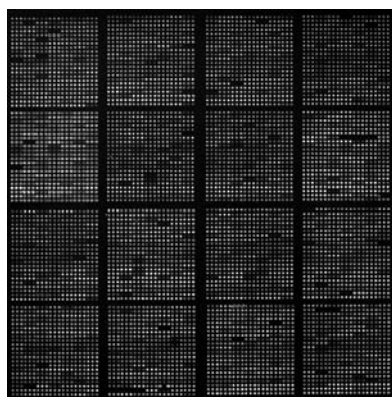


# Principy microarrays

Pavla Gajdušková  
Analytická cytometrie, 24. listopadu 2009

## Microarrays

Kolekce DNA sond přichycených k pevnému podkladu



„Tištěná“ microarrays



Fotolitografie

## Microarray technologie

- I. Výběr sond (probes):** cDNA vektory, BAC vektory, krátké nebo dlouhé oligonukleotidy, proteiny, tkáň
- II. Příprava microarray:** nanesení sond na sklo nebo membránu
- III. Design experimentu:** zvolení správné metody, použití referenčního vzorku, záměna fluorescenčních barev
- IV. Fluorescenční značení vzorků**
- V. Analýza microarray obrazů:** nalezení sond v obraze, korekce pozadí, výpočet intenzity v jednotlivých bodech
- IV. Analýza dat:** filtrování, normalizace, porovnání výsledků získaných z více microarray experimentů – klastrovací analýza

## Obsah přednášky

**Technologie přípravy microarrays**

Oblasti použití microarrays v biologii

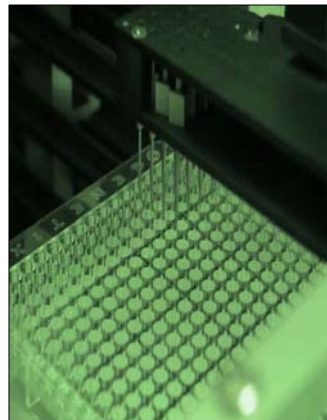
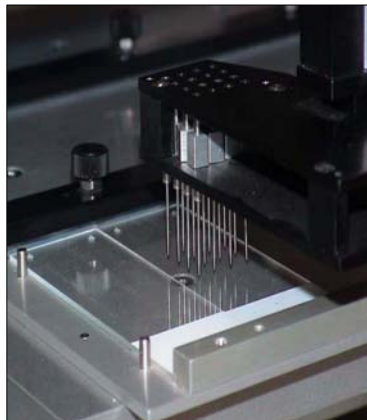
Úvod do statistického hodnocení dat

Příklady konkrétních aplikací z literatury

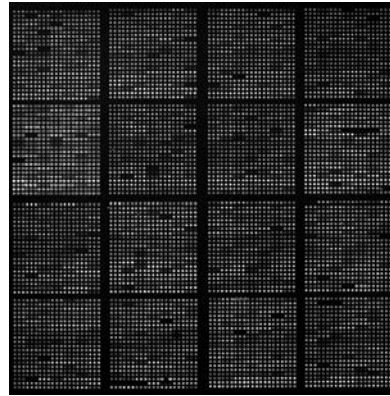
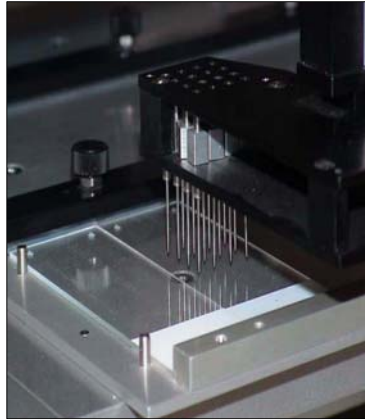
## Technologie přípravy microarrays

- I. tisk pomocí skleněných kapilár (na podložní skla)  
(výzkumné laboratoře)
- II. ink-jet tisk (Agilent)
- III. fotolitografie (Affymetrix, NymbleGen)
- IV. samosestavování silikonových kuliček (Illumina)

