

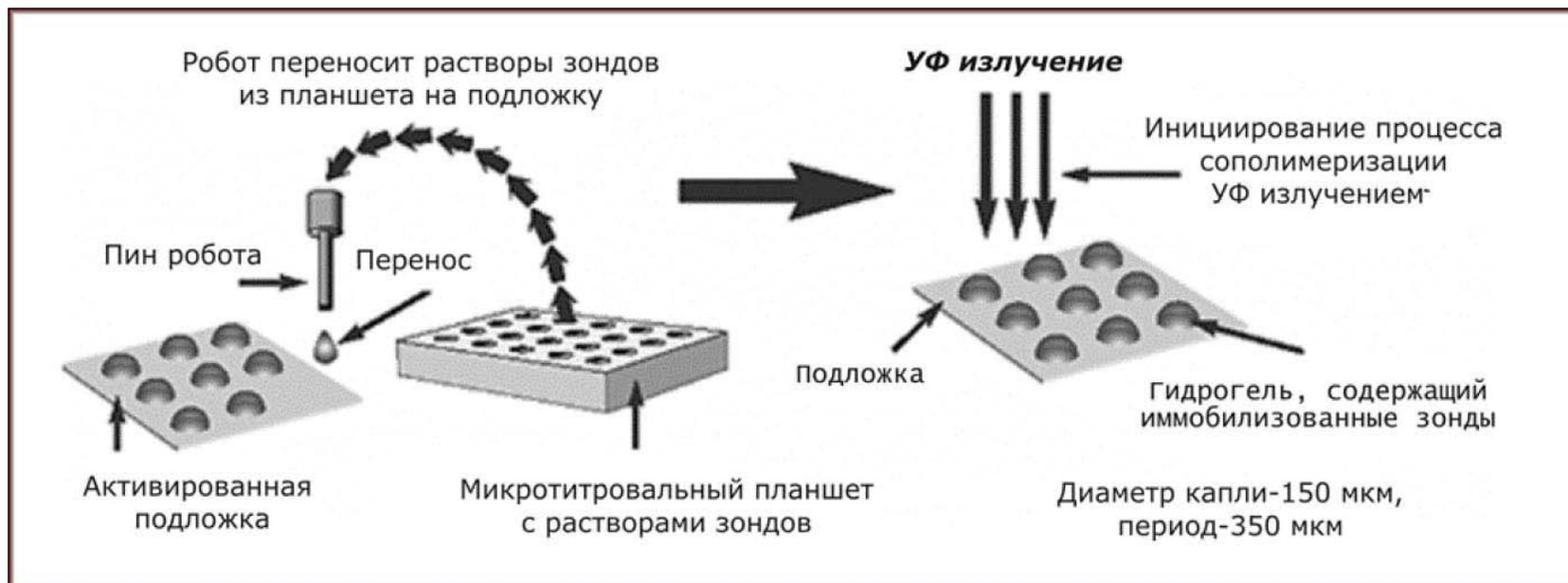
Микрочипы

- **Биологические микрочипы** представляют собой миниатюрные приборы для параллельного анализа специфических взаимодействий биологических макромолекул.
- Зондами в таких чипах могут служить олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, **кДНК**, РНК, белки, рецепторы, лиганды.
- Общее число ячеек на чипе может составлять 10^3 - 10^5 , а линейные размеры чипа ~ 1 см.

Матричные микрочипы с иммобилизованной ДНК

В поверхностных матричных биочипах ДНК иммобилизуется на поверхности мембран или пластинок из стекла, пластика.

Иммобилизация осуществляется за счет образования ковалентных связей с помощью фотореакции при облучении ультрафиолетовым излучением.



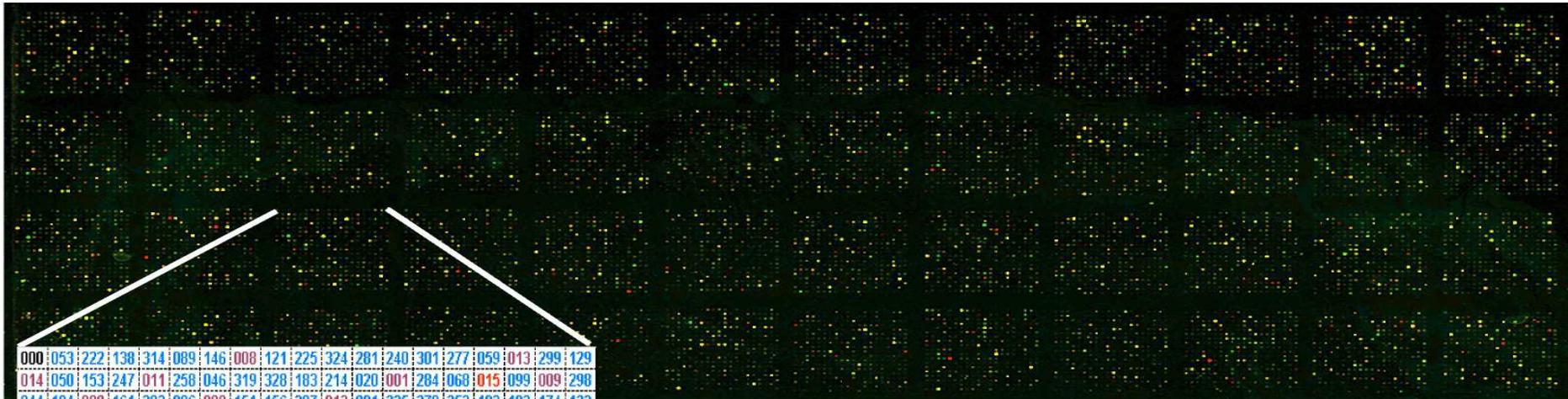
Гибридизации с ДНК-микрочипами

- Гибридируемая ДНК в растворе метится с помощью **флуоресцентной** или радиоактивной метки. Для **смеси молекул ДНК** (например, ДНК дикого типа и ДНК с мутациями) каждая из компонент метится своим флуоресцентным красителем.
- Гибридизация ДНК происходит в результате диффузии молекул из раствора к поверхности.
- Поверхностные микрочипы являются одноразовыми.
- Интенсивности флуоресценции из ячеек измеряются с помощью сканера.

Применение ДНК-микрочипов

1. Дифференциальная экспрессия генов
 - а) в развитии
 - б) по органам / тканям / клеткам
 - в) при заболеваниях
 - г) реакция на экспериментальные условия
2. Детекция мутаций / полиморфизмов
3. Поиск сайтов связывания хроматиновых белков в геноме
4. Другие типы исследований

A microarray



000	053	222	138	314	089	146	008	121	225	324	281	240	301	277	059	013	299	129
014	050	153	247	011	258	046	319	328	183	214	020	001	284	068	015	099	009	298
044	194	008	161	293	086	009	151	156	297	012	091	235	270	253	102	103	174	133
242	276	037	000	458	278	247	409	007	283	308	340	073	184	450	060	006	147	457
000	053	222	138	314	089	146	008	121	225	324	281	240	301	277	059	013	299	129
014	050	153	247	011	258	046	319	328	183	214	020	001	284	068	015	099	009	298
044	194	008	161	293	086	009	151	156	297	012	091	235	270	253	102	103	174	133
212	326	037	000	158	278	317	193	007	263	309	310	023	164	150	069	006	117	157
125	128	036	280	100	187	024	122	034	106	176	073	114	002	262	197	283	052	030
289	004	149	011	238	002	302	111	311	155	135	016	204	186	022	003	196	008	221
025	016	188	042	224	090	000	004	316	051	113	139	109	104	264	019	031	033	048
056	230	015	286	285	083	079	112	209	005	131	012	255	140	185	245	004	160	092
251	062	085	217	013	035	305	322	038	055	126	178	231	006	120	268	167	195	009
292	191	010	163	107	323	014	259	220	137	308	180	101	182	218	011	081	119	269
219	066	242	054	166	199	233	165	003	244	287	013	173	184	179	320	325	005	076
130	070	228	071	175	256	015	145	134	027	000	169	159	008	200	088	127	312	017
005	116	307	272	229	010	049	304	021	192	202	012	105	295	172	013	000	144	279
260	170	313	003	210	142	123	005	274	057	007	147	257	154	243	181	254	275	014
094	141	290	215	211	064	063	234	152	249	252	291	007	306	006	098	001	267	303
078	136	177	318	012	241	007	118	226	248	065	162	072	190	074	232	080	026	045
000	040	002	148	250	084	265	115	207	011	300	327	096	003	039	315	223	016	266
203	010	208	032	001	093	077	009	271	087	168	014	110	028	213	237	002	294	273
171	058	006	295	018	206	108	143	029	082	060	043	246	124	189	041	061	198	276
239	097	067	236	282	296	047	004	321	075	132	227	261	216	010	288	095	201	001



Упорядоченный набор фрагментов

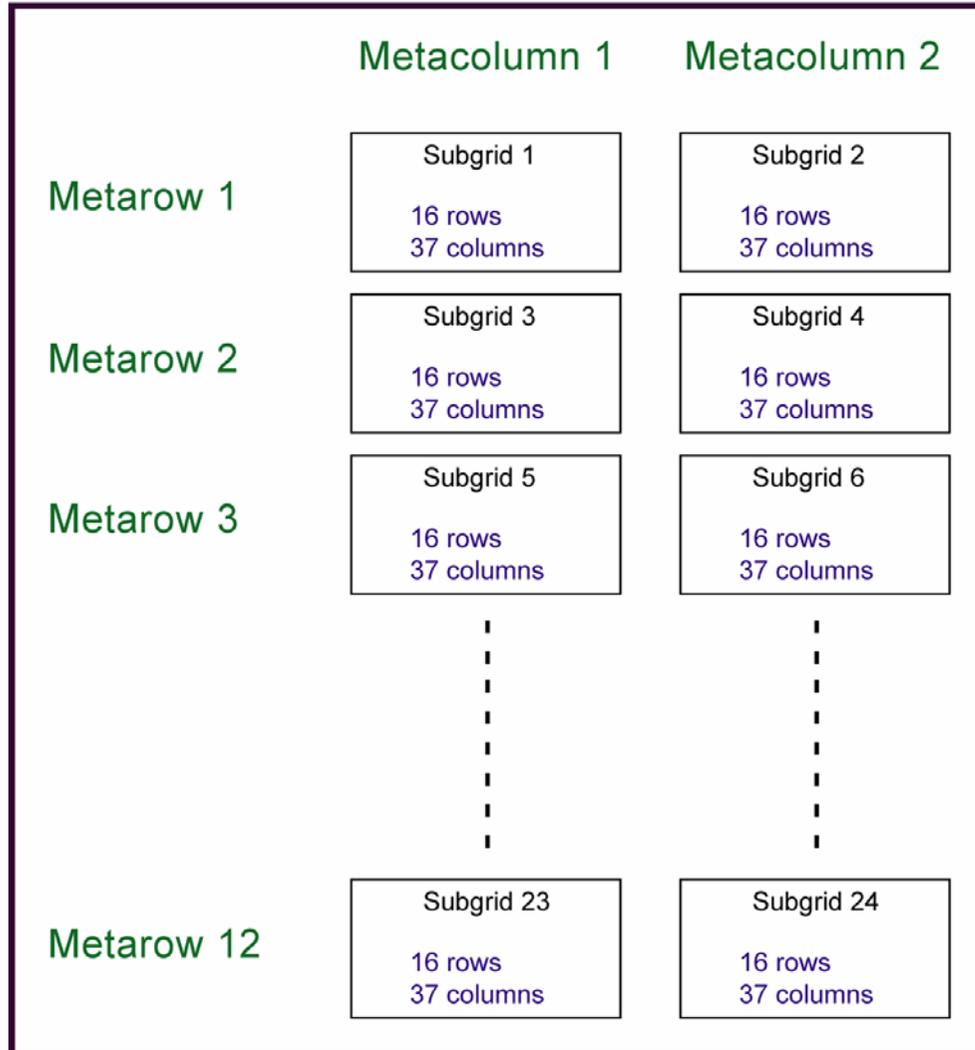


Все гены



Весь геном (tiling array)

