



Detekce rakovinných markerů prostřednictvím proteinových čipů

C4700 – Vybrané biochemické metody – cvičení

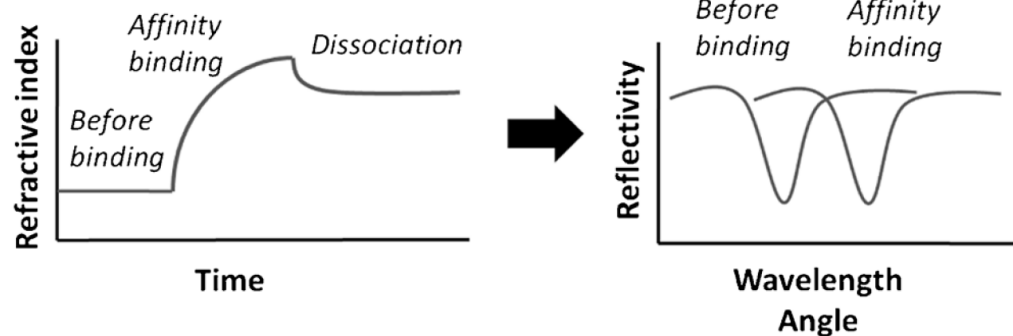
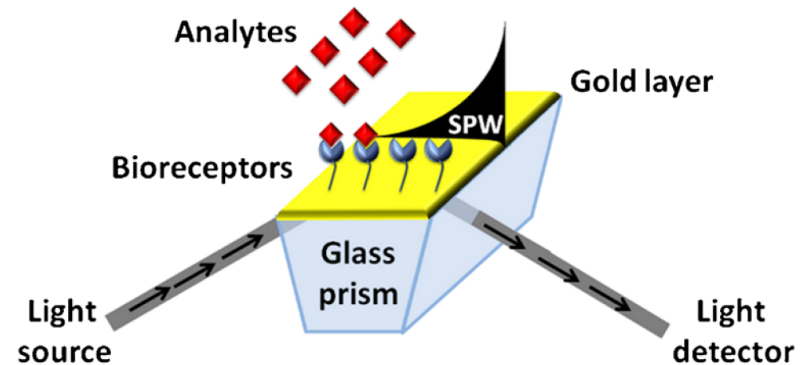
Matěj Pastucha
Jaro 2019

Možnosti detekce

- Bez značky (label-free)
 - Není nutná derivatizace
 - Menší citlivost
- Značené
 - Populárnější
 - Vyšší citlivost
 - Ovlivnění interakce
 - Složitější systém

Label-free a značené metody

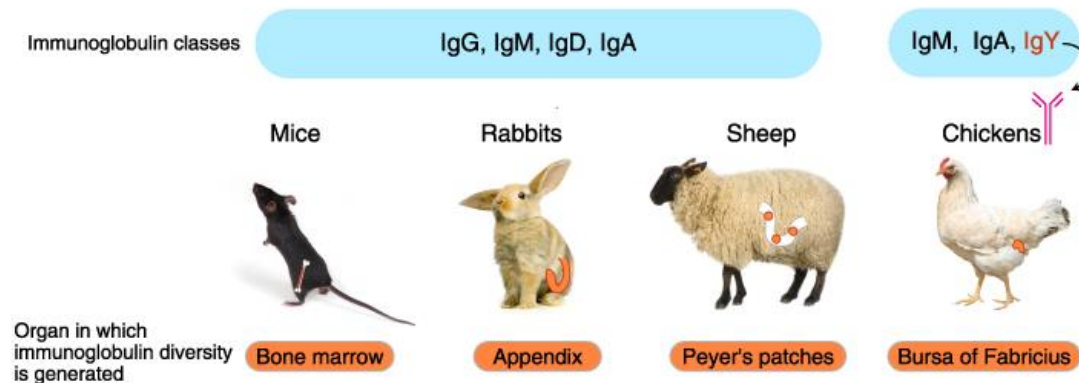
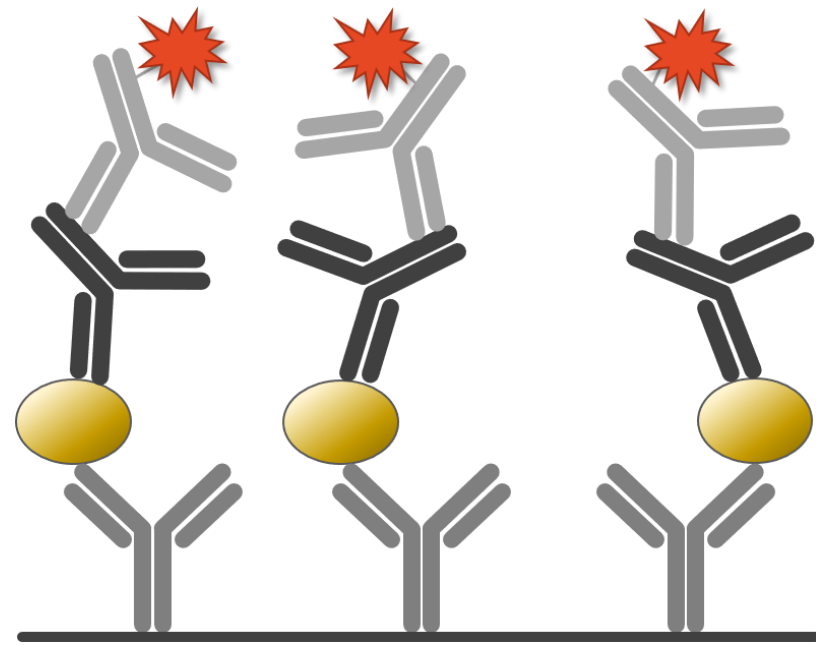
- SPR imaging
- Interferometrie
- Hmotnostní spektrometrie
 - SELDI
 - MALDI
- Elektrochemie
- Fluorescenční
- Radioaktivní značky



