



# Исследование функциональных характеристик генома (2)

*Катохин Алексей Вадимович, к.б.н.*

Кафедра информационной биологии ФЕН НГУ



## БИОЧИП-ТЕХНОЛОГИИ

- |                      |                           |
|----------------------|---------------------------|
| ■ Gene chips         | Genomics                  |
| ■ Protein chips      | Proteomics                |
| ■ Carbohydrate chips | Glycomics<br>(Glycochips) |
| ■ Array of cells     | Cellomics                 |

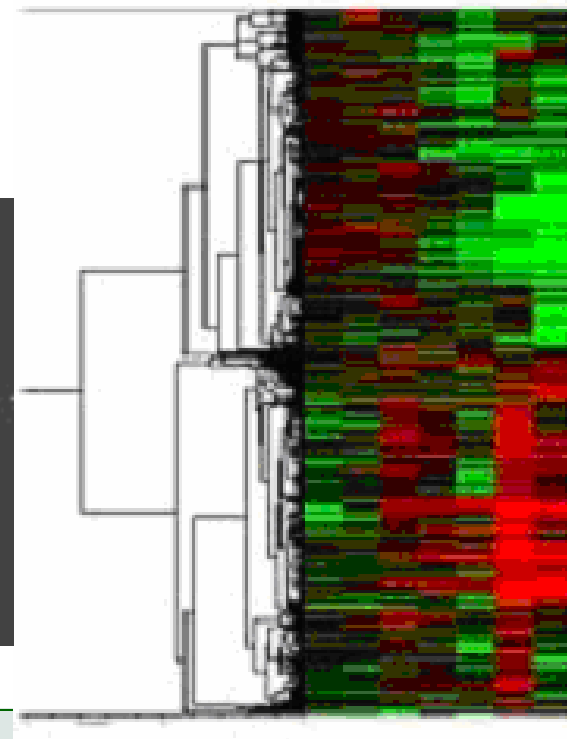
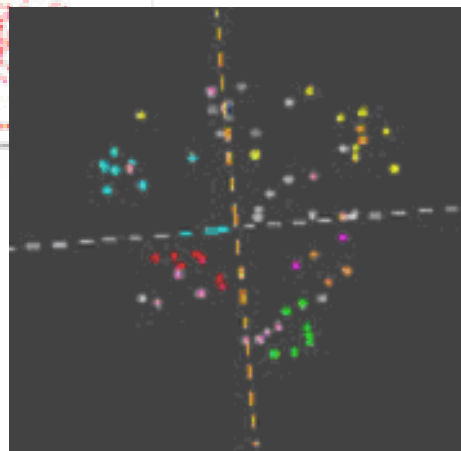
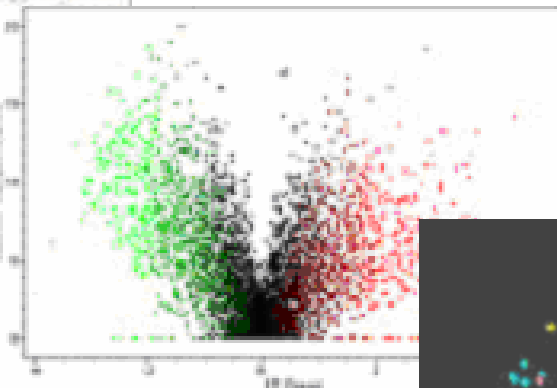
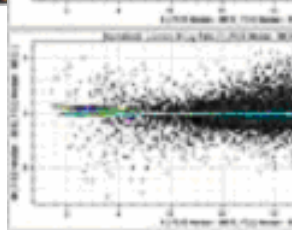
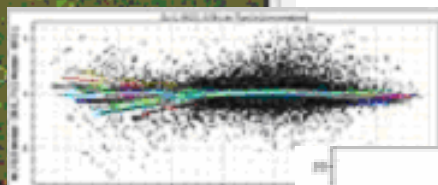
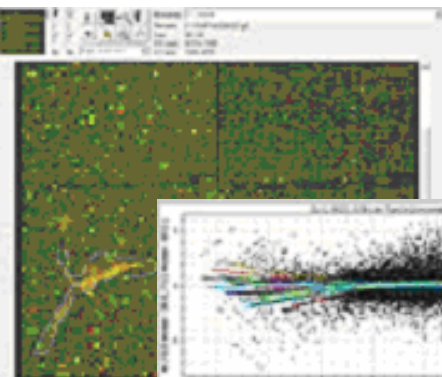


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома



### ДНК-биочипы (ДНК-микроматрицы)





## Определение ДНК-биочипов (ДНК-микроматриц)

ДНК-биочипы – это миниатюризированные матрицы, в которых на подложке в определенном порядке распределены и прикреплены фрагменты ДНК, соответствующие отдельным генам или их частям. Такие организованные микроматрицы позволяют проводить эксперименты по одновременному анализу структуры и экспрессии тысяч генов с помощью параллельной гибридизации.

Развитие методов преобразования результатов этих экспериментов в цифровые данные и методов компьютерной обработки последних обеспечивает возможность анализировать и сопоставлять экспрессию таких массивов генов во множестве экспериментальных условий.



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ТИПЫ ДНК-БИОЧИПОВ

#### МИКРО

На твердой поверхности  
(стекло или полимер)

**олигонуклеотидные  
биочипы**

20-75 н.о.

Fodor et al., 1993;  
Lipshutz et al., 1995;  
Lockhart et al., 1996

**кДНКовые биочипы**

100-2500 п.н.

DeRisi et al., 1996

**ДНКовые геномные  
биочипы**

2000-25000 п.н.

Микроскопное стекло размером  
25 мм x 76 мм

#### МАКРО

В объеме

В микрокаплях  
(микрокусочках) геля

**Фрагменты ДНК или  
олигонуклеотиды**

30-2500 н.о.

Под руководством акад. А.Д.  
Мирзабекова в ИМБ РАН  
Lysov et al., 1988;  
Khrapko et al., 1989

На мембране  
(фильтре)

**Фрагменты ДНК или  
олигонуклеотиды,**

30-2500 н.о.

Saiki et al., 1989  
Kawasaki et al., 1993

Фильтровые микрочипы,  
макрочипы, ОБРАТНЫЕ  
ДОТ-БЛОТЫ  
(Reverse Dot Blot Arrays)

От 10мм x 10 мм  
до 25см x 25см



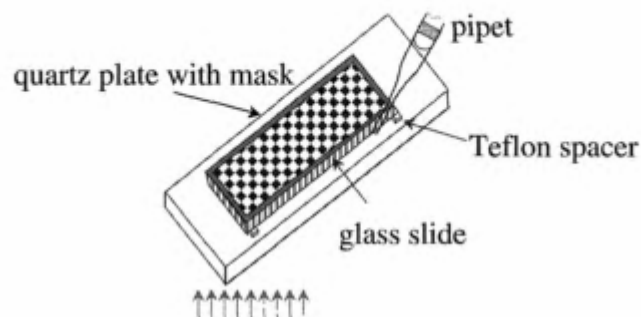
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

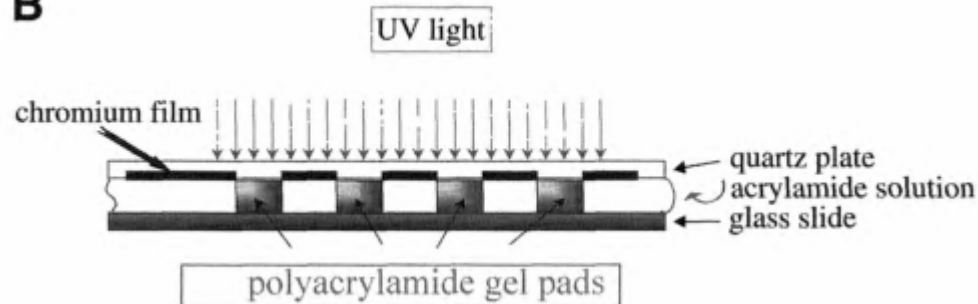


### БИОЧИПЫ МИРЗАБЕКОВА - MAGIChip™ ТЕХНОЛОГИЯ

**A**



**B**



Использование кусочков полиакриламидного геля, в которых иммобилизируются олигонуклеотиды. Или раскапывание микрокапель раствора с компонентами для геля и с олигонуклеотидами и фотоактивируемая кополимеризация



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

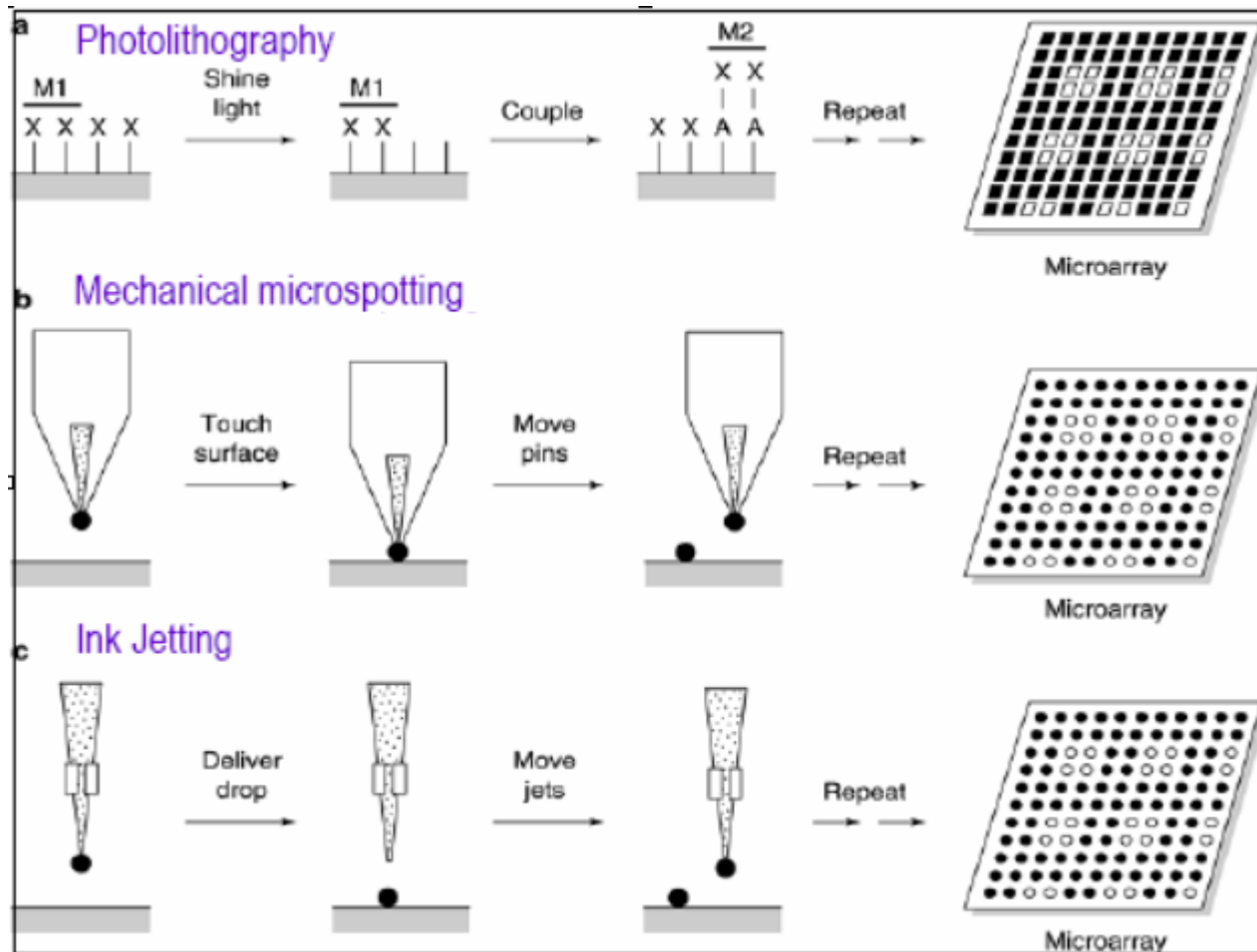


### СПОСОБЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДНК-БИОЧИПОВ НА ТВЕРДОЙ ПОВЕРХНОСТИ

синтез  
олигонуклеотидов  
*in situ*

контактная  
печать

струйная печать





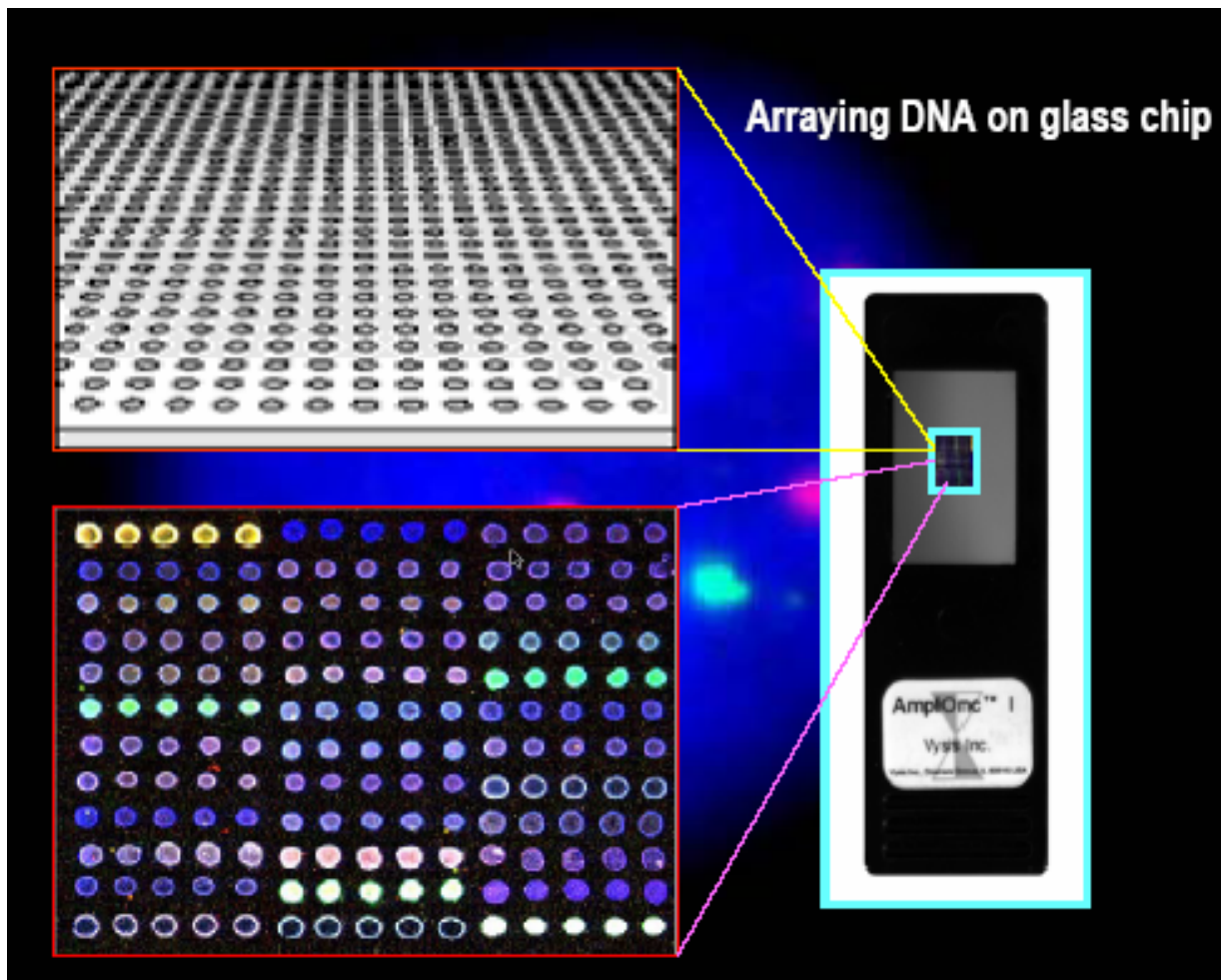


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ИЗГОТОВЛЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ



Вид  
стеклянного  
ДНК-биочипа

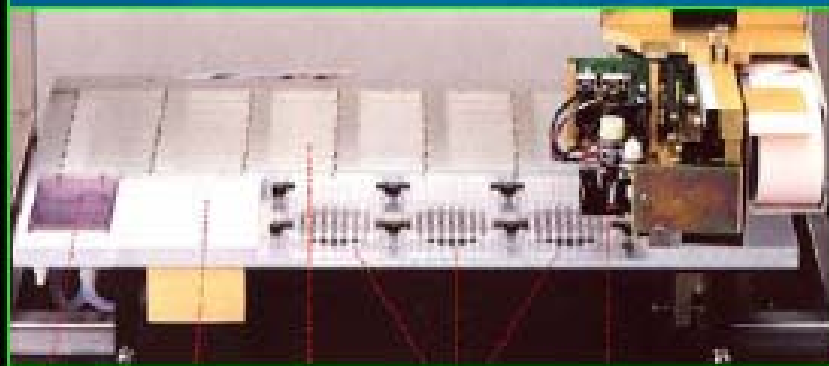




# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

### ИЗГОТОВЛЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ - РОБОТЫ



**ARRAYER**



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ИЗГОТОВЛЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ - видео





# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



## КОНТАКТНАЯ ПЕЧАТЬ (Pin Printing Technology)

Погружение пинов в образцы, размещенные в планшетах и перенесение малого количества образца на стекло на кончике пина

Размер пятна определяется:

- диаметром и формой пина,
- поверхностными энергиями взаимодействий между веществами пина, жидкости и стекла

Ограничения:

- малый объем переносимого образца
- низкая скорость;
- низкая воспроизводимость;



# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома

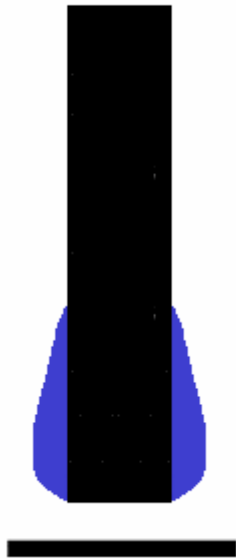


## РАЗНОВИДНОСТИ ПИНОВ

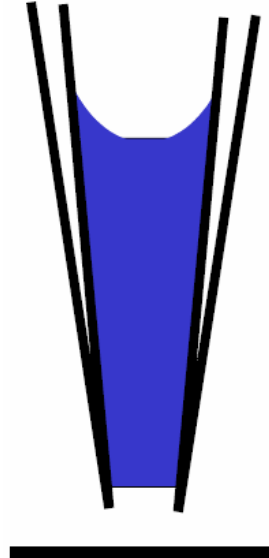
Задачи:

- переносить большой объем образца
- обеспечивать однообразие пятен

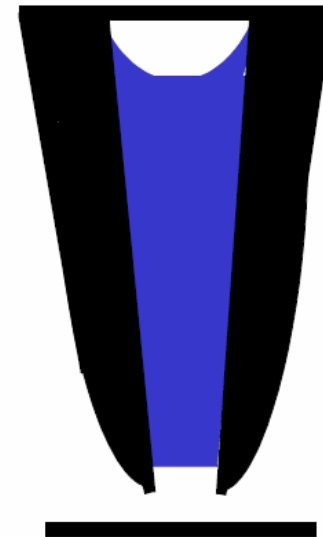
**Solid Pin**



**Tweezer**



**Split Pin**



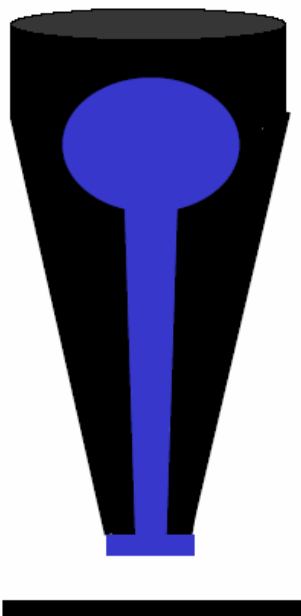


# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома

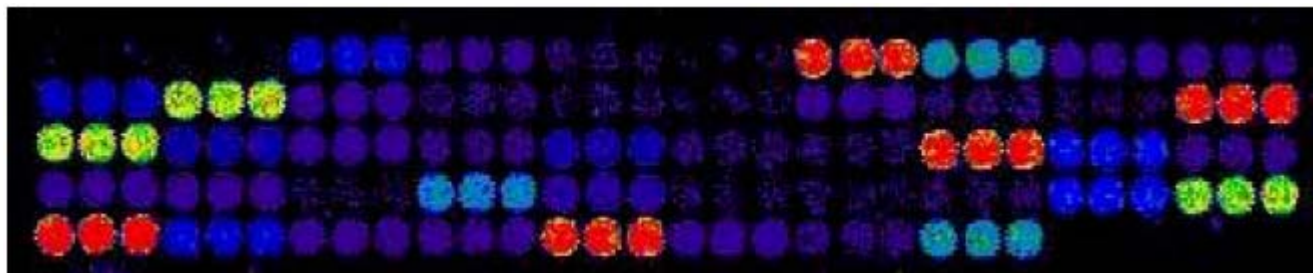


## РАЗНОВИДНОСТИ ПИНОВ: TeleChem's

Micro Spotting Pin



Пины фирмы TeleChem's (Micro Spotting pins) работают наподобие чернильных штампов и могут переносить до 0.2-1.0  $\mu$ l пробы, отпечатывать пятна размером 75-360  $\mu$ m в диаметре с расстоянием между ними 140  $\mu$ m



