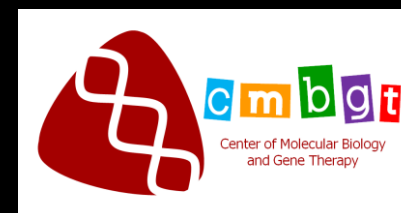
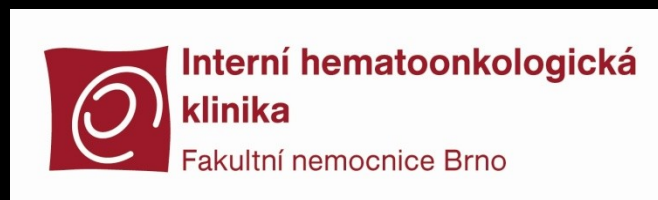




**LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY**  
**Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno**  
**Centrum molekulární biologie a genové terapie**



# Moderní metody analýzy genomu

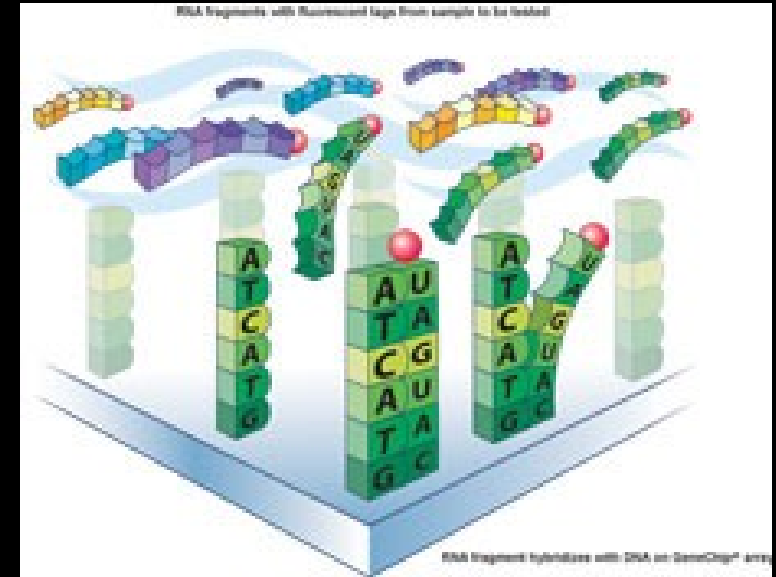
## Čipové technologie I

3.3.2011

Jitka Malčíková

# Princip čipových technologií

- Princip – sondy vázané na nosný podklad



- Různé dělení podle
  - Aplikace (genotypizace; exprese RNA, proteinů; epigenetika...)
  - Technologie výroby (*in situ* syntéza; deponování)
  - Typu sond (umělé chromozómy – BAC, PAC; cDNA; oligonukleotidy)
  - Značení (fluorescence – jedno/více-kanálové; autoradiografie, chemiluminiscence)

# Nosný podklad

## ■ Sklo

- mikroskopické sklíčko (25 x 75 mm)
- speciální formáty
- různé úpravy povrchu – aminosilan, epoxy atd.

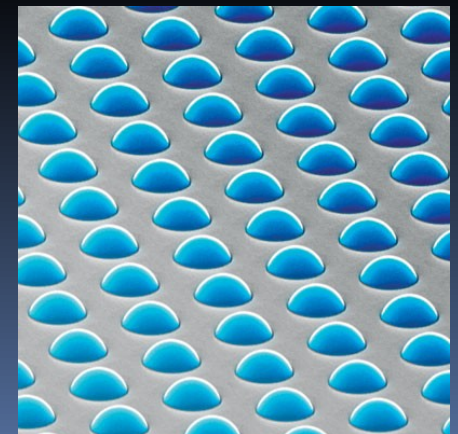
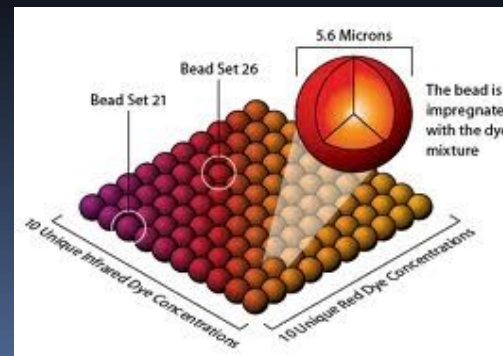


## ■ Nylonová nebo nitrocelulózová membrána

## ■ Plast, gel

## ■ Mikrokuličky

- BeadArrays® (Illumina)
- xMAP (Luminex)





# Aplikace

- Analýza genomových aberací, genotypizace
  - CGH, SNP čipy
  - Resekvenační čipy
- Epigenomika
  - Mapování vazby proteinů na DNA (ChIP-on-chip)
  - Mapování metylované DNA (MeDIP-chip)
- Exprese
  - mRNA, miRNA
  - Proteiny
  - Buňky, tkáně

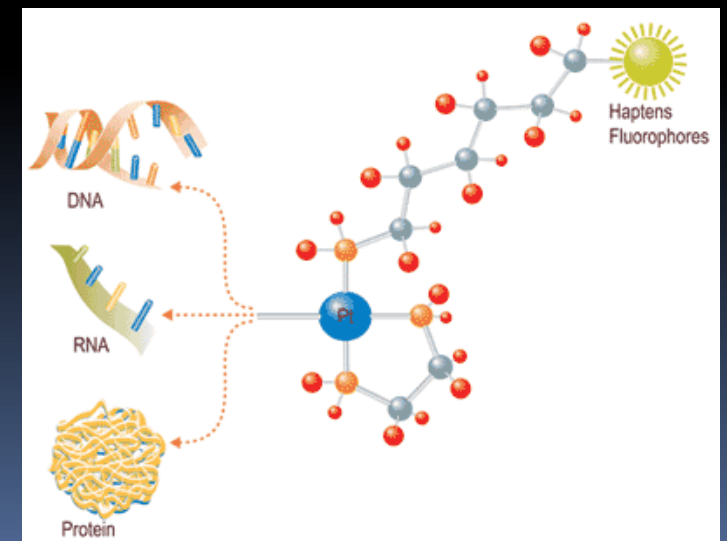
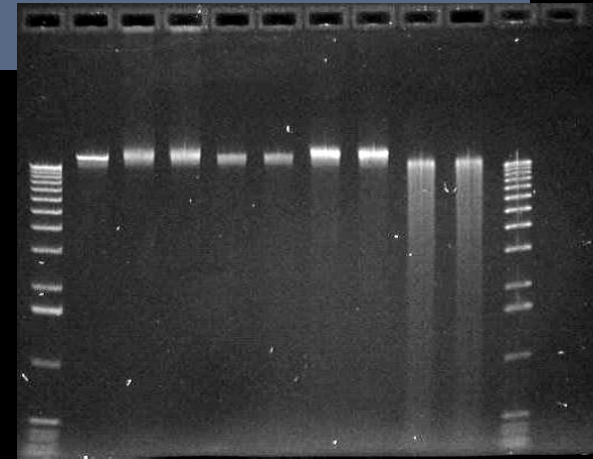