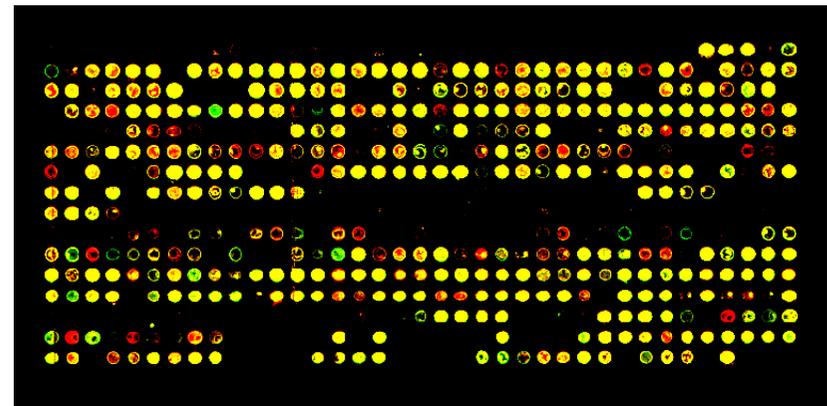
Микрочип 'Drosophila Gene Collections 1+2'



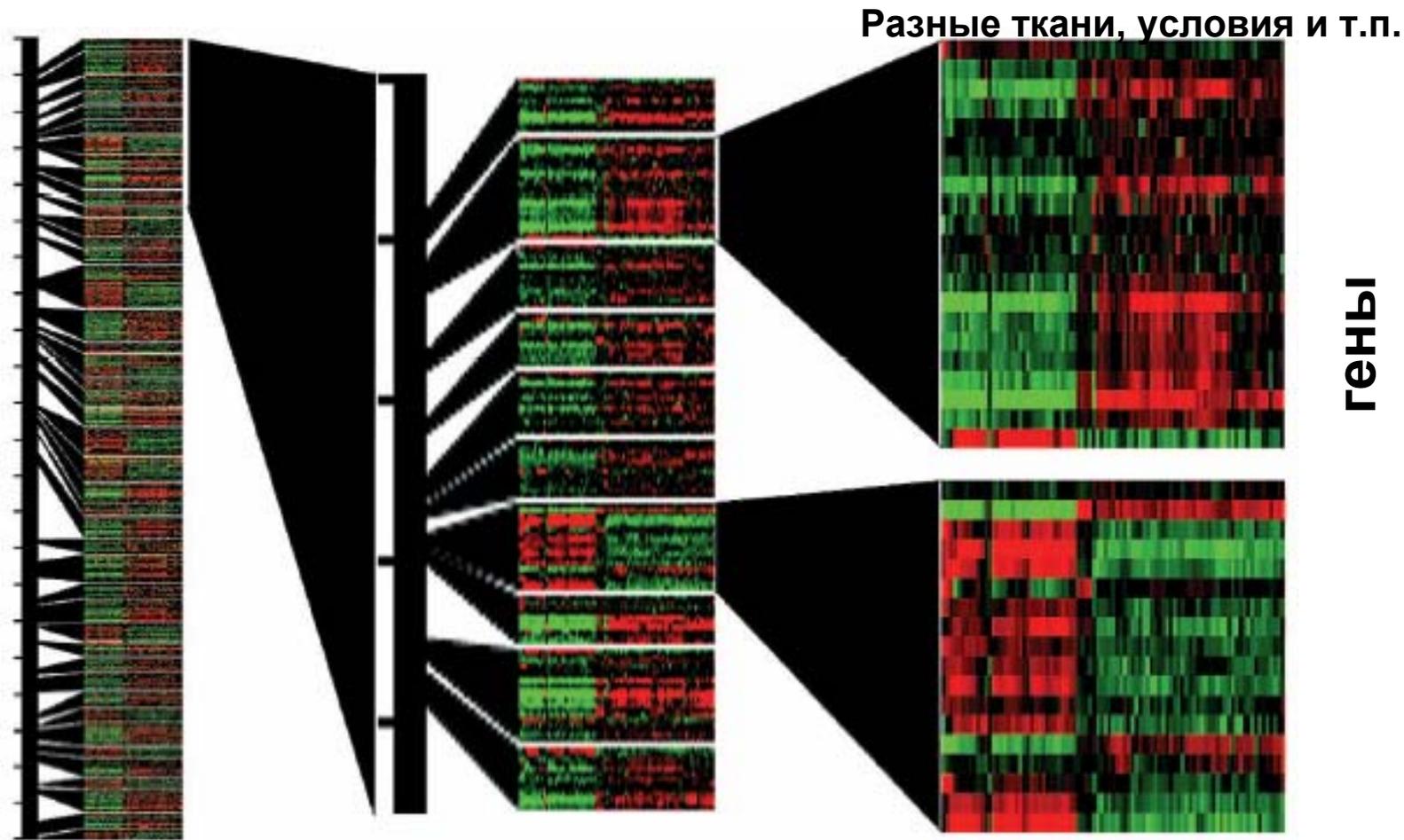
14208 точек

11459 кДНК

~10000 генов



Similarly expressed adjacent genes on the left arm of *Drosophila* chromosome 2 (2L)



Spellman, Rubin; Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome *Journal of Biology* 2002, 1:5

letters to nature

NATURE | VOL 406 | 17 AUGUST 2000 | www.nature.com

Molecular portraits of human breast tumours

Charles M. Perou^{††}, Therese Sørlie^{†‡}, Michael B. Eisen⁺,
 Matt van de Rijn[§], Stefanie S. Jeffrey^{||}, Christian A. Rees^{*},
 Jonathan R. Pollack[†], Douglas T. Ross[†], Hilde Johnsen[‡],
 Lars A. Akslen[#], Øystein Fluge[☆], Alexander Pergamenschikov^{*},
 Cheryl Williams⁺, Shirley X. Zhu[§], Per E. Lønning^{**},
 Anne-Lise Børresen-Dale[‡], Patrick O. Brown^{††} & David Botstein⁺

⁺ Department of Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA

[‡] Department of Genetics, The Norwegian Radium Hospital, N-0310 Montebello Oslo, Norway

[§] Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA

^{||} Department of Surgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA

[¶] Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA

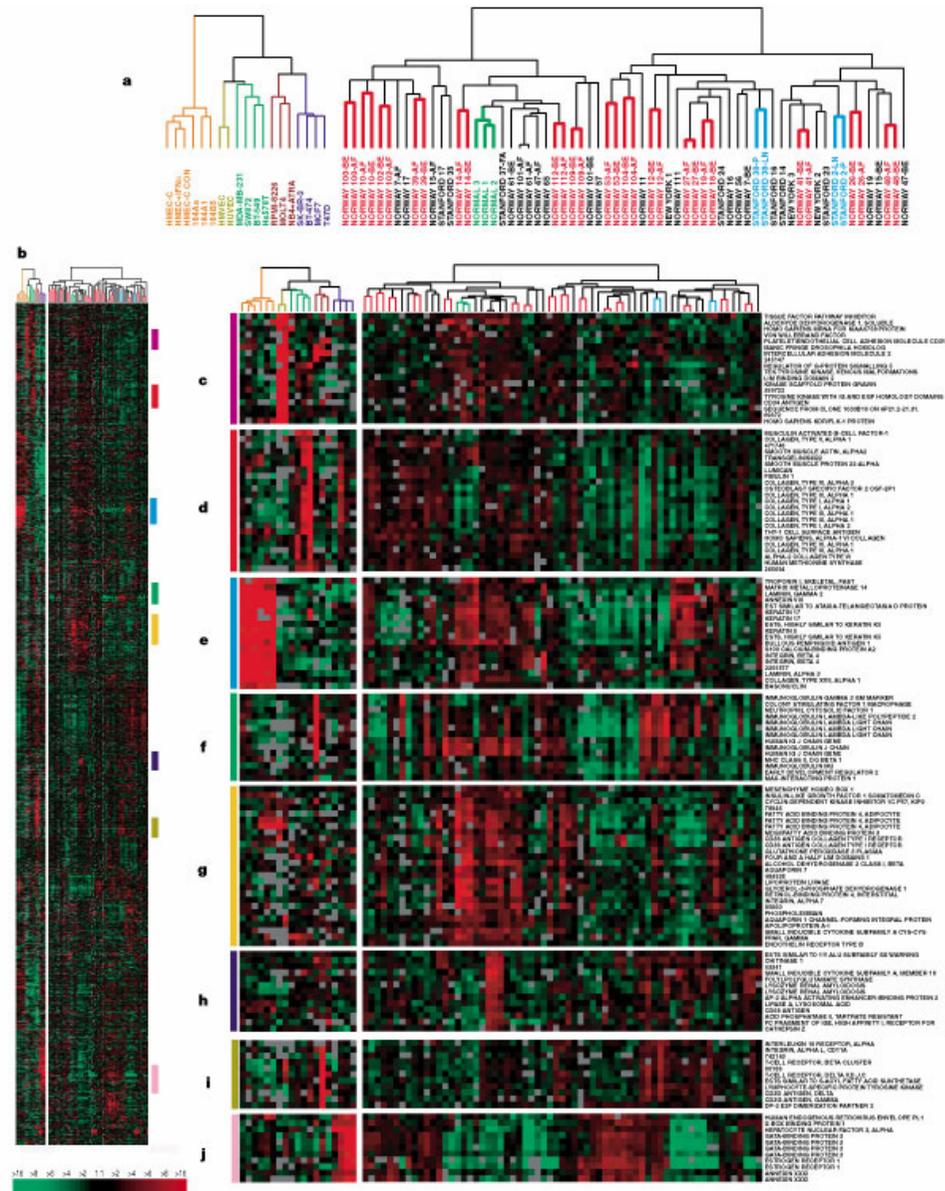
[#] Department of Pathology, The Gade Institute, Haukeland University Hospital, N-5021 Bergen, Norway

[☆] Department of Molecular Biology, University of Bergen, N-5020 Bergen, Norway

^{**} Department of Oncology, Haukeland University Hospital, N-5021 Bergen, Norway