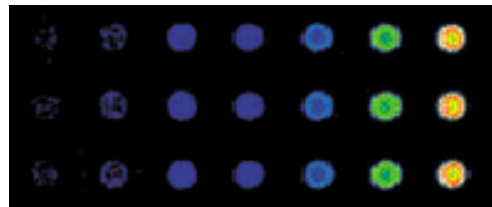
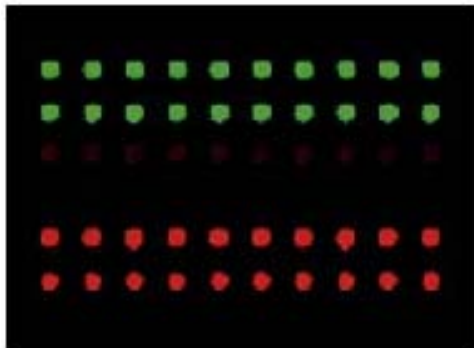
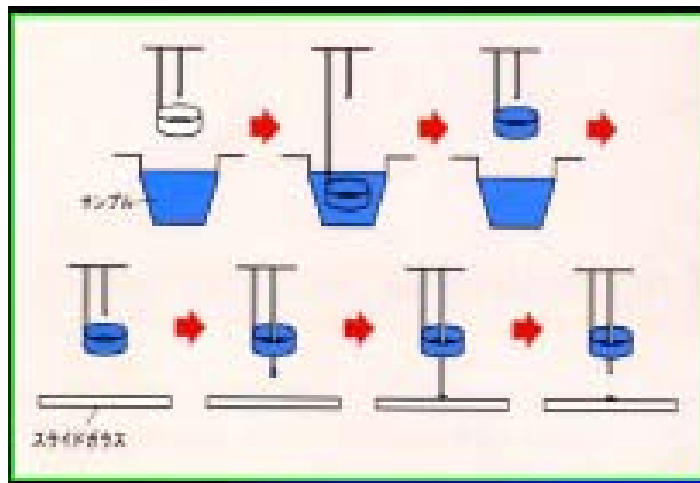
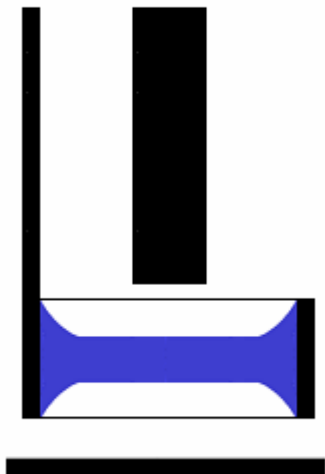


# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



## РАЗНОВИДНОСТИ ПИНОВ: Pin-and-Ring

Pin-and-Ring



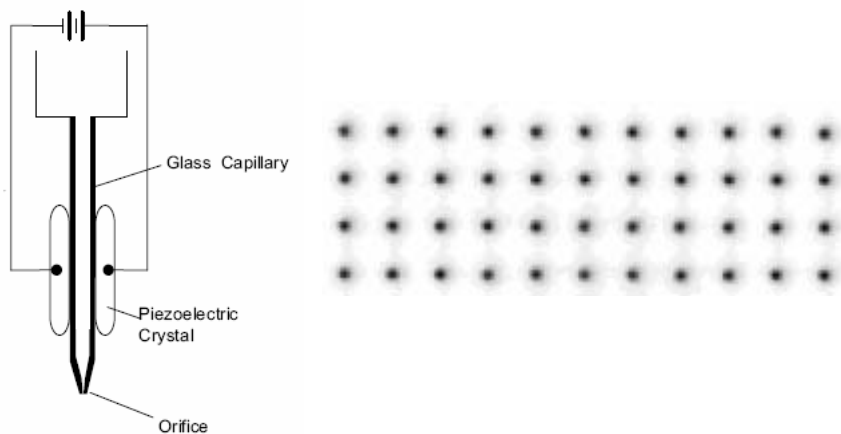


# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



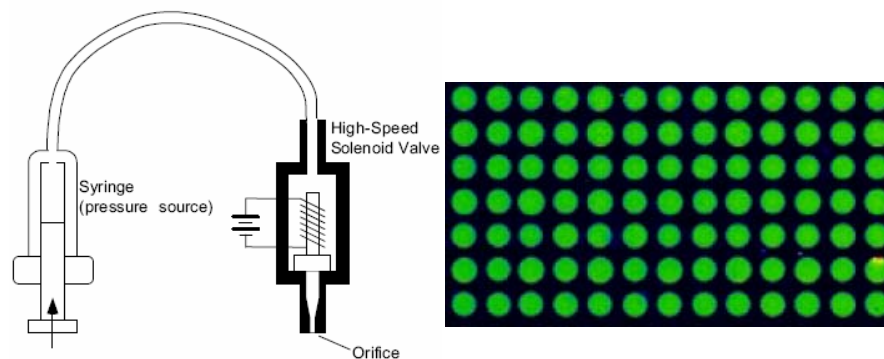
## БЕСКОНТАКТНАЯ ПЕЧАТЬ (INK-JET)

Пьезоэлектрическое устройство



Расстояние между пятнами 750  $\mu\text{m}$ , размер пятен 145  $\mu\text{m}$ .  
Объем капель – сотни пиколитров.  
Высокая скорость – несколько тысяч капель в секунду.

Щприц-соленоидное (syringe-solenoid) устройство



Расстояние между пятнами 500  $\mu\text{m}$ , размер пятен 325  $\mu\text{m}$ .  
Объем капель – 4-8 нанолитров.  
Высокая скорость – несколько тысяч капель в секунду.

Объем микрокапель от 100  $\mu\text{L}$  до 2  $\text{mL}$

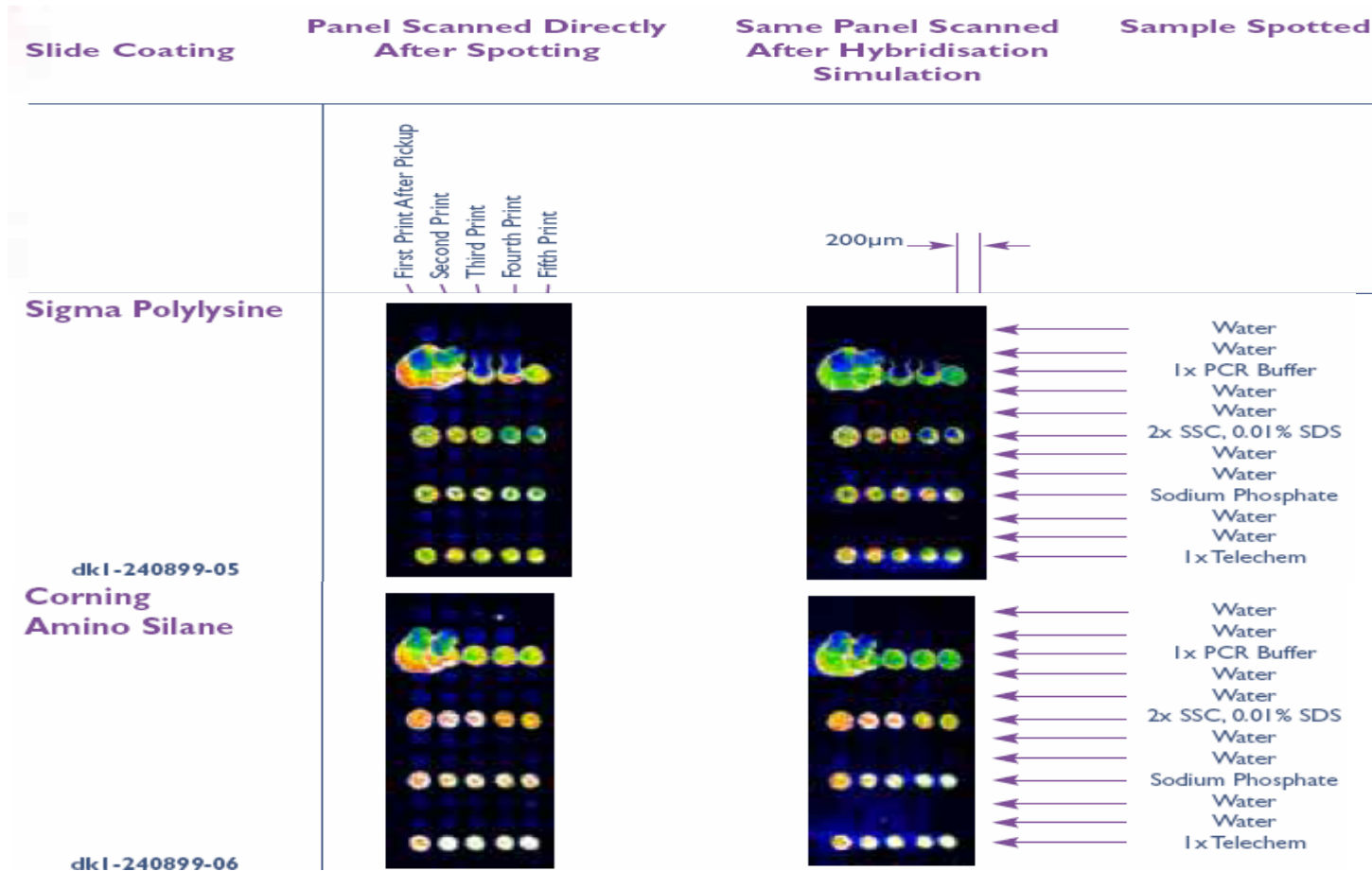




# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



## ЗАВИСИМОСТЬ КАЧЕСТВА ПЕЧАТИ ОТ СПОСОБА ОБРАБОТКИ СТЕКЛА И РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ПРОБ

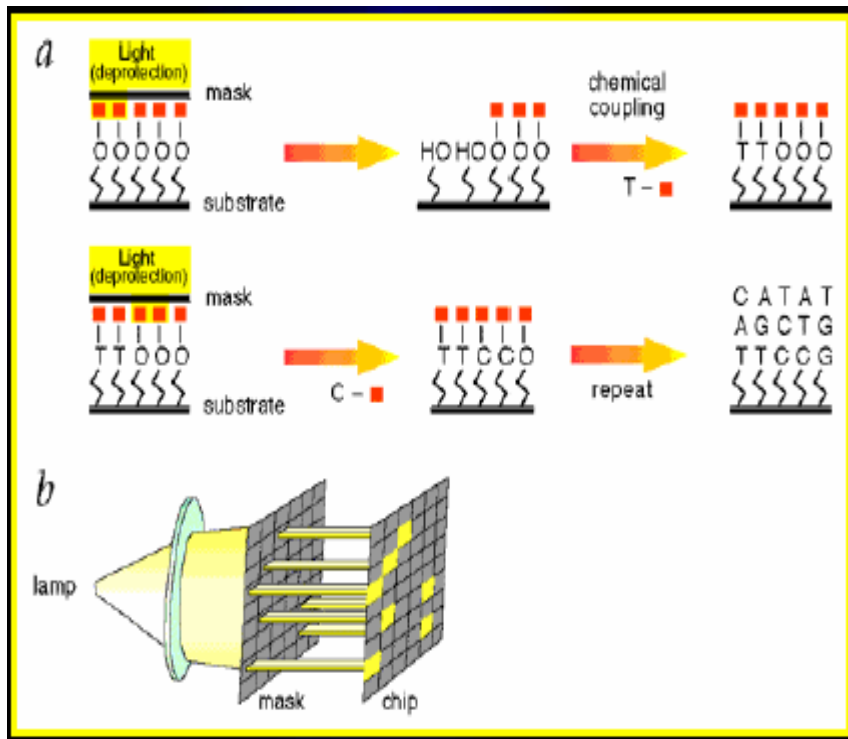




# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



## Процесс фотолитографии по методу Affymetrix



Используется набор масок, трафаретов, через которые облучают поверхность стеклянной пластины. В экспонированных точках происходит фотоиндуцируемая реакция присоединения одного нуклеотида, присутствующего в реакционной смеси. После смены маски и нуклеотида в смеси подается новый импульс света и присоединение еще одного нуклеотида. Весь набор проб синтезируется одновременно, что повышает воспроизводимость. Пластина затем делится на отдельные биочипы и упаковывается в картриджи, которые служат для защиты проб и как камеры для последующей гибридизации



## Affymetrix: Структура элементов биочипа

Affymetrix – компания, производящая олигонуклеотидные микробиочипы «GeneChip».

Каждый ген представлен несколькими короткими олигонуклеотидами 25 нт длиной.

Один меченый образец гибридизуется с одним микробиочипом.

В типичном микробиочипе Affymetrix содержится ~200,000 элементов для 10,000 генов





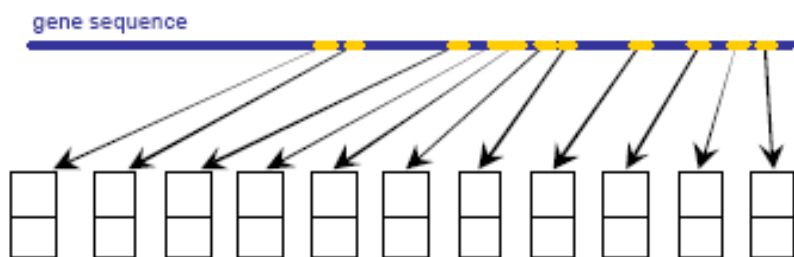
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

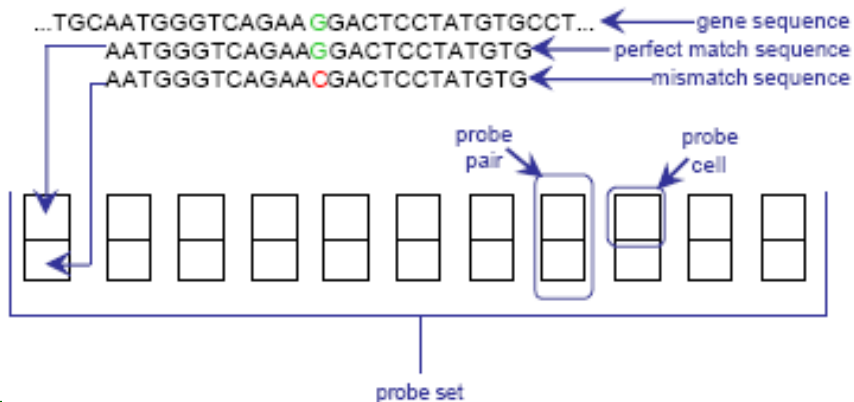


### Affymetrix: Структура элементов биочипа

Different Probe Pairs Represent Different Parts of the Same Gene



A Probe Set for Measuring Expression Level of a Particular Gene



- для измерения уровня мРНК
  - одного гена присутствует один набор проб;
  - \* каждый набор проб состоит из 10-20 олигонуклеотидных проб;
  - \* в каждом элементе биочипа (probe cell) миллионы копий олигонуклеотидных проб;
  - \* каждый олигонуклеотид - 25-мер;
  - \* элементы биочипа организованы в пары проб;
  - \* в каждой паре проб есть проба совершенного соответствия РМ (perfect match) и нарушенного соответствия ММ (mismatch);
  - \* РМ идентична участку в соответствующем гене;
  - \* ММ совпадает с этим же участком за исключением 13-ой позиции, в которой поставлен комплементарный нуклеотид

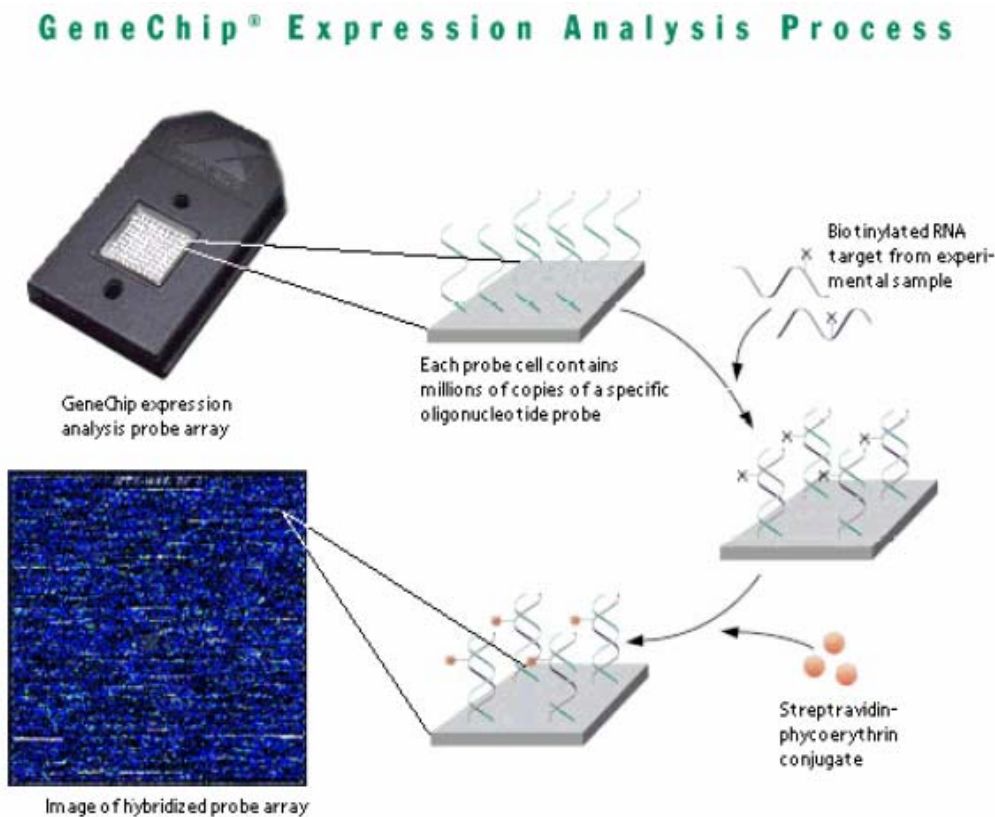


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Affymetrix: Схема технологии



Для гибридизации с микробиочипом выделенная мРНК сначала конвертируется в одноцепочечную кДНК, затем в двухцепочечную кДНК, которая используется как матрица в *in vitro* транскрипции с промотора для РНК полимеразы фага Т7 для производства меченых биотином кРНК. Именно этот пул кРНК используется для гибридизации. Выявление результатов гибридизации производится с помощью стрептавидин-фикоэритринового конъюгата и сканирования сигнала от фикоэритрина





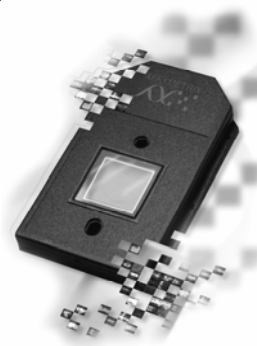
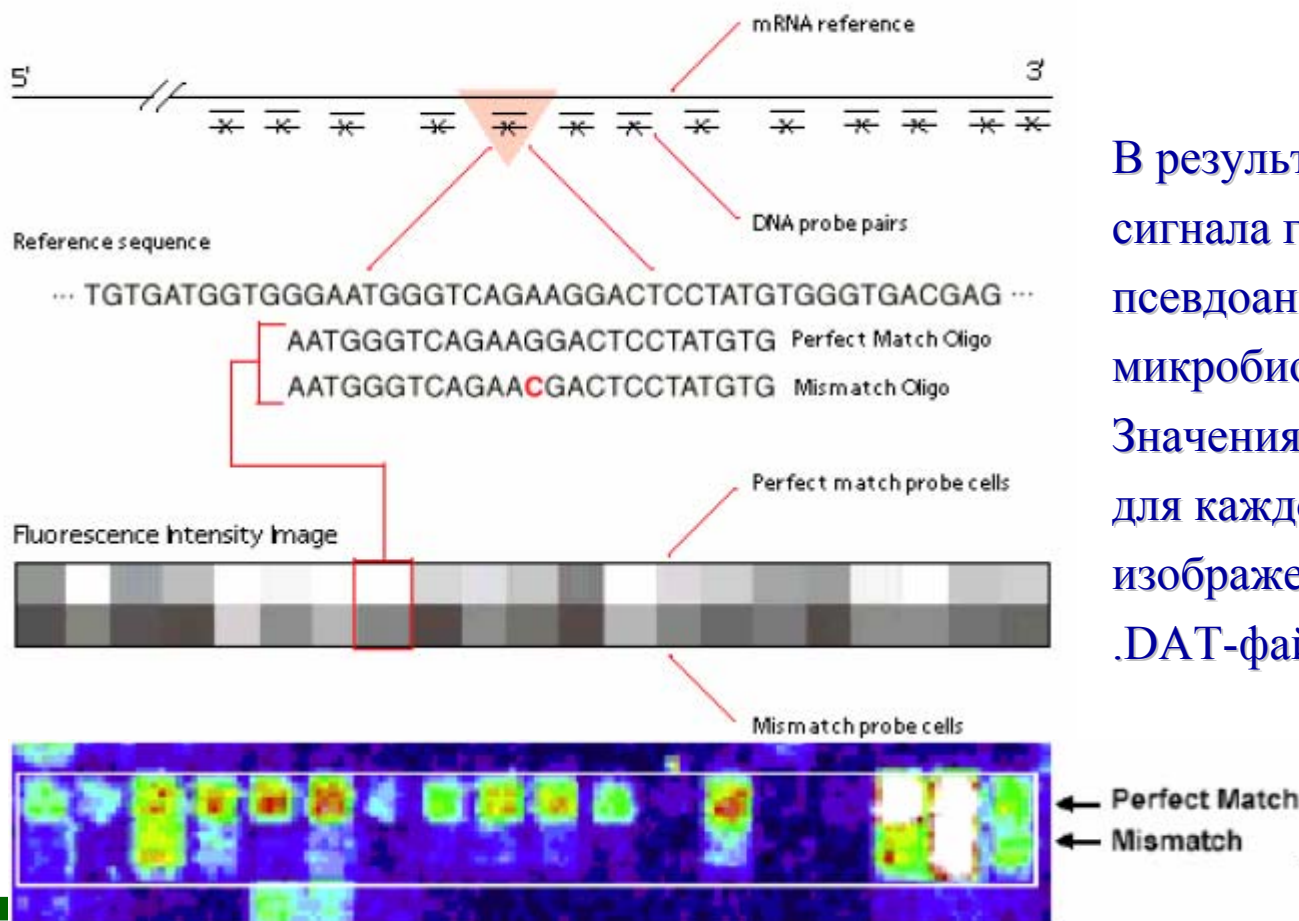
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Affymetrix: Вид сигналов гибридизации

#### GeneChip Expression Array Design



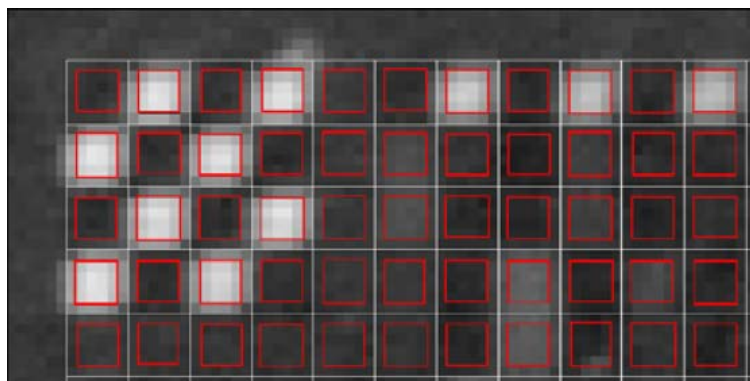
В результате каждого сканирования сигнала гибридизации получается псевдоаналоговое изображение микробиочипа.