## Microarrays tištěná pomocí skleněných kapilár



## Microarrays tištěná pomocí skleněných kapilár

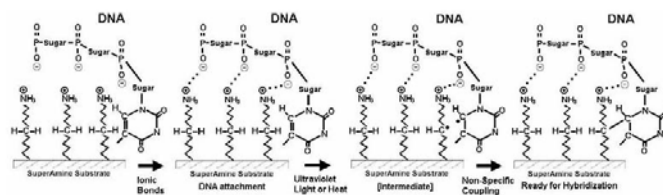
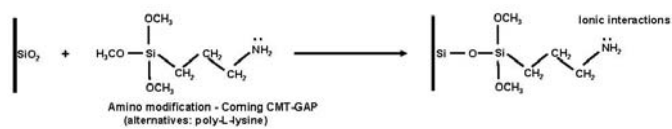


## Úprava povrchu sklíček pro tisk arrays I

povrchová úprava skla: amino modifikace, poly-L-lysine

modifikace povrchu → natisknutí DNA sond → UV ozáření

**Sklo**



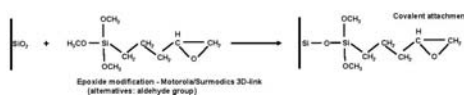
From Lee N. H. presentation: Introduction to High Density Microarrays

## Úprava povrchu sklíček pro tisk arrays II

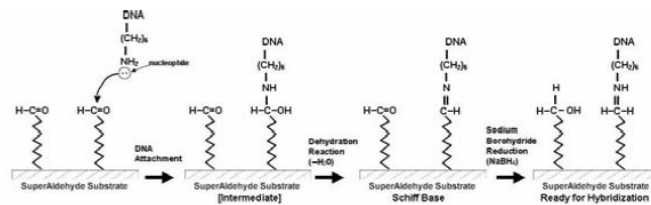
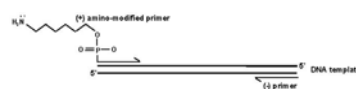
povrchová úprava skla: epoxidová modifikace

úprava DNA: amino-modifikace DNA

### Sklo



### DNA



From Lee N. H. presentation: Introduction to High Density Microarrays

## Zdroj DNA pro tisk pomocí kapilár

### I. dlouhé oligonukleotidy:

~ 60 - 70mers

komerčně dostupné (Operon, Agilent)

### II. cDNA:

knihovny cDNA vektorů (IMAGE, MGC)

dostatečné množství DNA se vyprodukuje pomocí PCR (univerzální primery pro daný typ vektorů)

### III. BAC (Bacterial Artificial Clones): malý výtěžek při izolaci,

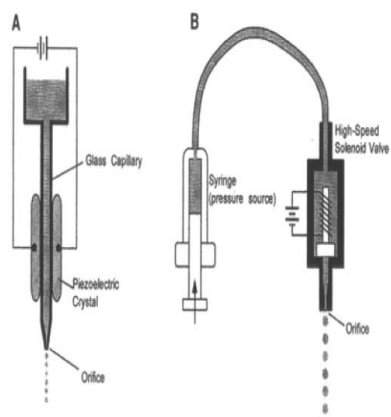
vysokomolekulární (lepivá) DNA, nutná následná amplifikace DNA spojená s rozdělením na menší úseky (DOP-PCR, ligation-mediated PCR)

## “ink-jet” tisk

oligonukleotidy 60 bp

pravidelnější tvar  
a rozmístění bodů

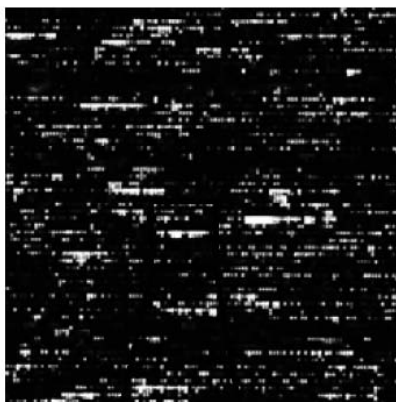
firma: Agilent



(From *Microarray Biochip Technology*, ed. M. Schena)