^{††} Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA

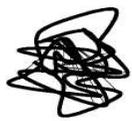
[†] These authors contributed equally to this work



Сравнение профилей экспрессии генов



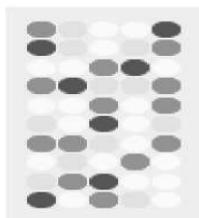
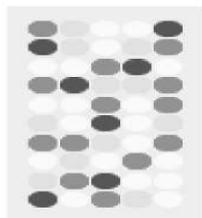
Take two things



Isolate RNA



Label RNAs

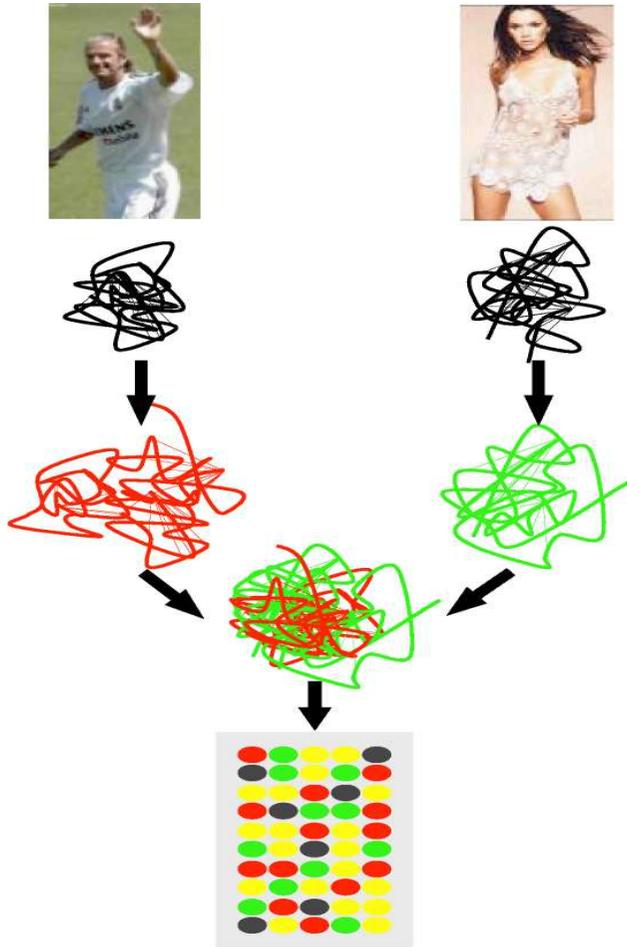


Hybridise to microarrays

Scan and quantify

Compare arrays

Dual Channel Microarrays



Take two things

Isolate RNA

Differentially label RNAs

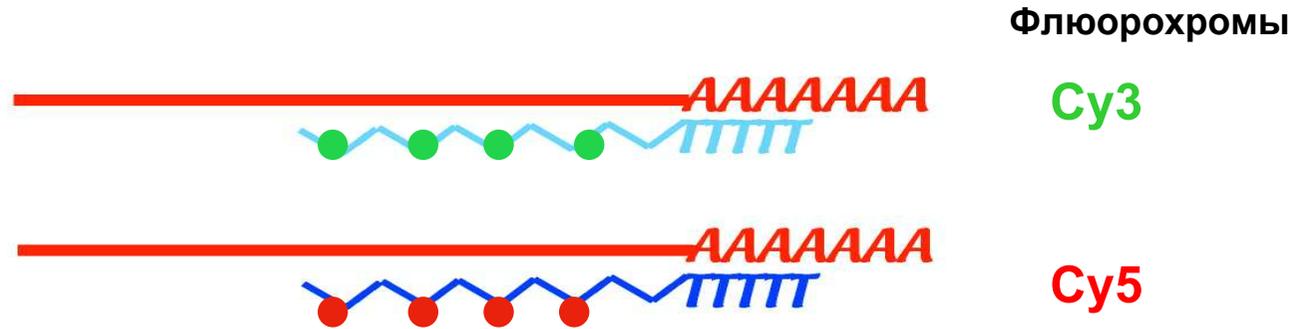
Mix labelled samples

Hybridise to microarray

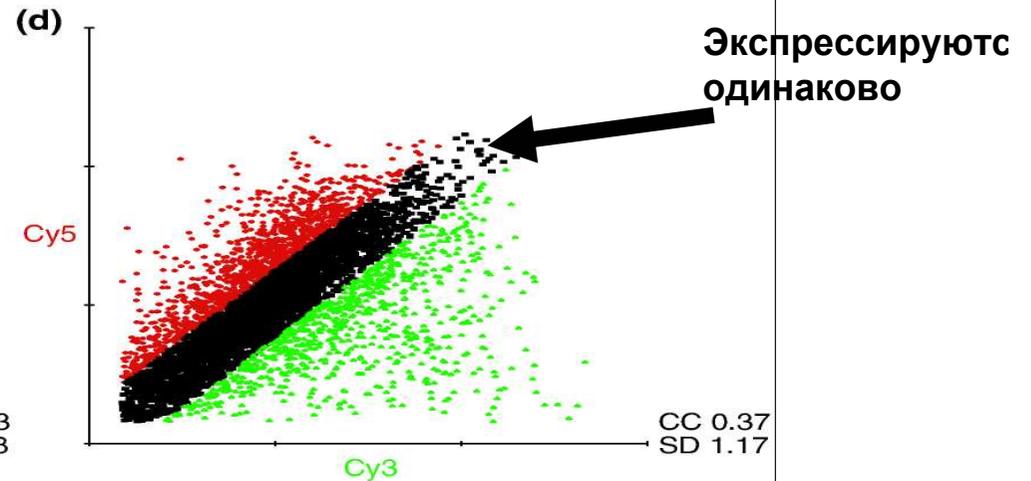
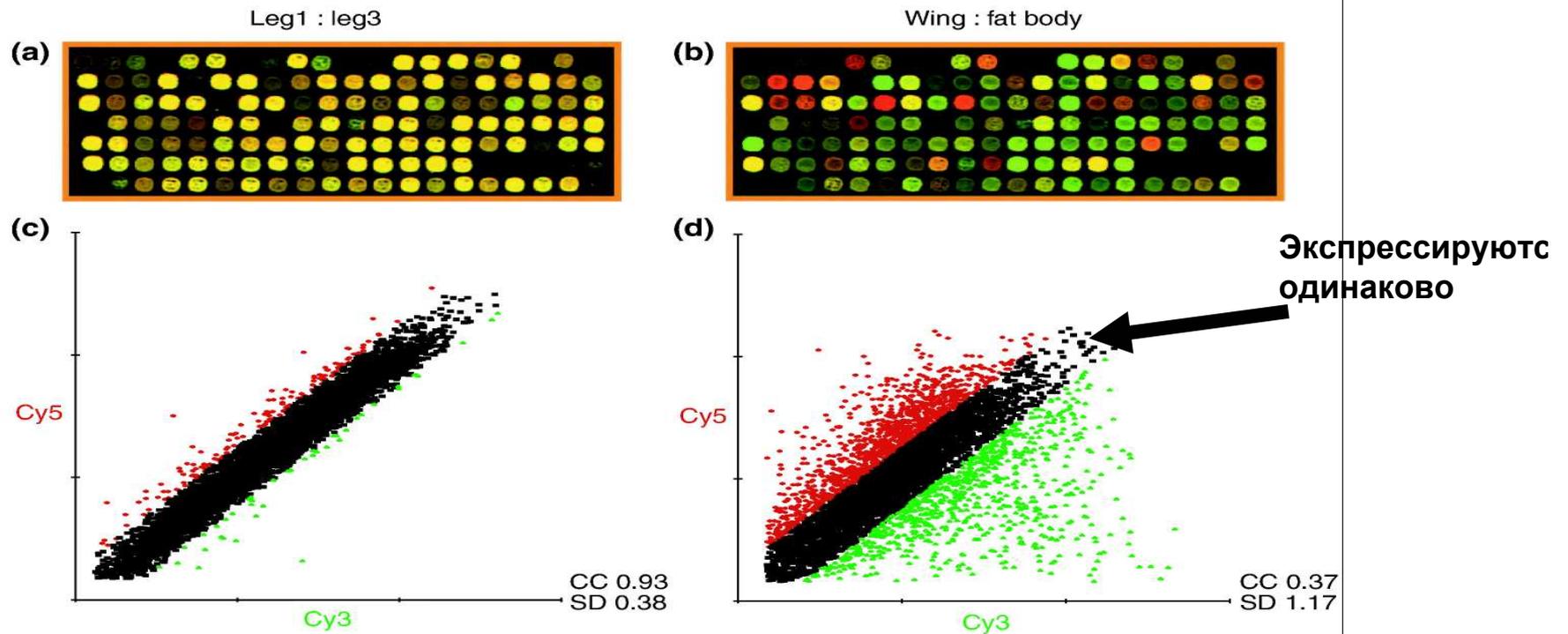
Scan and quantify

Compare within array

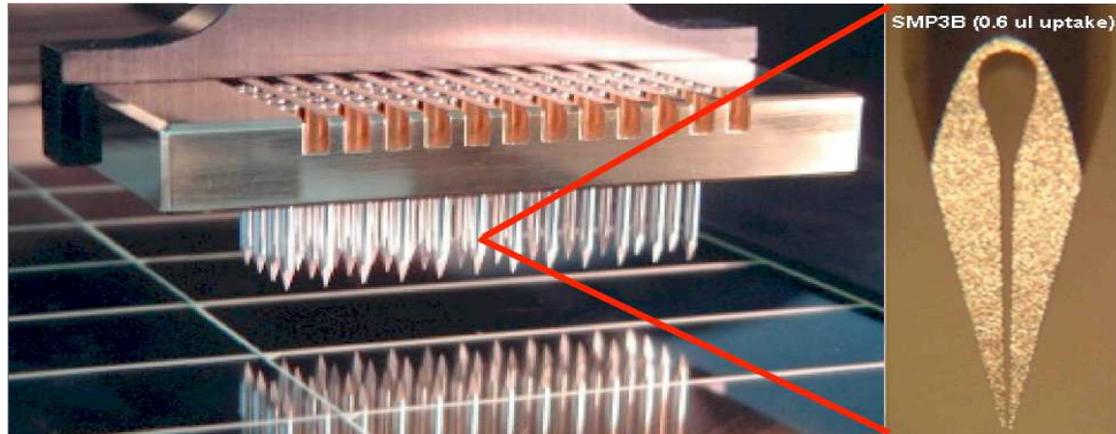
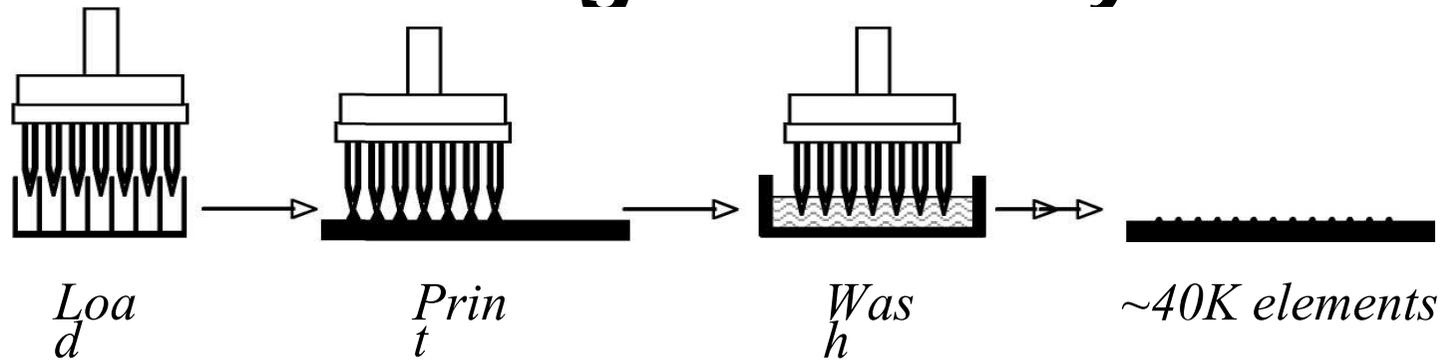
Синтез меченых cDNA



