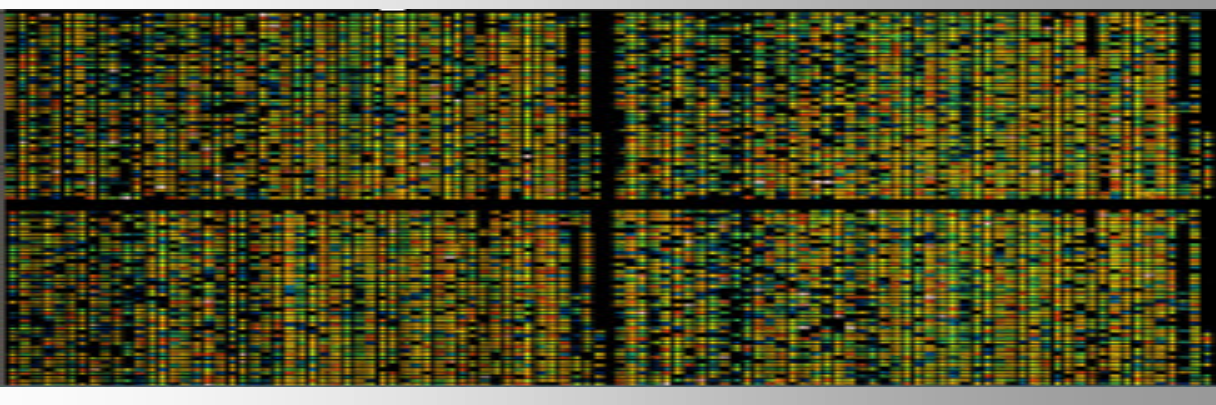


DNA MİKROARREY TEKNOLOJİSİ

Dr. Soner AKSU
TÜBİTAK MAM GMBE
21 Ekim 2008



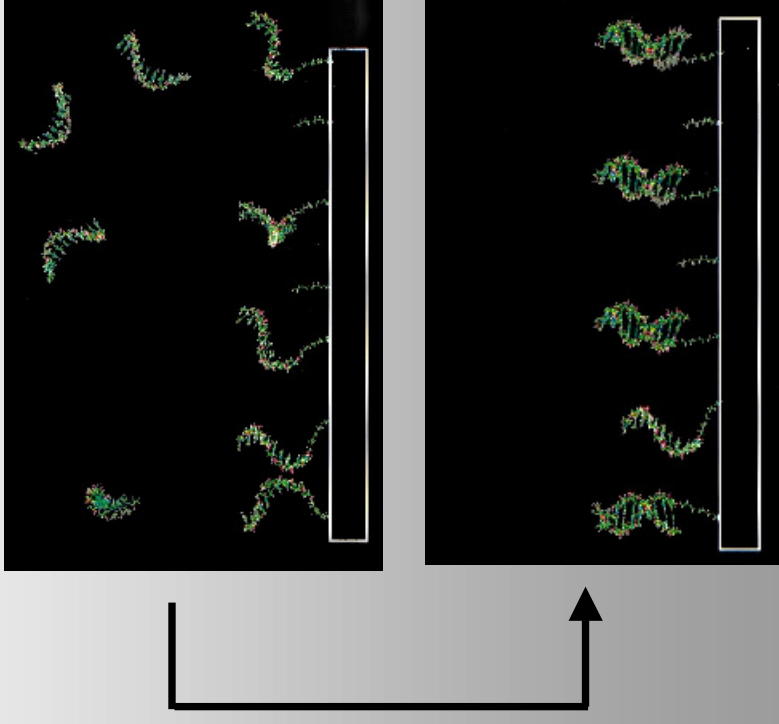
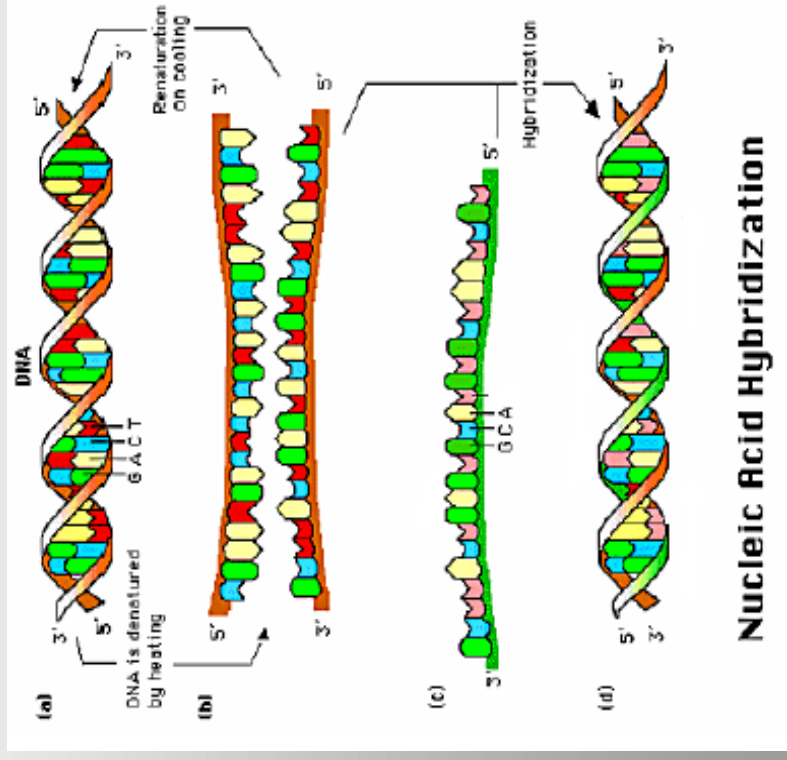
Tanım

DNA MIKROARRAY TEKNOLOJİSİ

DNA mikroarrayleri, nükleik asitlerin hibridizasyon özelliklerinden faydalanarak farklı tipte doku ya da hücrelerde genom boyutunda DNA ve ya RNA moleküllerinin varlığı ve miktarını belirlemek için kullanılan bir teknolojidir.

Tanim- vurgu 1

DNA mikroarreyler; nükleik asitlerin hibridizasyon özelliklerinden faydalanır.