## Fotolitografický způsob přípravy

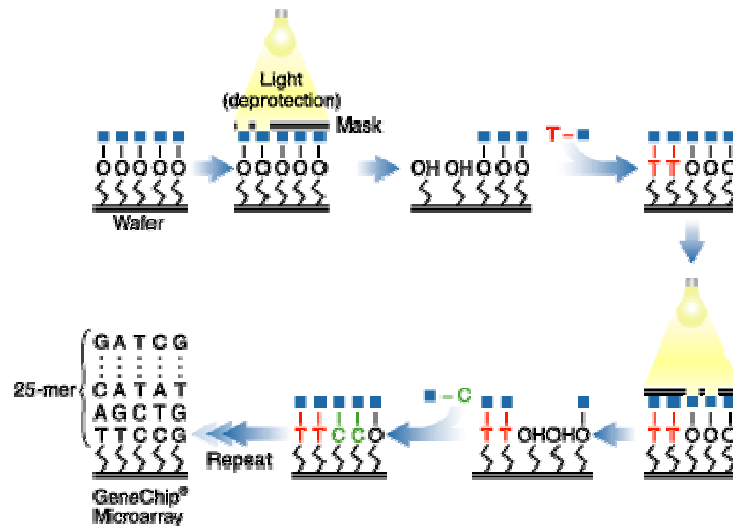
syntéza oligonukleotidů přímo na membráně



„In-situ“ syntéza

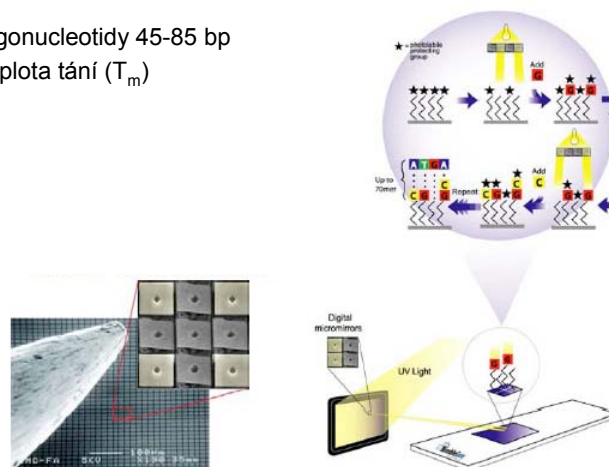
## Fotolitografický způsob přípravy (Affymetrix)

sondy = oligonukleotidy délky 25 bp



## Fotolitografický způsob přípravy (NimbleGen)

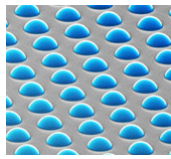
sondy = oligonucleotidy 45-85 bp  
podobná teplota tání ( $T_m$ )



## **Samosestavování silikonových kuliček**

základní stavební jednotka: silikonová kulička (3 $\mu$ M), která je pokryta mnoha kopiemi stejných specifických oligonukleotidů

kulička nemá přesně dané místo na sklíčku, po fixaci na sklíčku je její typ identifikován díky sekvenci části oligonukleotidu