Examining tissue-specific expression

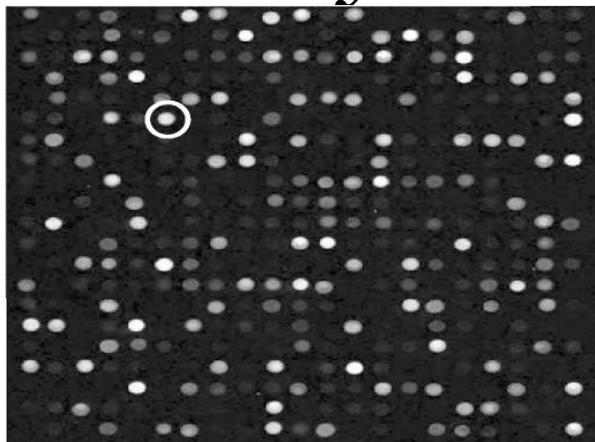


Making Microarrays

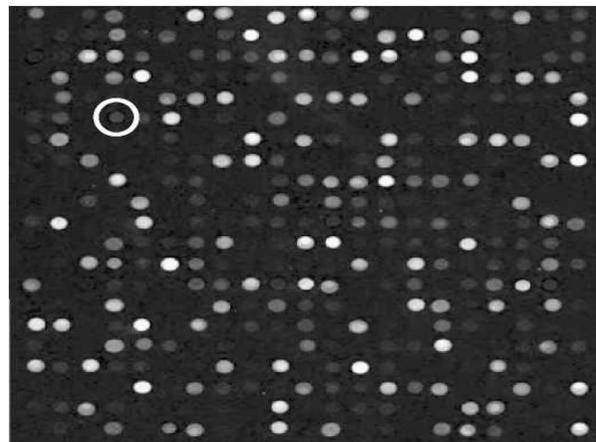


**Contact printing
on glass/membrane**

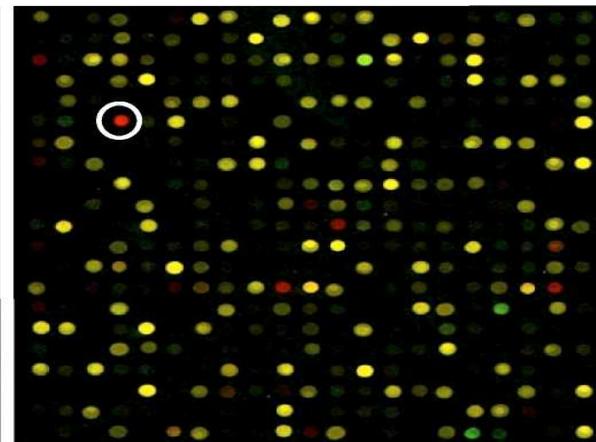
Grayscale channels are the raw data



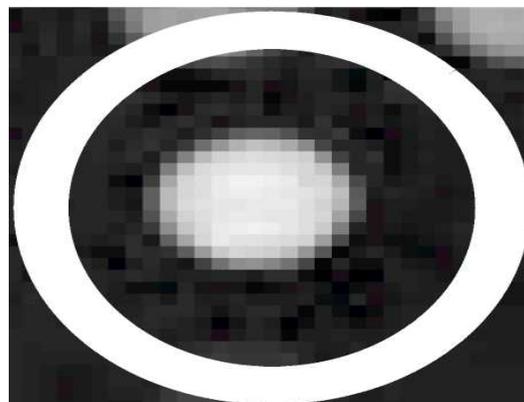
Cy5



Cy3

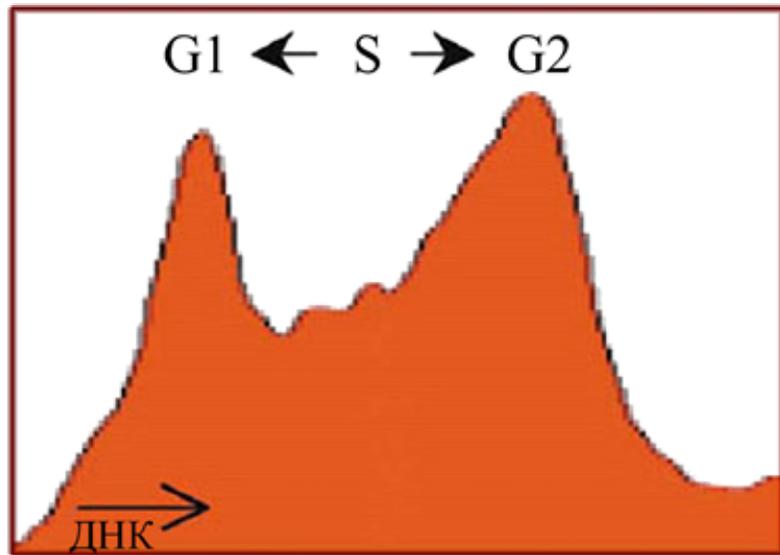


Cy3 + Cy5

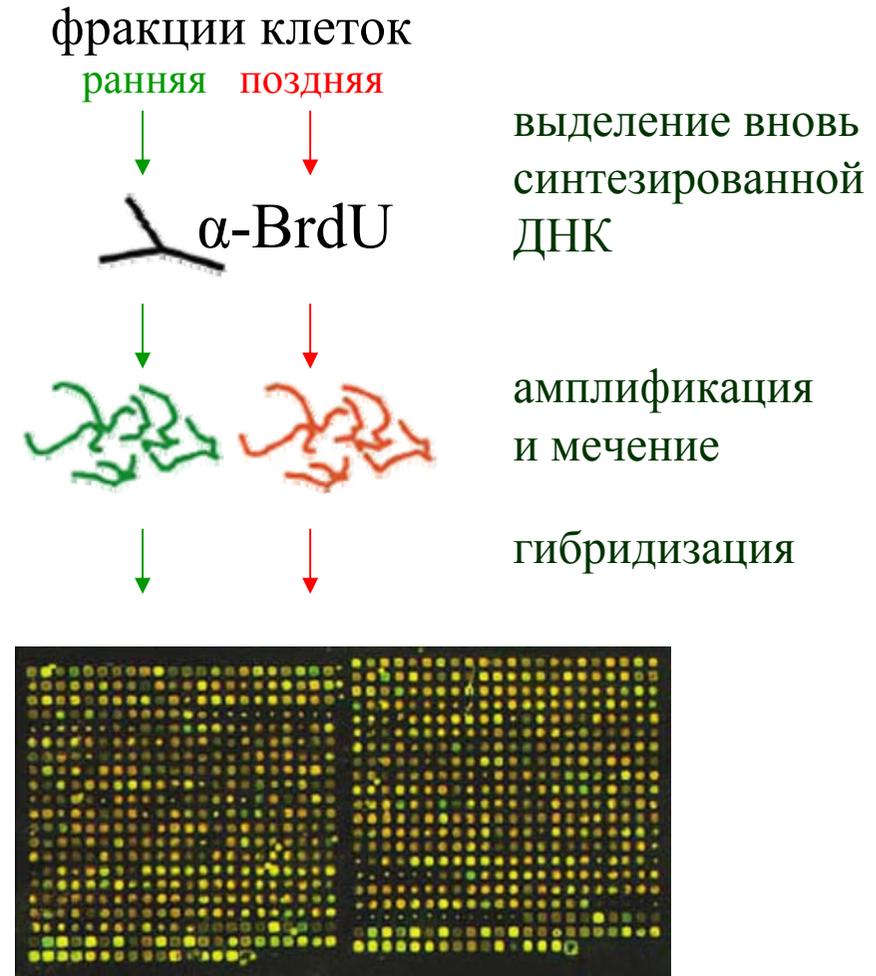


Профиль репликации генома

[Schübeler *et al.*, 2002 Nat Genet]

