

Mikročipy v mikrobiologii

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2014

Obsah přednášky

- 1) Charakteristika biočipů, DNA microarrays a DNA chip**
- 2) Výroba čipů, charakteristika sond**
- 3) Experimentální design**
- 4) Podmínky pro aplikace čipové technologie**
- 5) Využití DNA a RNA čipů v mikrobiologii**
- 6) Proteinové čipy, příklady aplikací v mikrobiologii**



Doporučená literatura

Kromě základní doporučené literatury můžete využít odkazy k jednotlivým částem tématu

**Něco málo najdete i na stránkách
www.farmakogenomika.cz**

Princip mikročipů

Mikročipy (DNA čipy, RNA čipy, biočipy) jsou soubory mikroskopických políček se sondami navázanými na pevný povrch

- **Vycházejí z principu Southern blotu a reverzní hybridizace**
- **Slouží k simultánnímu měření exprese mnoha genů**
- **Využívají se k typizaci mnoha lokusů na genomech**
- **Na jednom políčku (spotu) jsou pikomoly (10^{-12}) DNA sondy**
- **Cílová sekvence je značena fluoroforem nebo chemiluminiscenčně**

Vypočítejte



Kolik molekul sondy o délce 20 nukleotidů obsahuje DNA spot, když množství DNA na něm je 1 pmol?

Ono je jedno, jak je ten oligonukleotid dlouhý!



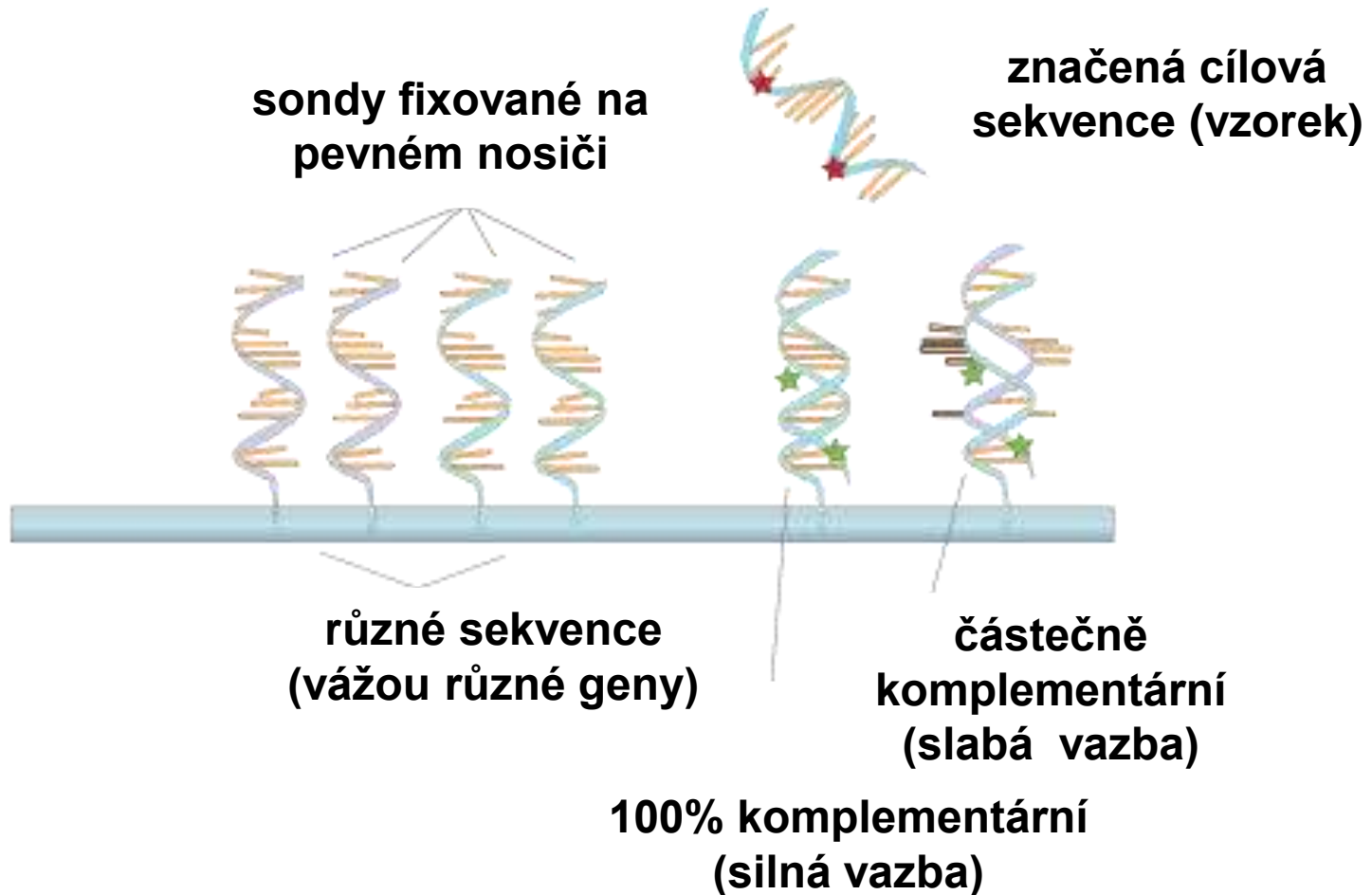
Řešení



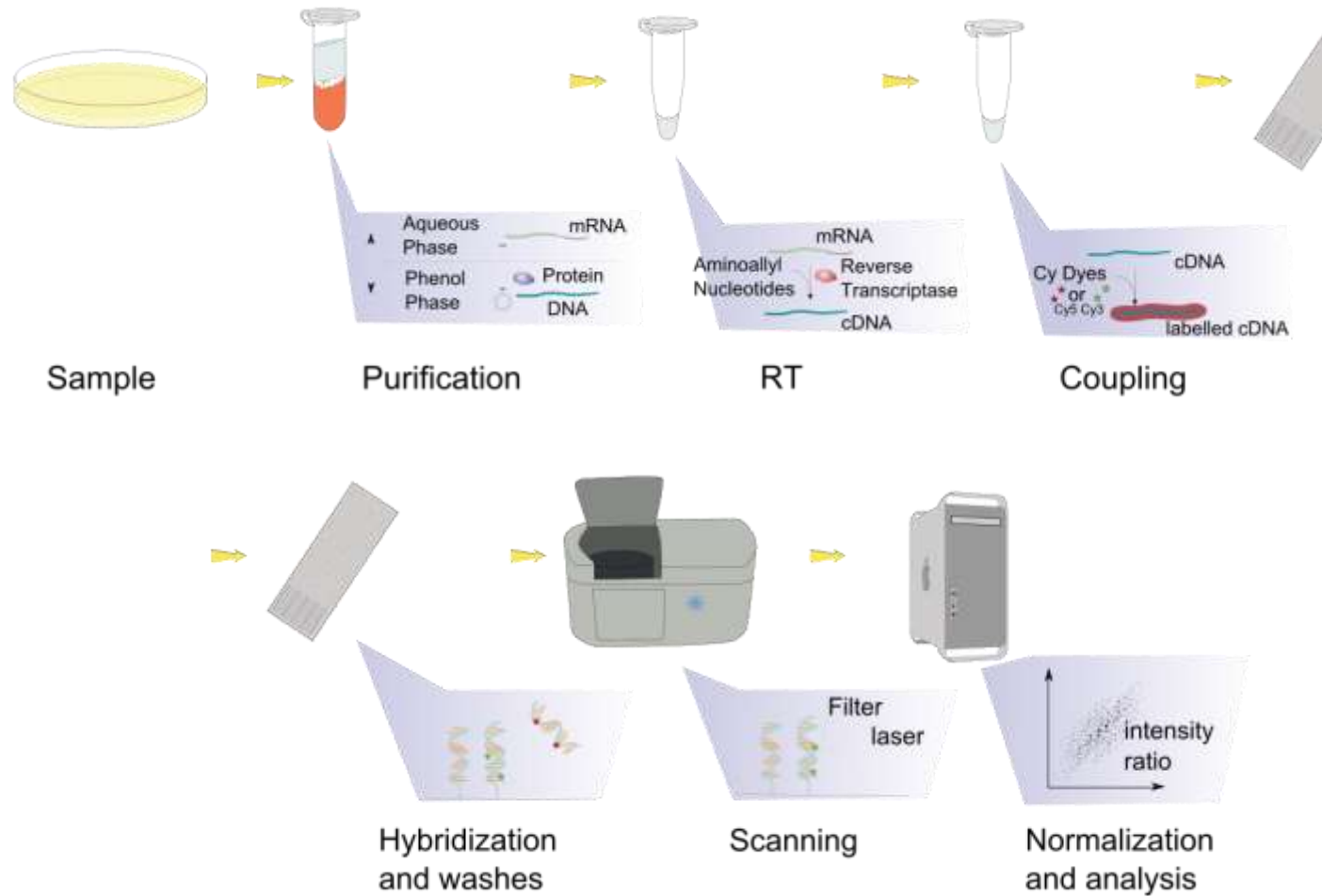
1 mol $6,023 \times 10^{23}$ oligonukleotidů