Значения интенсивности сигнала для каждого пиксела этого изображения представлены в виде .DAT-файла



## Affymetrix: Вычисление сигнала

Вычисление сигнала или корректировка фона (background adjustment)



$$PM - MM = S$$

- **Affymetrix summary:**  
 $\log(\text{Signal Intensity}) = \text{TukeyBiweight}\{\log(PM_j - MM_j^*)\}$
- **dChip model (Li, Schadt & Wong):**  
 $PM_{ij} - MM_{ij} = \theta_i \varphi_j + \varepsilon_{ij}$
- **Robust Multichip Analysis (RMA):**  
Use median polish or robust regression to fit  
 $\log_2(PM - BG)_{ij} = \text{chip}_i \text{ effect} + \text{probe}_j \text{ effect} + \varepsilon_{ij}$

- При вычислении сигнала для каждого элемента (cell) значения интенсивности для пикселей элемента преобразуются в одно значение.
- данные о значениях для всех элементов представлены в .CEL-файле
- Каждый элемент состоит из 10x10 пикселей
- Для каждого элемента (и PM, и MM) из расчетов удаляются внешние 36 пикселей для снижения влияния фона, остаются 8x8 пикселей
- За значение сигнала какого-либо элемента берется 75-й перцентиль от суммарного значения для 8x8 пикселей
- За значение фона в одном из 16-ти секторов биочипа принимается среднее от 2% элементов в этом секторе с самыми низкими значениями
- За значение сигнала для каждой пары проб берется разница сигналов PM и MM



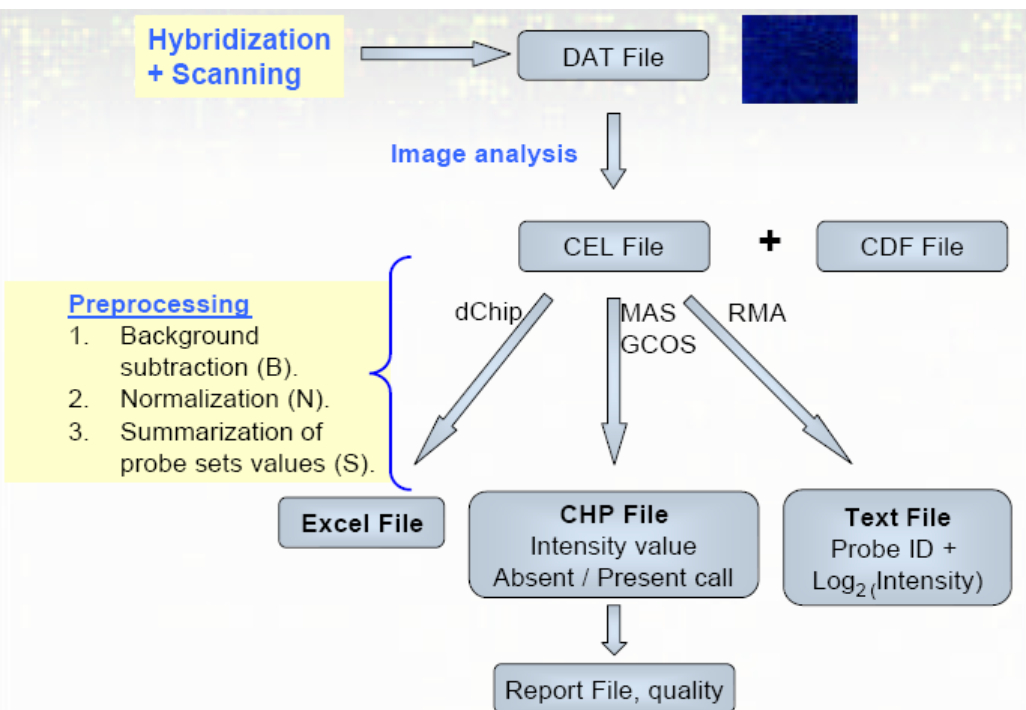


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Affymetrix: Типы файлов с результатами



- 1) .DAT файл - изображение, Содержит значения сигнала для  $\sim 10^7$  пикселей ( $\sim 50$  Мб).
- 2) .CEL файл - Cell intensity file. Содержит значения PM and MM для элементов чипа ( $\sim 7$  Мб).
- 3) .CDF файл - Chip Description File. Содержит данные о положении проб, пар проб и наборов проб на чипе ( $\sim 7$  Мб).
- 4) .EXP файл - Experiment Description File. Содержит описание образцов, установки для проточной системы реактивов и для сканера ( $\sim 1$  кб).
- 5) .RPT файл - Quality report file. Содержит описание параметров качества данных ( $\sim 2$  кб).

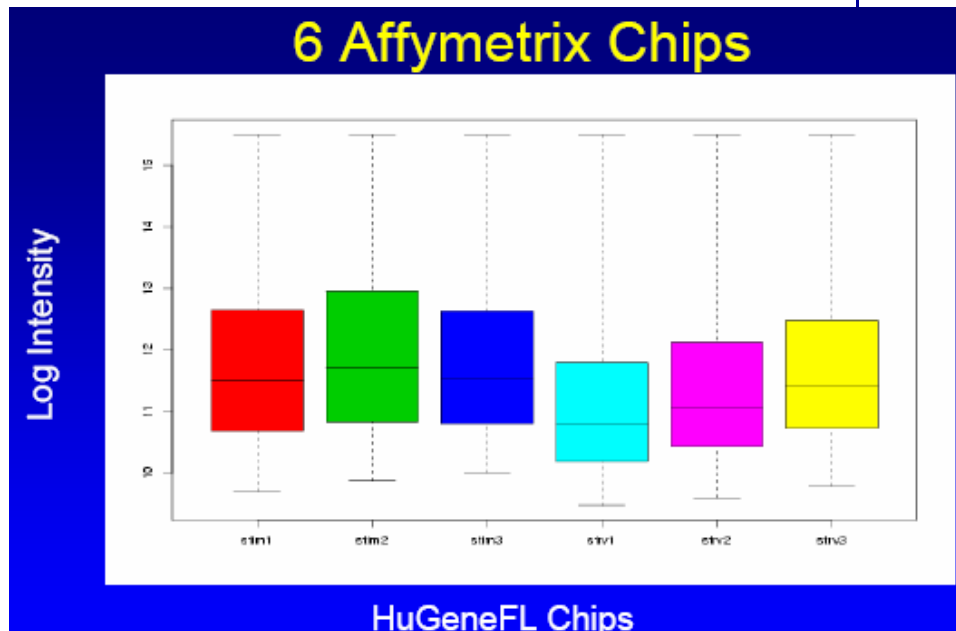


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Affymetrix: Причины применения нормализации



Типы различий:

- Интересующие нас
  - различия в экспрессии генов
- мешающие нам
  - различия в приготовлении образцов
  - различия в обработке биочипов
  - различия в сканировании биочипов

Между биочипами уже в одном эксперименте с многими отдельными гибридизациями могут быть различия по:

- общей яркости биочипов
- общим и локальным значениям фона

Систематические отклонения могут быть из-за различий в:

- количествах РНК в образцах
- эффективности гибридизации
- настройках или нестабильности сканера



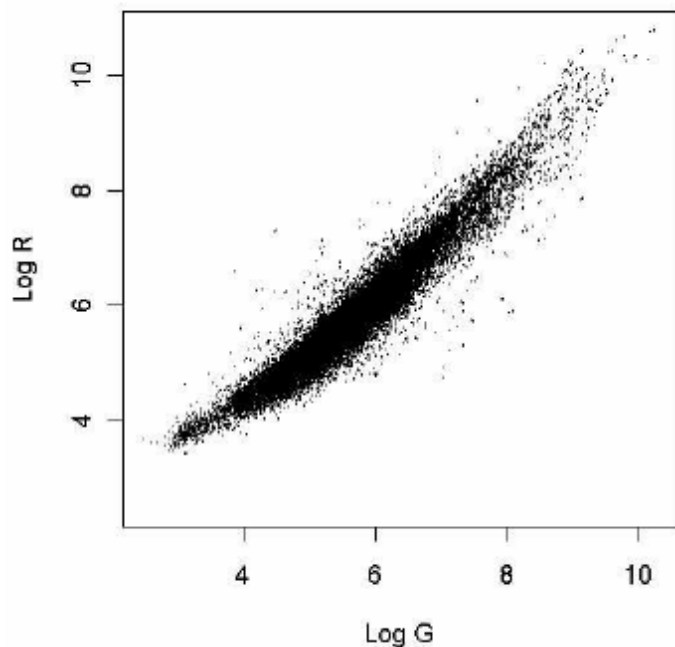
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Графическое представление сигналов

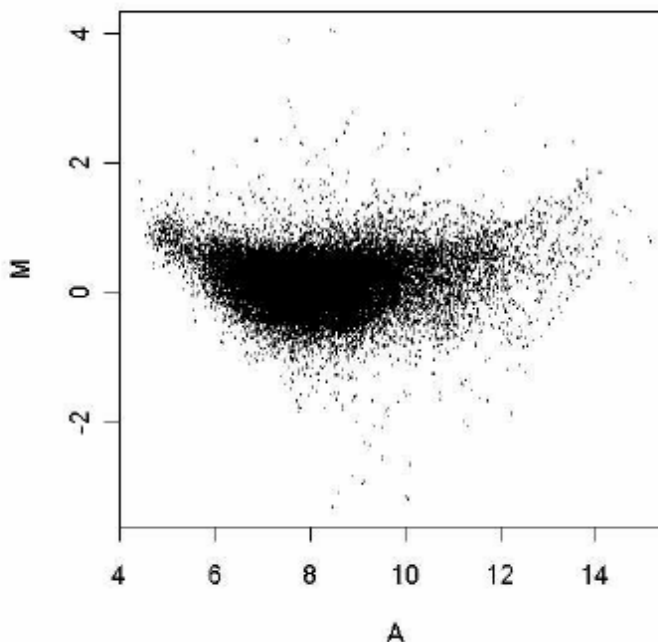
#### Способ 1



**R** - значения красных сигналов

**G** - значения зеленых сигналов

#### Способ 2



$$M = \log_2 R - \log_2 G,$$

$$A = (\log_2 R + \log_2 G) / 2$$

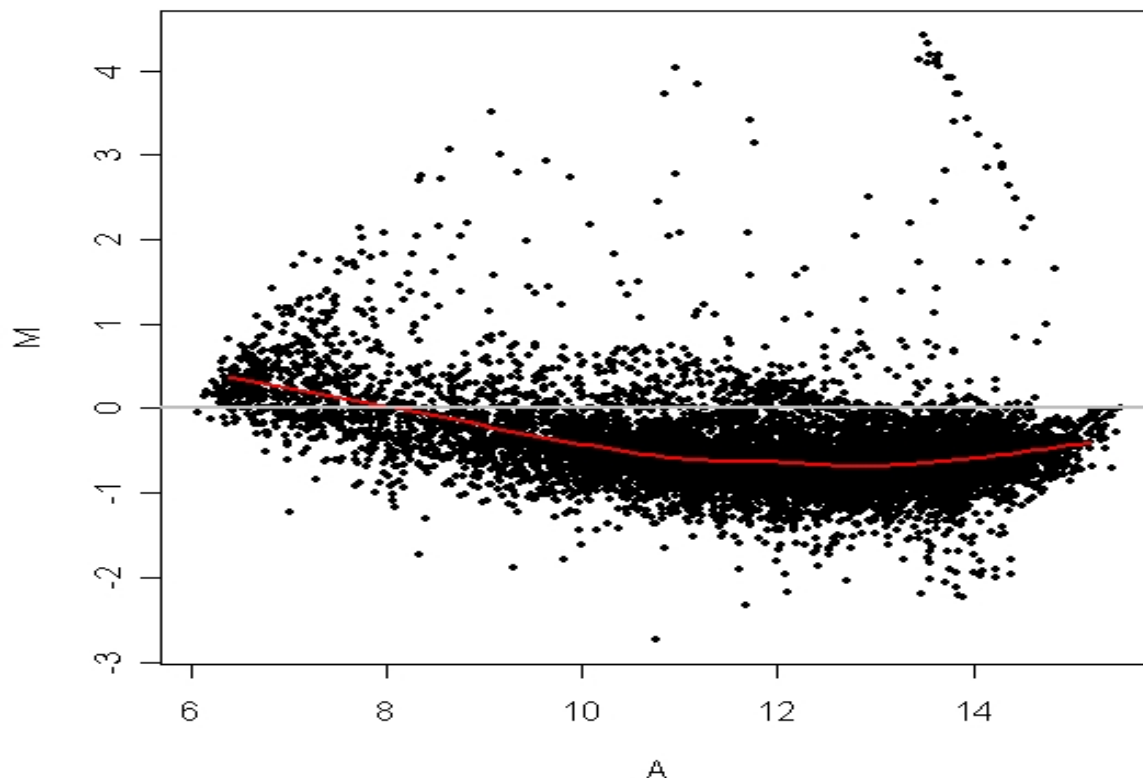


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Наблюдение систематического отклонения



Средняя интенсивность сигнала (**красная линия**) отклоняется от нулевого значения. Это означает присутствие систематического отклонения значений сигналов.



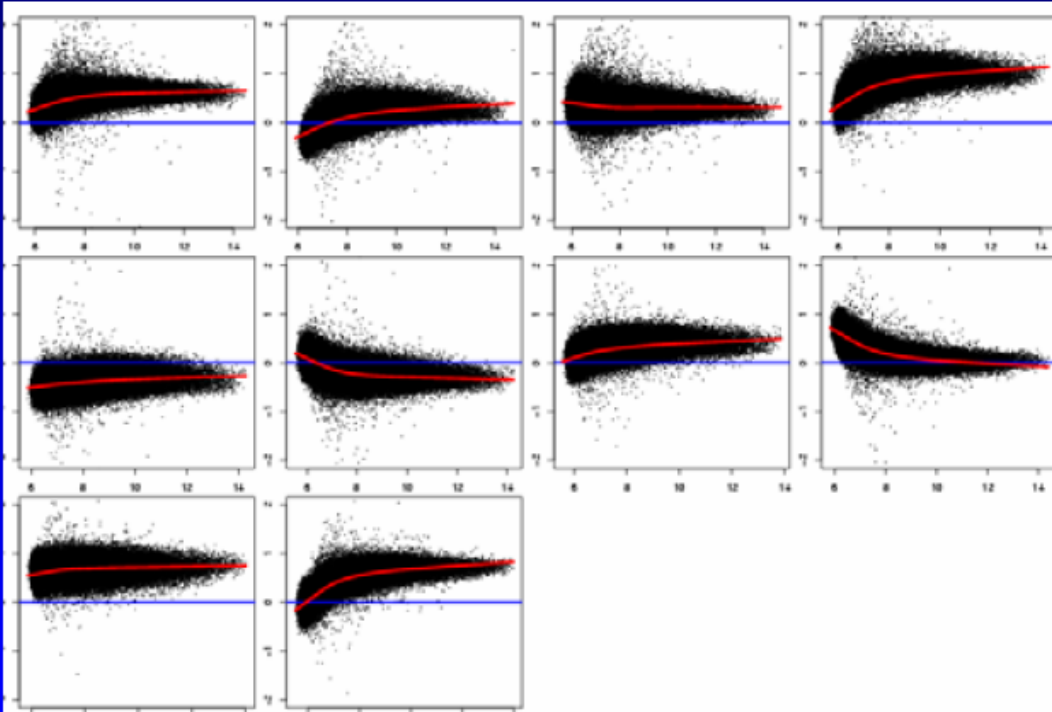
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Affymetrix. Графики распределения данных

#### M vs. A plots of chip pairs: before quantile normalization



Результаты для 5 Affymetrix-биочипов (HG-U95A) после гибридизации с мРНК из культур клеток печени (Bolstad et al. 2003);

- «M vs. A» графики, где M and A - PM-значения для каждой пары проб;
- 10 попарных графиков для PM-значений;

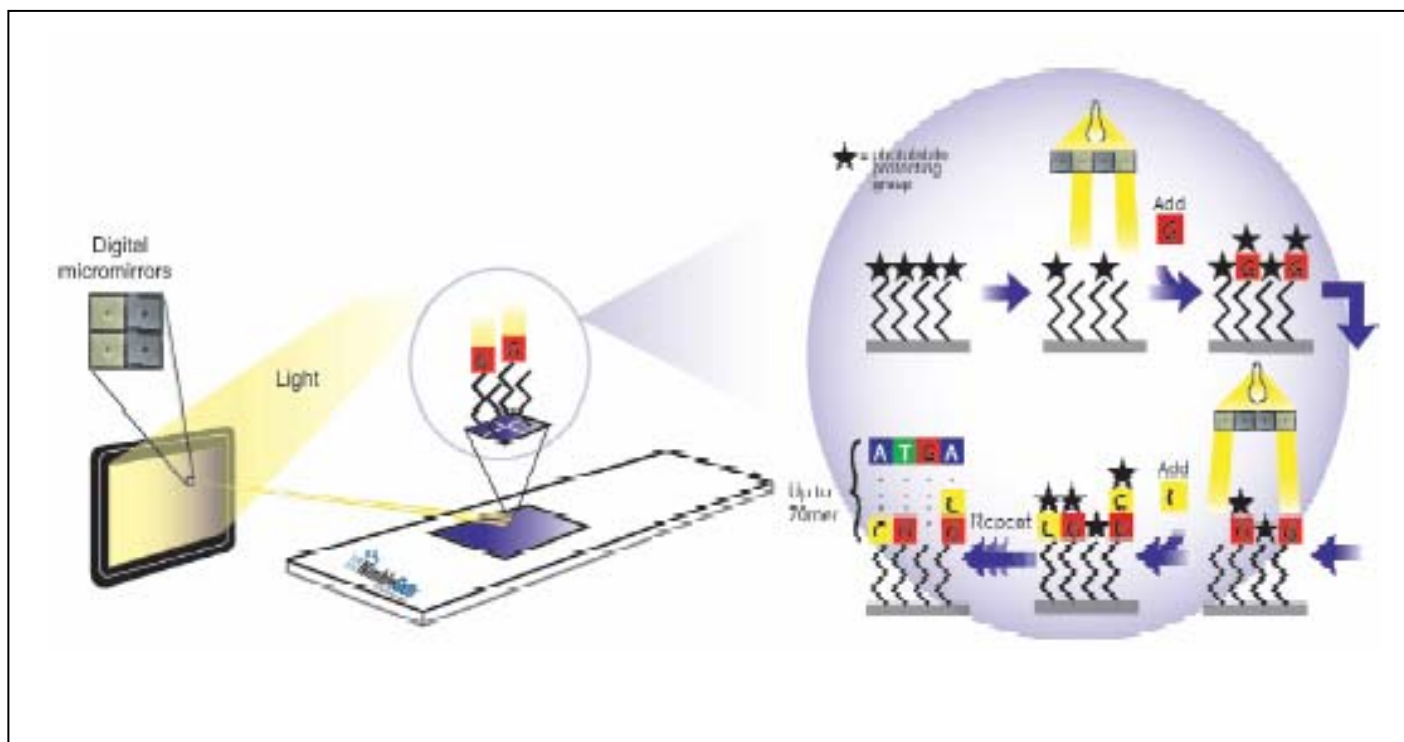


# Применение биочипов (микроматриц) для исследования транскриптома



## NimbleGen's Maskless Array

Разновидность фотолитографического способа приготовления олигонуклеотидных биочипов - NimbleGen's Maskless Array Synthesizer (MAS) Photolithography.