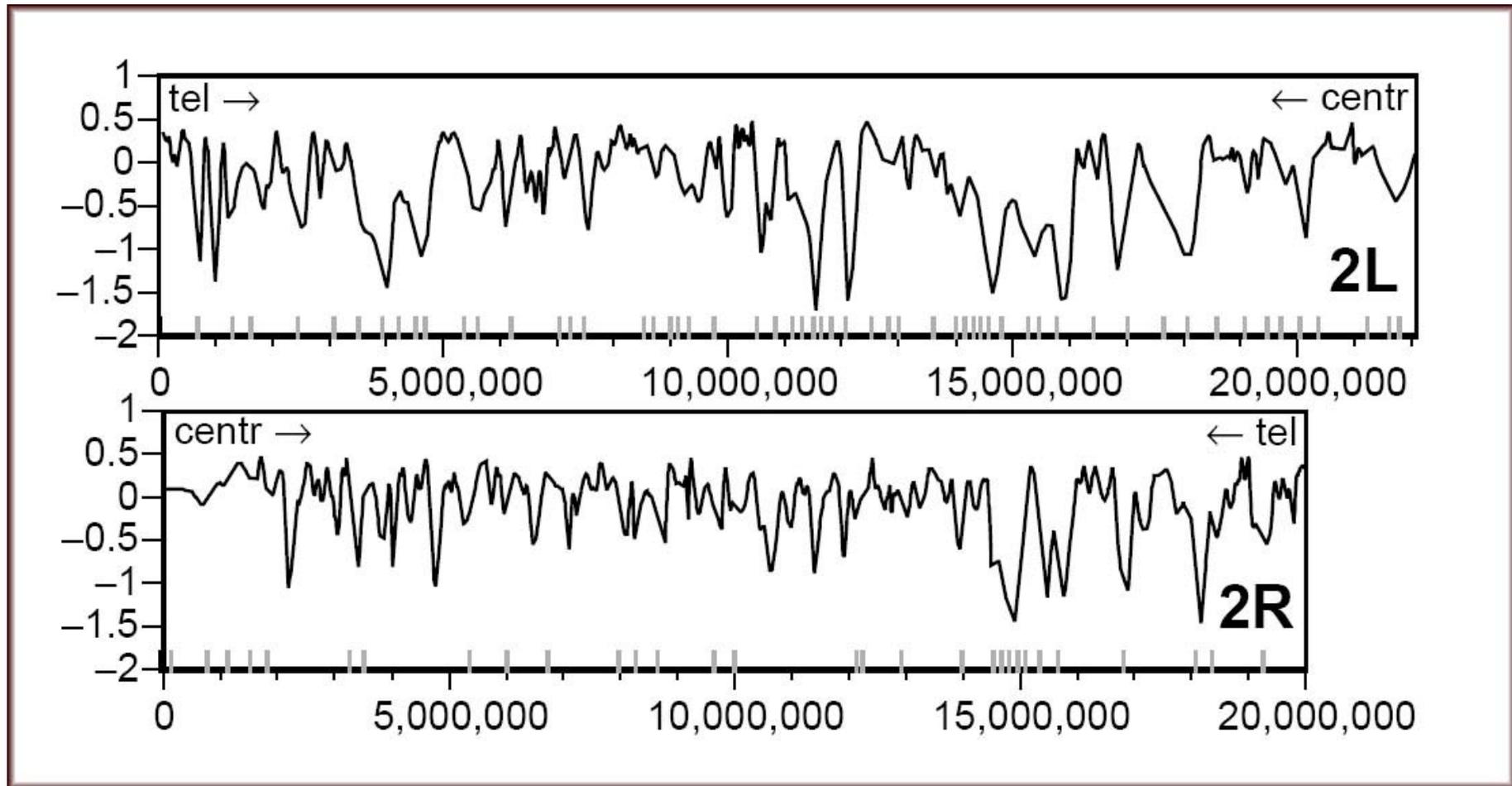


↔ ↔
ранняя поздняя
фракции клеток

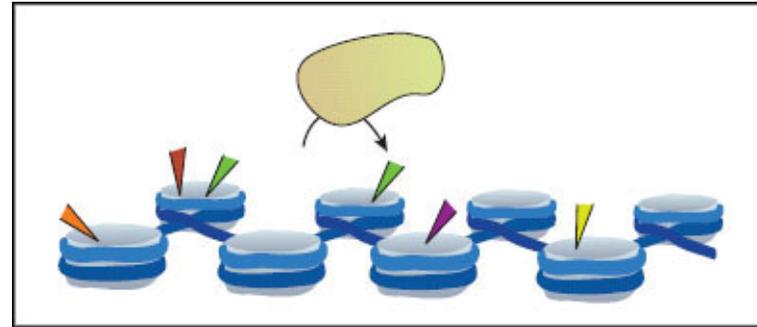
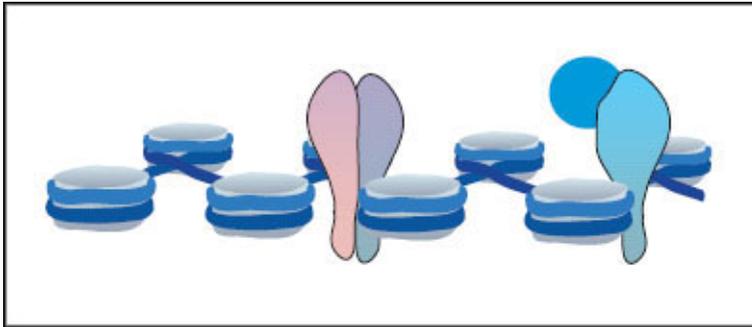


Профиль репликации хромосомы 2

Drosophila melanogaster



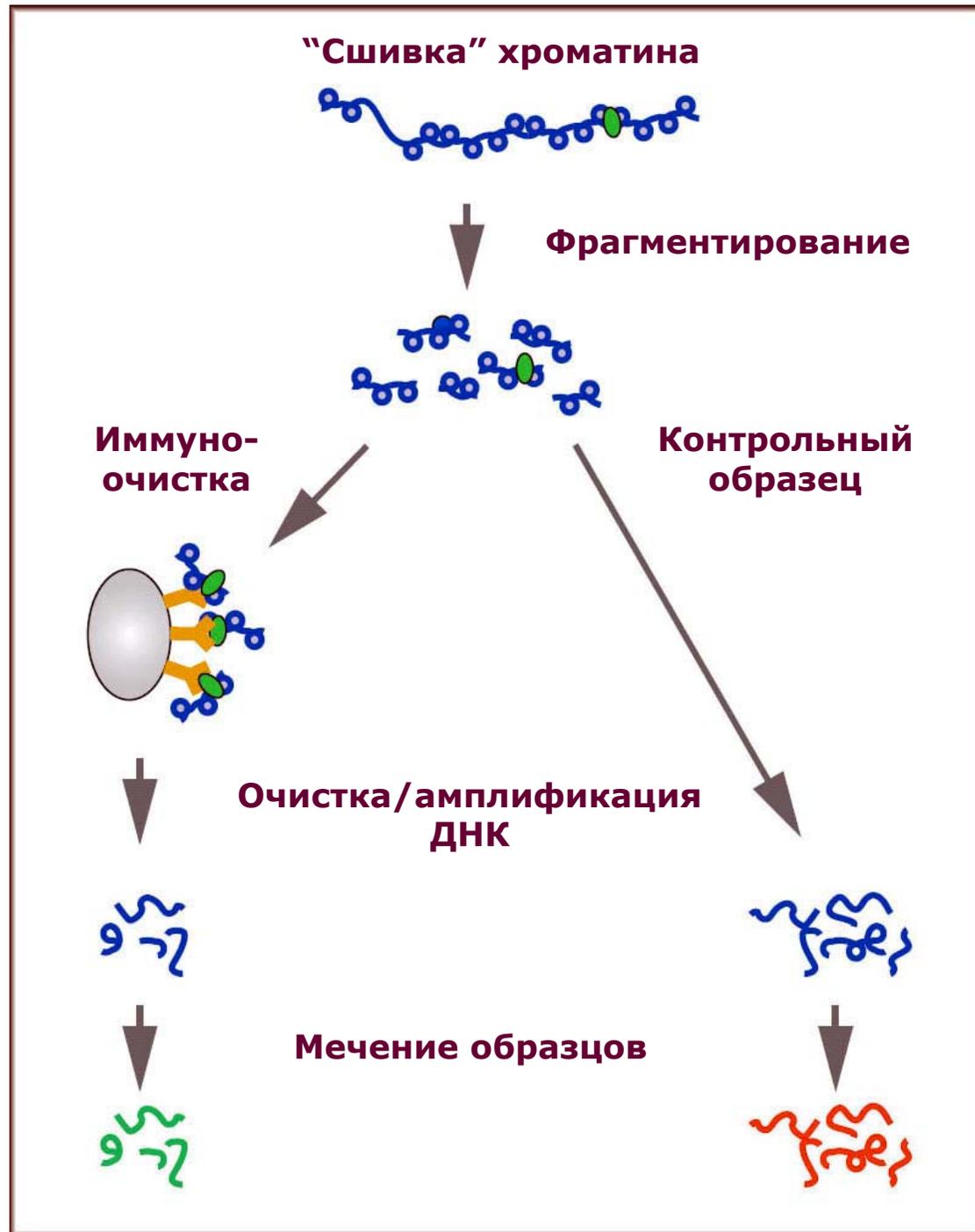
Методы картирования ДНК-белковых взаимодействий *in vivo*



Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP)

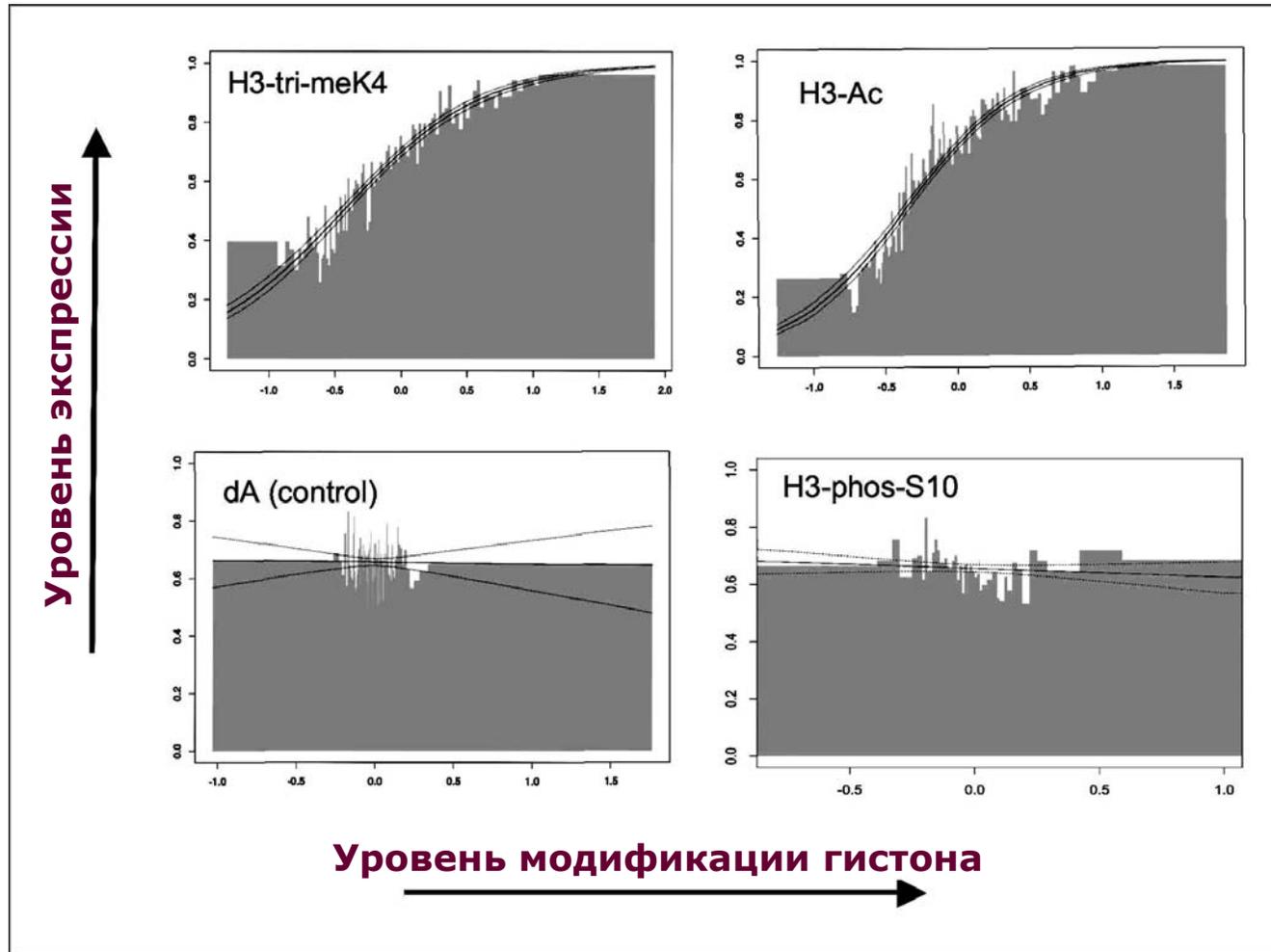
Dam Identification (DamID)