1×10^{-12} molů (pmol) ... $6,023 \times 10^{11}$ oligonukleotidů

Schéma základního principu



Experimentální provedení



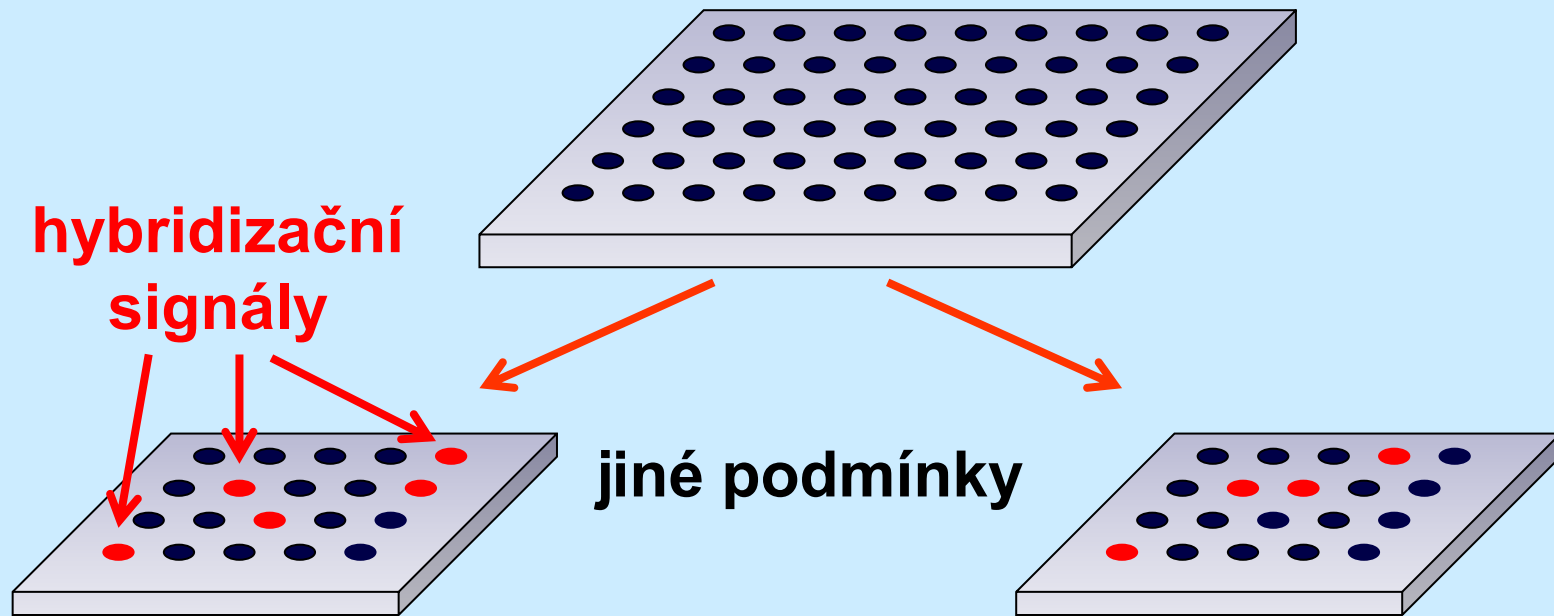
DNA microarrays versus DNA čip

A není to totéž?



Příklad DNA mikroarrays u kvasinek

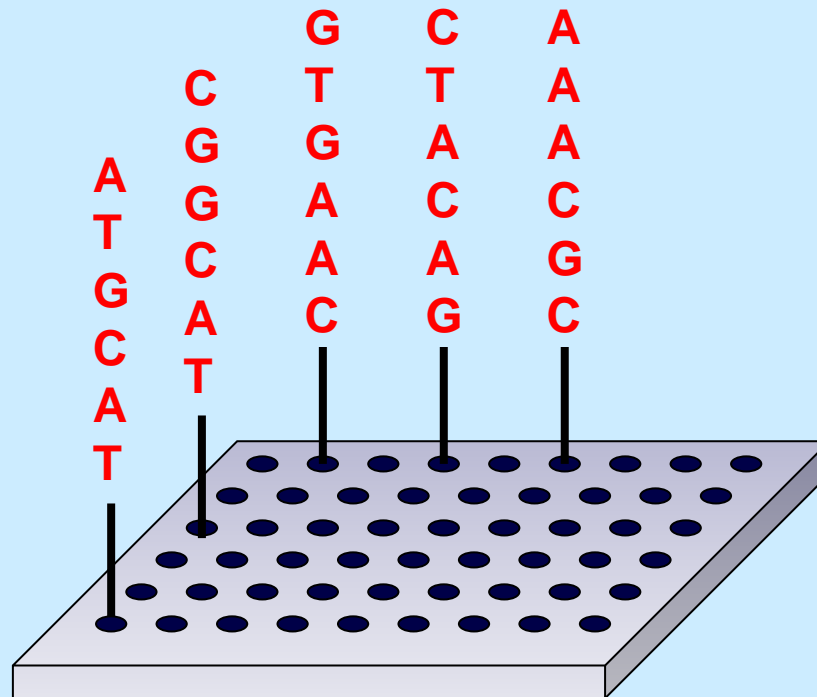
- Pro každý ze 6 000 genů byla připravena specifická sonda, stalo se v roce 1997
- DNA mikroarrays je sklíčko o rozměrech 80 x 80 spotů