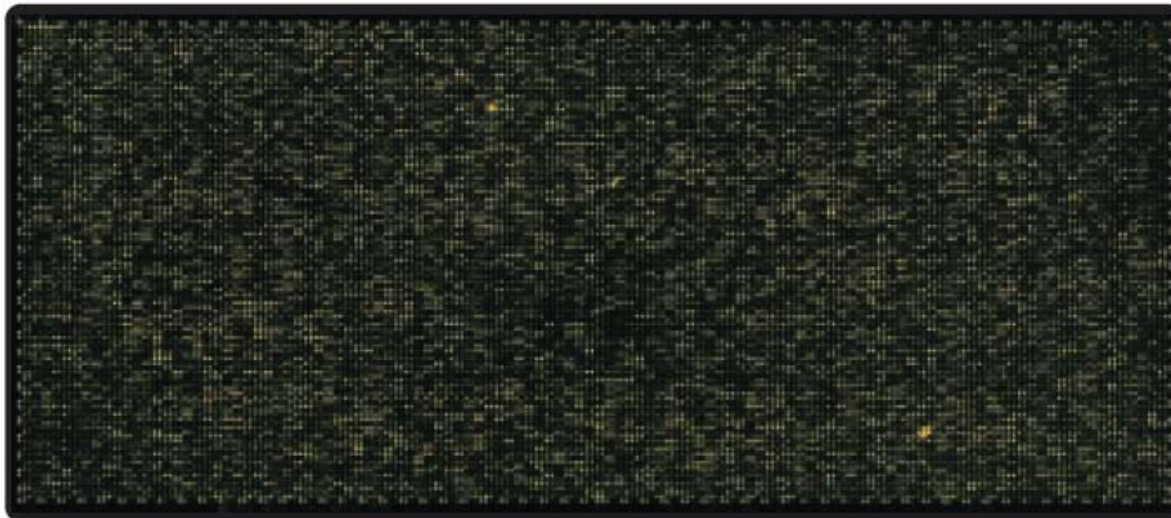


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### Олигонуклеотидные биочипы Agilent



**Agilent Technologies**

*In situ* синтез  
60-мерных олигонуклеотидов  
Двухцветная гибридизация

#### Custom *in situ* Microarray System Specifications, 8.4K features:

Product Number	G2508A
Probe Length	60-mer
Features/Microarray	8,455 features / microarray x 2 microarrays per 1" x 3" glass slide
	User Defined Features 8,091
	Perimeter Control Features 364
Features Present	> 95%
Sensitivity - Minimum	1 mRNA copies per cell in 10 <sup>6</sup> cells*
System Dynamic Range	10 <sup>3.5</sup> over the sample profile, in each color
Hybridization Sample Volume	250 microlitres per microarray

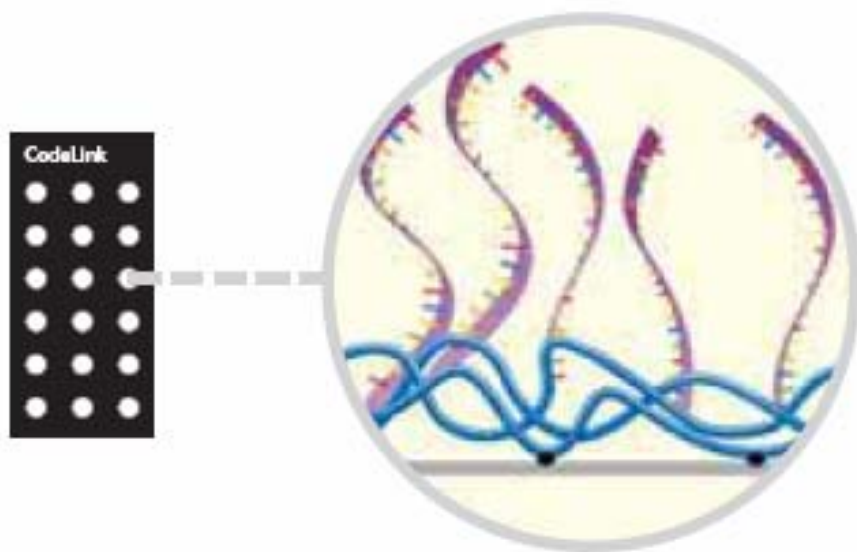




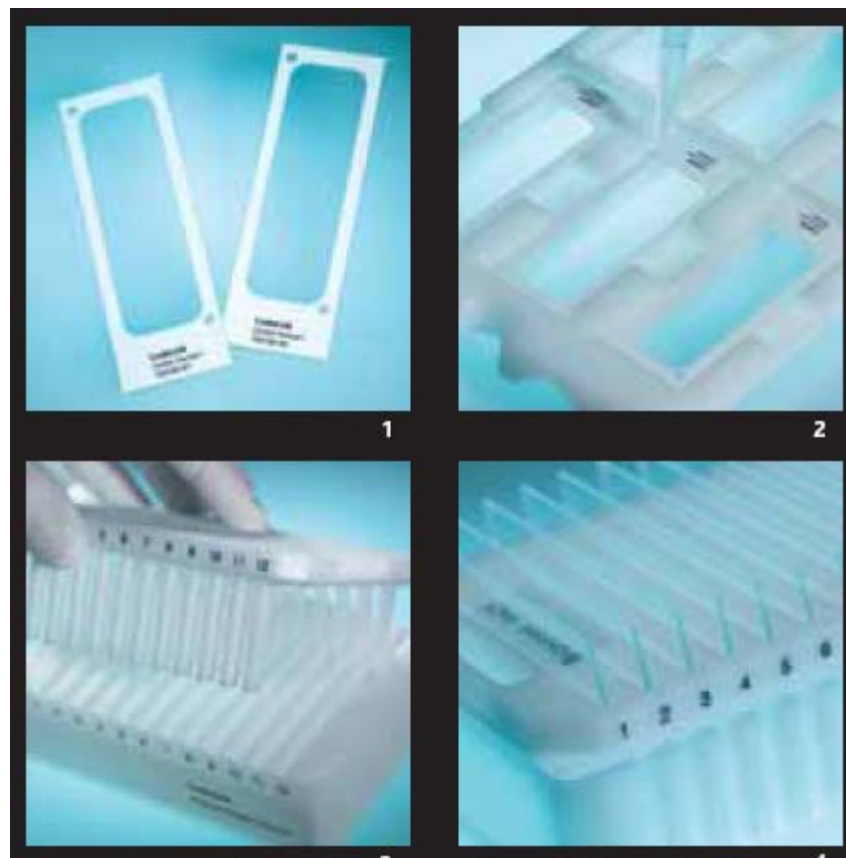
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

### Олигонуклеотидные биочипы Amersham CodeLink Gene Expression Bioarray System



Особенность – иммобилизация 30-мерных олигонуклеотидов в объеме, в микрокаплях геля (3-D gel matrix)



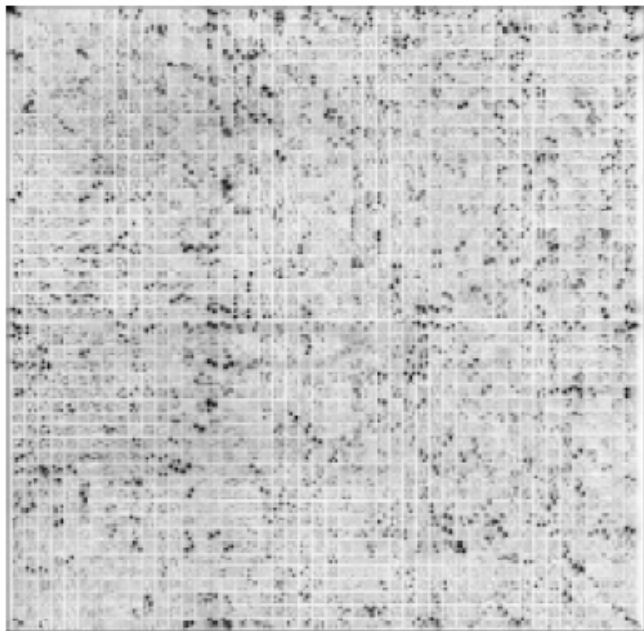


# Исследование функциональных характеристик генома

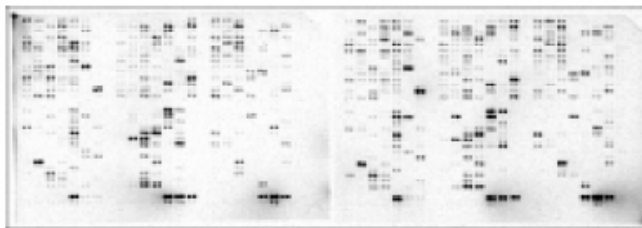
## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



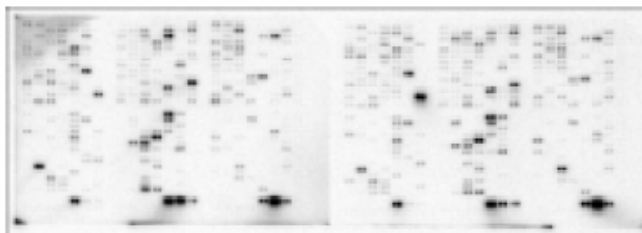
### Amersham membrane (filter) array



**Figure 1. Storm System Imaging of Genome Systems Gene Discovery Array.** mRNA was used to generate a labeled cDNA probe. The probed array was exposed to a storage phosphor screen for 3 days and imaged using a Storm 820 system. 36,864 spots are contained on a 22 x 22 cm membrane.



**Figure 2. Storm System Imaging of Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrays probed with <sup>33</sup>P-labeled cDNA from Jurkat cells.** mRNA from resting (left) and treated (right) Jurkat T cells was used to generate a cDNA probe. The probed arrays were exposed to storage phosphor screens for 2 days and imaged using a Storm 840 system.



**Figure 3. PhosphorImager SI System Imaging of Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrays probed with <sup>32</sup>P-labeled cDNA.** mRNA from resting (left) and treated (right) Jurkat T cells was used to generate a cDNA probe. The probed arrays were exposed to a storage phosphor screen for 2 days and imaged using a PhosphorImager system.





# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### SuperArray membrane (filter) array

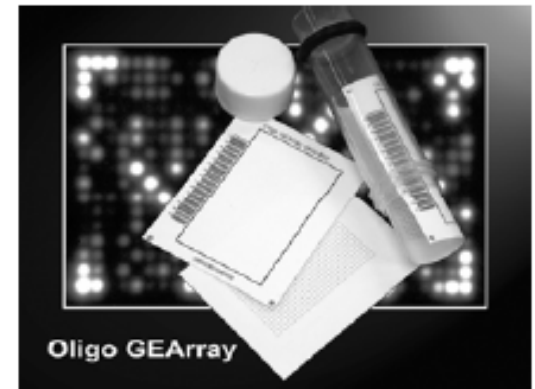
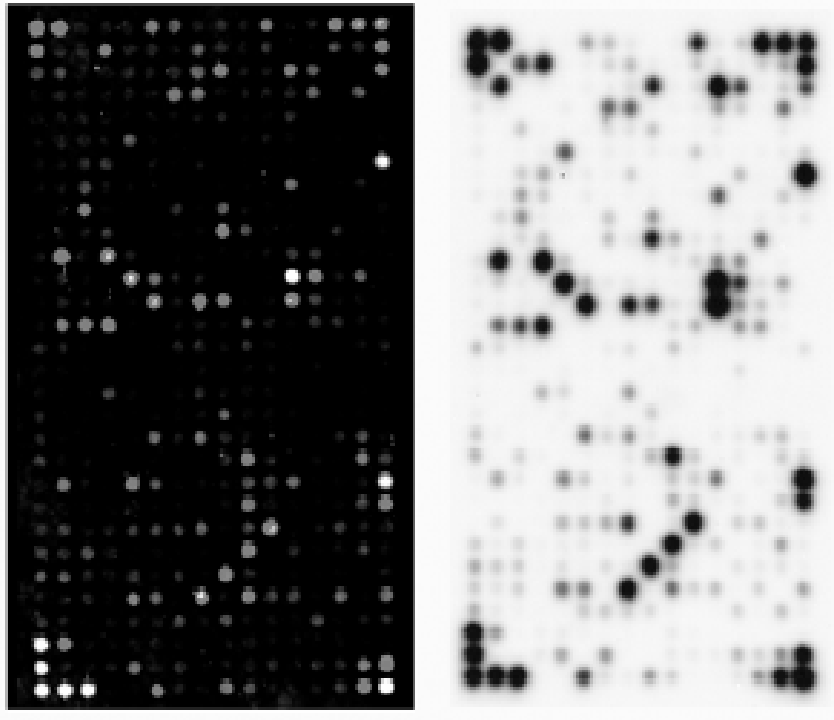


Figure 4: GEArray® Detection options.  
Left, Fluorescence: Oligo GEArray (OHS-801) was mounted on a glass slide and scanned on an Axon 4000B instrument. Right, Chemiluminescence: Oligo GEArray (OHS-801) was analyzed on a CCD camera based imager.

Oligo GEArrays and disposable hybridization chamber



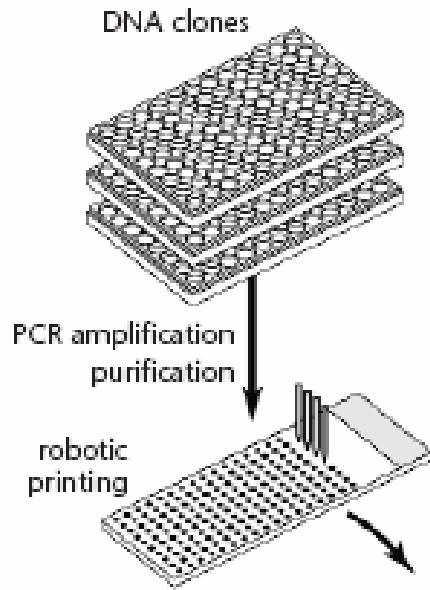
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

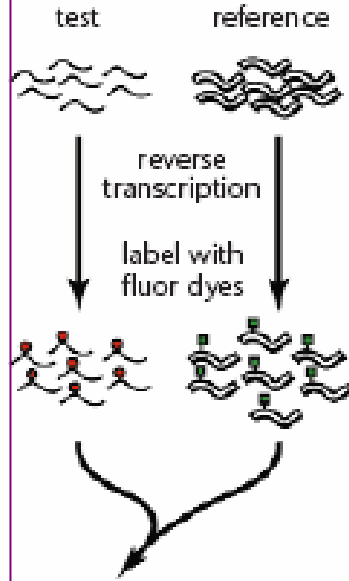


### СХЕМА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ кДНК-БИОЧИПОВ

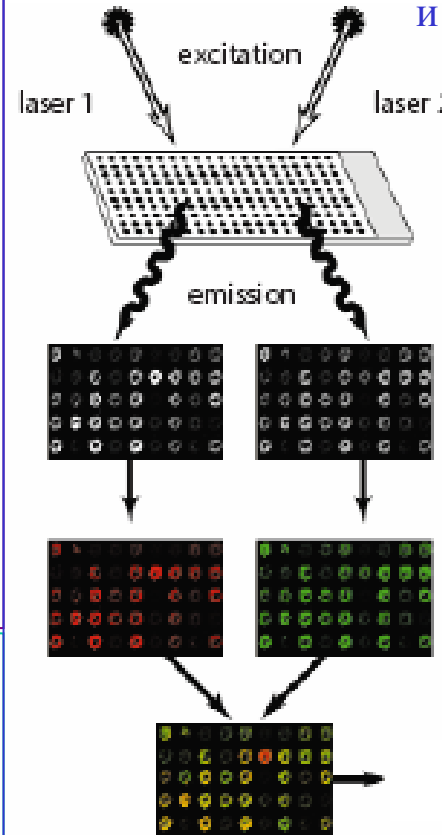
#### Приготовление биочипов



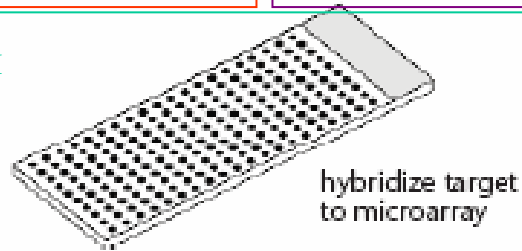
#### Приготовление образца



#### Сканирование и оцифровка сигналов



#### Гибридизация



#### Компьютерный анализ



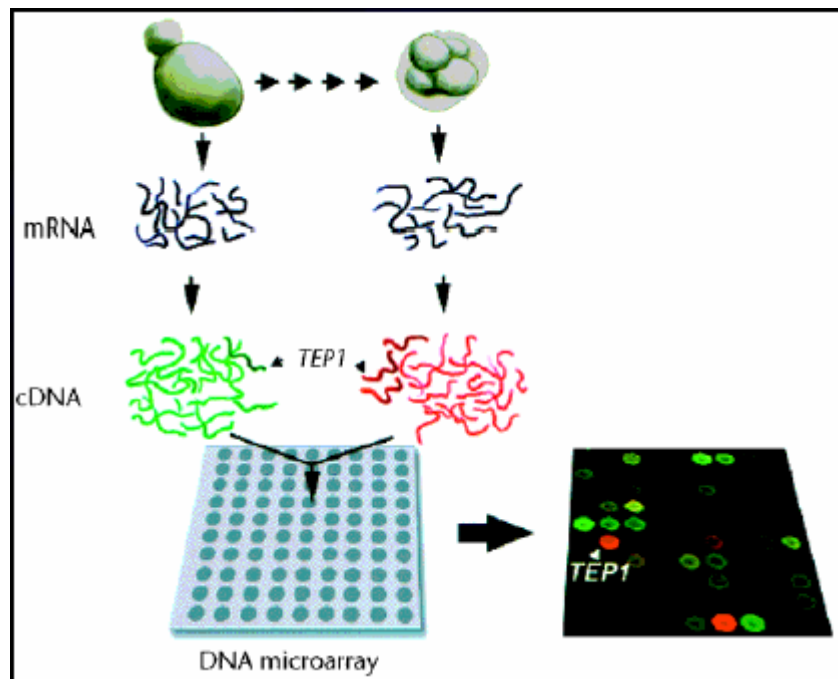


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ПРИГОТОВЛЕНИЕ МЕЧЕННОГО ОБРАЗЦА И ГИБРИДИЗАЦИЯ ДЛЯ кДНК-БИОЧИПОВ



Каждый пул кДНК, приготовленный из двух разных образцов, делится на две равные части молекул, в которые вводятся меченые флуоресцентными группировками нуклеотиды (прямое или не прямое включение). Обычно это зеленый Cyanine3 (Cy3) и красный Cyanine5 (Cy5). Оба меченых образца объединяются для совместной конкурентной гибридизации.





# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ТИПЫ ФАЙЛОВ С РЕЗУЛЬТАТАМИ СКАНИРОВАНИЯ кДНК-БИОЧИПОВ

Block	Column	Row	Name	ID	X	Y	Dia.	F635 Median	F635 Mean	F635 SD
1	1	1	A	TRP 1:2	2460	260	170	194	206	86
1	2	1	A	DAP 1:2	2700	260	170	203	207	81
1	3	1	A	THR 1:2	2940	260	170	197	209	82
1	4	1	A	PHE 1:2	3180	260	170	199	224	150
1	5	1	A	TRP 1:2	3420	260	170	196	210	86
1	6	1	A	DAP 1:2	3660	260	170	200	207	87

Как правило, результаты двухцветной гибридизации представлены в виде .GPR-файла.

Это файл содержит результатов квантификации по обоим каналам (на дли волн 635 нм и 543 нм) и вычисления статистических параметров, осуществленной программным обеспечением сканеров.

.GPR-файл содержит также общую информацию о методе получения изображения и его анализа, о настройках сканера, а также данные, полученные для каждого индивидуального элемента.



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ХАРАКТЕРНЫЕ ТЕРМИНЫ И ПАРАМЕТРЫ

При описании ДНК-чипов наиболее часто используют термины:

- «проба» или «зонд» (probe), фрагмент ДНК, иммобилизованный на подложке,
- «мишень» (target) или «образец» (sample), фрагменты ДНК(кДНК) из биологического материала

#### кДНК-биочипы

Типичный кДНК-биочип состоит из 40000 кДНК-проб длиной 600-2400 н.п.

#### олигонуклеотидные биочипы

Олигонуклеотидные биочипы высокой плотности (high-density oligonucleotide arrays) могут содержать до 500,000 пар проб на одном стекле. Одному гену могут соответствовать 11-20 пар проб.

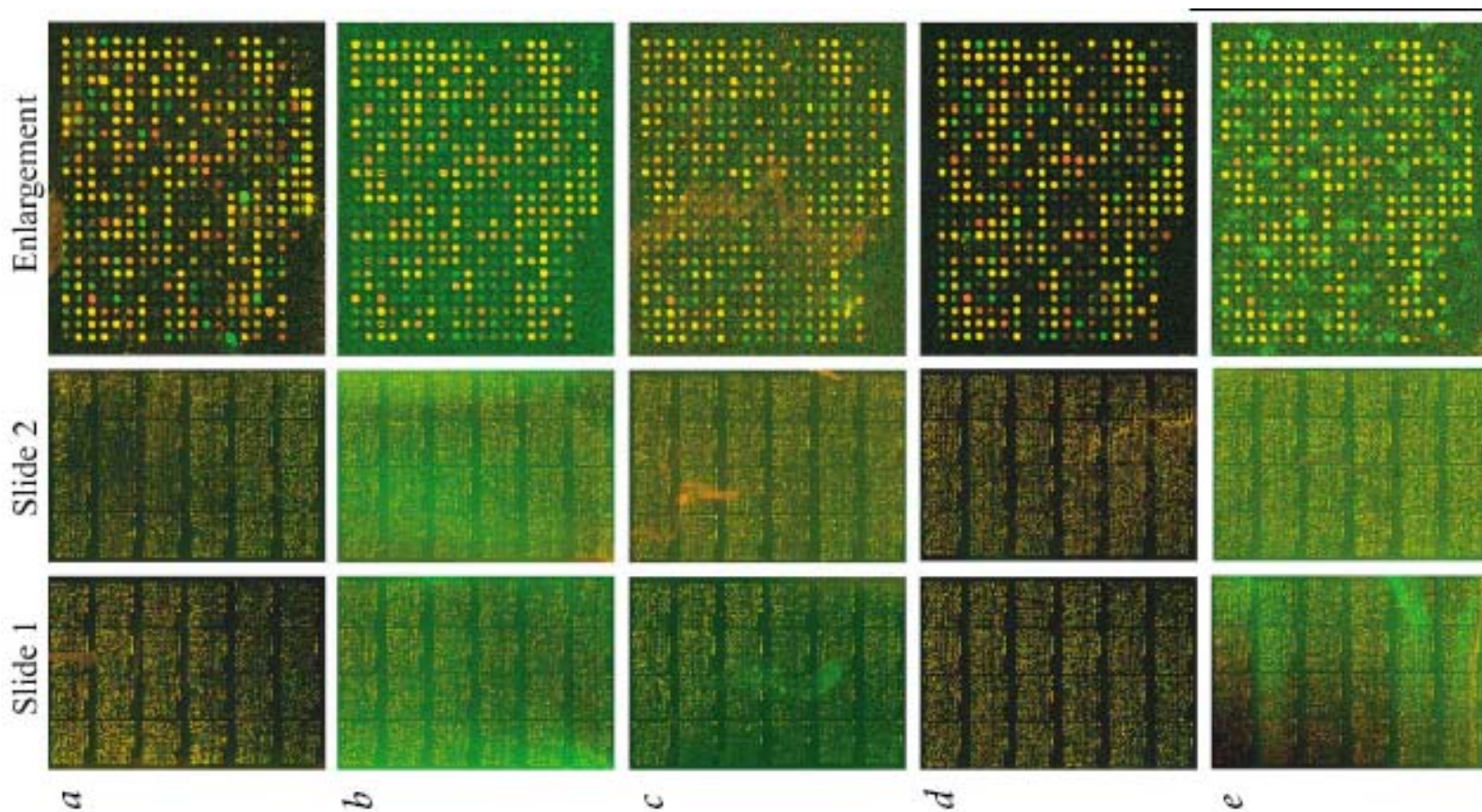


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СКАНИРОВАНИЕ И СРАВНЕНИЕ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ГИБРИДИЗАЦИИ







# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

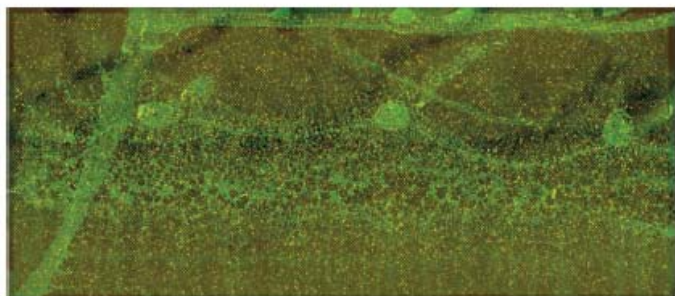


### СКАНИРОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГИБРИДИЗАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ



Control, normal microarray

Изображение нормальной биочип-гибридизации



Microarray with wash artifacts

Видны дефекты отмывки



Microarray with degraded total RNA

Видно, что образец РНК деградирован

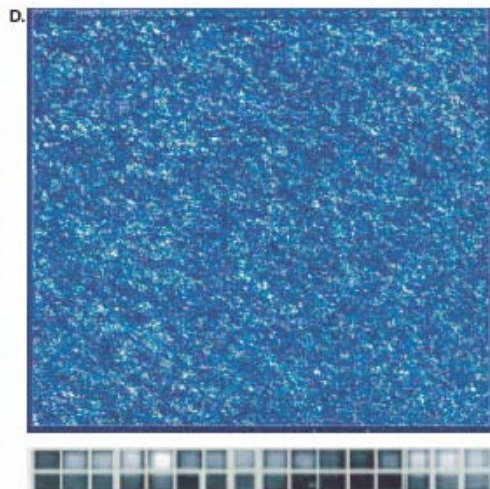
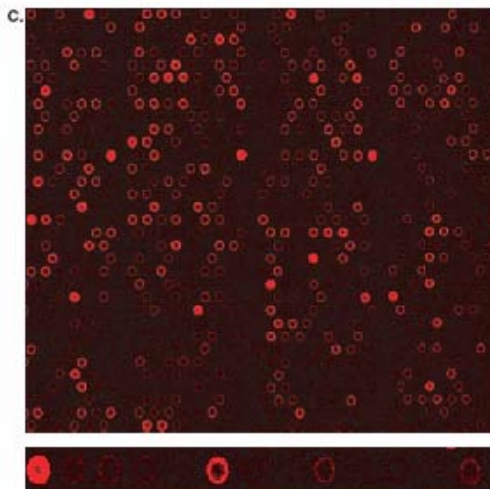
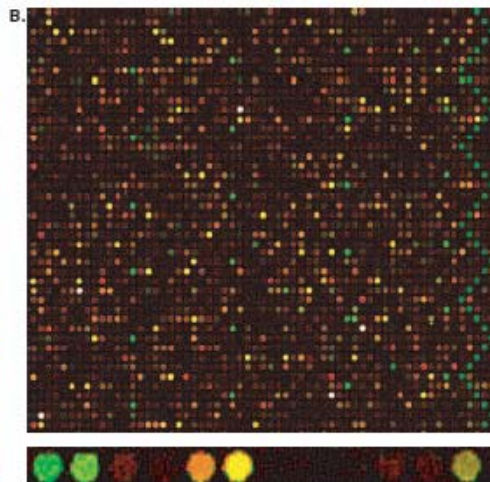
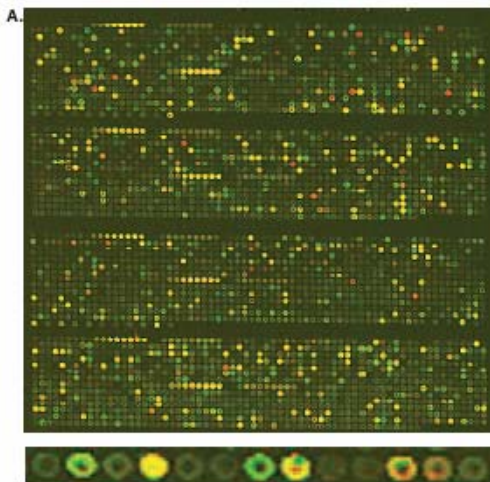


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНЕНИЕ РАЗНЫХ БИОЧИПОВ



- A. напечатанный кДНК-биочип
- B. Agilent-биочип 60-меры
- C. Amersham 3-D 30-меры
- D. Affymetrix-биочип высокой плотности



## ОБРАБОТКА ИЗОБРАЖЕНИЙ

Исходные данные, получаемые после сканирования по каждому каналу, - это изображения определенного района поверхности стекла в черно-белой шкале. Обычно это 16-битные TIFF (Tagged Information File Format) изображения.

Они преобразовываются в цифровые данные интенсивности сигнала гибридизации после:

- определения центра пробы ( регистрации)
- выделение пикселей картины, относящихся к пробе и не-пробе (сегментация)
- определение значений интенсивности сигнала от пробы (как суммированной величины значений для пикселей каждого сегмента пробы) и определение значений фона (как суммированной величины значений для пикселей каждого сегмента не-пробы) (квантификация)



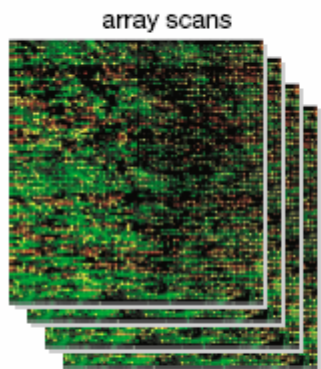
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

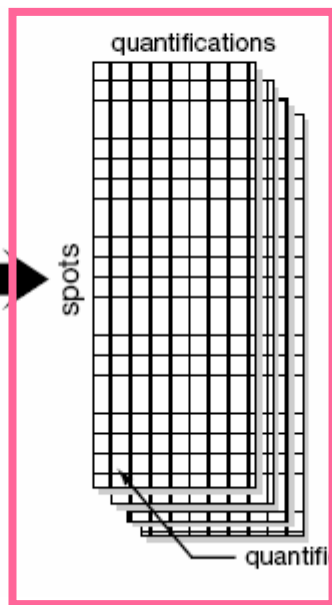


### ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ДНК-БИОЧИПОВ

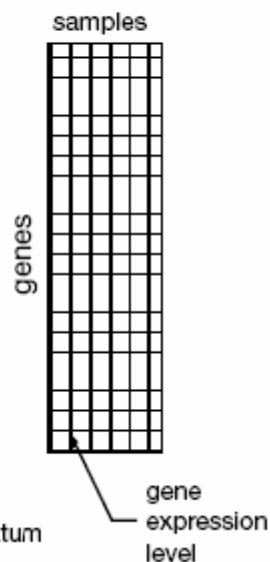
Исходные данные



Матрицы измерений



Матрицы данных по экспрессии генов







# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ИСТОЧНИКИ РАЗБРОСА ХАРАКТЕРИСТИК

#### СИСТЕМАТИЧЕСКИЕ ОШИБКИ

- Количество образца
- Эффективность:
  - выделения РНК
  - обратной транскрипции
  - введения метки
  - детекции сигнала

Сходный эффект на многие измерения  
Коррекция на основе анализа данных



КАЛИБРОВКА

#### СТОХАСТИЧЕСКИЕ ОШИБКИ

- Успешность ПЦР/Качество ДНК
- Эффективность раскапывания/печати:
  - размер пятен
  - морфология пятен
- Кросс-гибридизация
- Неспецифическая гибридизация

Случайны и не учитываемы, «шум», фон



МОДЕЛИРОВАНИЕ ОШИБКИ



# Исследование функциональных характеристик генома Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ В БИОЛОГИИ

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ





## **АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНОМНОЙ ДНК**

### **Мутационный анализ и ресеквенирование с помощью олигонуклеотидных биочипов.**

К настоящему времени предложено большое количество методов выявления SNP, которые можно разбить на категории в зависимости от принципа биохимической реакции, метода детекции или формата анализа (Syvanen, 2001). Биохимическими механизмами, положенными в основу различения аллелей, могут быть:

- гибридизация с аллель-специфическими олигонуклеотидами,
- эндонуклеазное расщепление,
- удлинение праймера,
- присоединение к праймеру только одного нуклеотида (минисеквенирование),
- лигирование двух олигонуклеотидов, инвазивное расщепление и др.



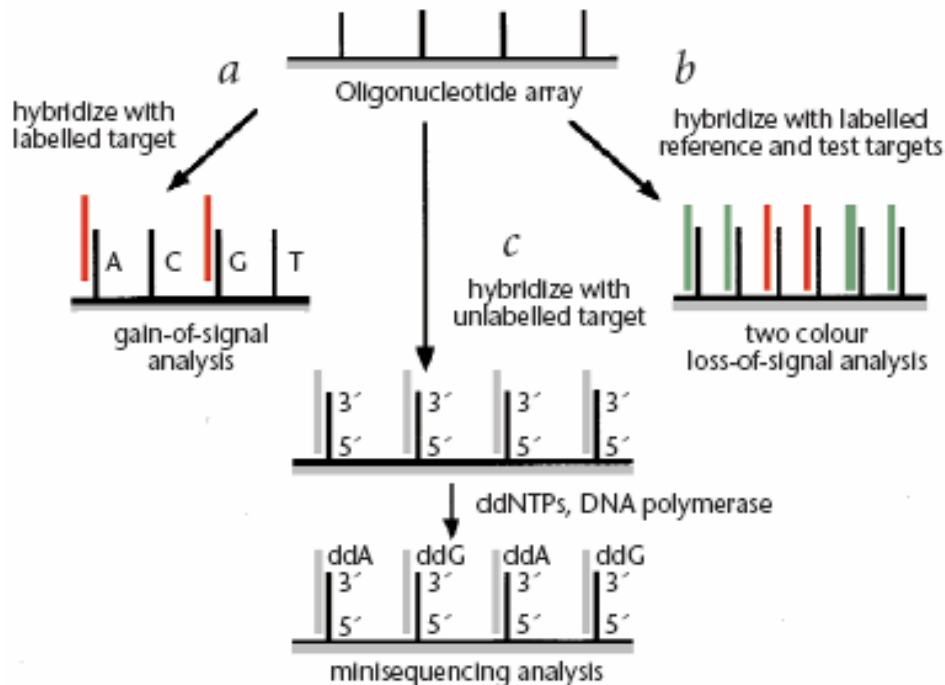
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНОМНОЙ ДНК - ТРИ СТРАТЕГИИ

#### Мутационный анализ и ресеквенирование с помощью олигонуклеотидных биочипов.



Миллионы нуклеотидных позиций, варьируемых у разных особей, могут быть скринированы с помощью специально разработанных биочипов. SNP-биочипы используются для исследования (1) сцепления между маркерами, (2) неравновесия по сцеплению (linkage disequilibria), (3) потери гетерозиготности (loss of heterozygosity).

Три экспериментальные стратегии для анализа последовательностей ДНК с помощью биочипов.



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНОМНОЙ ДНК - ДВУХЦВЕТНЫЙ МЕТОД – ПОТЕРЯ СИГНАЛА

Мутационный анализ с помощью олигонуклеотидных биочипов.

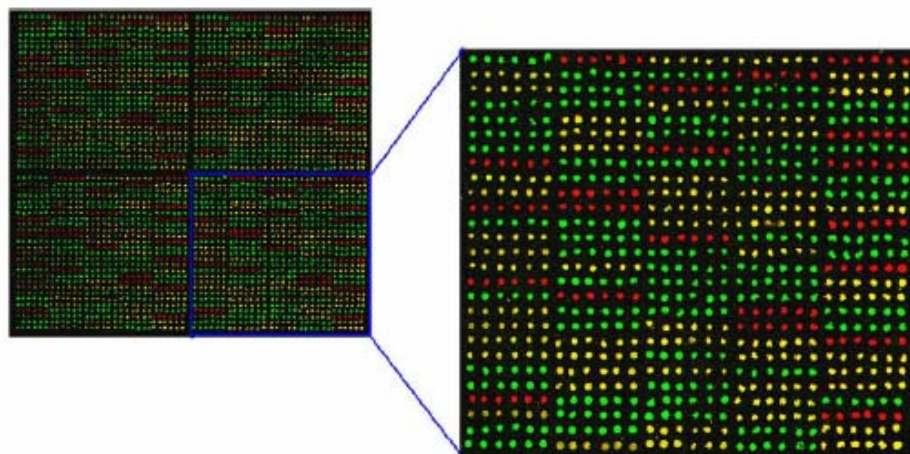
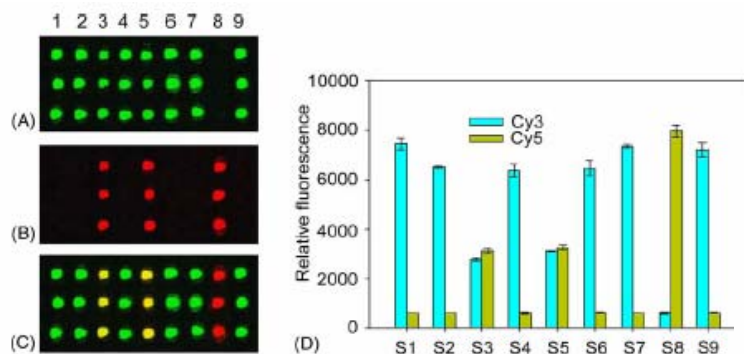
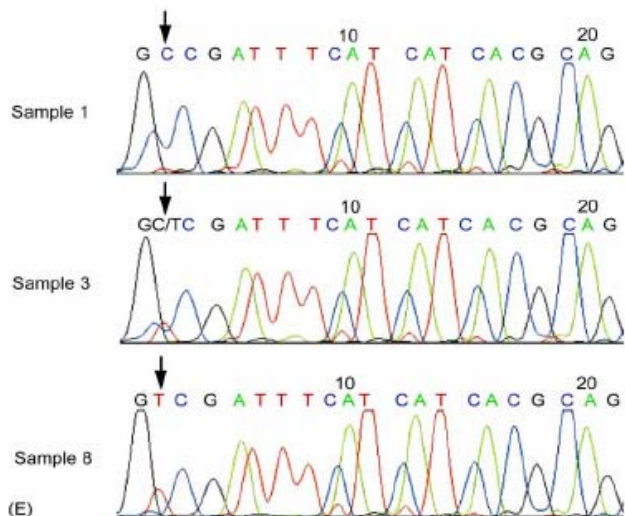


Fig. 4. Microarray image from 135 nasopharyngeal cancer samples assayed for the C677T of the *MTHFR* gene. Each sample was spotted six replicates in a row. Green, yellow and red spots indicate homozygous wild type, heterozygote, and homozygous mutant samples, respectively.





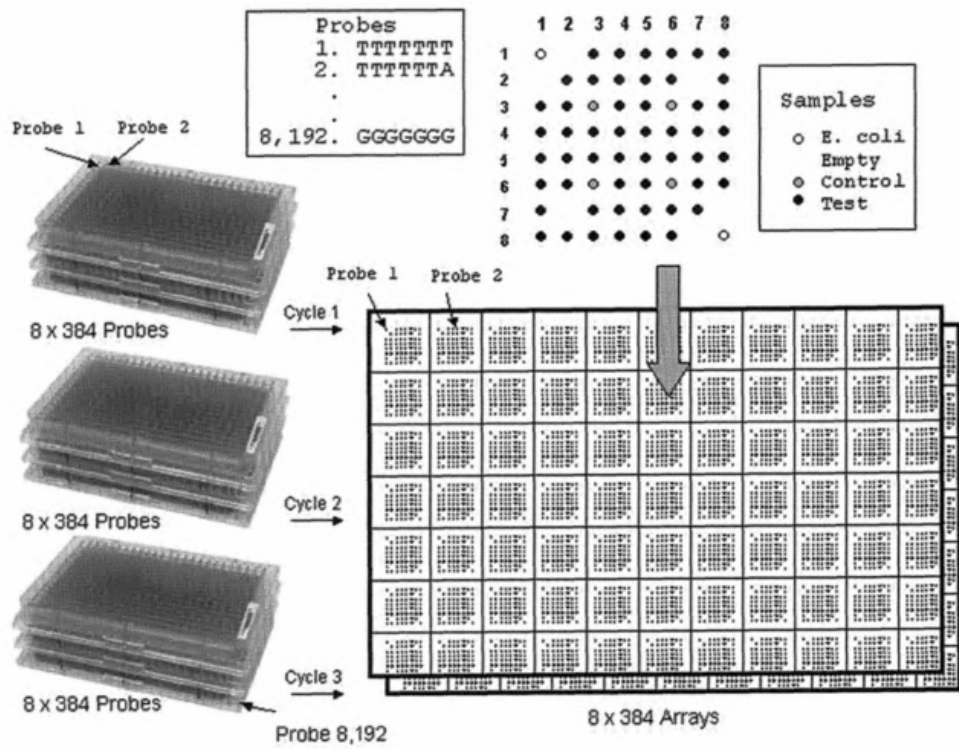
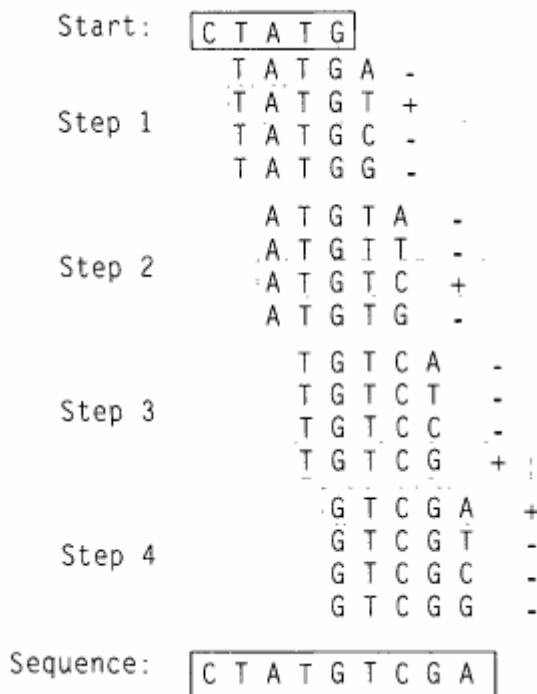
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СЕКВЕНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ БИОЧИПОВ

Использование перекрывающихся олигонуклеотидов в качестве проб



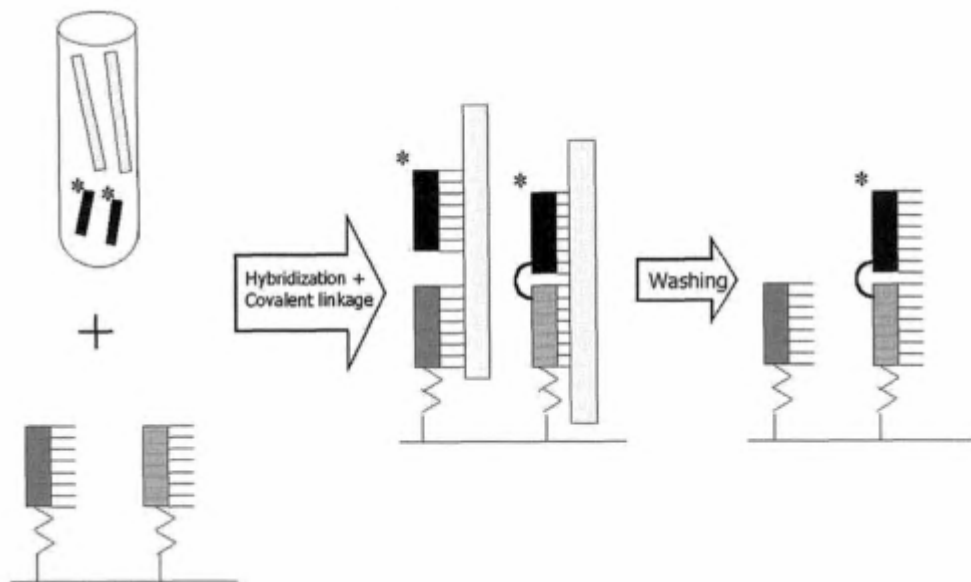


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СЕКВЕНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ БИОЧИПОВ



Гибридизация вспомогательных меченых олигонуклеотидов встык с пробой с последующим лигированием



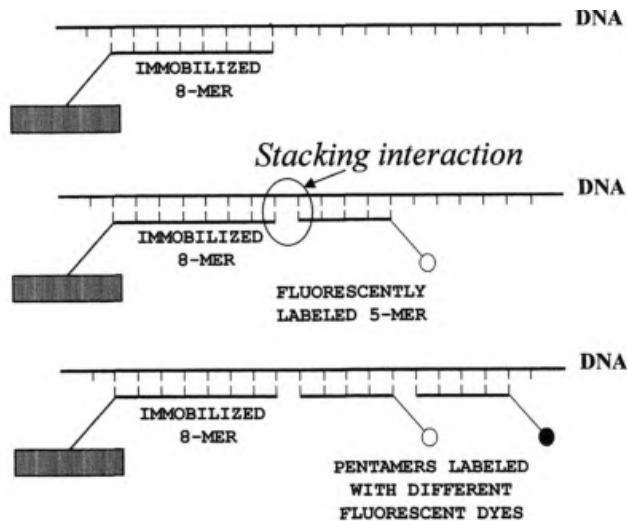


# Исследование функциональных характеристик генома

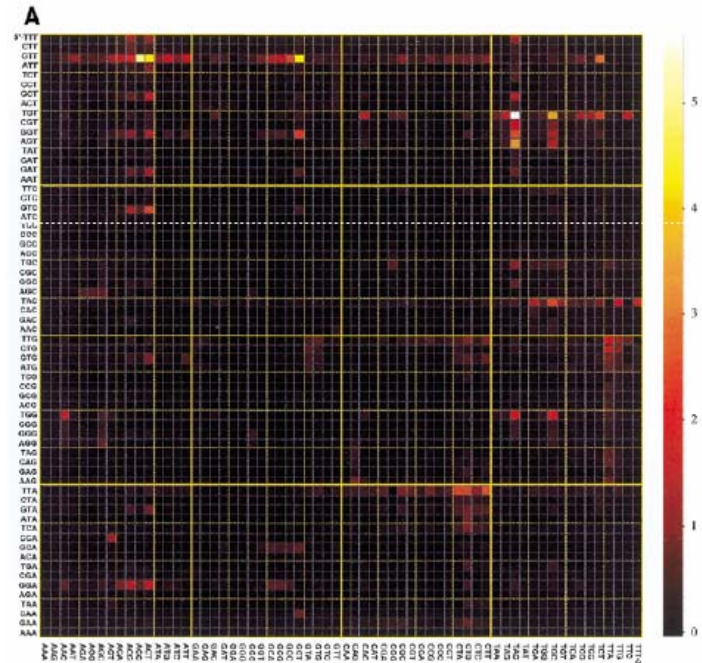
## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СЕКВЕНИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ MAGICChip™ ТЕХНОЛОГИИ



Гибридизация состыкованных олигонуклеотидов.







## ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ В БИОЛОГИИ

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМА С ПОМОЩЬЮ ДНК-БИОЧИПОВ

Сравнительно-эволюционный анализ генов

Исследование распределения связанных транскрипционных факторов

Картирование химических модификаций в хроматине и ДНК

Исследование процессов репликации и репарации

Выявление различий в числе копий ДНК-фрагментов



# Исследование функциональных характеристик генома Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ

**BMC Genomics**



Research article

**Open Access**

### **Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays**

James Adjaye\*<sup>1</sup>, Ralf Herwig<sup>1</sup>, Doris Herrmann<sup>2</sup>, Wasco Wruck<sup>1</sup>,  
Alia BenKahla<sup>1</sup>, Thore C Brink<sup>1</sup>, Monika Nowak<sup>2</sup>, Joseph W Carnwath<sup>2</sup>,  
Claus Hultschig<sup>1</sup>, Heiner Niemann<sup>2</sup> and Hans Lehrach<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Max Planck Institute for Molecular Genetics (Department of Vertebrate Genomics), Ihnestr. 73, D-14195, Berlin, Germany and  
<sup>2</sup>Institute for Animal Science (Department of Biotechnology), Mariensee, 31535 Neustadt, Germany

Email: James Adjaye\* - [adjaye@molgen.mpg.de](mailto:adjaye@molgen.mpg.de); Ralf Herwig - [herwig@molgen.mpg.de](mailto:herwig@molgen.mpg.de); Doris Herrmann - [herrmann@tzv.fal.de](mailto:herrmann@tzv.fal.de);  
Wasco Wruck - [wruck\\_w@molgen.mpg.de](mailto:wruck_w@molgen.mpg.de); Alia BenKahla - [kahla@molgen.mpg.de](mailto:kahla@molgen.mpg.de); Thore C Brink - [brink@molgen.mpg.de](mailto:brink@molgen.mpg.de);  
Monika Nowak - [nowak@tzv.fal.de](mailto:nowak@tzv.fal.de); Joseph W Carnwath - [carnwath@tzv.fal.de](mailto:carnwath@tzv.fal.de); Claus Hultschig - [hultschig@molgen.mpg.de](mailto:hultschig@molgen.mpg.de);  
Heiner Niemann - [niemann@tzv.fal.de](mailto:niemann@tzv.fal.de); Hans Lehrach - [lehrach@molgen.mpg.de](mailto:lehrach@molgen.mpg.de)

\* Corresponding author

Published: 28 October 2004

Received: 23 June 2004

BMC Genomics 2004, 5:83 doi:10.1186/1471-2164-5-83

Accepted: 28 October 2004

Исследование механизмов эволюции генов, вовлеченных в развитие  
болезней человека

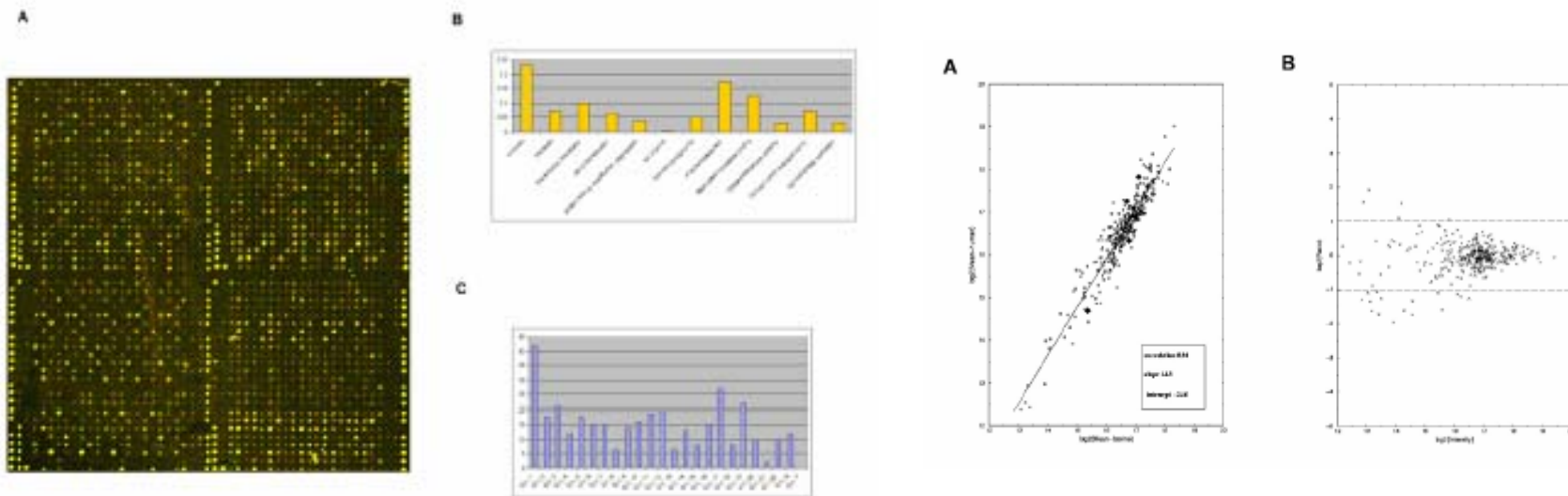


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ



кДНК-биочип с 349 хорошо охарактеризованными генами человека. Каждая проба нанесена 20 раз для обеспечения высокой достоверности квантификации сигналов.

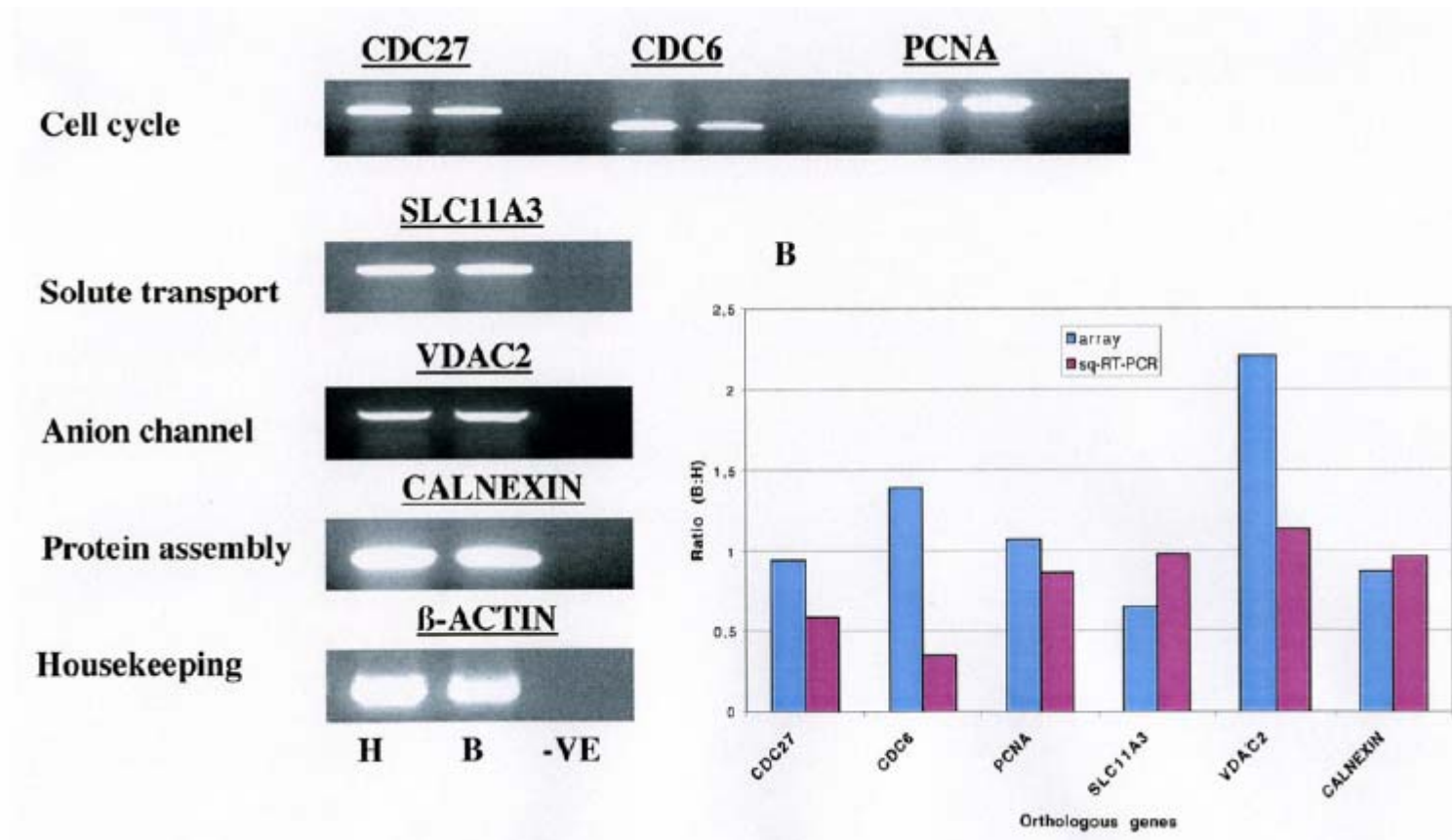


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНО-ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ



Экспериментальная проверка с помощью ОТ-ПЦР

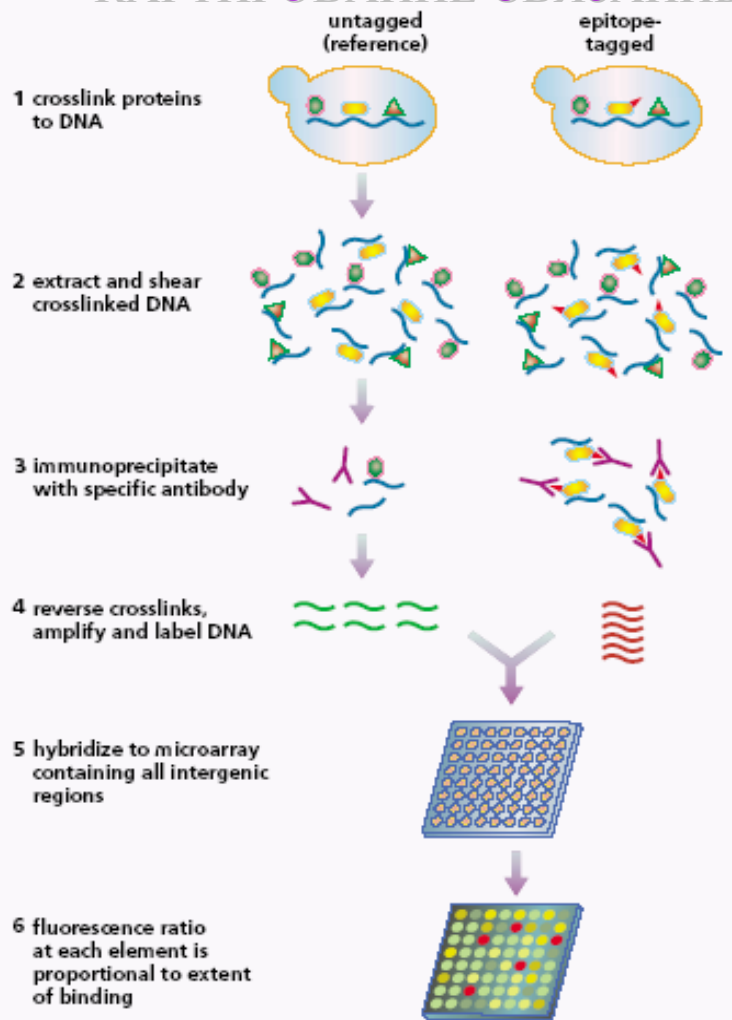


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### КАРТИРОВАНИЕ СВЯЗАННЫХ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ



Стратегия картирования ДНК-белок связывания в масштабах генома.



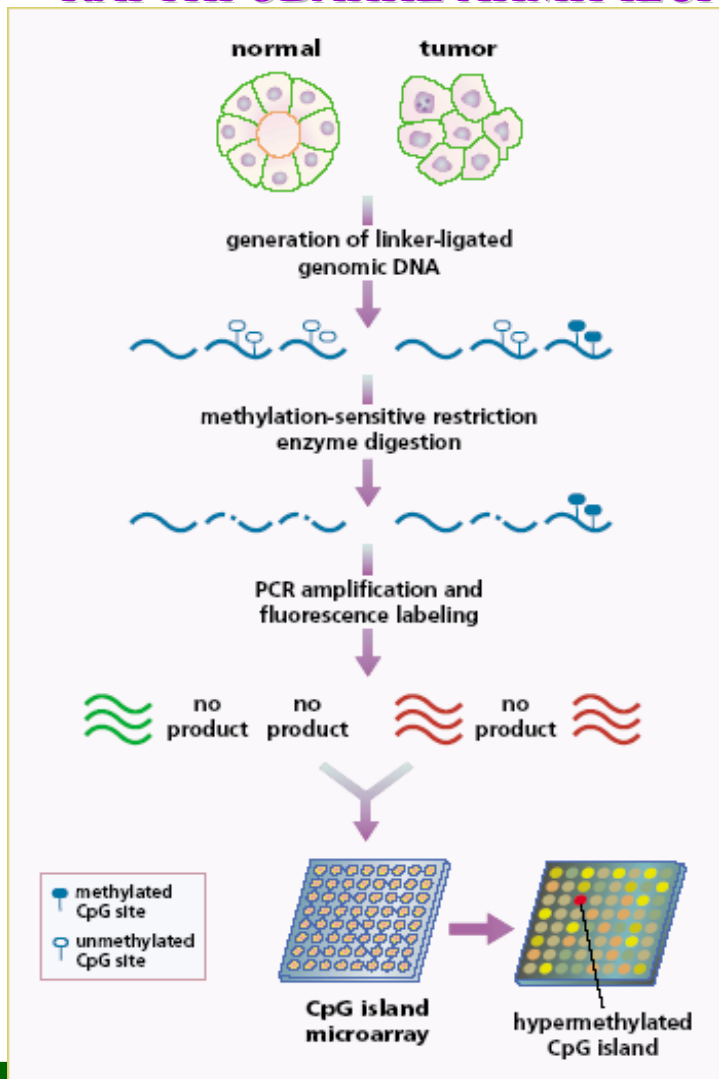


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### КАРТИРОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ В ХРОМАТИНЕ И ДНК



Дифференциальная чувствительная к метилированию гибридизация.



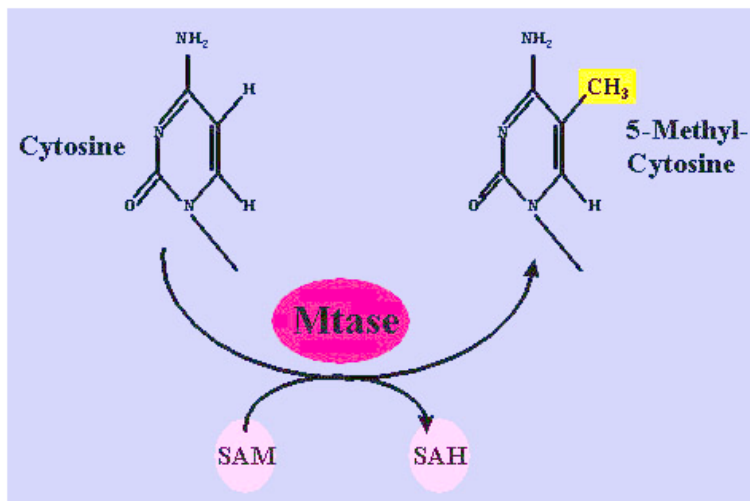
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### КАРТИРОВАНИЕ МЕТИЛИРОВАННЫХ CpG-ОСТРОВКОВ

Исследование связи между экспрессией генов и эпигенетическим состоянием геномных районов вокруг генов.



Метилирование ДНК – один из эпигенетических механизмов. Основной мишенью для метилирования в геноме млекопитающих является цитозин. Чаще всего метилирование происходит в контексте динуклеотидов CpG, хотя CpNG, CC(a/t)GG, CpA и CpT также могут быть метилированы.

«CpG-островки» охватывают промоторы и первые экзоны генов.

Метилированное состояние «CpG-островков» часто ведет к подавлению экспрессии генов.

Распределение метилированных сайтов ДНК в нормальных и трансформированных клетках значительно различается – в опухолевых клетках наблюдается гипометилирование одних и гиперметилирование других.



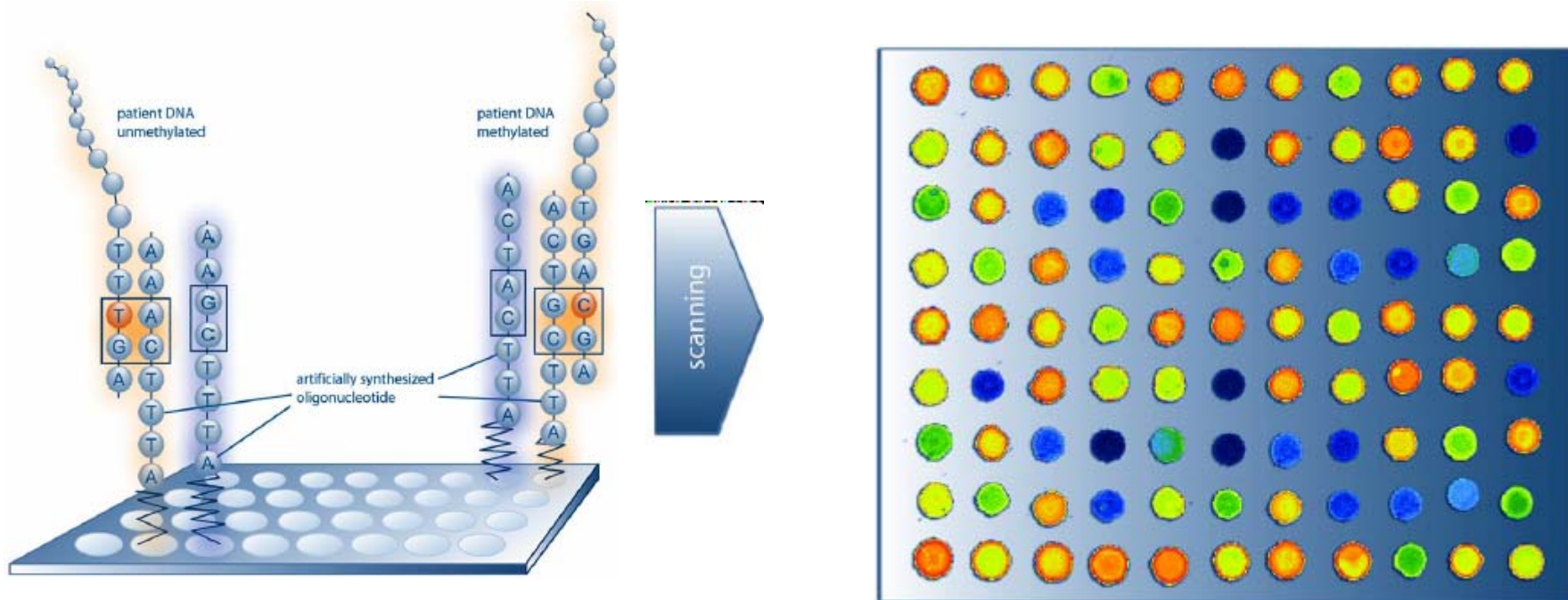
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### КАРТИРОВАНИЕ МЕТИЛИРОВАННЫХ CpG-ОСТРОВКОВ

Исследование связи между экспрессией генов и эпигенетическим состоянием генома.



Образцы из фрагментов геномной ДНК обрабатываются бисульфитом натрия, превращающего неметилированные цитозины в урацилы, затем метятся в процессе амплификации и гибридизуются с олигонуклеотидными биочипами. Для каждого потенциального сайта метилирования разрабатывается пара олигонуклеотидов.



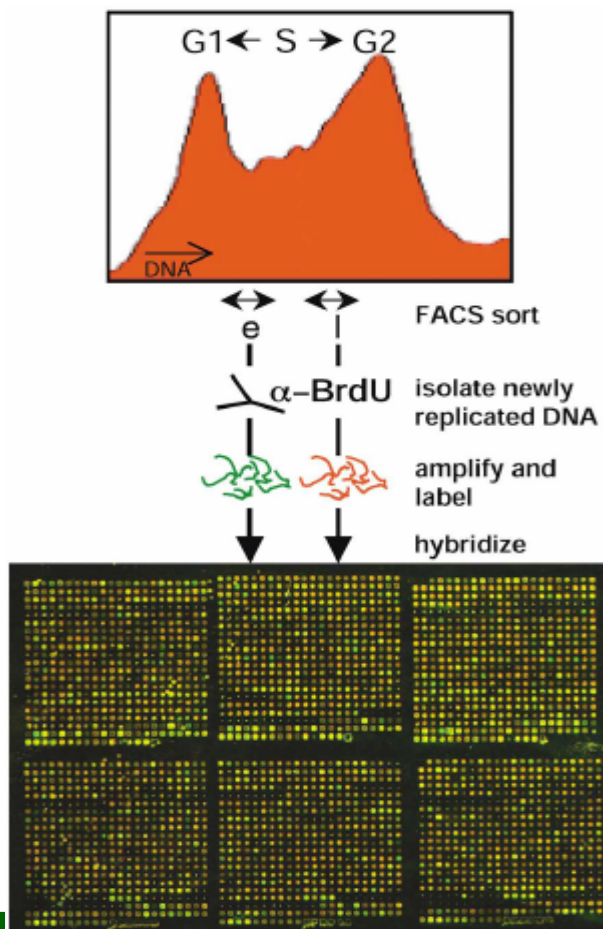
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ РЕПЛИКАЦИИ

Исследование связи между экспрессией генов и временем репликации соответствующих районов генома.



