

# Определение биомаркеров

Мультиплексные системы  
определения биомаркеров  
(микроэррей-биочипы)

Единичные  
биомаркеры



# Микрочипы

1.

ДНК

2. Белки (пептиды)

3. Органические молекулы

# Технология чипов

## Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)

Polony  
sequencing

SOLiD sequencing

454 pyrosequencing

Microscopy-based techniques

**Microfluidic Sanger s  
equencing**

Illumina (Solexa)  
sequencing

*Sequencing with mass spectrometry*

RNAP sequencing

***In vitro virus high-throughput  
sequencing***

Sequencing by hybridization

Ion semiconductor sequencing

DNA nanoball sequencing

Helicos single molecule sequencing

Single molecule real time (SMRT) sequencing

Nanopore DNA sequencing

# Illumina (Solexa) sequencing

**Transposase** is an [enzyme](#) is an enzyme that binds to the end of a [transposon](#) is an enzyme that binds to the end of a transposon and catalyzes the movement of the [transposon](#) to another part of the genome by a cut and paste mechanism or a replicative transposition mechanism.

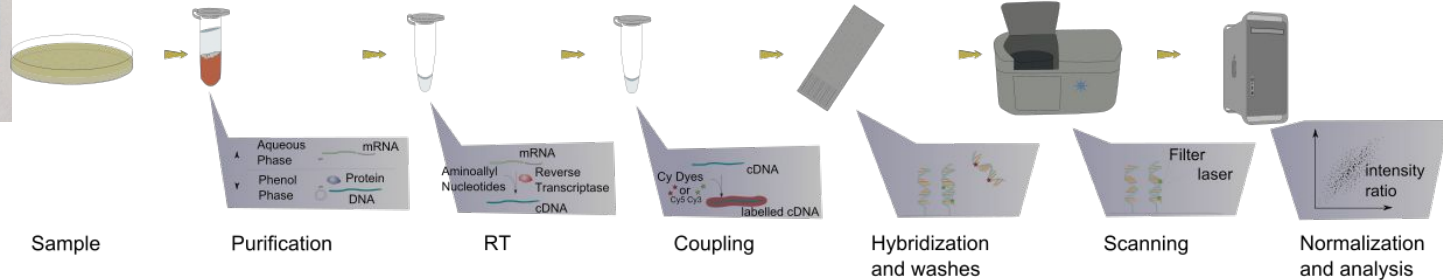
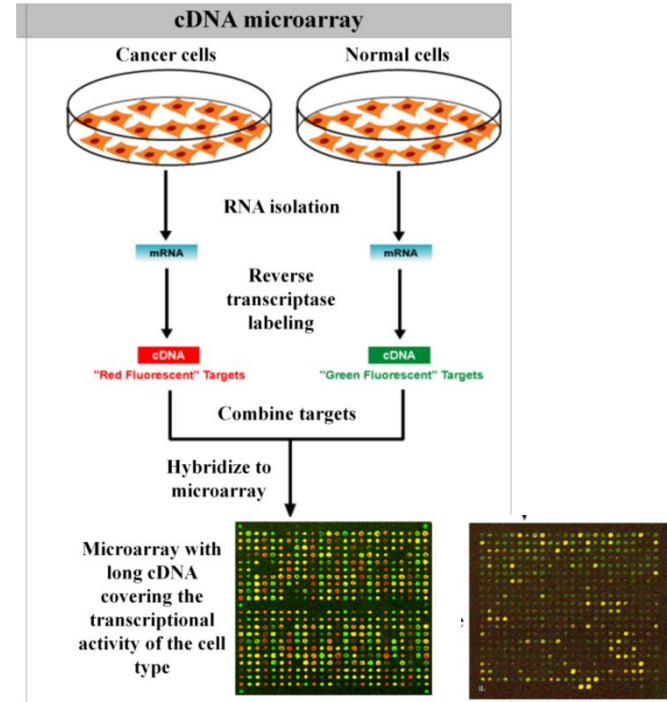
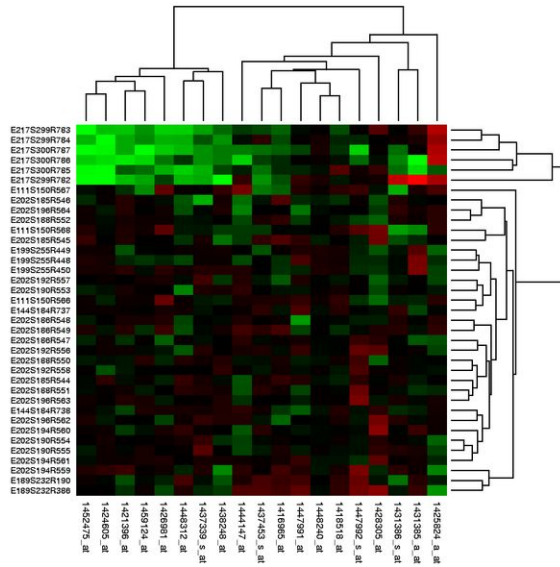
# Helicos single molecule sequencing



- **DNA microarray** (also commonly known as DNA (also commonly known as DNA chip or biochip) is a collection of microscopic DNA spots attached to a solid surface.



# [http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_microarray](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray)







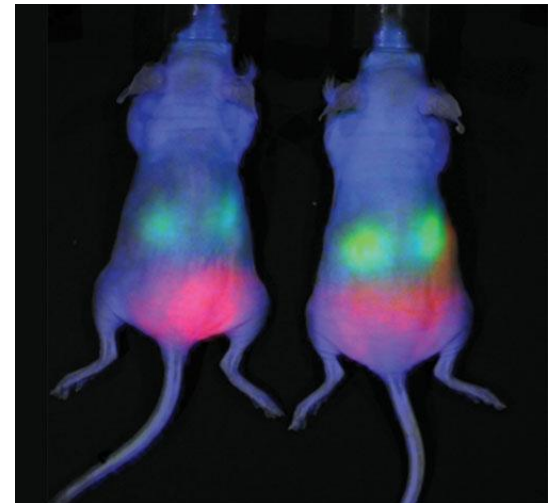
- Each **DNA spot contains picomoles** (10–12 moles) of a specific DNA sequence, known as probes (or reporters or oligos). These can be a short section of a gene or other DNA element that are used to **hybridize** a cDNA or cRNA (also called anti-sense RNA) sample (called target) under high-stringency conditions. Probe-target hybridization is usually detected and quantified by detection of **fluorophore-, silver-, or chemiluminescence**-labeled targets to determine relative abundance of nucleic acid sequences in the target.

- Microarray technology evolved from **Southern blotting**



- In standard microarrays, the probes are synthesized and then attached via surface engineering to a solid surface by a covalent bond to a chemical matrix (via epoxy-silane, amino-silane, lysine, polyacrylamide or others). The solid surface can be glass or a silicon chip, in which case they are colloquially known as an Affy chip when an Affymetrix chip is used. Other microarray platforms, such as Illumina, use microscopic beads, instead of the large solid support. Alternatively, microarrays can be constructed by the direct synthesis of oligonucleotide probes on solid surfaces. DNA arrays are different from other types of microarray only in that they either measure DNA or use DNA as part of its detection system.
- The traditional solid-phase array is a collection of orderly microscopic "spots", called features, each with thousands of identical and specific probes attached to a solid surface, such as glass, plastic or silicon biochip (commonly known as a genome chip, DNA chip or gene array). Thousands of these features can be placed in known locations on a single DNA microarray.
- The alternative bead array is a collection of microscopic polystyrene beads, each with a specific probe and a ratio of two or more dyes, which do not interfere with the fluorescent dyes used on the target sequence.

- Scientists use DNA microarrays to measure the expression levels of **large numbers of genes simultaneously** (tens of thousands of probes) or to **genotype multiple regions of a genome** (many genetic tests in parallel).



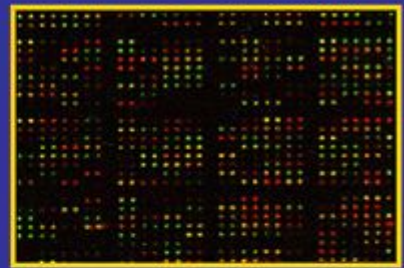
- Gen
- Con
- Gen
- Chro
- Dan
- SNP
- Alte
- Fusi
- Tiling array

# Biochip

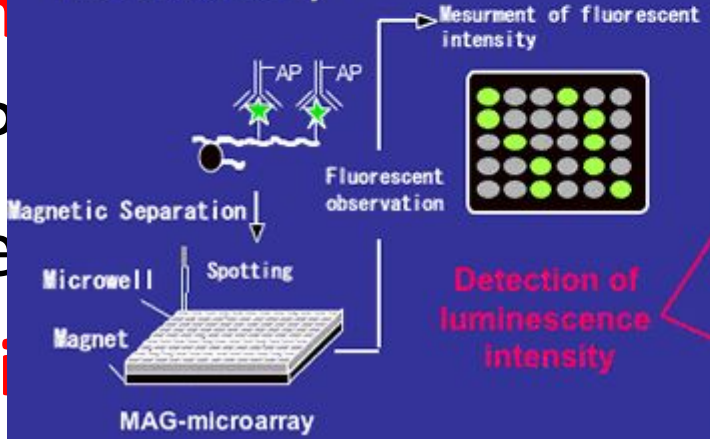
DNA chip, DNA Microarray ??

↓  
Microfabricated chip integrated and immobilized with many DNA probes

**[Application]** Genome-wide analysis  
Detection of specific DNA or SNPs



In our Laboratory . . .



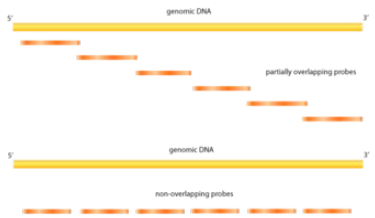
Flora analysis of cyanobacteria

Microcystis

Spirulina

Anabaena

Tuna species specific identification



# Sets of genes that are active in a variety of tumors.

- the data, which came from 26 cancer studies published in prominent journals and includes a total of 14,000 genes and 22 types of tumors.

# Sets of genes that are active in a variety of tumors.

- Using a new online cancer database, scientists have sifted through genetic information about some 3,000 tumors and identified a group of genes that are altered in most if not all cancers.
- The 67 genes are either more or less active in cancer cells than they are in healthy cells. For scientists, the genes are a resource for developing diagnostic tests and therapies that target these genes.
- In addition, the researchers identified 69 genes that are altered in aggressive cancers, including some genes from the original group.