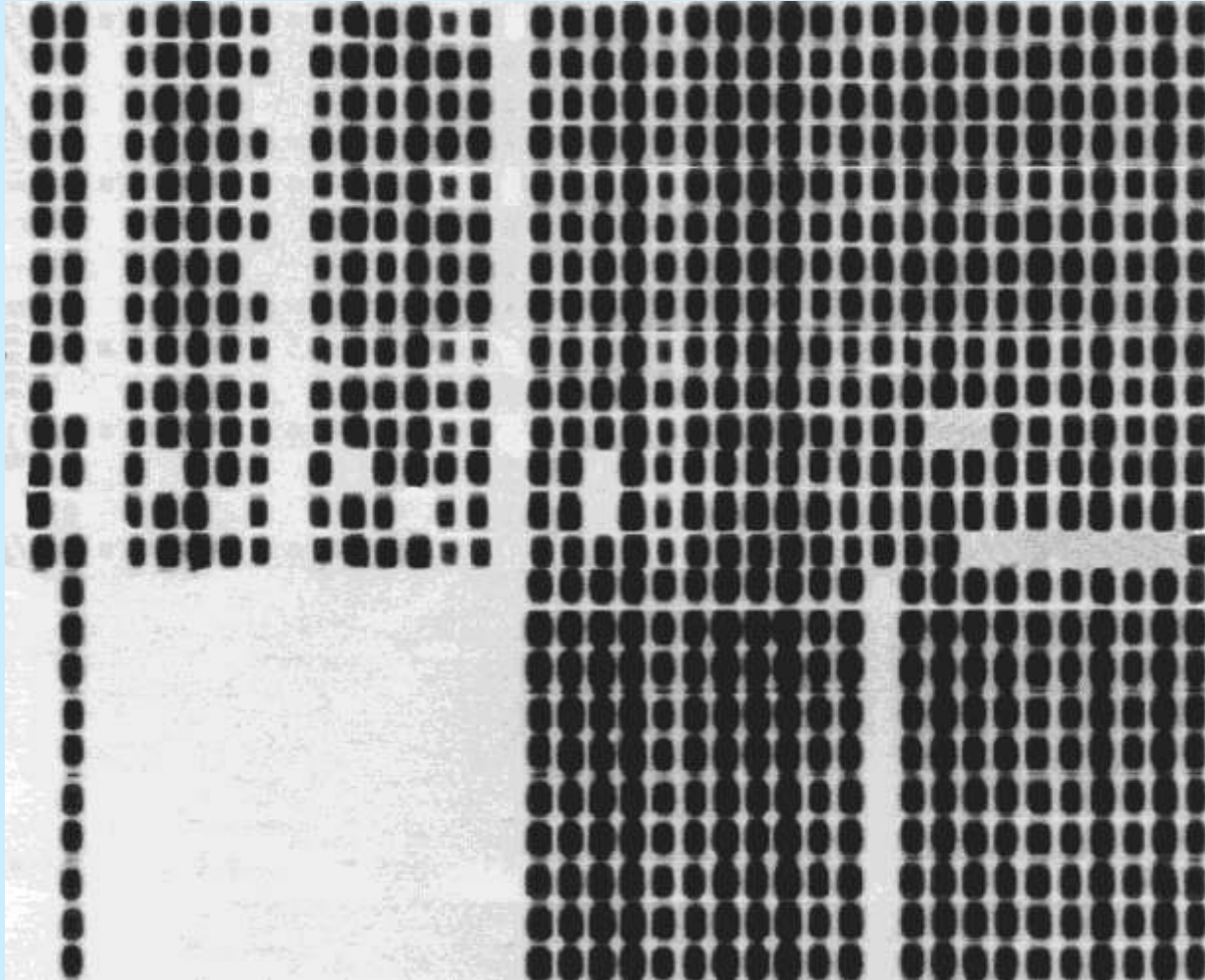
- Aktivita genů je sledována po izolaci mRNA a jejich konverzi na značenou cDNA
- Značená cDNA je hybridizována se spoty mikročipu

DNA čipy

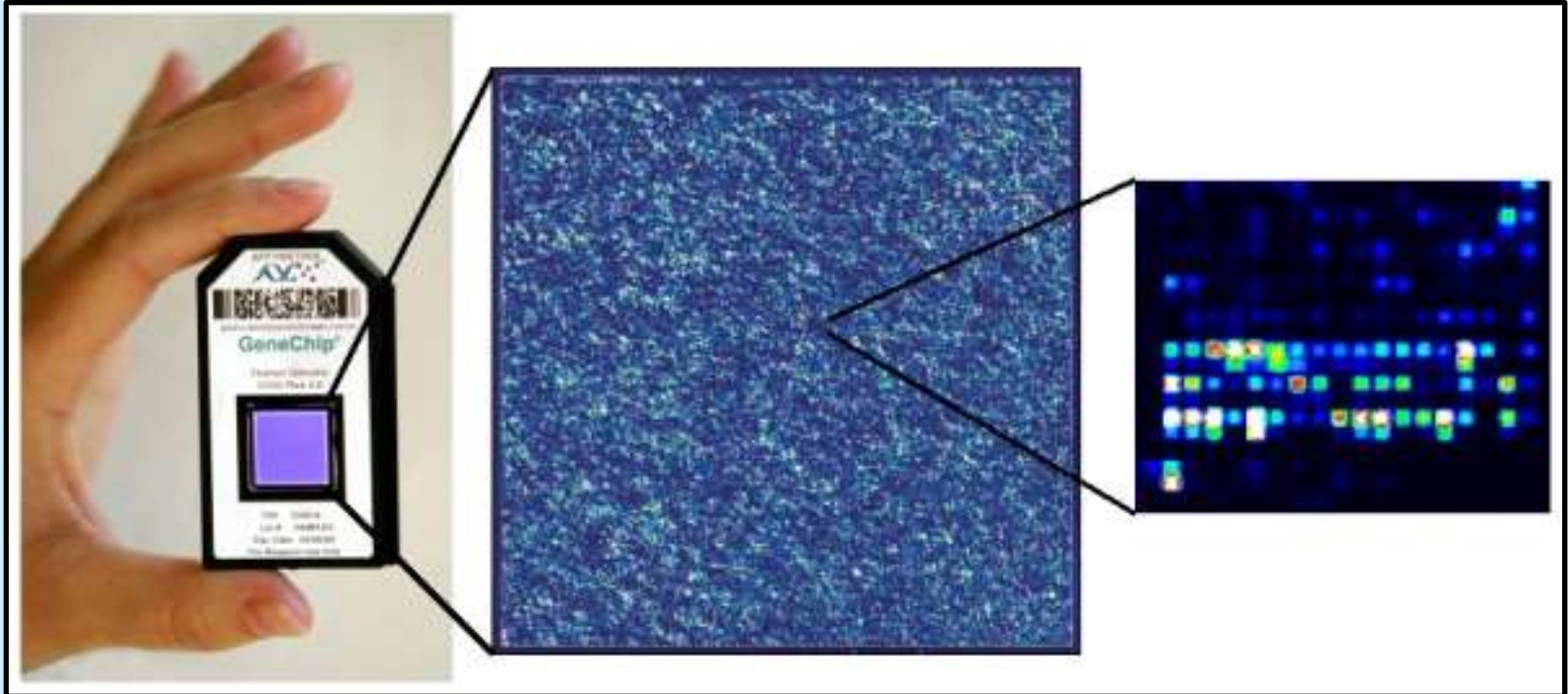
- Tenké silikonové membrány nesoucí spoty mnoha různých oligonukleotidů
- Oligonukleotidy jsou syntetizovány přímo na povrchu čipu a jejich sekvence jsou nahodilé
- Hustota je až 1 milion spotů na cm^2
- Hybridizační signály je možné detekovat jen elektronicky



Spoligotypizace - DNA microarrays?