Kaynak: Bioconductor short course. Dudoit, S., Gentleman R., Irizarry R., Yang HY

Tanım- vurgu 2

DNA mikroarreyler; doku ve organizma bağımlılığı yoktur.

- Farklı türlere spesifik olarak geliştirilmiş mikroarrey çipler ile kapsamlı analizler yapılabilir.

Human Genome U133 Plus 2.0 Array
Mouse Genome 430 2.0 Array
Mouse Genome 430A 2.0 Array
Human Genome U133 Set
Human Genome U95 Set

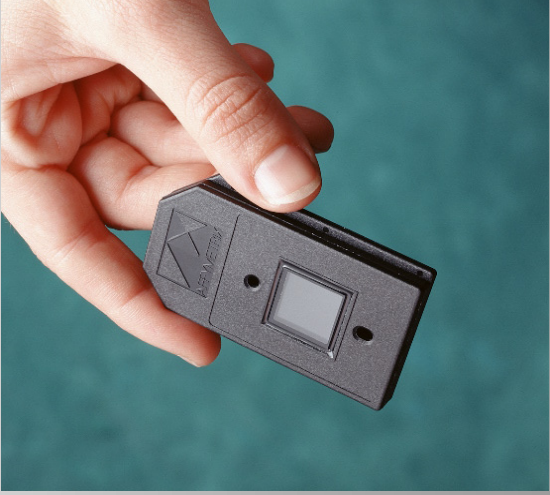
Rat Expression Array 230 2.0
Rat Expression Set 230
HT Human Genome U133 Set
HT Mouse Expression Set 430
HT Rat Focus Array

Barley1
Bovine
Bsubtilis
Canine
Canine_2

Tanım- vurgu 3

DNA mikroarreyler; sınırlandırılmış kapsamdan genom boyutuna kadar analiz imkanı sağlar.

- Üzerlerinde binlerce farklı gene ait dizilerin/alt dizilerin bağlandığı çok sayıda spesifik nükleotide dizileri taşırlar.



Probe Info	Probe Sequence(5'-3')	Probe X	Probe Y
	AGGAAAATGCGCTGTGGACCCCTGT	635	57
	TGGACCCCTGTATCGATTCTGTGG	557	565
	TATCTGTCTTACGTGGAGGCTGTGC	308	679
	GGATCAATGACATCTCACACACGCA	257	529
	AGGGTCACTGGTTTGGACTTCATCC	545	67
	CCTCTCTGAGTTTGTCCAAGATGG	386	287
	TGGACCAGACATTGGCGATCTACCA	100	567
	GTCTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCA	281	473
	ATCCAATGACCTGGAGAACCTCCGG	208	29
	GTCACACAGGACATGTTGCGGCAG	240	467
	ATGTTGCGGCAGCTGGACCTCAGTC	24	45

Tarihçe – kilometre taşları

- 1991: Photolithographic printing (Affymetrix)
- 1994: First cDNA collections are developed at Stanford
- 1995: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.
- 1996: Commercialization of arrays (Affymetrix)
- 1997: Genome- wide expression monitoring in *S. cerevisiae* (yeast)
- 2000: Portraits/ Signatures of cancer.
- 2003: Introduction into clinical practices
- 2004: Whole human genome on one microarray

Mikroarray Çip Teknolojisi

- Her gen 16-20 oligonükleotid ile ifade edilir.
- Tam eş (perfect match probe - PM) oligo: Genellikle 25-mer tam doğru oligonükleotid.
- Hatalı eş (mismatch probe - MM) oligo: Tam orta noktada (13th) yanlış baz taşıyan oligonükleotid.
- Oligo çifti: PM-MM çiftleri. Her gen için 16-20 oligo çifti bulunur.

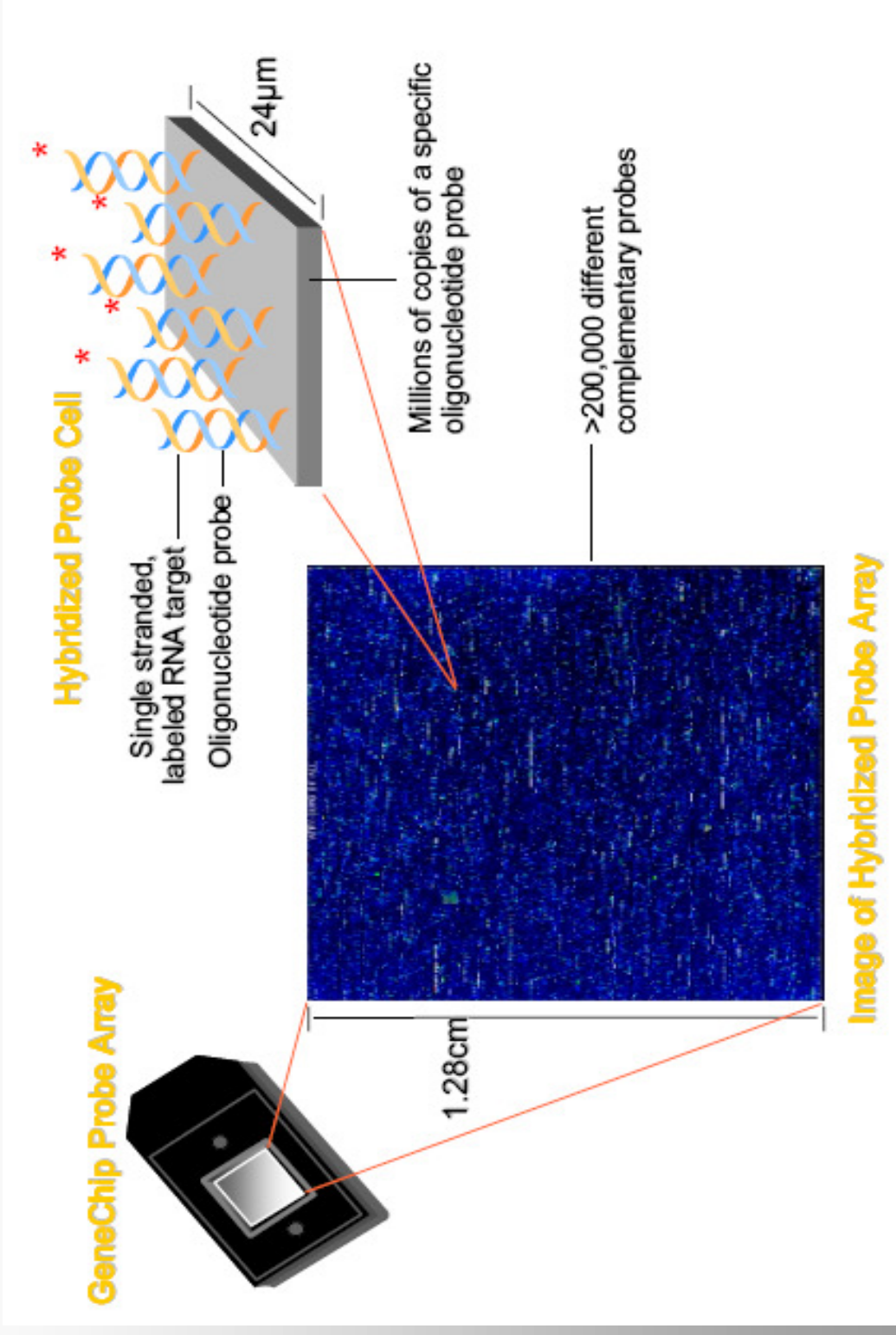
MM oligo dizaynı ile non-spesifik bağlanma miktarının ve arka plan gürültünün ölçülmesi amaçlanmıştır.

