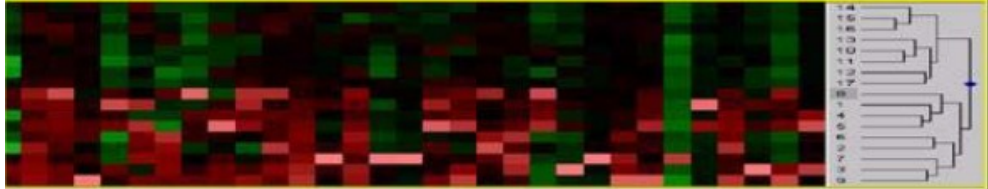


Zpracování signálu

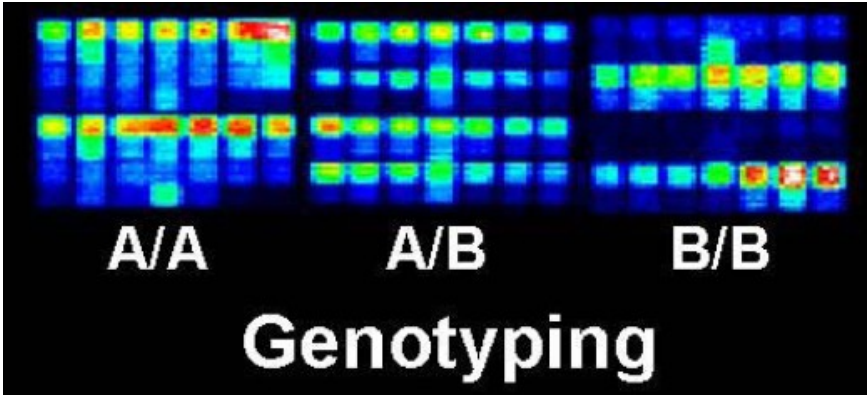
- nastavení skeneru – různé úrovně odpovídající stavu PM („perfect match“) a MM („mismatch“)
- změny poměru PM/MM v důsledku nastavení přístrojů mohou vést ke změně interpretace o přítomnosti genu
- technické komplikace – prachové částice, gradienty excitace, správné nastavení mřížky vymezující jednotlivé zóny
- statistické normalizování a vážení signálu, manipulace s rozhodovacími úrovněmi:
Statistical Difference Threshold (SDT) = jak signifikantní je rozdíl mezi PM a MM při uvážení dané úrovně šumu?
Statistical ratio threshold (SRT) = jak větší musí být PM než MM pro pozitivní výsledek? Zvýšené nastavení SRT dělá analýzu více stringentní (vliv uživatelského nastavení vyhodnocovacího programu)
- výsledek pro daný gen: Present / Marginal / Absent plus numerická hodnota odpovídající úrovni exprese



