Mikročipy

.

Mikročipy, mikrouspořádání, microarray

- Nová technologie využívající hybridisace – pro studium genové exprese
- Na mikroskopickém sklíčku jsou ukotveny ve velkém počtu krátké oligonukleotidy (např. 80 x 80),
- které reprezentují všechny geny organismu
- současně jsou hybridizovány s molekulami cDNA (radioaktivně nebo fluorescenčně značenými)
- Hybridisace je detekována pomocí laseru s vysokou rozlišovací schopností

Mikročipová analýza umožňuje

- Zjistit, které geny se exprimují
- identifikovat sady genů, které reagují stejným způsobem na určitý podnět (např. změna teploty jiná změna prostředí)
- zjistit, které geny jsou exprimovány, indukovány nebo reprimovány v závislosti na buněčném cyklu, fázi vývoje apod.
- Sada genů, jejichž exprese se zvyšuje nebo snižuje vlivem stejných podmínek, má pravděpodobně stejnou funkci
- Určitý typ genové exprese může indikovat abnormální buněčnou regulaci (např. při určitém onemocnění)
- Intenzita měřeného signálu je úměrná množství transkriptu v populaci RNA

Zpětná (reverzní) hybridizace

- Soubor neznačených oligonukleotidů (sond) je imobilizován na pevném podkladu, k nimž hybridizuje vzorek obsahující testovanou značenou DNA.
- (Značeny mohou být ukotvené oligonukleotidové sekvence a k hybridizaci může být použita mRNA nebo DNA)

Kroky v čipové analýze genové exprese

- 1. konstrukce čipu
- 2. příprava sondy
- 3. hybridizace sondy s čipem
- 4. snímání a detekce hybridisačních produktů
- 5. normalizace a analýza dat

1. Konstrukce čipu

- Dvě základní technologie
- - nakapávání DNA fragmentů (oligonukleotidů) na čip (podložní sklíčko)
- - syntéza oligonukleotidů přímo na čipu

Nakapávání na čip

- nakapávají se PCR produkty (po amplifikaci genomové DNA), cDNA (po reverzní transkripci mRNA), oligonukleotidy (chemicky syntetizované)

Nakapávání s využitím speciálně konstruovaných zařízení

- Pomocí jehly (tvar a hustota nanesených kapek jsou dány průměrem a tvarem jehly a viskozitou roztoku)
- Pomocí kličky a kroužku (kličkou se dávkují kapičky, kroužek je udržuje) výhoda: do kapek lze použít různé množství DNA
- S využitím principu inkoustové tiskárny (umožňuje zmenšení objemu kapky na pl)

Syntéza přímo na čipu

- Oligonukleotidy jsou syntetizovány na pevném nosiči – sklíčku (využívá se fotolitografických předloh nebo bezmaskové technologie spolu s fotodeposiční chemií)
- Jsou dlouhé 15-25 bp
- Různé sekvence představují jednotlivé geny
- Lze analyzovat malá množství transkriptů
- Eliminovat šum a falešně pozitivní výsledky

2. Příprava a detekce sondy pro analýzu mRNA

- syntetizuje se biotinylovaná cDNA, provede se hybridizace, hybridisační produkt je detekován pomocí avidinu s přikonjugovaným fluoroforem (cyanin, Cy5, Cy3, fluorescein, rhodamin)
- Použití většího počtu barviv pro značení umožňuje současné srovnání přítomnosti různých mRNA v analyzovaném vzorku

3. Hybridizace sondy s čipem

- Podmínky hybridizace nejsou pro jednotlivá místa čipu stejné z důvodu různých sekvencí imobilizovaných nukleotidů
- Volí se taková stringence (teplota a koncentrace solí), která dává dostatečně intenzivní signály odlišitelné od slabších signálů v případě hybridizace s částečně komplementární sekvencí
- Součástí čipu jsou kontrolní RNA transkripty
- Relativní množství jednotlivých transkriptů v analyzovaném a kontrolním vzorku je stanoveno podle intenzity signálů detekovaných pro jednotlivé fluorofory s přihlédnutím k rozsahu signálních poruch.

