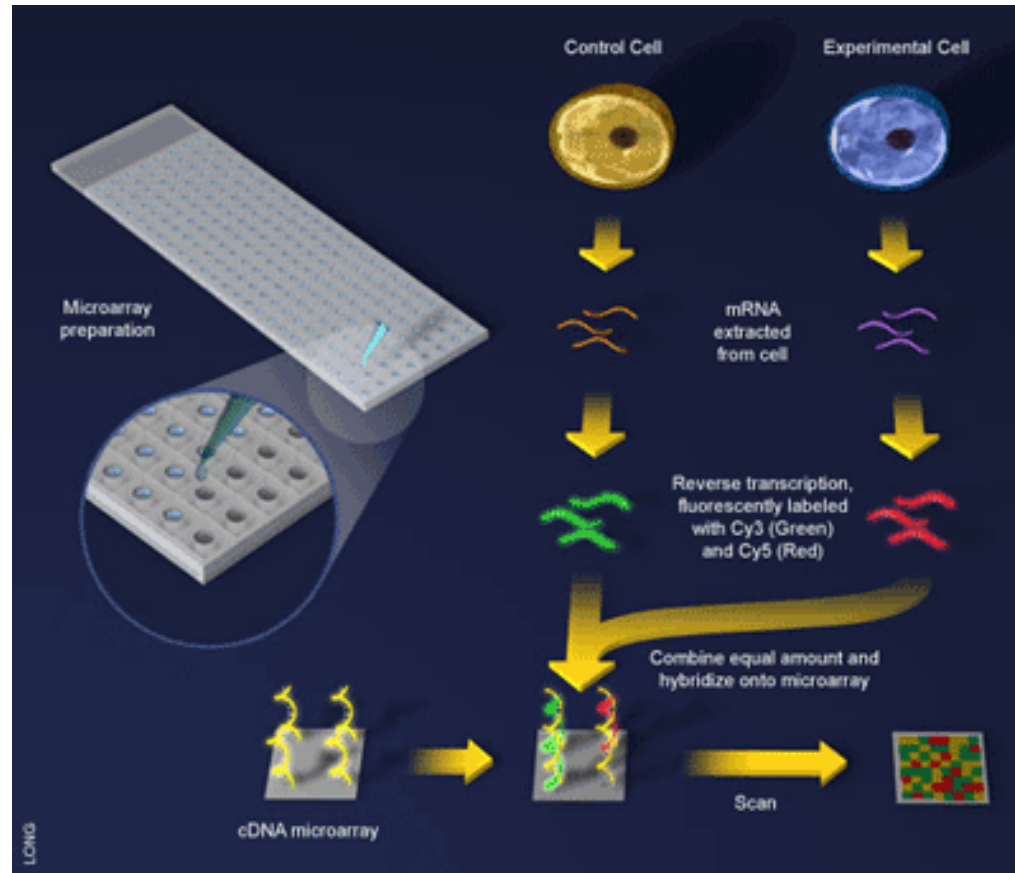
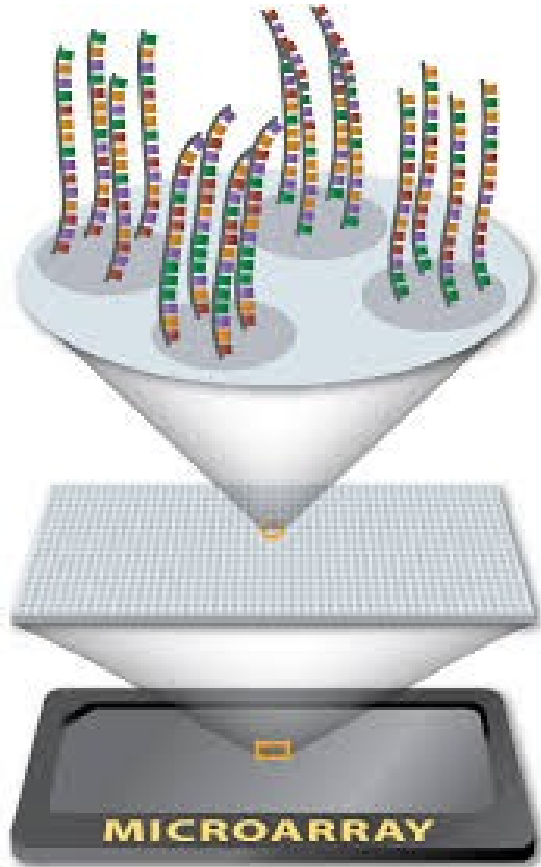


# Zhrnutie prvej časti

---

- Veľká časť rozmanitosti života vrátane ochorení sa zrejme dá obsiahnuť štúdiom **funkcie genómu a proteómu**
- V súčasnosti existujú špeciálne **vysokopokryvné metódy (high-density methods)**, ktoré umožňujú skúmať tisíce génov a proteínov v jednej vzorke a jednom experimente
- Tieto metódy produkujú **obrovské množstvá dát** a vyžadujú špecializovanú štatistickú analýzu

# Microarray



# Postup mikročipového experimentu

---

1. Výroba mikročipového sklíčka
2. Příprava vzoriek
3. Hybridizácia
4. Skenovanie
5. Analýza obrazu
6. Kvantifikácia obrázku na hodnoty expresie

# Postup mikročipového experimentu

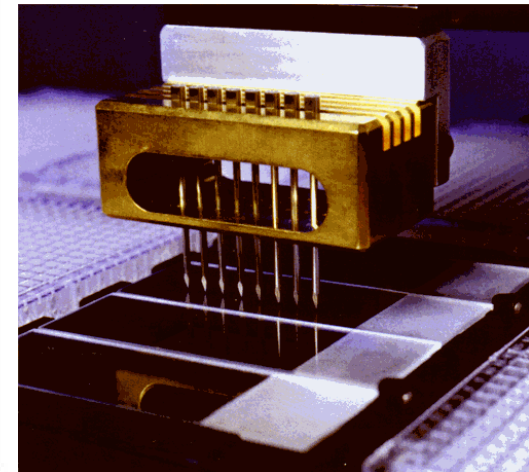
---

1. Výroba mikročipového sklíčka
2. Příprava vzoriek
3. Hybridizácia
4. Skenovanie
5. Analýza obrazu
6. Kvantifikácia obrázku na hodnoty expresie

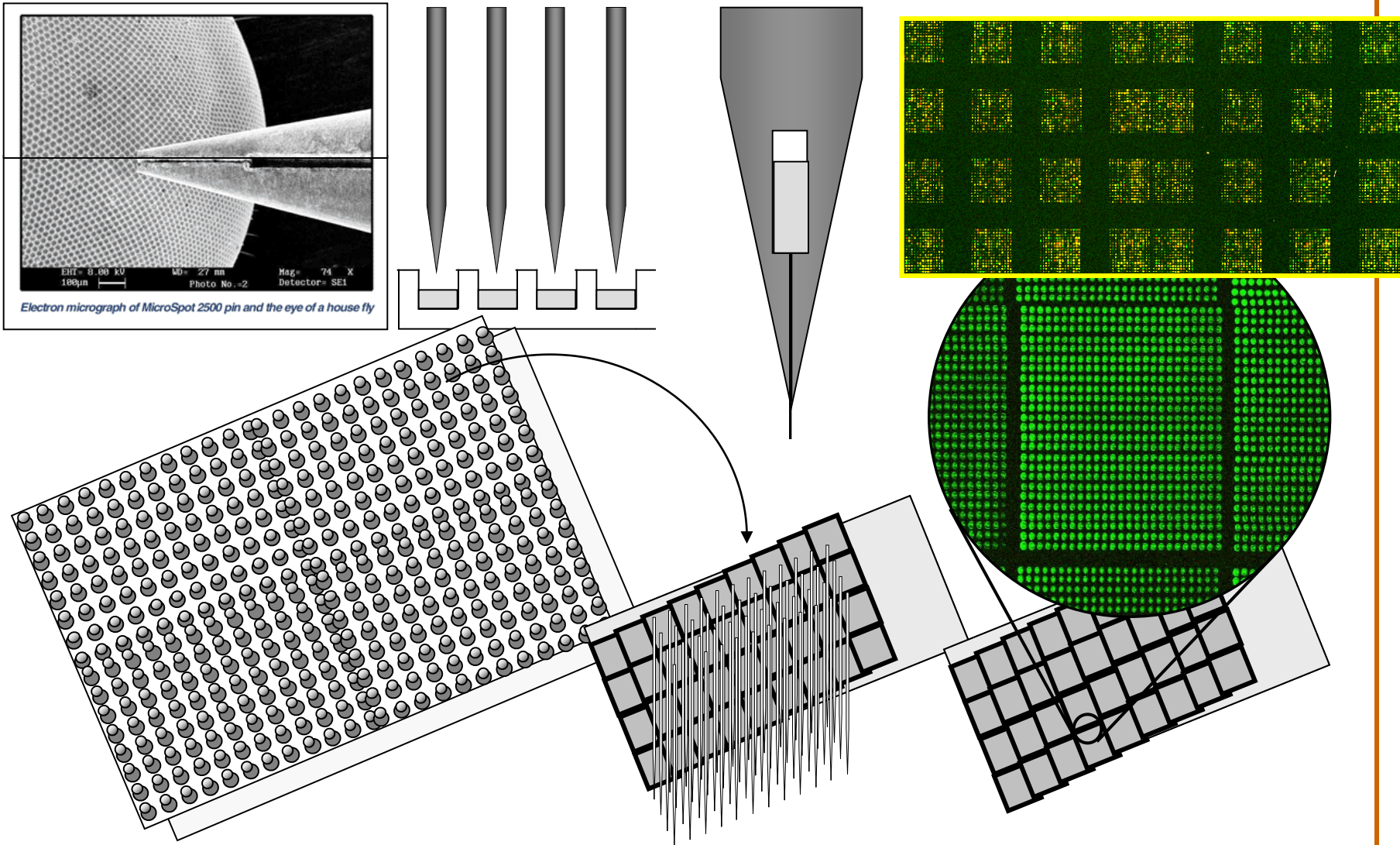
# Výroba microarray sklíčka

- Výroba sklíčka spočíva v pripojení sond na podložné sklíčko do oblastí spotov
- Dve hlavné metódy:
  - *Spotting* – sondy sú syntetizované PRED umiestnením na microarray sklíčko, potom umiestnené na sklíčko pomocou špeciálneho robota