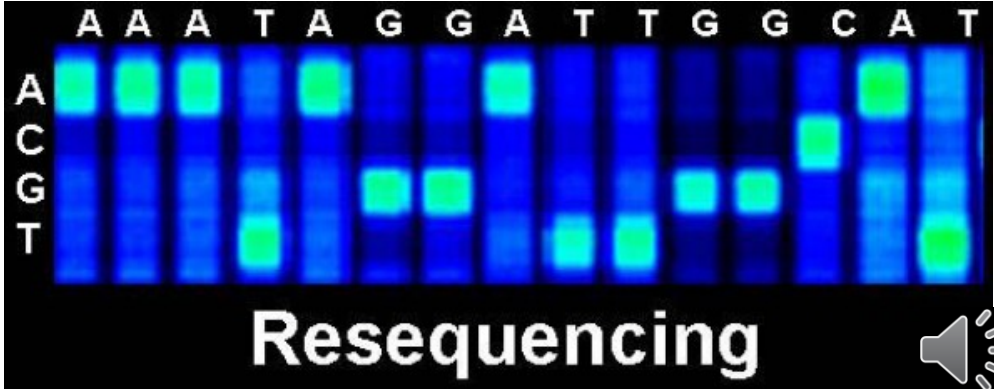
Způsoby použití DNA čipů



Expression Analysis



Genotyping

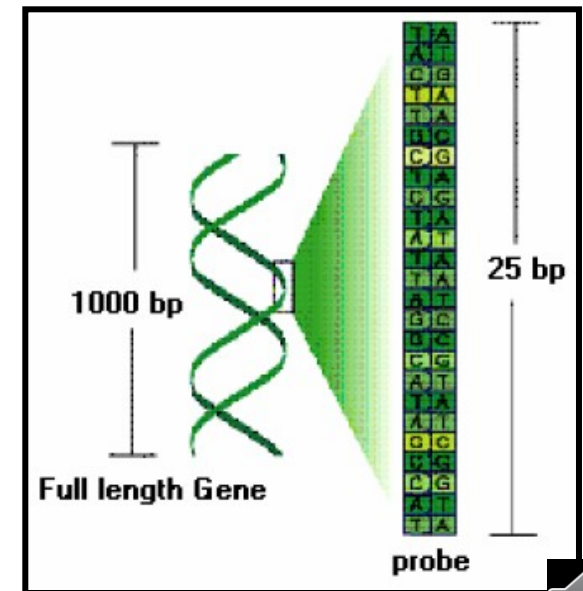


Resequencing



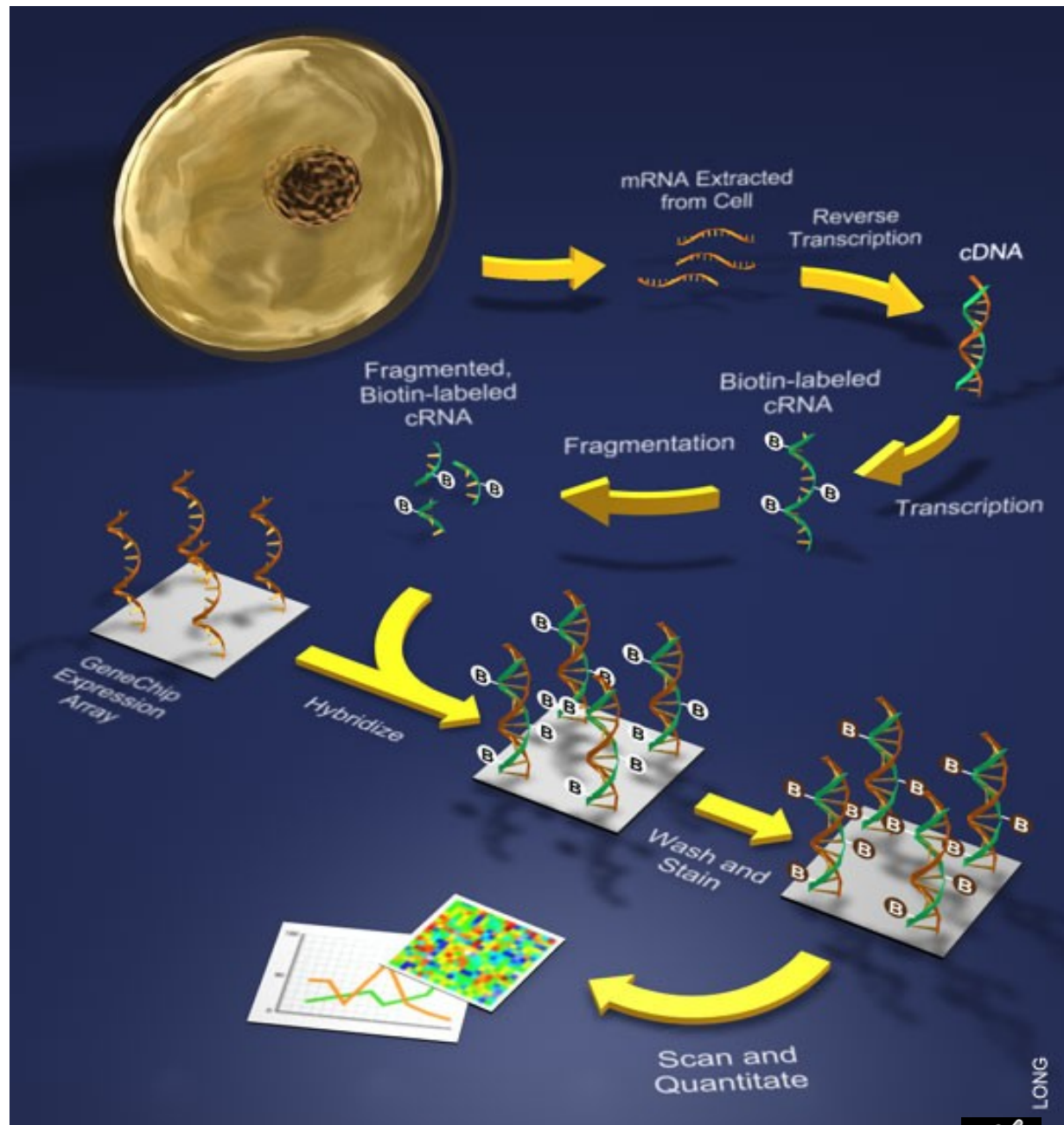
Analýza genové exprese

- Human Genom Project – 99.9% DNA u jednotlivých osob je identické sekvence
- i minimální sekvenční difference však mohou vést k ohromným rozdílům v úrovni exprese genů
- různé druhy buněk daného organismu obsahují shodnou DNA, ale ne každý gen je exprimován v každém typu buňky
- studium genové exprese se provádí měřením hladiny odpovídající přepisované RNA
- na čipu je každý z asi 30 tisíc genů reprezentován unikátní sekvencí o délce 25 bází – próba (vybere se z několika tisíc bází celého genu tak, aby se nepřekrývalo s jinými geny)
- provede se extrakce RNA z buněk (krev, sliny, tumor, ...)
- přepíše se na cDNA, zmnoží pomocí PCR, přitom se biotinylují konce jednotlivých kopií



oligoArrays (Affymetrix)

- absolutní data
- cca 20 prob reprezentuje každý gen, výsledné „rozhodnutí“ je statistickým zhodnocením dané kombinace

