Микрочипы (microarrays)

ДНК-микрочипы

- Организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе.

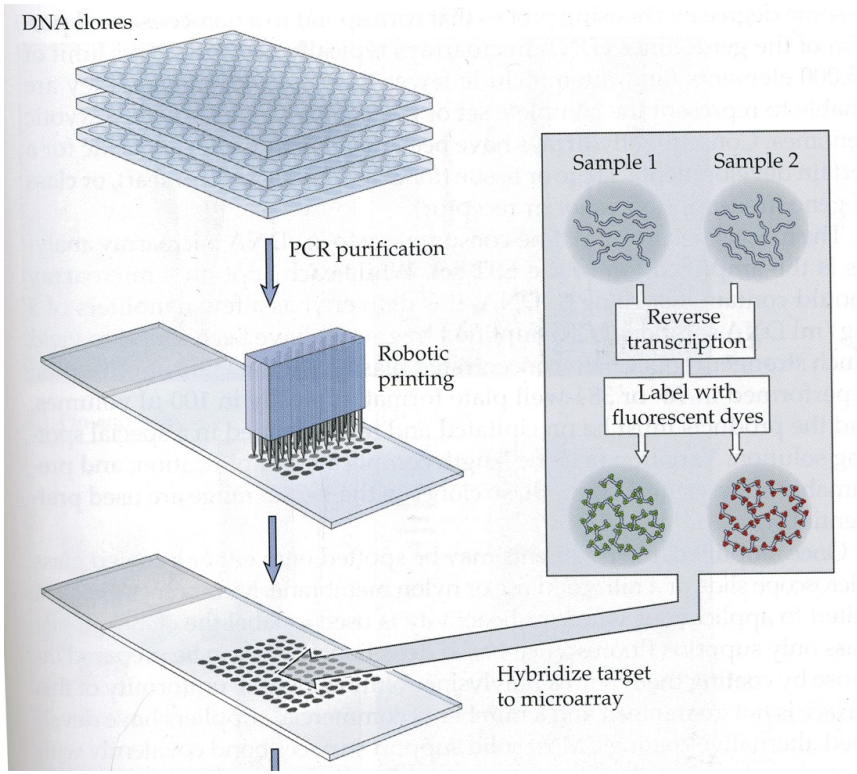
- кДНК - двухкрасочные;
- Олигонуклеотиды - однокрасочные;
- - двухкрасочные;

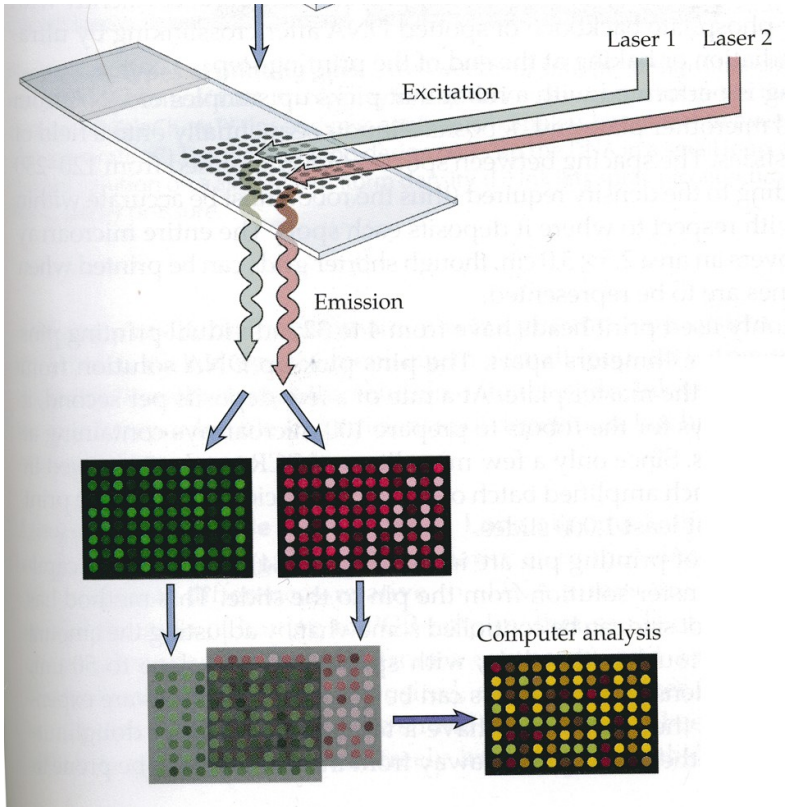
Флуоресцентная детекция

- Мембранные – с радиоактивной детекцией;
- Гелевые (ИМБ РАН);

- Цели:
- 1. Исследование профилей экспрессии (transcription profiling);
- 2. Генотипирование (genotyping).

кДНК микрочип (Stanford)





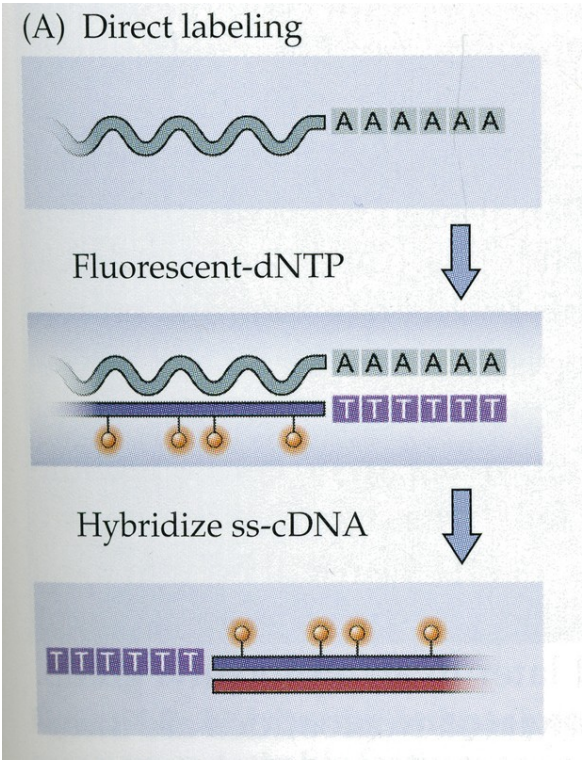
Сравнение экспресии генов в двух типах клеток.

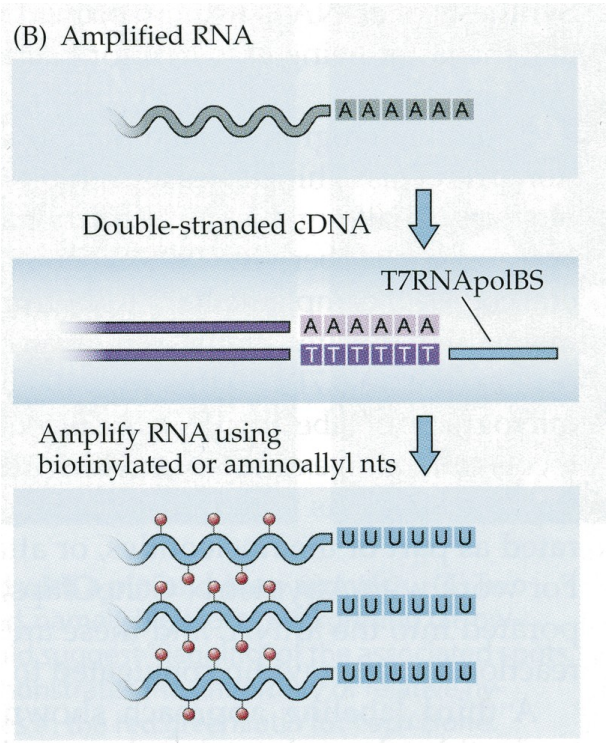
На чипе: к ДНК, ~1000 п.н., продукты ПЦР, ~20 000 генов; Принтер, микрокапельки, 16-pin spotter (робот).

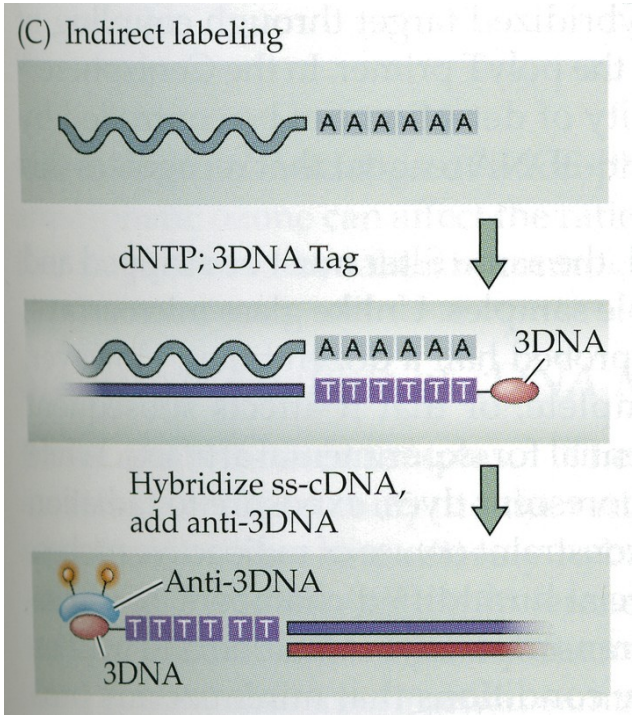
Подготовка гибридизационных зондов: выделение опытной и контрольной мРНК, получение кДНК - мечение Cy3 или Cy5 в процессе обратной транскрипции (CTP-Cy3, CTP-Cy5).

Детекция: чип освещают двумя лазерами (красная или зеленая эмиссия), сканируют эмиссию, накладывают результаты друг на друга; компьютерный анализ.

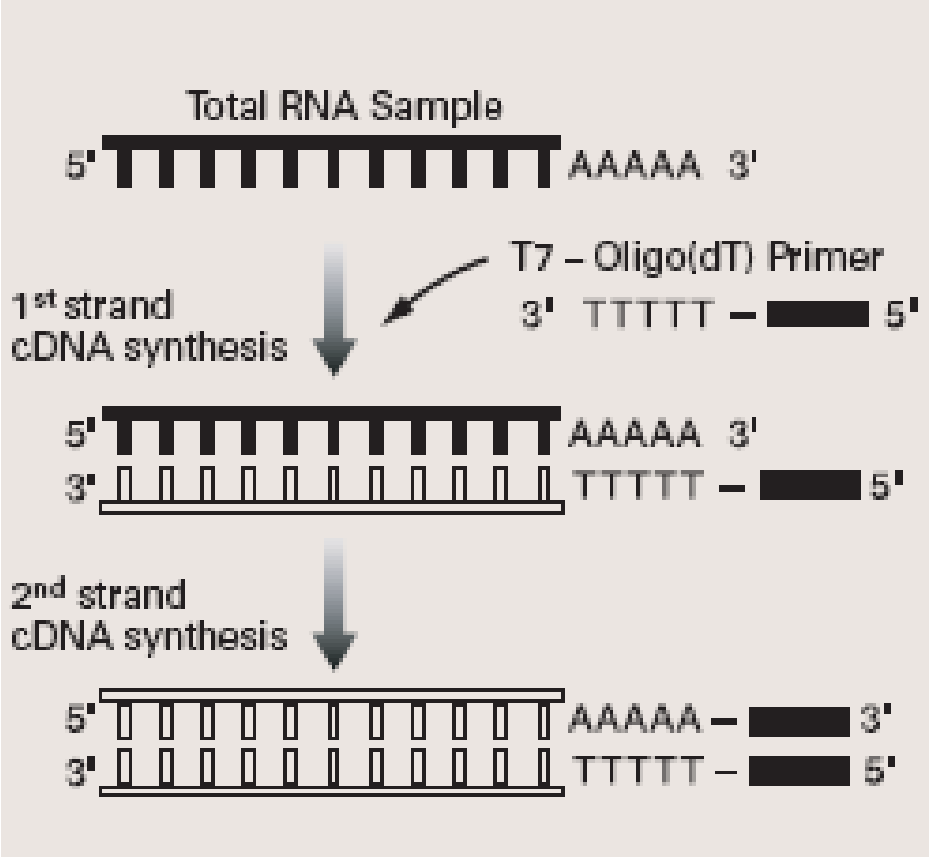
Три способа пометить ДНК







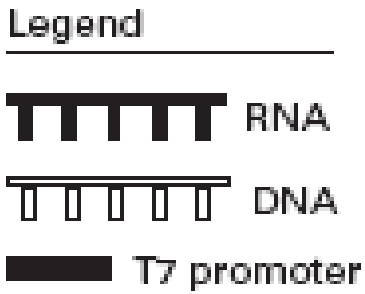
Подготовка мишени (target):