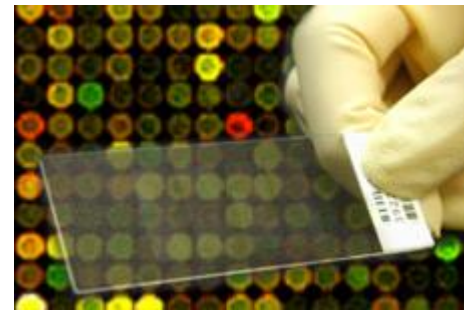
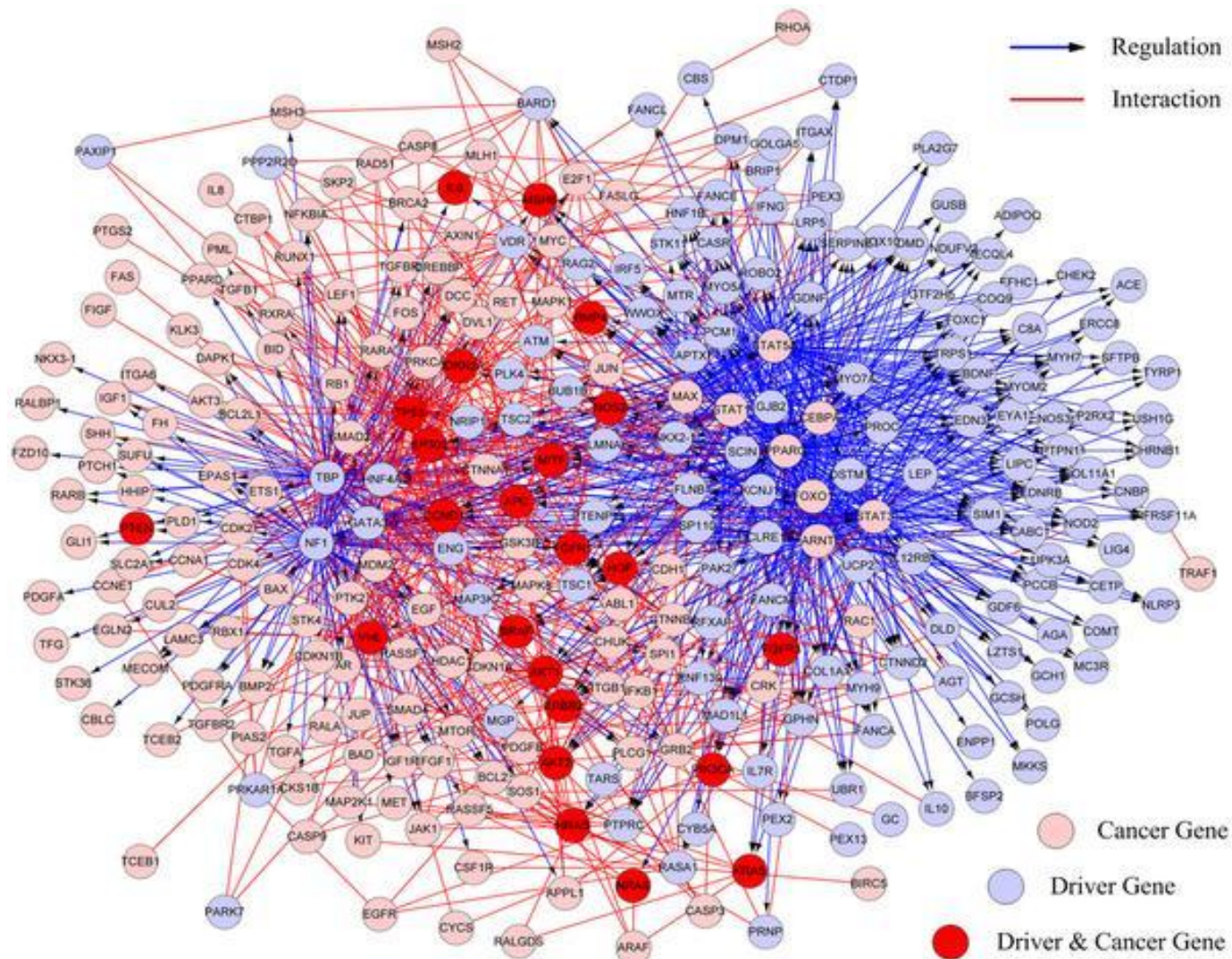


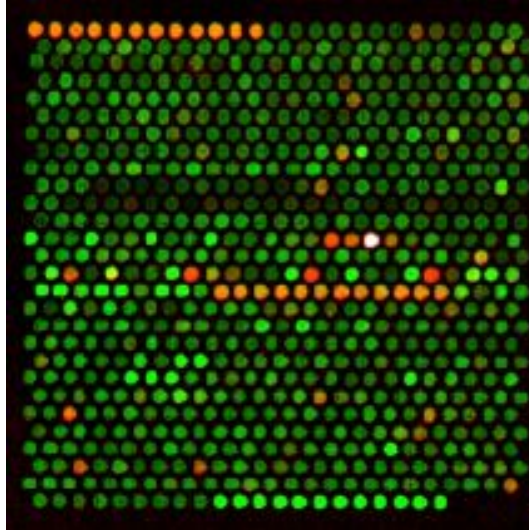
Figure 5: Correlations among known cancer genes and predicted driver genes.



Total **717** regulatory connections existed among 163 known cancer genes and 164 predicted driver genes were extracted from the DAVID database. The graph was drawn by using Cytoscape software. Among 163 known cancer genes, 23 genes are predicted as driver genes (red).

Identifying potential cancer driver genes by genomic data integration. Yong Chen, Jingjing Hao, Wei Jiang, Tong He, Xuegong Zhang, Tao Jiang & Rui Jiang. **2013**. Nature. 3:3538.





## ViroChip (2004)

Чип для определения вирусов.  
На чип нанесены ДНК 22 000  
известных вирусов

# Микрочипы

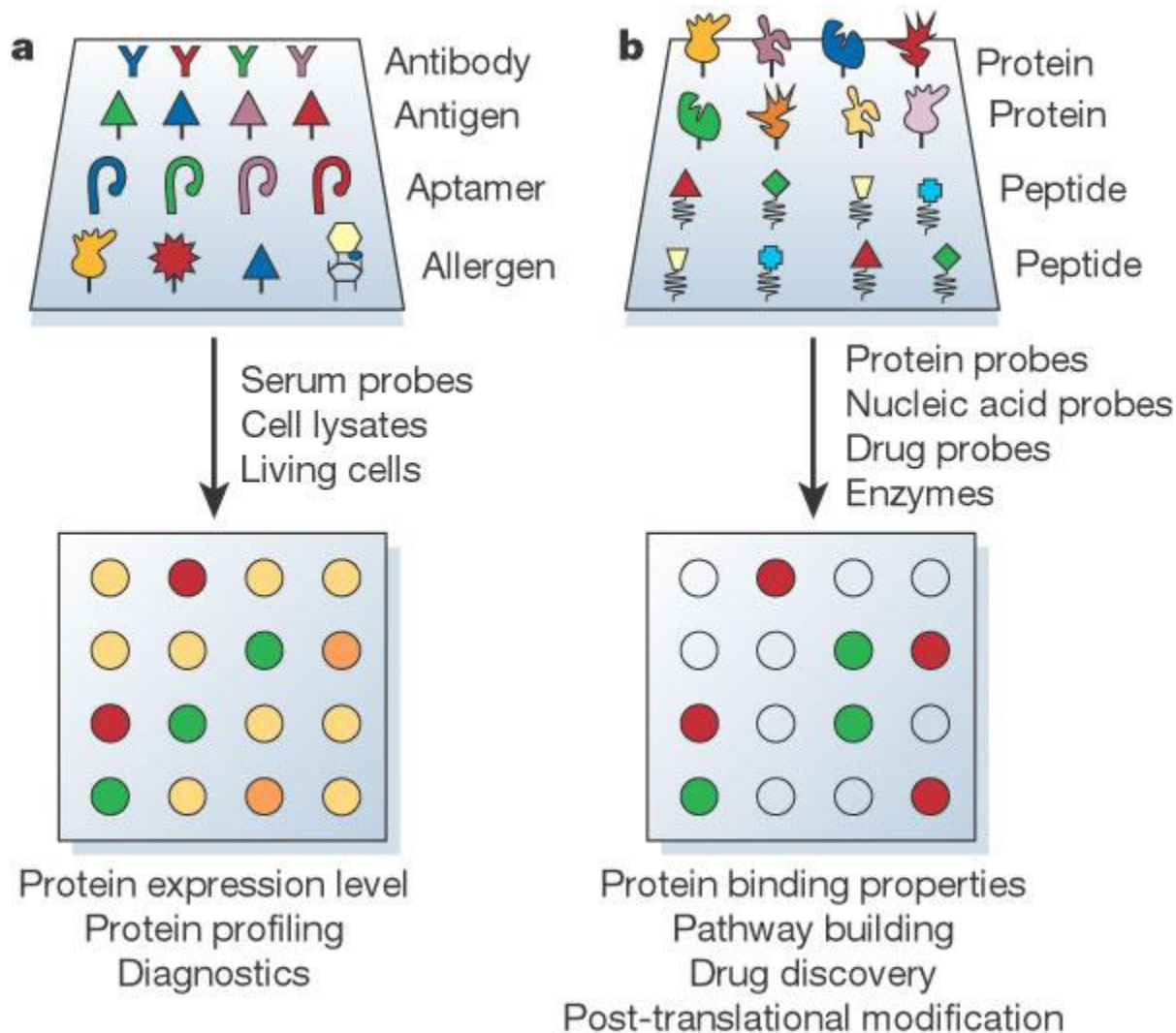
1.