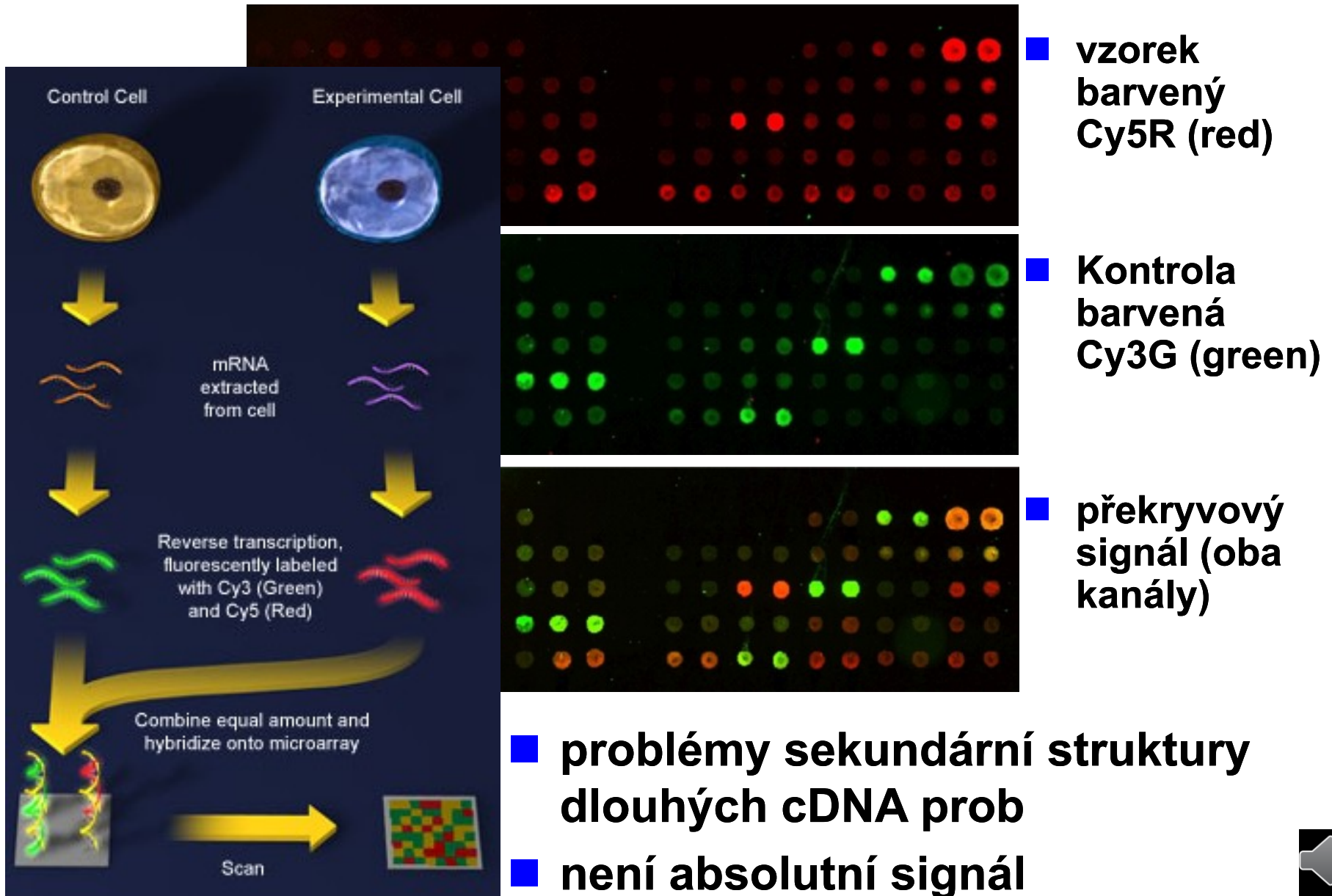


Genová exprese

- hybridizace na čipu, promytí, fluorescenční označení biotinylovaných konců PCR fragmentů
- „zviditelnění“ přepisovaných genů – intenzita fluorescence v dané pozici je úměrná úrovni exprese genu reprezentovaného v dané pozici
- korelace genové exprese s fyziologickými projevy umožňuje v konečné fázi identifikaci genů
- využití pro identifikaci genů spojených s nemocemi
- pomoc při kombinatorickém hledání vhodných léčiv pro „vypínání“ nebo naopak „zapínání“ genů



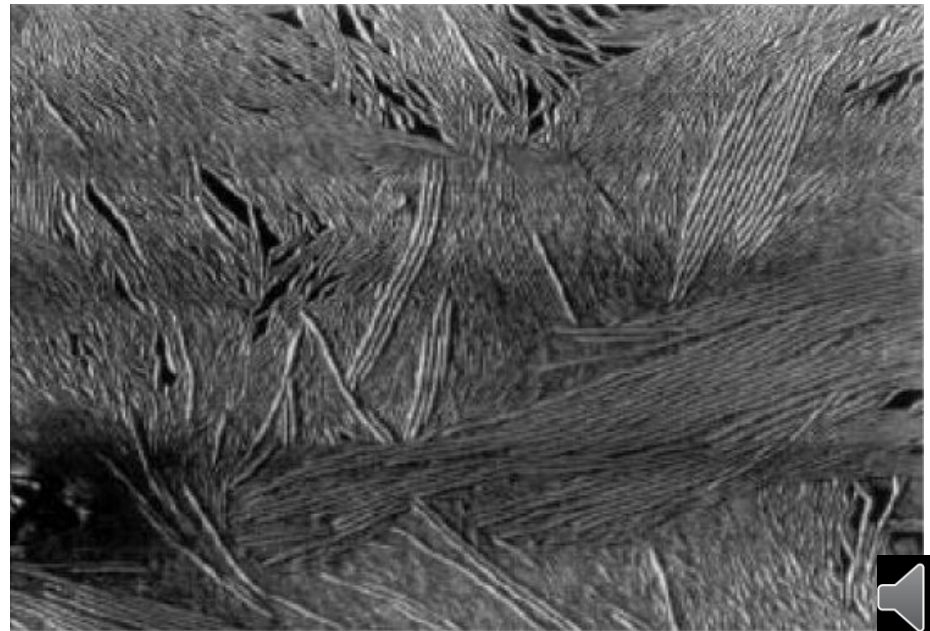
cDNA arrays (Stanford)