Принцип метода ChIP-on-chip

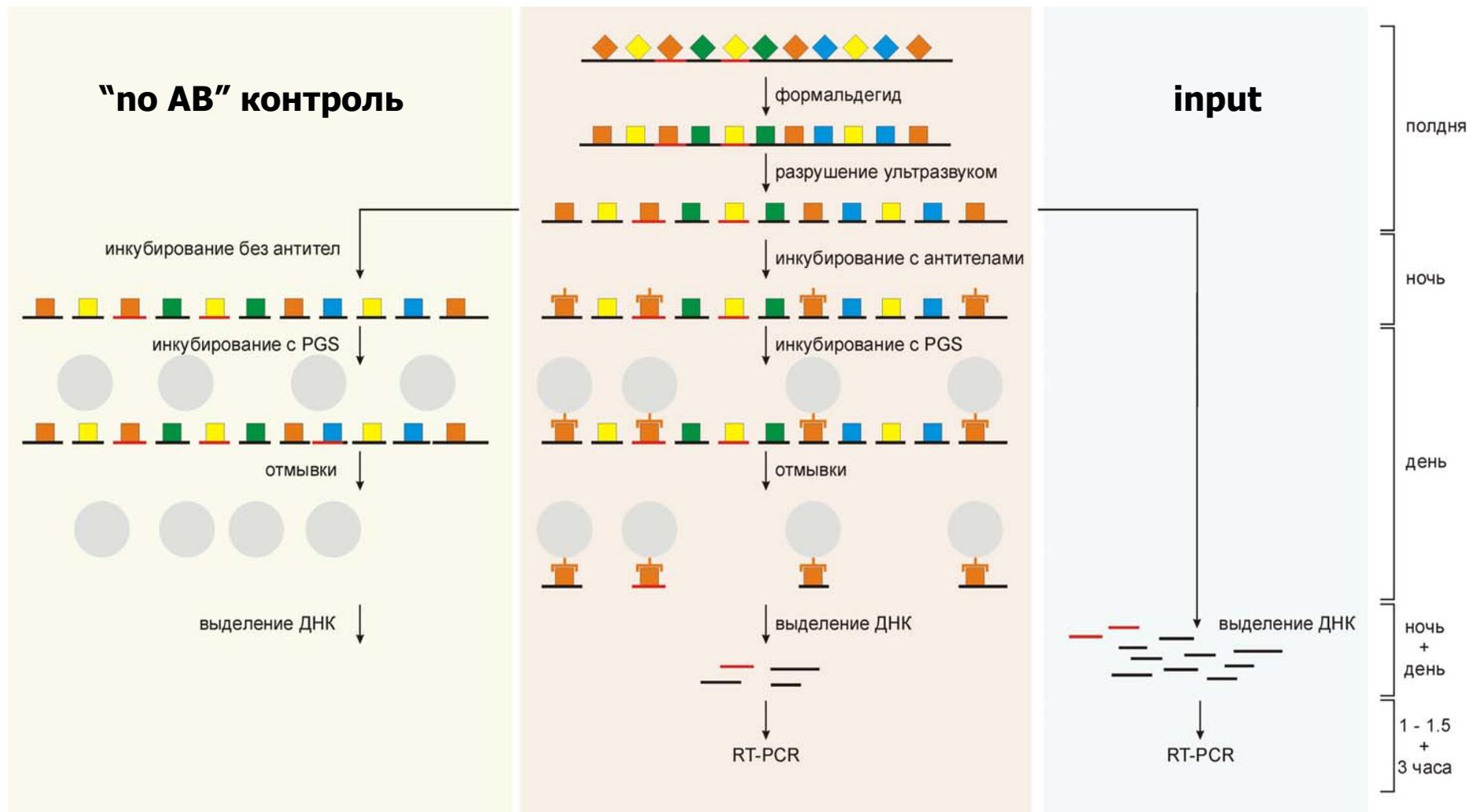


Картирование модифицированных гистонов

[Schübeler *et al.*, 2004 *Genes Dev*]

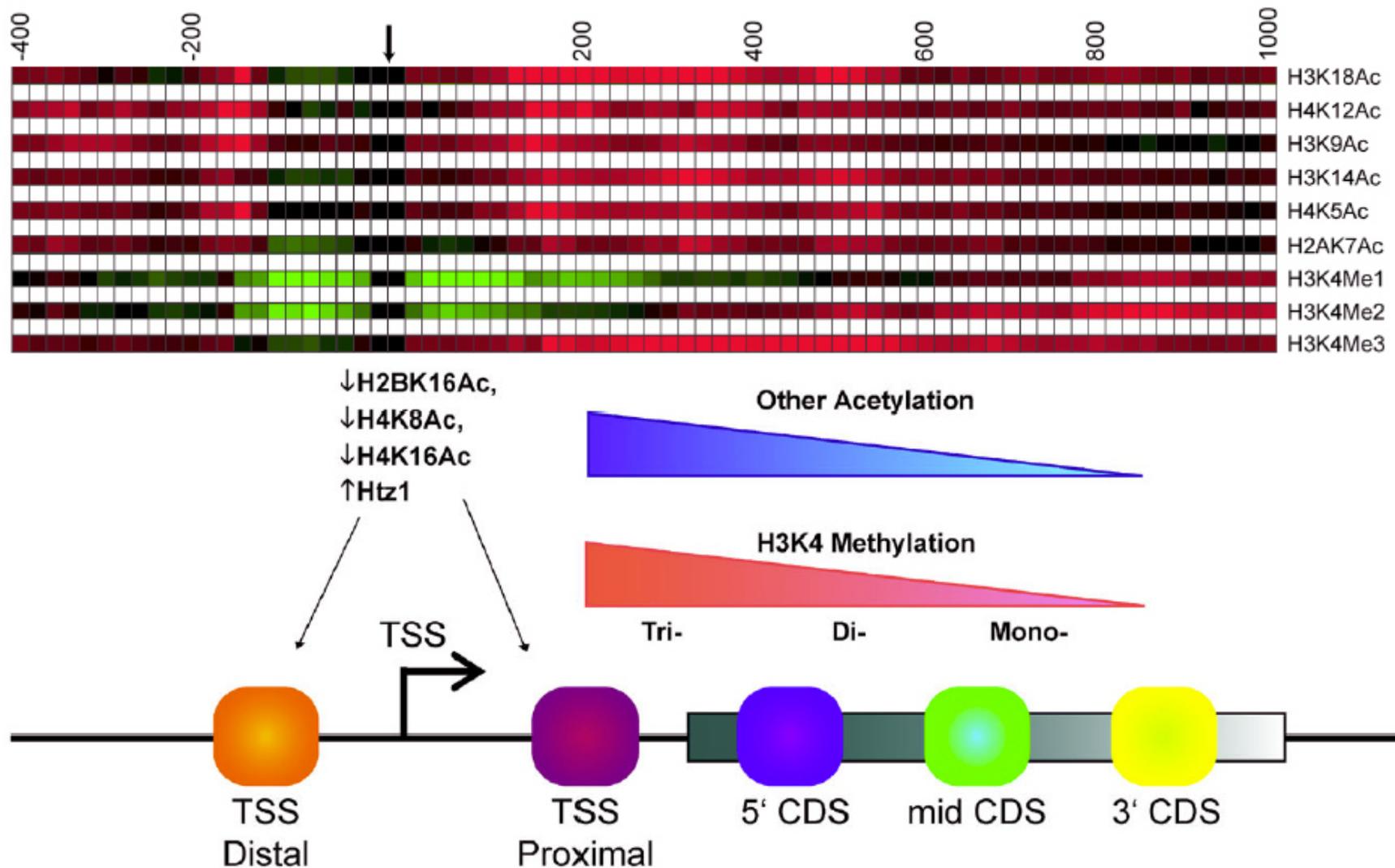


ChIP



Пример ChIP on chip

типичное распределение гистоновых модификаций в геноме *S. pombe* (на примере одного гена)



TSS - transcription starting sequence, CDS - coding sequence

X-ChIP

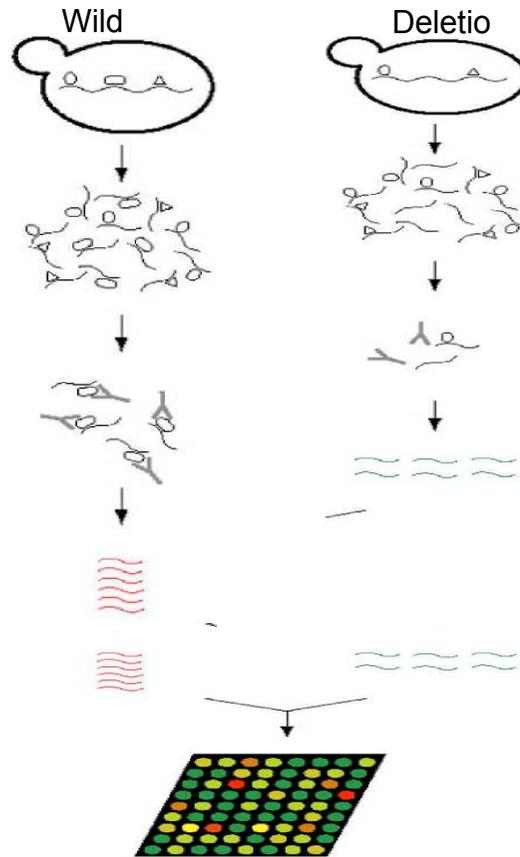
Crosslink proteins to DNA

Extract and shear crosslinked DNA

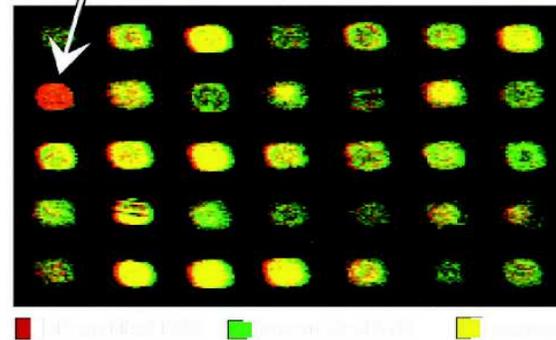
Immunoprecipitate with specific antibody

Reverse crosslinks, amplify and label DNA

Hybridize to microarray containing all intergenic regions



Binding site



Chromatin IP from wild type and TF deletion with antibodies against Swi4 and MBF1.

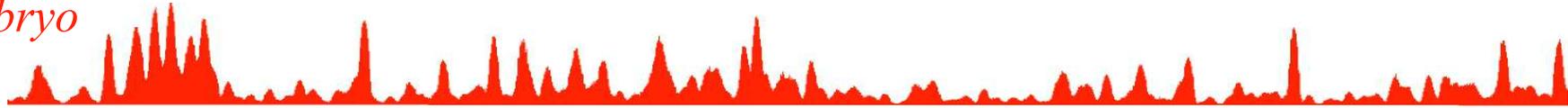
Microarrays containing all intergenic regions.