Jak takové čipy vypadají?



<http://www.abdn.ac.uk/ims/facilities/microarray/images/handtozoom.jpg>

Jak probíhá výroba čipů?

Nanášení kapek na podklad

- **Robot nanese na definovaná místa mikroskopické kapky obsahující molekuly jednoho typu**

Syntéza oligonukleotidů *in situ* - fotolitografie

- **Destička zakryta inertním materiálem a poté odkryta na požadovaných místech**
- **Destička vnořena do směsi obsahující nukleotidy jednoho druhu – nukleotidy se přichytí na otevřená místa**
- **Destička je zakryta, odkryta na dalších místech a ponořena do směsi s dalším nukleotidem**

Jak probíhá detekce?

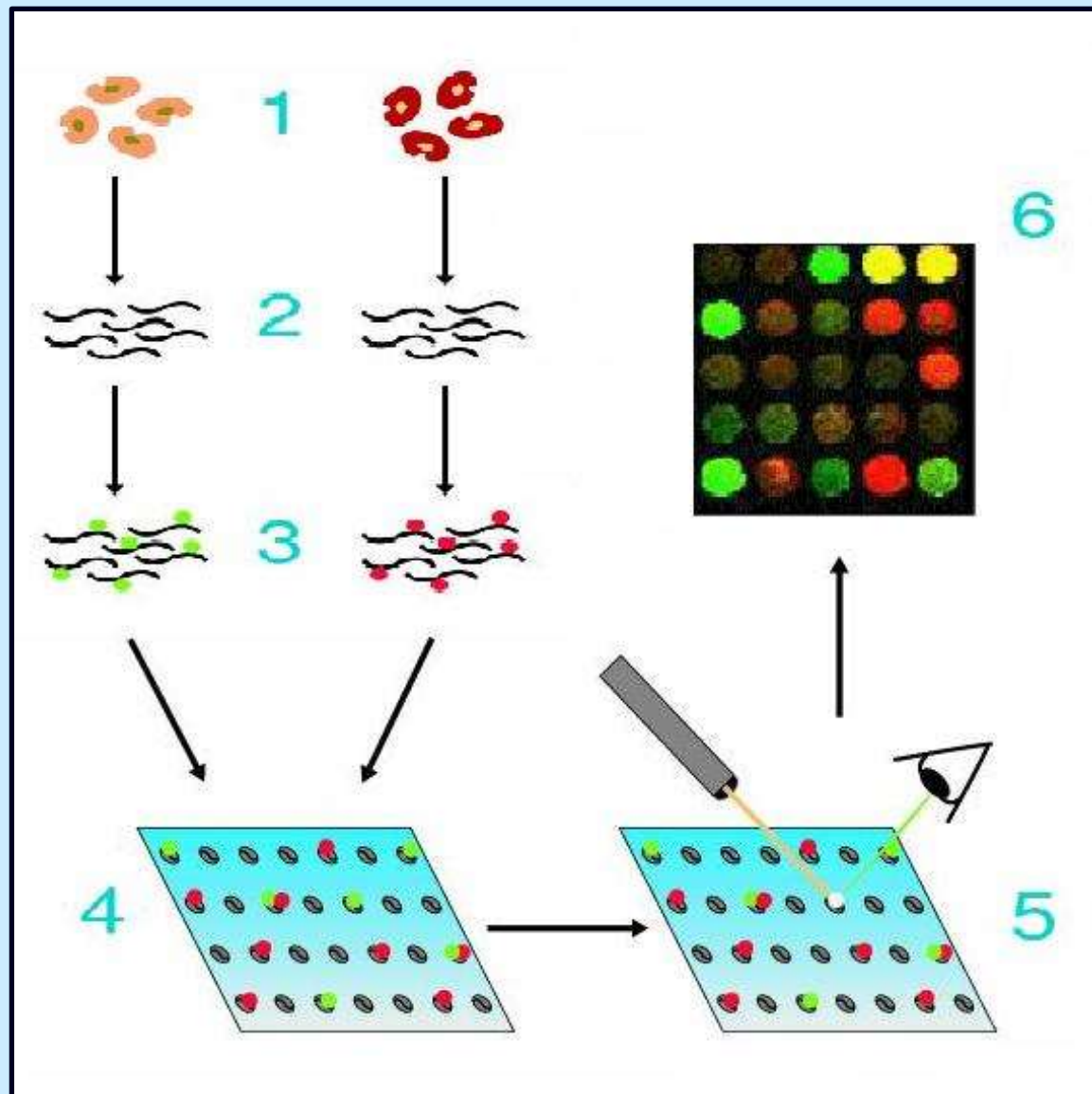
Jednokanálová detekce

- **Signál je nebo není přítomen**

Dvoukanálová detekce

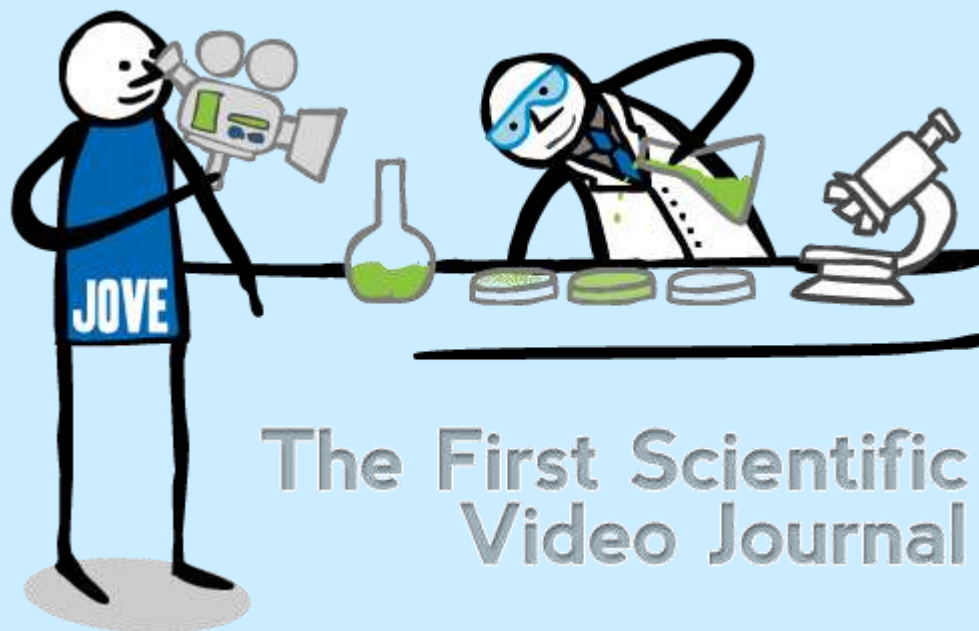
- **Porovnáváme profily dvou různých vzorků (bakterie rostoucí ve standardních podmínkách x bakterie rostoucí pod vlivem nějaké látky)**
- **Fluorofor Cy3 má emisní maximum při 570 nm (zelená)**
- **Fluorofor Cy5 má emisní maximum při 670 nm (červená)**
- **DNA čip je opracován produkty obou značení**
- **Porovnává se poměr intenzit záření Cy3/Cy5**