4. Snímání a detekce hybridizace

- Krycí sklíčka jsou po hybridizaci snímána a vizualizována pomocí různých typů čtecích zařízení – CCD kamery, nekonfokální a konfokální laserové skenery např. ScanArray 3000
- Obrazy jsou analyzovány s určitým cílem
- (Zjistit expresní úroveň jednotlivých genů
- Identifikovat rozdílně exprimované geny apod.)
- a
- K tomu se používají počítačové programy např. GenePixPro 3.0.5. nebo ScanAnalyse

5. Normalizace a analýza dat

- Provádí se normalizace relativních intenzit fluorescence v každém ze snímaných kanálů (Cy3, Cy5)
- Analyzují se výsledky 3 a více nezávislých experimentů
- Variabilita se stanovuje po zhodnocení šumu
- Stanoví se reprodukovatelnost u jednotlivých duplikovaných genů na daném čipu

Lze očekávat

- Že se měřitelné změny v expresi projevují u stovek genů
- K identifikaci a třídění genů podobně exprimovaných (tzv. klastry genů) se používají počítačové programy např. Cluster nebo Tree view
- Získáme tzv. klastrové algoritmy mikročipové analýzy

Mikročipová analýza umožňuje

- detekovat globální změny v transkripci genomu,
- avšak neposkytuje informaci o hladinách proteinových produktů, jež mohou být regulovány na úrovni translace. K tomu se využívá dvourozměrná gelová elektroforéza.

Mikročipová analýza umožňuje provádět

- srovnávací genomiku
- Genotypizaci
- Diagnostiku

V mikrobiologii

- Se využívají tzv. diagnostické čipy
- Pro identifikaci různých baktérií např. v klinickém materiálu

Konstrukce DNA mikročipu *Lactococcus lactis* IL1403

- Vychází ze sekvence kompletního genomu tohoto kmene
- Genom obsahuje 2310 ORF (otevřených čtecích rámců) s průměrnou délkou 900 bp
- 370 paralogních rodin (vznikly duplikací)
- Když se nebraly v úvahu tyto duplikované geny a IS elementy, zůstalo 1920 ORF

Při konstrukci mikročipu byly využity PCR produkty

- Nejprve bylo pečlivě pro každý specifický ORF navrženo a syntetizováno 1920 párů primerů
- Na 5´konec primerů byla přisyntetizována univerzální sekvence 15 nukleotidů
- PCR reakce proběhla v mikrotitrační destičce v objemu 100 ul
- První PCR byla provedena s 10 ng genomové DNA
- Druhá PCR byla provedena s 5 ul 40x ředěných PCR produktů a s C12-NH2 modifikovanými univerzálními primery
- Úspěšně bylo amplifikováno 96% genů (z 1920)

PCR produkty

- byly purifikovány a pečlivě kovalentně imobilizovány na skleněné sklíčko (0.6 nl kapky na ploše 1.8 x 1.8 cm, 15x15 kapek vzdálených 200 mikronů).
- Jako kontrola byla použita sada arteficierních genů jako univerzálních referenčních genů

Hybridizaci lze provádět

- Pomocí značené cDNA získané z buněk *Lactococcus lactis*
- Lze sledovat expresi jednotlivých genů

Kromě DNA čipů se konstruují

- Proteinové (peptidové) čipy – interakce proteinů
- Imunočipy (imobilizované protilátky) k vyhledávání cílových buněk

Výsledek čipové analýzy

- . Různá zabarvení v jednotlivých místech čipu

Geny klasifikujeme podle funkce

- Paralogy jsou velmi podobné geny, kódující příbuzné biologické funkce. Vznikly pravděpodobně genovou duplikací. Sekvenční podobnost je často indikátorem stejné biochemické funkce.
- Ortology jsou geny, které kódují proteiny, které jsou identické ze 60 až 80%. Dva enzymy, které provádějí stejnou biochemickou reakci, nemusí být evolučně příbuzní.