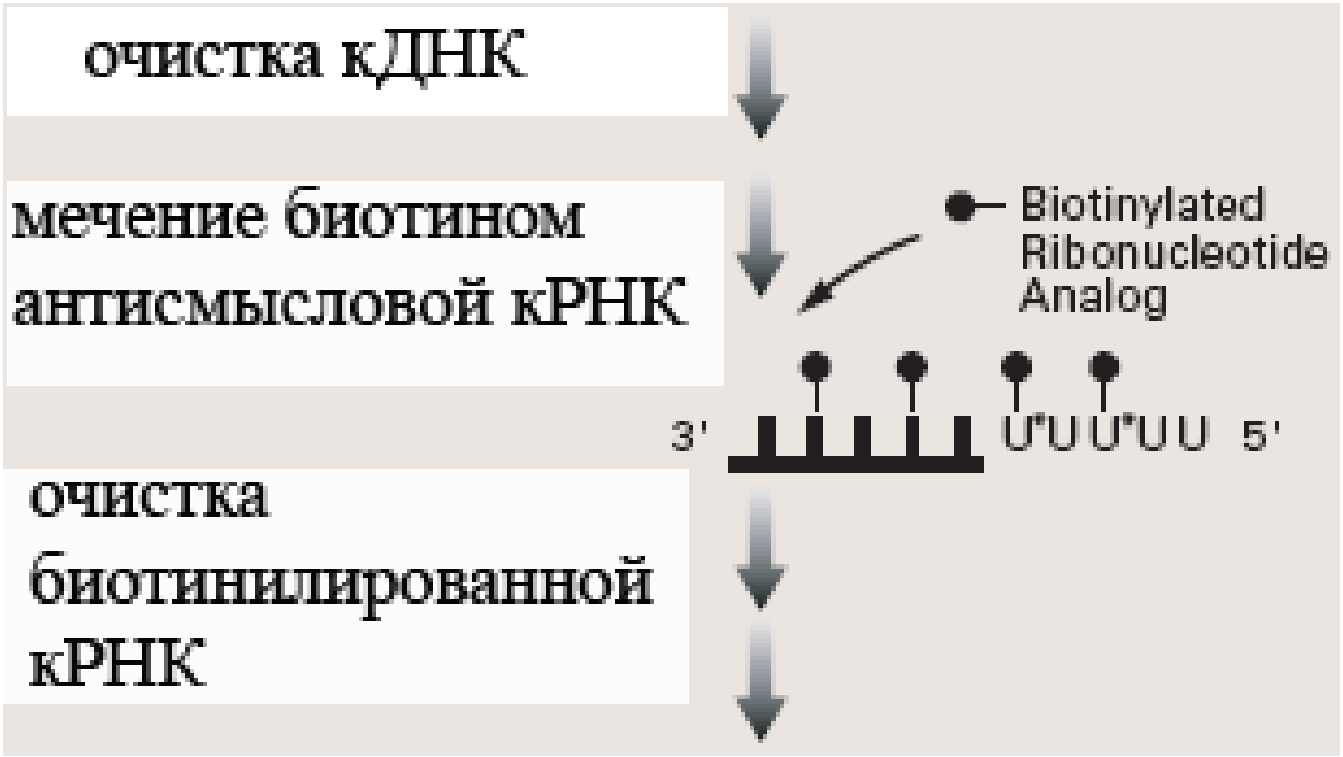
выделение мРНК или суммарной РНК клетки

обратная транскрипция

праймер: Т7 промотор-(dT)n



Подготовка мишени (продолжение)

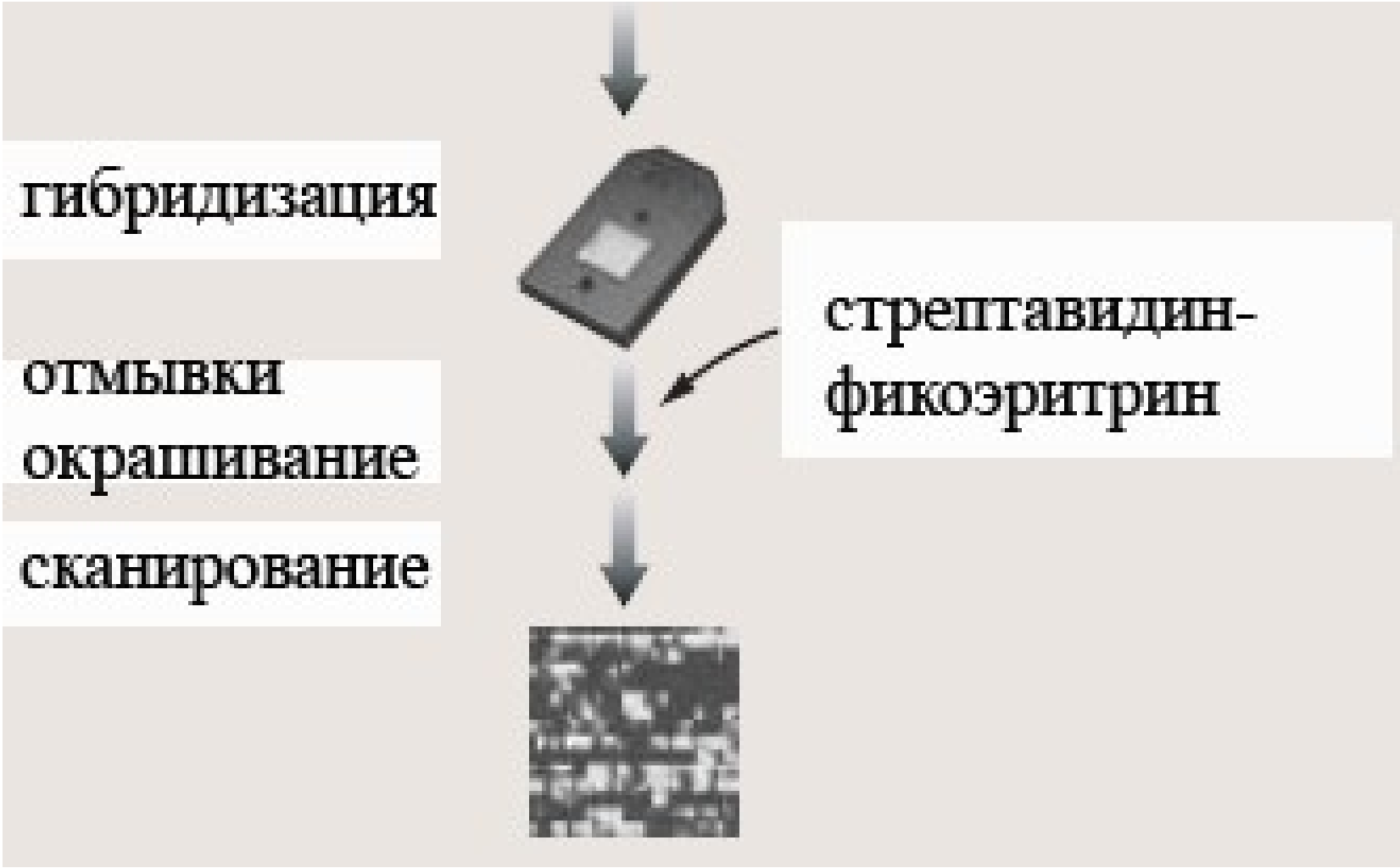


- Прямая транскрипция Т7 РНК-полимеразой, добавляют NTP-биотин, получают биотинилированную кРНК.

Biotin

U* — Pseudouridine

Гибридизация, детекция



Другие варианты

выделение РНК

↓

Обратная транскрипция с Т7-олиго(dT) праймера

↓

Прямая транскрипция Т7 РНК полимеразой
в присутствии аминоаллил UTP

↓

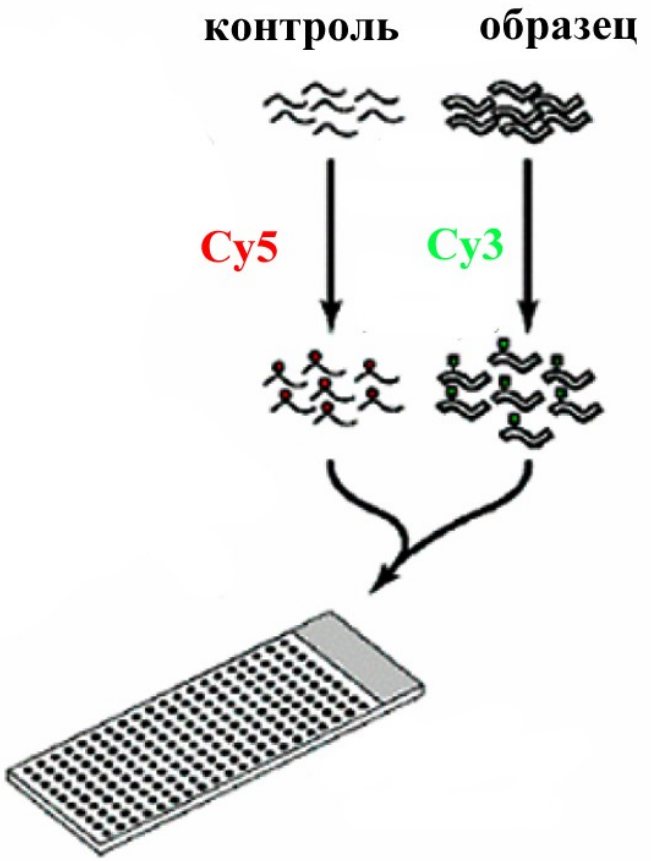
ковалентная “пришивка” флуоресцентных красителей

