
ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO EXPRESNÍ DNA ČIPY

SAMPLE TAKING AND PROCESSING FOR EXPRESSION DNA MICROARRAYS

TICHÝ B.¹, SVOBODA M.², MAYER J.¹ A POSPÍŠILOVÁ Š.¹

¹ CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENOVÉ TERAPIE, INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² LABORATOŘ PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE, ODD. KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV V BRNĚ

Souhrn

Moderní metodiky studia genové exprese na úrovni RNA využívající DNA čipy (DNA microarrays) představují účinný nástroj nejen pro výzkum onkologických onemocnění, ale mají i velký potenciál stát se základem nových diagnostických postupů. Jejich úspěšná aplikace však vyžaduje zvládnutí problematických postupů jako jsou odběr vzorku, izolace RNA nebo značení nukleových kyselin. S ohledem na množství různých DNA čipových platforem, neexistuje jeden univerzální návod, který by mohl být použit ve všech laboratořích. Protokoly zpracování DNA čipů se proto, někdy velmi výrazně liší, což má negativní dopad i na možnost jejich diagnostického využití.

Klíčová slova: RNA, DNA čip, biopsie, genová exprese

Summary

Gene expression profiling using DNA microarrays represents not only a powerful tool for oncological research but have also a big potential to become a standard diagnostic technique. However, successful microarray application needs to overcome some pitfalls such as sample collection, RNA isolation or nucleic acid labeling. Due to the number of microarray platforms there is no universal guide that can be used by all laboratories. The number of sometimes very different protocols for DNA microarray processing has a negative impact on their diagnostic utilization.

Keywords: RNA, microarray, biopsy, gene expression

Úvod

Rychlý rozvoj molekulárně-biologických technik v posledních letech s sebou přináší zcela nové požadavky i na klinické lékaře, chirurgy a patology. Odebíraný biologický materiál by měl být použitelný i pro ta nejnáročnější vyšetření, mezi něž patří i sledování genové exprese pomocí DNA čipů. Pro tyto analýzy je nutné získat co největší množství velmi kvalitní RNA, tzn. co největší, ale zároveň reprezentativní vzorek nádorové tkáně, krve nebo kostní dřeně. Asi největšími problémy, na kterých může celý čipový experiment ztroskotat, jsou nutnost rychlého odběru a „kontaminace“ vzorku „normálními“ buňkami. Ani úspěšné zvládnutí procesu odběru vzorku a izolace RNA nevede automaticky ke zdaru celého experimentu. Vzorek RNA ještě před hybridizací prochází sérií úprav, při kterých je naznačen (např. fluorescenční barvou) případně i amplifikován. Tyto kroky stejně jako hybridizace většinou vyžadují časově i finančně náročnou optimalizaci protokolů a jakákoli, byť na první pohled nepatrná změna postupu, může významně ovlivnit jejich výsledek.

Odběr vzorků

Jde o jedno z kritických míst, které většinou vyžaduje těsnou spolupráci několika pracovišť (laboratoř, chirurgie, ambulance, patologie ad.). Technická náročnost je závislá na druhu odebíraného vzorku.

a) Odběry krve a kostní dřeně.

Pro účely sledování profilů genové exprese stačí obvykle 2-10ml nesrážlivé citrátové nebo K3EDTA krve nebo 1-5ml obdobně ošetřené kostní dřeně. V nemocnicích jsou běžně dostupné odběrové nádoby původně určené pro stanovení krevního obrazu. Nesmějí se však použít zkumavky s heparinem, který interferuje s PCR. Buňky si zachovávají životnost dlouhou dobu po odběru a k zaznamenané degradaci nedochází ani několik hodin po aspiraci při ponechání vzorků při pokojové teplotě. Otázkou je změna exprese genů v buňkách ponechaných delší dobu mimo organismus. Výhodou krve jako zdrojového materiálu je i celkem snadná separace hlavních typů jaderných buněk – granulocytů a mononukleárů na denzitních gradientech. Takto oddělené buněčné populace mohou být použity jako výchozí materiál pro získání raritních subpopulací jako jsou např. leukemické (v průběhu léčby) nebo hematopoetické prekurzorové buňky pomocí fluorescence activated (FACS) nebo magnetic cell sortingu (MACS). Mimo to jsou komerčně dostupné sady pro odběr krve na izolaci RNA používající princip chemické stabilizace. Jejich zásadní nevýhodou je nemožnost následné separace krevních buněk a samozřejmě vyšší cena.

b) Odběry bronchoalveolární laváže (BAL).