ДНК

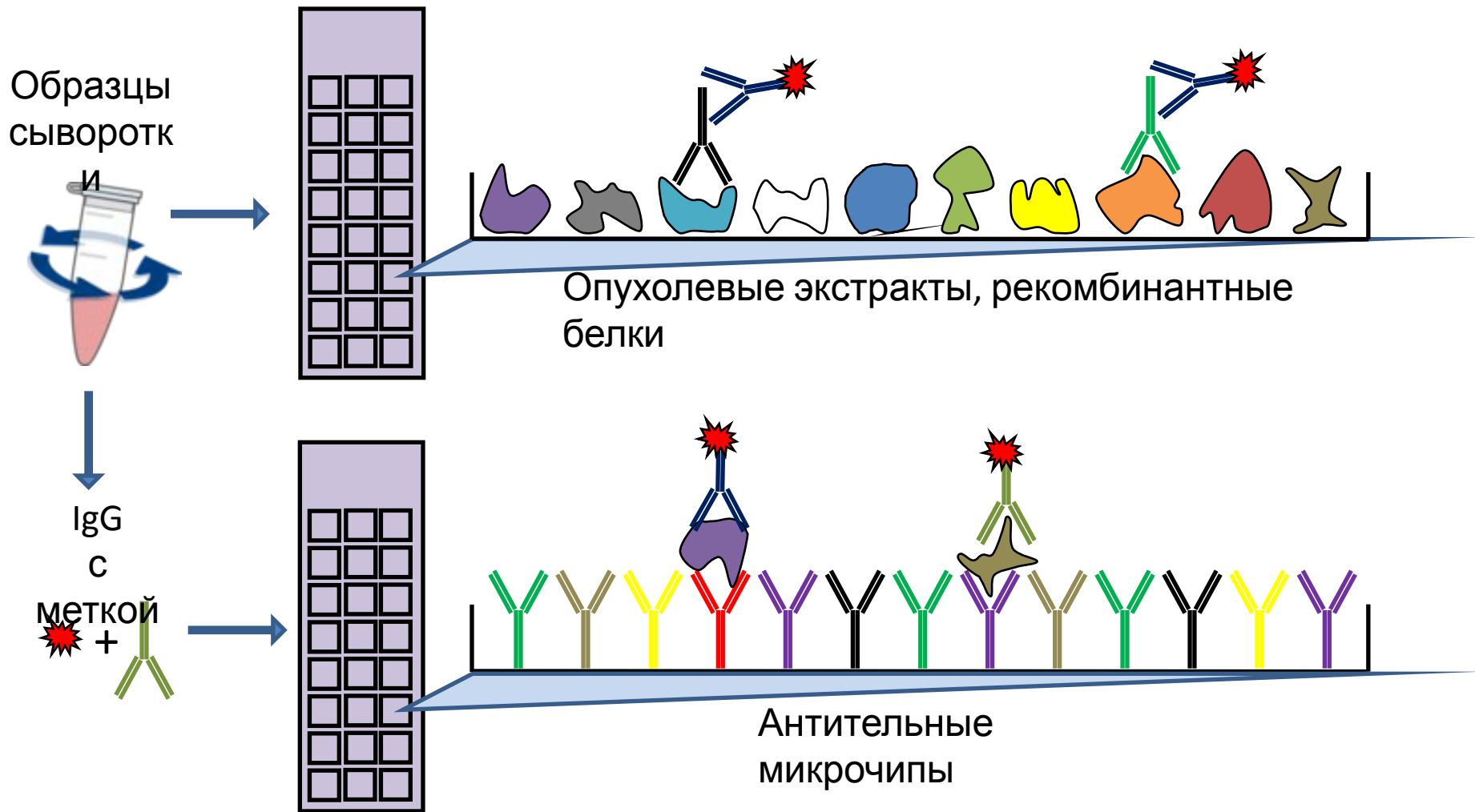
2. Белки (пептиды)

3. Органические молекулы

# Белковые микрочипы



# Белковые микрочипы



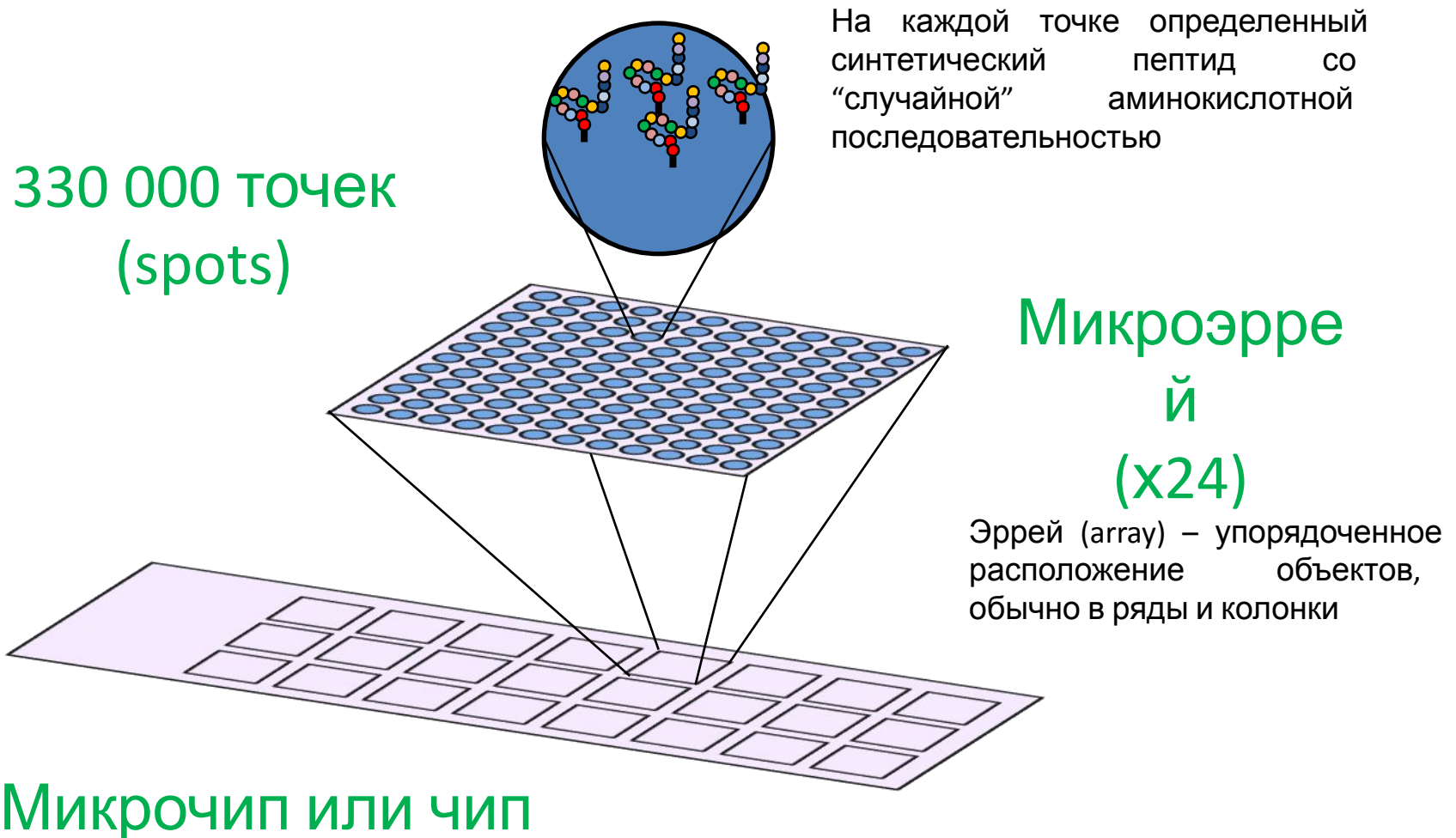
# Недостатки методов определения аутоантител

- Низкая возможность автоматизации
- Значительная трудоемкость
- Высокая стоимость
- Ограниченные/закрытые системы  
(использование хорошо изученных  
антигенов и антител)

# Иммуносигнатура

- Микрочип (микроэррей) с **синтетическими пептидами**
- Микроэррей = автоматизция = снижение стоимости
- Высокая воспроизводимость результатов
- Гибкая/открытая система (оценка не известных опухолевых антигенов)

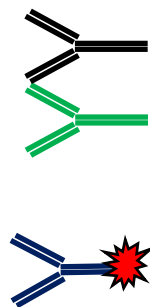
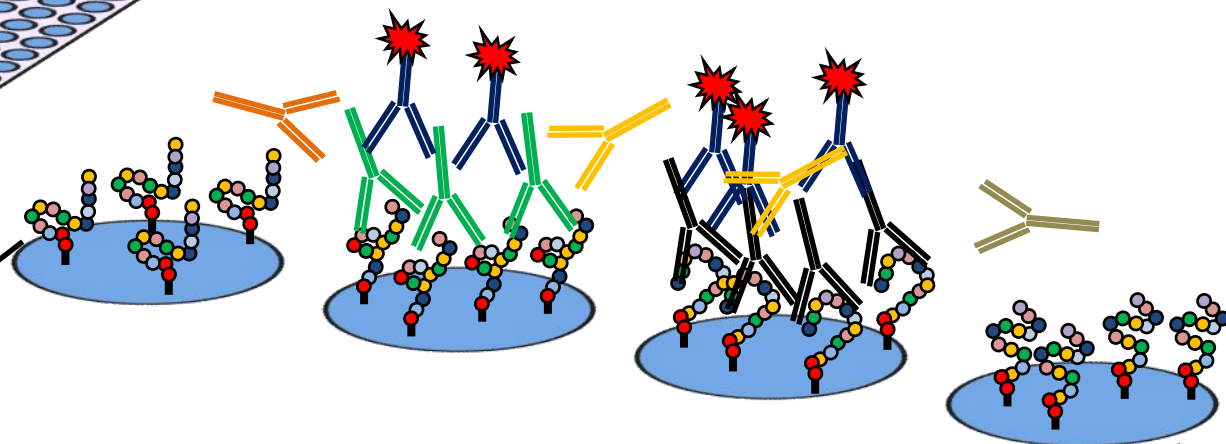
# Очень краткий иллюстрированный словарь микрочипового жаргона



# Чип

24  
микроэррей

330 000 точек  
(spots)



Антитела из сыворотки  
связывающиеся с  
пептидами  
Вторичные антитела с  
флуоресцентной меткой  
распознающие человеческий  
IgG

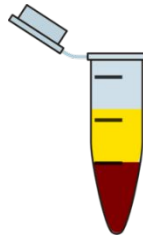


# Лабораторный протокол

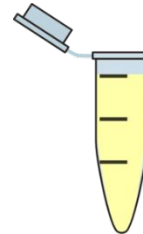
## Разработка диагностического метода по капле крови



Образцы  
крови

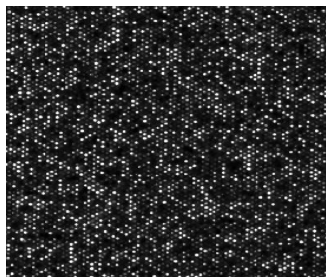


Сыворотка



Разведение (1:20)