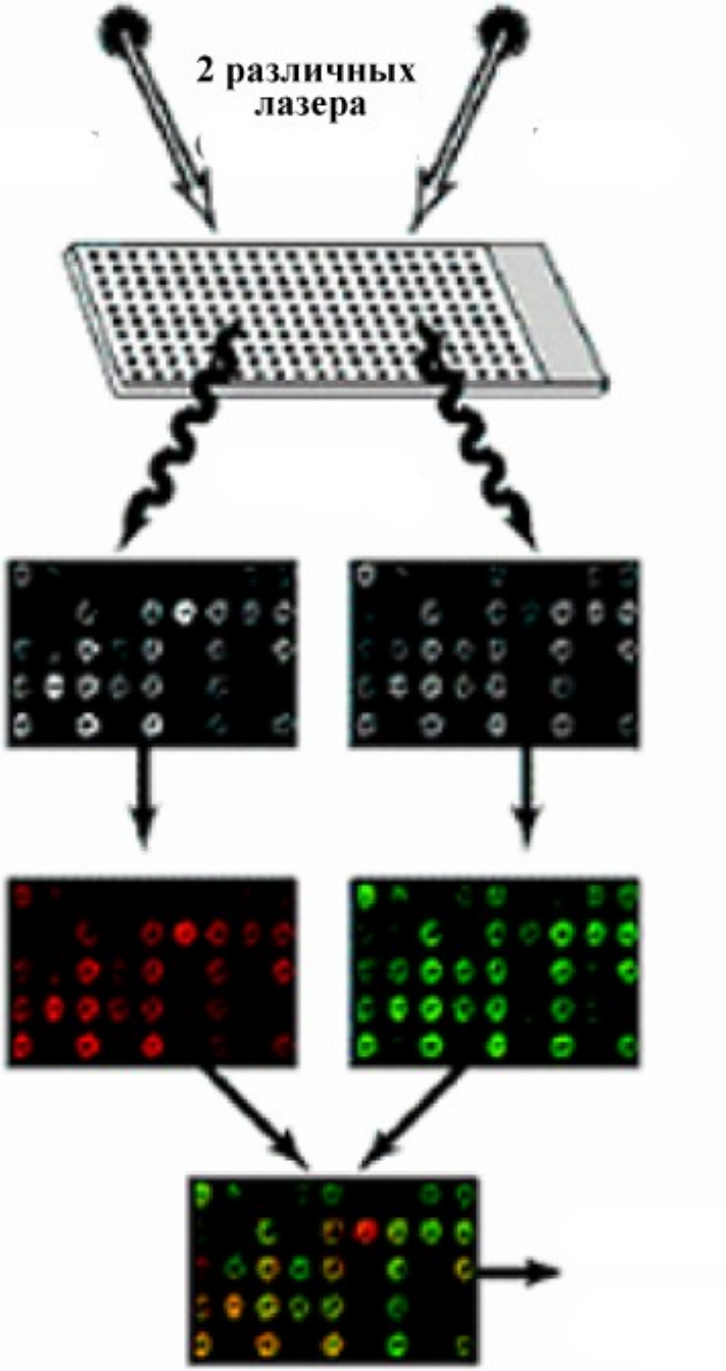
↓

гибридизация и отмывка микроматрицы

↓

Сканирование и анализ данных

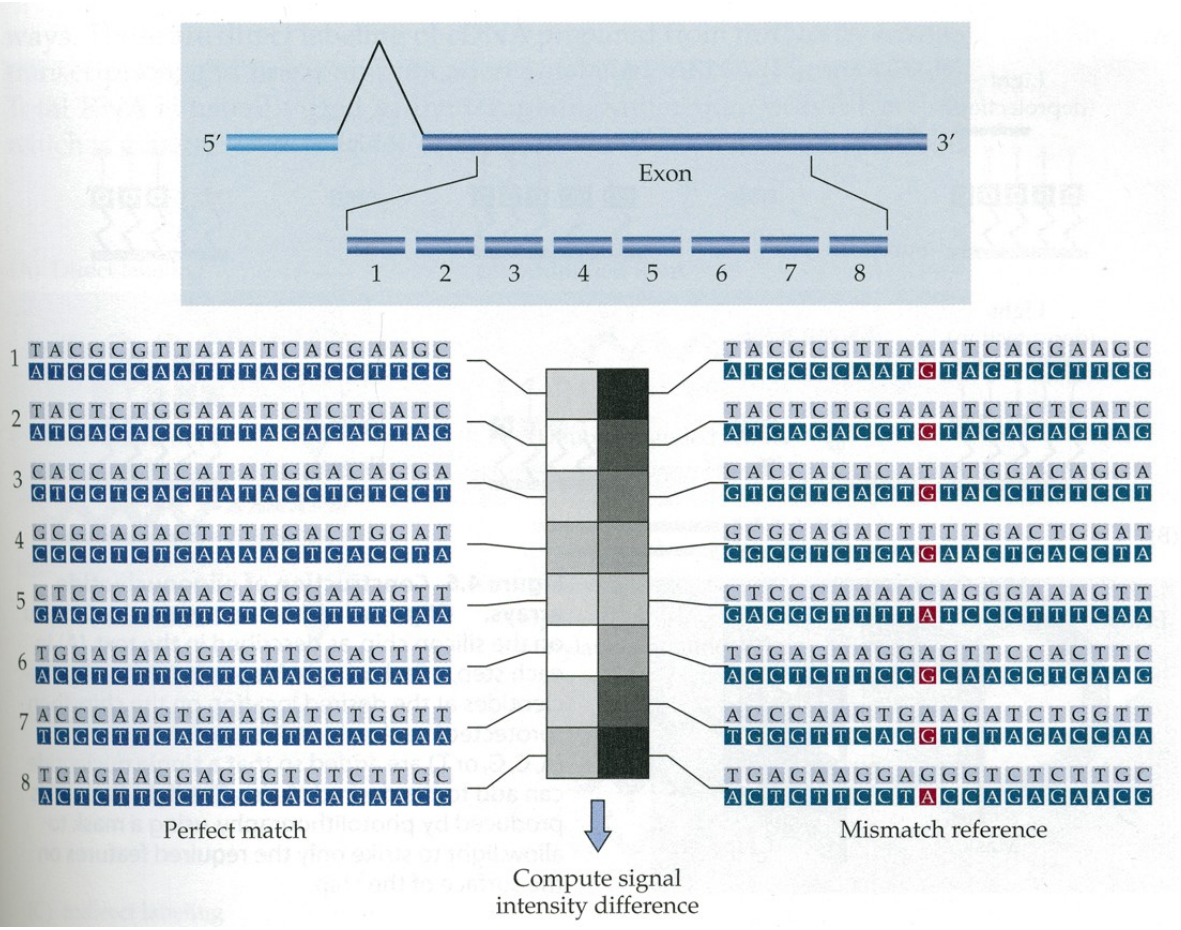



2 различных
лазера

- Подход с одной точкой на каждую мРНК годится только для относительных измерений (сравнения экспрессии гена в двух типах клеток с помощью “two-color assays”), но не для абсолютного измерения эффективности экспрессии генов.

- (probe – feature – target)

Микрочип Affymetrix



Абсолютные значения уровня экспрессии генов.

На чипе: 25-звенная одноцепочечная ДНК (probe); Химический синтез олигонуклеотидов (фотолитография);

Много олигонуклеотидов для мРНК одного типа (22 для генной экспрессии и 40 для генотипирования);

11 PM (perfect match)
11 MM (mismatch) – для учета фоновых сигналов.

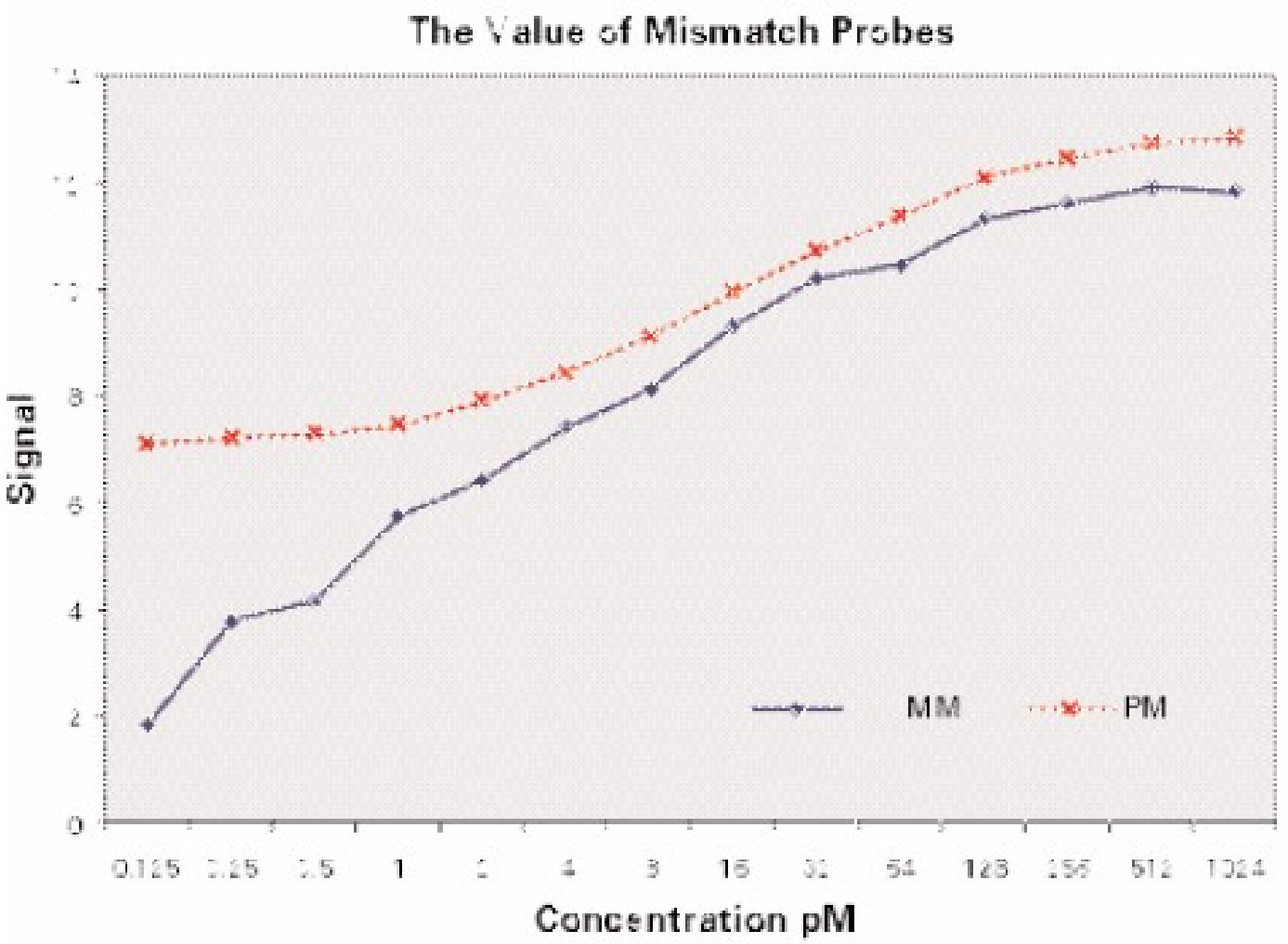
PM-MM система:

обеспечивает хорошую чувствительность, особенно для низких концентраций мишени;

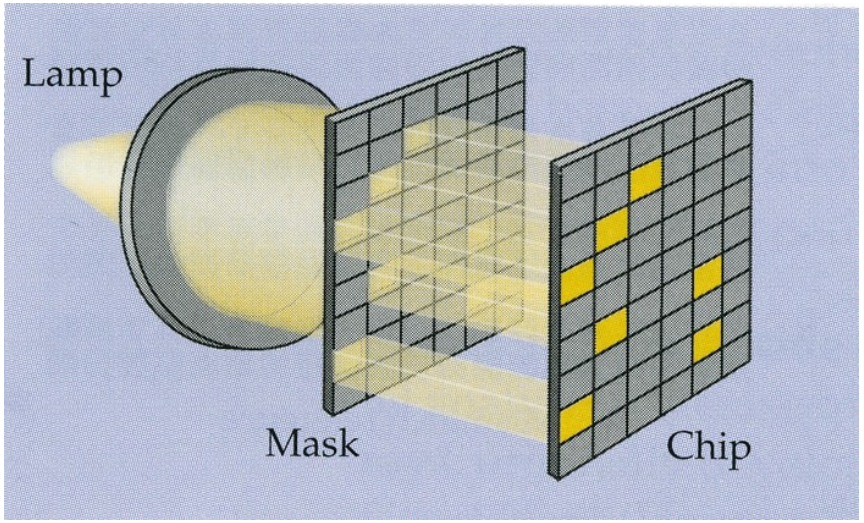
- При низкой концентрации транскрипта теряется чувствительность проб PM и возрастает значимость использования MM проб;