BAL se vyznačují poměrně malým výtěžkem RNA (cca do 1µg) vzhledem k omezenému počtu buněk. Navíc první 2 frakce obsahují vedle buněk leukocytární řady poměrně hodně epitelových buněk (až desítky procent). Buňky leukocytární řady jsou však zajímavé z hlediska exprese NOS a markerů spojených s alergickými reakcemi. Pro tyto účely se proto odebírá až třetí frakce, která obsahuje převážně leukocytární řadu.

c) Odběry biopsií solidních nádorů.

Existuje několik běžných typů biopsií:

1. Jehlové biopsie. Jejich výhodou je malá zátěž pacienta. K tomuto účelu se používají speciální tzv. tru-cut jehly, které z cílové tkáně vyříznou váleček tloušťky do 1mm a délky cca do 10 - 15mm. Používají se např. při vyšetřování metastáz nádorů v játrech. Toto množství nemusí někdy stačit pro přípravu dostatečného množství celkové RNA a je pak nutno používat amplifikaci RNA.
2. Malé excize pomocí speciálních bioptických kleští a fibroskopů. Lze jimi odebrat až několik mm cílové tkáně. Pou-

žívají se např. při vyšetřování rektálních nádorů. Uvedené množství tkáně většinou umožní přípravu 5 - 50 µg celkové RNA, což je dostatečné pro aplikace DNA čipů.

3. Operační excize. Lze jimi odebrat většinou dostatečné množství nádorové tkáně pro DNA čipy.
4. Tenkojehelné aspirační biopsie. Ty představují nejmenší zátěž pro pacienta, množství tkáně získané a tedy i RNA je ale velmi malé, zároveň může být negativně ovlivněna reprezentativnost vzorku.

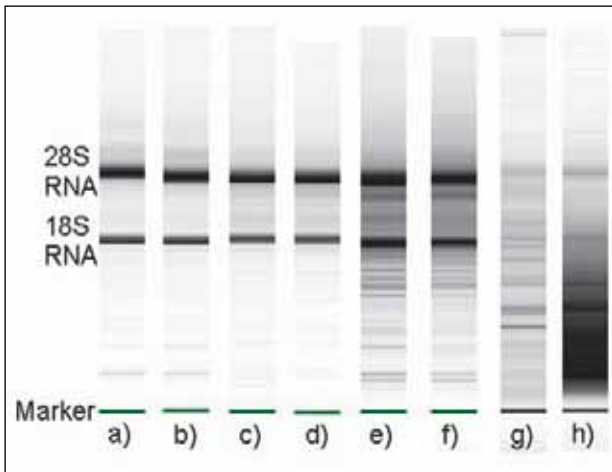
Ve všech případech probíhají odběry za informovaného souhlasu pacienta a jsou indikovány ošetřujícími onkology až po konkrétní domluvě s patologem, tak aby odběrem nebyla dotčena možnost patologického zhodnocení nádoru. Někdy není možné z důvodů priority patologického vyšetření provést nativní biopsii pro experimentální účely. V takovém případě je možné použít patologem již zhodnocené parafinové řezy tkání. To ovšem znamená nejenom malý výtěžek RNA a obvyklou nutnost amplifikace RNA, ale i rozpad RNA na menší fragmenty a nutnost použít speciální metody jak při izolaci RNA, tak při následném zpracování materiálu. Protože tkáň je v parafinových řezech obvykle fixována formaldehydem, který metyluje DNA, nejsou rutinní parafinové řezy vhodné ke sledování metylačního statusu DNA. Existují však i speciální histologická fixativa, která nemetylují DNA. S těmito fixativy lze parafinové řezy použít i pro sledování metylačních profilů DNA.