- Профиль клеточного цикла, выявляемый после импульсного введения в клетки BrdU, окрашивания клеток пропидиум иодидом (ДНК-специфическим красителем)
- Сортировка клеток по содержанию ДНК с применением FACS (fluorescence-activated cell sorting).
- Иммунопреципитация новосинтезированной ДНК антителами против BrdU, амплификация и введение флуоресцентной метки.
- Гибридизация с кДНК-биочипом, содержащим 6500 генов. Три биологические реплики.



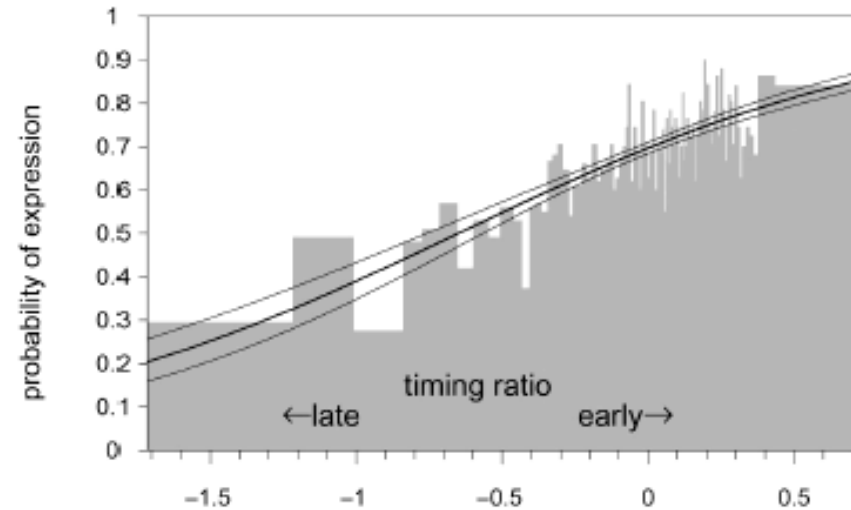
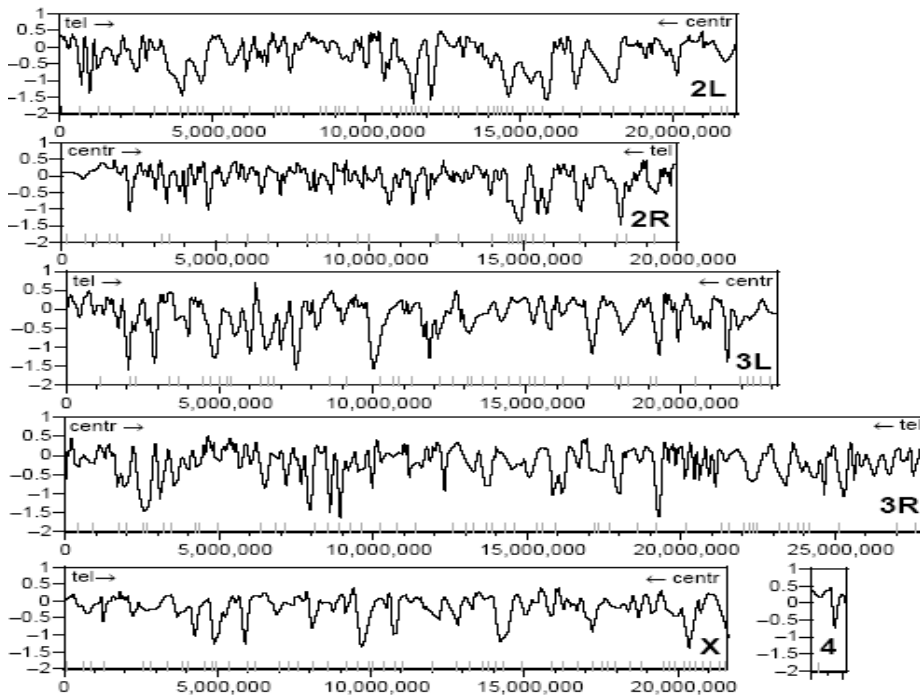
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ РЕПЛИКАЦИИ

Исследование связи между экспрессией генов и временем репликации генома.



Репликационный профиль для 6500 генов секвенированной части генома *D. melanogaster*.

Корреляция между транскрипционной активностью гена и временем его репликации.

Schübeler D., et al., Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nature Genet.* 2002 32:438-442.



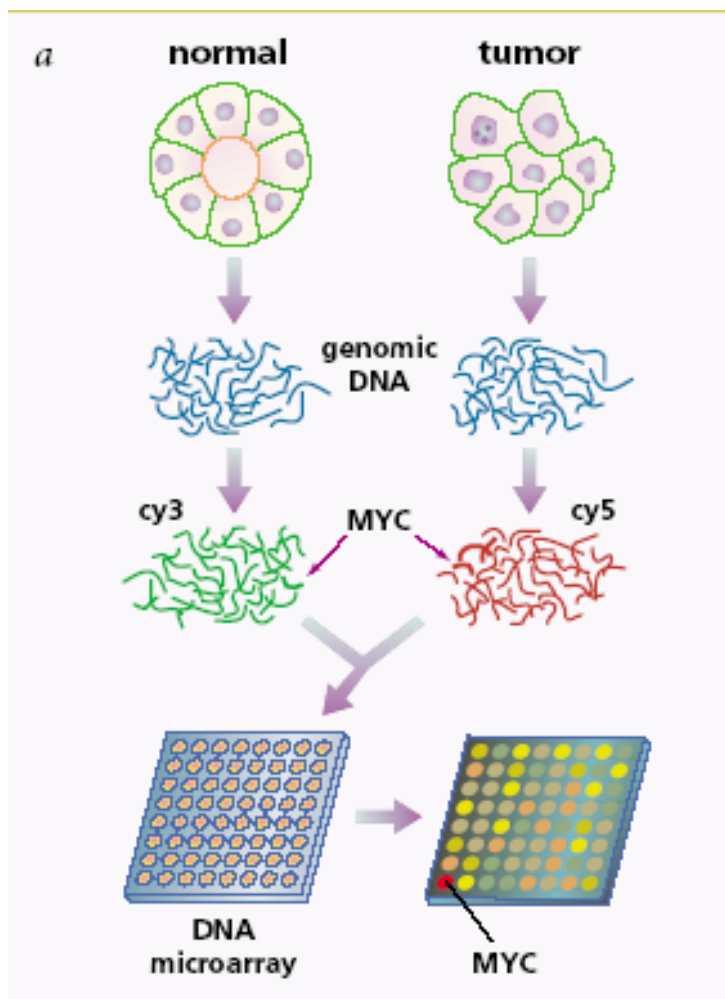


# Исследование функциональных характеристик генома

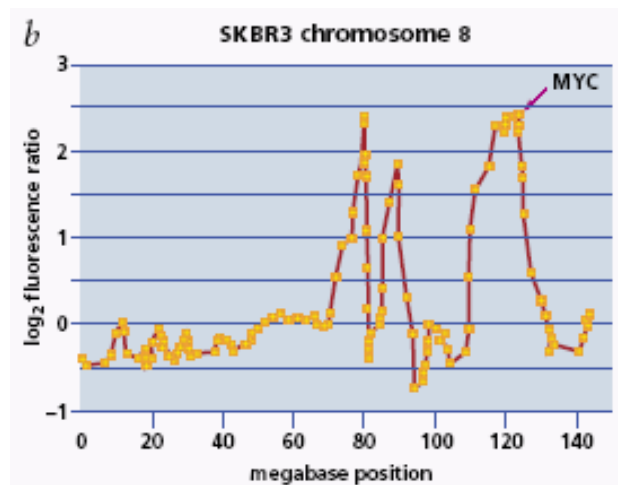
## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### ВЫЯВЛЕНИЕ РАЗЛИЧИЙ В ЧИСЛЕ КОПИЙ ДНК-ФРАГМЕНТОВ



Сравнительная геномная гибридизация.







# Исследование функциональных характеристик генома Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)

Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2005. 6:331–54

doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162140

Copyright © 2005 by Annual Reviews. All rights reserved

First published online as a Review in Advance on May 25, 2005

## COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

---

Daniel Pinkel<sup>1</sup> and Donna G. Albertson<sup>1,2</sup>

*Comprehensive Cancer Center, Department of Laboratory Medicine,<sup>1</sup> Cancer Research Institute,<sup>2</sup> University of California, San Francisco, California 94143;  
email: pinkel@cc.ucsf.edu, albertson@cc.ucsf.edu*

**Key Words** array CGH, clinical genetics, cancer genetics, genomic instability, genome profiling

Изменения в числе копий генов – одна из причин изменений экспрессии генов.



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)

На интенсивность сигнала в элементе биочипа может влиять множество факторов

- нуклеотидный состав
- присутствие повторенных последовательностей
- количество ДНК в пробе и т.д.

Таким образом, значения интенсивностей могут различаться в 30 раз, даже если различий в копиях гена нет.

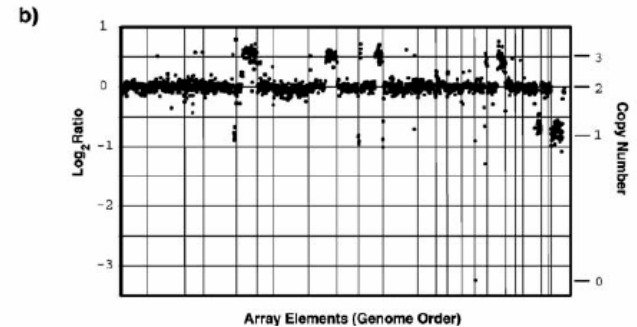
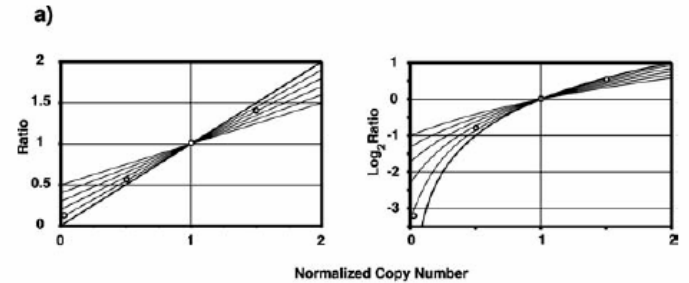
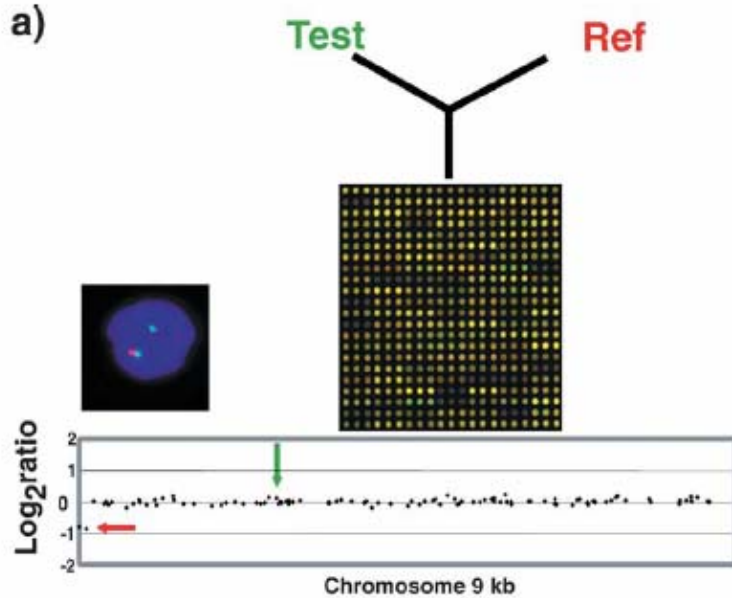


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)



b)

**Increasing Difficulty** →

Aberration:	Amplification	Single copy change	
Aberration size:	Multi array element	Single array element	
Specimen:	Cell line	Fresh/Frozen tissue	Fixed archival tissue
Composition:	Homogeneous	Heterogeneous (normal cells)	
Material:	Lots	Small primary tumor	
Data Utility:	Population overview	Accuracy for each specimen	

Связь между измеренным отношением сигналов и изменениями в числе копий



# Исследование функциональных характеристик генома Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)

### High-resolution genomic profiles of human lung cancer

Giovanni Tonon<sup>\*†</sup>, Kwok-Kin Wong<sup>\*\*†</sup>, Gautam Maulik<sup>\*†</sup>, Cameron Brennan<sup>\*</sup>, Bin Feng<sup>\*</sup>, Yunyu Zhang<sup>\*</sup>, Deepak B. Khatry<sup>\*</sup>, Alexei Protopopov<sup>\*</sup>, Mingjian James You<sup>§</sup>, Andrew J. Aguirre<sup>\*</sup>, Eric S. Martin<sup>\*</sup>, Zhaohui Yang<sup>\*</sup>, Hongbin Ji<sup>\*</sup>, Lynda Chin<sup>\*¶</sup>, and Ronald A. DePinho<sup>\*‡¶</sup>

<sup>\*</sup>Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02115; <sup>§</sup>Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115; and Departments of <sup>¶</sup>Dermatology and <sup>‡</sup>Genetics and Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

Communicated by Webster K. Cavenee, University of California at San Diego, La Jolla, CA, May 18, 2005 (received for review April 13, 2005)

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality worldwide, yet there exists a limited view of the genetic lesions driving this disease. In this study, an integrated high-resolution survey of

particularly amplifications and deletions, suggests that only a small fraction of lung cancer genes has been identified. In particular, chromosomal CGH studies have revealed recurrent gains at 1q31,

PNAS

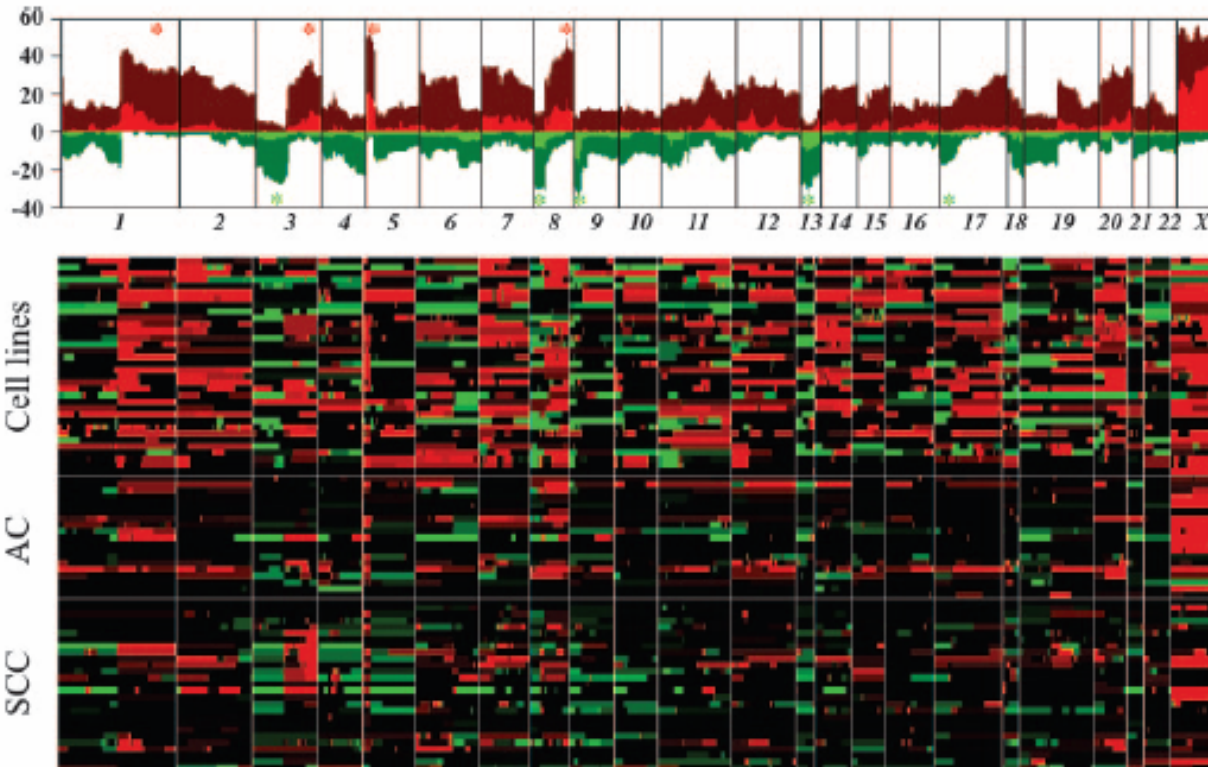


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)



Геномный профиль в образцах первичных легочных аденокарцином (AC), карцином легких (squamous) и клеточных линий из рака легких.

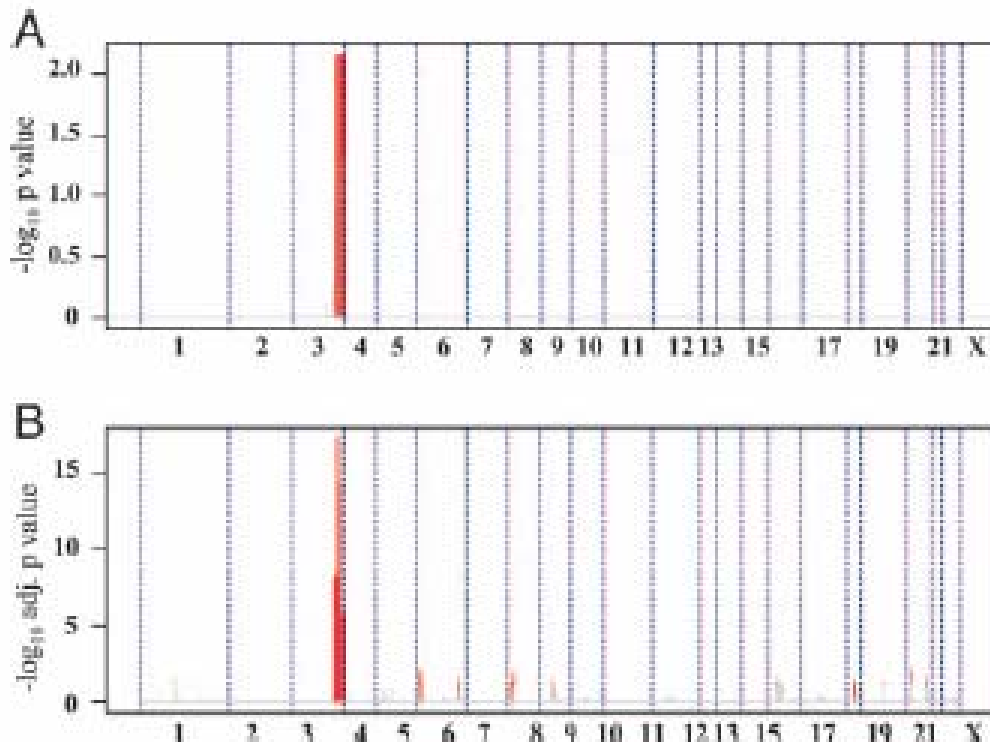


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ на биочипах (array CGH)



Район 3q (от 180 до 199 Мб) демонстрирует значительное различие между линиями АС и SCC как методом aCGH, так и профилированием экспрессии генов.





# Исследование функциональных характеристик генома Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



## ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ В БИОЛОГИИ

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ



# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы

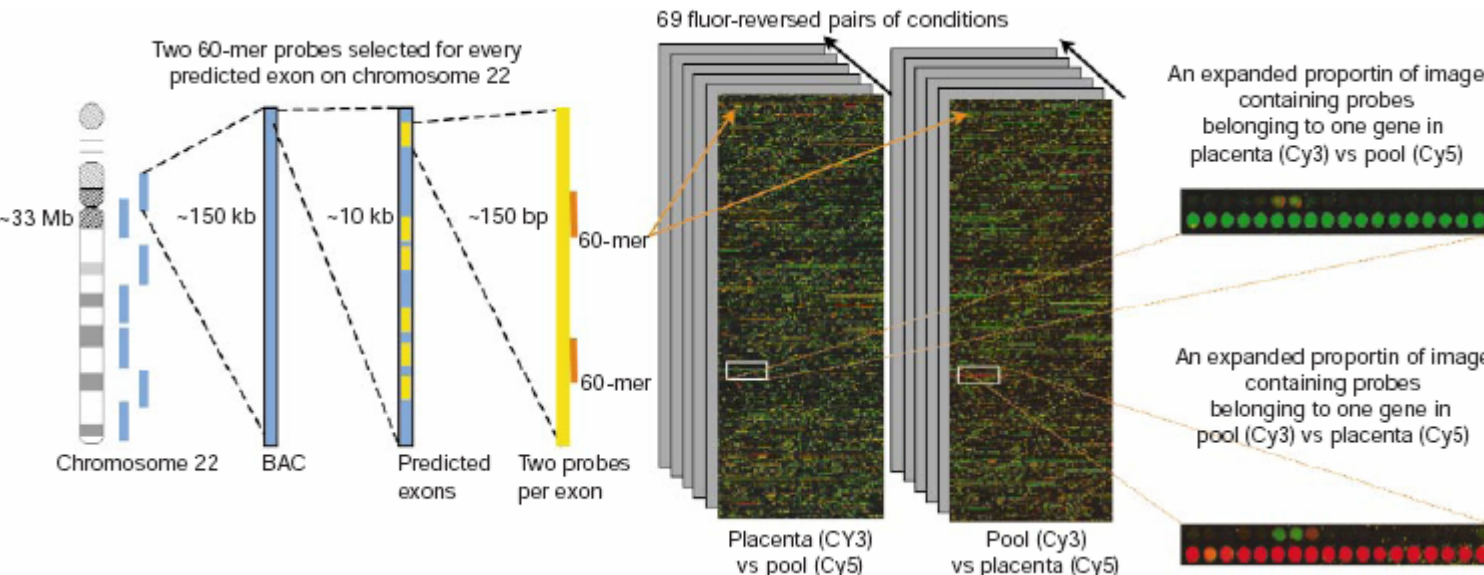


### АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

### Выявление генов

Экспериментальная аннотация человеческого генома - оценка компьютерных предсказаний наличия генов и определение полноразмерных транскриптов с помощью выявления одновременной экспрессии их экзонов.