Dvoukanálová detekce



Podívejte se na video

<http://www.jove.com/video/2546/dna-microarrays-sample-quality-control-array-hybridization-and-scanning>



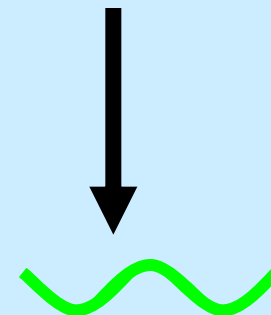
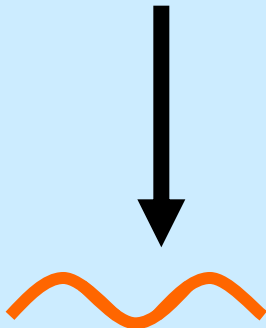
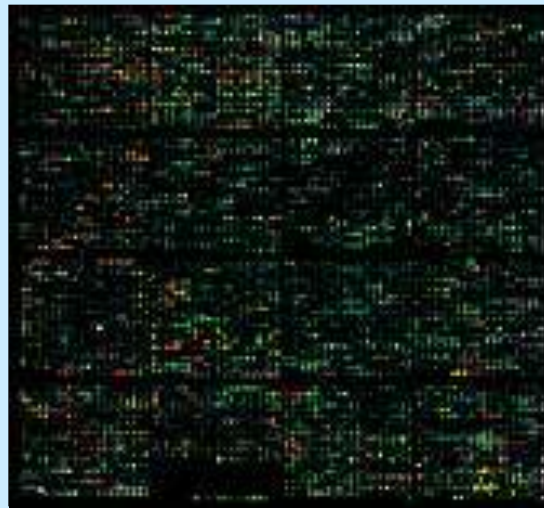
K čemu jsou DNA a RNA čipy

- **analýza přítomnosti a nepřítomnosti genů**
- **porovnání genomů dvou mikroorganismů**
- **porovnání exprese u dvou mikroorganismů**

Porovnání exprese

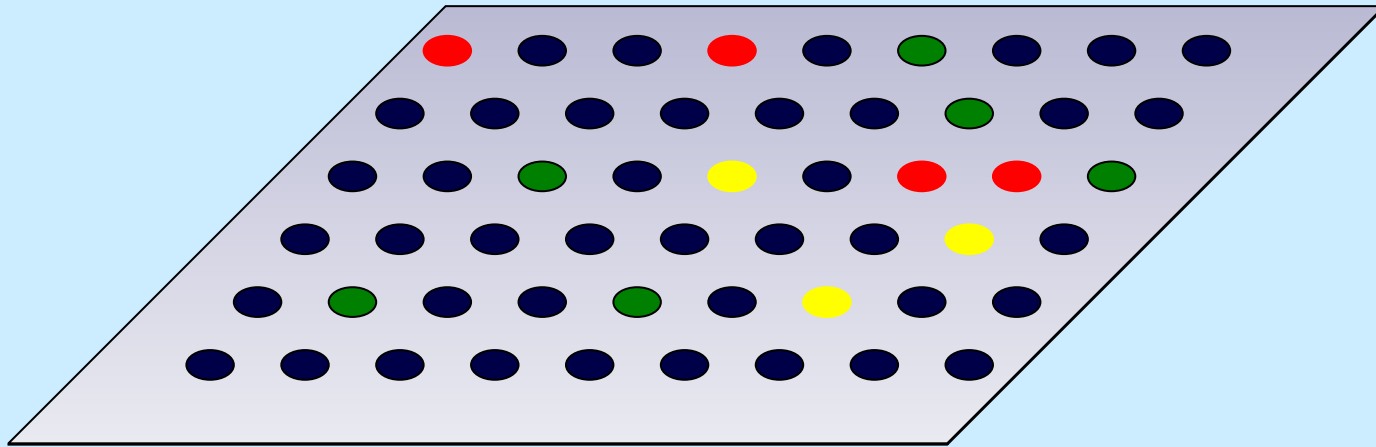
Kultivace za normálních podmínek

Kultivace za změněných podmínek



Hybridizace

Jak vyhodnotit detekci na čipu



- Signály genů exprimovaných za „standardních“ podmínek
- Signály genů exprimovaných za „změněných“ podmínek
- Signály genů exprimovaných v obou podmínkách
- Geny, které nebyly exprimovány

Vyhodnot'te expresi s využitím učební pomůcky



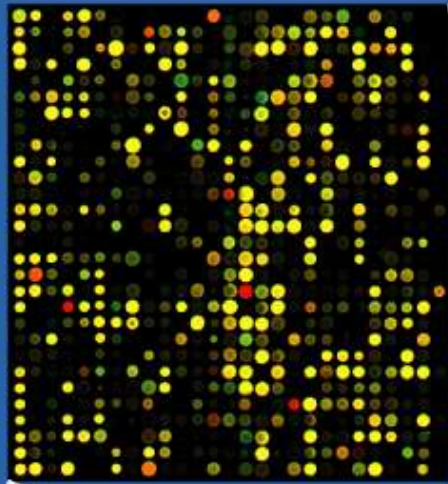
**„Analýza metabolických drah
na DNA čipu 01“**

Vyhodnot'te expresi s využitím učební pomůcky

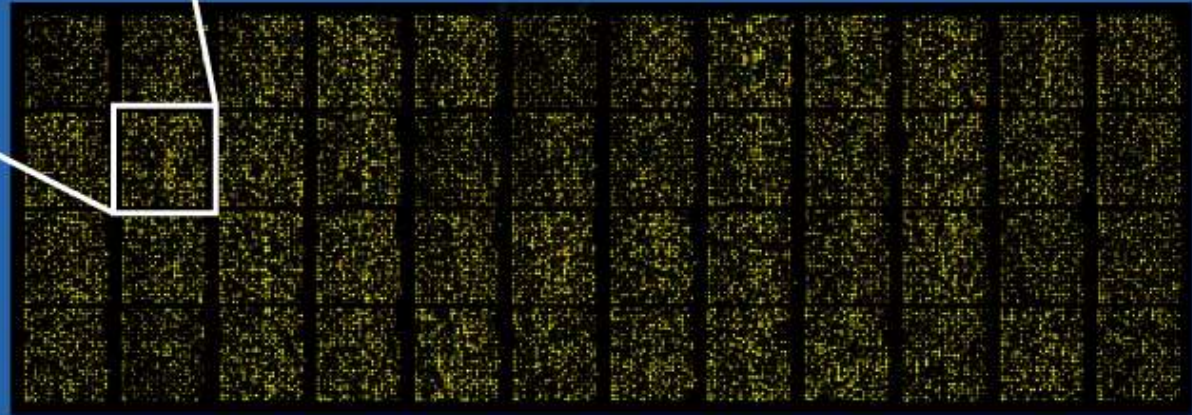


**„Analýza metabolických drah
na DNA čipu 02“**

Jiný příklad



Asi 40000 sond
natištěných na čipu +
detail výřezu





Pořád nevím, jaký je rozdíl mezi DNA čipem a RNA čipem

DNA čipy = DNA/DNA – komparativní genomika

RNA čipy = DNA/cDNA – exprese genů



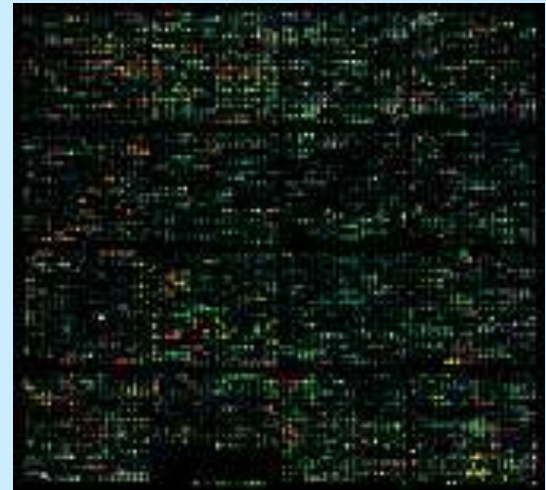
Shrnutí: využití DNA a RNA čipů

DNA čipy

- **porovnání genomů v mikrobiologii**
- **analýza přítomnosti a nepřítomnosti genů**
- **u člověka analýza genových polymorfismů – alely zodpovědné za onemocnění (farmakogenetika)**