Mariani, S et al., *Anal Bioanal Chem* 2014

Výběr protilátek

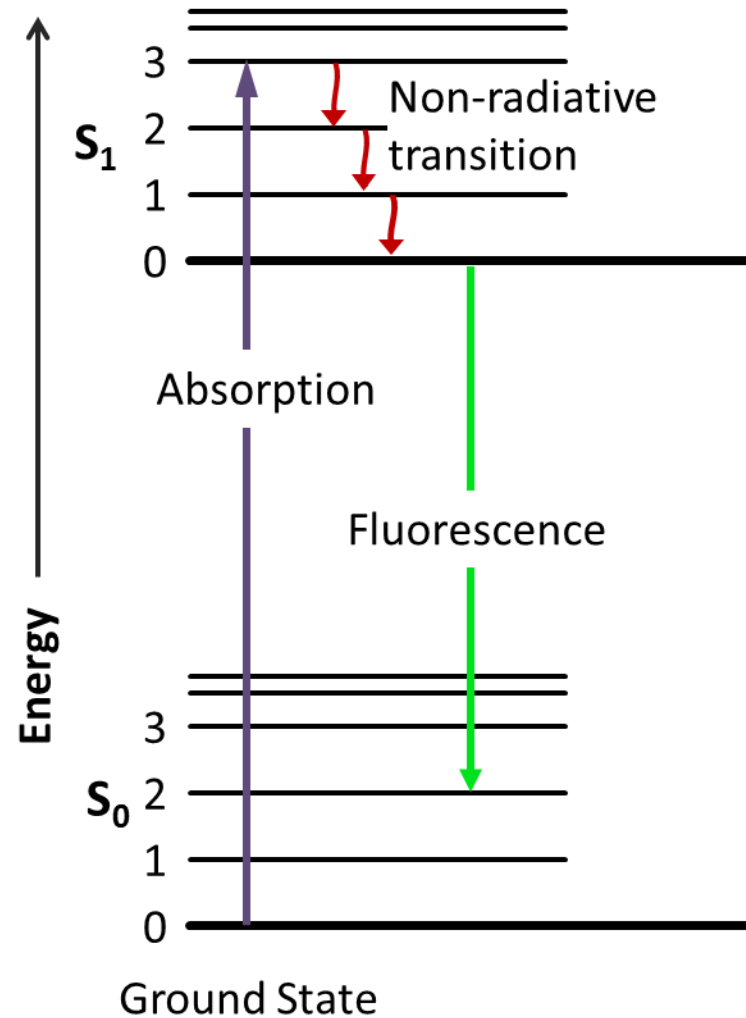
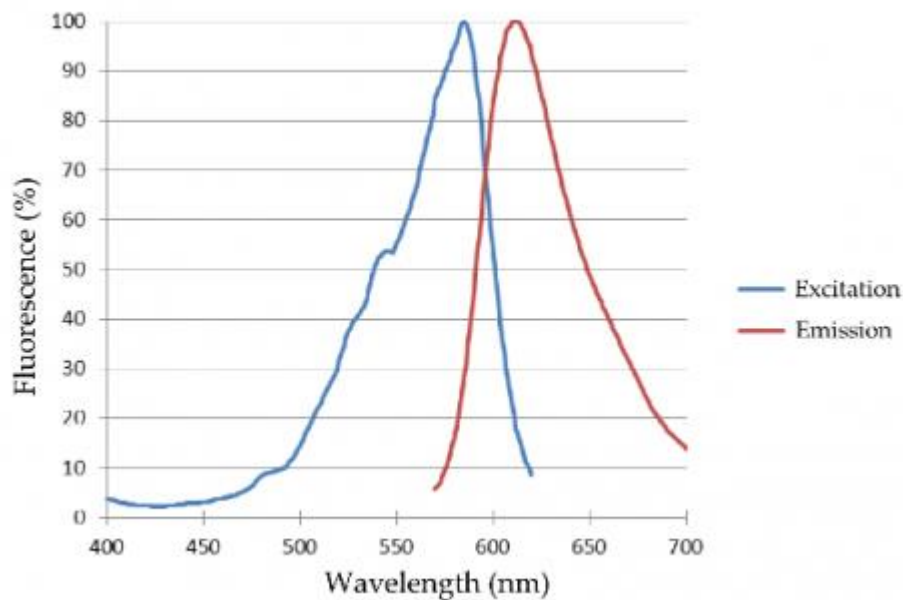
- Monoklonální
- Polyklonální
- Anti-species (sekundární)
- Vhodné kombinace zvířecích zdrojů – návrh eseje
- Křížová reaktivita
 - Nejsou 100%
 - Negativní kontroly
 - Testování
 - ELISA, WB
 - Kvantitativní?



<http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/support/method/antibody-production.html>

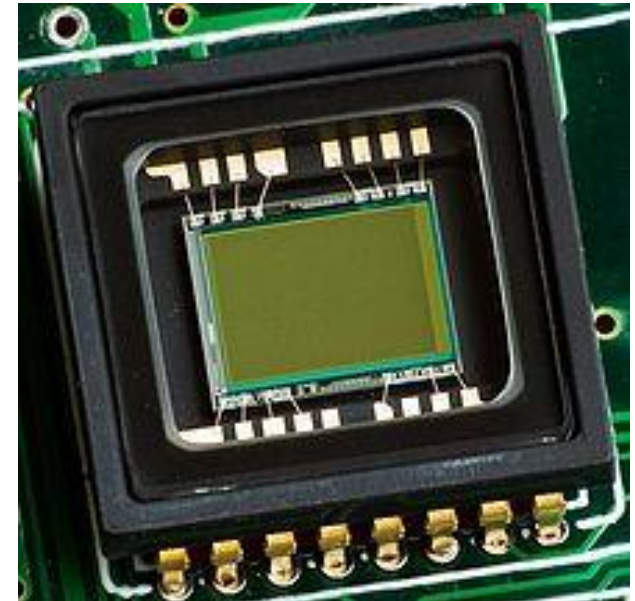
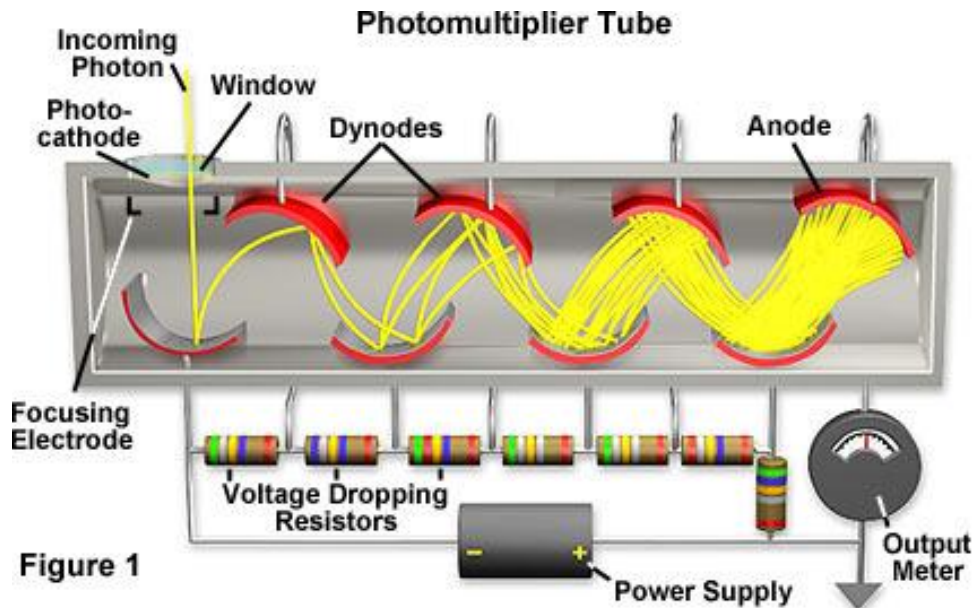
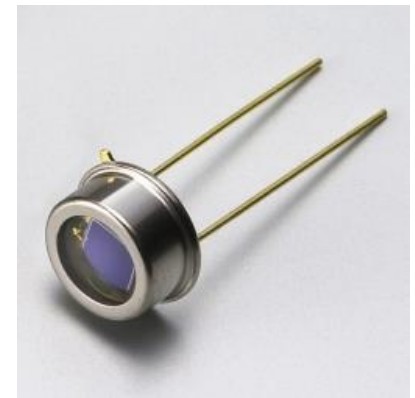
Fluorescence

- Excitační vs. emisní spektrum
- Stokesův posun



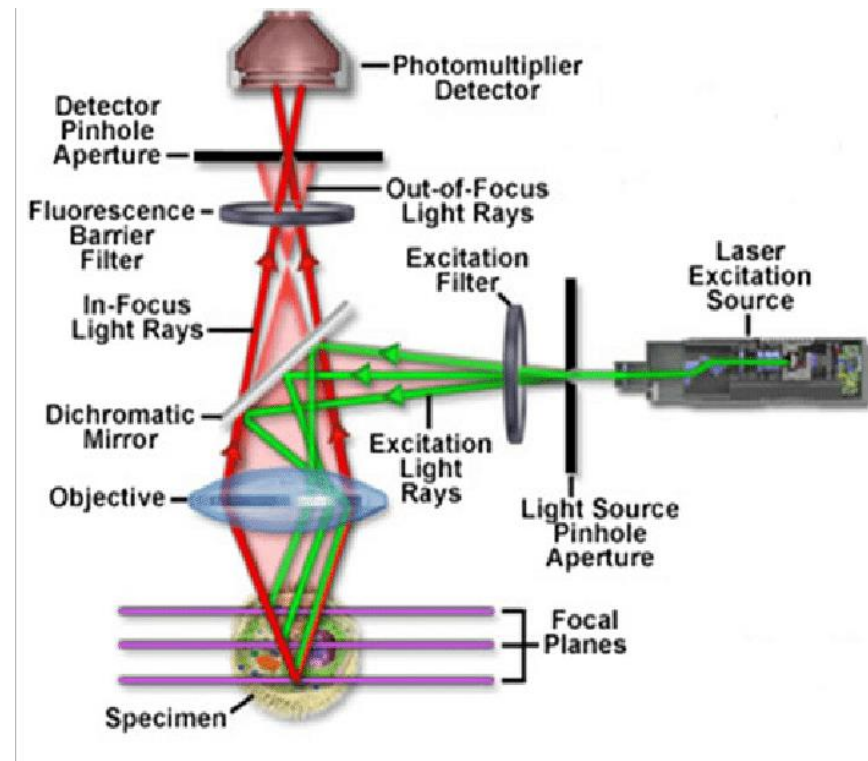
Detekce

- Fluorescenční mikroskop, fotografie
- Detektory CCD/CMOS, fotonásobič, fotodioda
- Skener – využívá konfokálního mikroskopu
- Dynamický rozsah, HDR/XDR