Обработка  
микрочипа



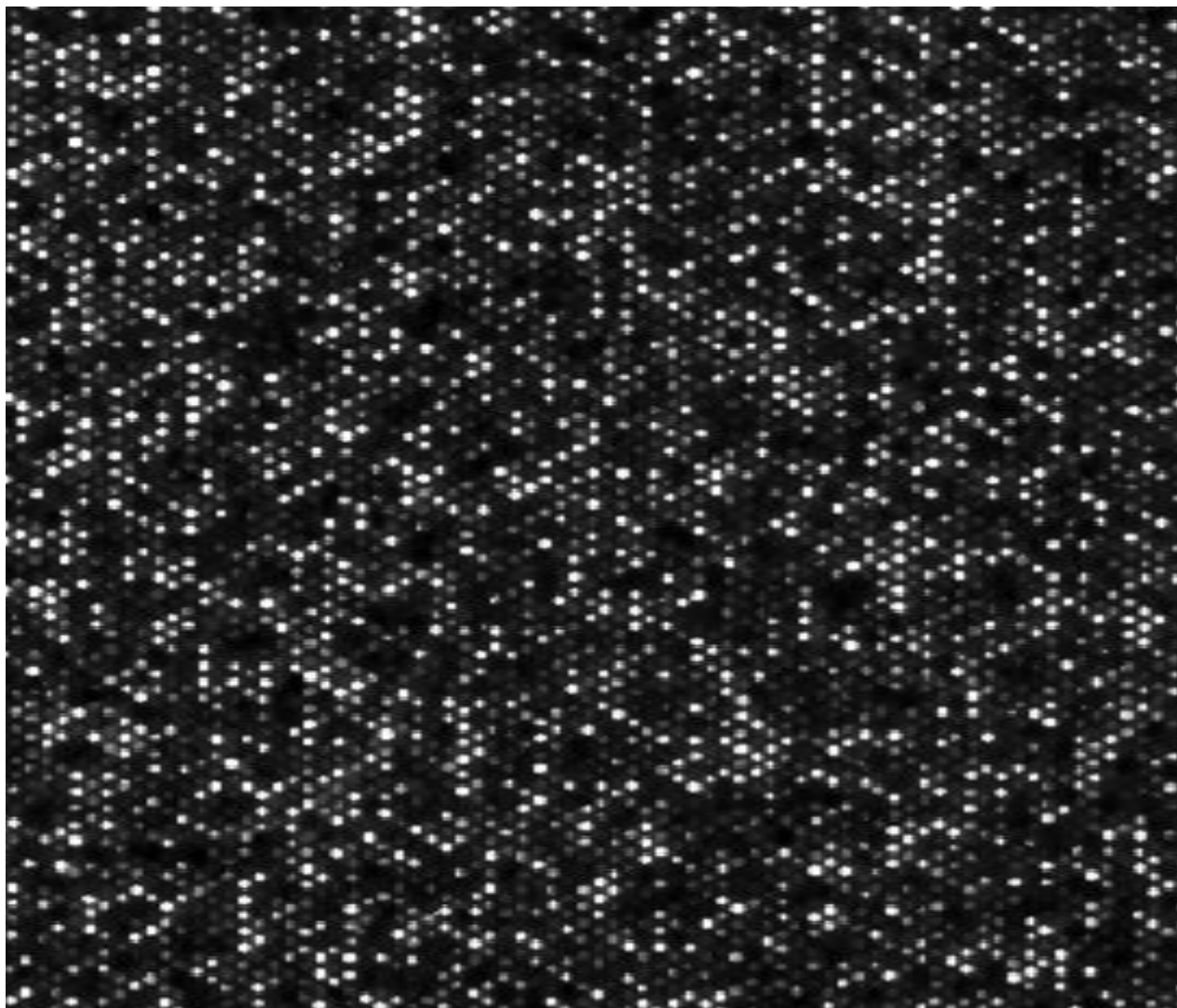
Сканирование



# Камера для работы с микрочипами 96-луночный (4x24) формат



# Сканированный микрочип

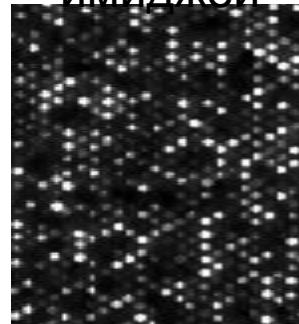


# Биоинформатика анализ иммуносигнатур

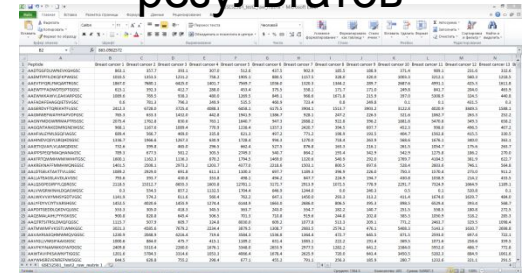
Сканирование



Анализ  
изображений

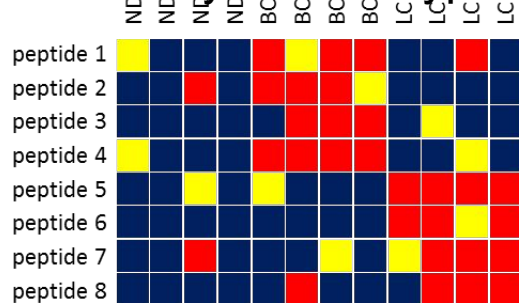


Оцифрование  
результатов



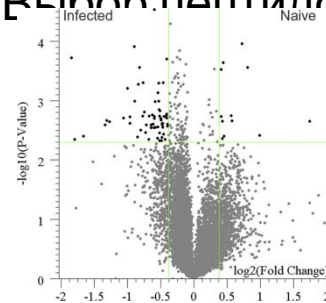
Визуализация  
результатов

ИММУНОСИГНАТУРЫ

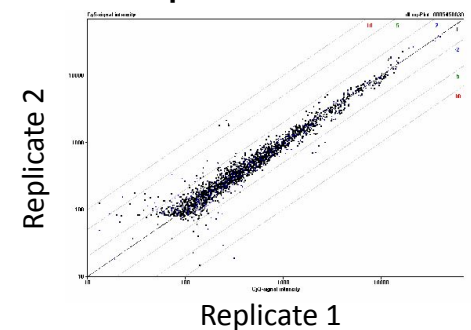


Иммуносигнатура

Выбор пептидов



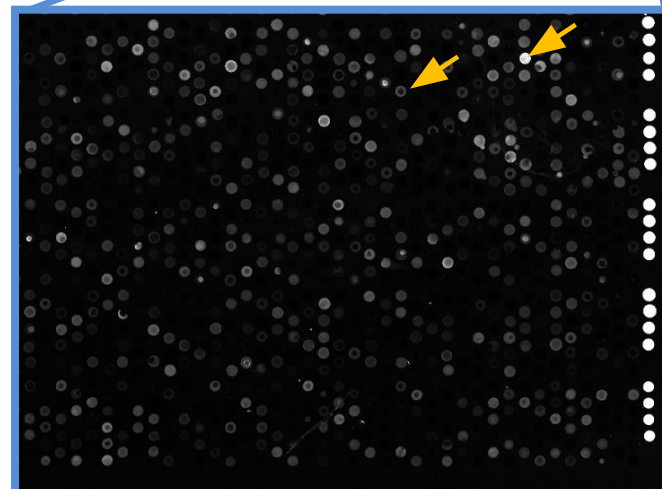
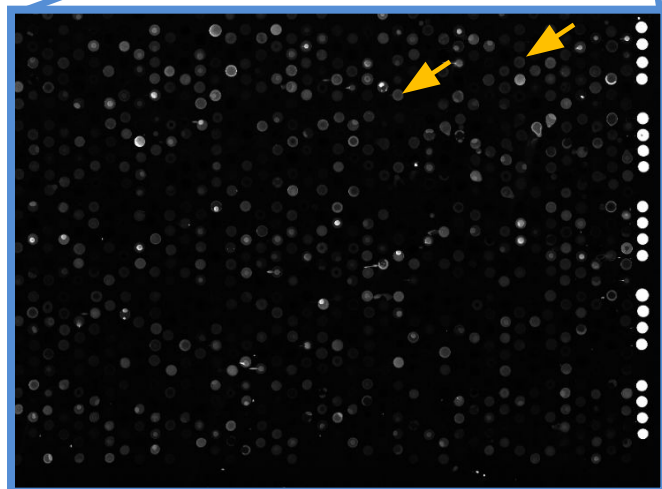
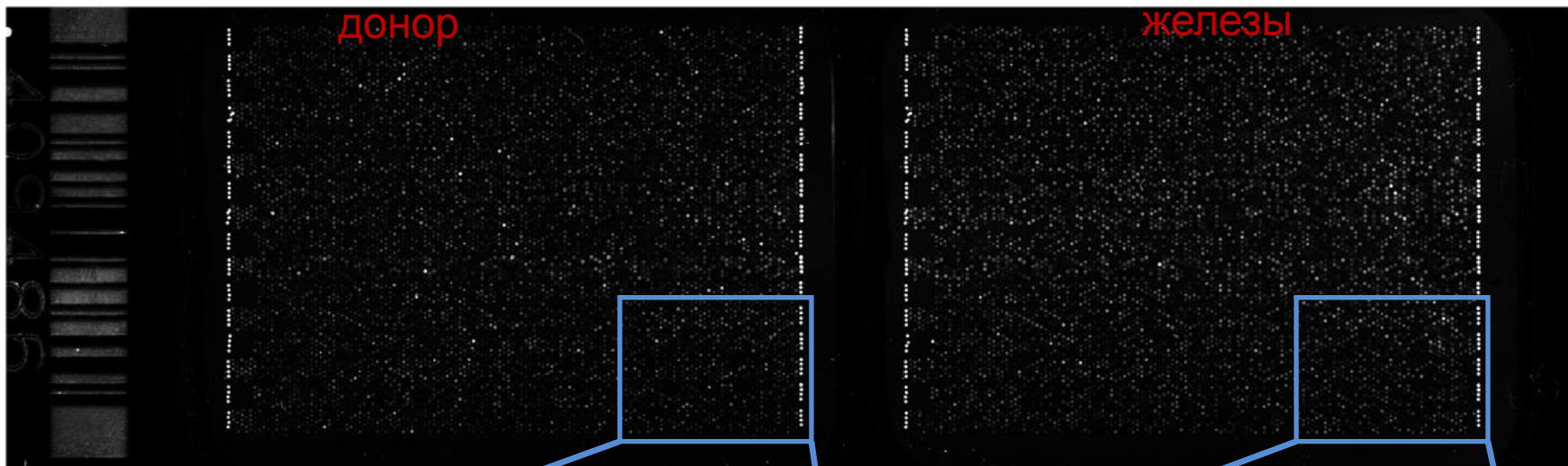
Нормализация и  
контроль качества