cDNA arrays

- nehomogennost natištěné cDNA – lze porovnat pouze relativní úrovně exprese – poměrový signál
- poměr závisí na volbě referentního materiálu – vysoká úroveň tedy nemusí znamenat vysoký poměr
- nemusí dojít k identifikaci každého genu
- změna úrovně exprese mezi kontrolou a vzorkem nemusí znamenat závěr o přítomnosti genu

- ukázka části oblasti proby po hybridizaci (AFM, šířka obrázku je 2 μm)



Analýza genotypu

- studium polymorfismu genomu (SNP, „single nucleotide polymorphism“) – výskyt bodových mutací
- porovnávání genových podobností mezi nositeli daného onemocnění
- výhoda DNA čipů – současné sledování desítek tisíc různých SNP
- analyzuje se DNA, po zmnožení PCR se fragmentuje
- detekce hetero / homozygotů



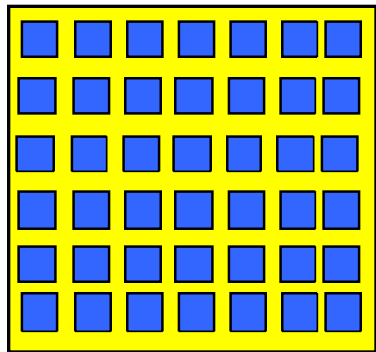
Hybridizační sekvenace

- klasická metoda sekvenování DNA - značení a postupné prodlužování řetězce
- vzorek se rozdělí do čtyř zkumavek, v každé z nich je jeden z nukleotidů značený (radioaktivně či fluorescenčně)
- při prodloužení řetězce se vždy na konec umístí značená báze a další prodlužování se tím zastaví
- získá se směs označených fragmentů, jejichž délka odpovídá pozici dané báze
- po rozdělení (elfo na gelu, HPLC, CE) se ze čtyř drah A, G, C, T (nebo čtyř barev) sestaví výchozí sekvence
- kapacita této metody je malá, navíc zdlouhavé



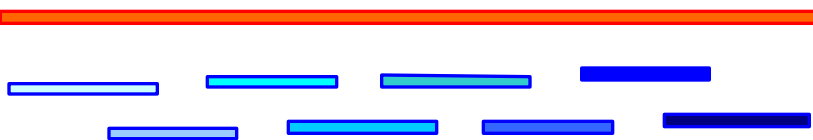
Hybridizační sekvenace

- využívá kombinatorické postupy
- analyzovaná sekvence se nechá hybridizovat se souborem krátkých prób (6 až 20 bází), který obsahuje všechny možné kombinace dané délky sestavitelné ze 4 bází
- podle toho, se kterými próbami analyzovaná DNA hybridizuje, se usuzuje na přítomnost známé krátké sekvence v jejím řetězci
- pomocí překrů se dá zrekonstruovat celá analyzovaná sekvence