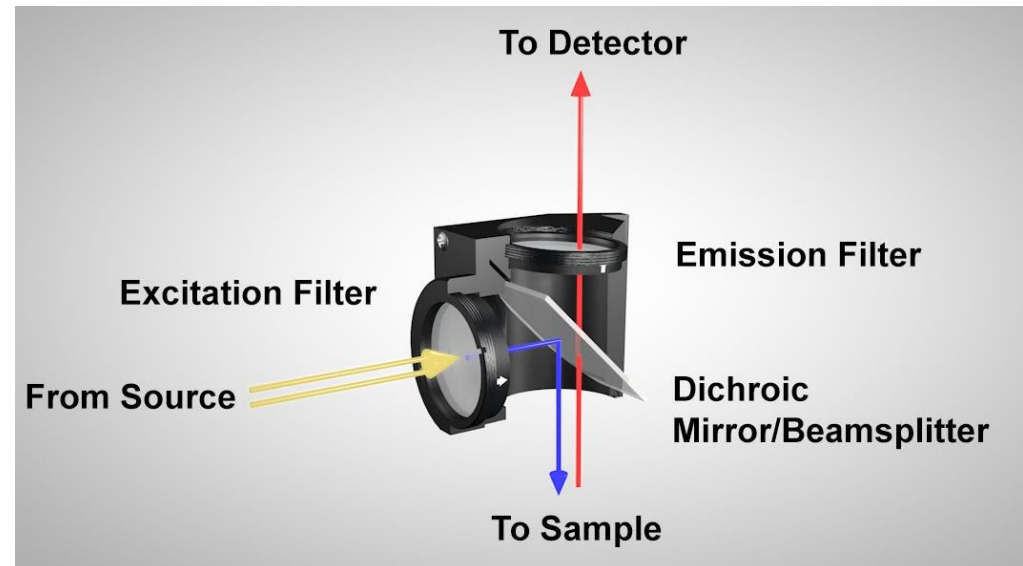
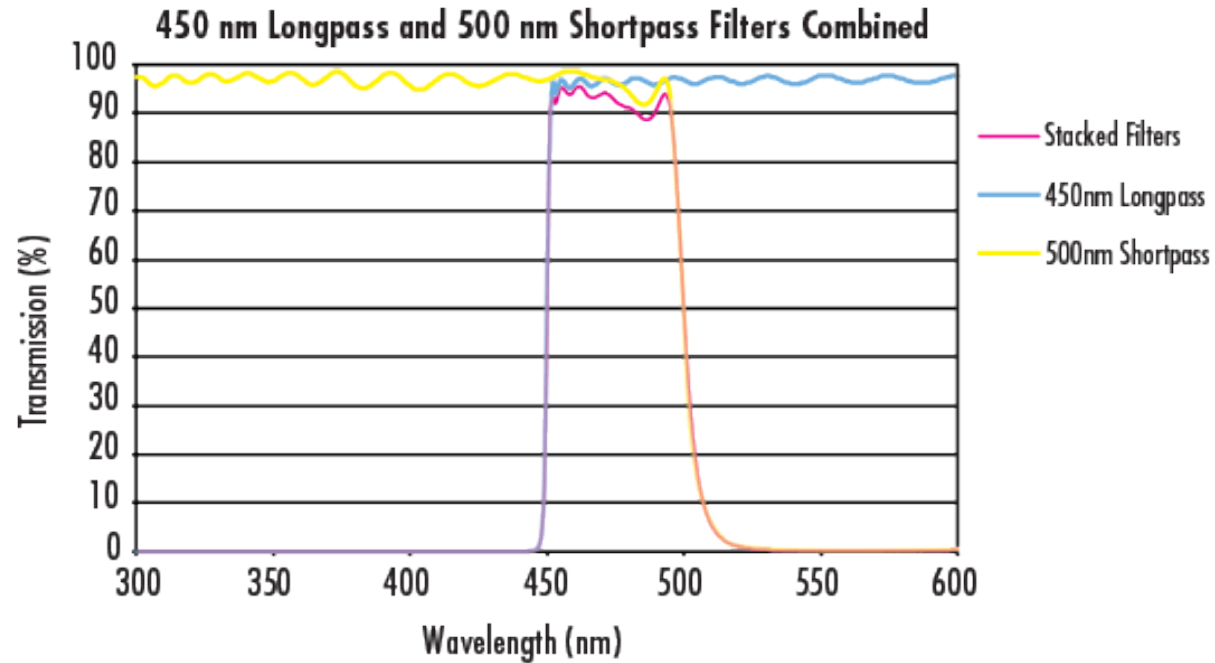
Konfokální mikroskop

- Vylepšení fluorescenčního mikroskopu
- Štěrbina odstiňuje signál z oblastí mimo focus
- Lepší ostrost obrazu – detekce signálu z úzkého rozmezí hloubky – konfokální
- Zlepšení rozlišení
- Skenovací technika - laser



Optické filtry

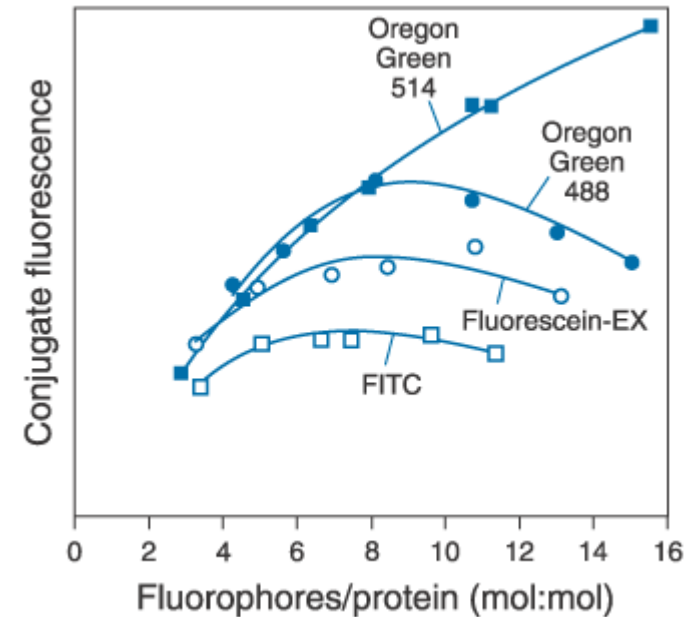
- Short pass
- Long pass
- Band pass
 - Bandwidth
- Zde jen emisní
- „Filter cubes“
- „Filter wheels“