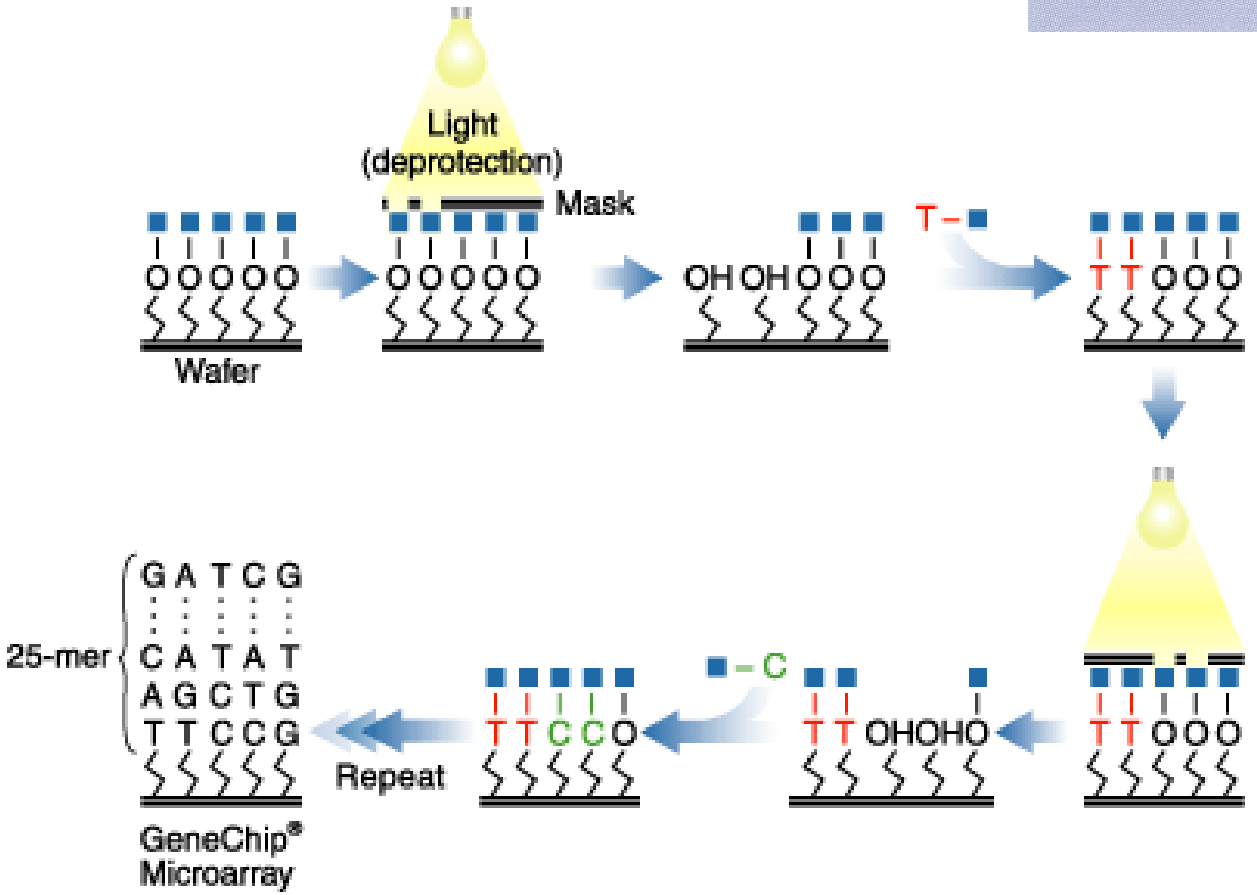
- оптимизирует соотношение между специфичностью и чувствительностью;
- можно детектировать транскрипт, доля которого составляет до 1:300 000 от суммарных транскриптов клетки.

При концентрации транскрипта менее 1- 8 pM теряется чувствительность проб PM и возрастает значимость использования MM проб.



Фотолитография





Генотипирование с помощью микрочипов

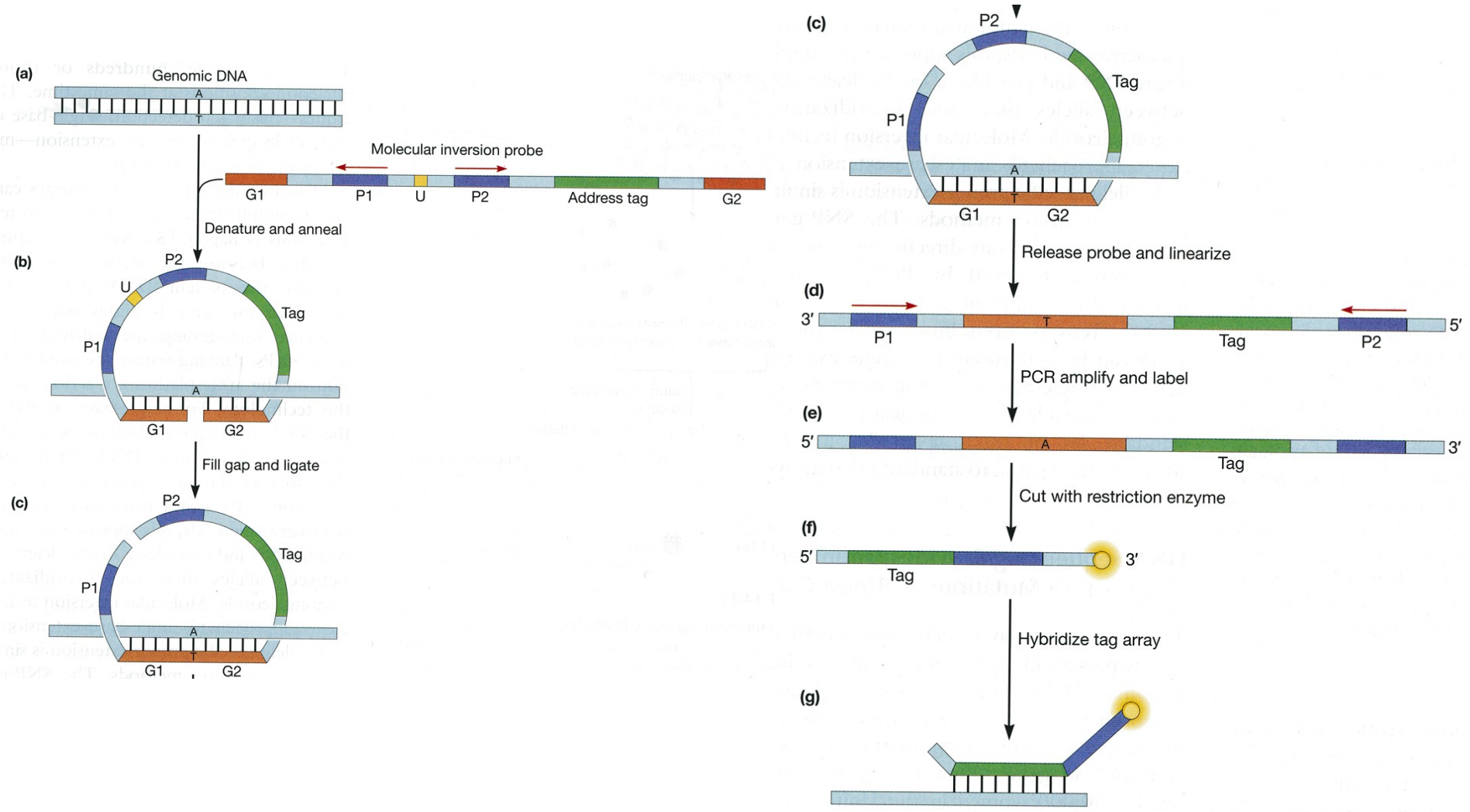
- **Основные принципы: Single base extention;**
- **Allele-specific primer extention.**

- **MIP (Molecular Inversion Probe)**

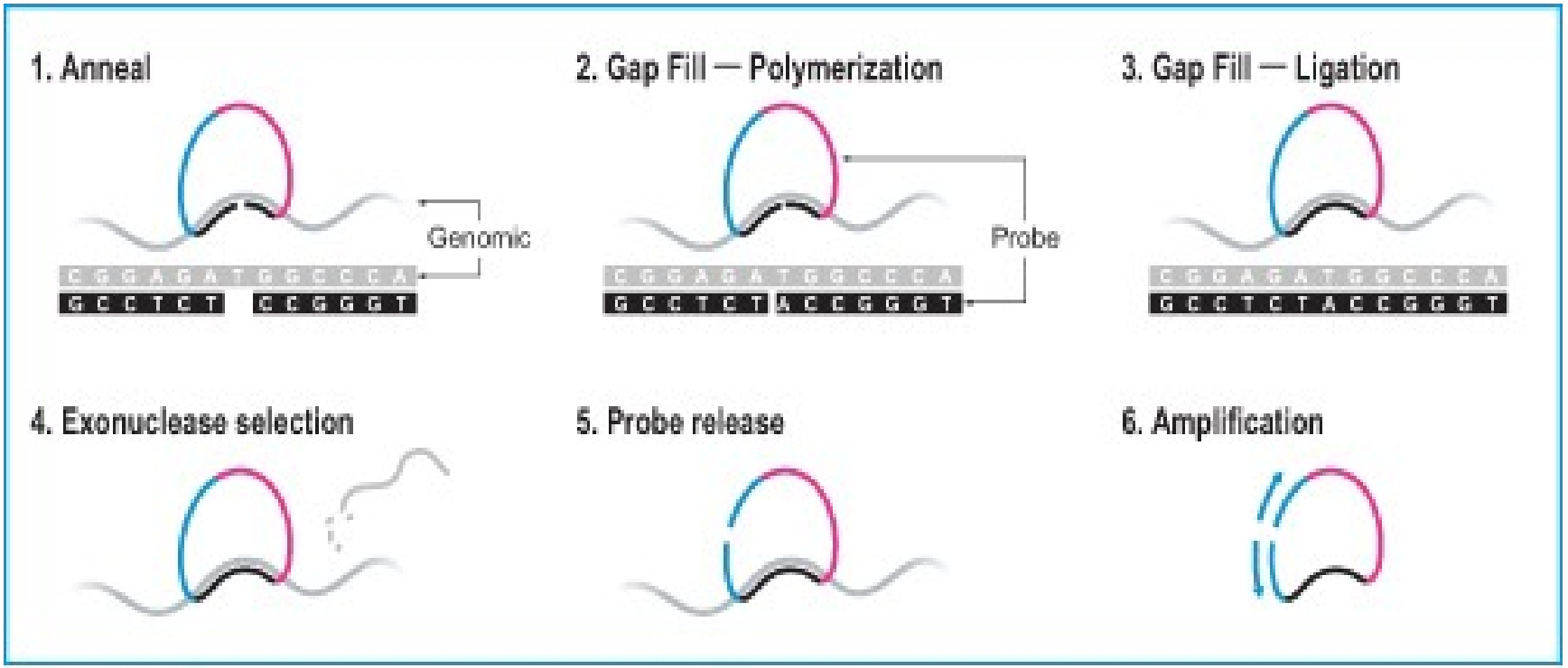
- Метод инвертированных молекулярных зондов позволяет детектировать до 20 000 мононуклеотидных полиморфизмов (**SNP)** на одном чипе.