Stabilita RNA

Odběr materiálu pro izolaci RNA je vzhledem k degradabilitě RNA poměrně náročný. Samotná RNA je stabilní, ale je velmi rychle degradována všudypřítomnými enzymy ribonukleázami (RNAsami). Ty pochází jak z buněk, ze kterých je RNA izolována, tak i z prostředí tj. z kontaminujících mikroorganismů - bakterií. Pomineme - li bakteriální kontaminaci, vedle RNA je fyziologickou součástí buňky celá řada různých ribonukleáz, které RNA degradují. Tyto ribonukleázy jsou součástí složitých buněčných regulačních mechanismů. Naneštěstí jsou jednotlivé RNA degradovány nesterjné rychle díky přítomnosti AU- sekvencí v některých genech [1]. Je známo, že RNA pro některé geny (cykliny) mají poločas rozpadu v rozmezí minut, zatímco některé housekeepingové geny mají poločas několik hodin. Po vyjmutí buněk z těla se rovnovážné hladiny jednotlivých RNA poruší a „rovnovážný expresní profil“ dané tkáně se začíná měnit v jakýsi arteficiální produkt, který se tím více liší od původního stavu, čím déle trvá, než se degradace RNA zastaví. Vliv na genovou expresi mají i další faktory, např. hypoxie zapříčiněná podvázáním cév zásobujících resekováný tumor, která může vést ke změně exprese celé řady genů [2]. Protože v klinické praxi je téměř nemožné zajistit uplynutí stejné doby od okamžiku odběru vzorku po jeho zpracování, promítají se rozdílné doby odběru do expresních profilů DNA čipů a jsou zřejmě jednou z příčin známé variability experimentálních výsledků DNA čipů pocházejících od různých výzkumných skupin [3].

Předpokladem úspěšného odběru je tedy kromě sterility i co nejrychlejší stabilizace vzorku - inhibice ribonukleáz. Jednou z možností je použití chladu, kdy je vzorek tkáně velmi rychle zmrazen - vhodným způsobem je ponoření do tekutého dusíku. Druhou možností je chemická inaktivace RNAs [4]. Pro tento účel jsou určeny speciální stabilizační roztoky (např. RNAlater®). Ty přinášejí nesporné výhody zjednodušením manipulace s materiálem, kdy způsob odběru se příliš neliší od odběru např. pro histologické vyšetření, jsou však podstatně finálně nákladnější a pro správný průběh fixace je nutné použít vzorek takové velikosti, aby mohl být roztokem dostatečně rychle prosycen. Obě metody tedy vyžadují co nejrychlejší zpracování tkáně po vyjmutí z organismu, nejlépe přímo

v odběrové místnosti nebo na operačním sále. Za přijatelnou dobu mezi odběrem vzorku a jeho stabilizací se považuje max. 15 minut, většina studií používá 10 min. interval [5]. Nutnost rychlé stabilizace komplikuje kontrolu vhodnosti vzorku, protože vyžaduje přítomnost kvalifikované osoby (patologa) pro iniciační makroskopické posouzení biotátu a jeho rozdělení na velikostně vhodné části. Na našem pracovišti (Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hemato-onkologická klinika, FN Brno – CMBGT) se osvědčil způsob odběru, při kterém je vzorek ihned po resekcii zchlazen a transportován na ledu k patologovi, který jej rozdělí na části pro histologické a molekulárně-biologické vyšetření. Potom je zmrazen v tekutém dusíku a dále skladován při -80°C . Takto uskladněný vzorek je použit až po histologickém vyšetření části oddělené patologem, pokud vyhoví požadovaným kritériím zastoupení patologických buněk. Při tomto způsobu nedochází k výraznější degradaci RNA (posuzováno na přístroji BioAnalyzer 2100, obr. 1) a odpadá manipulace s tekutým dusíkem na operačním sále. Je tak možno odebrat i větší vzorky tkáně, které nemohou být vzhledem k jejich velikost stabilizovány chemicky.