## **Obsah přednášky**

**Technologie přípravy microarrays**

**Oblasti použití microarrays v biologii**

**Úvod do statistického hodnocení dat**

**Příklady konkrétních aplikací z literatury**



## Oblasti použití microarrays v biologii

Typ array	Sondy na microarray	Co se fluorescenčně značí a hybridizuje	... analýza čeho
<b>Expresní</b>	DNA (cDNA, oligonucleotidy)	cDNA / mRNA	měření množství mRNA v bunkách, nádorech ...
<b>miRNA</b>	oligonukleotidy	miRNA	měření množství miRNA
<b>CGH</b>	DNA (BAC vektory, oligonukleotidy)	DNA	změny v genomu (zisk, ztráta chromozomů nebo jejich částí)
<b>SNP</b>	DNA (oligonukleotidy)	DNA	detekce „Single Nucleotid Polymorphisms“; změny v genomu
<b>Metylace</b>	DNA (CpG islands)	DNA (ovlivněná bisulfidem sodným)	míra metylace promotorových oblastí
<b>Promoter</b>	DNA (promotorové oblasti ~ 1kb)	DNA (ChIP obohacená)	místa vazby transkripčních faktorů, modifikace histonů
<b>Tilling</b>	DNA	všechno dříve zmíněné	všechno dříve zmíněné, sekvenování, anotace genů
<b>Protein</b>	protilátky	protein	exprese proteinů (ELISA)

## Oblasti použití microarrays v biologii

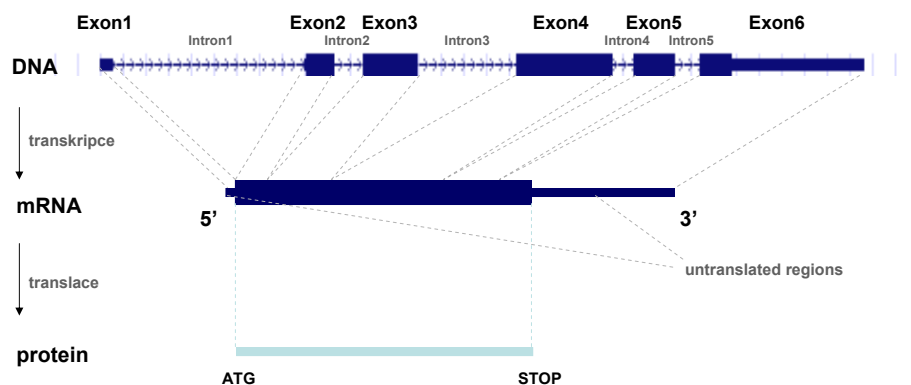


## Oblasti použití microarrays v biologii

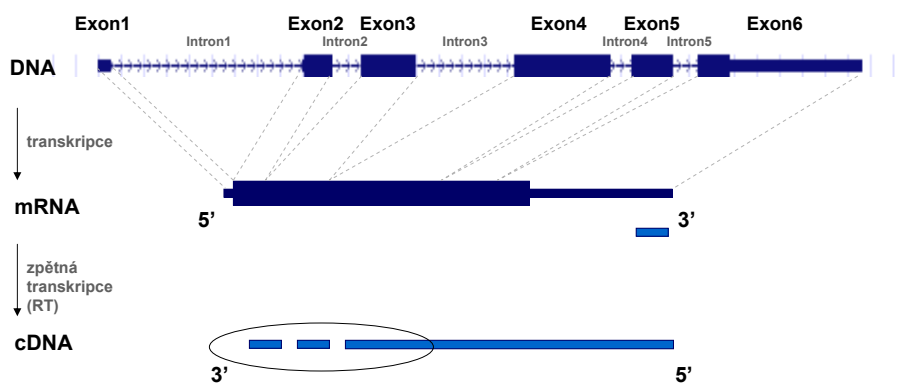


Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.  
Quantitative monitoring of gene expression patterns with a  
complementary DNA microarray. Science 270: 467-70, 1995.