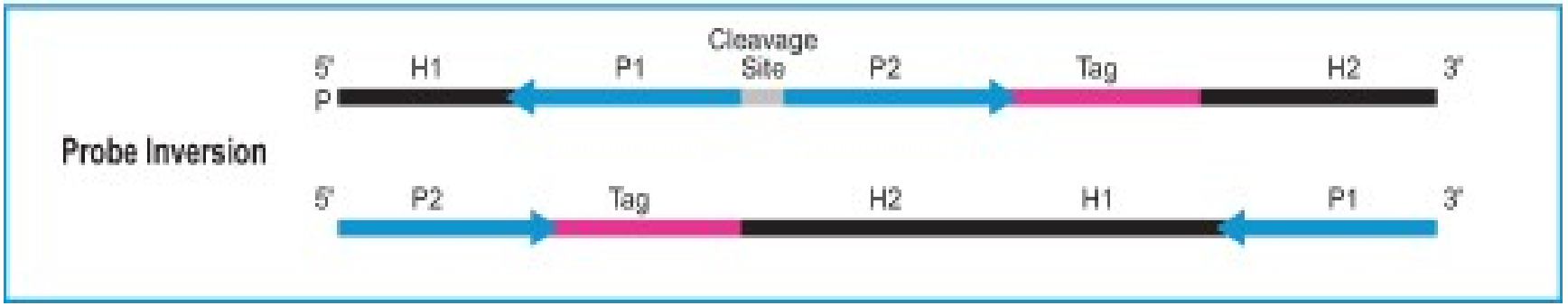
- Это происходит за счет превращения ДНК, которая не может быть амплифицирована (a), в ДНК, которая может быть амплифицирована (d).

MIP (Molecular Inversion Probe)

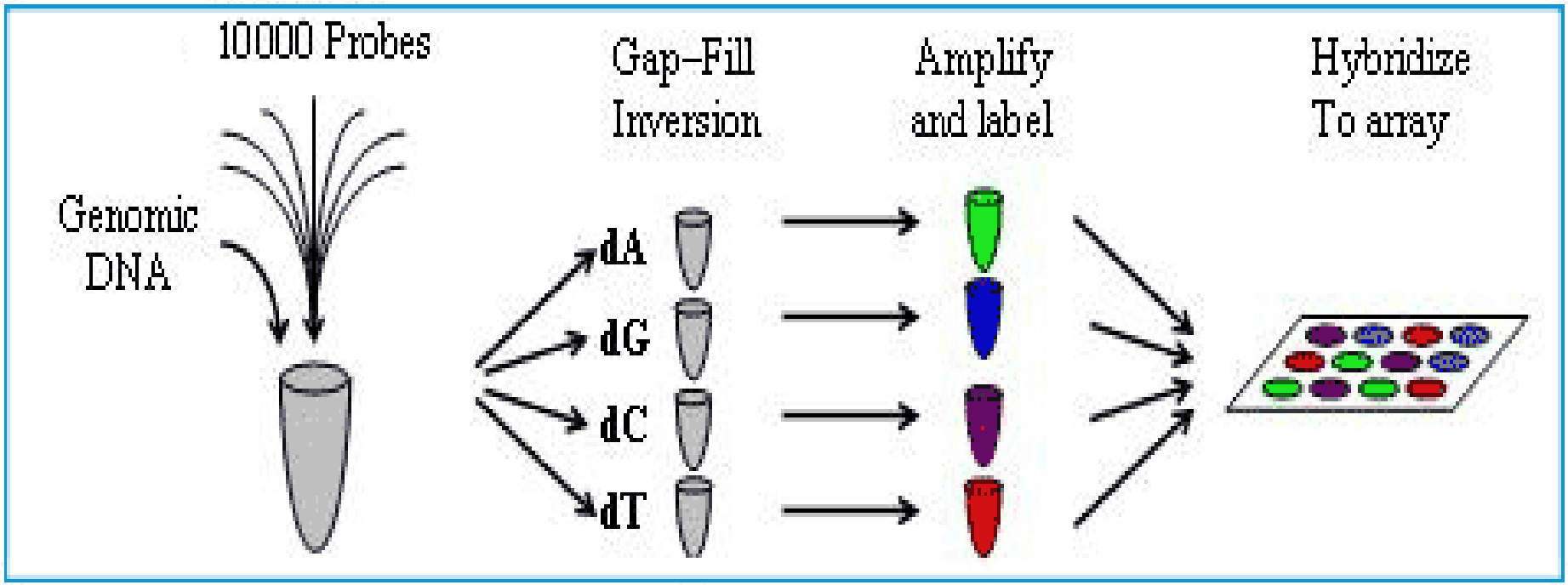


MIP Technology for SNP Genotyping

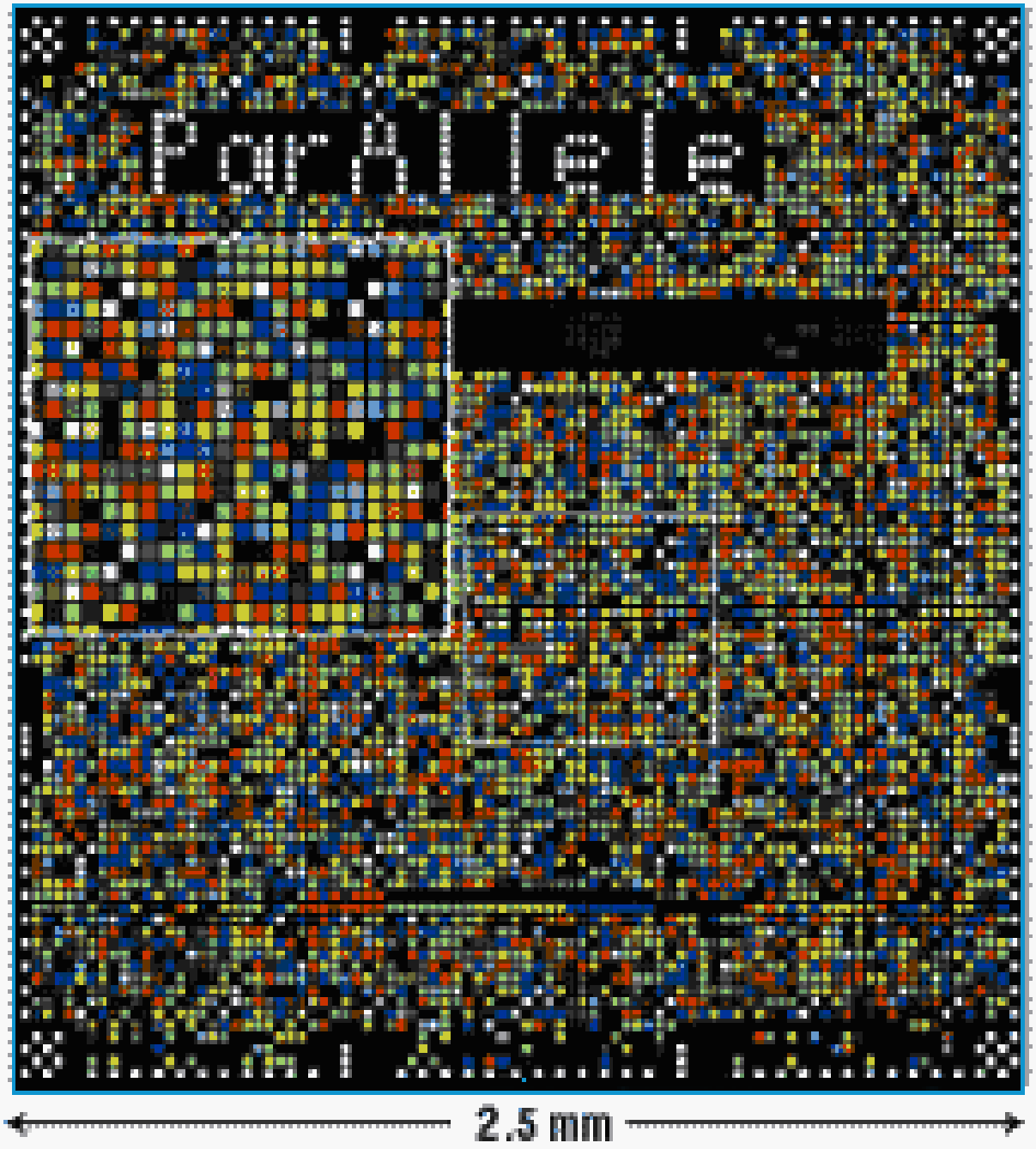




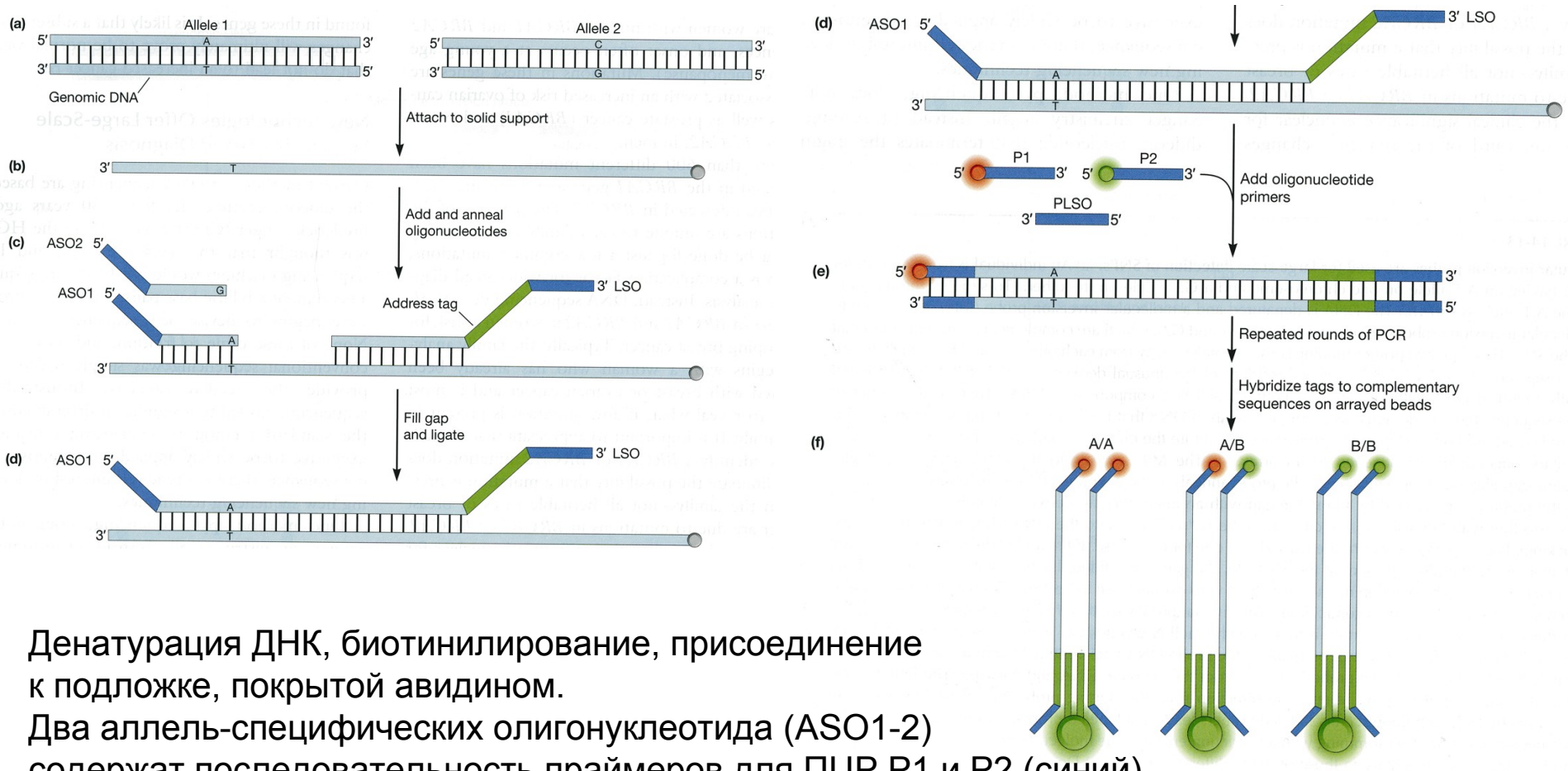
SNP Genotyping Using MIP



Four-color data obtained from the Affymetrix GeneChip



Использование аллель-специфических праймеров для генотипирования



Денатурация ДНК, биотинилирование, присоединение к подложке, покрытой авидином.