Obrázek 1: Porovnání vlivu odběru na stabilitu RNA. a) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/10,0); b) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/9,9); c) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 10min na ledu (2,1/9,9); d) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 20min na ledu (2,2/9,7); e) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 10min při pokojové teplotě (1,3/7,2); f) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložené po odběru 20min při pokojové teplotě (1,0/6,9); g) Degradovaná RNA (-/2,6); h) Degradovaná RNA (-/2,4); v závorce: 28S:18S rRNA/RIN („RNA integrity number“) Gel-like výstup přístroje BioAnalyzer 2100

Izolace RNA

V praxi je používáno několik rozdílných technologií pro izolaci RNA. Nejrychlejší je izolace na kolonkách (pevné fázi), kdy po uvolnění z buněk je RNA navázána na povrch filtru, nežádoucí komponenty jsou vymyty a čistá RNA je následně z filtru eluována. Tato metoda dosahuje velmi dobrých parametrů čistoty a oproti následující vyniká jednoduchostí a rychlostí. Další často používanou metodou je izolace založená na použití směsi fenolu a chaotropních solí [6]. Vzorek je nejprve lyzován ve směsi guanidinium thiokyanátu a fenolu (Trizol® ad.), po přidání chloroformu nebo bromchloropropanolu a centrifugaci dochází k rozdělení do několika fází. V horní vodné fázi je zachycena RNA, v mezivrstvě DNA a v dolní organické fázi proteiny. Celková (totální) RNA je z vodné fáze precipitována isopropanolem. Postup je technicky i časově podstatně náročnější, není příliš vhodný pro izolaci z velmi malých vzorků. Velkou výhodou je možnost současné izolace RNA, DNA i proteinů a zachycení kratších fragmentů RNA (menších než 200 bází). Obě metody by měly být schopny odstranit genomovou DNA, přesto je vhodné RNA ošetřit enzymem DNAsou. Námí používaná metoda závisí na druhu biologického materiálu, ze kterého má být RNA izolována. V případě leukocytů a tkáňo-

vých linií je to kolonková metoda, při izolaci z pevných tkání dosahujeme v našich podmínkách lepších výsledků kombinací obou výše popsaných metod - po úvodní lýze vzorku v Trizolu® a separaci fází pokračujeme kolonkovou metodou, která zahrnuje i ošetření vzorku DNAsou.

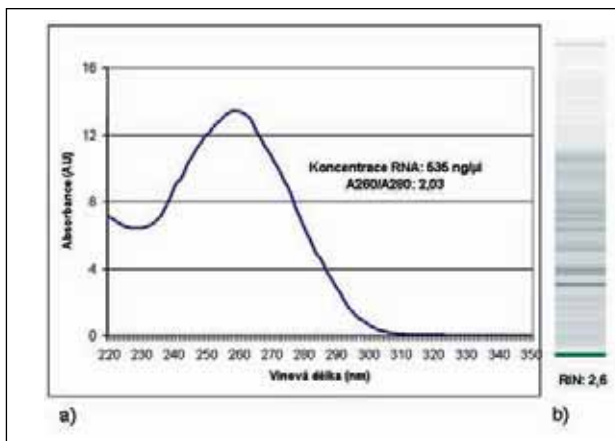
Při izolaci z pevných tkání je nutné použít mechanickou homogenizaci tkáně. Jednou z možných metod je rozdrčení hluboce zmrazené tkáně v tekutém dusíku a následná lýza. V laboratoři CMBGT dáváme přednost rotor-stator homogenizátoru, kdy je tkáň současně homogenizována i lyzována v Trizolu. Tyto homogenizační techniky s sebou nesou riziko křížové kontaminace vzorků, je tedy nutné důkladně očistit všechny opakovaně používané nástroje.

Výše uvedené metody představují ty nejčastěji používané, je dostupná řada dalších jak pro izolaci totální, tak i mediátorové RNA ve variantách pro manuální i plně automatizované zpracování. Stále větší rozšíření získávají metody magnetické separace, kdy je RNA navázána na povrch magnetických částic, které jsou při promývání ve zkumavce fixovány magnetem. Samozřejmě je použití „RNAse Free“ jednorázového plastiku a dekontaminace pracovního prostoru při veškeré práci s RNA.