Fluorescenční značky

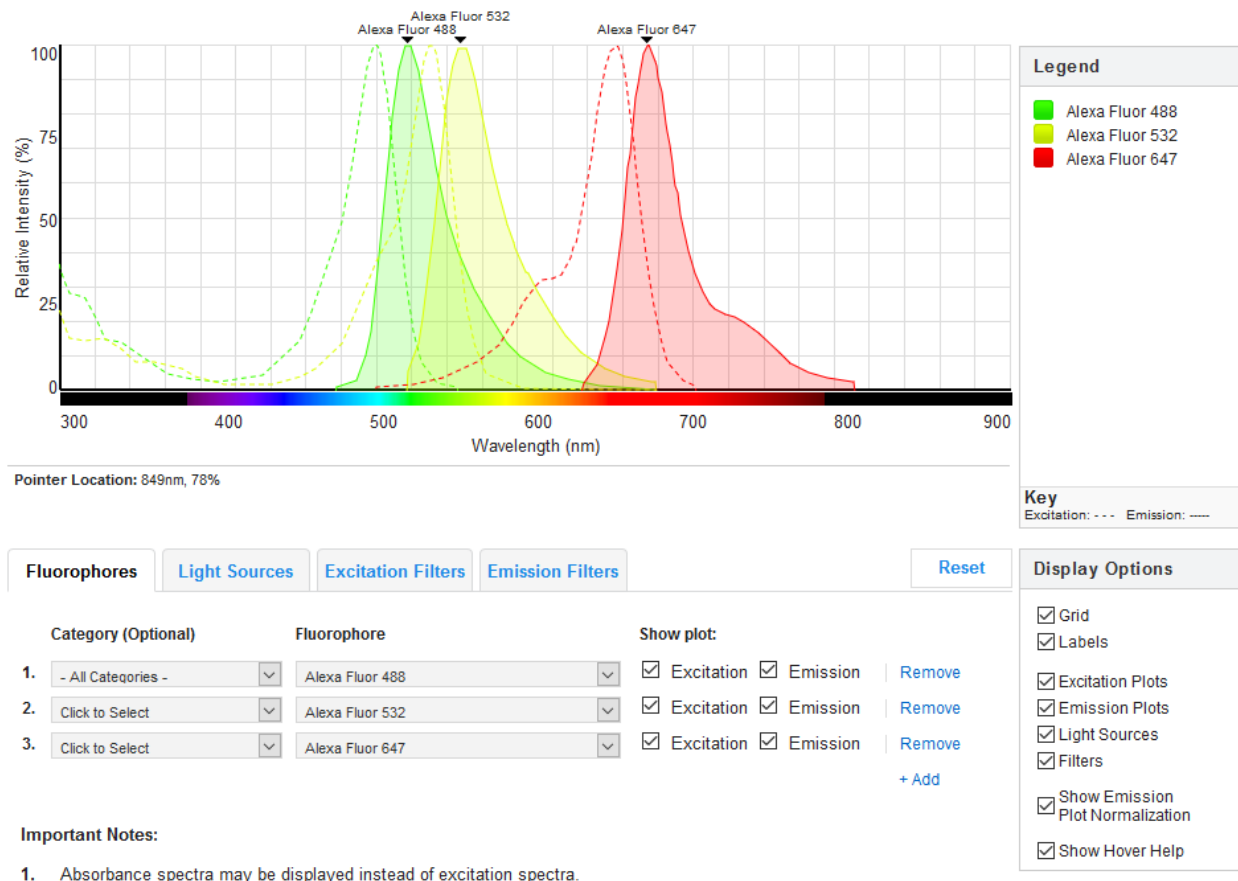
- Stabilita – photobleaching
- Kvantový výtěžek – účinnost fluor.
- Kompatibilita s biomolekulami
- Citlivost na prostředí – pH, polarita, teplota
- Zhášení
- Stokesův posun

- Atto, Alexa, Cy, CF, fluorescein, rhodamin
- Komplexy ruthenia



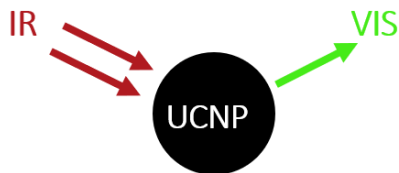
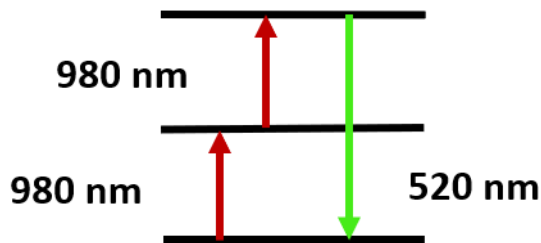
Fluorescenční značky

- Excitační a emisní vlnová délka; kombinace značek
- Nástroj Thermo Fisher SpectraViewer



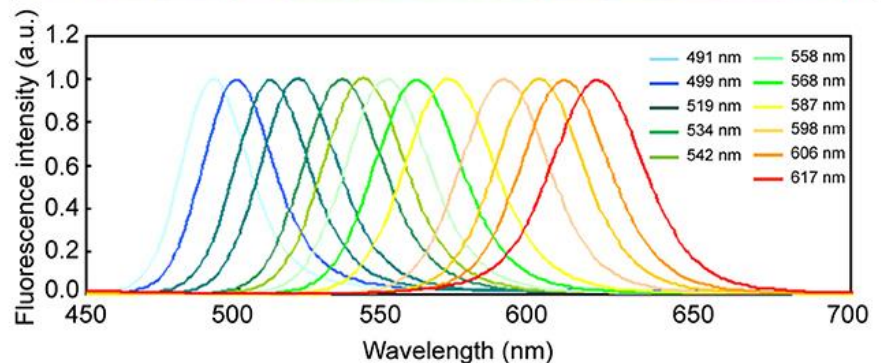
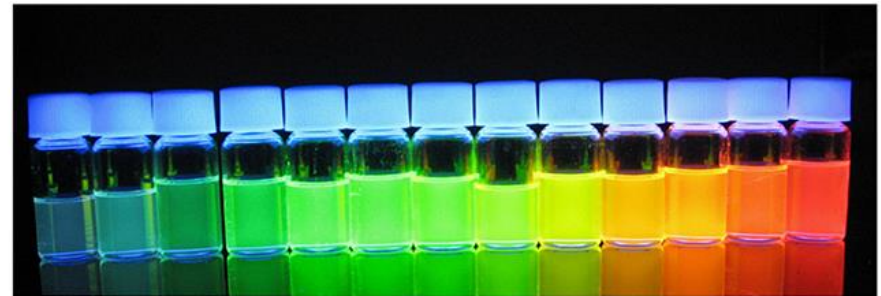
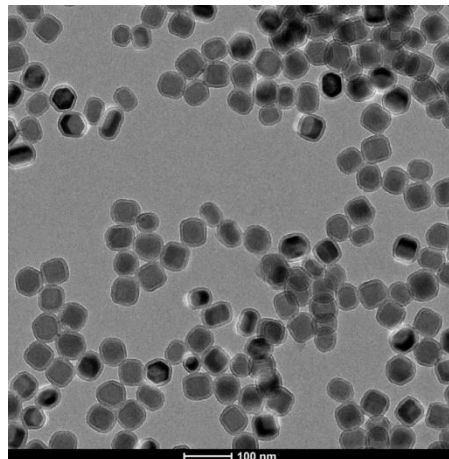
Alternativní luminiscenční značky

- Kvantové tečky (QDs) – polovodičové nanokrystaly
- UCNPs – podobné, dopované lanthanoidy
 - „Upconverze“ – anti-Stokesova luminiscence