# Spotovací robot



# Princíp spotovania



<http://www.youtube.com/watch?v=Pjr1Oyc0KrY&feature=related>

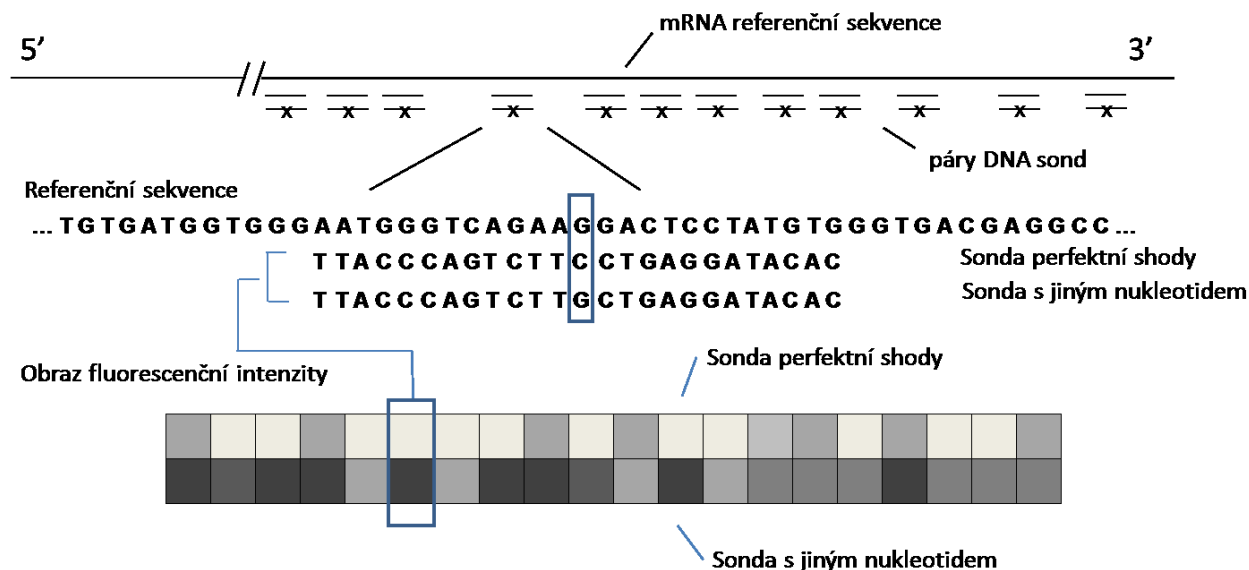
# Výroba microarray sklíčka

- Výroba sklíčka spočívá v pripojení sond na podložné sklíčko do oblastí spotov
- Dve hlavné metódy:
  - *Spotting* – sondy sú syntetizované PRED umiestnením na microarray sklíčko, potom umiestnené na sklíčko pomocou špeciálneho robota
  - *In-situ syntéza* – sondy sú syntetizované priamo na podklad, *fotolitografickou syntézou*  
<http://www.youtube.com/watch?v=ui4BOtwJEXs&feature=related>
- Spotting – u dlhších cDNA sekvencií
- In-situ syntéza – pre krátke oligonukleotidy



# Typy sond

- **cDNA sondy** - 500-5000 párov báz dlhé cDNA klony cieľového génu alebo známej sekvencie. Obvykle syntetizované pred umiestnením na microarray sklíčko pomocou spotovacieho robota
  - Výhoda: sú viac špecifické, a v prípade úspešnej hybridizácie s cieľovou DNA môžeme takmer s istotou povedať, že sa spojili práve s daným génom
- **Oligonukleotidové sondy** – najviac 25 párov báz dlhé sekvencie, ktoré sú designované tak, aby zodpovedali len častiam sekvencie známych kódujúcich génových ORF (open reading frames).



# Typy microarray sklíčok

- Podľa typu sondy rozlišujeme:

- **cDNA mikročipy** – používajú cDNA sondu

Pretože množstvo hybridizácie v týchto arrayoch je závislé na dĺžke sond, a pretože nepoznáme presné číslo exact number of klonov v každom spote, úroveň hybridizácie musí byť porovnané s nejakou referenčnou hodnotou, kontrolou. Táto relatívna informácia je robustnejšia než absolútna informácia o intenzite každého spotu. Preto tieto experimenty sú obvykle **dvojkanálové** (jeden kanál pre DNA ktorú skúmame, druhý kanál pre referenčnú DNA).

- **Oligonukleotidové mikročipy** – oligonukleotidové sondy

- obvykle syntetizované in-situ
    - nie je potrebný druhý kanál

- ...

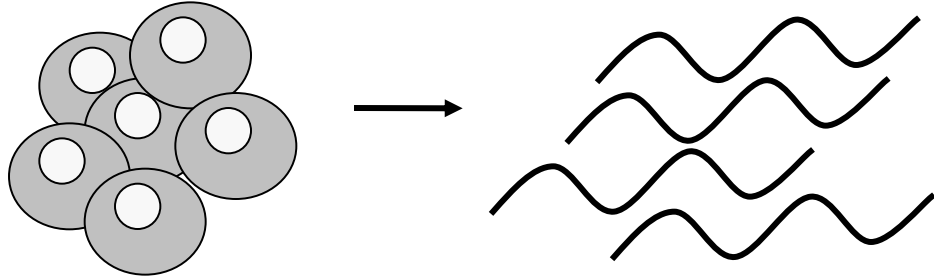
# Postup microarray experimentu

---

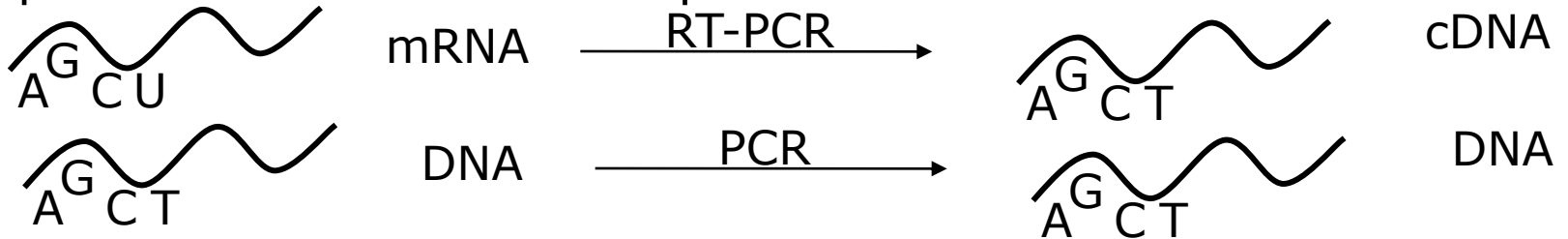
1. Výroba microarray sklíčka
2. **Príprava vzoriek**
3. Hybridizácia
4. Skenovanie
5. Analýza obrazu
6. Kvantifikácia obrázku na hodnoty expresie

# Príprava vzoriek

1. **Izolácia DNA/RNA:** molekuly ktoré chceme skúmať (DNA či mRNA) sú extrahované zo vzorky.



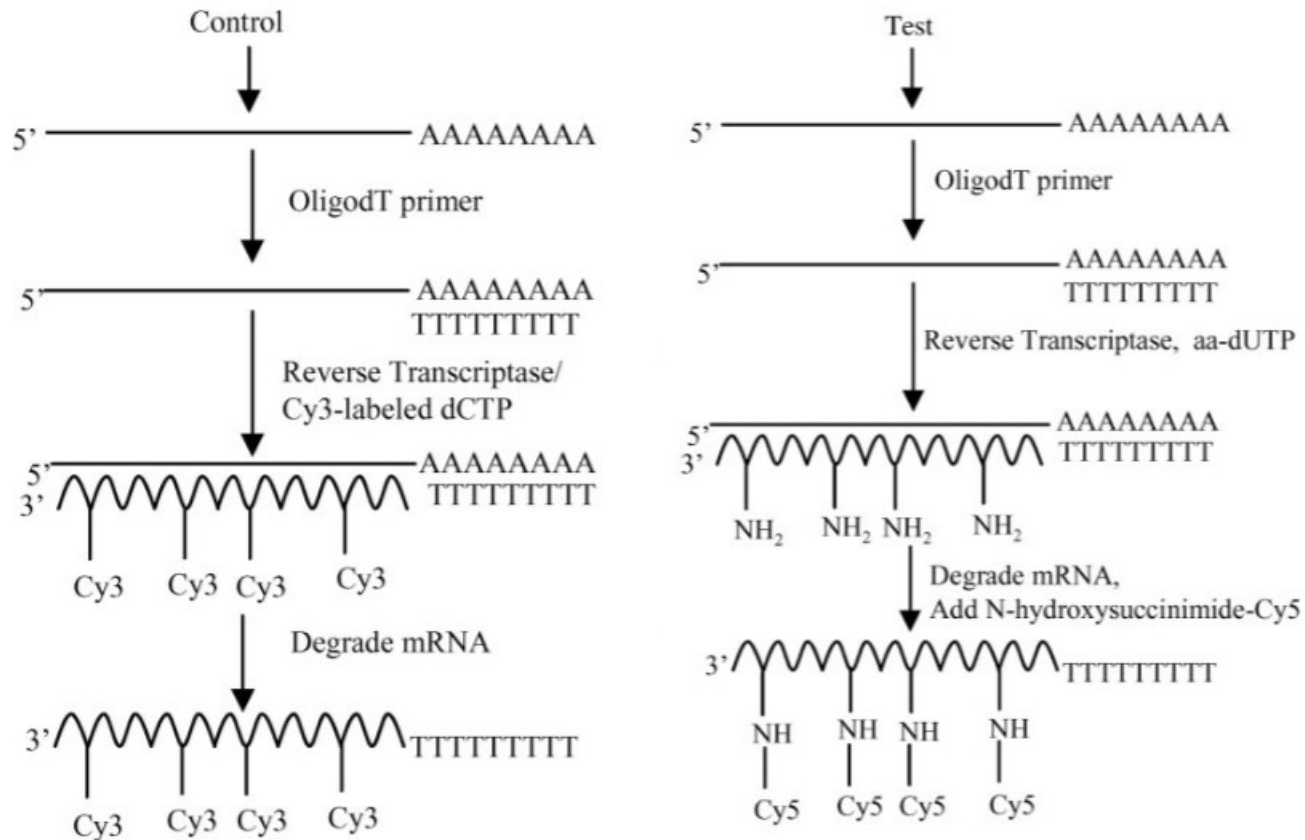
1. **Prepis a amplifikácia:** mRNA sa prepisuje do cDNA a aplikuje pomocou RT-PCR. DNA zas pomocou PCR.



1. **Značenie:** Amplifikovaná DNA (cDNA) je ofarbená fluorescenčným farbivom (najčastejšie Cy3 or Cy5). Toto sa nazýva priame označenie. U nepriameho, najprv reaktívna skupina, väčšinou primárny amín je inkorporovaná do cDNA a Cy3 / Cy5 sú potom inkorporované do cDNA v následnej reakcii.