## Genová exprese



## Genová exprese



**cDNA: jednořetězcová DNA (v dalším kroku je možné syntetizovat druhý řetězec)  
u genů s dlouhou mRNA nemusí vznikat vždy celá cDNA**

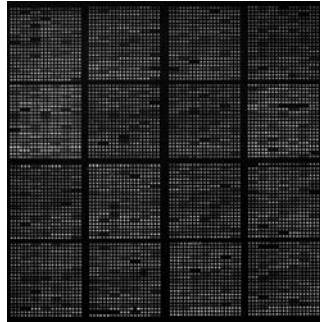
## Metody měření množství mRNA

<u>Method</u>	<u>Typical Throughput</u>	<u>Comments</u>
•Northern blot	1 gene	•Standard procedure; "Gold standard", Low throughput
•Subtractive cloning	↑ Increasing throughput ↓	•Mid-1980's, Not comprehensive, High FP
•Differential display		•1992, Follow up cloning required; Potential to identify rare mRNAs, High FP (Liang & Pardee, Science 257: 967-71, 1992)
•RT-PCR and Real-time RT-PCR		•Sequence I.D. & semi-quantification, FP?
•2D protein gel/Mass Spec		•2001, Sequence I.D. & quantification, FP? (Han et al., Nature Biotech 19: 946-951, 2001)
•ICAT/Tandem Mass Spec		•1995, Prior sequence knowledge not mandatory, Moderate FP - depends on level of survey (Lee et al., PNAS 92: 8303-7, 1995; Velculescu et al. Science 270: 484-7, 1995)
•EST/SAGE		
•High density arrays	20,000-40,000 genes	•1995, Identification of differentially expressed genes dependent on arrayed elements, Low FP (Schena et al. Science 270: 467-70, 1995)

From Lee N. H. presentation: Introduction to High Density Microarrays

## Měření množství mRNA

(microarrays tištěné pomocí skleněných kapilár)



## Typ sond

### I. dlouhé oligonukleotidy:

~ 60 - 70mers

komerčně dostupné (Operon, Agilent)

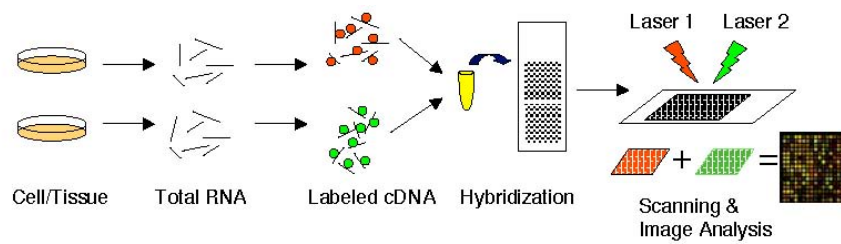
### II. cDNA:

knihovny cDNA vektorů (IMAGE, MGC)

dostatečné množství DNA se vyprodukuje pomocí PCR  
(univerzální primery pro daný typ vektorů)



## Experimentální design



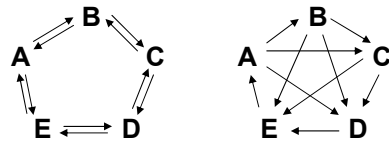
## Experimentální design

Porovnání exprese mezi vzorky:

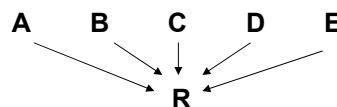
A ↔ B

B D ???  
E C A

1. **Loop design:** každé dva vzorky jsou hybridizovány na jedno sklo (plus vzájemná záměna fluorochromů)



2. **Reference design:** každý vzorek je hybridizován s referenčním vzorkem, který pak slouží jako převodník mezi různými vzorky



## Experimentální design

### Loop design

poskytuje přímé srovnání mezi vzorky  
o každém vzorku získáme více informací - kontrola  
vyžaduje větší množství RNA z každého vzorku  
špatný vzorek více ovlivní celý experiment

### Reference design

lze jednoduše rozšířit o nový vzorek  
jednodušší interpretace výsledků  
vyžaduje méně RNA ze vzorků  
špatný vzorek méně ovlivní celý experiment