křemíkový čip se souborem oligonukleotidových prób

analyzovaná sekvence



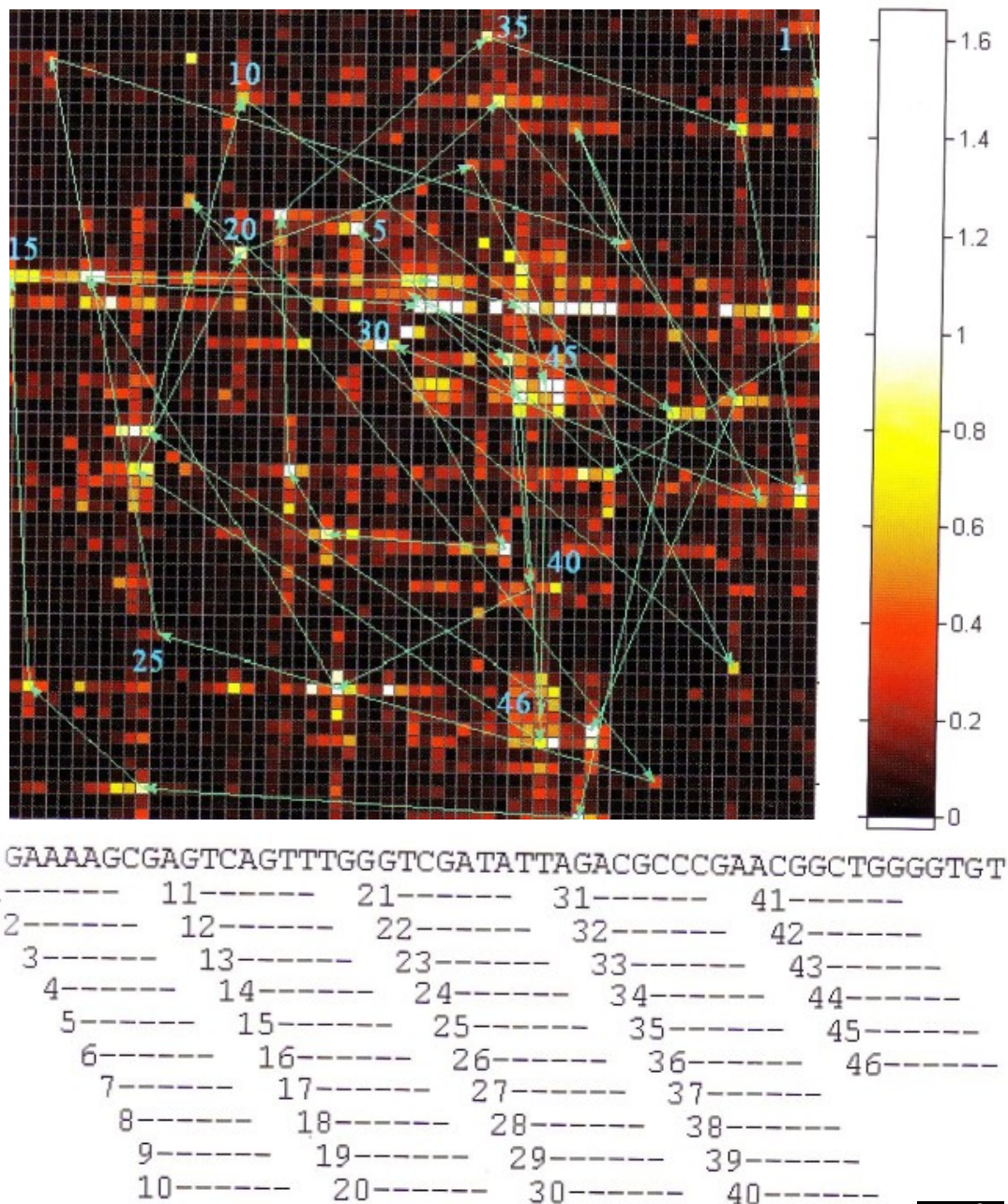
próby, se kterými probíhá hybridizace

- úplný soubor sekvencí:
- 6 bází ... 65000 oligonukleotidů
- 10 bází ... přes 1 milion