Mikroarray Çip Teknolojisi

DNA microarraylerin üretiminde genelde üç tip gelişmiş teknoloji kullanılmaktadır.

- **Fotolitografi**
- **Mekanik Mikrodağıtım**
- **Ink Jets**

Mikroarray Çip Teknolojisi



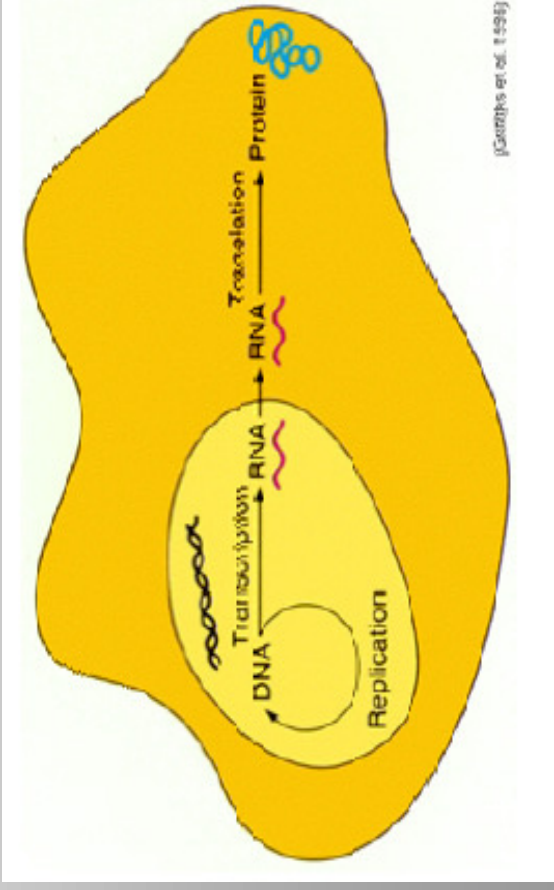
Temel Kullanım Alanları

- Transkript miktarlarının tespit edilmesi (gen ekspresyon seviyesi analizi)
- Genotiplendirme (SNP çipleri)
- DNA kopya sayısının belirlenmesi
- mRNA bozunum hızının ölçülmesi
- Protein bağlanma bölgelerinin tanımlanması
- Gen ürünlerinin hücre içi lokalizasyonunun tespit edilmesi

Transkriptom

Transkriptom; bir ya da bir grup hücre tarafından üretilen tüm mRNA moleküllerini ya da transkript varlığını ifade eden bir terimdir.

- her hangi bir organizmanın tüm transkript durumunu ifade etmek için kullanılabileceği gibi, belli bir hücre tipinde belli bir transkript içinde kullanılabilir.



Transkriptom

mRNA ya da *transkript seviyesi* ve içeriği bir hücrenin biyolojik durumunu çok hassas bir şekilde yansıtır.

- Bulunduđu gelişim evresi
- Bulunduđu hücre döngüsü
- Hastalık ve sağlık durumlarının genetik seviyedeki etkileri
- Tedaviye ve çevresel etkenlere karşı verilen biyolojik cevap

Araştırma Alanları

Mikroarray teknolojiyi saęlamıř olduęu transkriptom bilgileri ile;

- kanser araştırmalarında
- immunolojik arařtırmalarda
- kompleks metabolik hastalıkların ve önemli fenotipik karakterlerin altında yatan genetik temellerin daha iyi anlaşılmasına yönelik çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