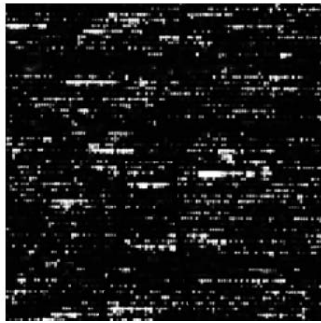
## Fluoresceční značení

Značení:

**Přímé:** jeden z nukleotidů je značen fluorescenční značkou  
nukleotid s fluorescenční barvou zabírá více místa →  
značen každý 30-35 nukleotid → nižší intenzita fluorescence  
než nepřímé značení

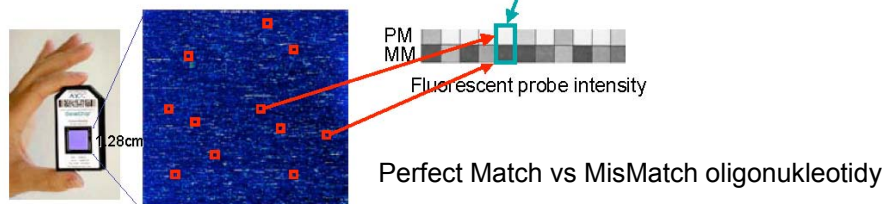
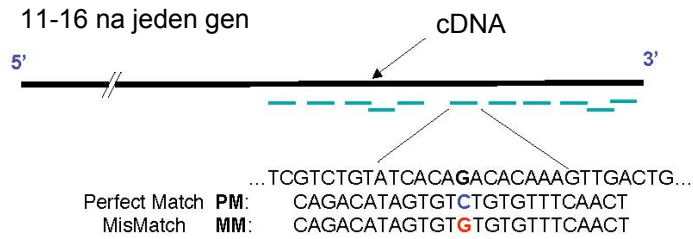
**Nepřímé:** jeden z nukleotidů modifikován reaktivní amino  
skupinou, na kterou se potom váže fluorochrom (NHS  
ester forma)  
pracnější v laboratoři než přímé značení

## Měření množství mRNA (fotolitograficky připravené microarrays)

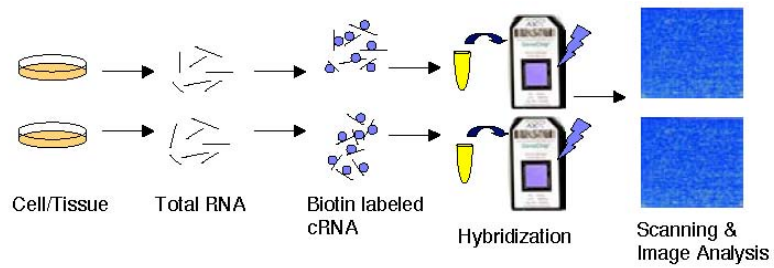


### Typ sond

oligonukleotidy 25bp  
blíže k 3' konci  
11-16 na jeden gen



## Experimentální design



## Fluorescenční značení

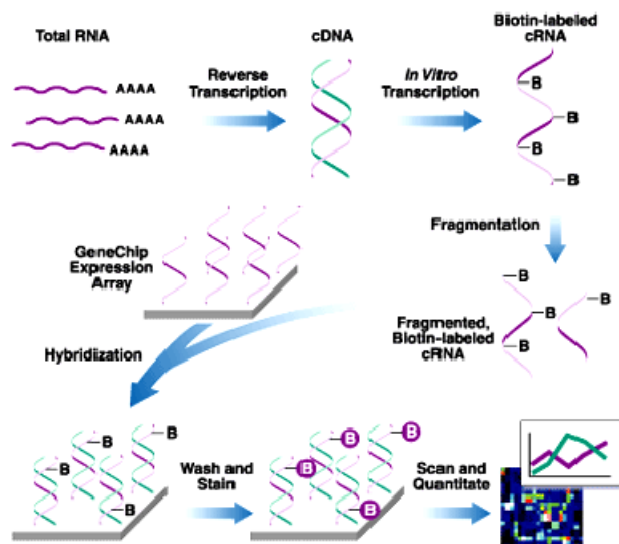
**Nepřímé:** jeden z nukleotidů modifikován biotinem, který se detekuje pomocí fluorescenčně značené protilátky až po hybridizaci