RNA čipy

- **analýza genové exprese**
- **kvantifikace mRNA**



Podmínky pro využití čipů

Design experimentů

Standardizace

Statistická analýza

Design experimentů

Tři základní podmínky

- 1) Nezbytné jsou repliky biologických vzorků
- 2) Technické a biologické repliky - mohou být dva alikvoty stejné extrakce
 - Technické repliky (dva vzorky RNA získané z každé experimentální jednotky) napomáhají přesnosti a umožňují testovat rozdíly mezi skupinami
 - Biologické repliky (dvě nezávislé extrakce RNA)
- 3) Spoty každého oligonukleotidu jsou v alespoň duplikátech – zajištění technické přesnosti každé hybridizace

http://en.wikipedia.org/wiki/Expression_profiling

Standardizace

Není jí zatím dosaženo, existují jen různá doporučení

- **Minimum Information About a Microarray Experiment „MIAME“ (<http://en.wikipedia.org/wiki/MIAME>)**
- **„MicroArray Quality Control (MAQC) Project“ předložený FDA**
- **Functional GENomics Data (FGED) Society (http://en.wikipedia.org/wiki/MGED_Society)**

Statistická analýza

- **Data musí být normalizována**
- **Odfiltrování pozadí**
- **T-test, ANOVA, Bayesiánské metody, Mann-Whitneyův test**
- **Metody analýzy sítí pro odhalení asociativních a kauzativních interakcí nebo závislostí mezi produkty genů**

Podívejte se taky na

http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_chip_analysis

**Navštivte stránky a podívejte
se na animace**

**[http://www.bio.davidson.edu/
courses/genomics/chip/chip.
html](http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html)**



Jiné využití čipů

Sekvenování pomocí hybridizace (SBH)

- **Fluorescenčně značený fragment analyzované DNA je hybridizován k DNA čipu, který obsahuje všechny kombinace oligonukleotidů konstantní délky**
- **Více v přednášce o sekvenování**

Minisekvenování

- **Specifické primery imobilizovány na čipu**
- **PCR produkty jsou fluorescenčně značeny**
- **Více v přednášce o sekvenování**



Další informace

http://www.lab-manual.com/lm_107.htm

- **Základní i pokročilé znalosti o technologii**

<http://www.affymetrix.com/estore/>

- **Významná firma zabývající se čipovou technologií**

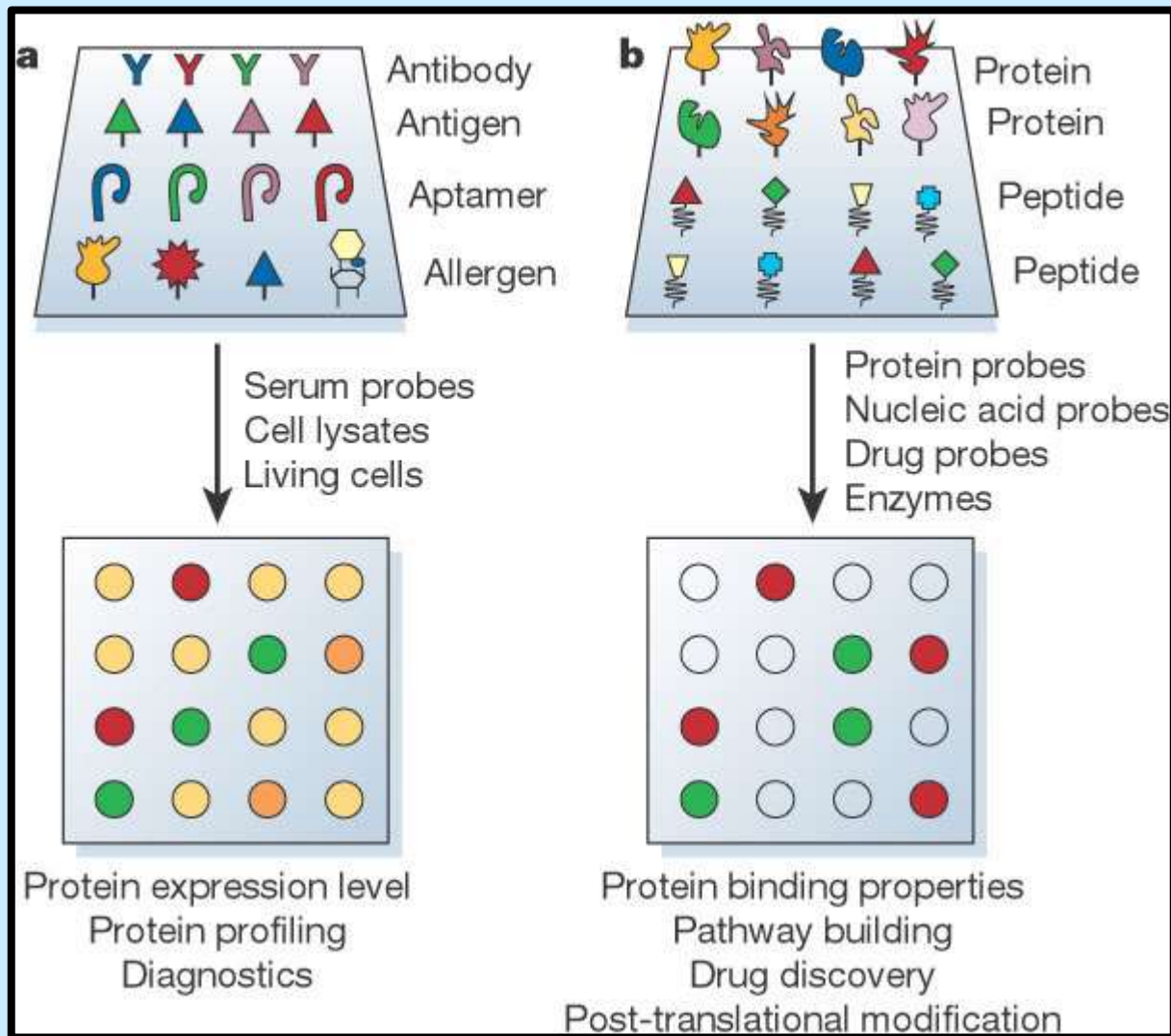
Proteinové čipy

Multiplexní analýza genové exprese

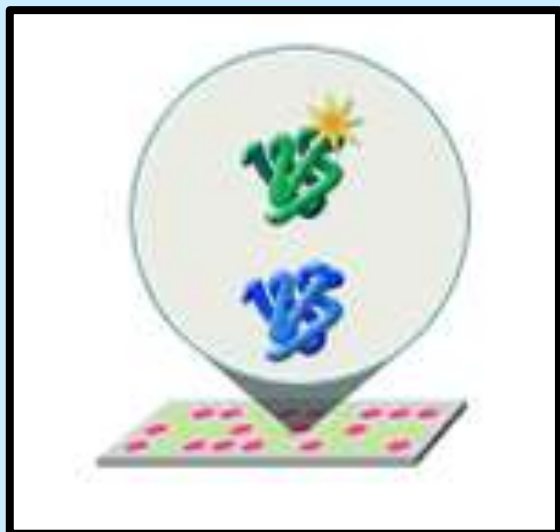
- **Vysoko hustotní, více než 1 000 elementů/čip**
- **Nízko hustotní, do 100 elementů/čip**
- **Slouží k identifikaci nových proteinů nebo sledování interakcí protein-protein**