Метод применен для анализа экспрессии генов из 22 хромосомы (8,183 экзонов) в 69 парах экспериментальных условий: 572 группы корегулируемых экзонов или 572



проверенных по экспрессии гена (expression-verified genes - EVGs).

210 (85%) из 247 известных генов и 185 (57%) из 325 предсказанных генов.



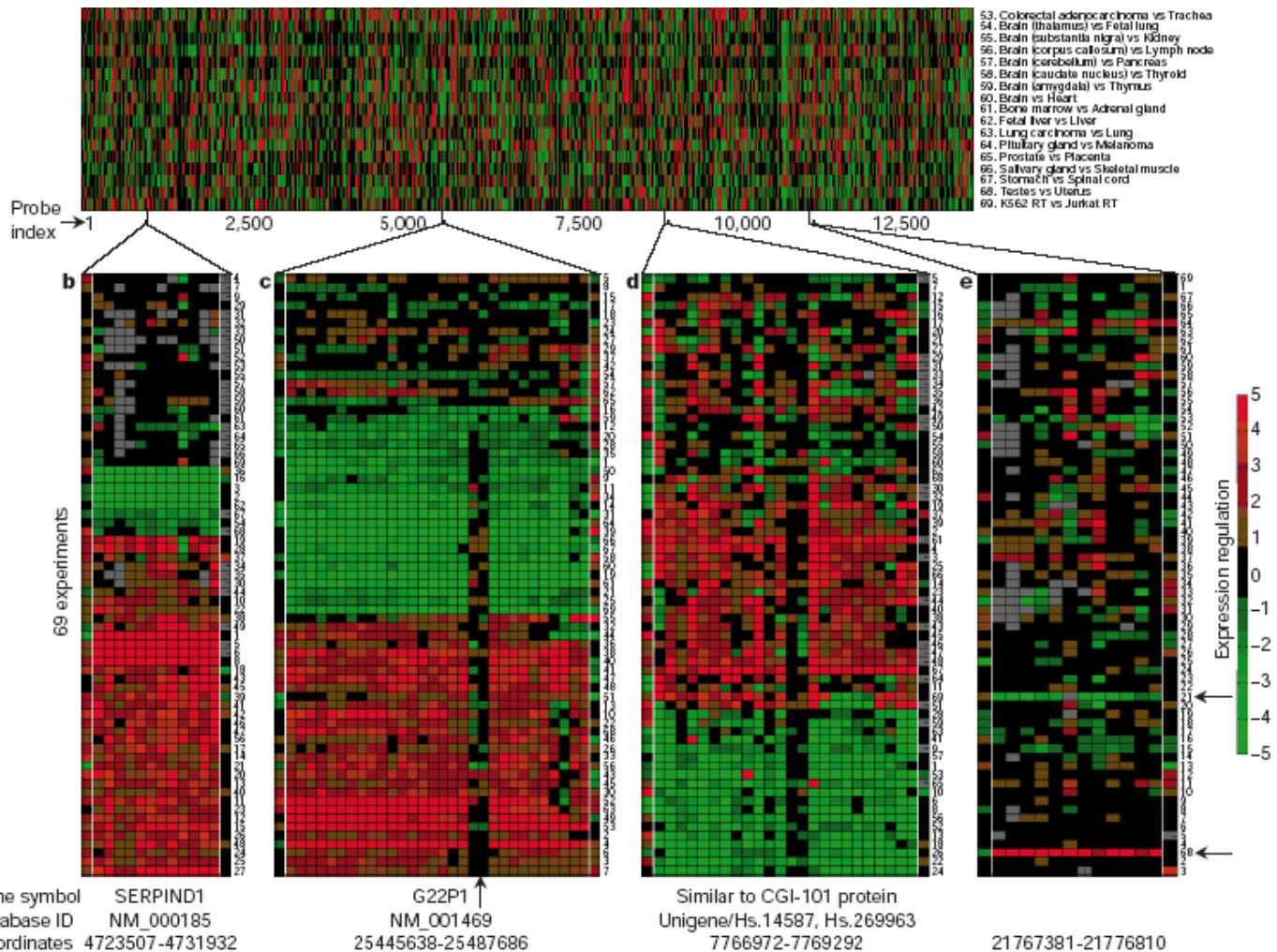
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

### Выявление генов



Псевдоцветное изображение взвешенного по ошибкам  $\log_{10}$  отношения (кр/зел) экспрессии каждого из ~8000 экзонов.



# Исследование функциональных характеристик генома

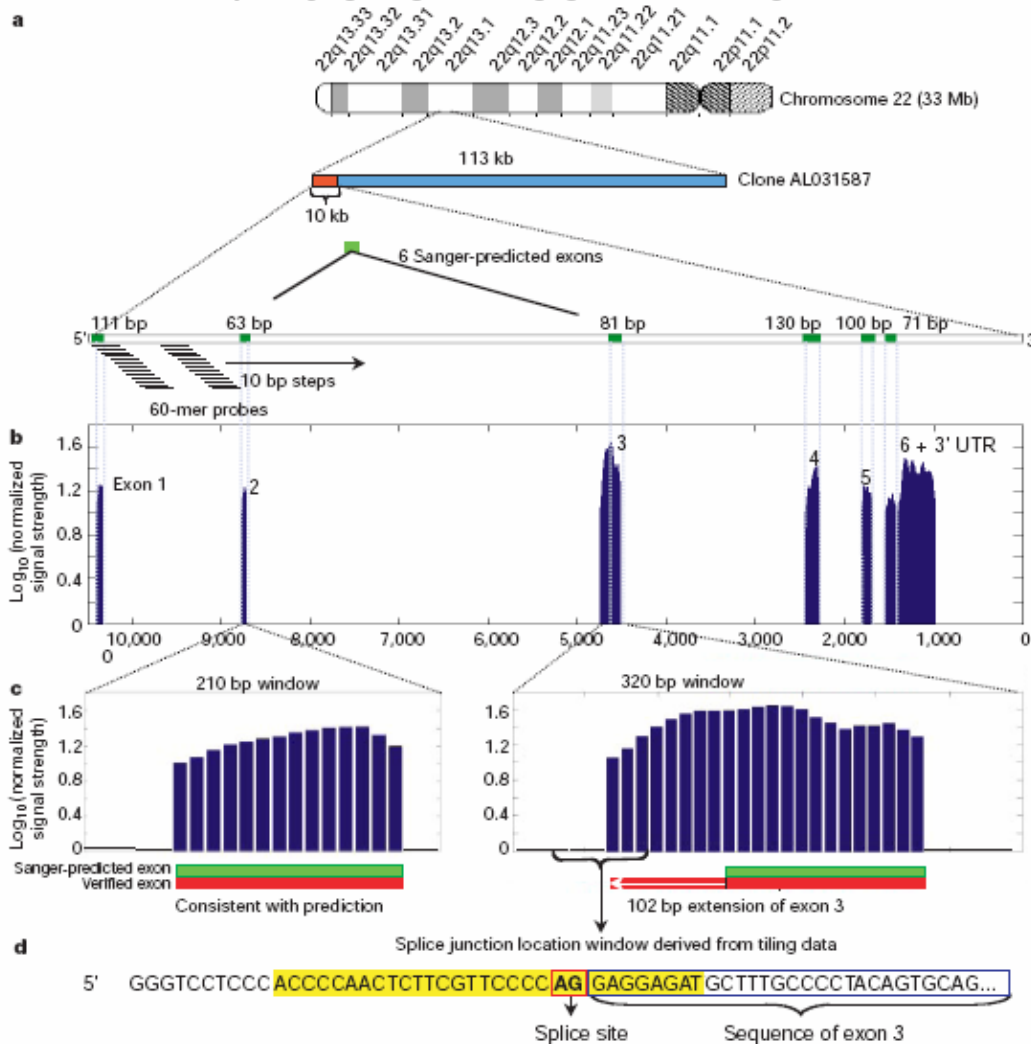
## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

### Выявление генов

Перекрывающиеся ряды проб, соответствующих обеим цепям отдельных геномных районов хромосомы 22.





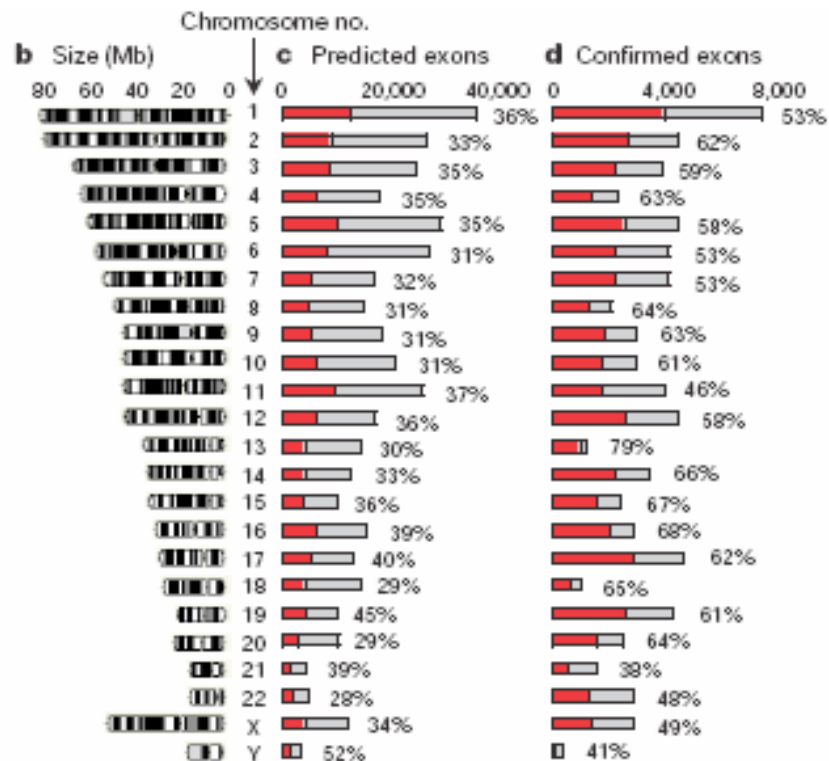
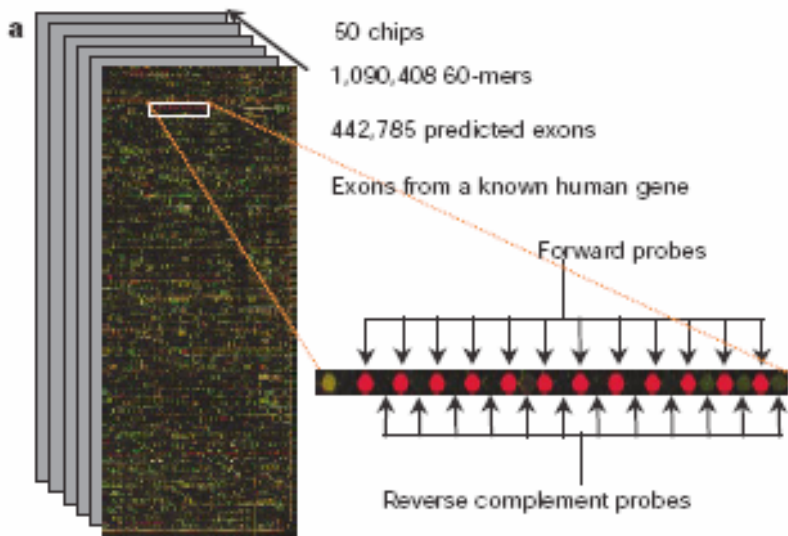
# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ      Выявление генов

Сканирование экзонов в масштабах всего генома: 1 090 408 проб, 110 000 обратного-комплементарных проб, 50 биочипов, два экспериментальных условия (РНК из двух клеточных линий). Красные полосы – доля экспериментально (для этих условий) проверенных экзонов





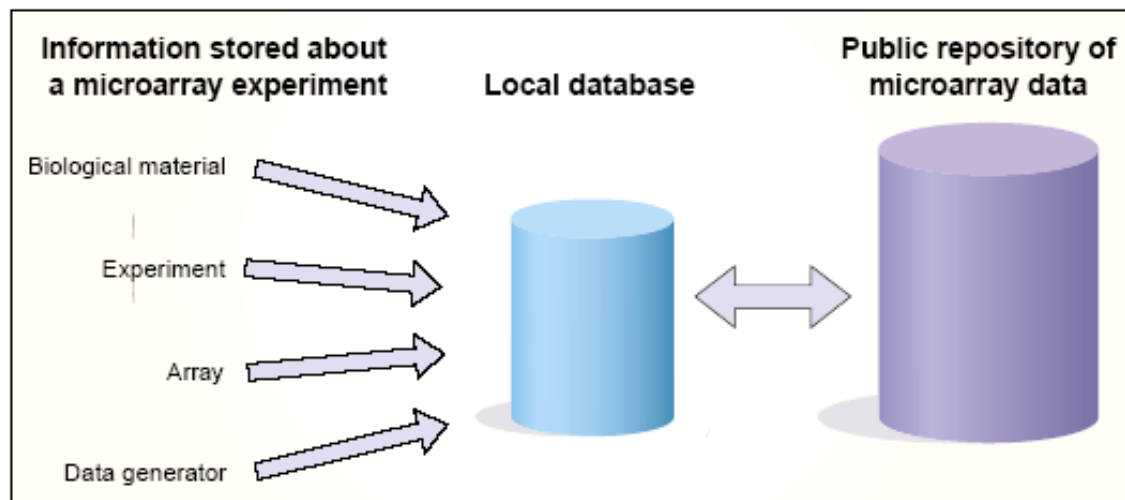


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### СООБЩЕСТВО MGED



- MicroArray Gene Expression Markup Language (MAGE-ML) - создан для создания общего формата, чтобы достичь сравнимости результатов
- Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) - создан для определения типа информации и степени подробности, с которой исследователь обязан ее представить;
- MGED Society Ontology Working Group (<http://www.mged.org/ontology>) - создана для формирования набора контролируемых словарей и онтологий, необходимых для описания биологических образцов и экспер. процедур.



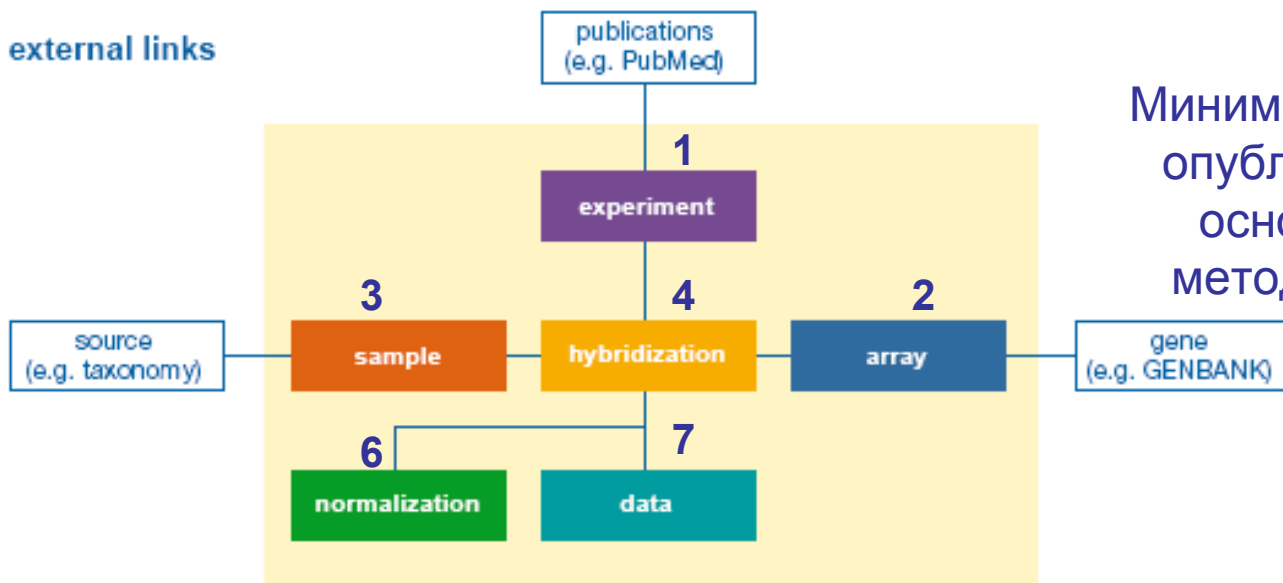


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



### MINIMUM INFORMATION ABOUT A MICROARRAY EXPERIMENT (MIAME)



Минимальная информация об опубликованном эксперименте, основанном на ДНК-биочип-методе, включает шесть типов описаний:

1. План эксперимента - набор отдельных гибридизационных экспериментов
2. План биочипа – содержание пятен/ячеек, компоновка по рядам и т.д.
3. Образцы – источник, приготовление экстрактов, способ мечения
4. Гибридизация – процедура и параметры
5. Измерение – характеристики изображений и сканнеров
6. Нормировка – способ, коэффициенты и т.д.

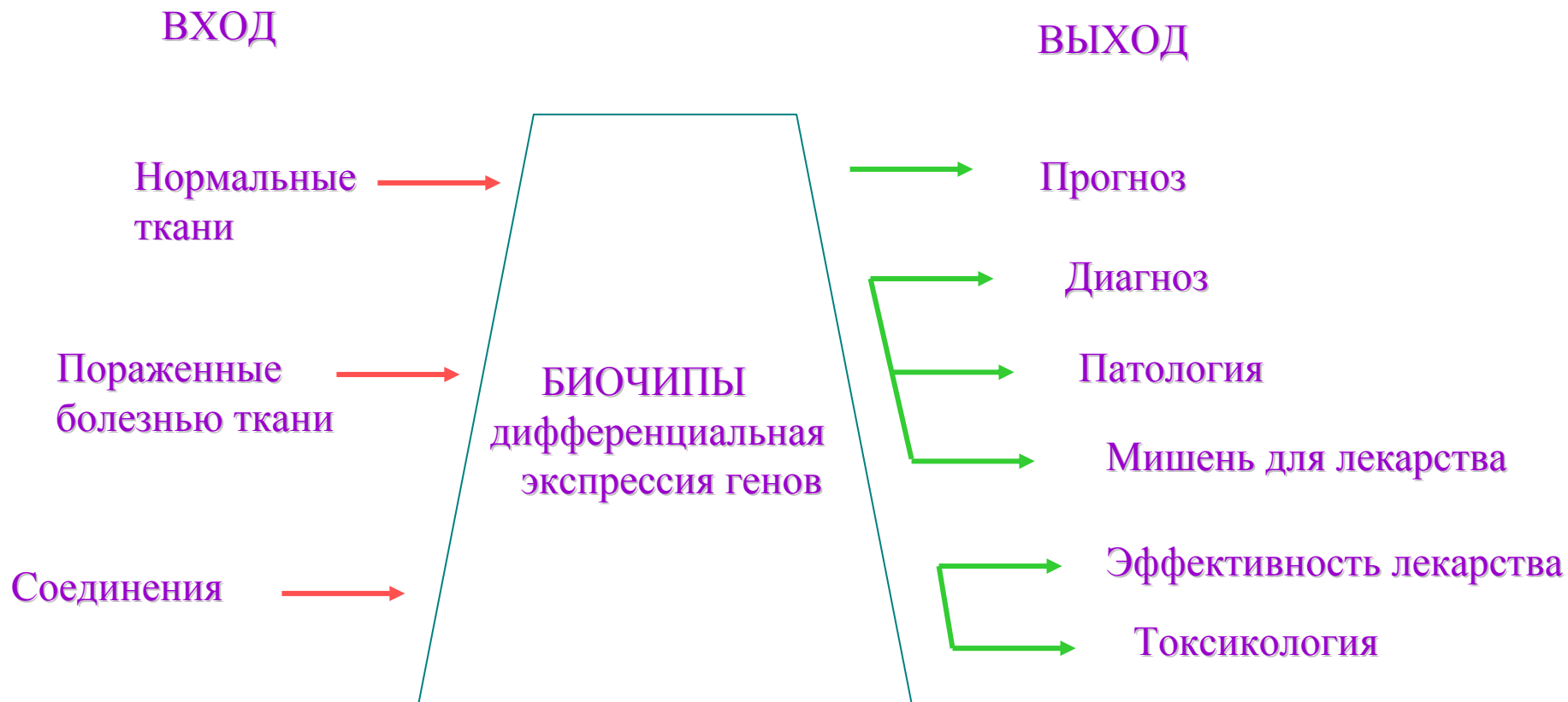


# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



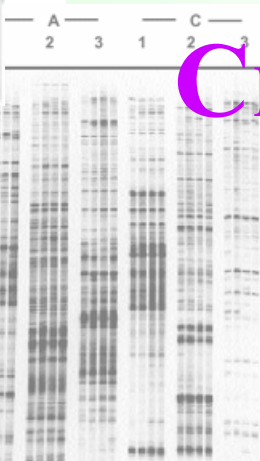
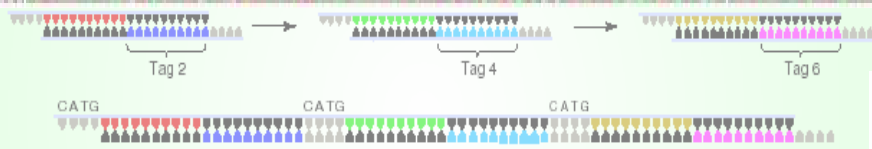
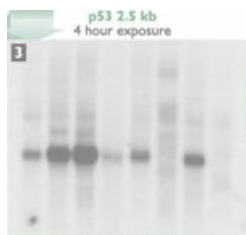
### ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-БИОЧИПОВ В МЕДИЦИНЕ





# Исследование функциональных характеристик генома

## Исследование качественных и количественных характеристик транскриптома: ДНК-биочипы



Спасибо за внимание