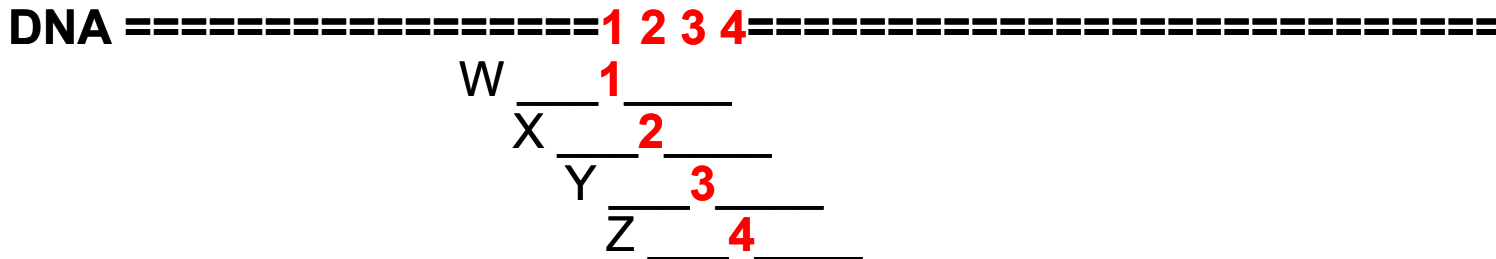
Sekvence 2

- fluorescenční obraz úplného souboru hexamerových prób hybridizovaného se sekvenovaným fragmentem DNA (51-mer)
- šipky spojují pozice v souboru odpovídající perfektně komplementárním duplexům
- dole je pak výsledná sekvence a jí odpovídající sekvence 46 komplementárních hexamerů s vyznačeným překrýváním



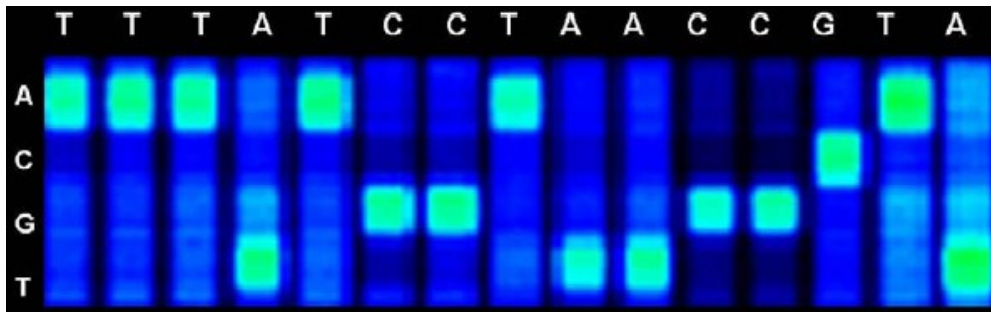
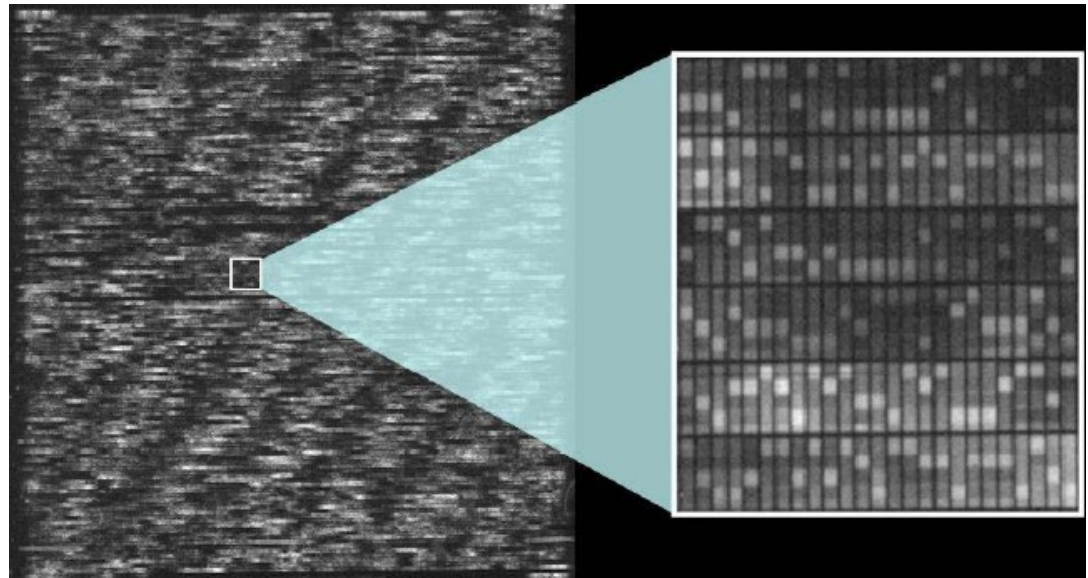
(Re)sekvenace na čipu