Hlaváček et al.,
Anal. Chem. 2016

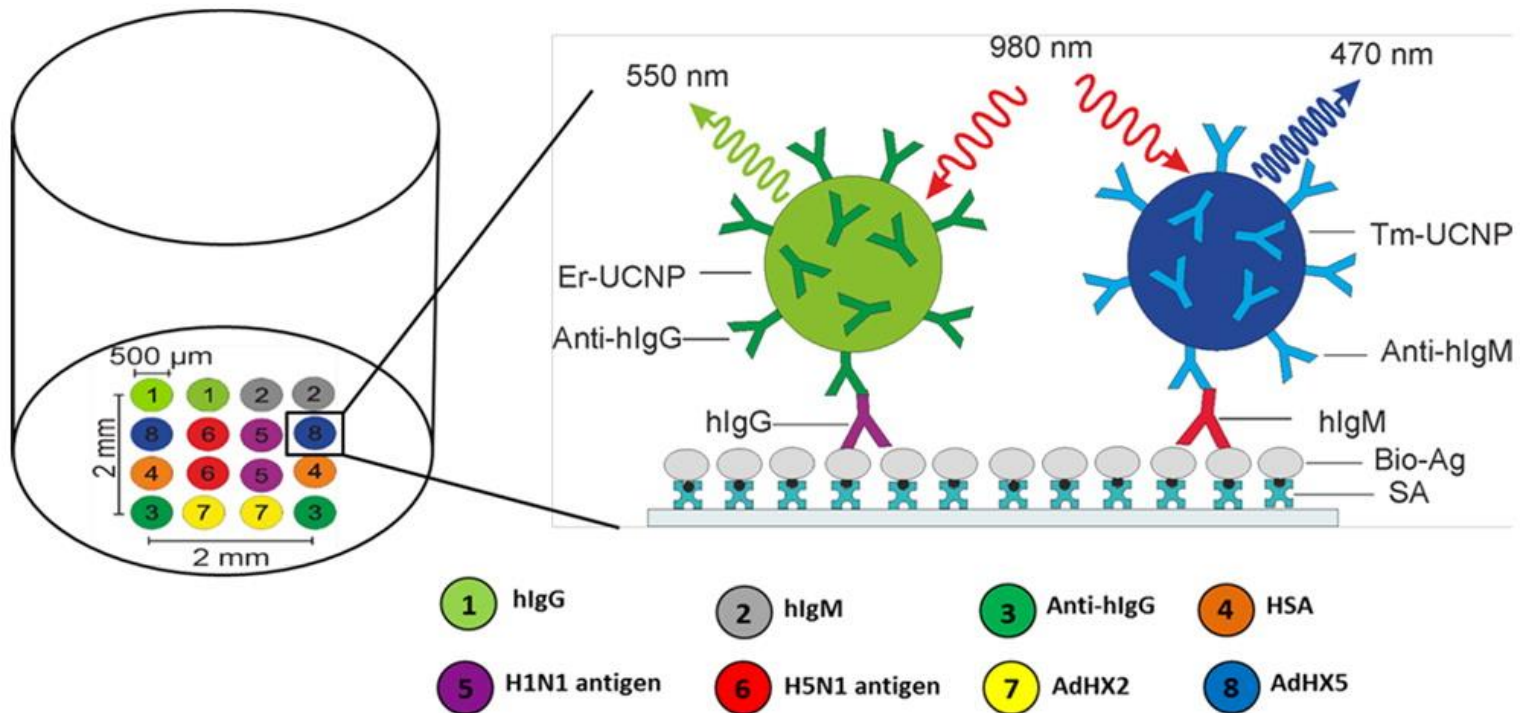
C4700 - Proteinové čipy



Ichimura et al., *Front. Physiol.* 2014

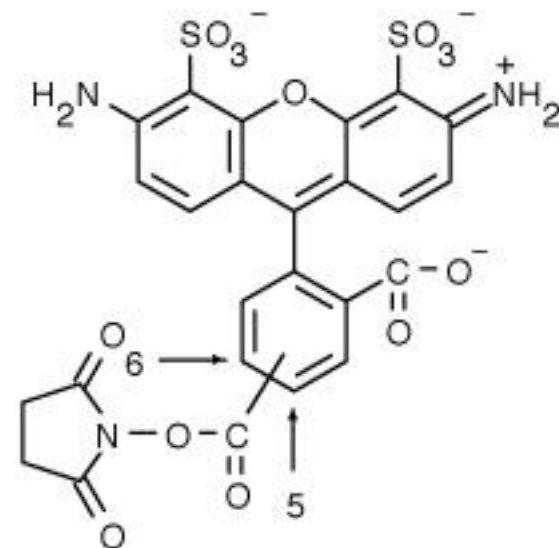
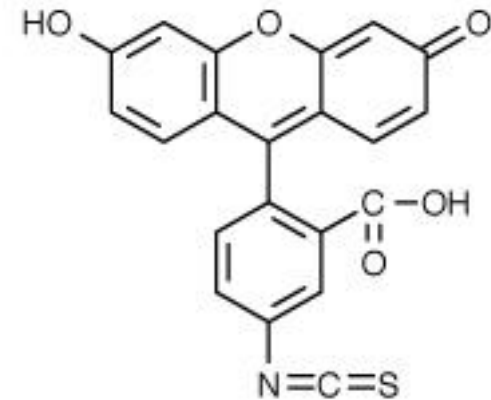
UCNPs – multiplexing

- Detekce a klasifikace protilátek proti virům z krve
- V 96-jamkových destičkách, dvě barvy značek



Konjugace značek

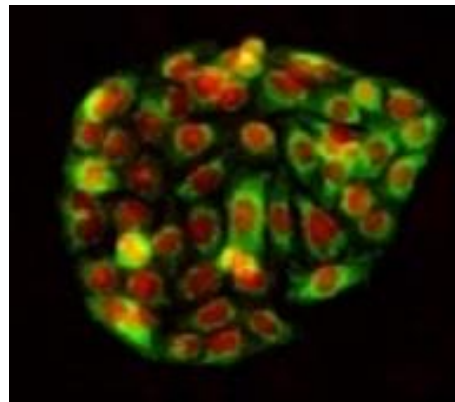
- Využití aktivovaných značek
 - -NHS ester
 - -COOH
 - Maleimid
 - Azid
 - Isothiokyanát
 - Hydrazid
 - Sukcinimidyl ester
- Poměr F/P



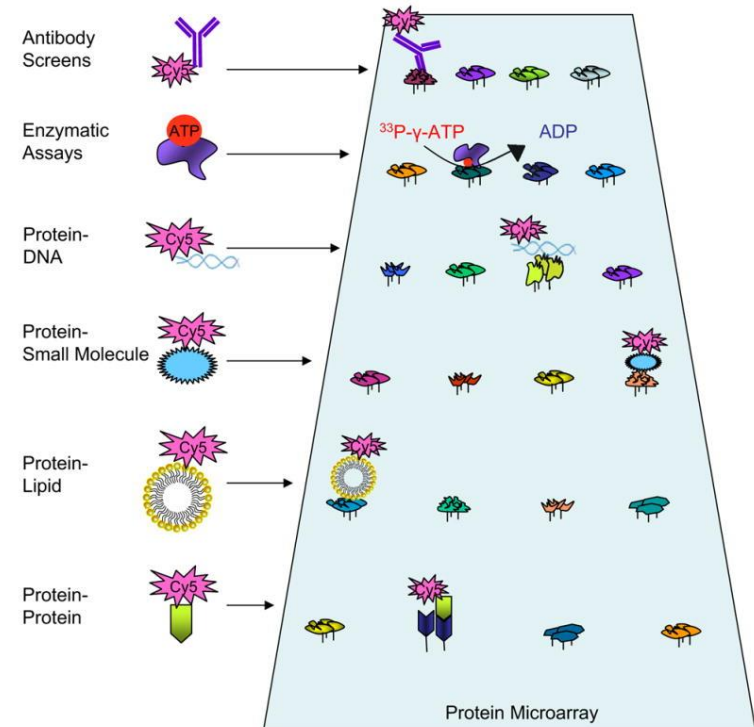
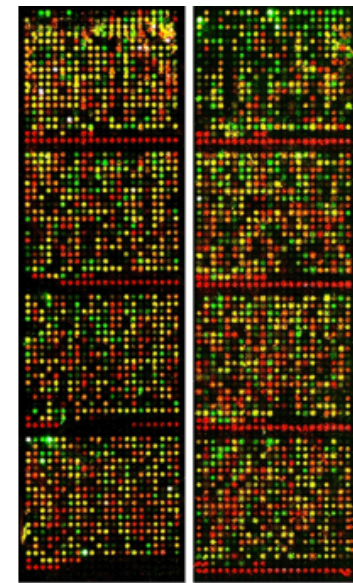
2 Li⁺

Typy čipů - biomolekuly

- DNA – tištěné i syntetizované
- Peptidové - tištěné i syntetizované
- Proteinové – pouze tištěné
 - Cell-free exprese
- Glykanové – interakce s cukry
- Bunečné čipy