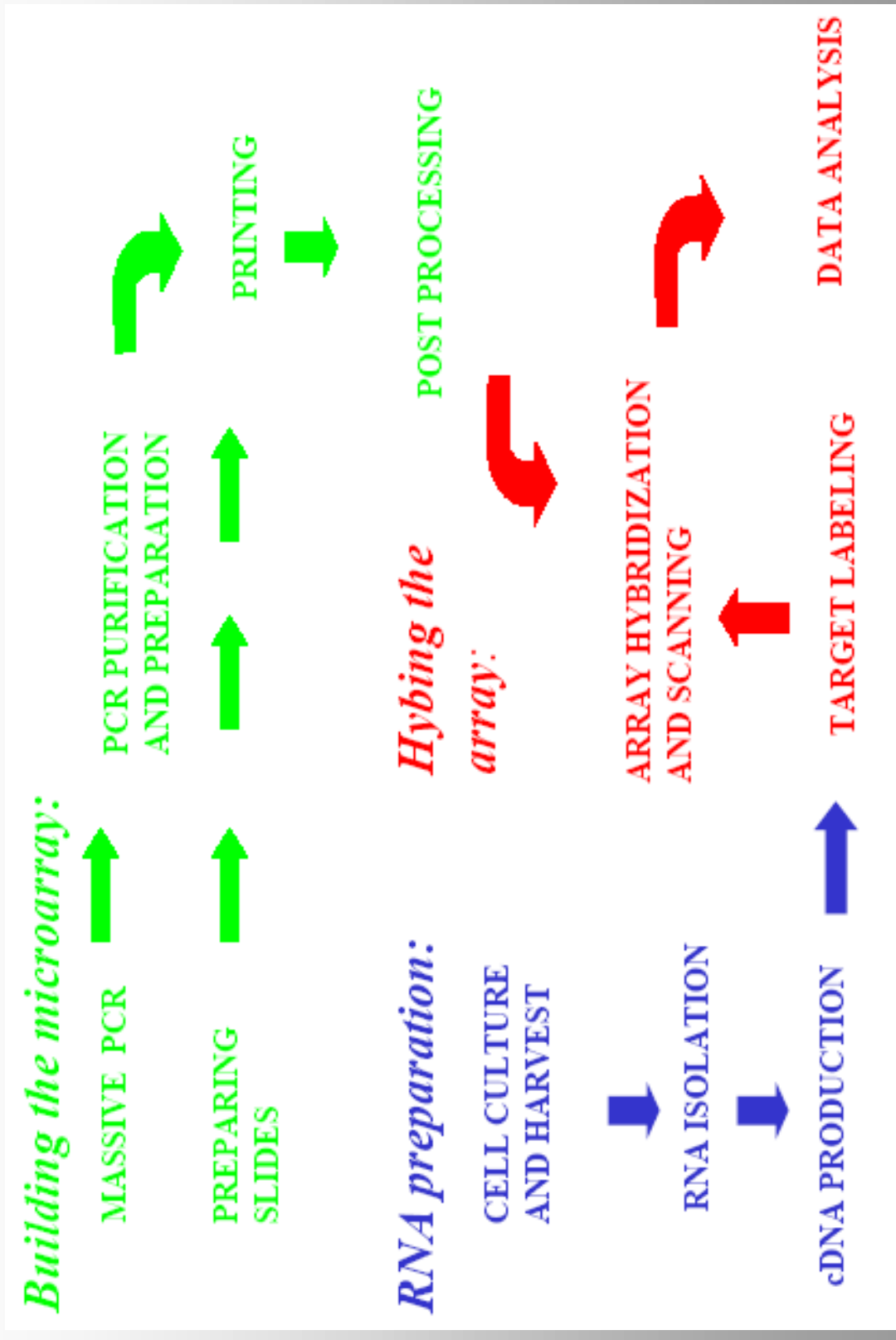
Uygulama - bileşenler

Örnek
Hazırlanması

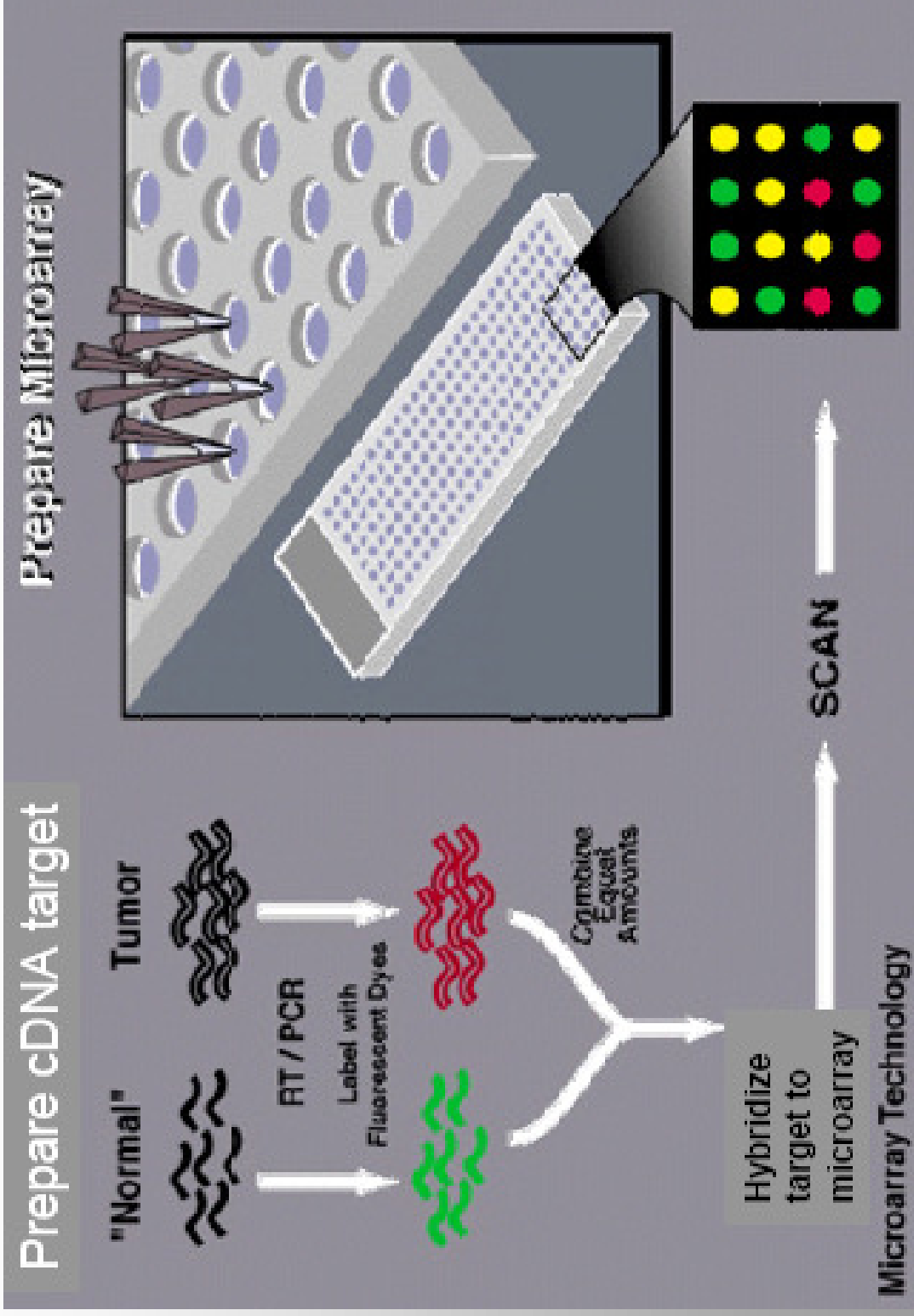
Mikroarrey
Çip
Hazırlanması

Uygulama ve Analiz

Uygulama - aşamalar



Uygulama - aşamalar



Uygulama – laboratuvar aşamaları 1

- **Microarray çiplerin üretimi:** Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmış DNA fragmanları farklı metotlar kullanılarak çip yüzeyi üzerine sabitlenerek yapıştırılır.
- **Örneklerin Hazırlanması:** Gen ifade seviyeleri karşılaştırılmak istenen farklı örneklerle ait olan mRNA'lar uygun kitler kullanılarak cDNA 'ya çevrilir.

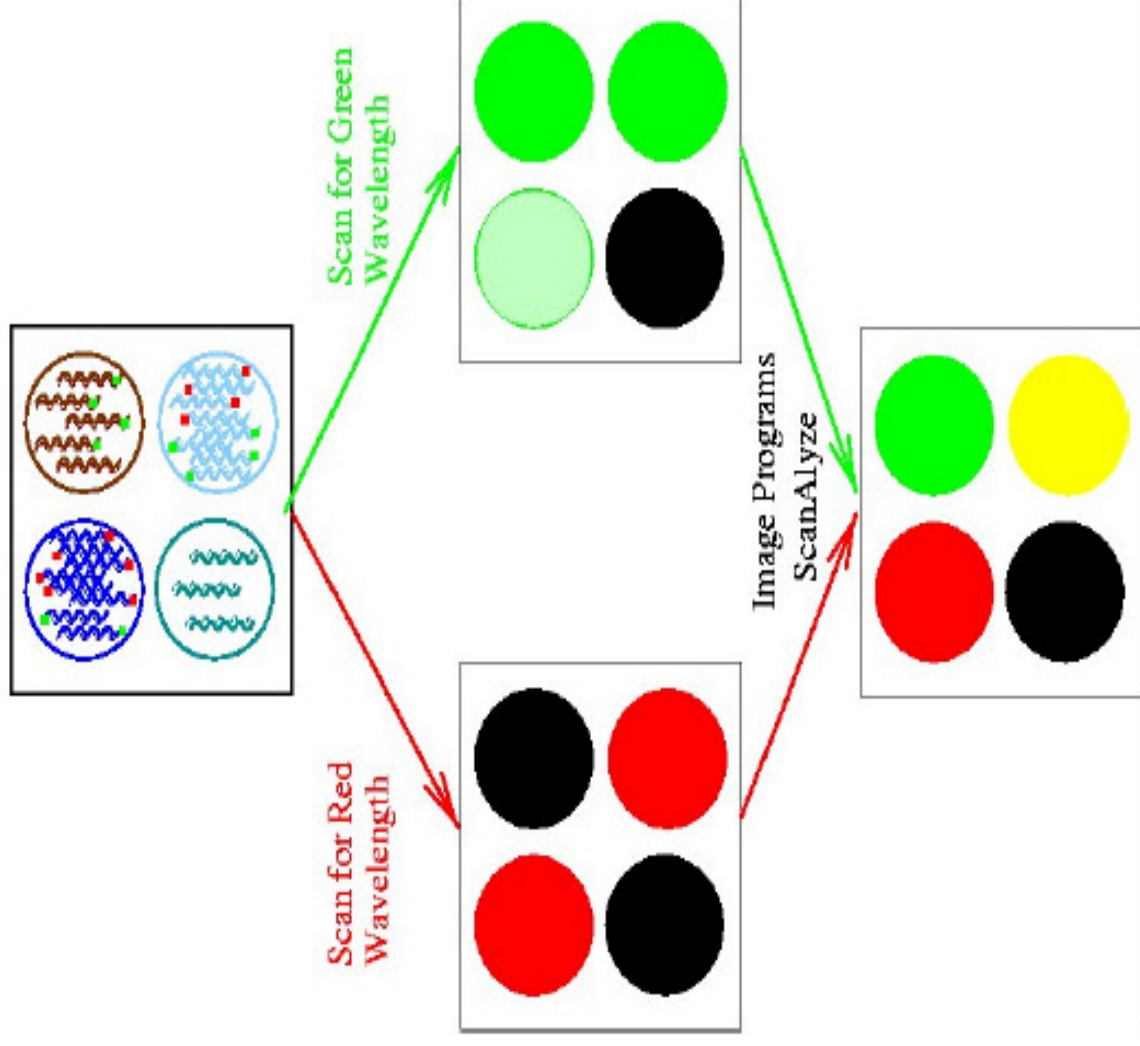
Uygulama – laboratuvar aşamaları 2

- ***İşaretleme:*** cDNA örnekleri farklı yöntemler mevcut olmasına rağmen temel olarak cDNA sentezi sırasında farklı işaretler ile boyanır. En çok tercih edilen iki boya, kırmızı ışıma yapan **Cy3** ve yeşil ışıma yapan **Cy5** işaret maddeleridir.
- ***Hibridizasyon:*** Doku ya da hücre örneklerinden elde edilen mRNA'lardan işaretlenerek elde edilen tek iplikçik halindeki cDNA örnekleri önce eşit miktarda karıştırılır ve ardından çip üzerinde sabit olarak bulunan oligolar ile hibridize olmaları sağlanır.

Uygulama – laboratuvar aşamaları 3

- **Çip/Slide Görüntüleme:** Lazer ile her nokta ışıma yapması için uyarılır ve gelen sinyal okunarak konfokal mikroskop ile görüntülenir.
- **Data Analizi:** Elde edilen ham veriler çeşitli parametre ve karşılaştırmalar ile normalize edilir ve elde edilen sonuçlar oranlanarak gen ifadesinde örnekler arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığı tespit edilir. Veriler farklı metot ve programlar kullanılarak analiz edilir.