- **Proteomické čipy**
- **Bodová ELISA s protilátkou**
- **Capture systém s jedinou protilátkou**
- **Čip s antigenem neboli reverzní čip**
- **Microarray western bloty**
- **Protein vázající čipy**

Princip fungování proteinového čipu



Proteomické čipy



- **Vysoko hustotní**
- **Proteinové sondy jsou navázány na pevný povrch**
- **Proteiny v testovaném vzorku musí být označeny fluoroforem nebo haptenem**
- **Součástí detekčního systému může být protilátka**

Často využíváné pro screening protilátek

Bodová ELISA



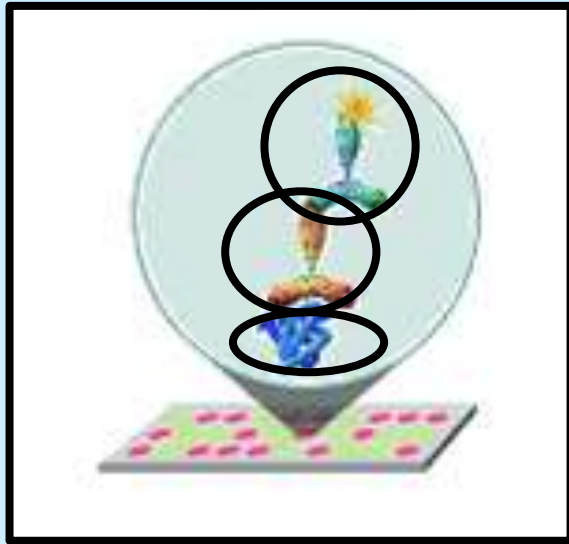
- Nízko hustotní
 - Slouží ke kvantifikaci genové exprese v buněčných kulturách nebo klinických vzorcích
 - Na pevný povrch jsou navázány protilátky, které zachycují antigen z neznámých vzorků
-
- Antigen musí být naznačen přímo nebo musí být použita **další antigen-vázající protilátka** = sandvič podobný klasické ELISA, ale v mikroskopickém formátu

Capture systém s jedinou protilátkou



- **Na pevný povrch jsou navázány protilátky, které zachycují antigeny ze dvou porovnávaných vzorků**
- **Využívá přímého značení nebo haptenu, který nemusí být dále rozpoznáván další protilátkou**
- **Kvalitativní systém založený na rozpoznání antigenu, pokud se naváže na ukotvenou sondu ve formě protilátky**

Čip s antigenem neboli reverzní čip



- Nízko hustotní čip s ukotvenými **antigeny**
- Testuje se sérem nebo plasmou klinických vzorků
- Využitelný i pro buněčné lyzáty

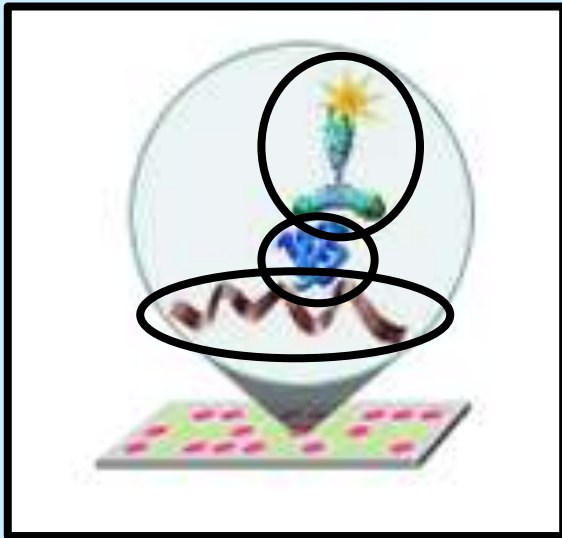
- Detekce přes sekundární značenou protilátku

Využívané k testování přítomnosti auto-protilátek

Microarray western bloty

- **Vzorky obsahující směs proteinů jsou ukotveny na sklíčko a smíchány se značenou protilátkou nebo sadou protilátek**
- **Výhodou tohoto systému je, že lze na jednom sklíčku testovat extrakty z různých pokusných zásahů a různých časů**
- **Je možné současně měřit a srovnávat hladiny mnoha proteinů**