Identify the *in vivo* location of TF binding sites.

lyre et al (2001) Nature 409:p533

Binding of su(Hw) in the Adh region

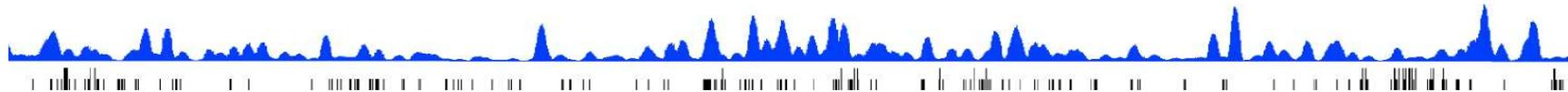
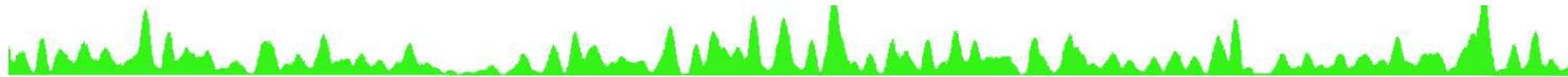
Embryo



L3 Brain

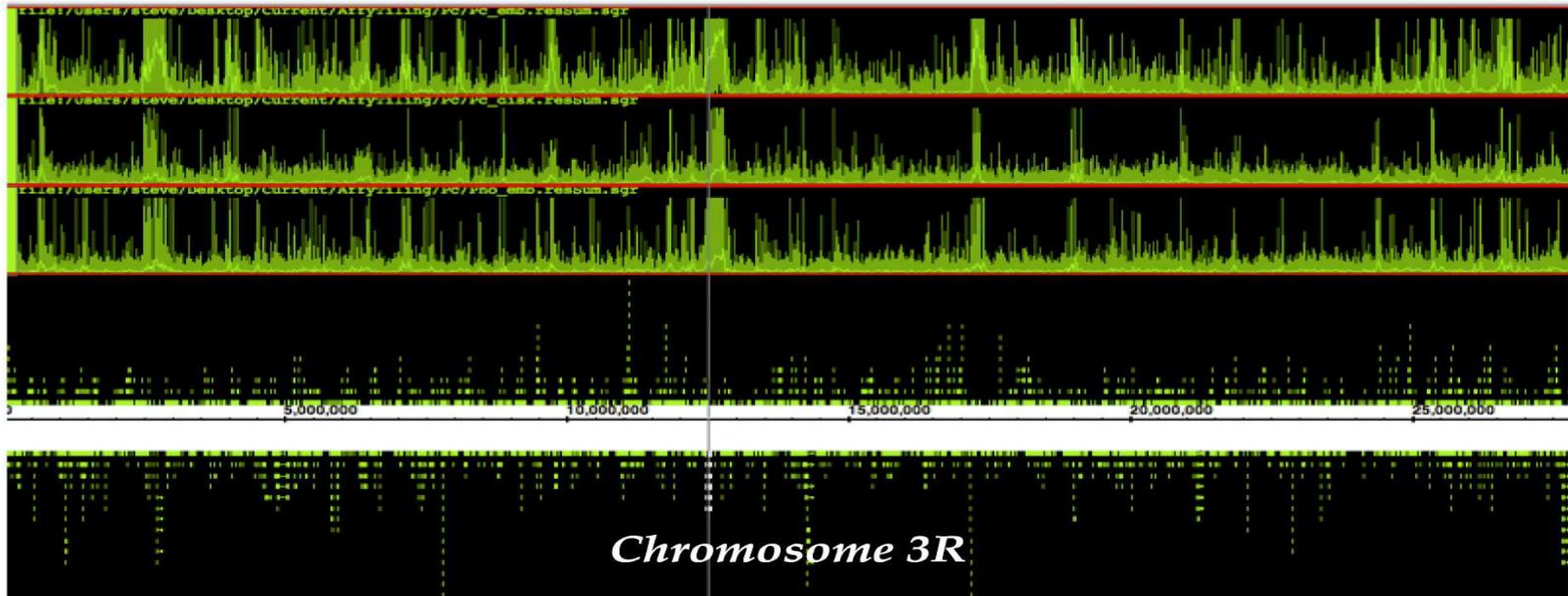


Wing Disc



- 112 fragments *su(Hw)* enriched fragments $>1.75 \times 10^5$ in
- *Adh* region.

Genome-wide Pc analysis



Affymetrix Drosophila Genome Tiling Array

~106Mb euchromatin

25mer PM/MM oligos every 35bp

~6 million oligos

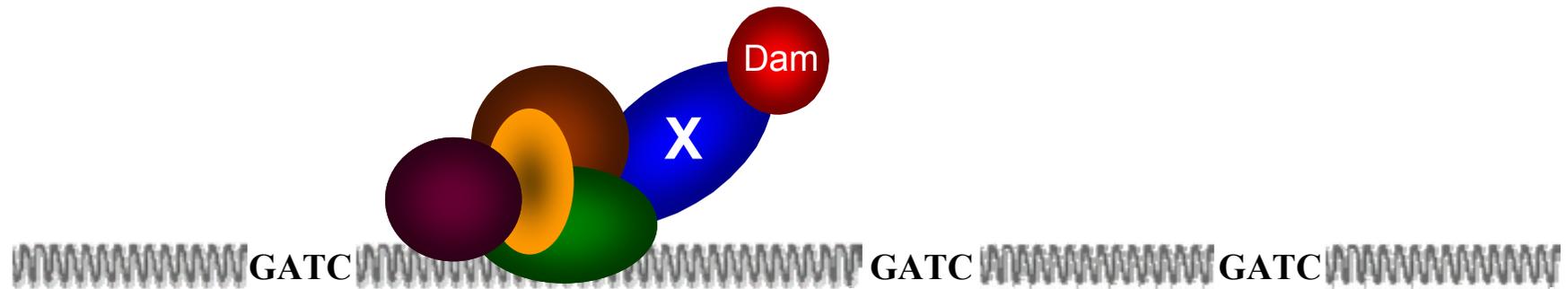
Принцип метода DamID

Идентификация сайтов связывания хроматиновых белков посредством ДНК-аденин-метилтрансферазы Dam Identification (DamID)

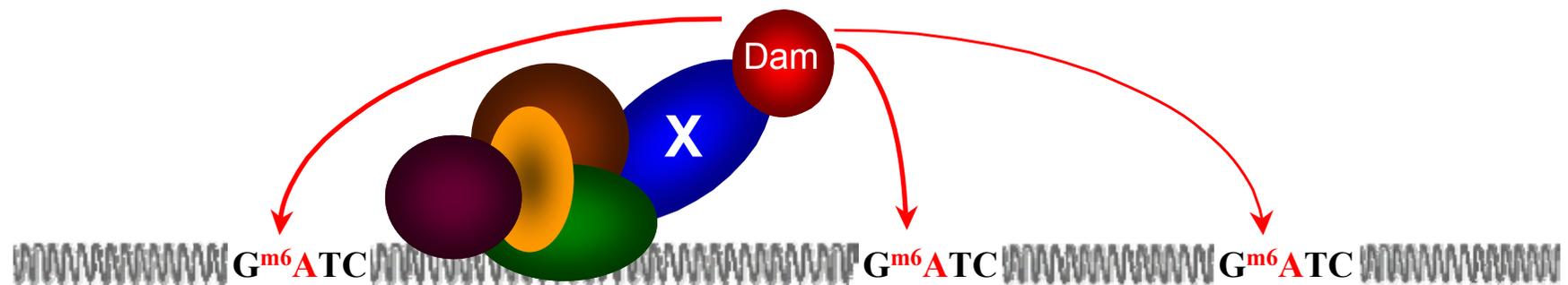
[van Steensel *et al.*, 2001 Nat Genet]

- *Escherichia coli* ДНК-аденин-метилтрансфераза (DNA adenine methyltransferase, Dam) метилирует аденин в последовательности GATC, которая встречается в среднем каждые 200 - 300 пн в геноме
- Функционально активная Dam может быть экспрессирована в дрозофиле, что не приводит к каким либо нарушениям в развитии и понижению жизнеспособности
- Будучи присоединенной к хроматиновому белку, Dam рекрутируется в естественные сайты связывания данного белка, что приводит к локальному метилированию ДНК

Экспрессия химерного белка Dam-X *in vivo*



Химерный белок **Dam-X** рекрутируется в естественные сайты связывания белка **X**



Dam метилирует ДНК возле сайтов связывания химерного белка **Dam-X**

Амплификация метилированных фрагментов ДНК



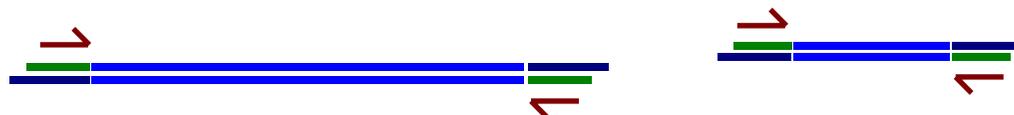
↓ *DpnI* (расщепляет только метилированную ДНК по последовательности G^{m6}ATC)