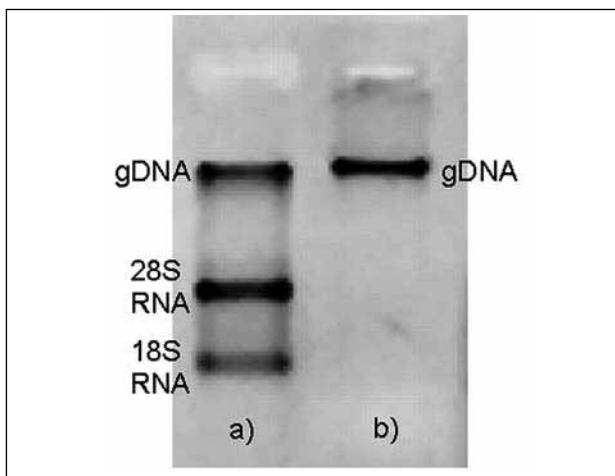
Kontrola kvality RNA

Základní podmínkou úspěšného čipového experimentu je, kromě vhodného designu, kvalita vstupního materiálu. Vzhledem k tomu, že většina technik pracuje s reverzní transkripci iniciovanou z polyA(3') konce mRNA je nutné zachovat co největší procento transkriptů v jejich plné délce. Existují a dále jsou intenzivně rozvíjeny metody, které používají k iniciaci transkripce náhodné krátké nukleotidy (hexamery, oktamery). Ty nacházejí své uplatnění především v aplikacích využívajících degradovanou RNA získanou např. izolací z parafinových bločků (FFPE - Formalin Fixed Parafin Embeded). Problém stability RNA si dobře uvědomují i výrobci oligonukleotidových DNA čipů, kteří se snaží snížit ovlivnění výsledků DNA čipů přizpůsobením algoritmů pro návrh sond tak, že jsou preferovány sondy ležící v sekvenci mRNA blízko k polyA(3') konci – obvykle do vzdálenosti 1000 bází. Přes toto ulehčení je však kvalita vstupní RNA jedním z nejkritičtějších bodů celého procesu přípravy DNA čipů. Kontrola kvality RNA by tedy měla být nepostradatelnou součástí všech protokolů. Posouzení kvality RNA však není jednoduché a neexistuje pro něj spolehlivá metoda. Nejzákladnější a nejméně informativní je spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Základními hodnotami jsou v tomto případě absorbance vzorku při 260 nm a při 280 nm. Vlnové délce 260 nm odpovídá absorbanční maximum nukleových kyselin, poměr absorbancí při 260 a 280 nm vypovídá o kontaminaci RNA, především proteiny. Obecně doporučovaným rozmezím A260/A280 je 1,9–2,1. Spektrofotometrické měření ale není schopno vypovědět nic o integritě vzorku, i naprosto degradovaná RNA může mít vysokou koncentraci a poměr A260/A280 vyšší než 2 (obr. 2). Integrita je nejčastěji posuzována pomocí vzájemného poměru proužků 28S rRNA a 18S rRNA získaných při denaturující gelové elektroforéze. 28S a 18S rRNA jsou zvláštními typy RNA, které nekódují informaci o primární struktuře proteinů, ale jsou stavební součástí ribosomů. Při běžné izolaci RNA představují tyto dvě frakce většinu získané celkové RNA (asi 85 %), kdežto mRNA kódující proteiny, v závislosti na typu buněk, 2-10 %. Tyto dva druhy RNA jsou stejně citlivé k degradaci jako mRNA, čehož se využívá pro odhad její integrity. V případě intaktní RNA bývá podíl 28S rRNA : 18S rRNA větší než 2 a postupující degradací se snižuje. Tuto metodu lze použít i pro rychlé posouzení kvality vizuálním odhadem síly proužků, přesnější je samozřejmě využití specializovaného software určeného pro analýzu gelů, který je schopen vyhodnotit poměry obou proužků objektivněji. Gelová elektroforéza dovoluje i posouzení kontaminace genomovou DNA, která se v nedenaturujícím agarosovém gelu objeví jako velmi pomalu migrující proužek (obr. 3). Kontaminace DNA nejen zkresluje spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA, ale může vést i k zavádějícím výsledkům čipové ana-

lýzy, pokud dojde k přepisu a obarvení genomové DNA. Alternativou gelové elektroforézy je použití přístroje BioAnalyzer, který kromě poměru 28S a 18S rRNA používá pro hodnocení integrity i další regiony gelu. Výsledkem analýzy je tak kromě poměru 28S/18S i tzv. RIN (RNA Integrity Number), dávající přesnější odhad intaktnosti vzorku. Posouzení kontaminace genomovou DNA je však na tomto přístroji obtížné, vzhledem k velmi krátkému času, po který jsou jednotlivé vzorky analyzovány. Další možností je zkušební PCR amplifikace vzorku. Používá se metodika RT-PCR (reverzní transkripce a následná PCR) s použitím oligo-dT primeru pro reverzní transkripci. Pomocí PCR jsou současně amplifikovány dva úseky genu, jeden v blízkosti 3' (polyA) konce, druhý v 5' oblasti. Poměr těchto dvou ampikonů je u intaktní RNA blízký 1, s postupující degradací klesá zastoupení fragmentu z 5' konce genu. Některé oligonukleotidové čipy mohou obsahovat podobnou kontrolu, kdy jsou na nich sondy navrženy pro oba konce transkriptu a z poměru jejich intenzit lze zpětně odhadnout míru degradace vstupní RNA.