# Značení



# Postup microarray experimentu

---

1. Výroba microarray sklíčka
2. Příprava vzoriek
3. **Hybridizácia**
4. Skenovanie
5. Analýza obrazu
6. Kvantifikácia obrázku na hodnoty expresie

# Hybridizácia I.

---

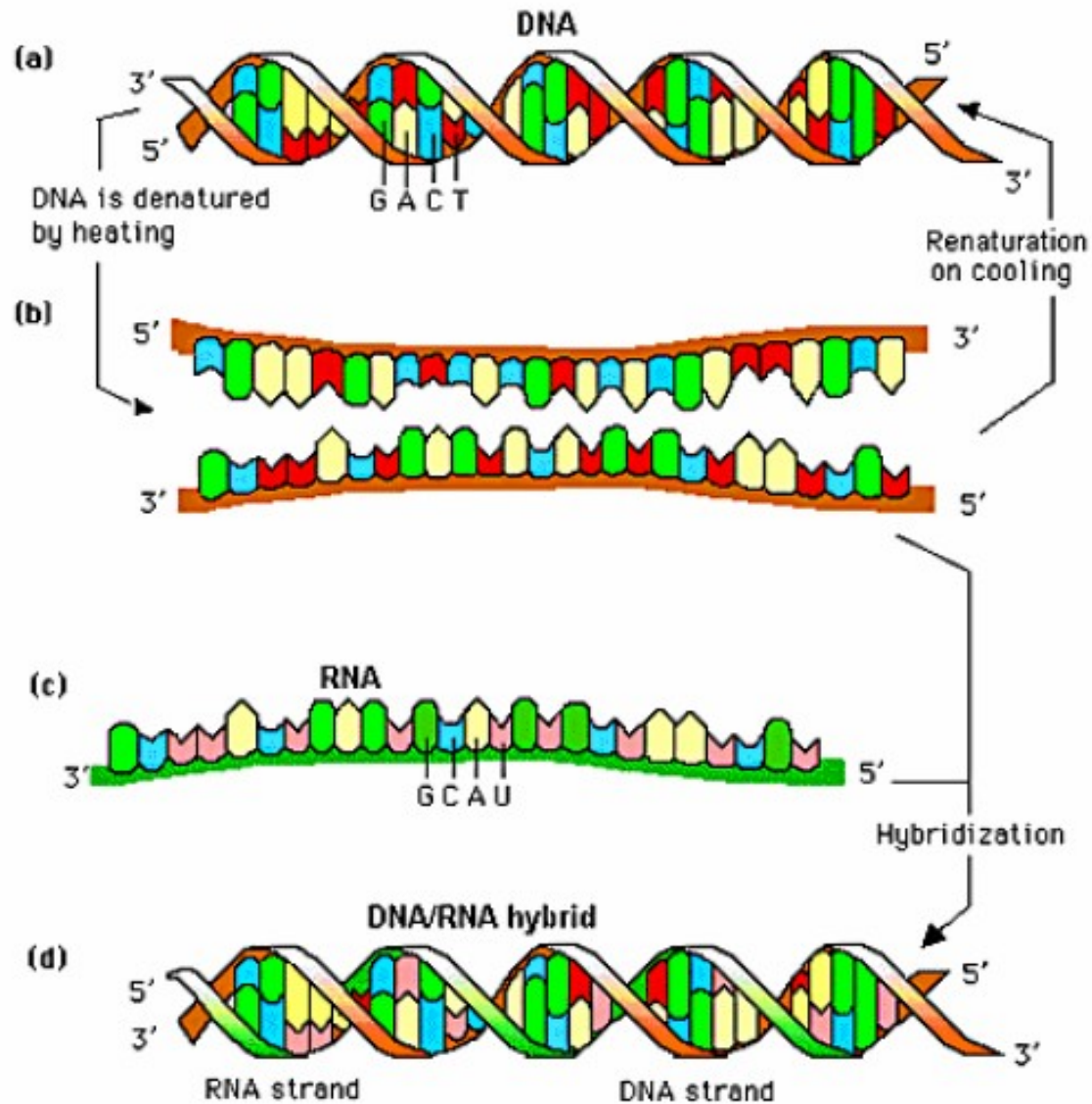
- DNA mikročipová technológia je založená hybridizácií
- **Hybridizácia** je proces komplementárneho párovania dvoch jednoreťazcových nukleových kyselín do dvojreťazcovej molekuly (duplexu) na základe párovania báz.

# Hybridizácia II.

- Princíp:
  1. Fragmentovaná a namnožená cDNA(DNA) vzorky sa vyleje na microarray sklíčko, kde sú už naviazané jednoreťazcové sondy.
  2. Zahriatím na určitú teplotu sa zrušia vodíkové väzby medzi reťazcami a DNA vzorky sa rozpletá na dva samostatné reťazce – tento proces nazývame **denaturácia**
  3. Teplota sa zas zníži a jednoreťazcové molekuly sa snažia znovu spárovať so svojimi komplementárnymi reťazcami
  4. Nastáva komplementárne párovanie medzi:
    - pôvodným párom DNA reťazcov
    - DNA a sondou – vzniká **hybrid**



# Hybridizácia III.



# Kapitola II.1.1

---

## Vznik a charakter dát -> cDNA mikročipy

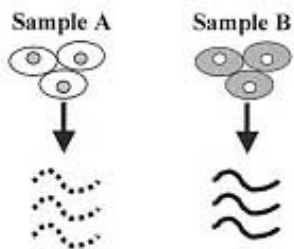
# Postup microarray experimentu

---

1. Výroba microarray sklíčka
2. Příprava vzoriek
3. Hybridizácia
4. Skenovanie
5. Analýza obrazu
6. Kvantifikácia obrázku na hodnoty expresie

# Ako získavame základné dáta z cDNA

## A. RNA Isolation

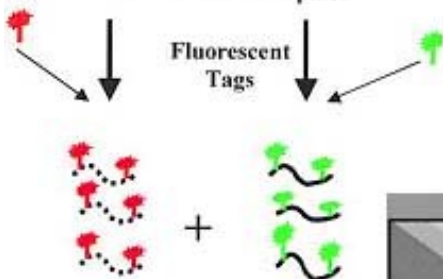


## B. cDNA Generation

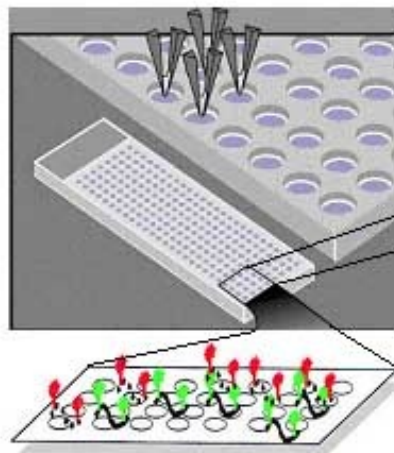
## C. Labeling of Probe

Reverse Transcriptase

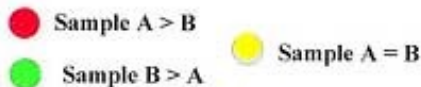
Fluorescent  
Tags



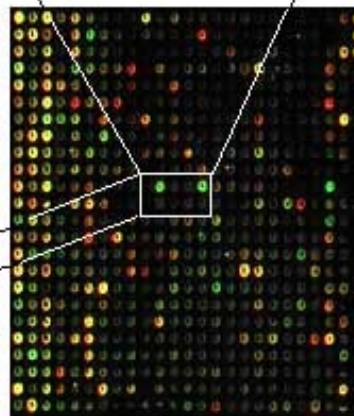
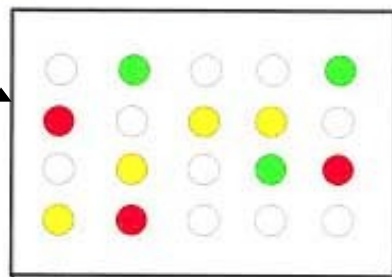
## D. Hybridization to Array



## E. Imaging



spot



## F. Analýza obrazu (snímanie intenzít jednotlivých kanálov)

### Dátový súbor:

tisíce riadkov (génov)  
X desiatky stĺpcov

- číselné hodnoty intenzít testovanej a referenčnej RNA (+ hodnoty pozadí...)
- kontrola kvality spotov
- ...

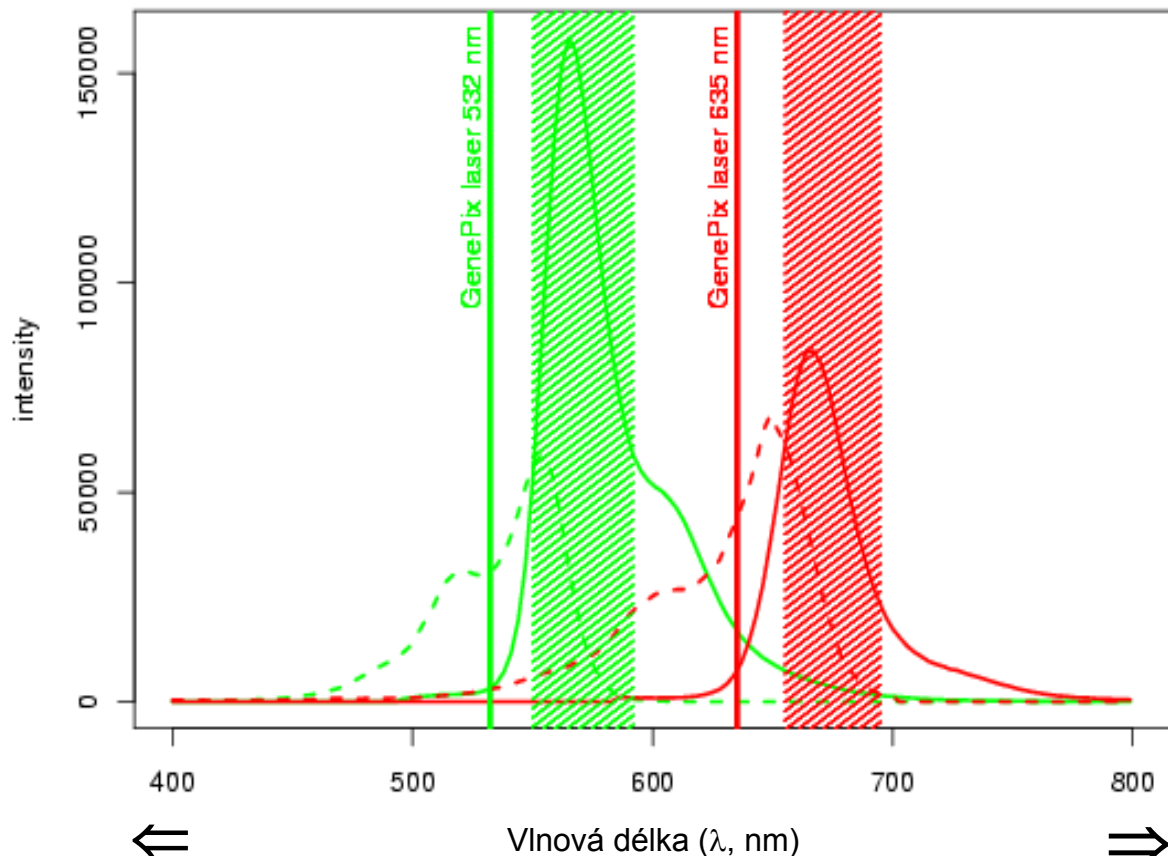
### Ďalšia analýza

1. úpravy datového súboru
2. určenie odlišných génov
3. klasifikácia, predikcia....