Uygulama – *sinyal okuma*

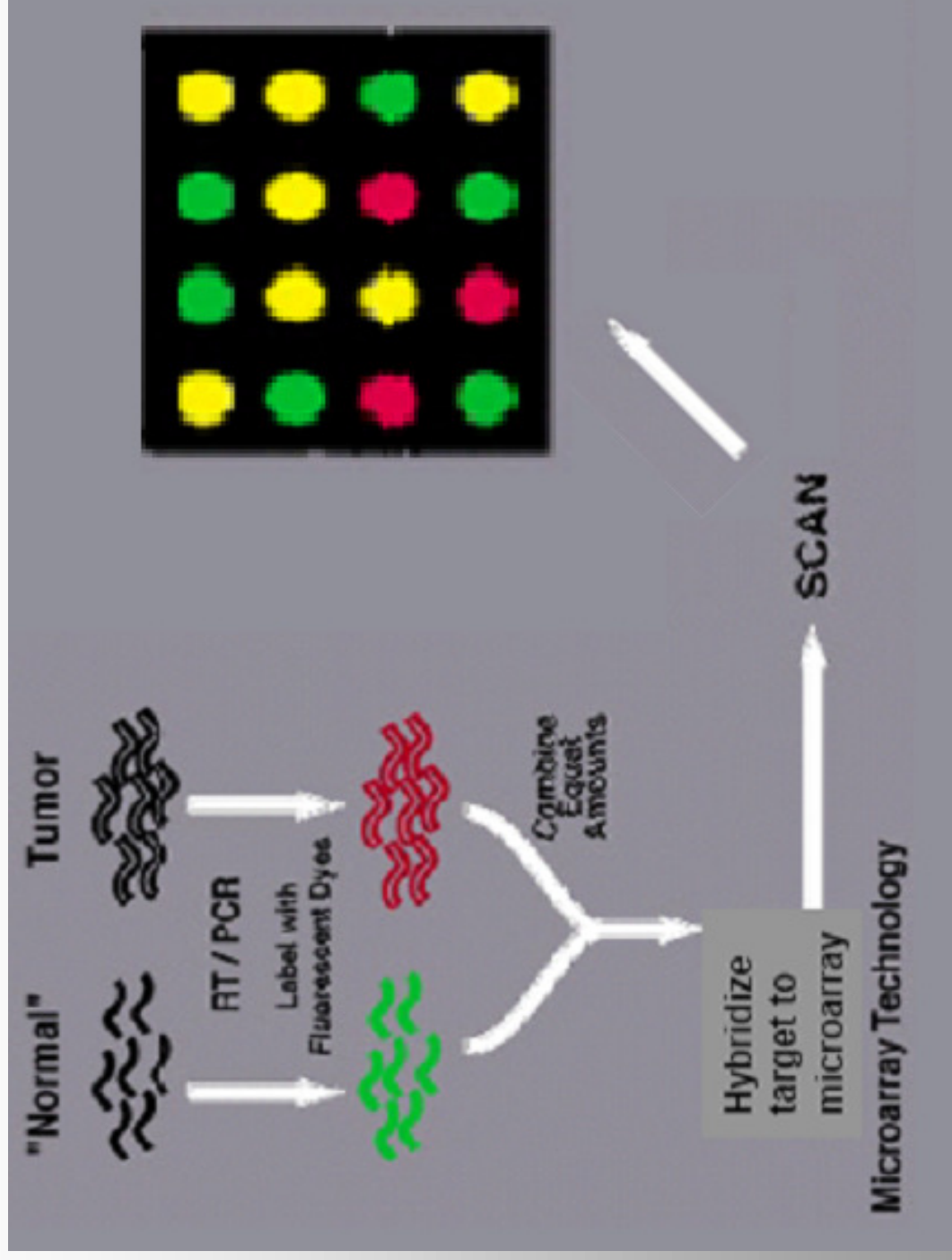


Uygulama – data analizi

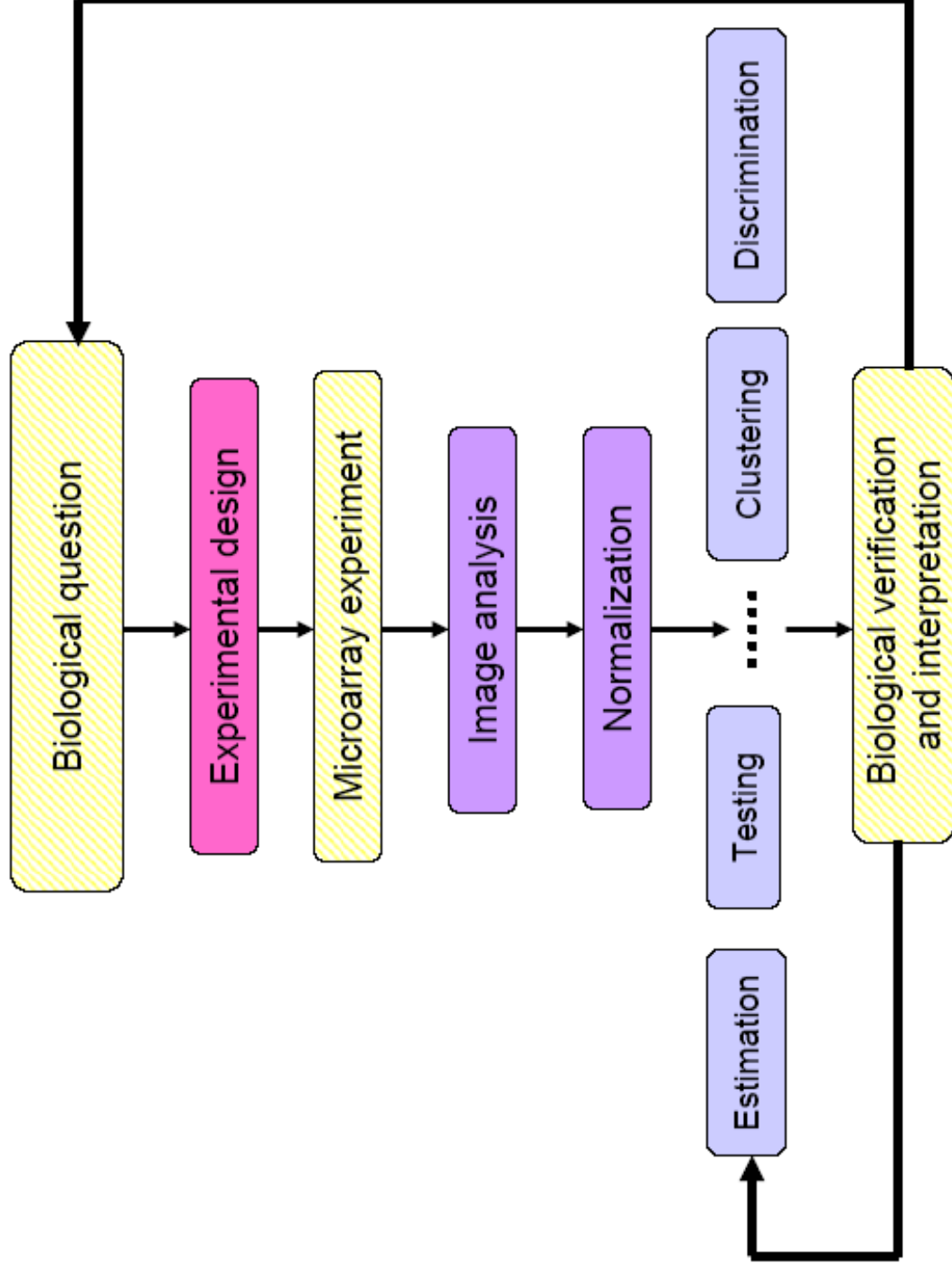
➤ *Her spotta kayıt edilen kırmızı ve yeşil renkteki floresan ışımanın şiddeti spotlarda yer alan genlerin bir birlerine göre olan ekspresyon seviyelerini belirler.*