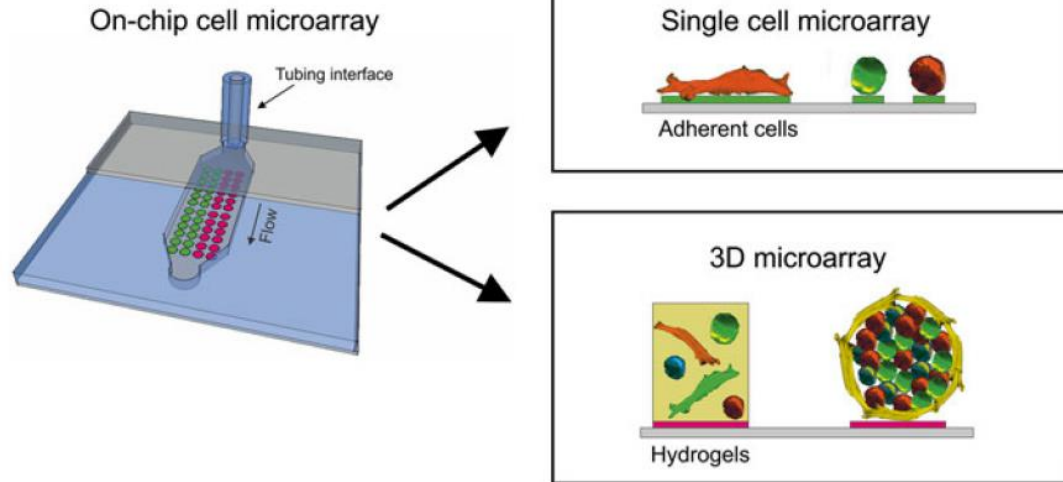


www.innopsys.com

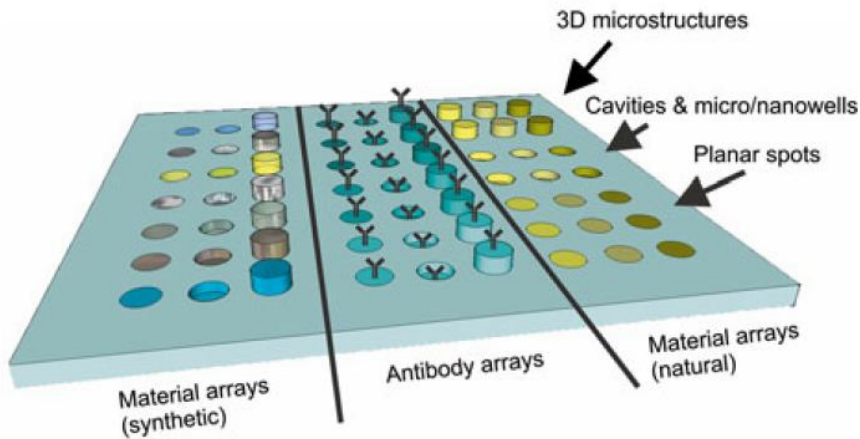


Hall et al., *Mech Ageing Dev.* 2007⁵

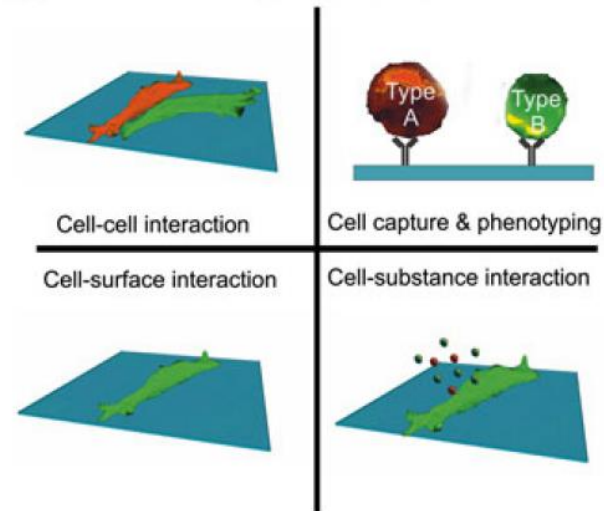
Buněčná array



a Live-cell microarray technology

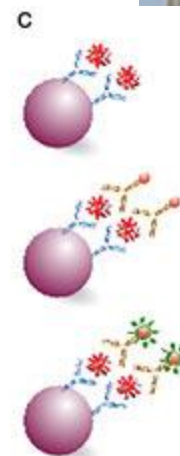
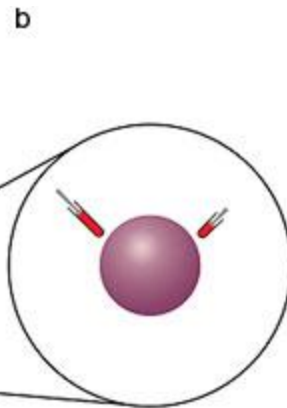
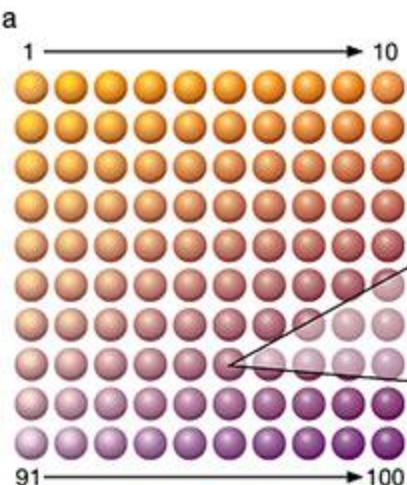
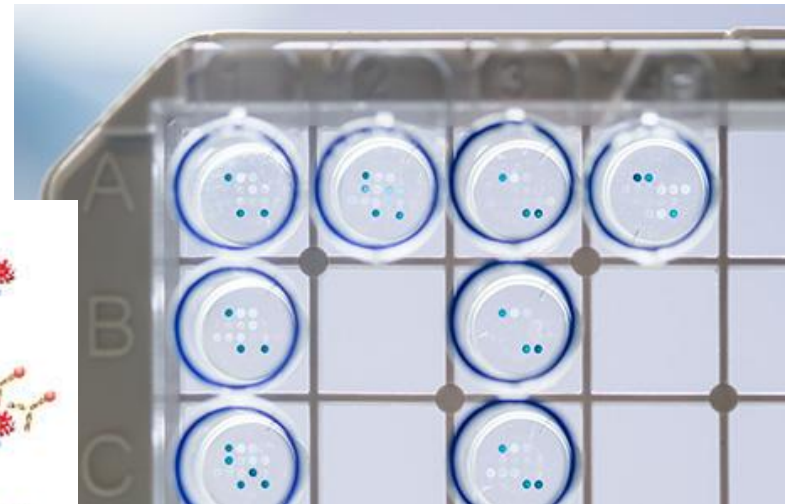
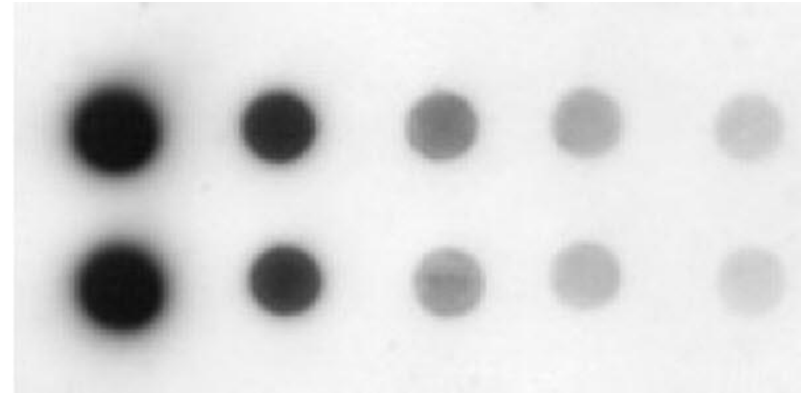