# Dvojkanálové skenovanie

Po hybridizácii vkladáme sklíčko do skeneru aby sme vytvorili obrázok microarray sklíčka.

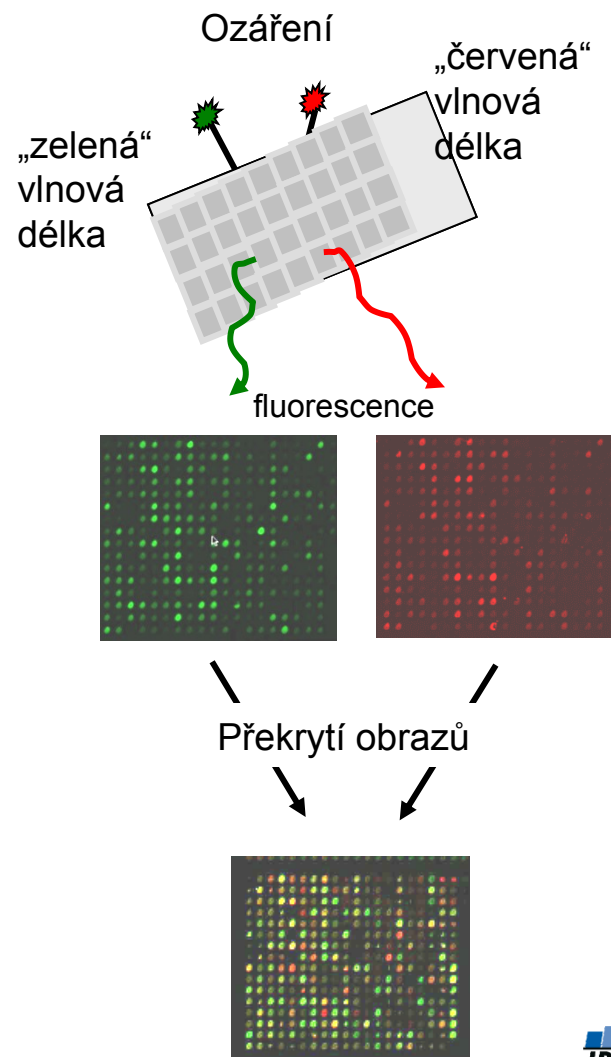
Excitační a emisní spektra Cy3 a Cy5



Vyšší frekvence,  
více energie



Nižší frekvence,  
méně energie



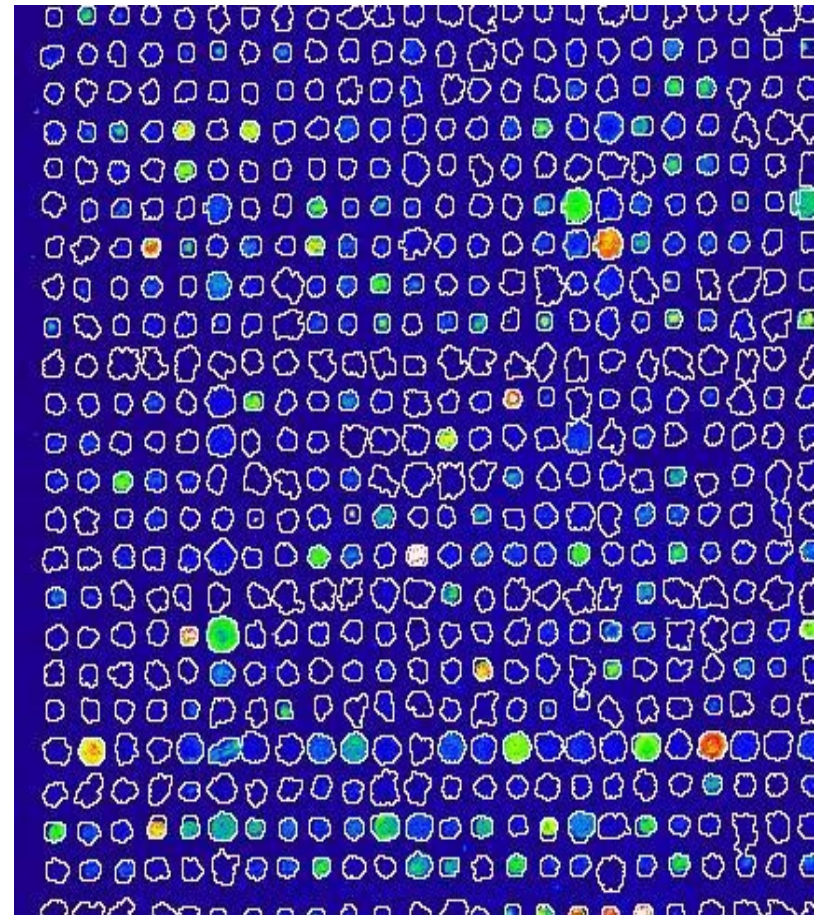


# Analýza obrazu

Po skenovaní sa uloží obrázok microarray sklíčka vo formáte .tiff, ktorý sa vloží do programu pre analýzu obrazu. Nasleduje kvantifikácia signálu.

Kroky kvantifikácie:

1. Lokalizácia centier spotov  
Automaticky pomocou *grid* (sieťky), a manuálnou úpravou
2. Segmentácia  
Klasifikácia spotov, odlíšenie intenzity pozadia od popredia (pomocou kruhov, etc...).
3. Kvantifikácia signálu  
V popredí i v pozadí spotu

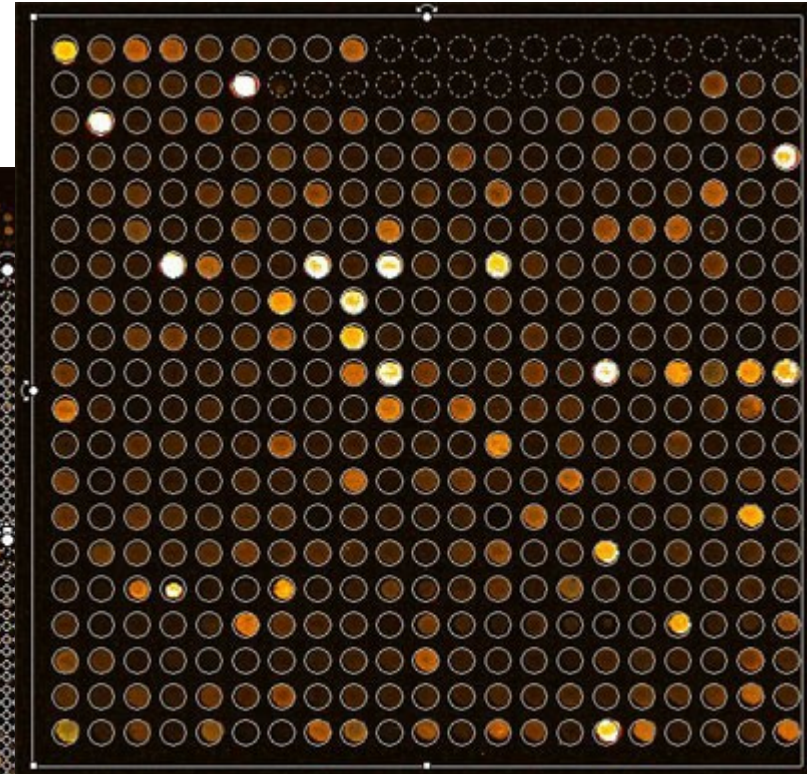
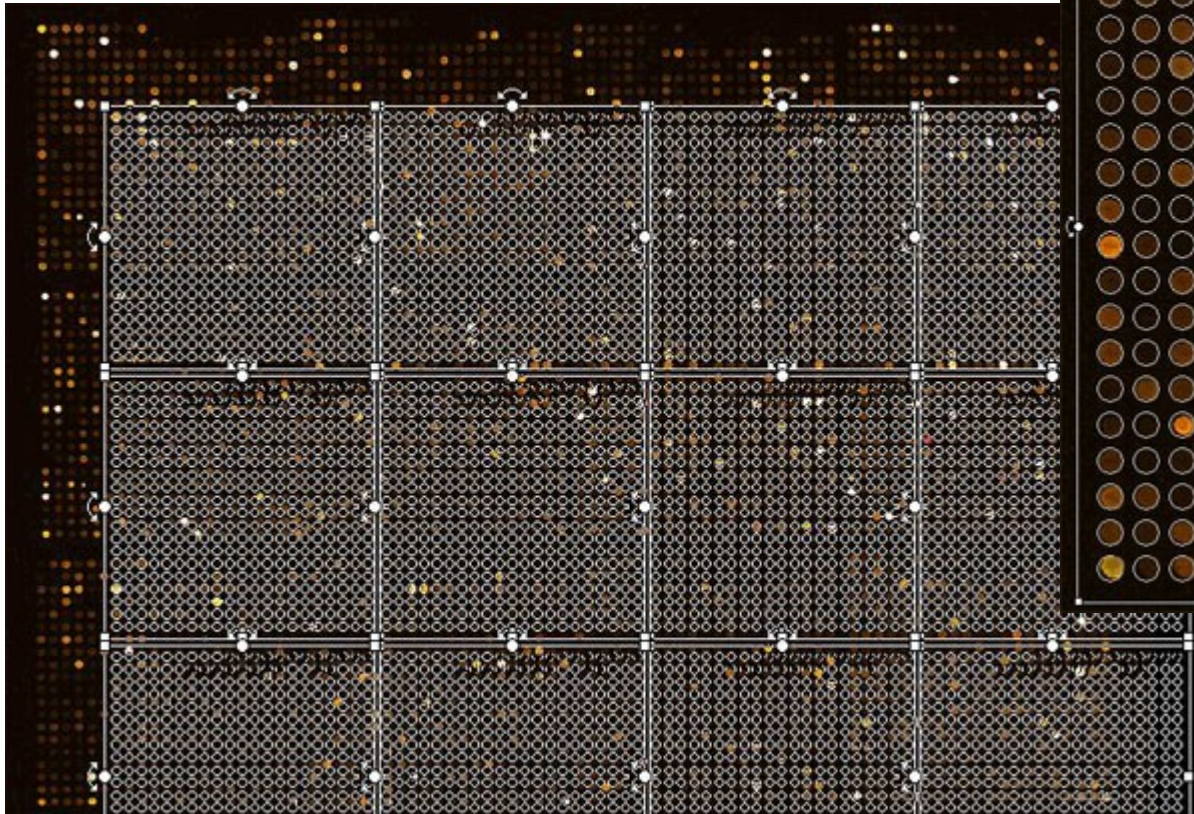




# Lokalizácia centier spotov

Automaticky pomocou špeciálneho súboru *grid* (od výrobcu mikročipu), ktorý obsahuje info o:

- Počte a umiestnení spotov na mikročipe
- Priemere spotu v pixeloch



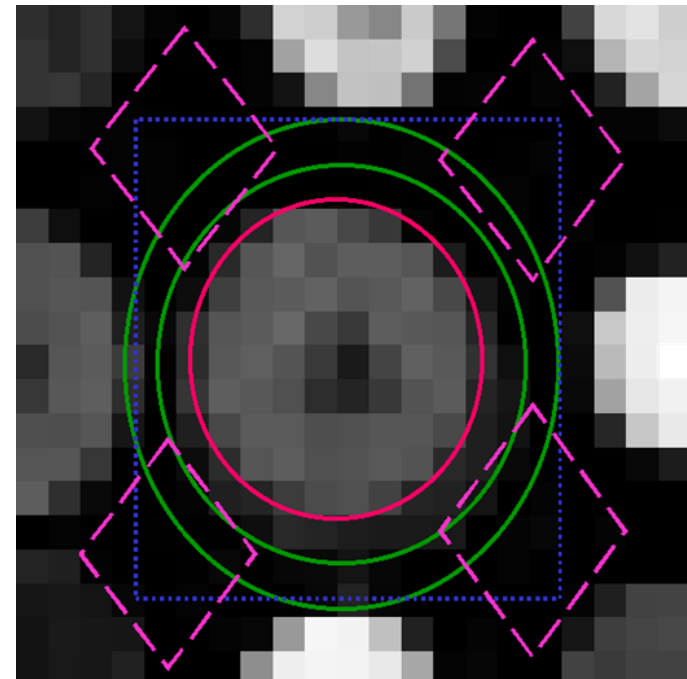
# Segmentácia

- V tomto kroku sú programom pre analýzu obrazu rozpoznávané oblasti **spotov** a **pozadia**
- Nastavenie veľkosti a pozície spotov – automaticky
- Obvykle nutná vizuálna inšpekcia a ďalšie prispôsobenia ručne
- Navyše – manuálne označovanie zlých, prípadne prázdnych spotov
- Algoritmy vyhľadávania spotov:
  - Fixed circles
  - Adaptive circles
  - Histogram adaptive
- Rôzne programy rôzne definujú pozadie spotu

GenePix

QuantArray

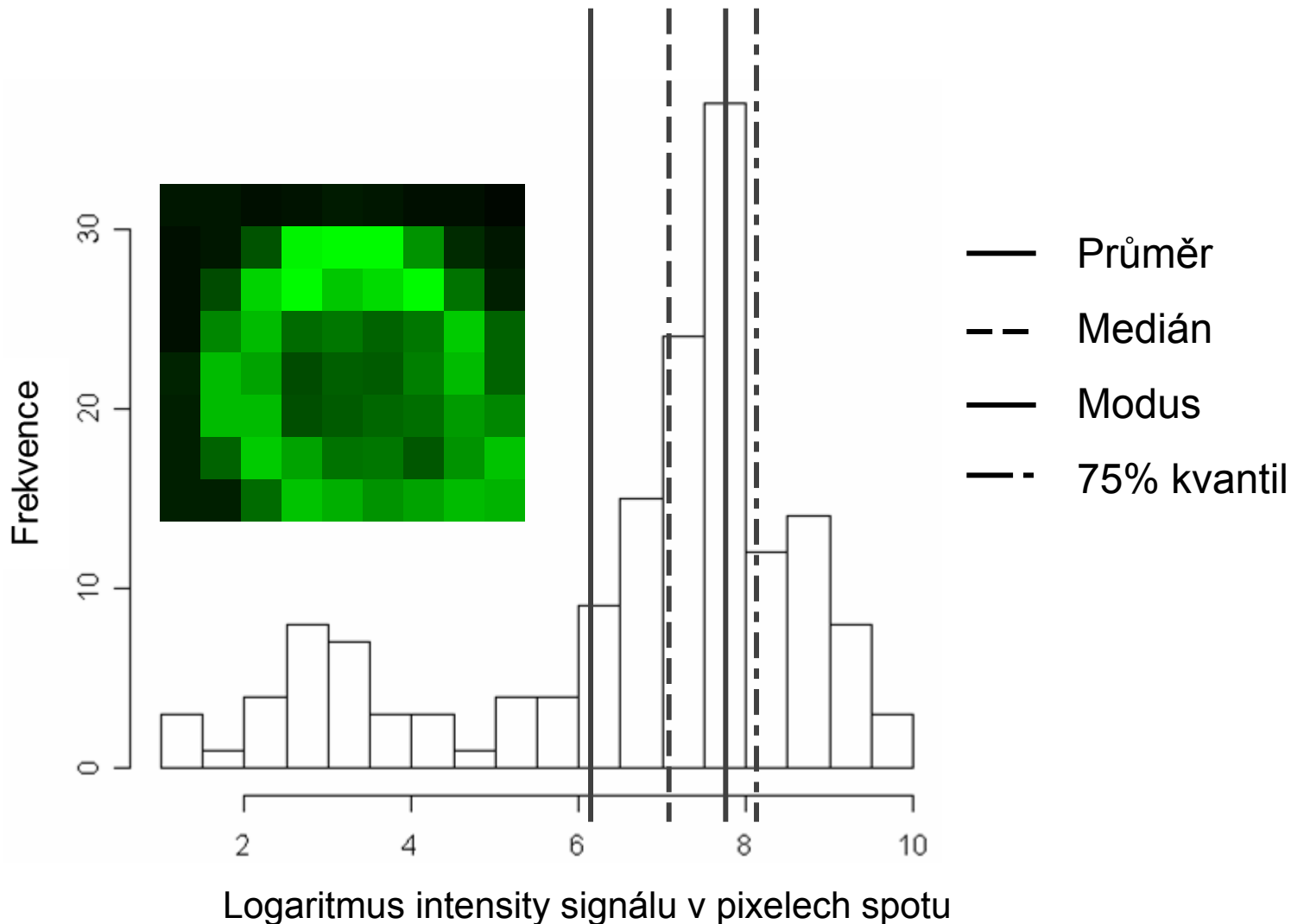
ScanAlyse





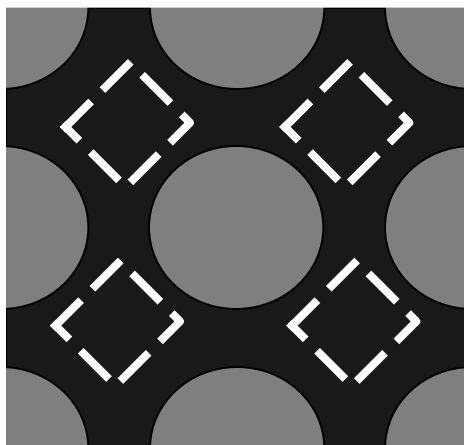
# Kvantifikácia signálu

- V tejto fáze sa kvantifikuje signál spotu, používajú sa rôzne charakteristiky (priemer, medián, modus, kvantily)

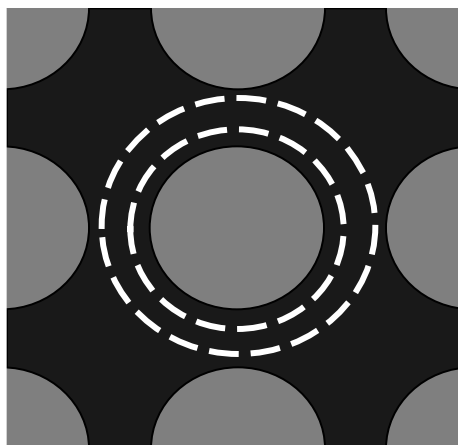


# Kvantifikácia signálu pozadia

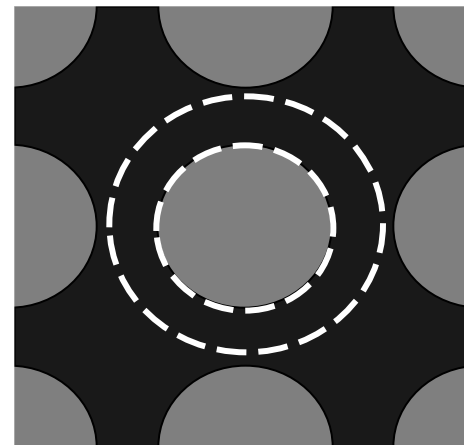
- Tri druhy metód:
  1. **Lokálna metóda (local background)**
  2. Morfológické otvorenie (morphological opening)
  3. Konštantná/globálna metóda (constant/global background)



GenePix



QuantArray

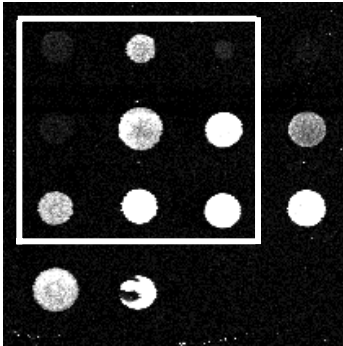


ScanAlyse

Vizualizácia oblastí lokálneho odhadu intenzity pozadia u troch rôznych programov analýzy obrazu cDNA mikročipu

# Kvantifikácia signálu pozadia 2.

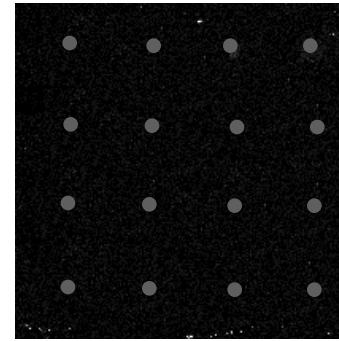
- Tri druhy metód:
  1. Lokálna metóda (local background)
  - 2. Morfológické otvorenie (morphological opening)**
  3. Konštantná/globálna metóda (constant/global background)



Štvorcový element



Nový obraz  
s odhadnutým  
signálom pozadia



Schematické znázornenie  
Centier spotov, z ktorých  
je odhadnutý  
signál pozadia pre spot

# Kvantifikácia signálu pozadia 3.

- Tri druhy metód:
  1. Lokálna metóda (local background)
  2. Morfológické otvorenie (morphological opening)
  3. **Konštantná/globálna metóda (constant/global background)**

Signál je odhadnutý ako jediná hodnota pre všetky spoty:

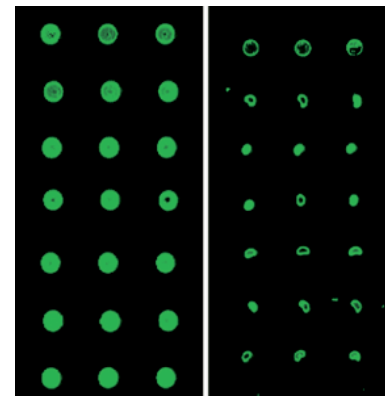
- priemer intenzít signálov negatívnych kontrol (sondy iného organizmu, ktoré by nemali hybridizovať so vzorkou)
- 3% rozdelenia signálu všetkých spotov