Два аллель-специфических олигонуклеотида (ASO1-2) содержат последовательность праймеров для ПЦР P1 и P2 (синий).

LSO (locus-specific oligonucletide) содержит адресную для данного локуса последовательность (зеленая) и праймер для ПЦР PLSO (синий).

ПЦР с праймерами P1 и P2 (разные фл. краски) и PLSO. Гибридизация с микрочипом.

Белковые микрочипы

- Protein arrays
- Чипы состоят из белков, пептидов или антител, нанесенных в определенном порядке на миниатюрную подложку (стеклянные пластинки).
- Задача – идентификация связывания белков и других молекул (лигандов) из сложных смесей (сыворотки, клеточные лизаты).

- Недостатки белковых микрочипов по сравнению с НК:
- 1. Нет метода амплификации (типа ПЦР);
- 2. Белки синтезируют из 22 аминокислот (а не 4-х н.о.), возможны пост-трансляционные модификации, белки отличаются по физико-химическим свойствам;
- 3. Мечение и связывание с подложкой могут влиять на взаимодействие белков с лигандами.

Antibody arrays

- 1. Стандартный иммуноэссэй.
- Антитела иммобилизованы, связывают меченные белки из раствора. Измеряется сигнал (обычно, флуоресцентный), соответствующий каждому антителу.
- Две белковые смеси, несущие красную и зеленую метку, могут инкубировать с чипом одновременно. Детектируют разницу в содержании каждого белка в смеси.
- 2. Сэндвич метод (иммобилизованное АТ1 --- белок --- АТ2-метка).
- 3. Использование системы усиления сигнала на втором антителе.
- Например, иммуно-ПЦР или иммуно-RCA (rolling cycle amplification).
- Второе антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом, который служит праймером для амплификации добавленной ДНК-матрицы. Детекция с помощью флуоресцентно меченного олигонуклеотида.

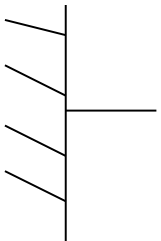
Классический **сэндвич-метод**:

- чип с иммобилизованными антителами инкубируют со смесью белков, промывают;
- инкубируют с мечеными вторичными антителами к общей детерминанте белков;
- промывки, сканирование.

- **Примеры:**

- 1. тестируется фосфорилирование белков,
- вторичные антитела специфичны к фосфосерину, фосфотреанину и фосфотирозину.

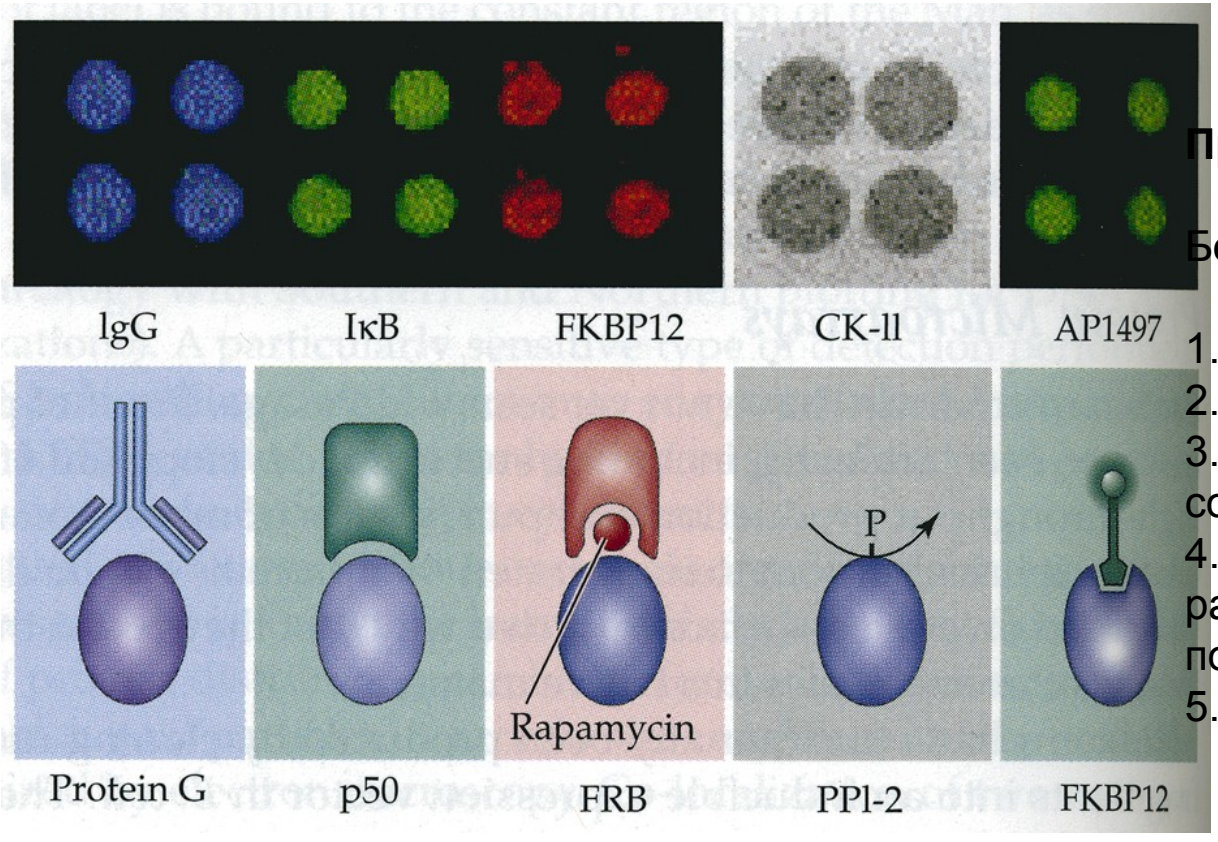
- 2. компоненты смеси биотинилируют,
- для детекции используют вторичное антитело к биотину или флуоресцентно-меченый стрептавидин.



$АТ_1$ * Белок * $АТ_2$---Метка

Белковые микрочипы

- Protein profiling
- Чипы состоят из белков (печатают на подложку) или пептидов (синтезируют *in situ* с помощью фотолитографии).
- Задача – идентификация связывания антител (reverse immunoassay), белков и других молекул из сложных смесей (сыворотки, клеточные лизаты).



Проверка принципа.

Белки на чипе связывают:

1. Антитела;
2. Другие белки;
3. Низкомолекулярные соединения (лекарства);
4. Мечение белков на чипе радиоактивным фосфатом с помощью протеинкиназ;
5. Меченые малые молекулы.

Functional protein array – микрочип из полноразмерных, функционально-активных белков

- **Создание библиотеки охарактеризованных кДНК в экспрессионном векторе, кодирующем тэг**
- Используют Gateway клонирование.
- $P_{инд}$ --[tag]—att—ccdB—att—[tag]—[Term]

- Индуцибельный промотор, введение C- или N-концевых тэгов (GST, ZZ, 6xHis), экспрессия в гомологичной системе.

- **Эффективная экспрессия и очистка белков**;
- Тэг позволяет не только очистить белок методом аффиной хроматографии, но и иммобилизовать белок на подложке.

- Например, используют покрытые ионами Ni пластинки для иммобилизации белков с гексагистидиновым тэгом.

Иммобилизация

- 1. Белки связывается с подложкой **в разных ориентациях** (использование альдегидов, аминов, эпокси-соединений, которые реагируют с многочисленными карбоксильными и амино-группами белка).

- 2. Все белки **ориентированы одинаково** (использование тэгов).

- Нормировка
- GST-тэг позволяет определить количество белка в каждом пятне (spot) чипа с помощью специфичных к GST флуоресцентно-меченых антител (измеряют базовую флуоресценцию каждого пятна).
- Эти величины используют для нормировки сигналов, полученных в результате связывания образцов.

Методы детекции взаимодействий

- Флуоресцентное мечение;
- Радиоактивное мечение;
- Хемилюминисценция;
- Label-free methods.

Примеры:

- Белковую смесь биотинилируют, инкубируют с чипом, чип промывают и инкубируют с флуоресцентным производным стрептавидина.

- В белки смеси можно непосредственно ввести флуоресцентную метку.

- Для исследования ДНК-белковых взаимодействий использовали флуоресцентно-меченную ДНК;

Yeast proteome microarray

- 5800 ORF из 6280 белок-кодирующих генов были клонированы в виде фьюжн-белков с GST и 6xHis тэгами и экспрессированы в клетках дрожжей с индуцибельного Gal-промотора.
-
- После аффиной хромотографии каждый белок «перепечатали» на стеклянную пластинку в виде двух точек (13 000 точек на чип).

- Использовали покрытые ионами Ni пластинки, белки связывались за счет 6xHis тэга.

- Тестировали на связывание биотинилированных фосфолипидов. Идентифицировали 150 липид-связывающих белков, из них 52 были не известны ранее.
- Аналогично, обнаружили 39 белков, связывающих калмодулин.