Obrázek 2.: Spektrofotometrická křivka a elektroforéza degradované RNA. Přestože má vzorek velmi dobré parametry při spektrofotometrickém měření, může být integrity RNA nízká. a) Graf závislosti absorpance vzorku RNA na vlnové délce, data získána přístrojem Nanodrop ND-1000; b) Stejný vzorek RNA, gel-like výstup přístroje BioAnalyzer 2100



Obrázek 3.: Kontaminace RNA genomovou DNA (gDNA). a) Kontaminovaná RNA; b) Genomová DNA – pozitivní kontrola; 1% nedenaťující TBE/agarosový gel, barvení ethidiumbromidem;

„Čistota“ vzorku

Především v onkologii je nutno brát v potaz i „čistotu“ vzorku, tj. míru zastoupení nežádoucích populací buněk. Většina experimentů je zaměřena na sledování genové exprese v nádorových buňkách. Klinické vzorky však nikdy nemůžou dosáhnout stoprocentního zastoupení nádorové subpopulace, přitom i relativně malá příměs „kontaminujících“ buněk může výrazně ovlivnit zjištěnou míru exprese genů

[7]. Proto se nyní věnuje velká pozornost vývoji metodik, které umožňují ze získaného biologického materiálu separovat žádanou populaci buněk. Minimem by měla být histologická/cytologická/flow-cytometrická kontrola vstupního vzorku. Pokud zastoupení cílové subpopulace dosahuje určité mez, je možno postupovat dále bez použití dalších purifikačních technik. Není-li tato podmínka splněna, měl by být celý experiment přizpůsoben a do jeho protokolu zahrnuta purifikace vzorku. V případě vzorku krve/kostní dřeně se dá s úspěchem použít technik MACS nebo FACS, případně jejich kombinace. Nevýhodou je samozřejmě prodloužená doba zpracování, vyšší finanční náročnost a ztráta, někdy velmi podstatné části vzorku. Pro pevné tkáně je možné využít FACS/MACS metody po předchozím rozvolnění buněk (např. trypsinací nebo mechanickou homogenizací tkáně) nebo mikrodisekční metody. Perspektivní je využití LCM (Laser Capture Microdissection) v kombinaci s metodami pro zpracování FFPE vzorků. To umožňuje nejen histologické posouzení odebíraného vzorku a výběr cílové subpopulace, ale zároveň představuje metodický postup použitelný pro analýzu vzorků uložených v patologických archívech.

Využití separovaných raritních populací buněk nebo LCM vyžaduje následné použití amplifikačních technik, protože získané množství RNA je velmi malé a pro DNA čipy nedostatečné. Typické požadované množství v případě standardních metodik používajících pro hybridizaci značenou cDNA je 10 a více mikrogramů celkové RNA. Tato množství jsou při izolaci z malého počtu buněk např. po LCM naprosto nereálná, úspěchem je získání stovek nanogramů. Amplifikačních technik bylo a je vyvíjeno značné množství [8-12], nejpoužívanější se stala „Eberwinova“ [8] a její variace. Metoda spočívá v reverzní transkripci s inkorporací promotoru pro RNA polymerázu, syntéze druhého řetězce cDNA a in vitro transkripci dvouřetězcové DNA do komplementární RNA. Mimo technik amplifikujících vzorky jsou dostupné metody pro amplifikaci signálu, např. 3DNA systém [13], kdy je cDNA označena speciální sekvencí, na kterou se poté váží speciální fluorescenčně značené struktury (dendrimery). Protože dendrimery mohou nést až několik stovek molekul fluorescenčních barev, je možné dosáhnout dostatečné intenzity signálu i při použití méně než 1 mikrogramu totální RNA. Jinou možností je chemiluminiscenční systém detekce, který je několikanásobně citlivější než fluorescenční. Existují již komerční vysokohustotní DNA čipy s chemiluminiscenční detekcí. Ve spojení s komerčně dostupným kitem na preamplifikaci RNA lze použít jen 50ng výchozí RNA. V extrémních případech lze získat expresní profily z jedné jediné buňky. Tyto profily jsou však poznamenány velkou variabilitou výsledků.