# Kontrola kvality spotov I.

- Počas kvantifikácie intenzít prebieha ešte inšpekcia kvality spotov na základe parametrov zadaných do algoritmu
- Aj po kvantifikácii je možné manuálne označiť spoty ktoré považujeme za nekvalitné
- Spotom, ktoré neprejdú kontrolou kvality je priradená príslušná hodnota v premennej Flags:
- Napr.
  - 100 ~ good ;
  - -100 ~ bad ;
  - -75 ~ absent;
  - -50 ~ not found;
  - 0 ~ unflagged;

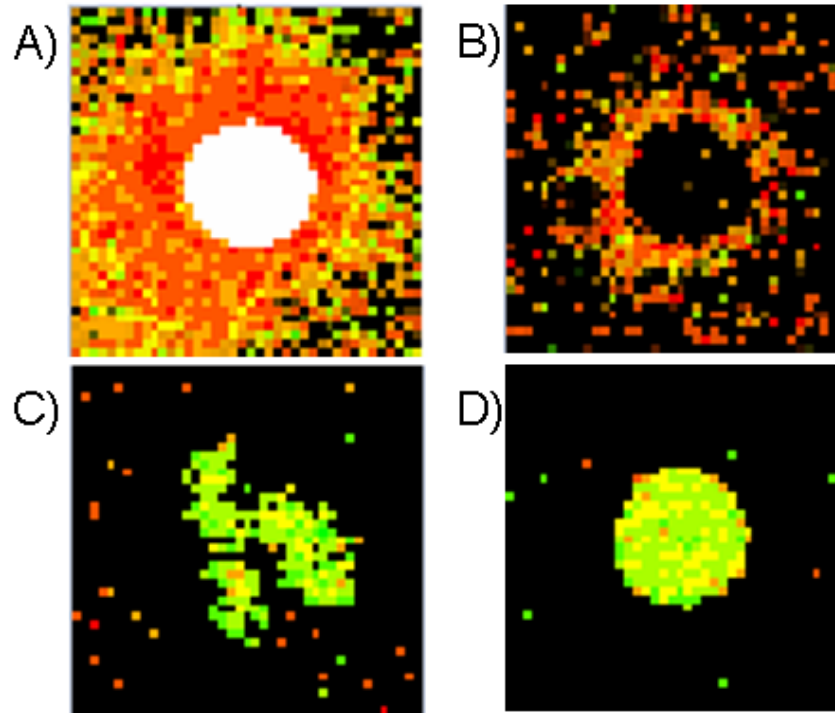
# Kontrola kvality spotov II.

- Charakteristiky kontroly kvality:
- **Veľkosť a tvar spotu**
  - Príliš malé spoty neposkytujú vierohodné odhady intenzity hybridizácie (Simon et al., 2003) (spoty menšie než  $< 25$  pixelov by mali byť odstránené)
  - Spoty s nepravidelným tvarom, prípadne "koblihové spoty" by mali byť označené ako nekvalitné
- **Intenzita signálu**
  - Spoty s príliš malou intenzitou signálu v oboch kanáloch
    - $\log_2(610/590) = 0.048$ , ale  $\log_2(30/10) = 1.58$
  - Pomer signál/šum by mal byť dosatočne veľký
- **Saturácia spotu**
  - Spoty by nemali obsahovať saturované pixely!



# Kontrola kvality spotov III.

- Príklad nekvalitných spotov:



- A) saturevaný spot, B) koblihový spot, C) spot s nepravidelnou štruktúrou, D) dobrý spot

# Ukážka základných cDNA microarray dát

Po kvantifikácii a kontrole získavame základný dátový súbor.

- Dáta z jedného cDNA microarray sklíčka

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Unique position	ID	Chromosome	Mb positio	SES end	Plate info	Block	Column	Row	Name	X	Y	Dia.
2	44	RP11-195a8	1	37581779	37726637	NK12C1	26	11	19	44	8600	35890	140
3	44	RP11-195a8	1	37581779	37726637	NK12C1	26	10	19	44	8370	35890	140
4	44	RP11-195a8	1	37581779	37726637	NK12C1	26	12	19	44	8820	35890	140
5	102	RP11-124d4	1	87374825	87558032	NK12B12	4	7	19	102	16600	8970	120
6	102	RP11-124d4	1	87374825	87558032	NK12B12	4	9	19	102	17060	8970	130
7	102	RP11-124d4	1	87374825	87558032	NK12B12	4	8	19	102	16830	8970	120
8	154	RP11-145H4	1	1.52E+08	1.52E+08	NK12G5	26	11	20	154	8600	36110	150
9	154	RP11-145H4	1	1.52E+08	1.52E+08	NK12G5	26	13	20	154	9040	36110	140
10	154	RP11-145H4	1	1.52E+08	1.52E+08	NK12G5	26	12	20	154	8820	36110	150
11	187	RP11-1122M	1	1.83E+08	1.83E+08	NK12F10	20	7	20	187	16690	27120	130
12	187	RP11-1122M	1	1.83E+08	1.83E+08	NK12F10	20	6	20	187	16460	27120	130
13	187	RP11-1122M	1	1.83E+08	1.83E+08	NK12F10	20	5	20	187	16240	27120	130
14	196	RP11-66B	1	1.89E+08	1.9E+08	NK12C2	18	10	19	196	8330	26880	130
15	196	RP11-66B	1	1.89E+08	1.9E+08	NK12C2	18	11	19	196	8560	26880	130
16	196	RP11-66B	1	1.89E+08	1.9E+08	NK12C2	18	12	19	196	8780	26880	130
17	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	10	19	236	8330	17960	140
18	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	10	19	236	8330	17960	140
19	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	12	19	236	8780	17960	150
20	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	12	19	236	8780	17960	150
21	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	11	19	236	8550	17960	140
22	236	RP11-845b6	1	2.27E+08	2.27E+08	NK12C3	10	11	19	236	8550	17960	140
23	320	RP11-1084a2	2	47485695	47697380	NK11F10	24	7	20	320	16660	31610	130
24	320	RP11-1084a2	2	47485695	47697380	NK11F10	24	6	20	320	16440	31610	130
25	320	RP11-1084a2	2	47485695	47697380	NK11F10	24	5	20	320	16220	31610	130
26	323	RP11-460n15	2	47854784	48034160	NK12H8	4	12	20	323	17720	9190	130
27	323	RP11-460n15	2	47854784	48034160	NK12H8	4	11	20	323	17500	9190	130
28	323	RP11-460n15	2	47854784	48034160	NK12H8	4	13	20	323	17940	9190	130
29	324	RP11-3g11	2	47946940	48102089	NK12H7	12	11	20	324	17540	18150	130
30	324	RP11-3g11	2	47946940	48102089	NK12H7	12	12	20	324	17760	18160	140
31	324	RP11-3g11	2	47946940	48102089	NK12H7	12	13	20	324	17990	18160	140
32	361	RP11-232j18	2	71372264	71537932	NK11F4	8	20	19	361	19530	13430	130
33	361	RP11-232j18	2	71372264	71537932	NK11F4	8	1	20	361	15250	13660	130
34	361	RP11-232j18	2	71372264	71537932	NK11F4	8	19	19	361	19290	13430	130



# Základný dátový súbor

Obsahuje (príklad GenePix 6.0)

- Pozíciu spotu
- Meno a ďalšie identifikátory sondy na spote
- Ďalšie charakteristiky spotu: (priemer, tvar, cirkularita, saturácia, ...)
- Informácie o intenzite signálu pozadia, popredia (medián, priemer, suma, SD)
- Počet saturovaných pixelov
- Odvodené charakteristiky
  - i) % pixelov signálu s intenzitami väčšími než 1SD (2SD) intenzity pozadia
  - ii) intenzita signálu mínus intenzita pozadia
  - iii) pomer mediánov/priemerov oboch kanálov
  - iv) logaritmus bázy 2 tohoto pomeru
- Informácie o kvalite spotu
- Premennú Flags

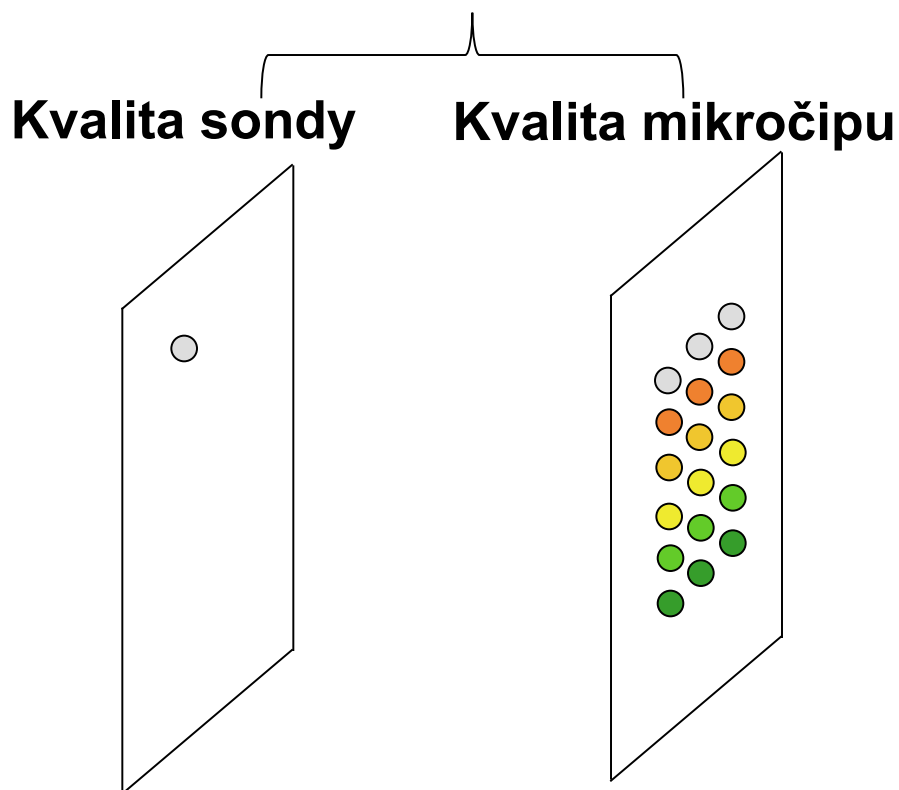
# Základné dáta

- Dáta v základnom súbore **NIE SÚ** koncentrácie mRNA!
- Hodnoty získané z microarray experimentu sú pozitívne korelované s množstvom prítomnej mRNA, ale navyše v sebe nesú **ŠUM**, súvisiaci s:
  - Kontamináciou tkaniva
  - RNA degradáciou
  - Efektivitou
    - amplifikácie DNA
    - reverznej transkripcie
    - hybridizácie a špecificitou sond
  - Výberom a identifikáciou sond
  - PCR výsledkom
  - Efektivitou spotovania
  - Ďalšími technickými vplyvmi pri spracovaní
  - Segmentáciou obrazu
  - Kvantifikáciou signálu
  - Korekciou na pozadie