# Čipy pro analýzu genomu

- Výchozí materiál – genomová DNA
- Detekce nebalancovaných genomových změn
  - Amplifikace, delece – CNV – copy number variations
  - Nedetekuje balancované chromozomální translokace
  - Array CGH
- Detekce uniparentální dizomie, genotypizace
  - SNP čipy
- Detekce mutací, polymorfismů
  - Resekvenační čipy

# Postup

- Izolace DNA
- Kontrola kvality, stanovení kvantity
- Amplifikace – celogenomová, PCR
- Fragmentace – enzymaticky
- Značení - fluorescence
- Hybridizace, odmytí
- Skenování
- Analýza dat



# CGH - komparativní genomová hybridizace

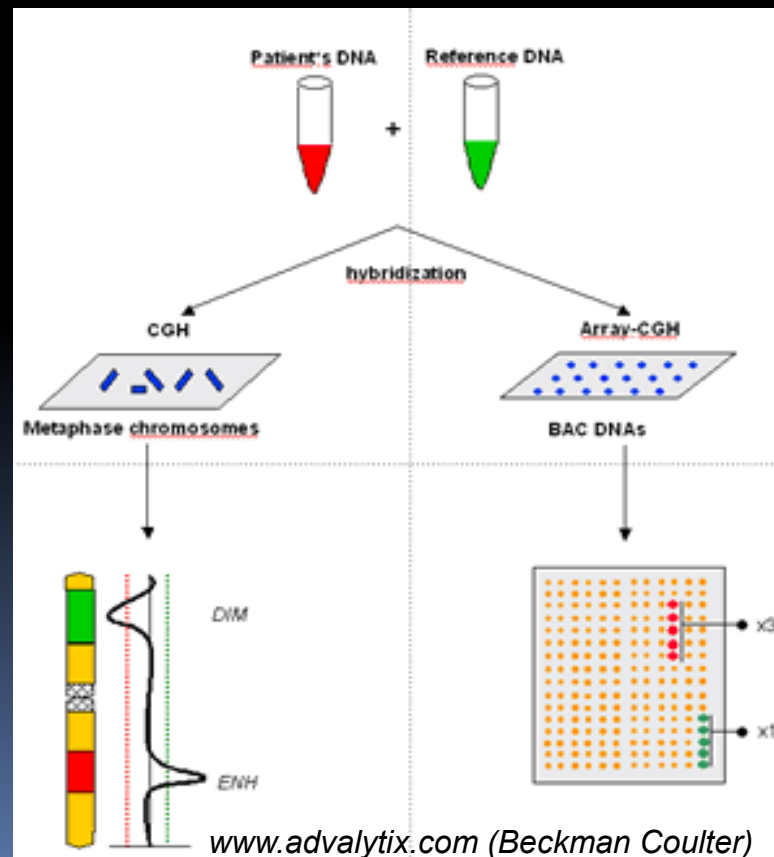
Kohybridizace značené **DNA vzorku** a **kontrolní DNA**

- na normální metafázní chromozomy

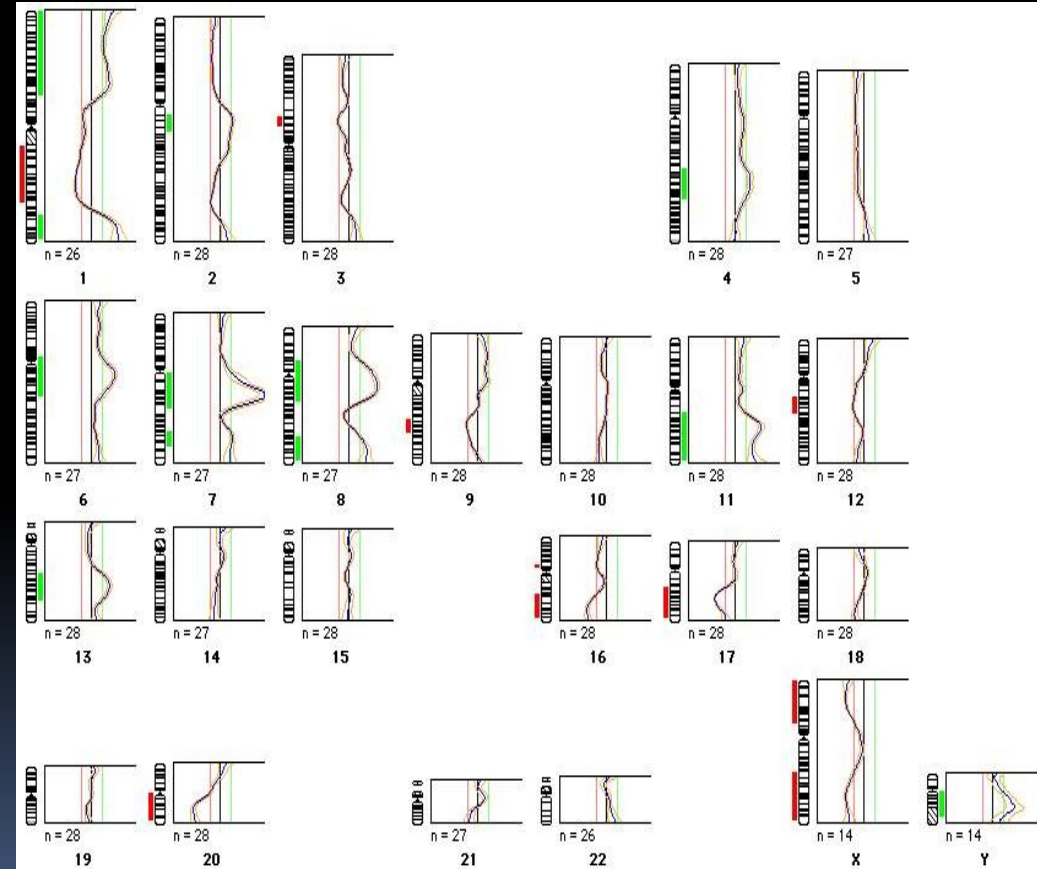
- klasická CGH, HR-CGH
- Metoda molekulární cytogenetiky

