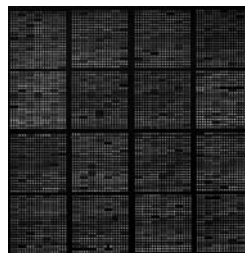


## Principy microarrays

Pavla Gajdušková  
Analytická cytometrie, 13. listopadu 2012

## Microarrays

Kolekce DNA sond přichycených k pevnému podkladu



„Tisťená“ microarrays



Fotolitografie

## Microarray technologie

- I. **Výběr sond (probes):** cDNA vektory, BAC vektory, krátké nebo dlouhé oligonukleotidy, proteiny, tkáně
- II. **Příprava microarray:** nanosení 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

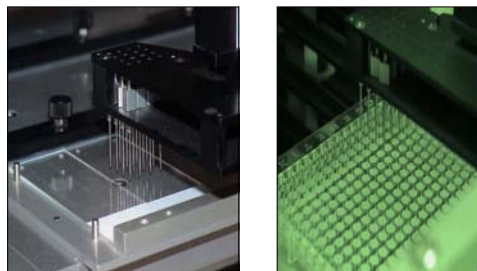
Úvod do statistického hodnocení dat

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)

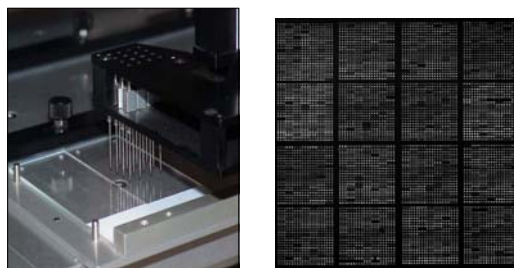
## Microarrays tištěná pomocí skleněných kapilár



## 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)

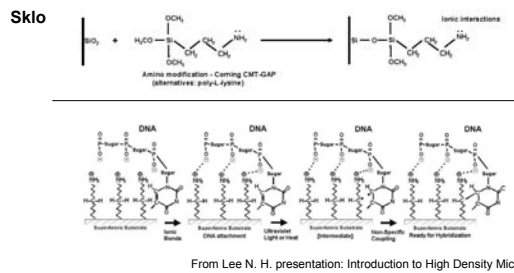
## Microarrays tištěná pomocí skleněných kapilár



## Úprava povrchu sklíček pro tisk arrays I

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

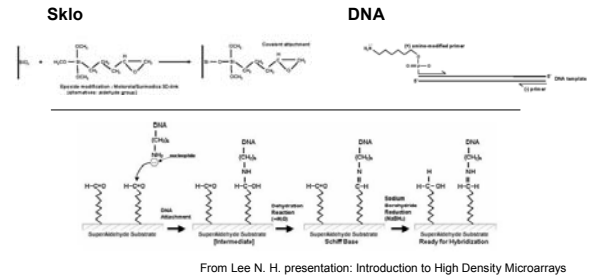
modifikace povrchu → natisknutí DNA sond → UV ozáření



## Úprava povrchu sklíček pro tisk arrays II

povrchová úprava skla: epoxidová modifikace

úprava DNA: amino-modifikace DNA

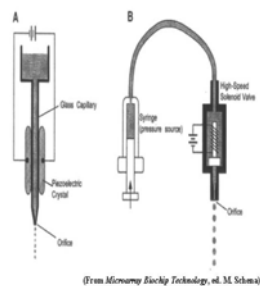


## “ink-jet” tisk

Oligonukleotidy dlouhé 60 b

pravidelnější tvar sond  
a jejich rozmístění

firma: Agilent



## Fotolitografický způsob přípravy

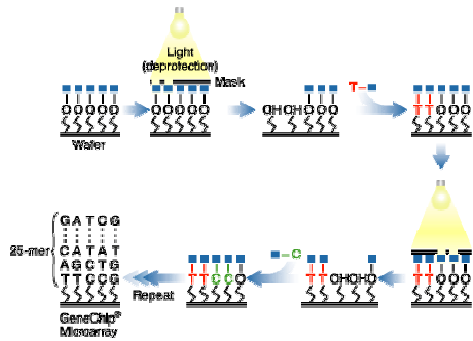
syntéza oligonukleotidů přímo na membráně