- Eğer spot yeşil gözüküyorsa bu renkle işaretlenen örnekte söz konusu gen diğer örneğe göre fazla eksprese ediliyor demektir.
- Spotun kırmızı renkte gözlenmesi ise kırmızı ile işaretlenen örnekte bu genin diğer örneğe göre daha fazla eksprese ediliyor anlamına gelir.
- Eğer spot sarı görünüyorsa ise, söz konusu gen ya da transkript karşılaştırılan her iki örnekte de eşit ifade ediliyor anlamına gelir.

Uygulama – data analizi

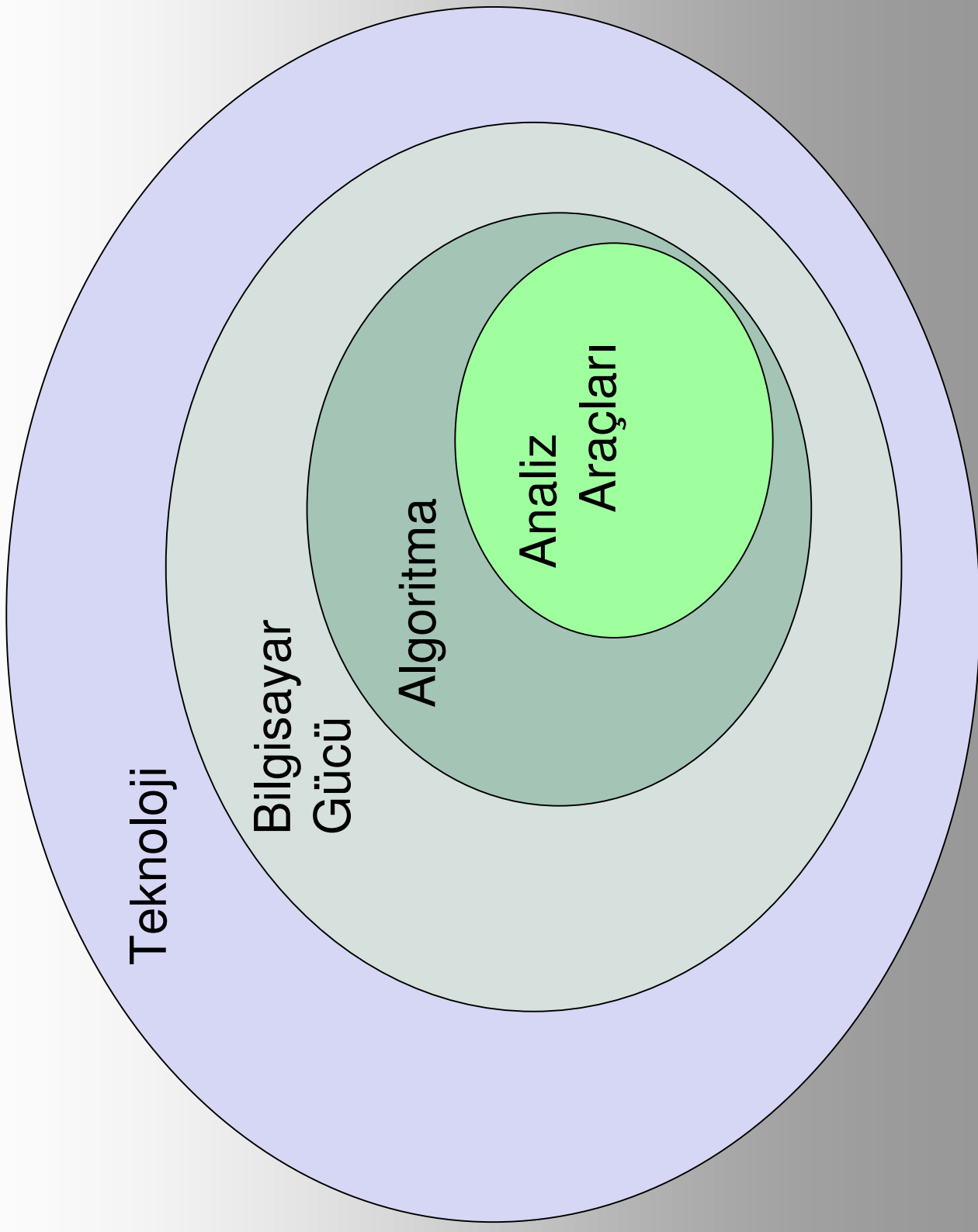


Uygulama – istatistik ve mikroarray



Kaynak: Bioconductor short course. Dudoit, S., Gentleman R., Irizarry R., Yang HY

Mikroarray Biyoinformatiđi



Mikroarray - avantajlar

- Aynı anda binlerce genin ekspresyonu hakkında bilgi verir.
- Binlerce nokta kullanılarak tüm genom taraması ile detaylı bir genotiplendirme imkanı sunar.
- Amaca yönelik olarak farklı dizayn edilebilir.
- Laboratuvar aşamaları kolay ve hızlıdır.
- Teknolojisi ile gelişimini sağladığı biyoinformatik analiz yöntemlerini kullanarak oldukça fazla miktardaki verileri hızlı ve farklı şekillerde analiz edebilir.