- na sondy navázané na sklíčku

- array CGH – čipová technologie



# Klasická CGH, HR-CGH

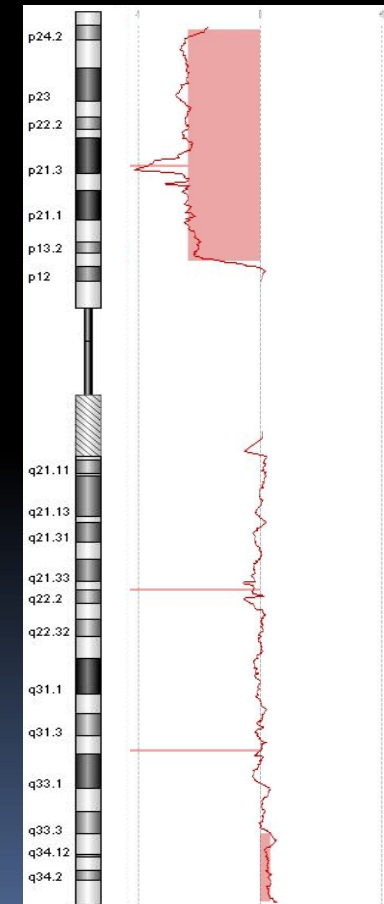


<http://web.ncifcrf.gov> (NCI-Frederick)



# Rozdělení aCGH podle typu sond

- Délka a hustota pokrytí DNA sond určuje rozlišení čipu
- Úseky genomové DNA vložené do vektorů
  - YAC (Yeast Artificial chromosome) - 200 -1000 kb
  - BAC (Bacterial Artificial chromosome) - 50–200 kb
  - PAC (Phage Artificial chromosome) - 75-200 kb
  - Kosmidy – 30-40 kb
  - Rozlišení ~ 1Mb
- cDNA - 1-2 kb
  - Pouze genové oblasti
  - Horší schopnost detekce jednokopiových změn
  - Rozlišení - 1-2 kb
- Oligonukleotidy - 25-85 bází
  - Rozlišení - pod 1 kb



# Platformy aCGH

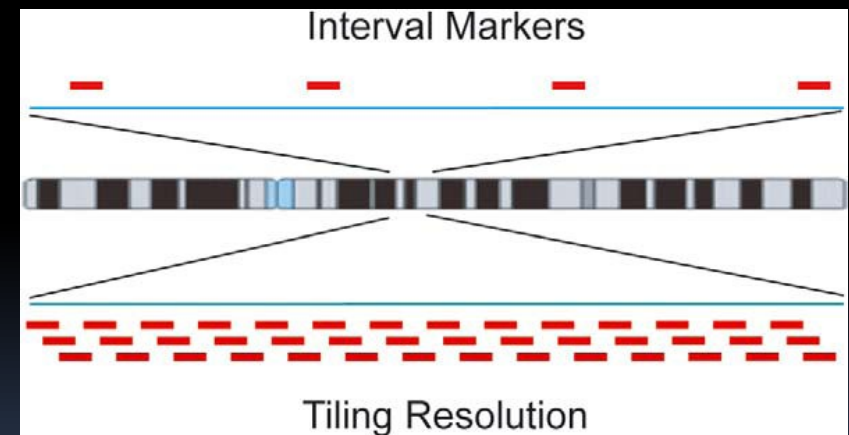
## ■ Cílené

- Analýza vybraných „hot spot“ oblastí spojených s konkrétním onemocněním

## ■ Chromozomové

## ■ Celogenomové

- Sondy rozmístěné
  - rovnoměrně po genomu
  - v určitých intervalech
- Tiling arrays – sondy se překrývají – vysoké rozlišení

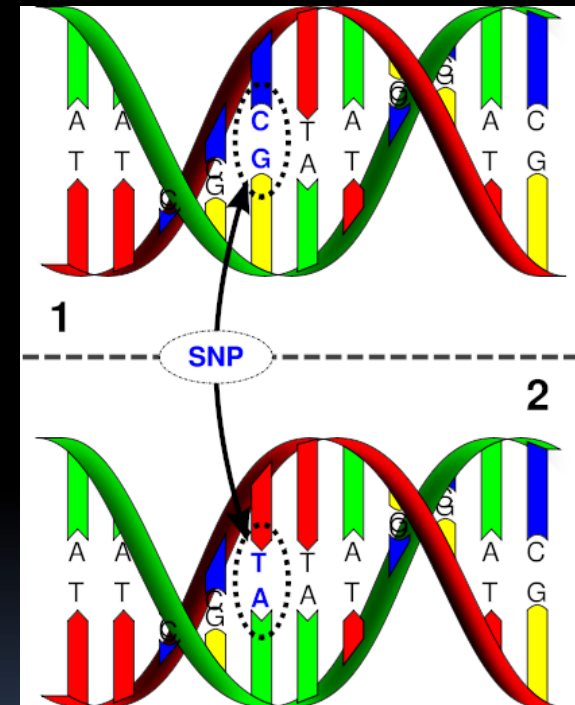


*Davies et al., 2005*



# SNP čipy

- Čipy umožňující rozlišit nejen CNV, ale i SNP
  - Sondy pro detekci CNV jako u CGH čipů + sondy speciálně navržené pro detekci SNP
- SNP – jednonukleotidové polymorfismy
  - V lidském genomu asi 10 mil identifikovaných polymorfismů
  - Asociace s onemocněními
- Určení alelového statusu, haplotypu
  - Genotypizace, asociační studie
- Detekce uniparentální dizomie