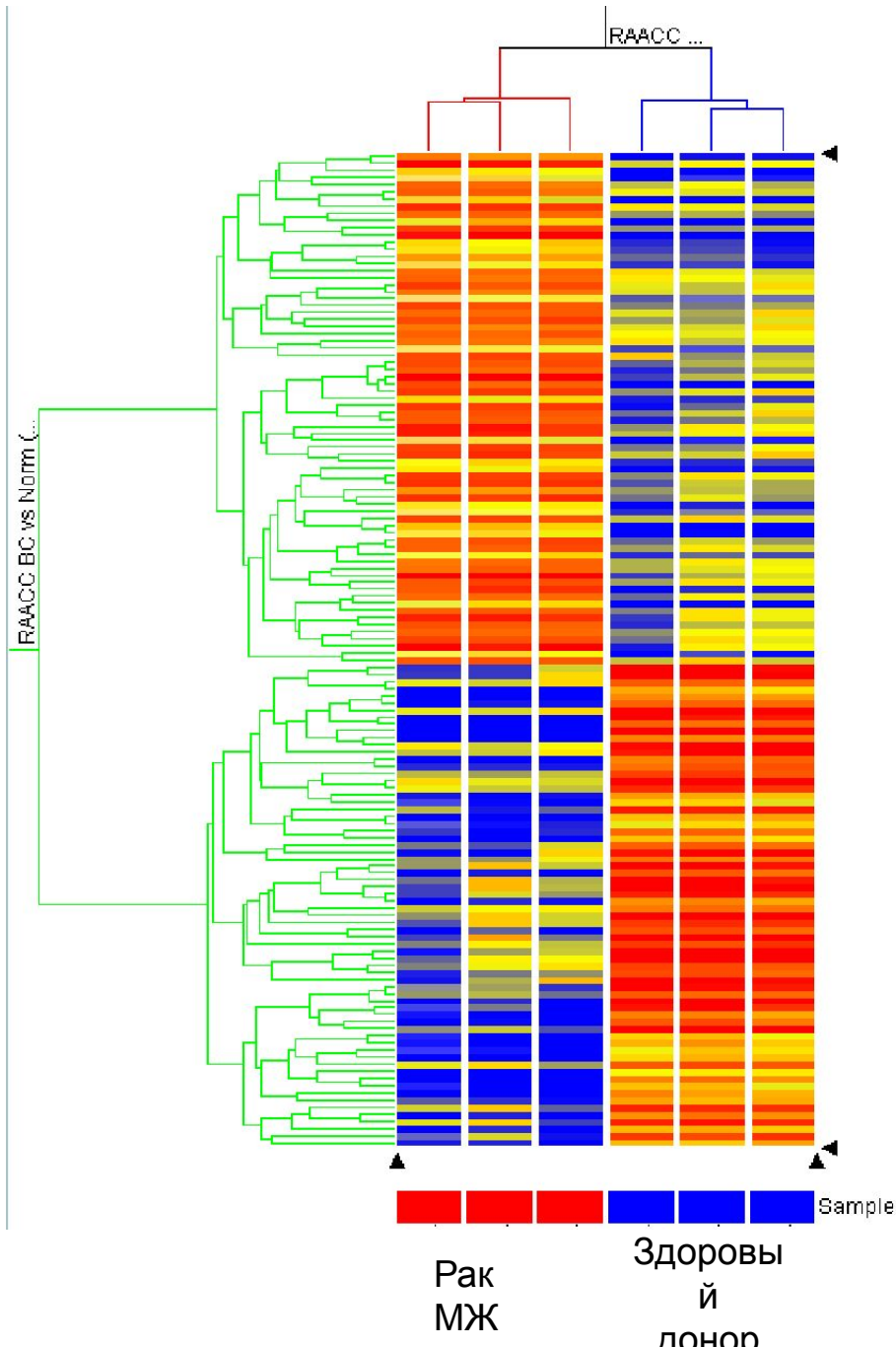


# Первый тест РАПРЦ

Здоровый  
донор

Рак молочной  
железы



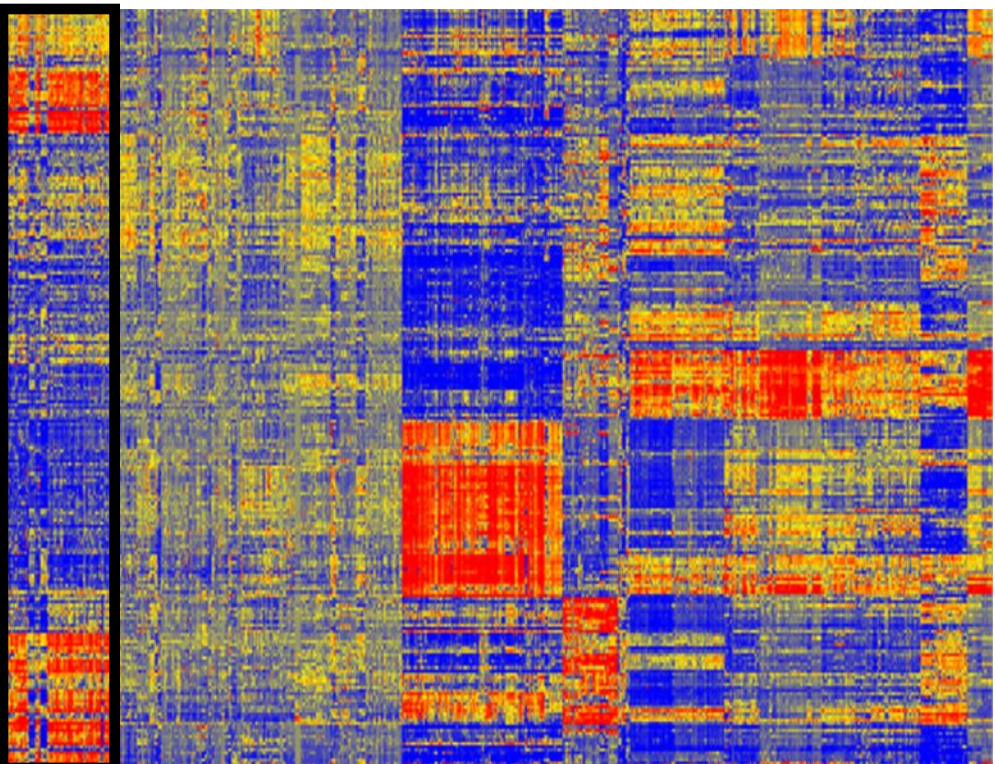


140 пептидов способны показать различия между сыворотками полученными от разных доноров.

Рак молочной железы

Здоровый донор

# Иммуносигнатуры различных заболеваний



Саркома

Рак МЖ IV  
(42)

Астроцитомы

Глиобластома  
(97)

Олиго/Астро  
(97)

Олигодендроглиома  
(48)

Рак МЖ II, III  
(141)

Доноры без  
признаков ОЗ  
(249)

Панкреатит  
(82)

Миелома  
(112)

Рак матки  
(86)

Рак легкого  
(107)

Рак  
поджелудочной  
железы (136)

Долгinnая лихорадка  
(142)

Рак МЖ  
Вторичный  
(61)

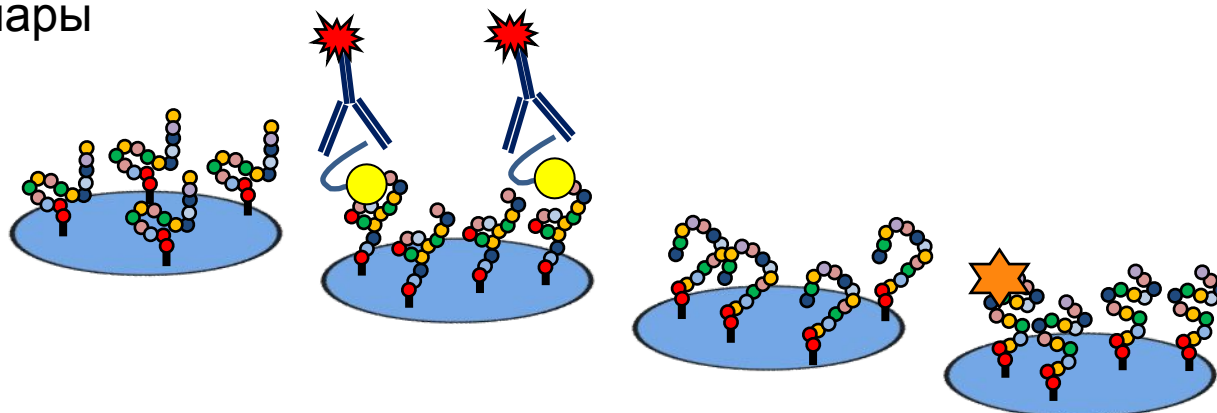
# Использование Immunosignature

- Ранняя диагностика заболеваний
  - Злокачественные новообразования
  - Инфекционные
  - Аутоиммунные
  - Аллергия (anti-IgE)
- Эффективность терапии/вакцин
- Прогноз отторжения трансплантата
- Определение опухолевых антигенов
- Определение эпитопов
- Белок-белковые взаимодействия
- Патологии беременности
- Определение пола плода на ранних стадиях
- Диагностика резус конфликта
- Допинг тестирование

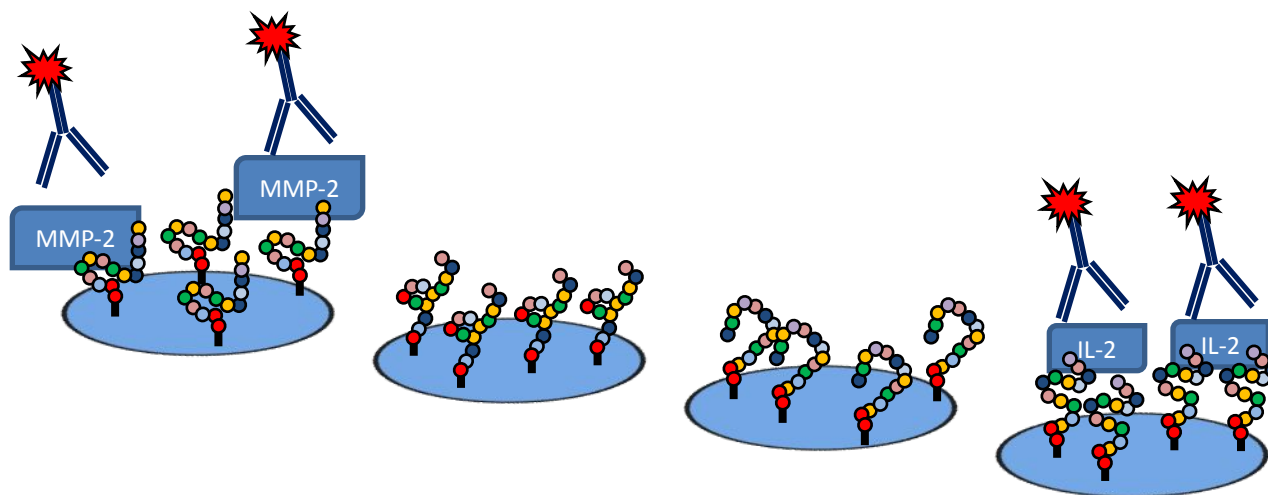


**Чипы с пептидами с известной  
аминокислотной  
последовательностью**

Белок-белковые  
взаимодействия  
Лиганд-рецептор пары  
Малые молекулы

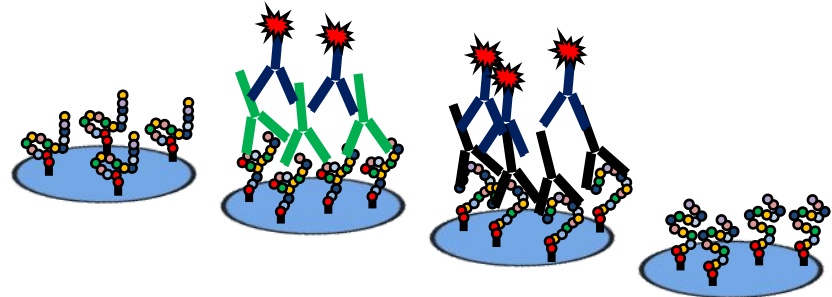


Альтернатива  
ИФА



# Определение опухолевых антигенов (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

LSQETFSNDNLWKLLPEN



## Alignments

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

cellular tumor antigen p53 isoform b [Homo sapiens]