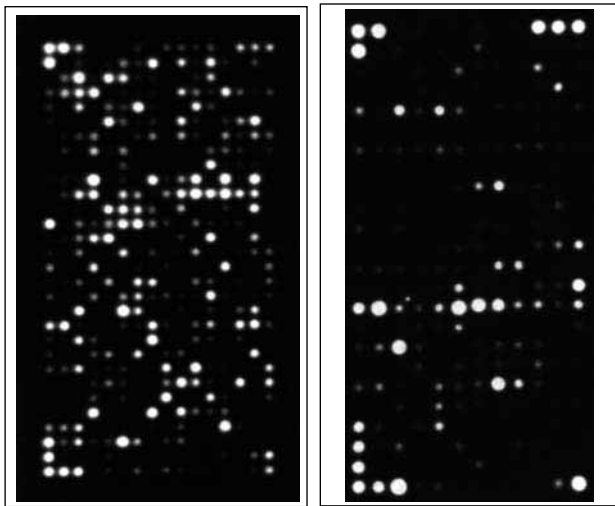
Značení a hybridizace

Zatímco základní postupy, jako je izolace RNA, jsou víceméně univerzální, metodiky značení a hybridizace vzorků se velmi liší. Každá laboratoř si vytváří vlastní protokoly, které nejlépe vyhovují jejich požadavkům a zohledňují typ a velikost vzorků i druh použitých čipů.

V laboratoři CMBGT používáme lineární amplifikaci RNA s nepřímým značením fluorescenčními barvami. Při tomto postupu je RNA nejdříve enzymaticky přepsána do dvouvláknové DNA, během této reakce je zainkorporován promotor pro enzym T7 polymerázu. V dalším kroku je dvouvláknová DNA transkribována T7 polymerázou (RNA polymeráza) do komplementární amplifikované RNA (cRNA). V tomto kroku je do cRNA zabudován aminoallyl-UTP. Na závěr je cRNA přečištěna a zakoncentrována. cRNA je poté fluorescenčně naznačena barvami, které jsou reakcí s amino skupinou aminoallyl-UTP kovalentně navázané na řetězce RNA. Po odstranění nenavázaných barev je vzorek připraven k hybridizaci.

Čipy mají formát mikroskopického sklíčka, na kterém jsou

imobilizovány oligonukleotidové sondy délky 40-70 bazí. Používáme dvoubarevnou metodiku DNA čipů, tj. na čip jsou současně hybridizovány dva vzorky (např. referenční a vyšetřovaný) značené různými fluorescenčními barvami. Při hybridizaci jsou dvě různé značené cRNA smíchány s hybridizačním pufrům a nanášeny na čip, kde jsou ponechány při optimální teplotě 16-17 hodin. Nakonec je nenačnaná cRNA odmyta a čip je možno naskenovat fluorescenčním skenerem.



Obrázek 4a): Příklad středněhustotního membránového DNA čipu, chemiluminiscenční detekce
Obrázek 4b): Příklad nízkohustotního membránového DNA čipu, chemiluminiscenční detekce

V Laboratoři prediktivní onkologie a v Laboratoři experimentální buněčné biologie Masarykova onkologického ústavu (MOU) z finančních důvodů používáme tzv. nízkohustotní DNA čipy (desítky až stovky sond na jednom čipu). Kvůli vyšší citlivosti a z důvodů úspory biologického materiálu a kvůli nenáročnosti na technické vybavení používáme membránové čipy s chemiluminiscenční detekcí. Tyto DNA čipy obsahují buď cDNA sondy jako klasické cDNA čipy nebo oligonukleotidové sondy. cDNA nebo RNA značíme biotinyln-16-dUTP