Mikroarray – önemli noktalar

- Proben seçilmesi ve hedefin hazırlanması
- Spotlamanın düzgün yapılması
- Yüksek kalite ve saflıkta RNA izolasyonu
- Kaliteli ve sabit işaretleme verimliliği
- Housekeeping genler ile normalizasyona gidilmesi
- Yeteri kadar tekrar kullanılması

Mikroarray – rnek alıřma

Konu: Obezite gibi kompleks özellik gösteren metabolik bir hastalığın genetik temellerinin daha iyi anlaşılmasının sağlanması.

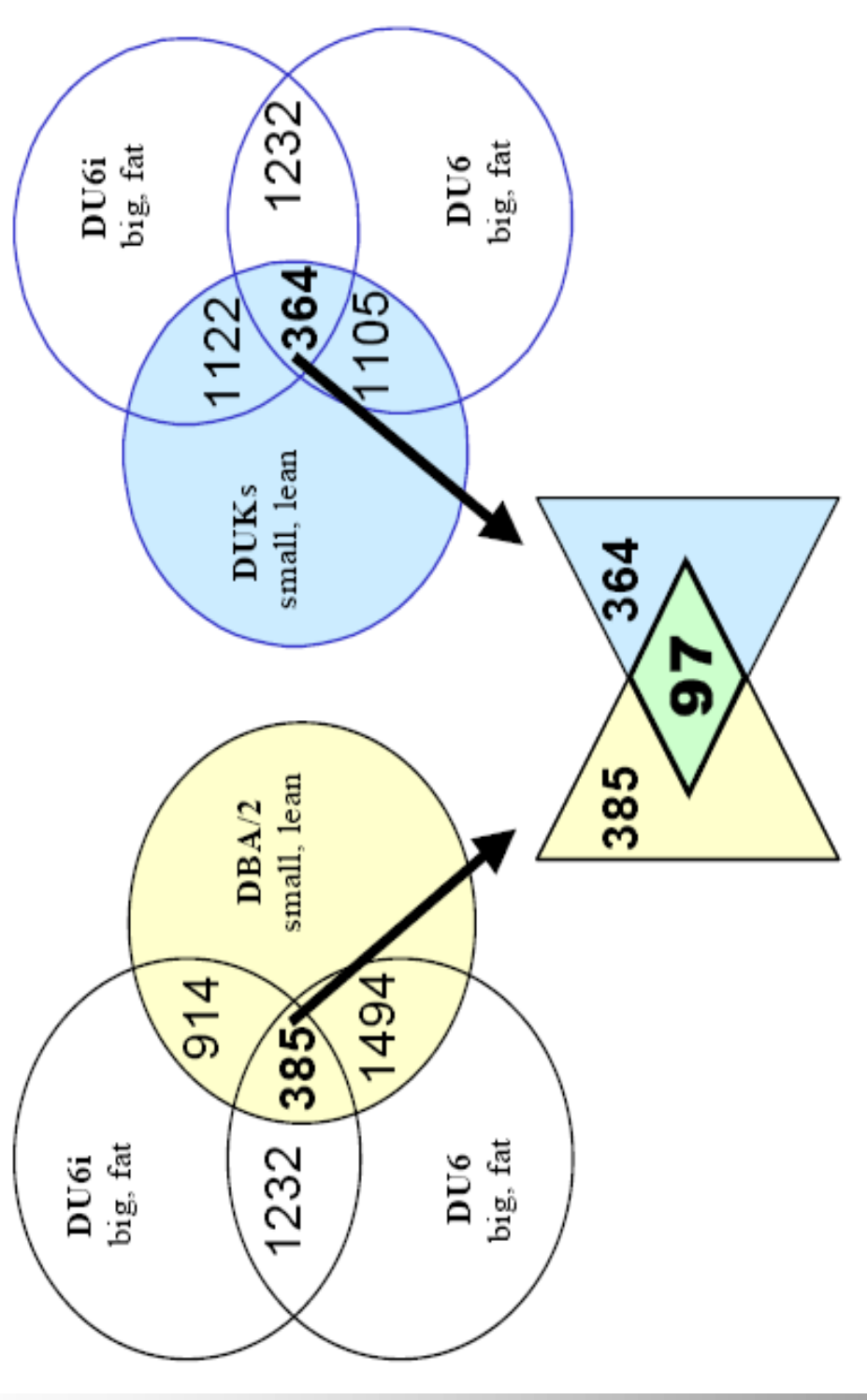
Amaç: Ekspresyon farklılığına dayalı olarak obezite tablosunun ortaya çıkmasına katkıda bulunan aday genlerin tespit edilmesi.

Mikroarrey – örnekleme çalışması

Uygulama: DNA Mikroarrey GenÇip teknolojisi:
Mu11KsubA ve subB (11000 gen olmak üzere toplam
13000 probe)

Sonuç: Obez ve normal fareler arasında anlamlı
derecede ekspresyonları farklılık gösteren genlerin
belirlenmesi.

Mikroarray – örnek çalışma



Soner Aksu, Dirk Koczan, Ulla Renne, Hans-Jürgen Thiesen, Gudrun A. Brockmann. Differentially expressed genes in adipose tissues of high body weight-selected (obese) and unselected (lean) mouse lines. Journal of Applied Genetics 48(2): 133-143, 2007.

Teşekkürler