Sequence ID: [ref|NP\\_001119586.1](#) Length: 341 Number of Matches: 1

Range 1: 14 to 29 GenPept Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
51.5 bits(114)	6e-09	16/17(94%)	16/17(94%)	1/17(5%)

```
Query 1  LSQETFSNDNLWKLLPEN 17
          LSQETFSND LWKLLPEN
Sbjct 14  LSQETFSND-LWKLLPEN 29
```

### Related Information

[Gene](#) - associated gene details  
[UniGene](#) - clustered expressed sequence tags  
[Map Viewer](#) - aligned genomic context

Download GenPept Graphics

Next Previous Descriptions

lysophosphatidic acid receptor 5 [Homo sapiens]

Sequence ID: [ref|NP\\_065133.1](#) Length: 372 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 177 to 190 GenPept Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
31.6 bits(67)	0.020	10/14(71%)	10/14(71%)	2/14(14%)

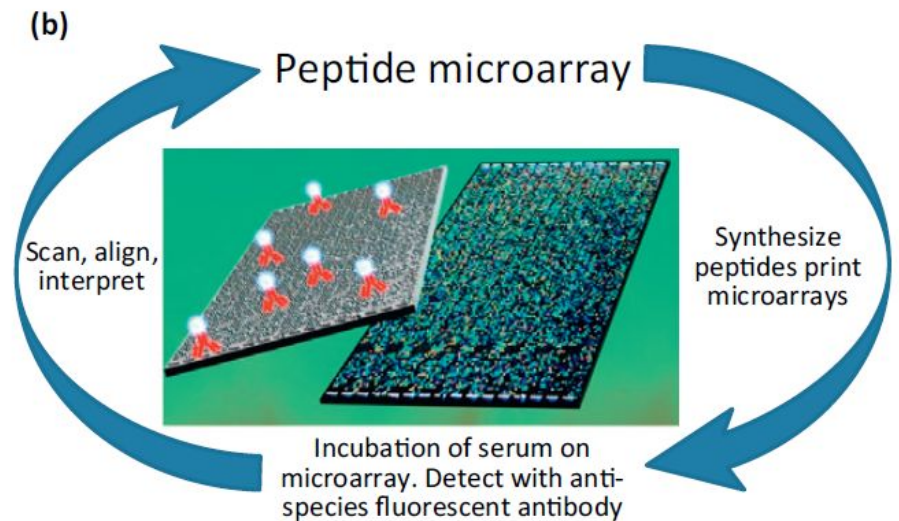
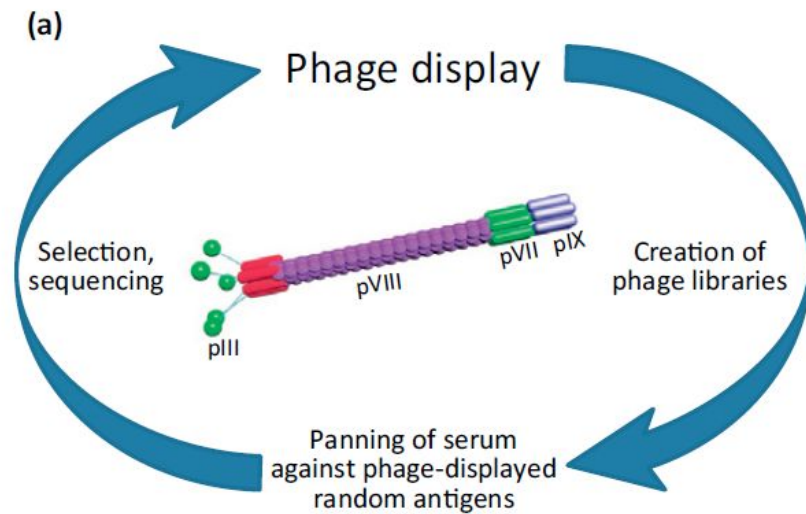
```
Query 4  ETFSDNLWK--LLP 15
          E FSD LWK LLP
Sbjct 177 ESFSDNLWKGRLLP 190
```

### Related Information

[Gene](#) - associated gene details  
[UniGene](#) - clustered expressed sequence tags  
[PubChem BioAssay](#) - bioactivity screening  
[Map Viewer](#) - aligned genomic context  
[Identical Proteins](#) - Proteins identical to the subject

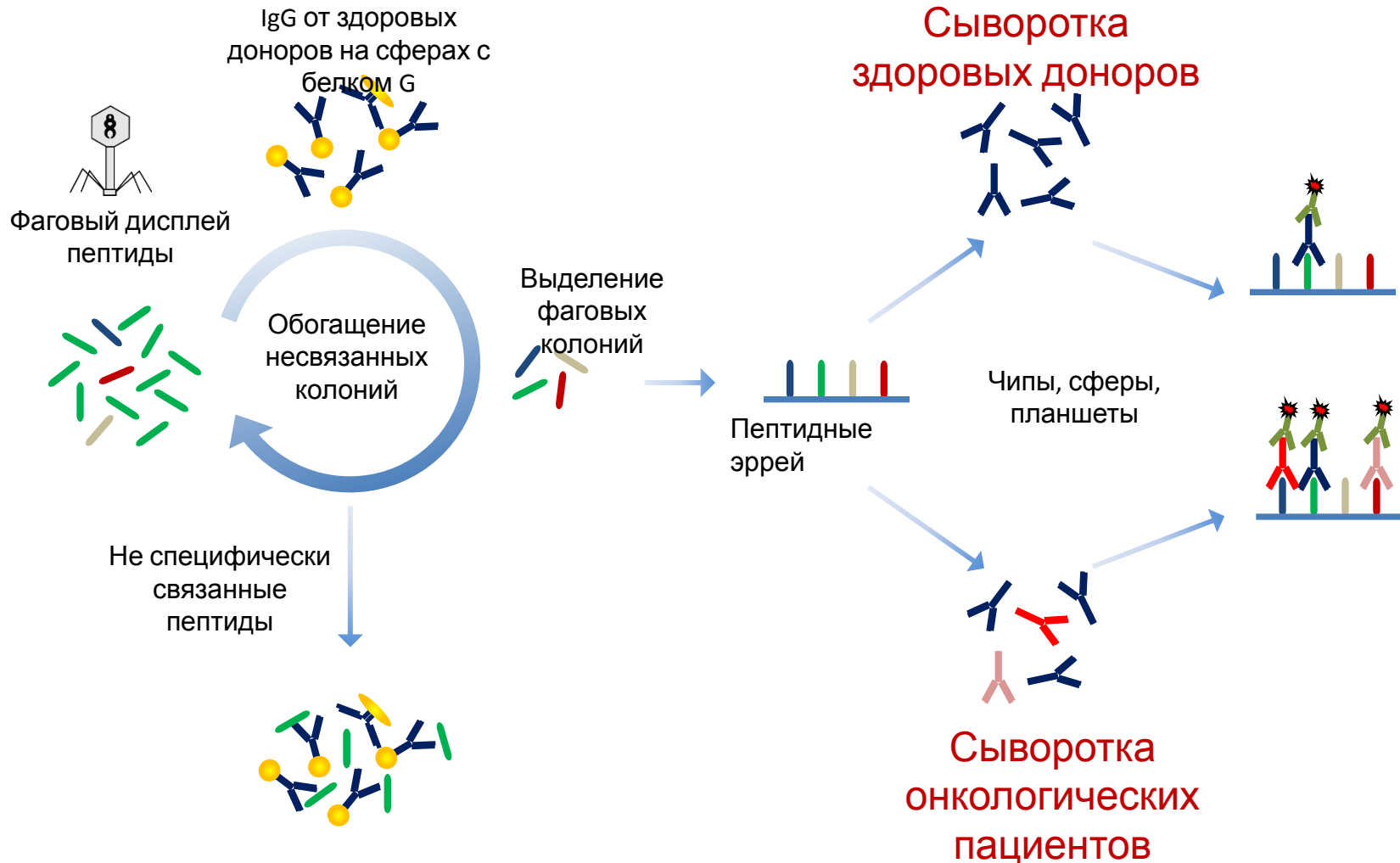
Рак кишечника и  
мелко клеточная  
карцинома

# Фаговый дисплей и Immunosignature



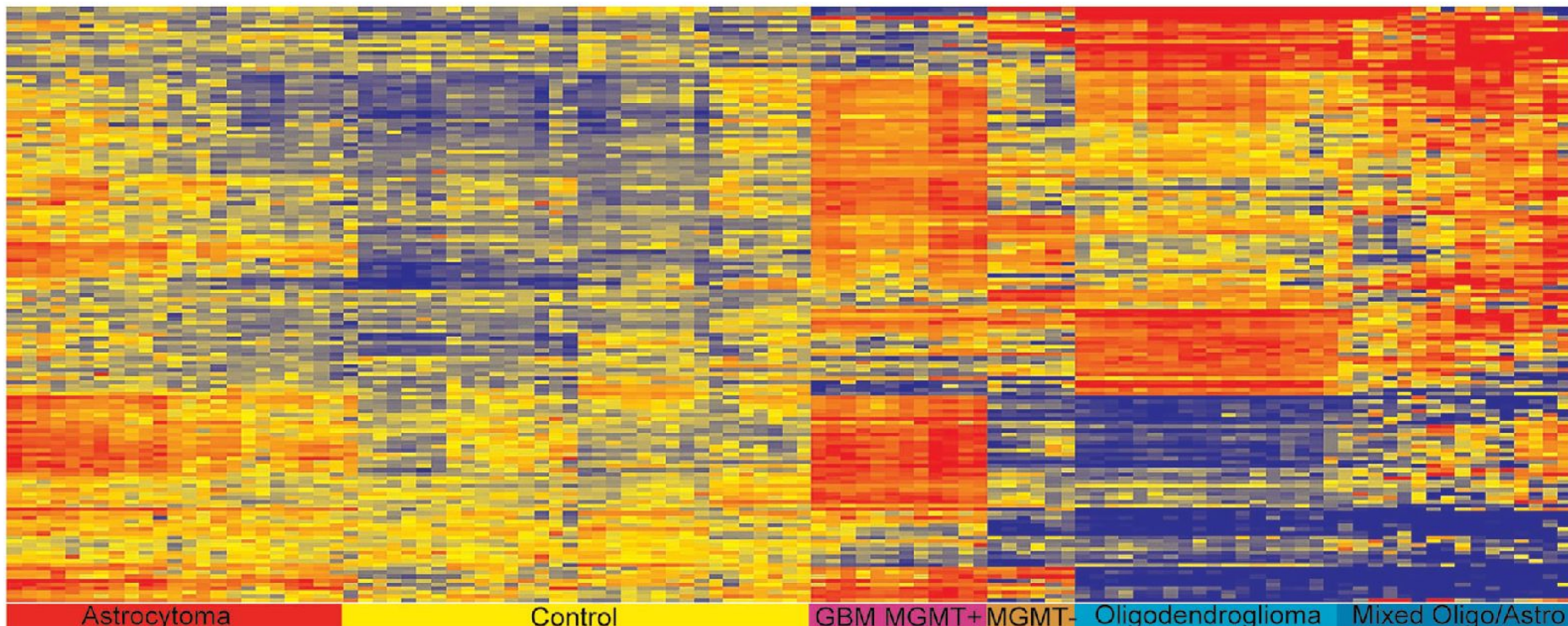
*TRENDS in Biotechnology*

# Использование фагового дисплея для Immunosignature



# Иммуносигнатура и молекулярная сигнатура

100 наиболее информативных пептидов выявлены используя ANOVA.