nebo biotynil-16-UTP. Značení je spřaženo s amplifikací cDNA nebo lineární amplifikací cRNA. Po hybridizaci sond se značenou cDNA nebo cRNA a po vymytí přebytečné cDNA nebo cRNA je třeba membrány inkubovat s konjugátem streptavidin-alkalická fosfatáza. Konjugát se naváže na biotyninové zbytky značené cDNA nebo RNA na membráně. Obrázek je nutno „vyvolávat“ inkubací s chemiluminiscenčním substrátem (např. CDPStar), který alkalická fosfatáza přeměňuje za vzniku výrazné chemiluminiscence. Díky tomu je dosaženo 5x až 10x vyšší citlivosti metody oproti fluorescenčním metodám. Lze proto použít pro vyšetření méně výchozí RNA (standardně 500 ng až 6 µg). Na obr. 4a) je vidět chemiluminiscenční obraz středněhustotního DNA čipu (512 bodů) pro detekci exprese onkogenů a tumorových supresorů u nádoru rekta (klešťová biopsie, zpracováno cca 3x3x3mm tkáně). Intenzita signálu každého bodu představuje „intenzitu“ exprese jednoho genu nebo „intenzitu“ exprese kontrolních markerů. V současné době používáme v MOU DNA čipy při výzkumu prediktivních faktorů rezistence na cytostatika (viz obr. 4b, 288 bodů) a při výzkumu nádorových prognostických faktorů.

Závěr

Zajištění technické stránky odběru biologického materiálu pro DNA čipové experimenty vyžaduje těsnou a bezchybně fungující kooperaci klinických a laboratorních pracovišť. Při plánování takového projektu je nutné promyslet všechny možné komplikace a řešit je ještě před jeho zahájením, změna parametrů v průběhu experimentu může zcela znehodnotit získaná data. Především je zapotřebí se seznámit se všemi technikami, které budou použity a zhodnotit nutnost další purifikace materiálu a jejího možného vlivu na výběr vhodných metodik (izolace RNA, amplifikace RNA). Nutností je vypracování systému kontroly kvality od fáze odběru vzorku až po značení a hybridizaci RNA.

DNA čipy jsou stále poměrně novou metodou, ale jejich širší rozšíření jako diagnostický nástroj v onkologii je pravděpodobné v nejbližších letech. Klinická i laboratorní pracoviště by proto měla být připravena na uplatnění této technologie.

Poděkování:

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR8448-3/2005, a NR 9076-4.

Literatura:

1. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 3;33(22):7138-50.
2. Atkin G, Daley FM, Bourne S et al. The effect of surgically induced ischemia on gene expression in a colorectal cancer xenograft model. *Br J Cancer.* 2006 Jan 16;94(1):121-7.
3. Sotiriou C, Khanna C, Jazaeri AA, Petersen D, Liu ET. Core biopsies can be used to distinguish differences in expression profiling by cDNA microarrays. *J Mol Diagn.* 2002 Feb;4(1):30-6.
4. Grotzer MA, Patti R, Georger B et al. Biological stability of RNA isolated from RNA later-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Jun;34(6):438-42.
5. Chu TY, Hwang KS, Yu MH, Lee HS, Lai HC, Liu JY. A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Mar-Apr;12(2):171-6.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.

7. de Ridder D, van der Linden CE, Schonewille T et al. Purity for clarity: the need for purification of tumor cells in DNA microarray studies. *Leukemia.* 2005 Apr;19(4):618-27.
8. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):1663-7.
9. Shearstone JR, Allaire NE, Campos-Rivera J et al. Accurate and precise transcriptional profiles from 50 pg of total RNA or 100 flow-sorted primary lymphocytes. *Genomics.* 2006 Apr 17.
10. Kurn N, Chen P, Heath JD et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications. *Clin Chem.* 2005 Oct;51(10):1973-81.
11. Ohtsuka S, Iwase K, Kato M et al. An mRNA amplification procedure with directional cDNA cloning and strand-specific cRNA synthesis for comprehensive gene expression analysis. *Genomics.* 2004 Oct;84(4):715-29.
12. Marko NF, Frank B, Quackenbush J, Lee NH. A robust method for the amplification of RNA in the sense orientation. *BMC Genomics.* 2005 Mar 1;6(1):27.
13. Stears RL, Getts RC, Gullans SR. A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiol Genomics.* 2000 Aug 9;3(2):93-9.