**NUTNÁ KONTROLA KVALITY A ÚPRAVA DÁT**

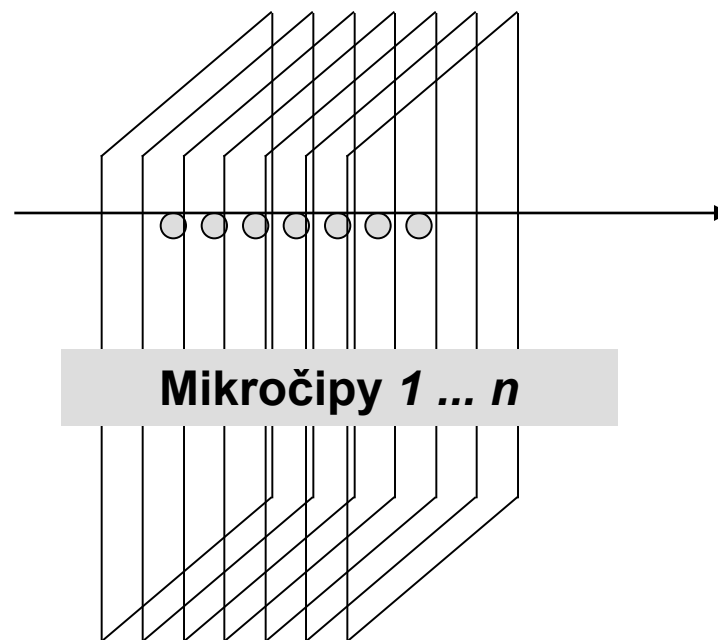
# Úrovně kontroly kvality

## Úroveň mikročipu (základní datová matice)



## Úroveň experimentu (finální datová matice)

### Kvalita experimentu



**Úroveň sondy:** Kvalita jednoho spotu na mikročipe

**Úroveň mikročipu:** Kvalita celého mikročipu

**Úroveň experimentu:** Kvalita měření transkriptů všech mikročipů v experimentu

# Úrovně úprav datových souborů

## Úroveň mikročipu (základní datová matice)

Kvalita sondy

Kvalita mikročipu

Odstránění  
nekvalitných spotov

Sumarizácia  
duplikátov

Normalizácia  
v rámci  
mikročipu

## Úroveň experimentu (finální datová matice)

Kvalita experimentu

Normalizácia  
medzi  
mikročipmi

mikročipy I ... II

**Úroveň sondy:** Kvalita jedného spotu na mikročipe

**Úroveň mikročipu:** Kvalita celého mikročipu

**Úroveň experimentu:** Kvalita měření transkriptů všech mikročipů v experimentu

# Úrovně úprav datových souborů

## Úroveň mikročipu (základní datová matice)

Kvalita sondy

Kvalita mikročipu

Odstránění  
nekvalitných spotov

Sumarizácia  
duplikátov

Normalizácia  
v rámci  
mikročipu

## Úroveň experimentu (finální datová matice)

Kvalita experimentu

Normalizácia  
medzi  
mikročipmi

**mikročipy I ... II**

**Úroveň sondy:** Kvalita jedného spotu na mikročipe

**Úroveň mikročipu:** Kvalita celého mikročipu

**Úroveň experimentu:** Kvalita měření transkriptů všech mikročipů v experimentu

# Kontrola dát v rámci microarray sklíčka

## ■ Replikáty sond

- Sumárne štatistiky replikátov spotov (nekvalitné spoty už vylúčené)

clone	Replicate			mean	median	SD	No. of non-flagged replicates
	1	2	3				
A_23_P347643	-0.186	-0.265	-0.313	-0.254	-0.265	0.052	3
A_23_P60243	0.523	flagged	flagged	0.523	0.523	0	1
A_23_P116057	0.039	-0.978	flagged	-0.495	-0.495	0.5	2
A_23_P203743	-0.614	0.537	1.589	0.504	0.537	0.899	3

- Buď vyhodit' sondy s príliš veľkou variabilitou medzi replikátmi...
- ...alebo si uschovať informáciu o počte validných replikátov (a vyhodit' klony len s jedným replikátom)

## ■ Kvalita microarray sklíčka

- Percento nekvalitných spotov nesmie byť príliš veľké (<25 %)

## ■ Systematické odchýlky odstránime procesom NORMALIZÁCIE

# Úrovně úprav datových souborů

## Úroveň mikročipu (základní datová matice)

Kvalita sondy

Kvalita mikročipu

Odstránění  
nekvalitných spotov

Sumarizácia  
duplikátov

Normalizácia  
v rámci  
mikročipu

## Úroveň experimentu (finální datová matice)

Kvalita experimentu

Normalizácia  
medzi  
mikročipmi

mikročipy I ... II

**Úroveň sondy:** Kvalita jedného spotu na mikročipe

**Úroveň mikročipu:** Kvalita celého mikročipu

**Úroveň experimentu:** Kvalita měření transkriptů všech mikročipů v experimentu

# Systematické odchýlky v rámci microarray sklíčka

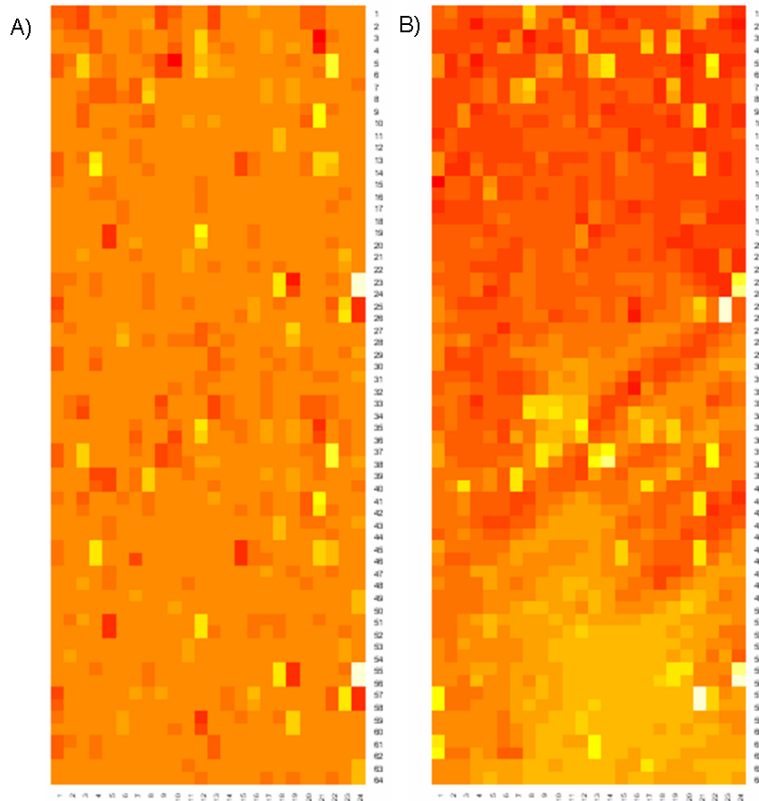
- **Nerovnomerná hybridizácia** (priestorové odchýlky)
  - Príčina: nerovnomerne umytý čip, nerovnomerne distribuovaná vzorka, print-tip efekt (defektná ihla)
- **Signál pozadia**
  - Môže byť veľmi silný, buď zle umytý čip, alebo zlá segmentácia (časť popredia je kvantifikovaná ako pozadie)
- **Efekt farbiva (rozdiely intenzít medzi kanálmi)**
  - Príčina: odlišná schopnosť inkorporácie molekúl farbiva (Cy3, Cy5)  
odlišná reakcia na excitáciu (slabšia intenzita UV, ...)

**ODHAĽUJEME GRAFICKOU REPREZENTÁCIOU**

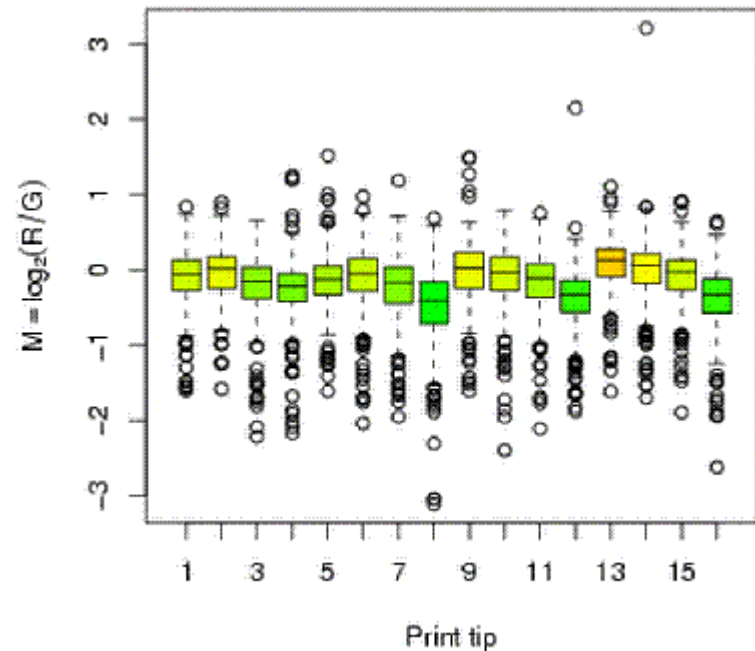


# Diagnostika nerovnomernej hybridizácie

Virtuálna rekonštrukcia microarray sklíčka, vykreslenie **heatmapy**  $\log_2$  pomeru **Cy5/Cy3** intenzít na základe ich pozície na sklíčku



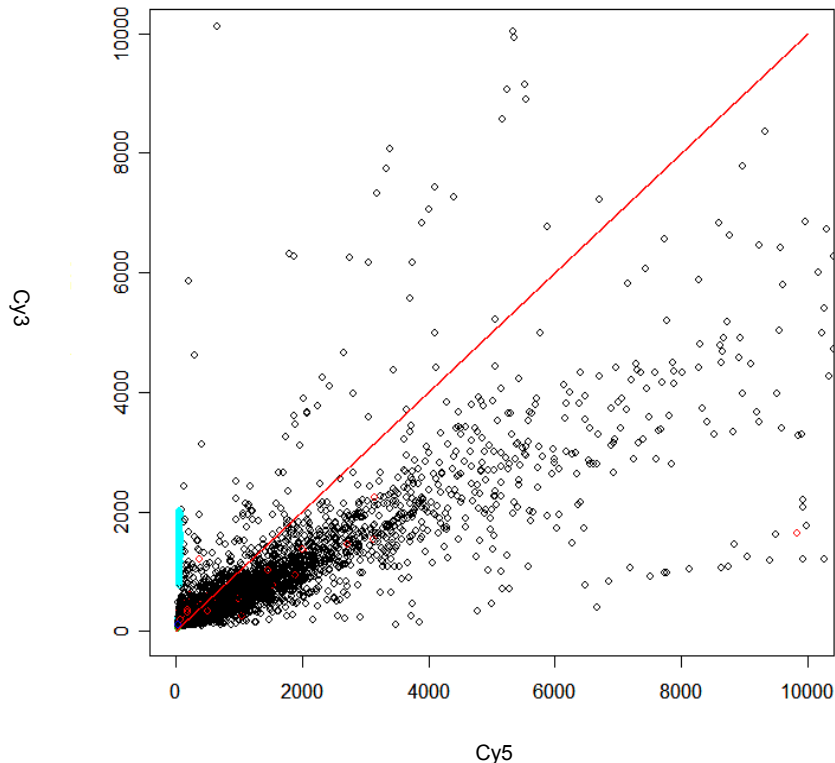
Box-ploty jednotlivých oblastí (najčastejšie print-tip)