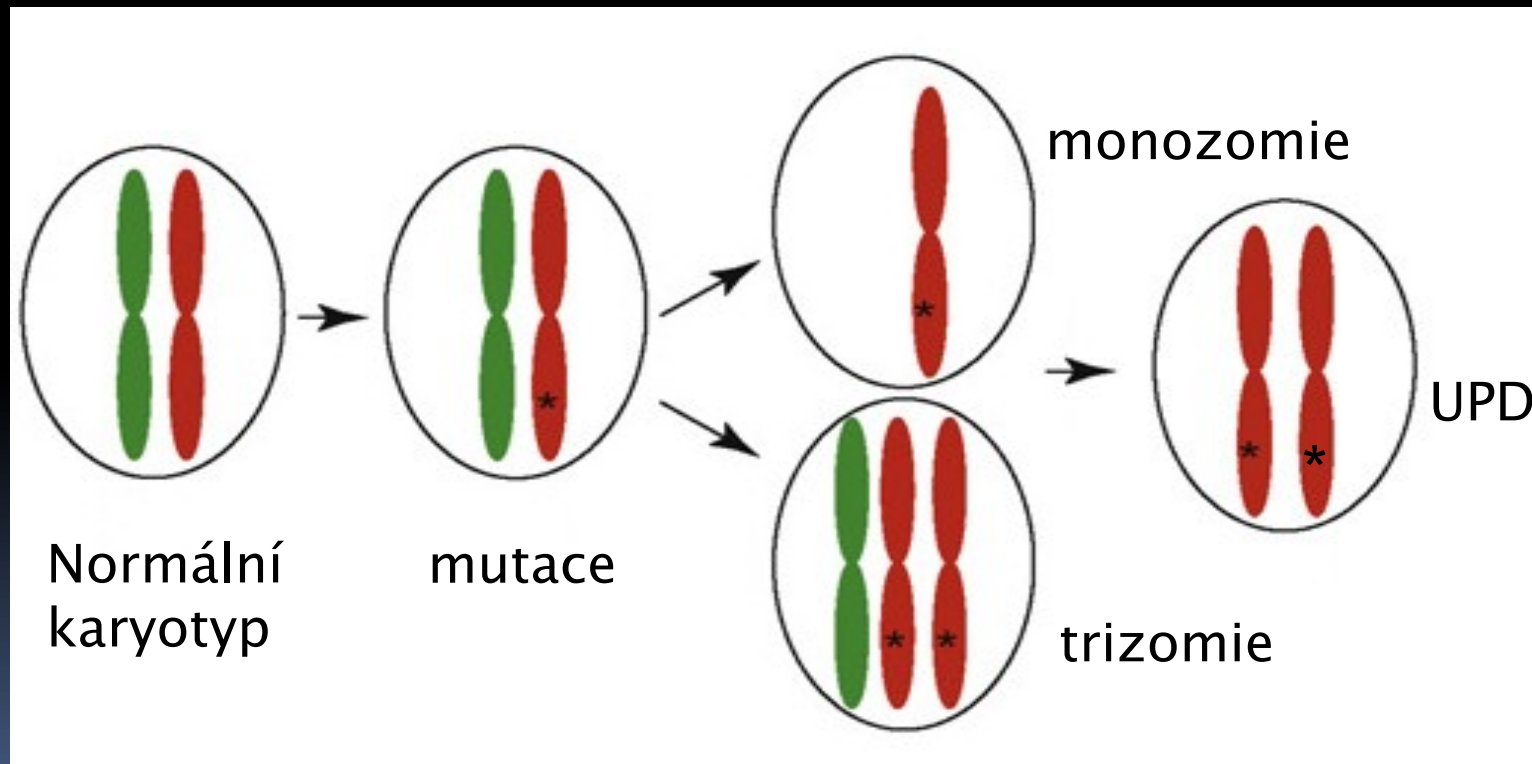


[www.marshall.edu](http://www.marshall.edu)

# Uniparentální dizomie (UPD)

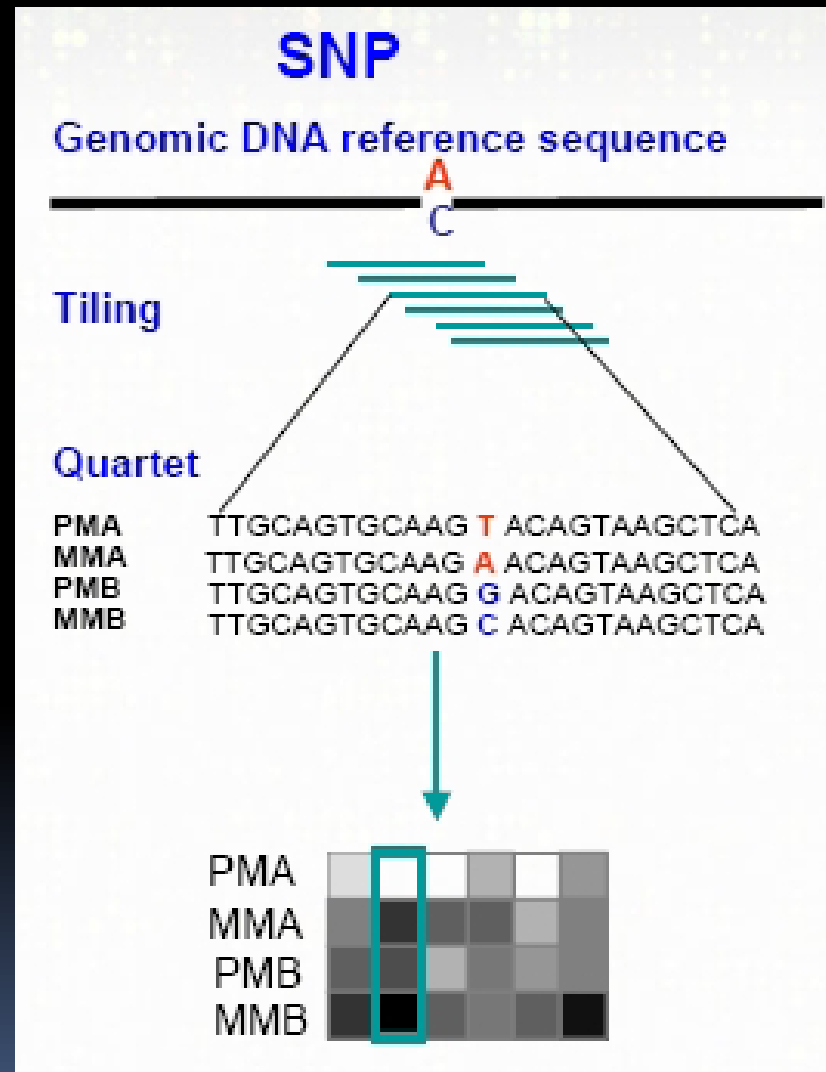
CNN LOH – copy number neutral loss of heterozygosity

- Vrozená, získaná
- Vyskytuje se u řady onemocnění



# Princip SNP čipů - Affymetrix

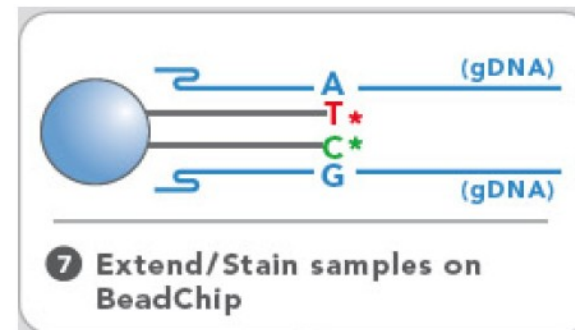
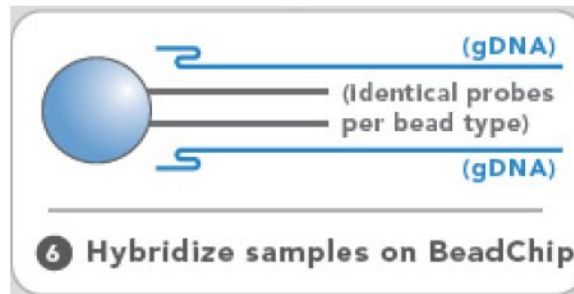
- 25b sondy, záměna 13. nukleotidu
- Jednobarevná detekce
  - na čip se hybridizuje pouze označená testovaná DNA