↓ + T4 ДНК лигаза
+ дц олигонуклеотид-линкер



↓ ПЦР с использованием праймера гомологичного линкерной последовательности



Экспрессия химерного
Dam белка *in vivo*



Выделение
Геномной ДНК



Гидролиз
рестриктазой *DpnI*



Очистка / амплификация
метилованных
фрагментов ДНК



Мечение образцов



Экспрессия белка
Dam *in vivo*



Выделение
Геномной ДНК



Гидролиз
рестриктазой *DpnI*



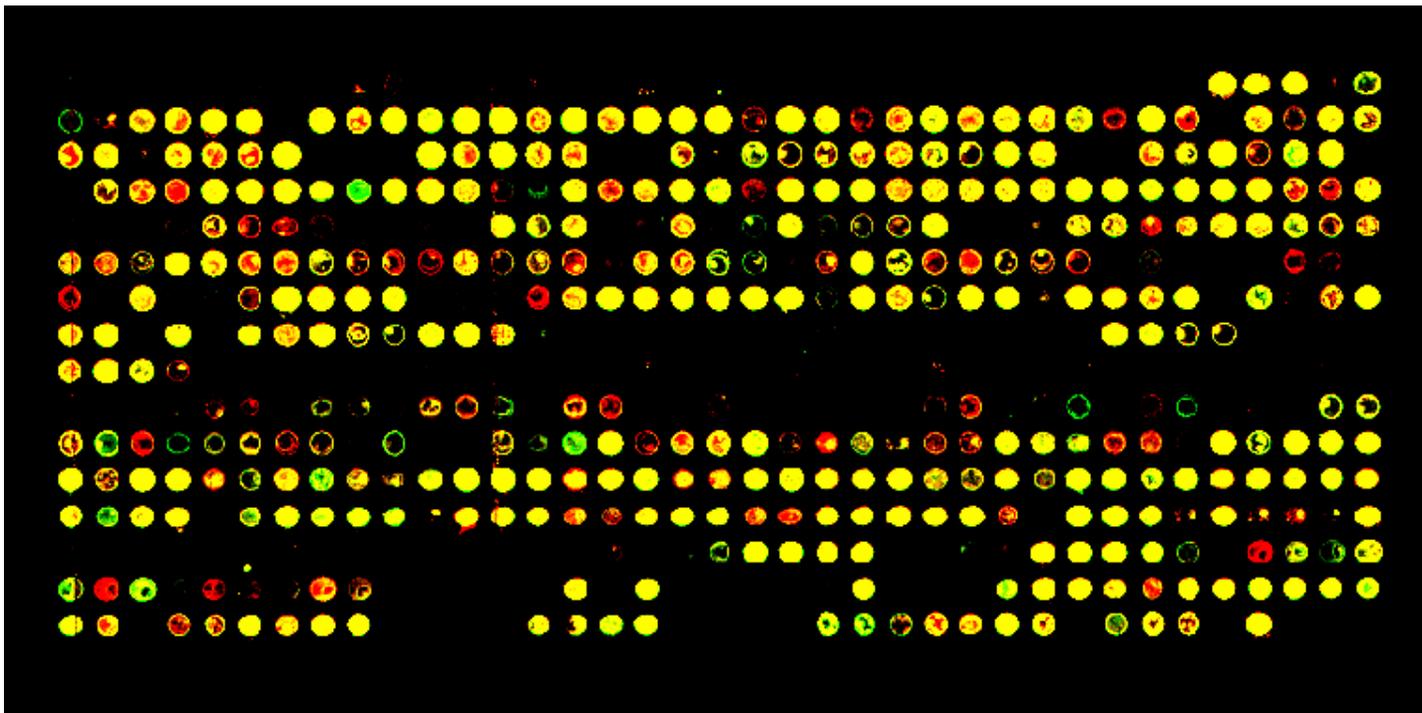
Очистка / амплификация
метилованных
фрагментов ДНК



Мечение образцов

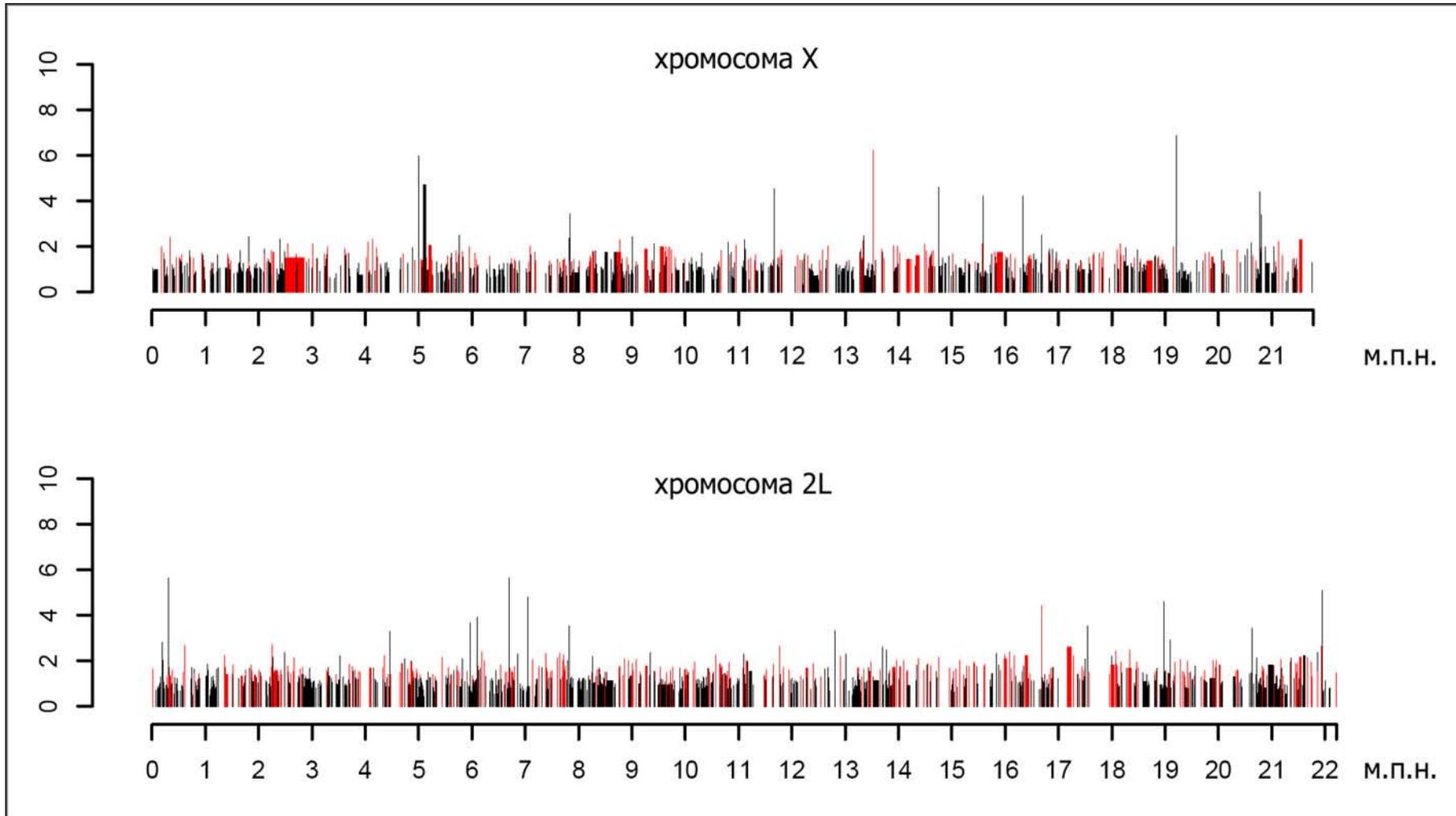


Гибридизация с микрочипом



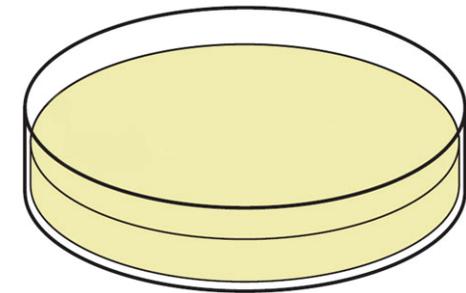
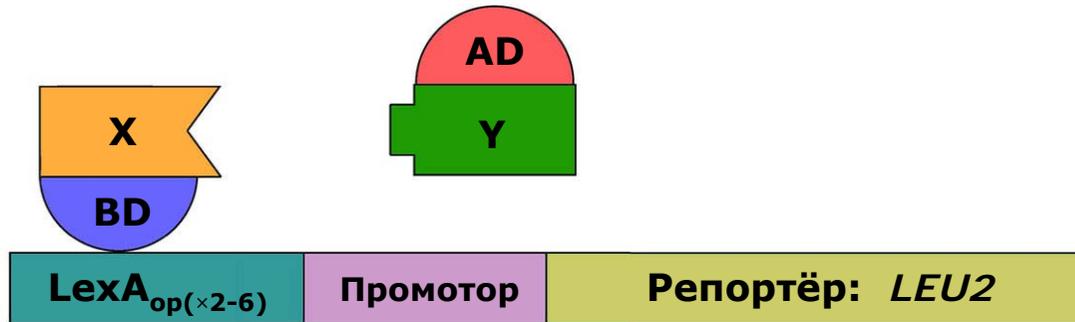
- Сайты связывания белка **Dam** в отсутствие X
- Сайты связывания белка **Dam**
- Сайты связывания белка **X**

В результате получается распределение белка X вдоль хромосом



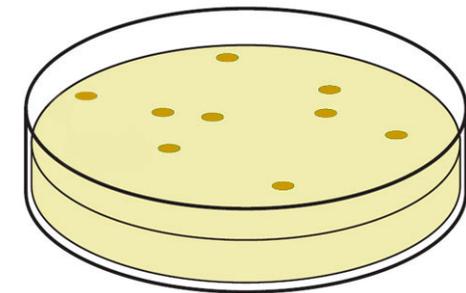
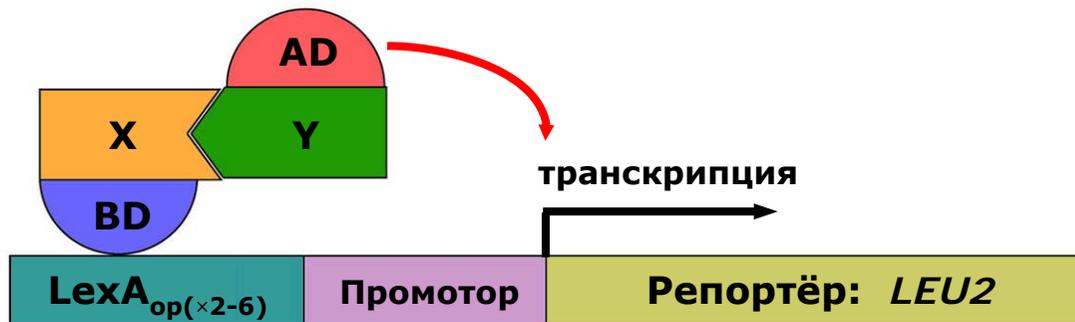
Поиск возможных белков-партнёров с помощью дрожжевой двугибридной системы

Белки X и Y не взаимодействуют



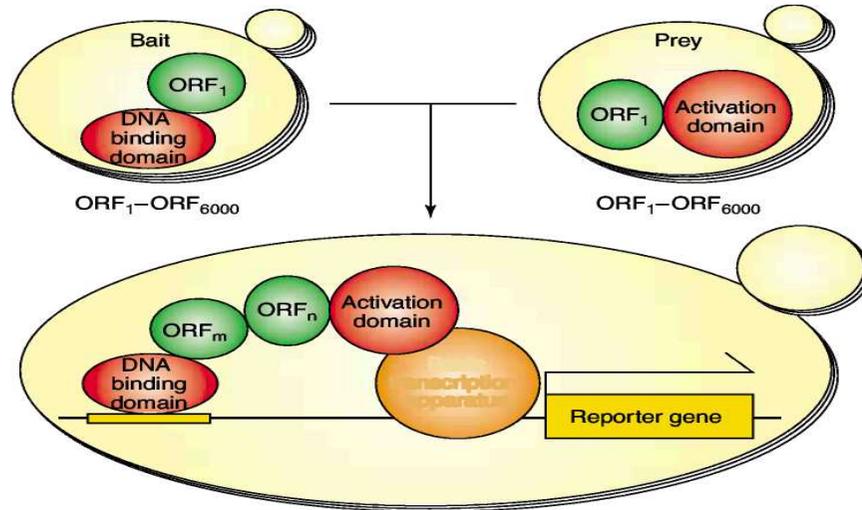
-LEU

Белки X и Y взаимодействуют



Searching for protein-protein interactions

Yeast 2-hybrid system



TRENDS in Biotechnology

2 yeast strains:

Bait: DNA binding domain of GAL4.

Prey: transcription activation domain.

Mate strains and select for reporter gene expression.

Generate protein fusions (single bait against a library of prey).

In vivo.

Fast, a single bait screen can be done in couple of days.

Ito et al (2001) Trend Biotech 19:S23