# Diagnostika efektu farbiva

- Často je efekt farbiva väčší u sond s nízkou expresiou

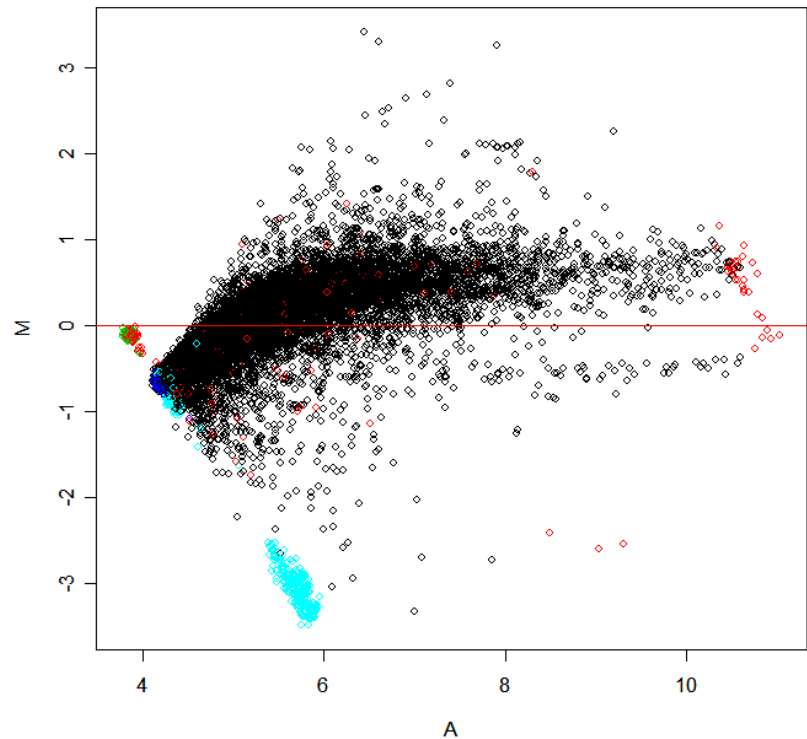
Graf intenzit kanálů



$$\text{Cy3} = B_0 + B_1 \cdot \text{Cy5}$$
$$(\text{Cy3} - B_0) / B_1 = \text{Cy5}'$$

Neukáže nelineárne trendy

MA graf



$$M = \log(R/G)$$

$$A = 1/2 (\log(R) + \log(G))$$

Ukáže nelineárne trendy!

# Balík marray

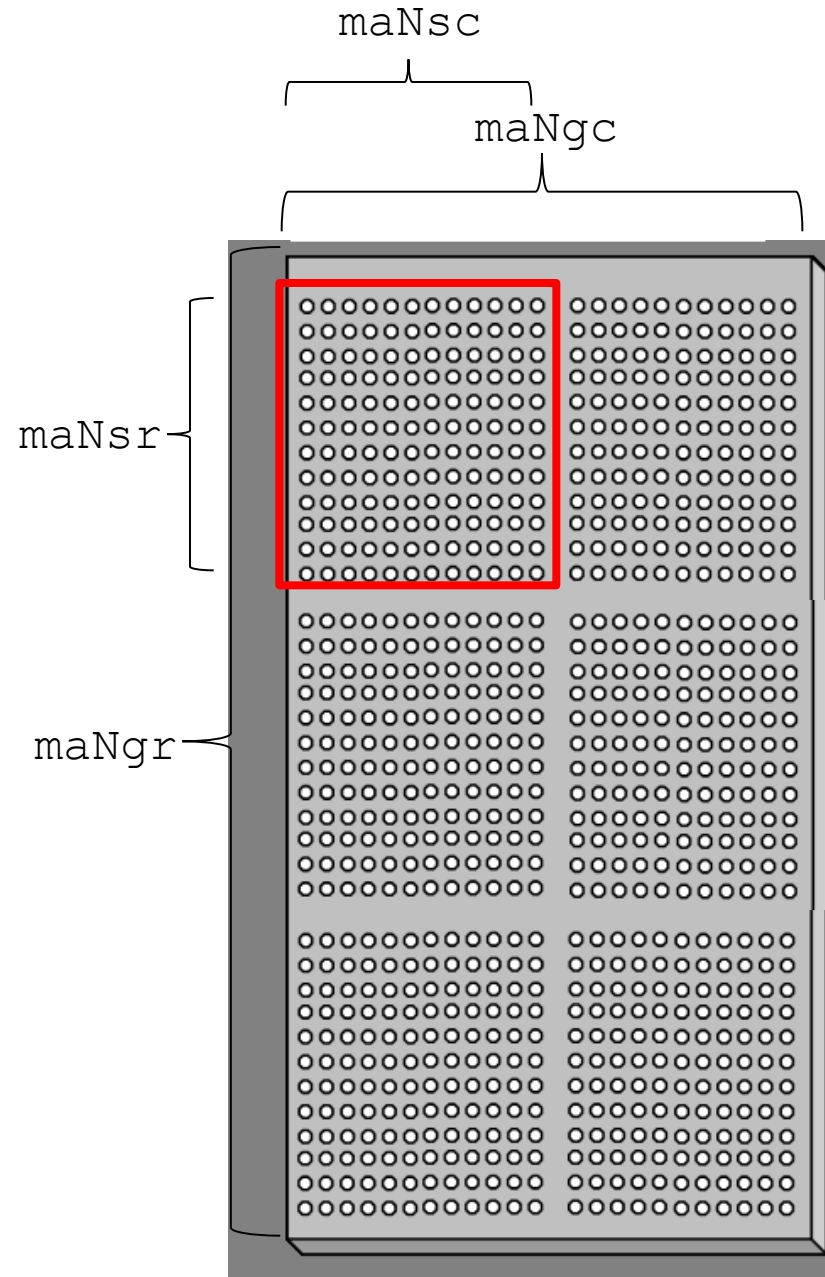
- Balík `marray` poskytuje sadu funkcí pre analýzu cDNA čipov
- Základnou štruktúrou, s ktorou pracuje a ktorá obsahuje základné dáta všetkýchch matic experimentu je trieda `marrayRaw`
- Vytvára sa nasledovne

```
new('marrayRaw',  
    maRf = ....., # matice intensit spotu červeného kanálu  
    maGf = ....., # matice intensit spotu zeleného kanálu  
    maRb = ....., # matice intensit pozadí červeného kanálu  
    maGb = ....., # matice intensit pozadí zeleného kanálu  
    maLayout = ....., # objekt třídy marrayLayout, popis  
    mikročipu  
    maGnames = ....., # objekt třídy marrayInfo, popis sond  
    maTargets = ....., # objekt třídy marrayInfo, popis vzorků  
    maNotes = ....., # text - poznámky )
```

# Ďalšie objekty balíku marray

- **marrayLayout** - popisuje mikročip, umiestnenie spotov a ich sondy

```
new('marrayLayout',  
  maNgr = ... , #počet riadkov matic  
  maNgc = ... , #počet sloupců matic  
  maNsr = ... , #počet riadkov v matici  
  maNsc = ... , #počet sloupců v  
  matici  
  maNspots = ... , # maNgr x maNgc x  
  maNsr x maNsc  
  maSub = ... , # vektor TRUE/FALSE,  
  které spoty se používají  
  maPlate = ... , # faktor - print  
  tip  
  maControls = ... , # faktor -  
  status sondy (kontrolná nebo ne?)  
  maNotes = ... , # Object of class  
  character)
```



# Ďalšie objekty balíku marray

- **marrayInfo** - popisuje vzorky alebo sondy

```
new('marrayInfo',  
    maLabels = ....., # vektor jmen/názvů  
maInfo = ....., # datová tabulka s dalšími  
    charakteristikami  
maNotes = ....., # text s poznámkami  
)
```

# Příklad I

- Načtěme si data `swirl`, které představují mikročipový experiment, porovnávající genovou expresi divokého druhu ryby Dánio pruhované a jejího mutantu v genu *BMP2*. Experiment byl proveden v *dye swap* designu, dohromady jsou k dispozici 4 mikročipy:

```
> library(marray)
```

```
> data(swirl)
```

```
> str(data)
```

- Vytvořme si paletu barev a provedeme kontrolu kvality čipů

```
> Gcol <- maPalette(low = "white", high = "green", k = 50)
```

```
> Rcol <- maPalette(low = "white", high = "red", k = 50)
```

```
> RGcol <- maPalette(low = "green", high = "red", k = 50)
```

# Příklad II – kontrola prostorových efektů

- Vykreslíme si heatmapu třetího mikročipu s pomocí funkce `maImage`
  - > `maImage(swirl[, 3], x = "maRb")` # vykreslíme pozadí červeného kanálu
  - > `maImage(swirl[, 3], x = "maGb")` # vykreslíme pozadí zeleného kanálu
  - > `maImage(swirl[, 3], x = "maM")` # vykreslíme poměr intenzit spotů obou kanálů ( $M$  hodnoty)
- Funkce `maImage` dokáže vykreslit i efekt `print-tip`:
  - > `maImage(swirl[, 1], x="maPrintTip")`
- Funkce `maBoxplot` vykreslí krabicové grafy
  - > `maBoxplot(swirl[, 1])`

# Příklad III – efekt barviva

- Vykreslíme jednoduše pomocí základní funkce `plot`, a dvou funkcí, kterými z `marrayRaw` objektu extrahujeme intensity spotů červeného a zeleného kanálu:

```
> R = maRf(swirl[,1])
```

```
> G = maGf(swirl[,1])
```

```
> plot(R,G)
```

```
> abline(a=0, b=1) # vykreslíme diagonálu
```

- Funkce `plot` aplikována přímo na objekt třídy `marrayRaw` vykreslí MA graf, s odhadem křivek podle jednotlivých print-tipů

```
> plot(swirl[,1])
```

- Jiným způsobem je prvně vypočítat hodnoty  $A$  a  $M$ , a pak je zobrazit pomocí funkce `ma.plot`:

```
> A=maA(swirl[,3])
```

```
> M=maM(swirl[,3])
```

```
> ma.plot(A,M)
```