Astrocytoma

Control

GBM MGMT+ MGMT-

Oligodendroglioma

Mixed Oligo/Astro

Астроцитомы  
(23)

Здоровые доноры  
(34)

Мультиформная  
глиобластома  
MGMT промотор  
метилирование  
+ (16) - (6)

Олигодендроглиомы  
(18)

Олиго/Астро  
(16)

# Микрочипы

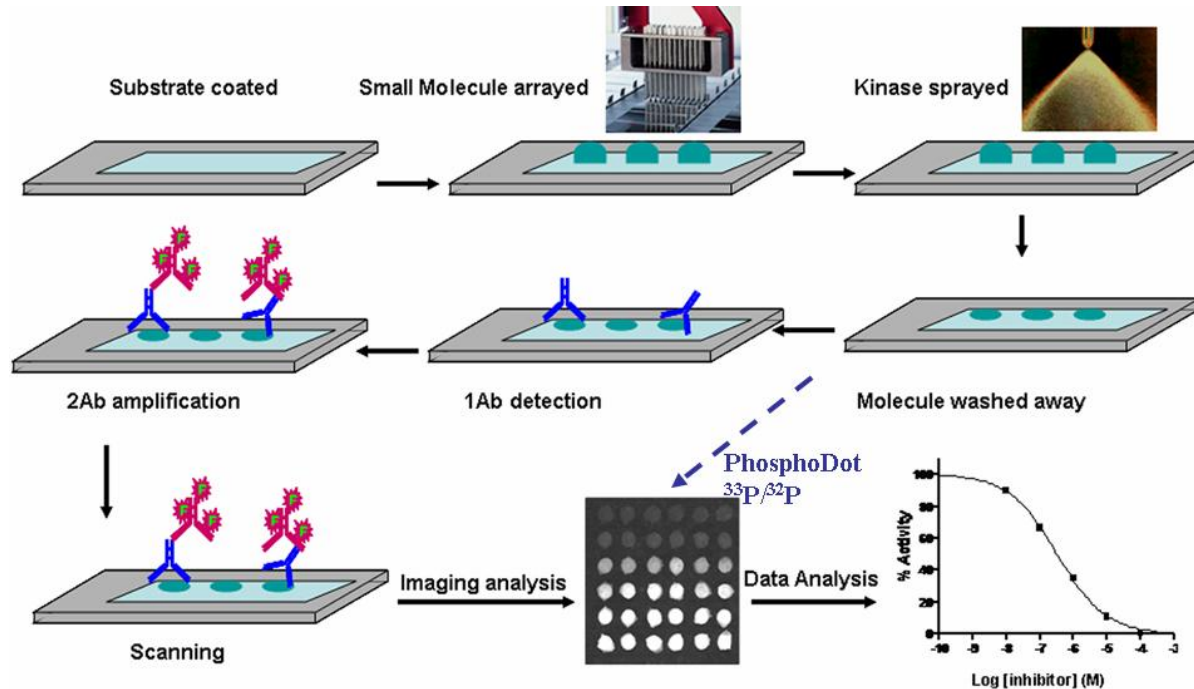
1.

ДНК

2. Белки (пептиды)

3. Органические  
молекулы

# Чипы с органическими молекулами



1. Иммобилизованные на чип
2. Не иммобилизованные на чип (сухие)
3. Не иммобилизованные (в растворе)



# Другие чипы - более “сложные” ЧИПЫ





**PerkinElmer**<sup>®</sup>  
*For the Better*

КАТАЛОГ ПРОДУКЦИИ

- Микрофлюидные автоматизированные системы LabChip.
- Мультимодальные микропланшетные ридеры.
- Микропланшетный оптический биосенсор Epic LabelFree.
- Анализаторы и реагенты для технологии ALPHA Screen.
- Автоматизированные станции пробоподготовки и роботы для молекулярно-биологических исследований.
- Системы оптического имиджинга *in vivo*.
- Системы клеточного скрининга.

# 1

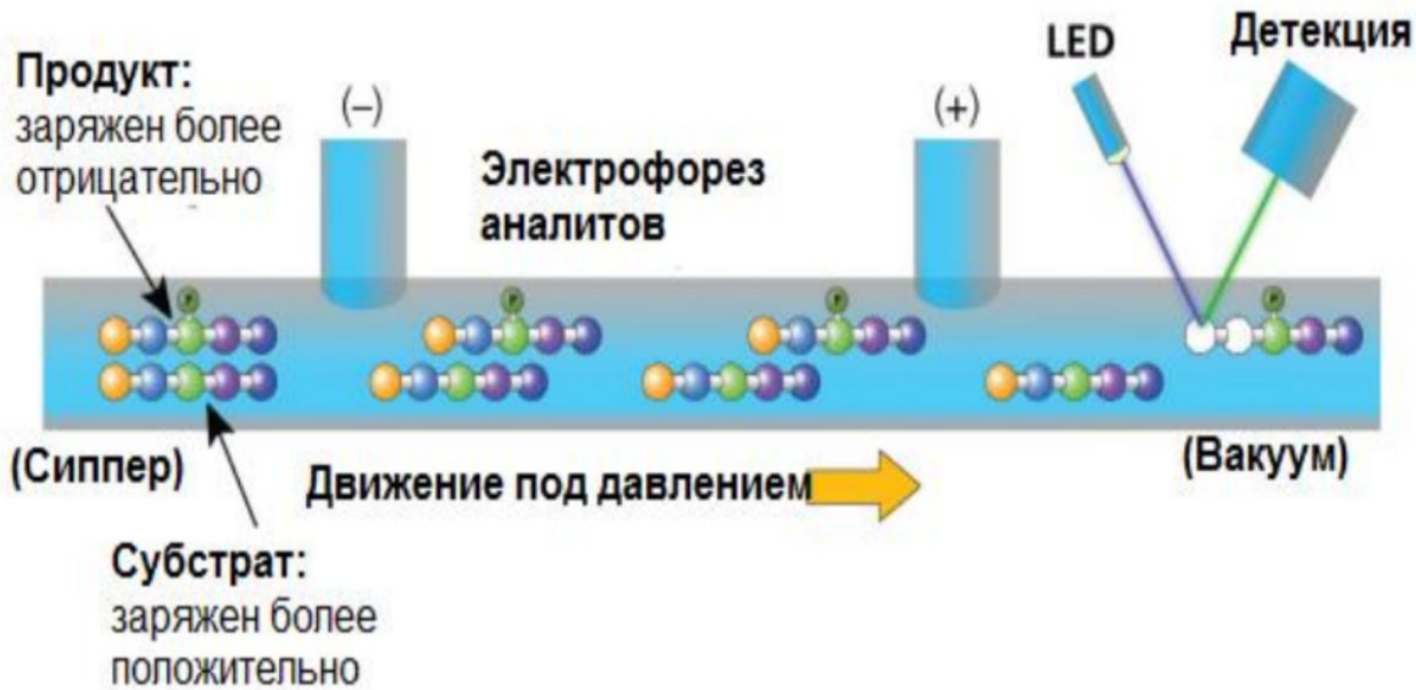
## Микрофлюидные технологии

### Системы LabChip®

#### LabChip EZ

Ключевым компонентом системы являются миниатюрные чипы с вытравленными микроканалами. В микроканалах чипов в автоматическом режиме происходит высокоскоростное препаративное или аналитическое электрофоретическое разделение биомолекул с последующей детекцией.





Смещение подвижности: разница соотношений заряда к массе у непрореагировавшего субстрата и продукта используется для разделения на микрофлюидном чипе. На рисунке приведен пример изучения свойств протеинкиназы на ридере LabChip EZ. Субстрат – нефосфорилированный пептид - мигрирует в электрическом поле медленнее, чем фосфорилированный продукт. И субстрат, и продукт детектируются по флуоресценции, индуцированной светодиодом.

# Ридер LabChip® EZ: всесторонний анализ ферментов

Ридер LabChip EZ от компании PerkinElmer – абсолютно необходимый прибор при работе в области поиска веществ с заданной биологической активностью, анализе ферментов и изучении свойств биомолекул. Совмещая в себе преимущества капиллярного электрофореза с технологией забора проб через иглу («сиппер») микрофлюидного чипа (так называемый «сиппер-чип»), данная система выполняет анализ смещения электрофоретической подвижности. Этот метод особенно хорошо зарекомендовал себя в фармакологических исследованиях, поскольку обеспечивает прямое высокоточное определение продукта и субстрата и получение кинетических данных в режиме реального времени с хорошей воспроизводимостью.

## Области применения:

- Пробоподготовка (в том числе для NGS)
- Разделение
- Амплификация
- Клеточный анализ
- Геномика
- Протеомика
- Поиск кандидатов в лекарственные препараты
- Молекулярная диагностика
- Иммунодиагностика

*Геномика* – наука, занимающаяся изучением структуры и функций генов (*геном* – совокупность всех генов организма).

*Протеомика* – наука, занимающаяся изучением совокупности белков и их взаимодействий в живых организмах (*протеом* – совокупность всех белков организма).