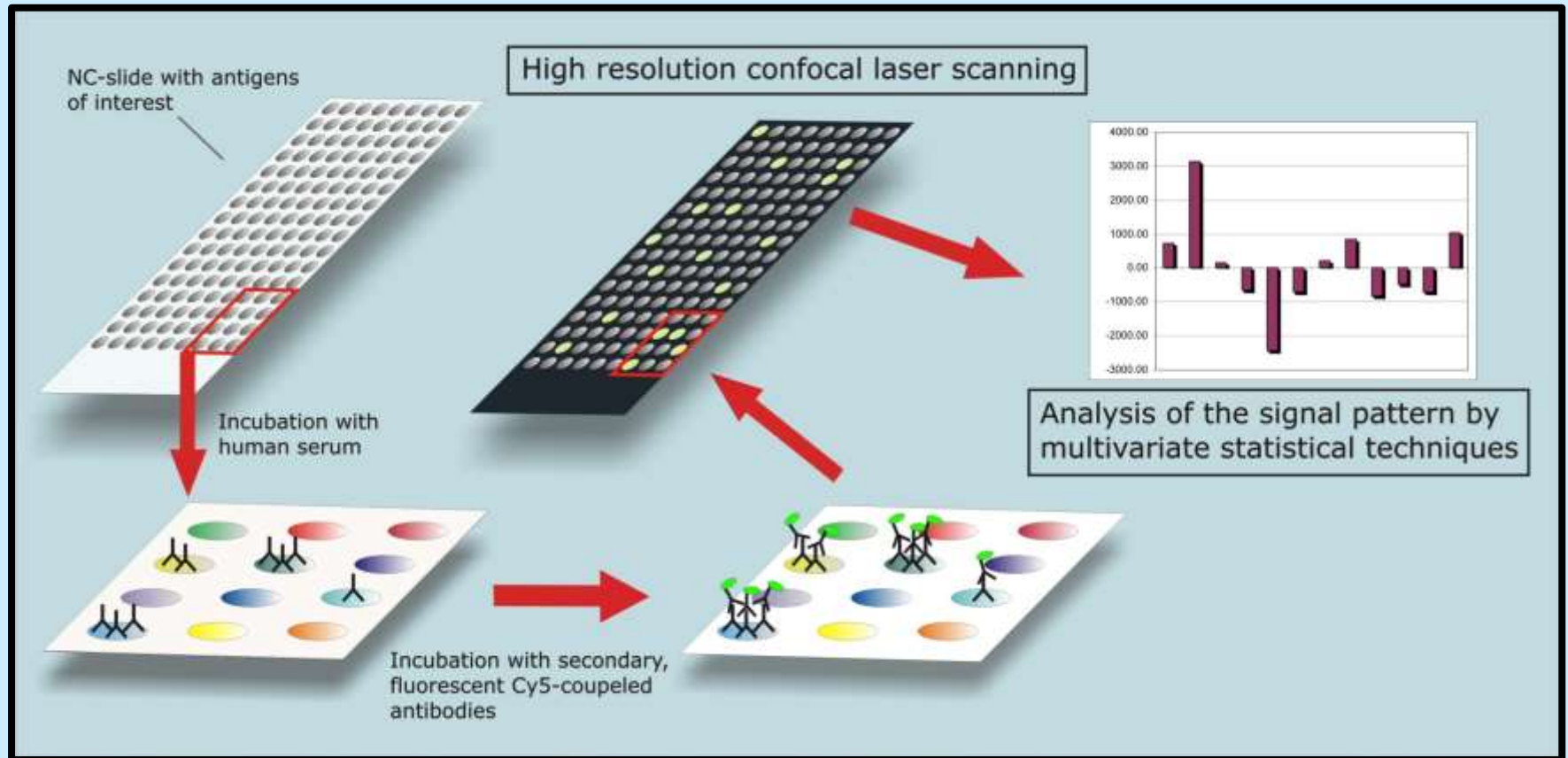
Protein vázající čipy



- Na pevný povrch jsou navázány **syntetické proteiny nebo peptidy** s různými vazebnými motivy
- Na čip jsou nanášeny **komplexní proteinové vzorky**
- **Detekce známou protilátkou** umožňuje identifikovat předtím neznámé interakce

Využívány k identifikaci vazebných motivů nových proteinů nebo pro studium interakcí protein-protein

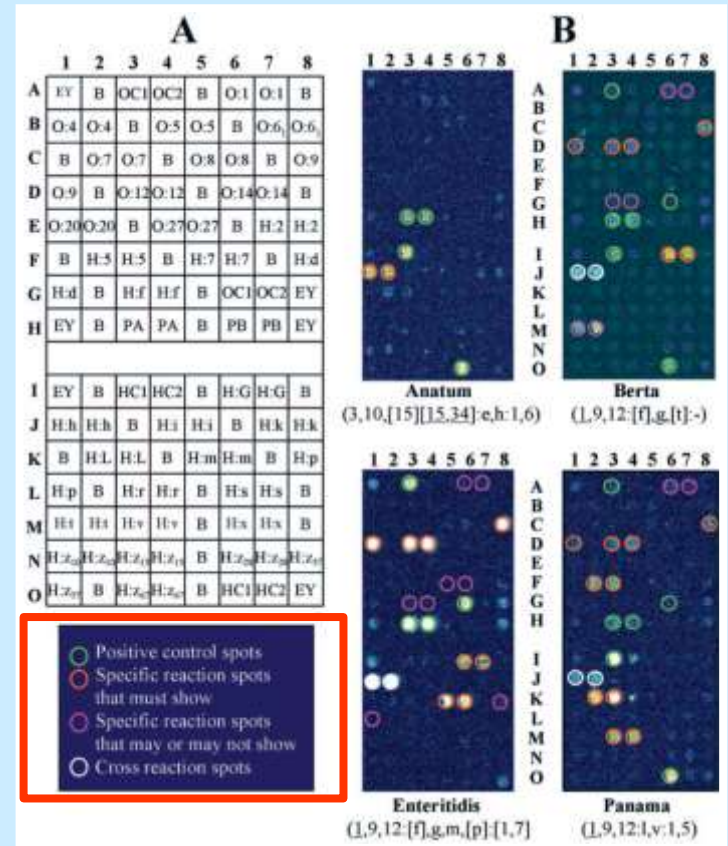
Sled prací na proteinovém čipu



Využití v mikrobiologii I

Serotypizace kmenů *Salmonella enterica*

- Makročip o rozměrech 8 x 15 s celkem 35 navázanými protilátkami
- Detekce 20 známých serovarů



Cai et al. (2005): Development of a Novel Protein Microarray Method for Serotyping *Salmonella enterica* Strains, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 43(7), 3427–3430.

Využití v mikrobiologii II

Stanovení protilátkové odpovědi proti influenzaviru

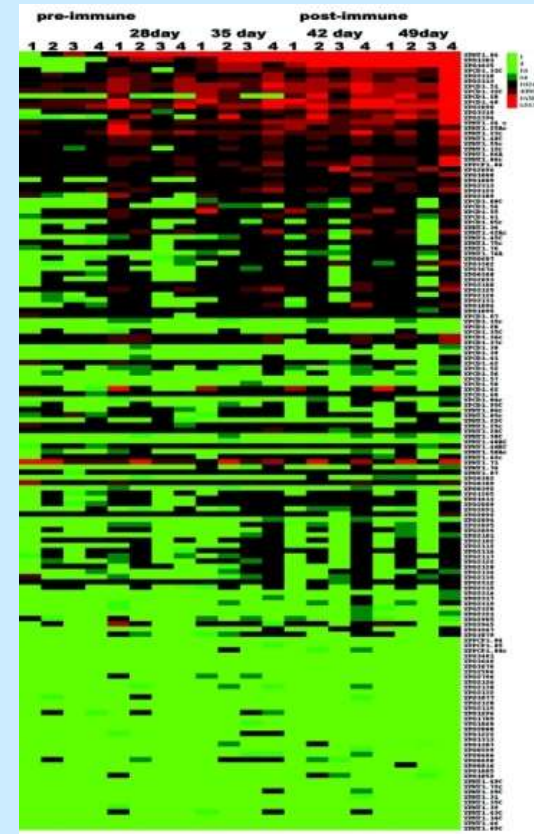
- **Měřili protilátky proti HA1 izolátů získaných po pandemii v roce 2009**
- **Srovnávali s protilátkami ze starších izolátů a s izoláty ptačích virů**
- **Potvrdili výsledky hemaglutinizačních testů**

Koopmans et al. (2011): Profiling of humoral immune responses to influenza viruses by using protein microarray, CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIONS 23 DEC 2011.

Využití v mikrobiologii III

Stanovení protilátkové odpovědi proti *Yersinia pestis*

- Měřili sérové protilátky u imunizovaných králiků
- Odhalili protilátky k až 50 proteinům
- Celkem 11 proteinů potenciálně vhodných pro přípravu vakcíny nebo diagnostiku



Li et al. (2005): Protein Microarray for Profiling Antibody Responses to *Yersinia pestis* Live Vaccine, *Infect Immun.* 73(6): 3734–3739.

Shrnutí

- 1) Charakteristika biočipů, DNA microarrays a DNA chip**
- 2) Výroba čipů, charakteristika sond**
- 3) Experimentální design**
- 4) Podmínky pro aplikace čipové technologie**
- 5) Využití DNA a RNA čipů v mikrobiologii**
- 6) Proteinové čipy, příklady aplikací v mikrobiologii**