b Applications



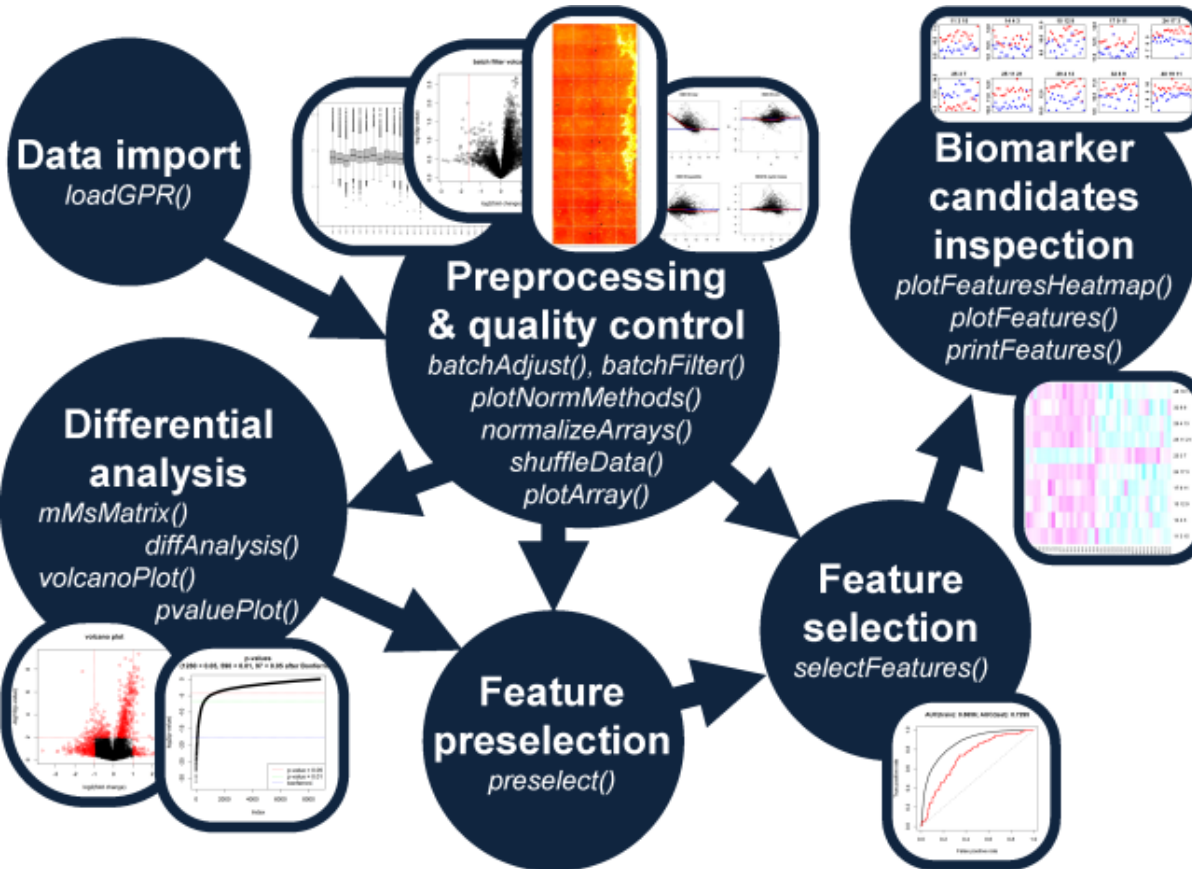
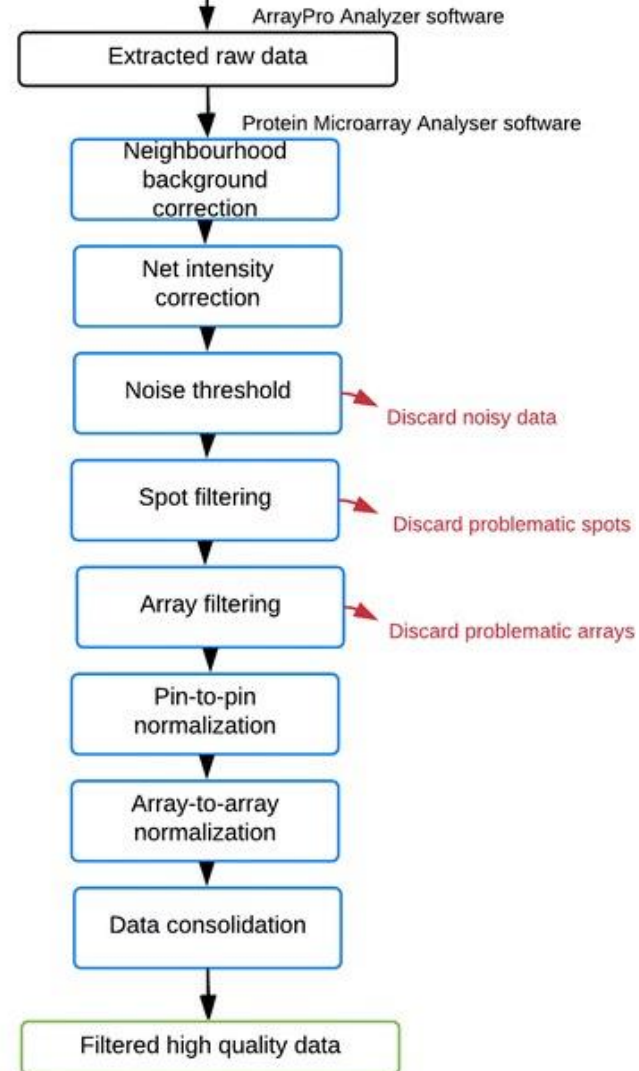
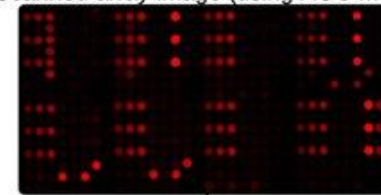
Jiné formáty

- Dot-blot
- Microspot ELISA
- Částicové (microbead) eseje
 - Fluorescenčně kódované částice
 - V ELISA destičce



Zpracování a vyhodnocování dat – „big data“

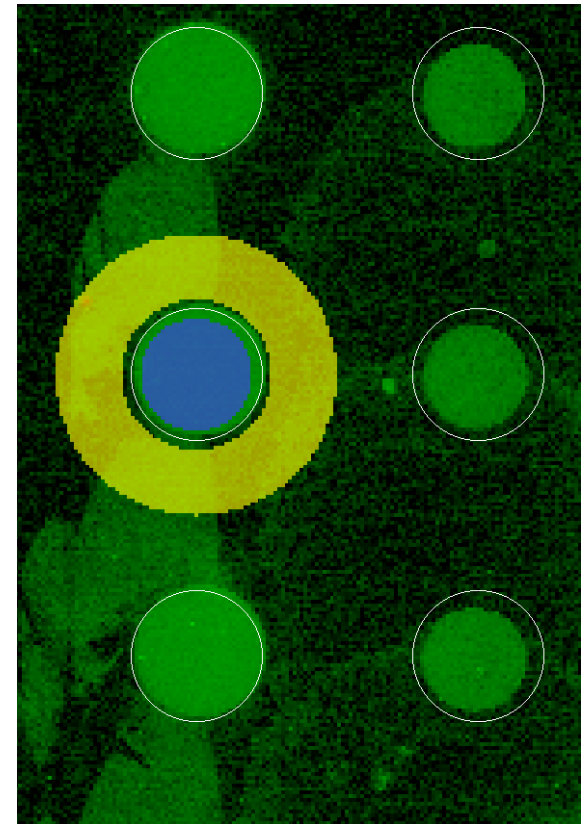
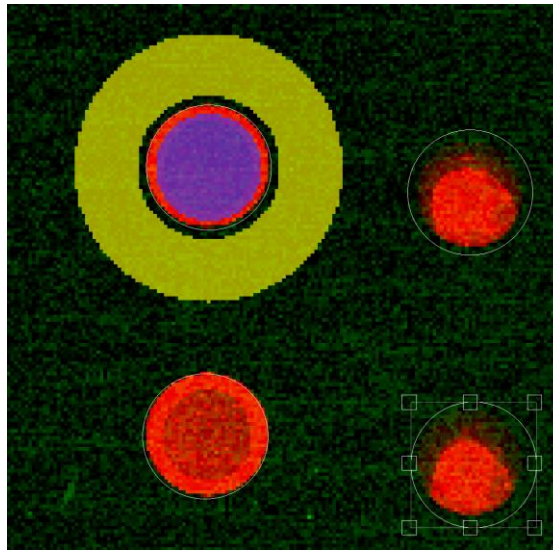
- Složité
- Bioinformatika, statistika
- Open-source – R, Bioconductor
- Specializovaný SW – většinou DNA čipy
 - Mnoho komerčních i open-source
 - PMA – Protein Microarray Analyser
 - PAA – Protein Array Analyser – R package
 - GenePix - standard
 - Mapix