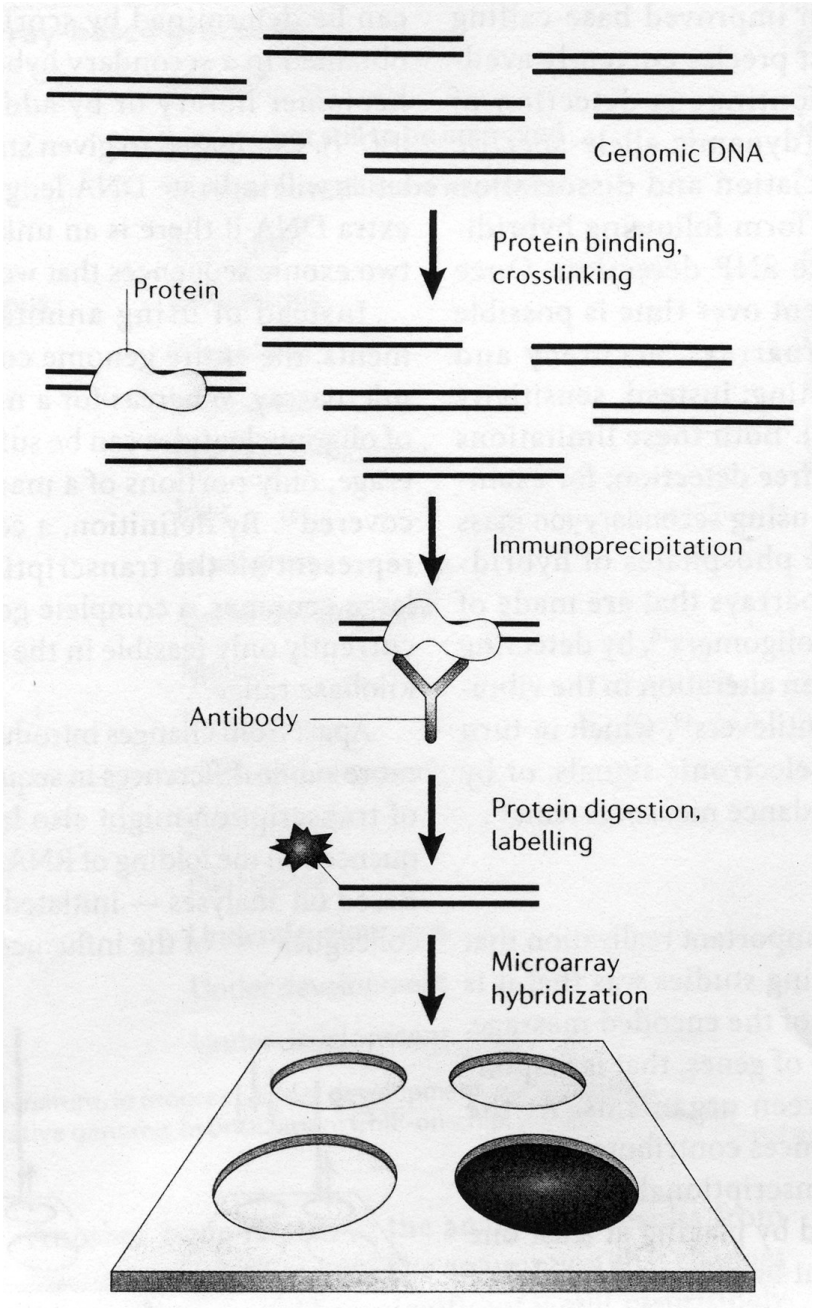
Комбинированное использование белковых и ДНК-микрочипов

- Поиск ДНК-связывающих белков в дрожжевой протеоме.
- Белковые чипы тестировали с помощью меченой дрожжевой геномной ДНК.
- Обнаружили 200 ДНК-связывающих белков.
- Ряд обнаруженных белков исследовали **ChIP-on-chip методом:**

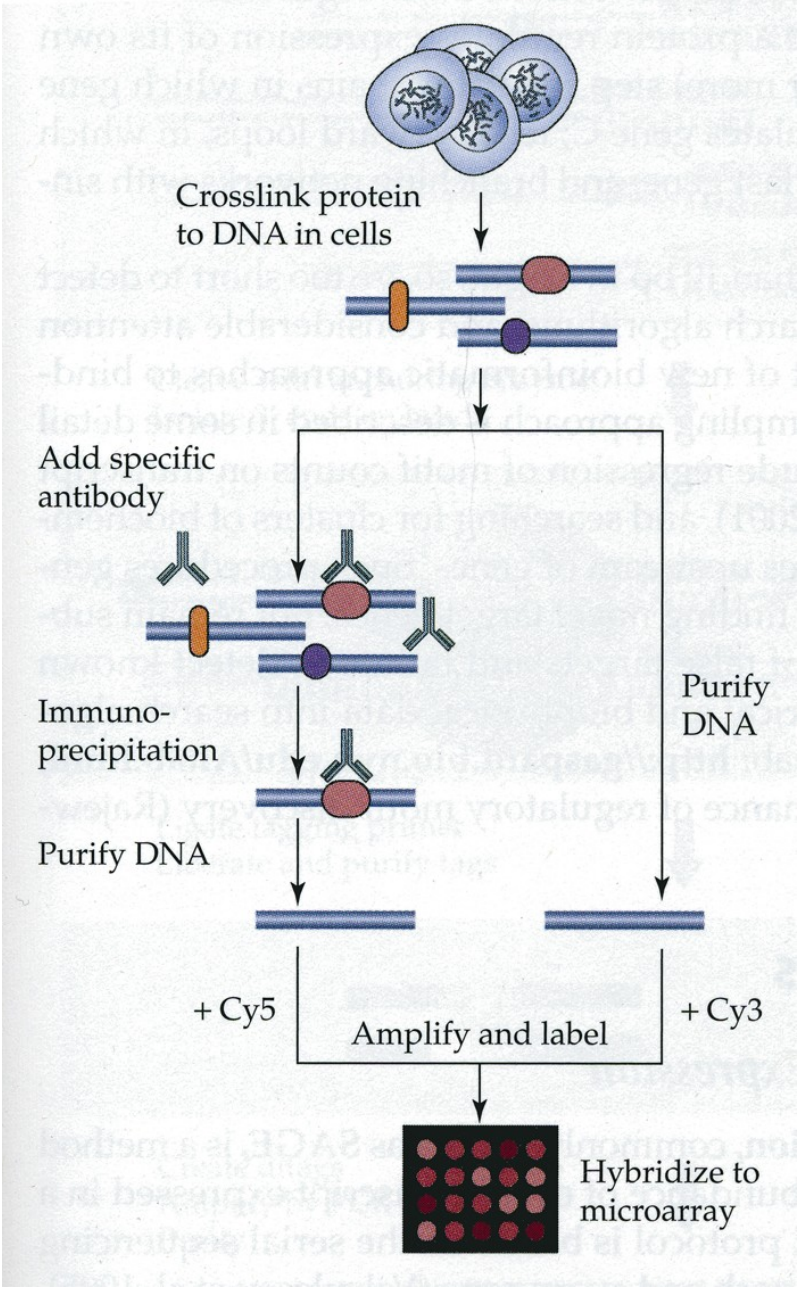
- В результате получают данные об участках связывания транскрипционных факторов на хромосомной ДНК.

ChIP-on-chip метод

- 1. Иммунопреципитация ДНК-белковых комплексов с помощью антител к белку или тэгу.
- 2. ДНК из иммунопреципитата фрагментируют ультразвуком, метят и гибридизуют с ДНК-чипом (содержащим межгенные области или весь дрожжевой геном).



ChIP-chip метод

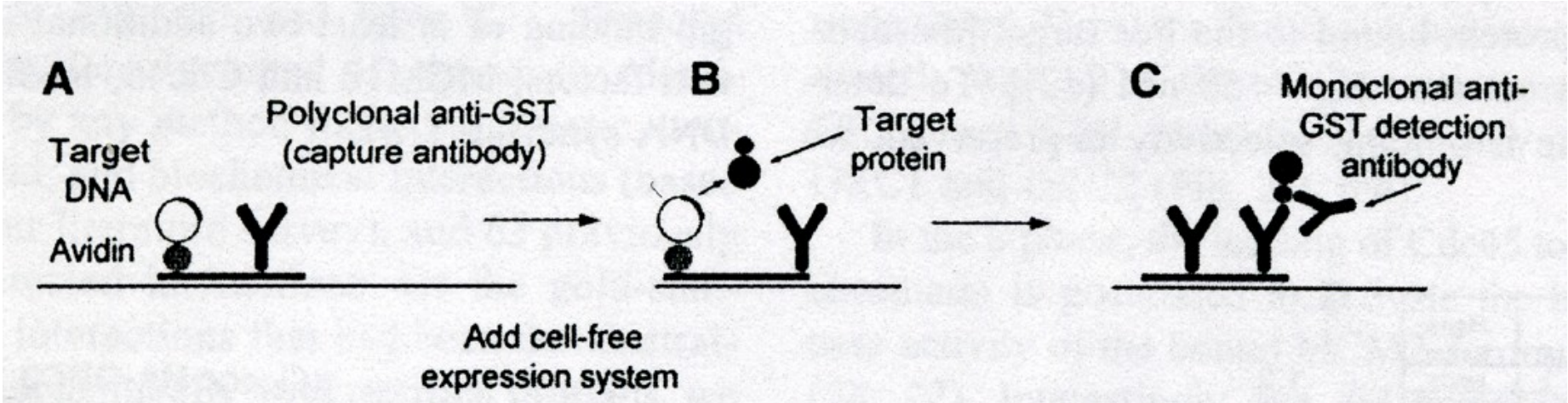


NAPPA (nucleic acid programmed protein array)

- **A.** Элемент чипа состоит из плазмидной ДНК и “capture agent” (поликлональные антитела к GST).
- Плазмида содержит экспрессионную кассету [T7promoter—cDNA--GST].

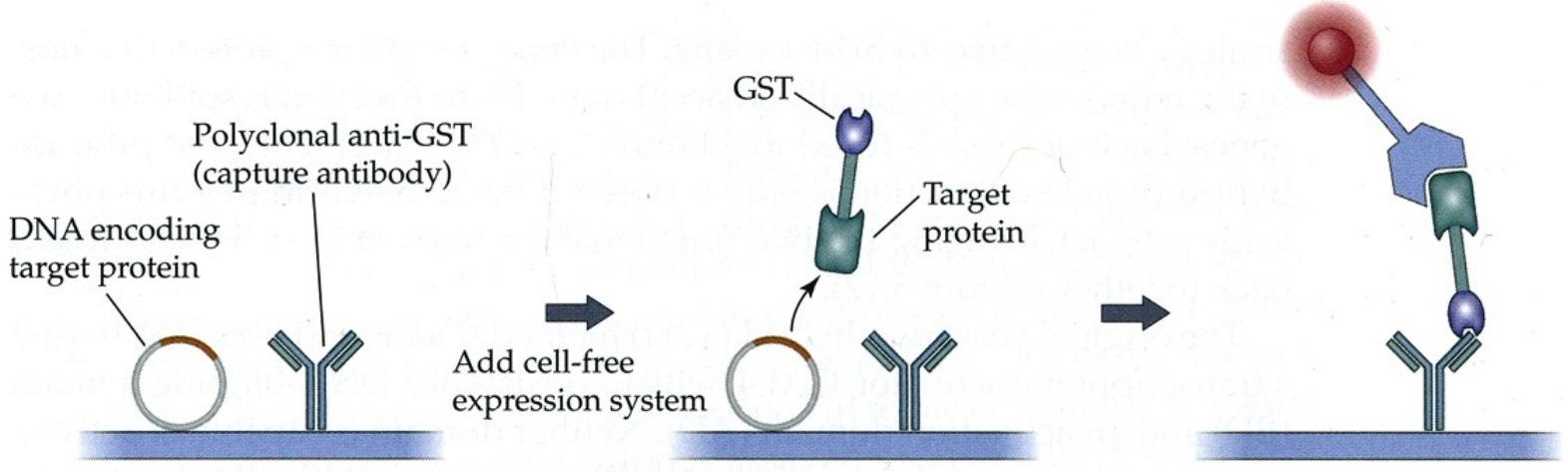
- **B.** С помощью Т7 РНК-полимеразы и бесклеточной системы трансляции (ретикулоцитный лизат кролика) синтезируются белки с GST-тэгом на С-конце. Они связываются с расположенными рядом антителами к GST. После инкубации чип тщательно промывают.

- **C.** Детекция синтеза полноразмерных белков с помощью меченых моноклональных антител к GST.