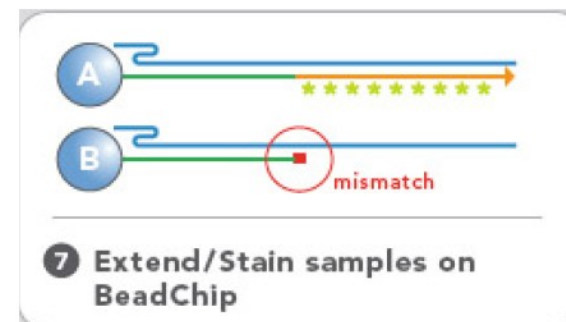
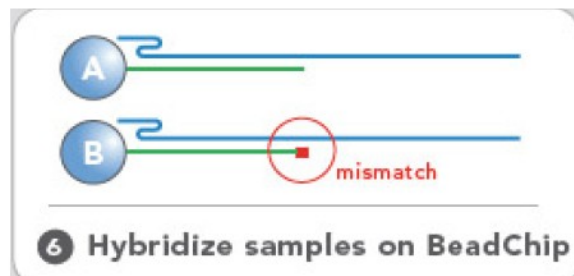
# Princip SNP čipů - Illumina

- 1x 50b, single base extension; pouze A/G, A/C, T/C, T/G (dvoubarevná metoda)
- 2X 50b, allele specific extension

Infinium II

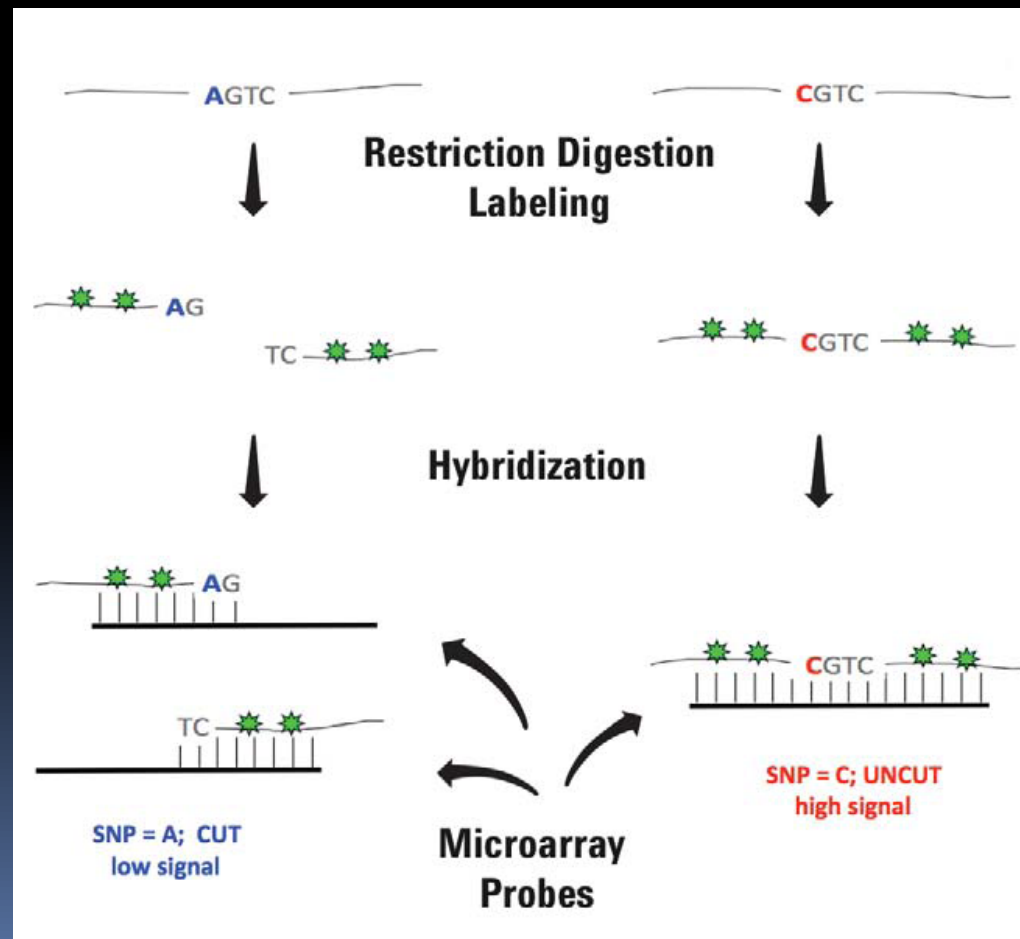


Infinium I



# Princip SNP čipů - Agilent

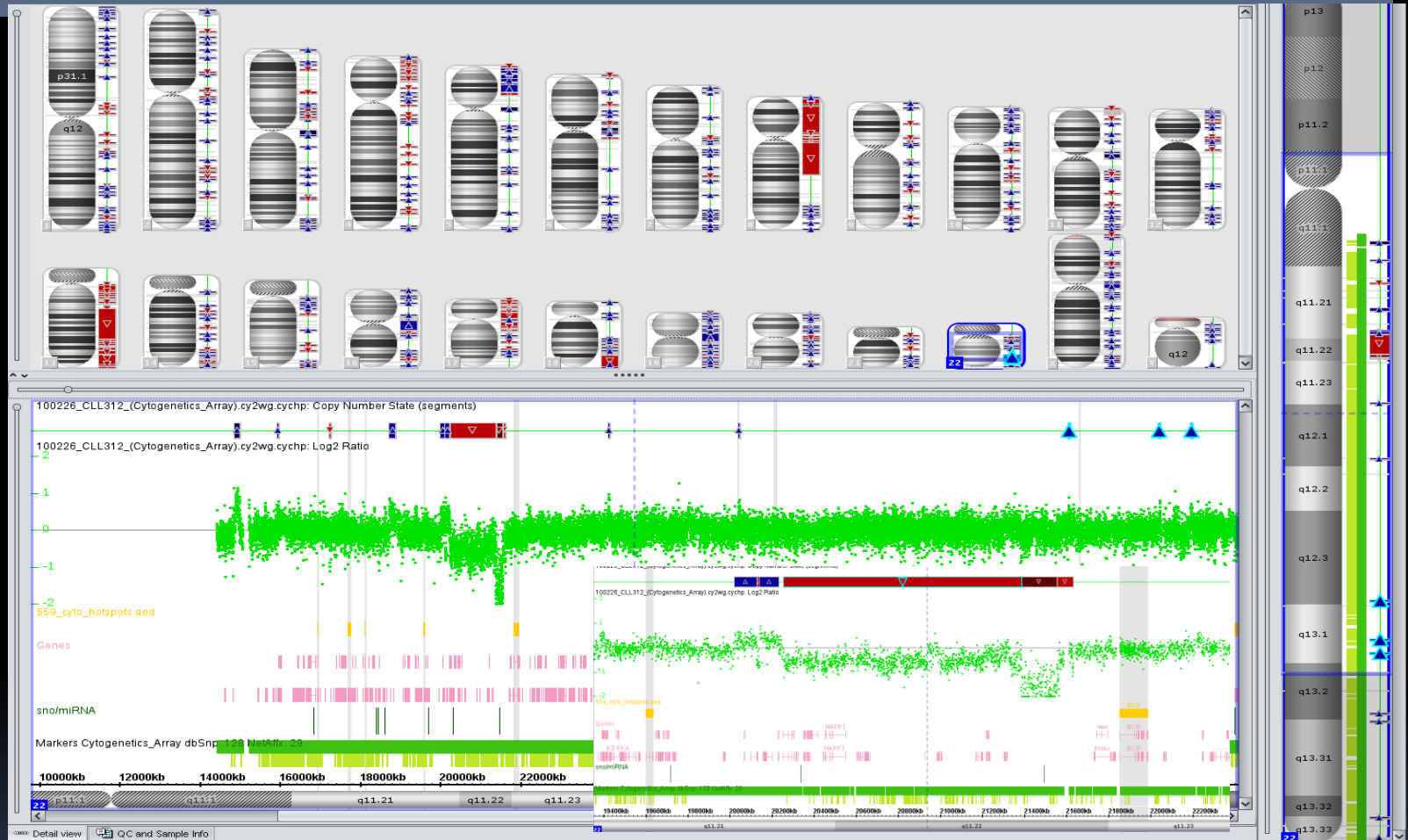
- 60b, SNPs pouze v místech rozpoznávaných restričními endonukleázami