„In-situ“ syntéza

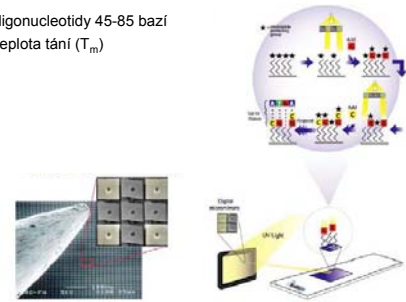
### Fotolitografický způsob přípravy (Affymetrix)

sondy = oligonukleotidy délky 25 bází



### Fotolitografický způsob přípravy (NimbleGen)

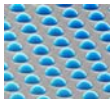
sondy = oligonucleotidy 45-85 bází  
podobná teplota tání ( $T_m$ )



### 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

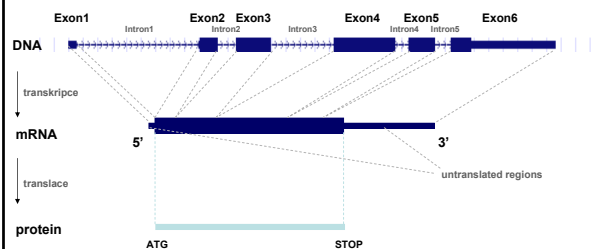


### Oblasti použití microarrays v biologii

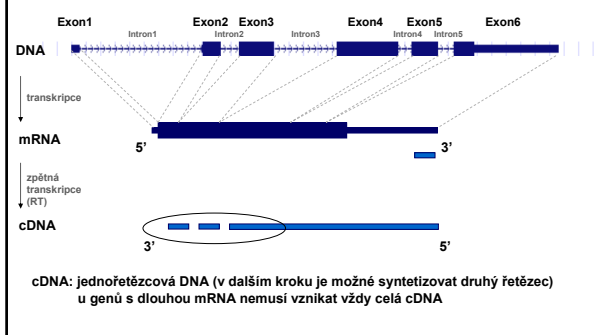


Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.  
Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270: 467-70, 1995.

### Genová exprese



## Genová exprese



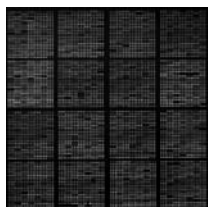
## Metody měření množství mRNA

Method	Typical Throughput	Comments
•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: 8203-7, 1995; Valdesara et al. Science 270: 484-7, 1995)
•EST/SAGE	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)
•High density arrays		

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

## Měření množství mRNA

(microarrays tištěné pomocí skleněných kapilár)



## Typ sond

### I. dlouhé oligonukleotidy:

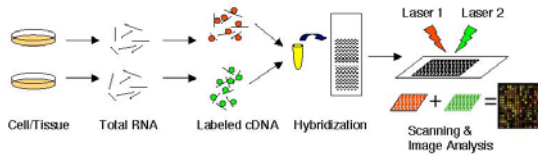
~ 60 - 70mers  
komerčně dostupné (Operon, Agilent)

### II. cDNA:

knihovny cDNA vektorů (IMAGE, MGC)  
dostatečné množství DNA se vyprodukuje pomocí PCR (univerzální primery pro daný typ vektorů)



## Experimentální design



### Příklady použití v molekulární biologii (na úrovni mRNA):

- aplikace chemické látky na buněčnou kulturu a její vliv na expresi různých genů (najít geny, které sníží nebo naopak zvýší expresi mRNA)
- zvýšení exprese mRNA zvoleného genu vnesením plasmidu → nalezení dalších genů se změněnou expresí
- snížení exprese mRNA zvoleného genu po vnesení specifické siRNA → nalezení dalších genů se změněnou expresí

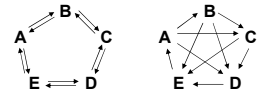
## Experimentální design

Porovnání exprese mezi vzorky:

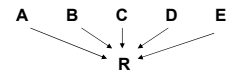
A ↔ B

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

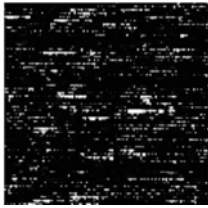
## Fluoresceční značení

Značení:

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

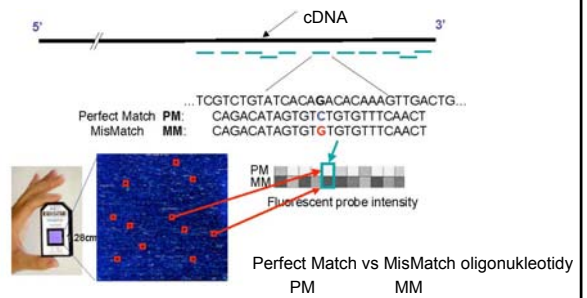
**Nepřímé:** jeden z nukleotidů modifikován reaktivní amino  
skupinou, na kterou se potom váže fluorochrom (NHS  
ester forma)  
pracnější v laboratoři než přímé značení

## Měření množství mRNA (fotolitograficky připravené microarrays)



## Typ sond

oligonukleotidy 25 bází



## Typ sond

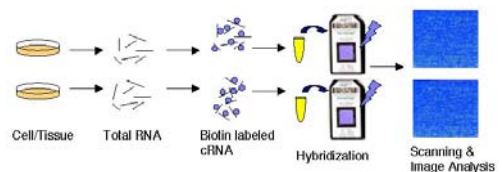
oligonukleotidy 25 bází

**Dříve:**  
sondy blíže k 3' konci mRNA  
11-16 na jeden gen  
PM, MM sondy

**Nyní:**  
sondy v různých exonech genu (ideálně 4 sondy v každém exonu)  
jenom PM sondy

umožňuje studovat alternativní sestřih

## Experimentální design



**Příklady použití v molekulární biologii (na úrovni mRNA):**

- aplikace chemické látky na buněčnou kulturu a její vliv na expresi různých genů (najít geny, které sniží nebo naopak zvýší expresi mRNA)
- zvýšení exprese mRNA zvoleného genu vnesením plasmidu → nalezení dalších genů se změněnou expresí
- snížení exprese mRNA zvoleného genu po vnesení specifické siRNA → nalezení dalších genů se změněnou expresí



## Fluoresceční značení

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

biotinem se značí cRNA (in vitro transcription)

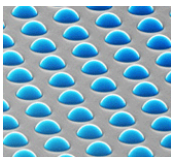
mRNA → first strand cDNA → double strand cDNA → cRNA

## Porovnání tištěných a fotolitograficky připravených microarrays

	tisk kapilárami	fotolitografie
<b>počet sond</b>	až 33 000	až 6 500 000
<b>příprava</b>	náročná práce s knihovnami (neplatí pro dlouhé oligo)	jednodušší
<b>tisk</b>	větší variabilita mezi skličky	menší variabilita mezi skličky
<b>design experimentu</b>	umožňuje přímé srovnání	nepřímé srovnání
<b>alternativní sestřih</b>	nelze studovat (neplatí pro dlouhé oligo)	možné studovat
<b>úprava podle požadavků</b>	jednoduchá	dříve nemožná, dnes možná

## Měření množství mRNA

(Allumina samosestavovací arrays)



## Samosestavování silikonových kuliček

základní stavební jednotka: silikonová kulička (3μM)

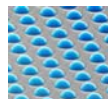
kulička nemá přesně dané místo na skličku, po fixaci na skličku je její typ identifikován díky sekvenci části oligonukleotidu

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

např: 14 arrays, každé obsahuje 2x 3 250 000 sond  
25 bází sonda, PM a MM, mezera mezi sondami 10 bází

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 → first strand cDNA → double-stranded cDNA → fragmentace  
↓  
sekvenace (Illumina technologie) ← ligace adapterů

## mRNA sequencing