- pomocí čipu se určí sekvence DNA ve vzorku a porovná se se známými sekvencemi v databázi (resekvenace)
- na čipu je úplný soubor všech kombinatoricky možných sekvencí
- próby se vždy vyskytují ve čtveřicích, např. proba W:
W1 – ATCGGGTAAACT**A**AAGGCTACTGCCT
W2 – ATCGGGTAAACT**C**AAGGCTACTGCCT
W3 – ATCGGGTAAACT**G**AAGGCTACTGCCT
W4 – ATCGGGTAAACT**T**AAGGCTACTGCCT
- další soubor prób (X) pak je posunut o jednu bázi:
X1 – TCGGGTAAACTG**A**AGGCTACTGCCTC
X2 – TCGGGTAAACTG**C**AGGCTACTGCCTC
X3 – TCGGGTAAACTG**G**AGGCTACTGCCTC
X4 – TCGGGTAAACTG**T**AGGCTACTGCCTC
- takto se pokračuje pro celou sekvenci



Čtení sekvence

	W	X	Y	Z
A				
C				
G				
T				



- perfektně komplementární hybridizující pozice vymezují hledanou sekvenci



Oblasti diagnostiky DNA

Testy rodičovství / kriminalistika

HLA komplex, oblast D-smyčky (mitochondriální DNA), délkový polymorfismus (VNTR místa)

Onkogeny / supresorové geny

c-myb, c-myc, c-abl, c-sis, c-ras, G-protein, jun, p53, retinoblastoma geny

Dědičné choroby

cystická fibrosa, hypercholesterolemie, srpkovitá anemie, Huntingtonova choroba, Duchenneova svalová dystrofie, β -Thalasemie, polycystická ledvinová choroba dospělých, hemochromatosis, hemophilie A / Von Willebrandova choroba



Aplikace diagnostiky DNA

Viry

cytomegalovirus, papilloma viry, rotaviry (RNA), virus lidské imunodeficiency (HIV), virus leukemických t-lymfocytů

Bakterie

Mycobacterium tuberculosis, *Gonorrhea* (RNA nebo DNA), *Mycoplasma pneumoniae* (RNA), *Chlamydia*, *Escherichia coli* (RNA), *Bacillus subtilis* (RNA), *Bacillus burgdorferi*



Databáze informací

- [ArrayExpress](#) - A public repository for microarray based gene expression data maintained by European Bioinformatics Institute.
- [ChipDB](#) - A searchable database of gene expression
- [Gene Expression Atlas](#) - A database for gene expression profile from 91 normal human and mouse samples across a diverse array of tissues, organs, and cell lines.
- [Gene Expression Database \(GXD\)](#) - A database of Mouse Genome Informatics at the Jackson laboratory.
- [Gene Expression Omnibus](#) - A database in NCBI for supporting the public use and disseminating of gene expression data.
- [MUSC DNA Microarray Database](#) - MUSC DNA Microarray Database is a web-accessible archive of DNA microarray data.
- [NASCArrays](#) - a repository for Affymetrix data generated by NASC's transcriptomics service.
- [Public Expression Profiling Resource \(PEPR\)](#) - A web oracle data warehouse of quality control and standard operating procedure (QC/SOP) Affymetrix data. Reference.



Komerční systémy

- Affymetrix oligo arrays
- Qiagen oligo arrays
- Amersham Biosciences oligo arrays
- MWG Biotech oligo arrays
- Rosetta (Merck) oligo arrays
- Agilent cDNA a oligo arrays
- Clontech, BD Biosci. cDNA arrays
- UHN MAC (Ontario) cDNA arrays
- Incyte Gene Album cDNA arrays
- Genomictree cDNA arrays



Současný stav

- problémem je analýza dat, nikoliv jejich získávání
- k dispozici je řada microarray databází, software pro analýzu je veřejně přístupný
- z důvodu výskytu chyb a šumu je typicky ze stovek rozdílně exprimovaných genů pouze několik úspěšně validováno
- existuje velmi dobrá reprodukovatelnost měření na dané platformě, pokud jsou experimenty prováděny v téže laboratoři
- interlaboratorní srovnání v rámci platformy jsou horší
- srovnání dat mezi měřícími platformami obvykle schází nebo si výsledky příliš neodpovídají