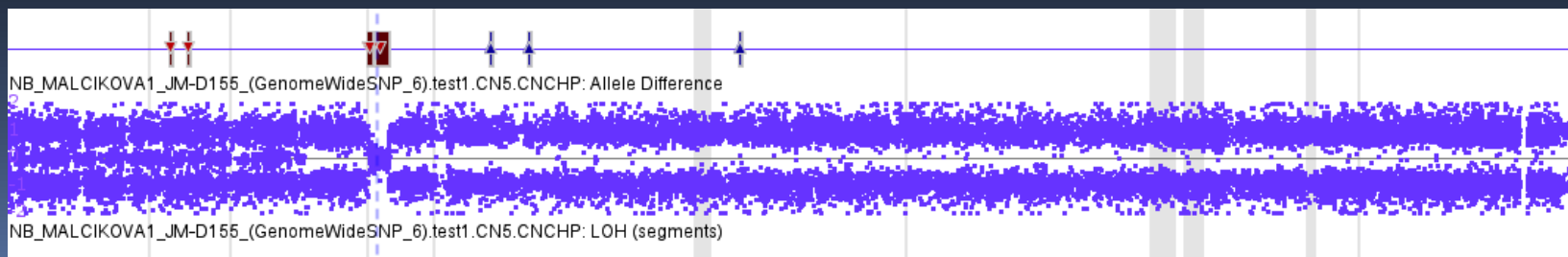


# Výsledky SNP čipů

amplifikace +  
delece +  
bialeická delece



Uniparentální  
dizomie



# Využití CGH, SNP čipů

- **Nádorová genomika**
  - V nádorových buňkách často změny genomu – primární i sekundární
- **Klinická genetika**
  - Přesnější charakterizace mikrodelečních syndromů
  - Identifikace genomových změn u pacientů s mentální retardací i jinými vrozenými postiženími
- **Farmakogenomika**
- **Prenatální a preimplantační diagnostika**
- **Asociační studie – asociace SNP i CNV s řadou onemocnění (revmatoidní artritida, diabetes, nádorová onemocnění, psychiatrická onemocnění)**
- **Evoluční studie**

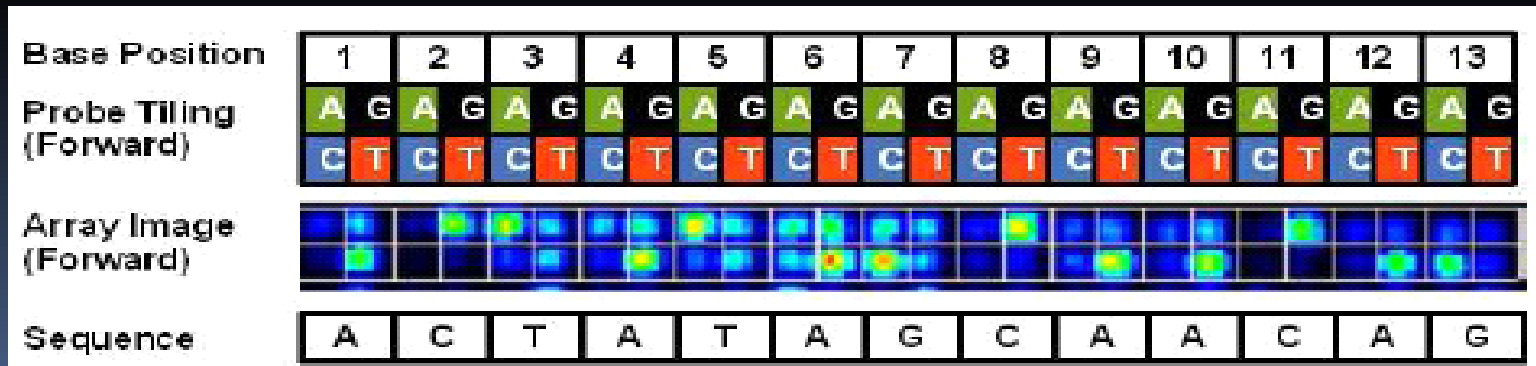
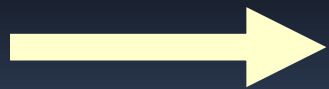
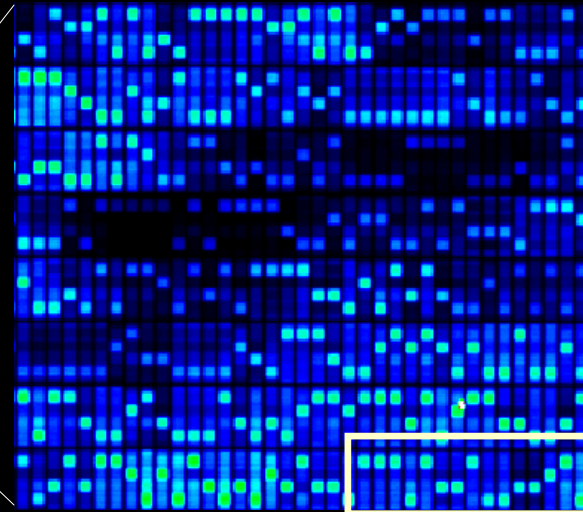
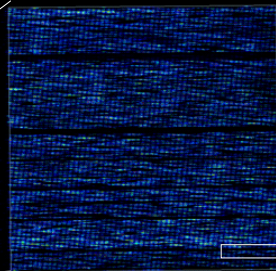
# Resekvenační čipy