biotinem se značí cRNA (in vitro transcription)

mRNA → first strand cDNA → double strand cDNA → cRNA



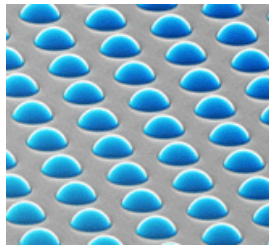
## Fluoresceční značení



## Porovnání tištěných a fotalitograficky připravených microarrays

	tisk kapilárami	fotalitografie
počet sond	~ max 33 000	~ max 390 000
příprava	náročná práce s knihovnamí (neplatí pro dlouhé oligo)	jednodušší
tisk	větší variabilita mezi skličky	menší variabilita mezi skličky
design experimentu	umožňuje přímé srovnání	nepřímé srovnání
alternativní sestřih	nelze studovat (neplatí pro dlouhé oligo)	možné studovat
úprava podle požadavků	jednoduchá	dříve nemožná, dnes možná

## Měření množství mRNA (Allumina samosestavovací arrays)



## Samosestavování silikonových kuliček

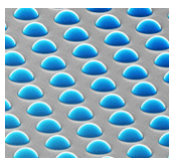
základní stavební jednotka: silikonová kulička (3 $\mu$ M)

kulička nemá přesně dané místo na sklíčku, po fixaci na sklíčku je její typ identifikován díky sekvenci části oligonukleotidu

oligonukleotid:

- I. **adresa** (definuje typ kuličky)
- II. **vlastní sonda** - oligonucleotid (50 bp), který je specifický pro jednotlivé transkripty

míra exprese mRNA = intenzita fluorescence navázané cRNA



## Objevování nových transkriptů

objevování nových transkriptů, které nejsou ještě ve veřejných databázích (např. SeqRef, Emsembl)

nebylo to možné pomocí výše zmíněných technologií, protože ty jsou založené na znalostech obsažených v databázích

Řešení:

tilling arrays (Affymetrix)

mRNA sequencing (Illumina)

## „Tilling“ arrays

**sondy na sklíčku pokrývají kompletně určitou oblast genomu popř. celý genom**

repetitivní sekvence nejsou pokryty (před návrhem sond jsou odstraněny pomocí programu „RepeatMasker“)

sondy: oligonukleotidy (Affymetrix - 25bp, NimbleGen – 60bp)  
(např: 38 arrays, každé obsahuje 390 000 sond - 60mer  
pokryje celý lidský genom - NimbleGen)

po hybridizaci s fluorescenčně značenou cRNA „svítí“ sondy, které představují transkribovaná místa ve studované oblasti (genomu)

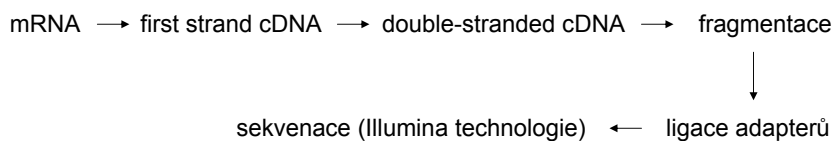
sondy v místech „bez transkripce“ mají intenzitu fluorescence na úrovni pozadí

lze detekovat nové exony, jejich alternativní sestřih

## mRNA sequencing

objevování nových transkriptů pomocí Illumina sekvenační technologie

není potřeba navrhovat, tisknout nebo syntetizovat sondy



## mRNA sequencing