PAA workflow; <http://www.ruhr-uni-bochum.de/mpc/software/PAA/>

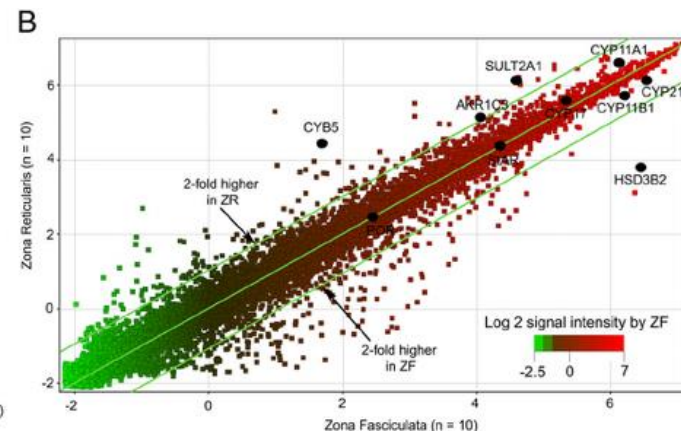
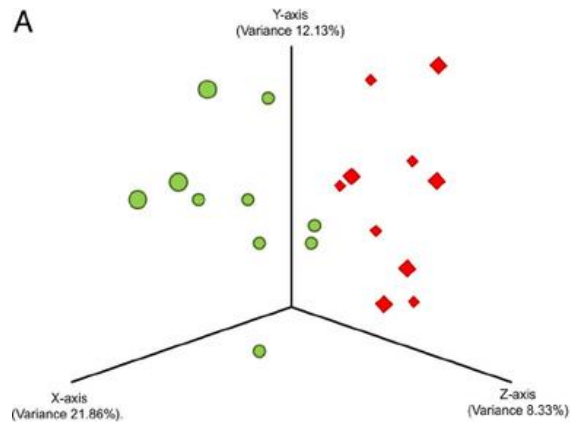
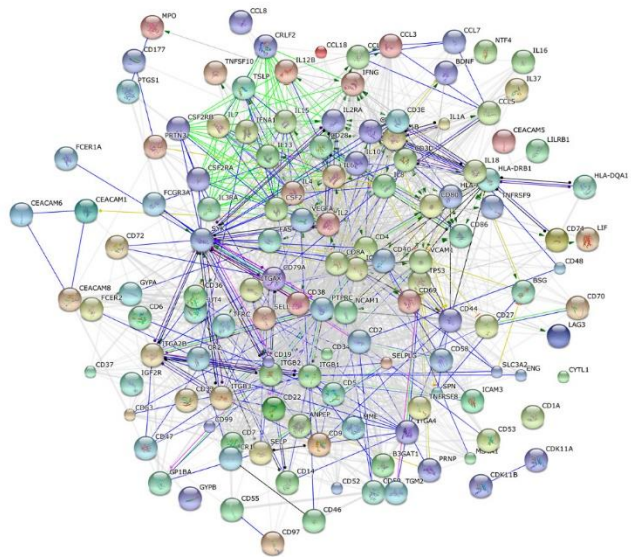
Zpracování obrazových dat

- Nalezení spotů, segmentace obrazu
- Pozadí – lokální vs. Globální
- Kvantifikace – průměr, medián
- Poměry signálů

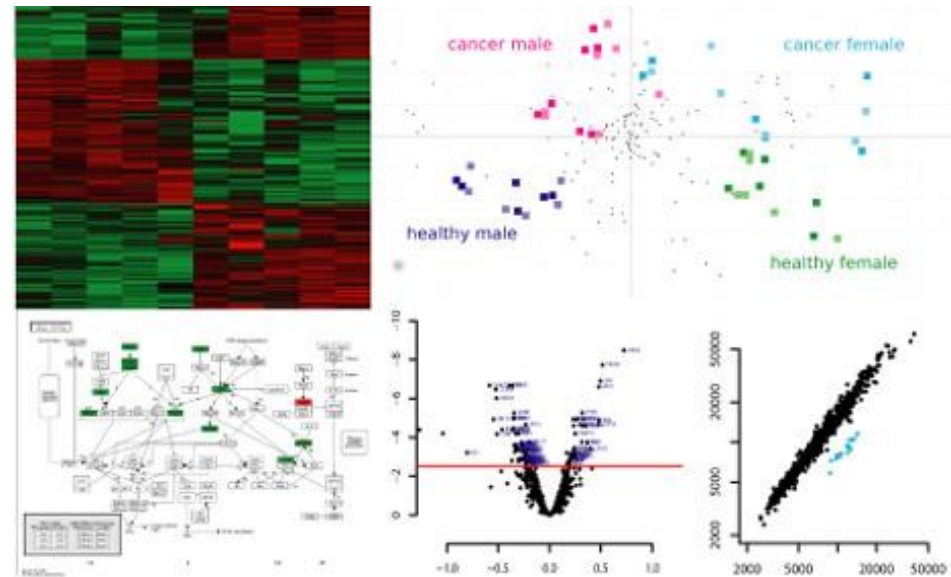
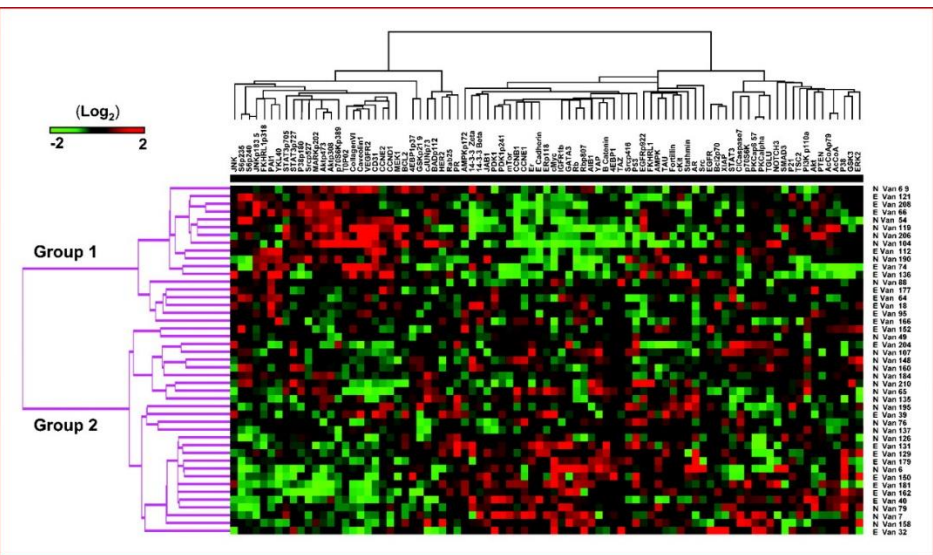


Normalizace, vyhodnocení dat

- Korelační diagram – Scatter plot
- Normalizace
 - Mediánová
 - Kvantilová
 - Lowess - locally weighted scatterplot smoothing
- Diferenciální exprese proteinů
- PCA – principal component analysis
- Shluková analýza (clustering)
 - Tree plots, dendrogramy, heatmapy



Carey et al., *Clin. Cancer Res.* 2010
 Rege et al., *J Clin Endocrinol Metab.* 2014
<http://www.sciomics.de/services>



Standardizace formátů pro přenos dat

- ATF, GenePix Results .gpr
- http://www.cryer.co.uk/file-types/a/atf/genepix_file_formats.htm

```

ATF      1.0
8        5
Type=GenePix ArrayList V1.0
BlockCount=4
BlockType=0
Supplier=Scienion AG
Block1= 8000, 8000, 200, 14, 750, 15, 750
Block2= 8000, 23500, 200, 14, 750, 15, 750
Block3= 8000, 39000, 200, 14, 750, 15, 750
Block4= 8000, 54500, 200, 14, 750, 15, 750
Block  Row      Column ID      Name

```

Fluorescenční skener Innopsys InnoScan 1100 AL

- 3 lasery, 3 PMTs – simultánní měření 3 značek
 - 488, 532, 635 nm
- Rozlišení 0.5 $\mu\text{m}/\text{pix}$ až 40 $\mu\text{m}/\text{pix}$
- 16 bit rozsah (20 bit XDR – dynamický rozsah 10^6)
- Autoloader pro 24 sklíček

Laser λ (nm)	488	532	635
Filter (nm)	520/5	572/34	675/37
	Cy2	Cy3	Cy5
Compatible fluorophores	Alexa 488	Alexa 555	Alexa 647
	FITC	Sytox Orange	Draq 5





Děkuji za pozornost

Financováno z projektu FRMU: Inovace výuky vytvořením laboratorní úlohy „Detekce rakovinných markerů prostřednictvím proteinových čipů“