## ■ Affymetrix

- Stejný princip jako detekce SNP
- Krátké oligonukleotidy – 25mery
- Typizovaná báze na 13. pozici – největší vliv na sílu vazby při neshodě
- SNP = testovány 2 varianty X resekvenování = testovány 4 varianty

TCGGTAGCCATGAATGAGTTACTAC	<i>Probe 1 Forward</i>
TCGGTAGCCATGCATGAGTTACTAC	<i>Probe 2 Forward</i>
TCGGTAGCCATGGATGAGTTACTAC	<i>Probe 3 Forward</i>
TCGGTAGCCATGTATGAGTTACTAC	<i>Probe 4 Forward</i>
ATCGGTAGCCATGCATGAGTTACTACAGCT	<i>Genomic Sequence of interest</i>
TAGCCATCGGTACGTA TCAATGATGTCGA	
AGCCATCGGTAGATACTCAATGATG	<i>Probe 1 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGCTACTCAATGATG	<i>Probe 2 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGGTACTCAATGATG	<i>Probe 3 Reverse</i>
AGCCATCGGTAGTTACTCAATGATG	<i>Probe 4 Reverse</i>

# Resekvenační čipy Affymetrix - princip



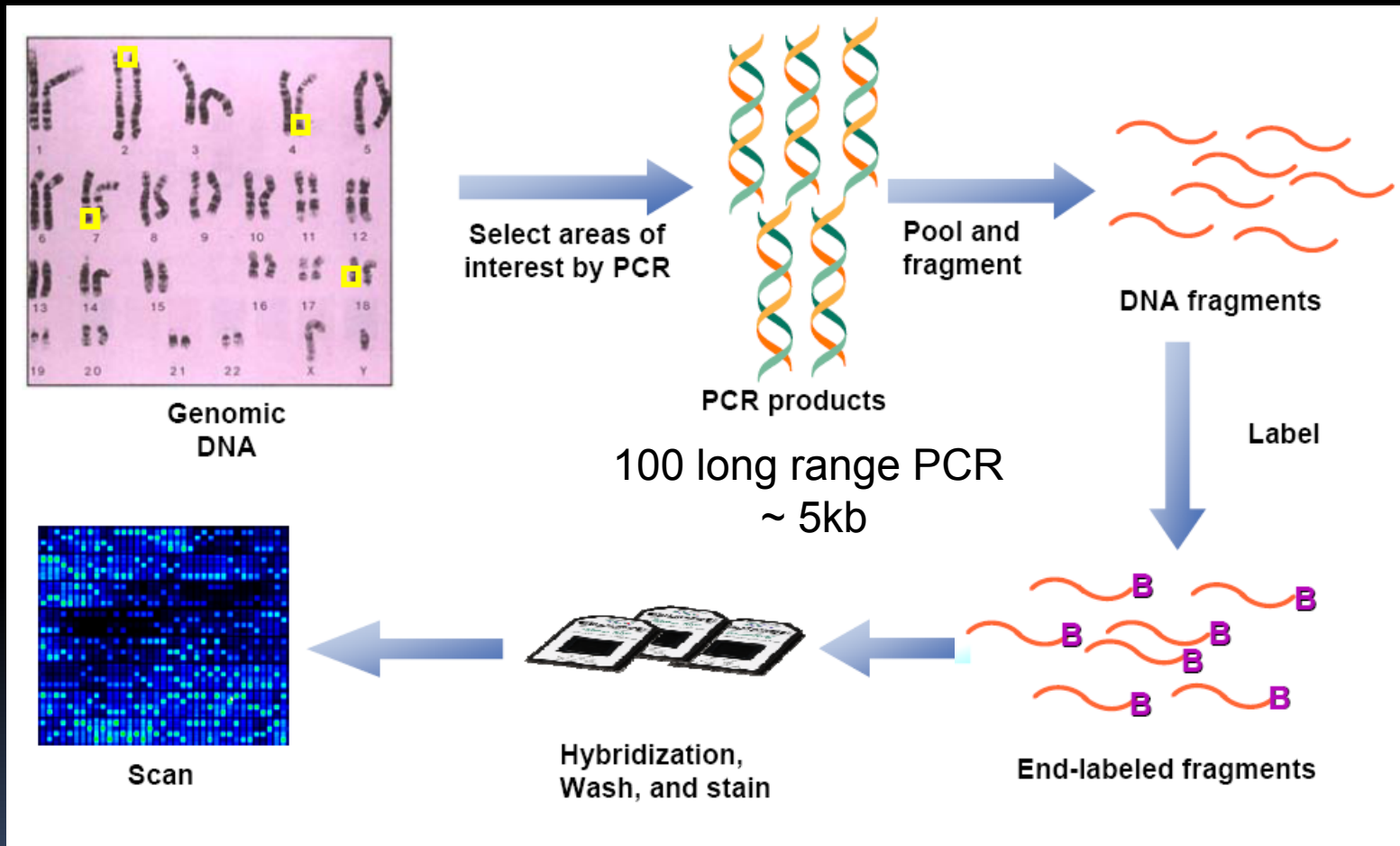
# Resekvenační čipy Affymetrix

- Sekvence mnoha kb současně

Format	49	100	<b>169</b>
Sequence Capacity	300 kb	100 kb	<b>50 kb</b>

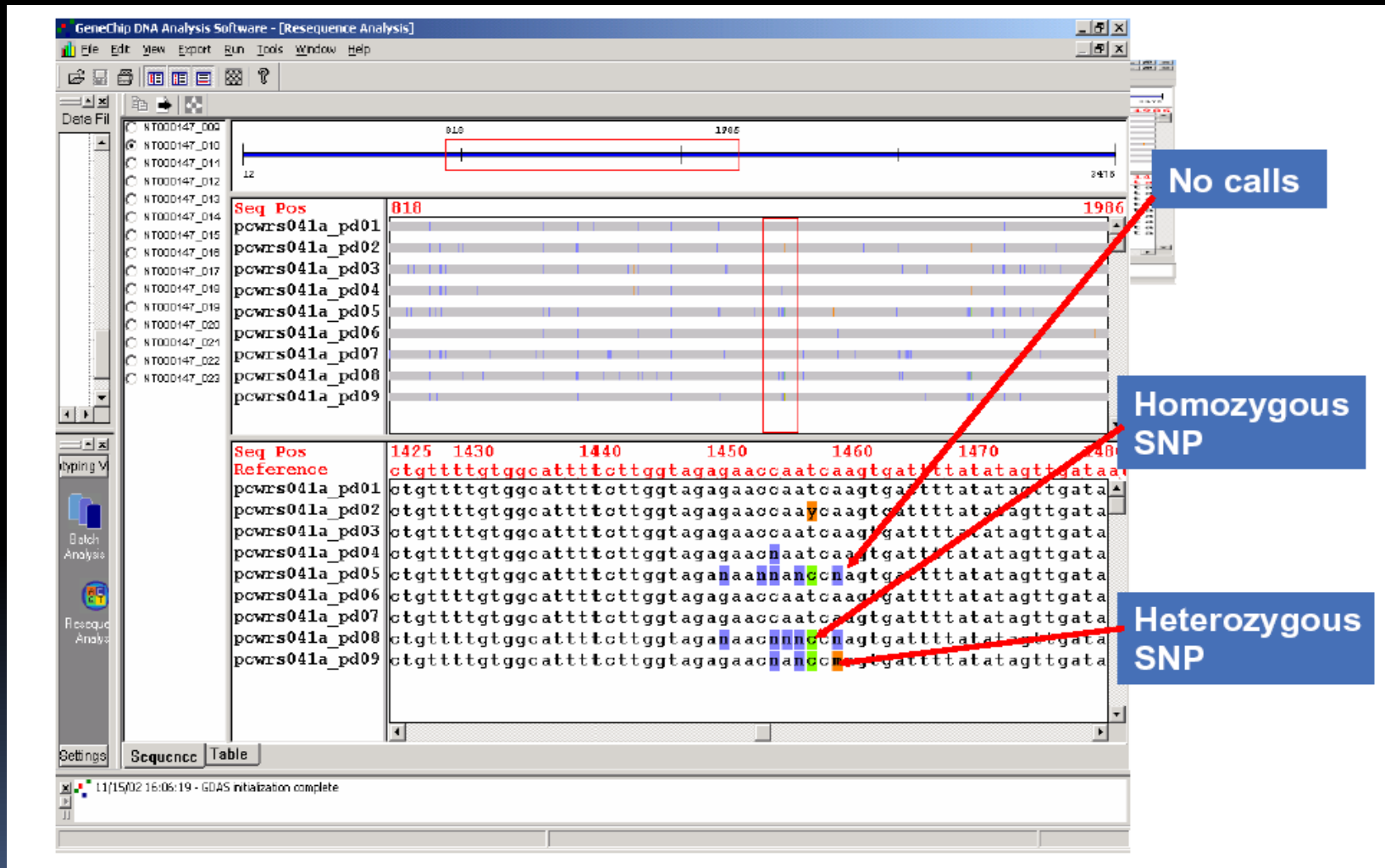