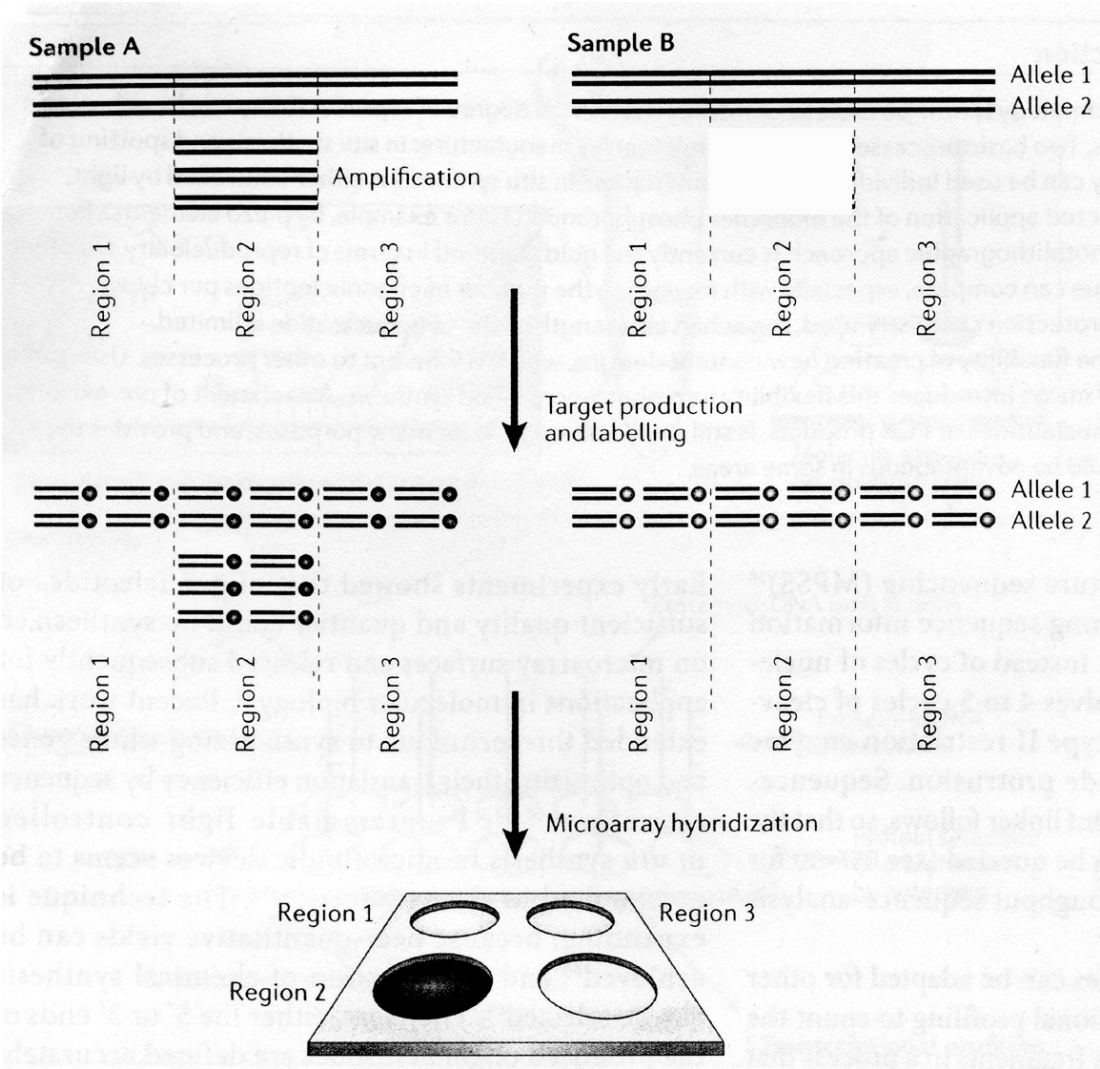
NAPPA (nucleic acid programmed protein array)

- **Преимущества:**
- Количество белка на таком чипе существенно превышает традиционное;
- Гомологичная система обеспечивает правильное сворачивание белка;
- Не происходит денатурации белков в процессе очистки и иммобилизации.



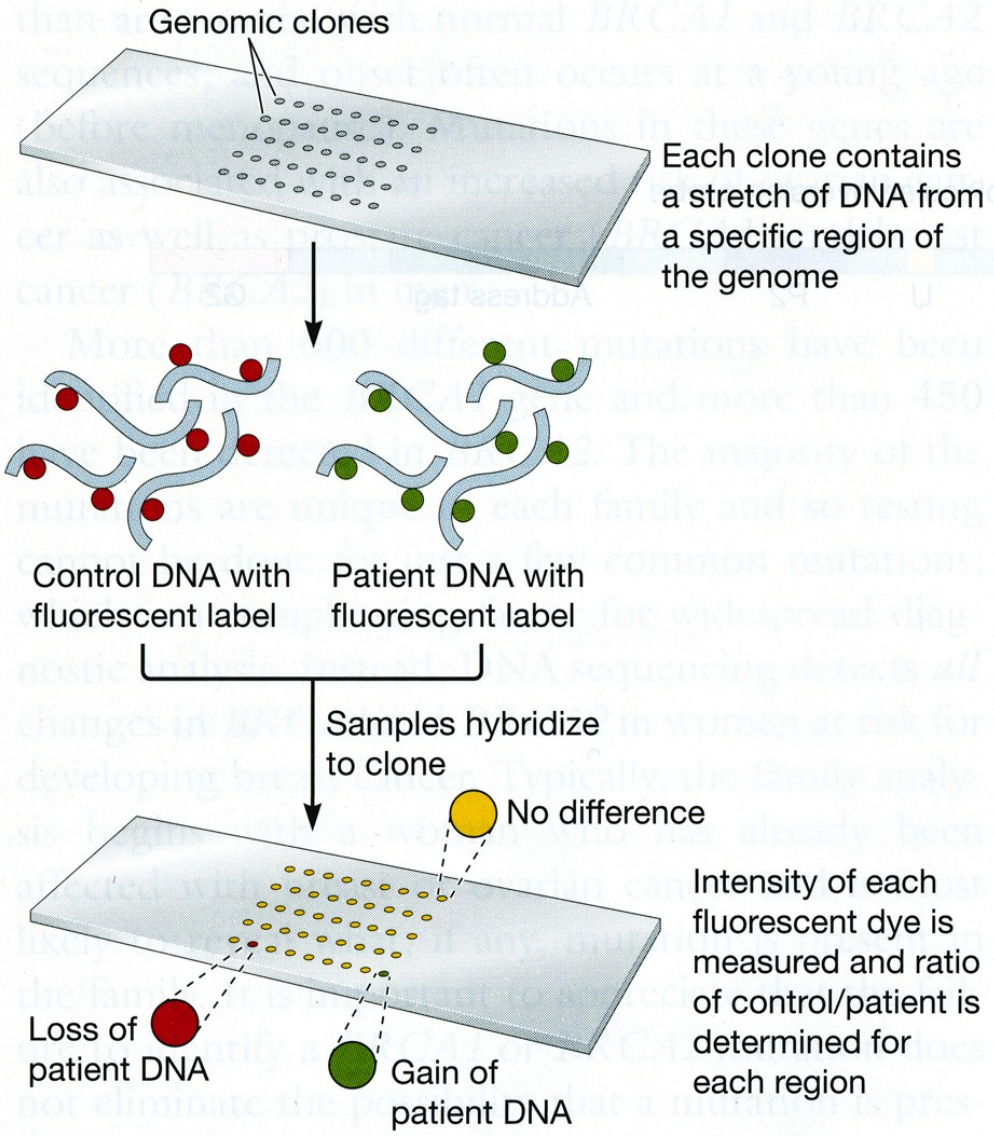
Comparative genomic hybridization (CGH)

- Определение копийности гена (детекция делеций и амплификаций)



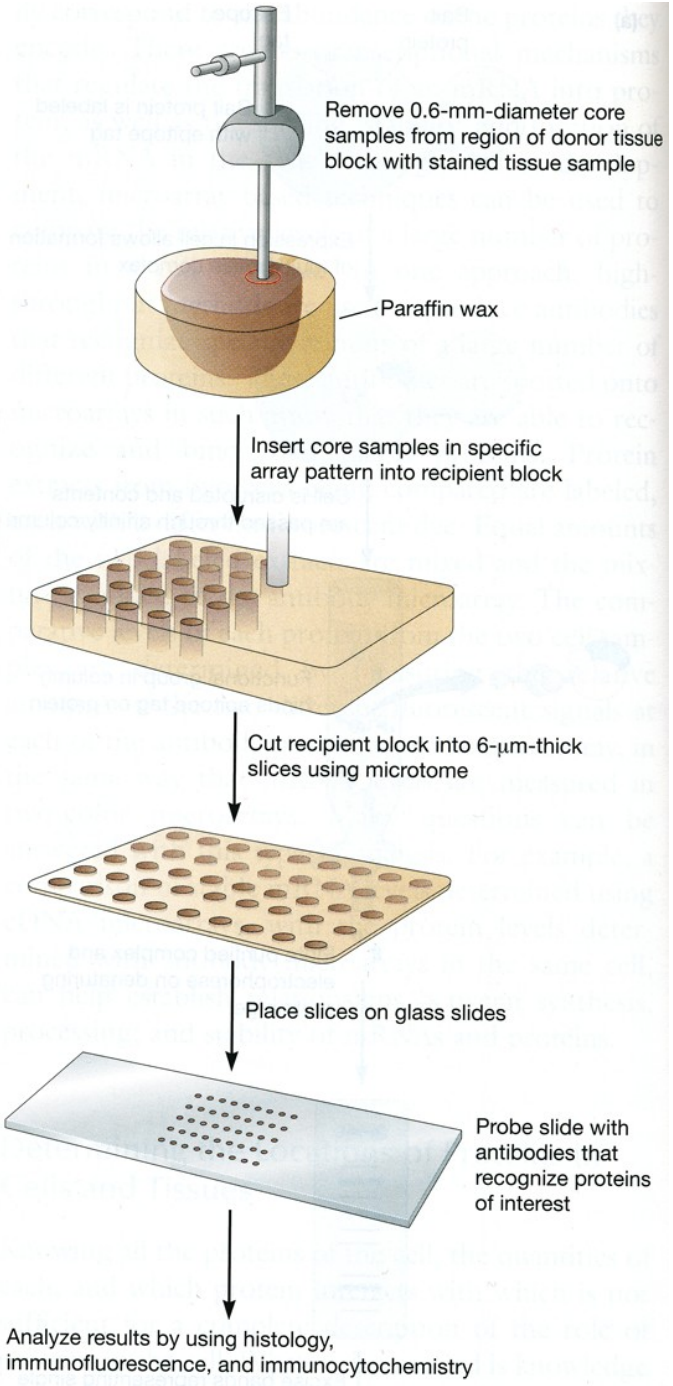
Array CGH

- Сравнивают ДНК пациентов с образцами контрольной ДНК.
- Каждая ДНК метится флуоресцентным красителем (контрольная – красным, пациента – зеленым). Смесь этих ДНК гибридизуют с микрочипом.
- Детектируют соотношение красной и зеленой флуоресценции в каждом пятне.



Tissue microarray

- В блок помещают кусочки (диаметром 0.6 мм) из парафинированных образцов тканей в определенном порядке.
- Затем делают тонкие срезы этого блока с помощью микротома, их фиксируют на стеклянных слайдах.
- Каждый слайд тестируют с помощью определенного антитела.
- Исследуют распределение белков по тканям или разным типам опухолей. Определяют субклеточную локализацию белков иммуногистохимическими методами.



Biosignature analysis

- Multi – feature array of ion-exchange resin / antibodies:
- Включение ионообменных смол или АТ в матрикс для ионизации;
- инкубация с образцом;
- промывки;
- масс-спектрометрия (MALDI).