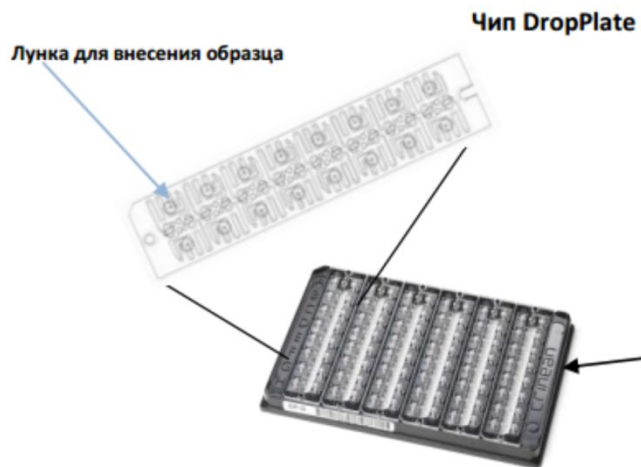
Система LabChip EZ рекомендована при работе со следующими объектами:

- Киназы
- Протеазы
- Фосфатазы
- Липидкиназы
- Фосфодиэстеразы
- Белки, связывающиеся с ДНК/РНК
- Ферменты эпигенетических модификаций  
(гистонацетилтрансферазы,  
деацетилазы  
гистонов, метилтрансферазы,



# 2

## LabChip® DS: сверхбыстрое сканирование спектра в микрообъеме

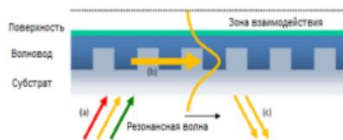


От 1 до 3 мкл образца наносят в лунки специальных чипов на 16 проб. После раскапывания под действием капиллярных сил образец поступает в микроканалы, тем самым предотвращается высыхание пробы (стабильность в течение 2-х часов). Чипы помещаются в специальный штатив DropFrame, таким образом достигается конфигурация стандартного 96-луночного планшета вида.

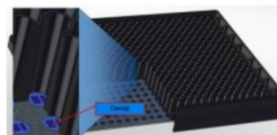
# 3

Безметочная технология детекции

**Corning® Epic®**



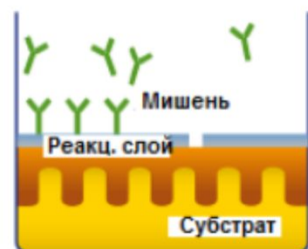
**Аналог Biocore (4 дорожки)**  
**или ProteOn (6 дорожек)**



Специализированный модуль Label-free на базе платформы EnSpire обеспечивает детекцию фенотипических изменений клеток, а также равновесный анализ межмолекулярных взаимодействий **без использования каких-либо меток.** Измерение происходит в специальных планшетах, соответствующих стандартам ANSI/SBS. В дно каждой лунки планшета интегрирован биосенсор. Модуль LabelFree оснащен источником света и детектором, улавливающим изменения в коэффициенте преломления среды в непосредственной близости от поверхности сенсора (до 150 нм) в режиме реального времени. Детекция основана на феномене волноводного резонанса на дифракционной решетке.

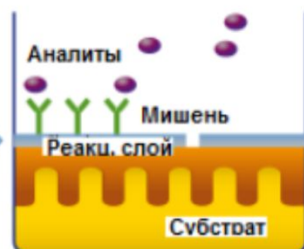
## Этапы анализа

1 этап



Образец      Референс

2 этап

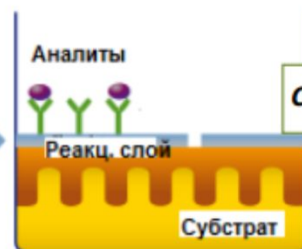


Образец      Референс

Широковолновый  
источник света

Отраженный свет  
определенной  
длины волны

3 этап

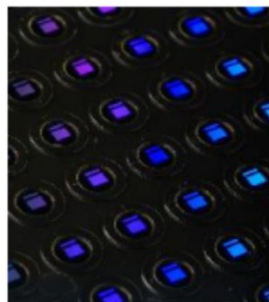


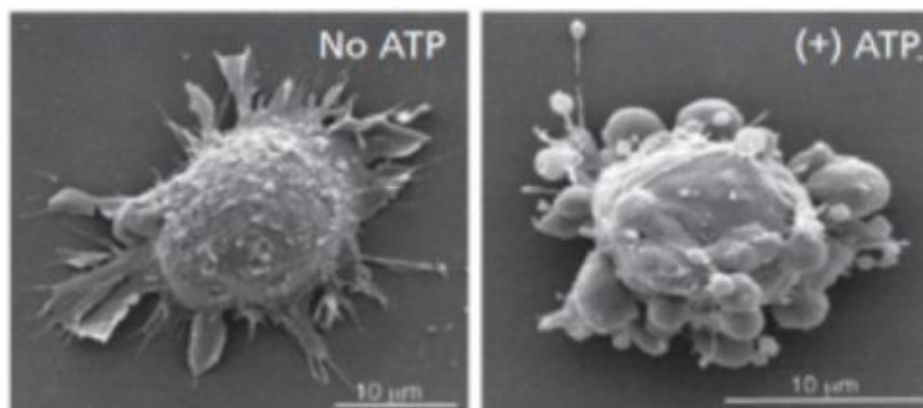
Образец      Референс

Широковолновый  
источник света

Отраженный свет  
определенной  
длины волны

Связывание = Образец - Референс

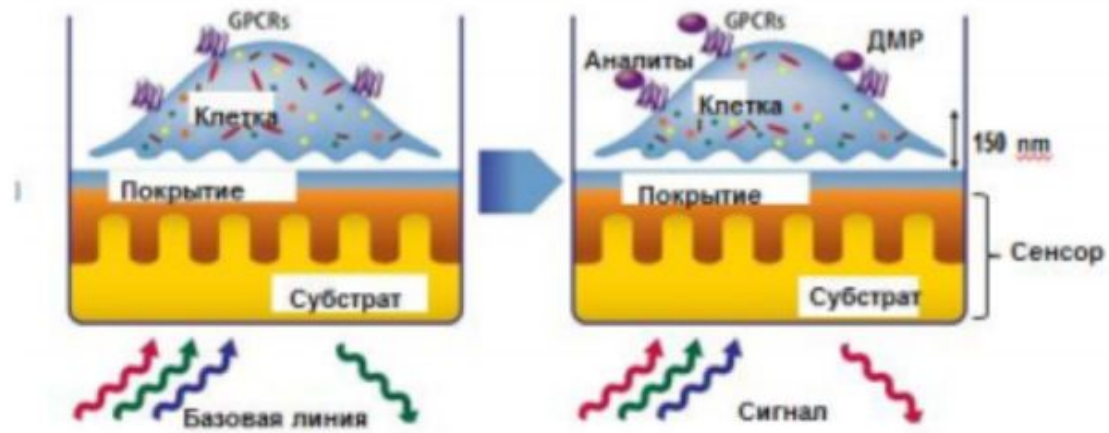




J. Brown GSK Neuroscience

1 этап

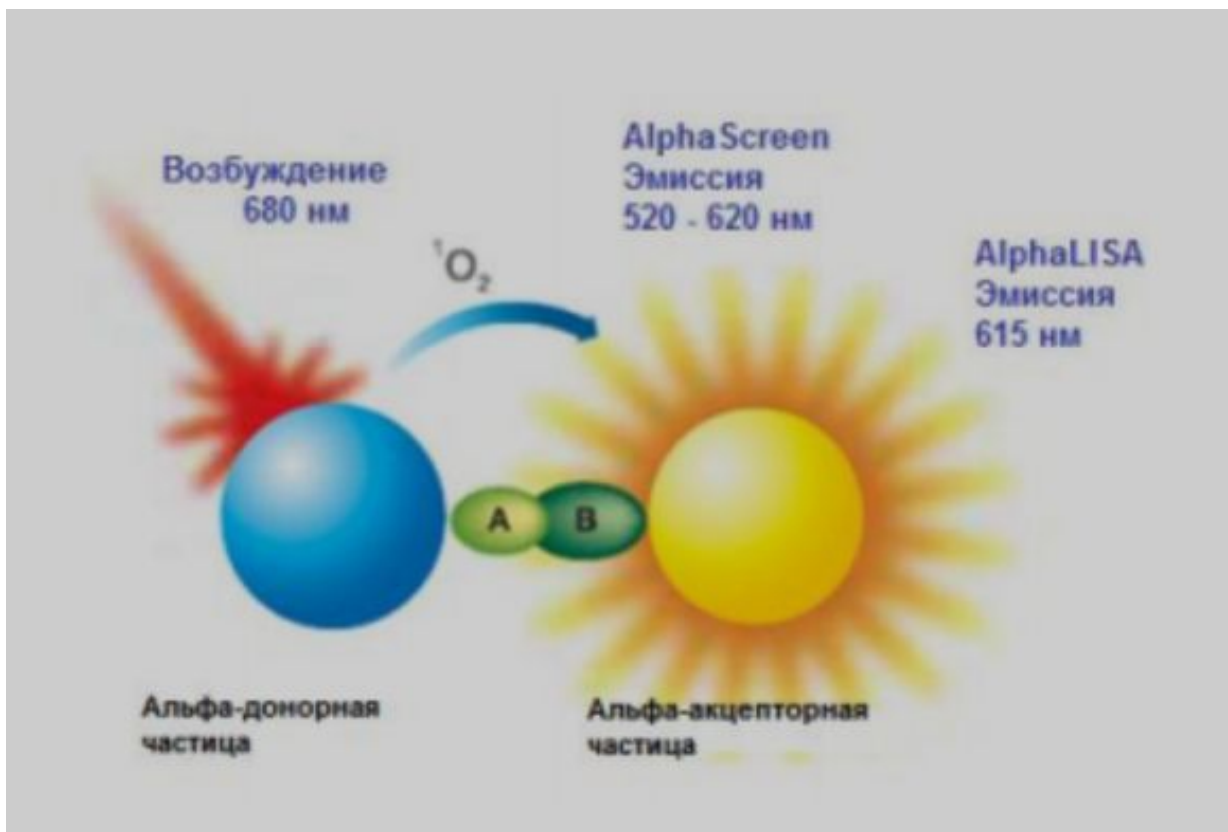
2 этап



Типичные приложения:

- Клеточная адгезия
- Хемотаксис
- Цитотоксичность
- GPCRs (рецепторы, сопряжённые с G-белком, также известные как семиспиральные рецепторы или серпентины, составляют большое семейство трансмембранных рецепторов. )
- Гетродимеризация GPCRs
- Ионные каналы
- Рецепторы ядерных гормонов
- Фагоцитоз
- Рецепторные тирозинкиназы
- TLRs (Толл-подобные рецепторы — класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ.
- Транзиентная трансфекция
- Инфицирование вирусами

**4** Технология Альфа, запатентованная компанией PerkinElmer, основана на использовании микрочастиц, на которых закрепляются биомолекулы, специфичные к различным лигандам.



## Список доступных наборов для работы с технологией Альфа Формат AlphaScreen

AlphaScreen для детекции  
цАМФ  
AlphaScreen для детекции  
цГМФ

Ангиогене  
3  
Аутофаг  
ия  
Биопроцесс  
ы  
Канцерогене

Наборы AlphaScreen SureFire  
для анализа внутриклеточной  
передачи сигнала

3  
Сердечно-сосудистая система

Центральная нервная система

AlphaScreen для детекции  
гибридных белков: c-MYC, GST,  
гистидина

Воспалени  
9  
Метаболиз  
М  
Вирусологи  
я

AlphaScreen для  
детекции с помощью  
IgG  
AlphaScreen для детекции  
фосфотирозина

Анализ  
ацетилирования

Другие посттрансляционные  
модификации

5

Робот  
ы