- Citlivost - 10-25% mutované DNA
- Problematické oblasti – GC bohaté, repetitivní
- Náš design - CLL specifický čip
  - 50kb
  - 8 genů (m.j. ATM – 62 exonů), 110 miRNA

# Resekvenační čipy - postup



Protokol - 3 dny

# Resekvenační čipy - výstup

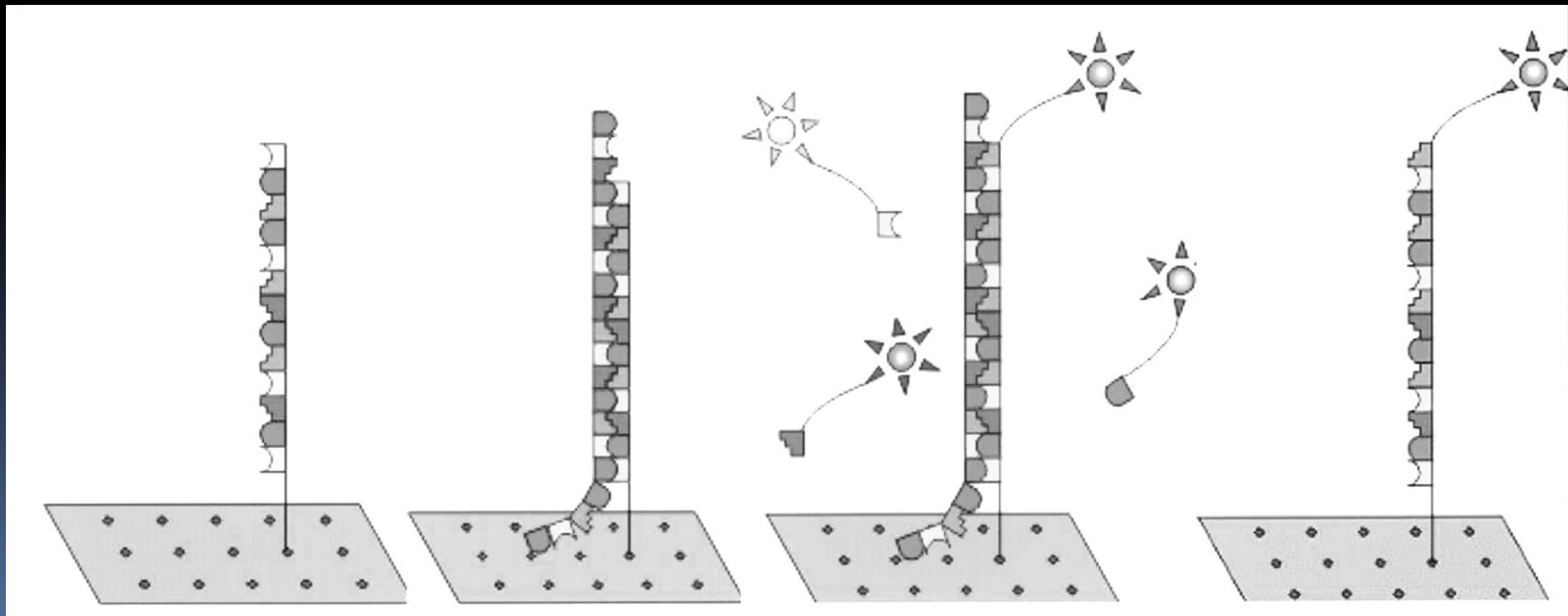


Nutné ověřit sangerovým sekvenováním

# Resekvenační čipy

- APEX

- Arrayed Primer EXtension
- 4-barevná technologie – nutné speciální vybavení
- Prodloužení sondy o jeden nukleotid komplementární ke vzorku





# Resekvenační čipy - závěr

- Paralelní sekvenace více oblastí
- Detekce mutací, na které je čip navržen
- Screeningová metodika
- Komerčně dostupné „diagnostické“ čipy
  - Roche – platforma Affymetrix
    - Cytochrom P450 – FDA approval, CE-IVD
    - P53 v testování
    - Není nutné ověřovat výsledek
    - Jen 1 gen , ale velmi rychlé, „user friendly“ (protokol max 2 dny)
  - APEX
    - Dostupné čipy pro konkrétní geny + možný vlastní design
    - Nutné ověřit sekvenací
    - Research use only