

Metodi di Quantificazione dell'Espressione Genica II



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

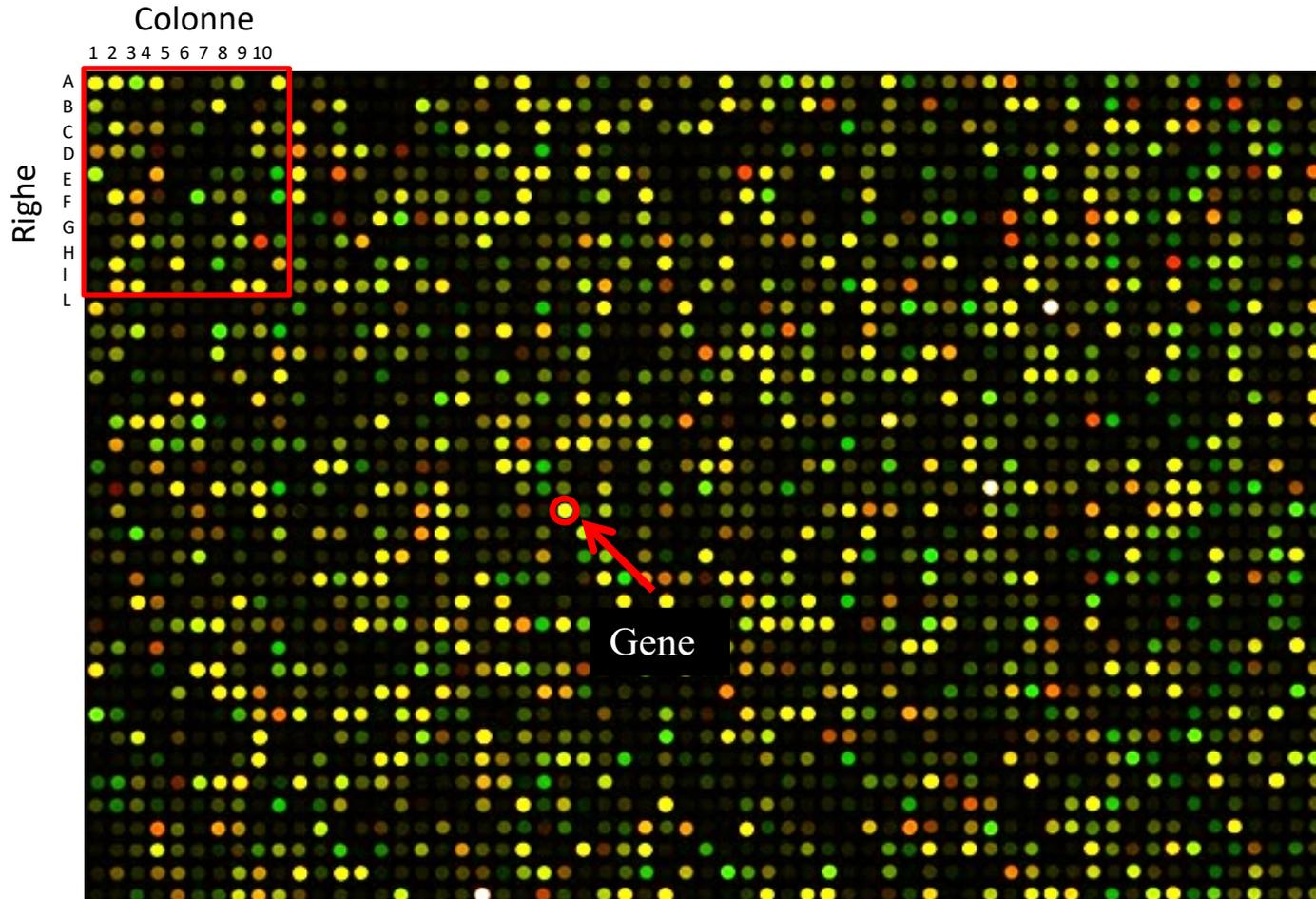
Dr. Roberto Mattioli

e-mail: roberto.mattioli@uniroma1.it



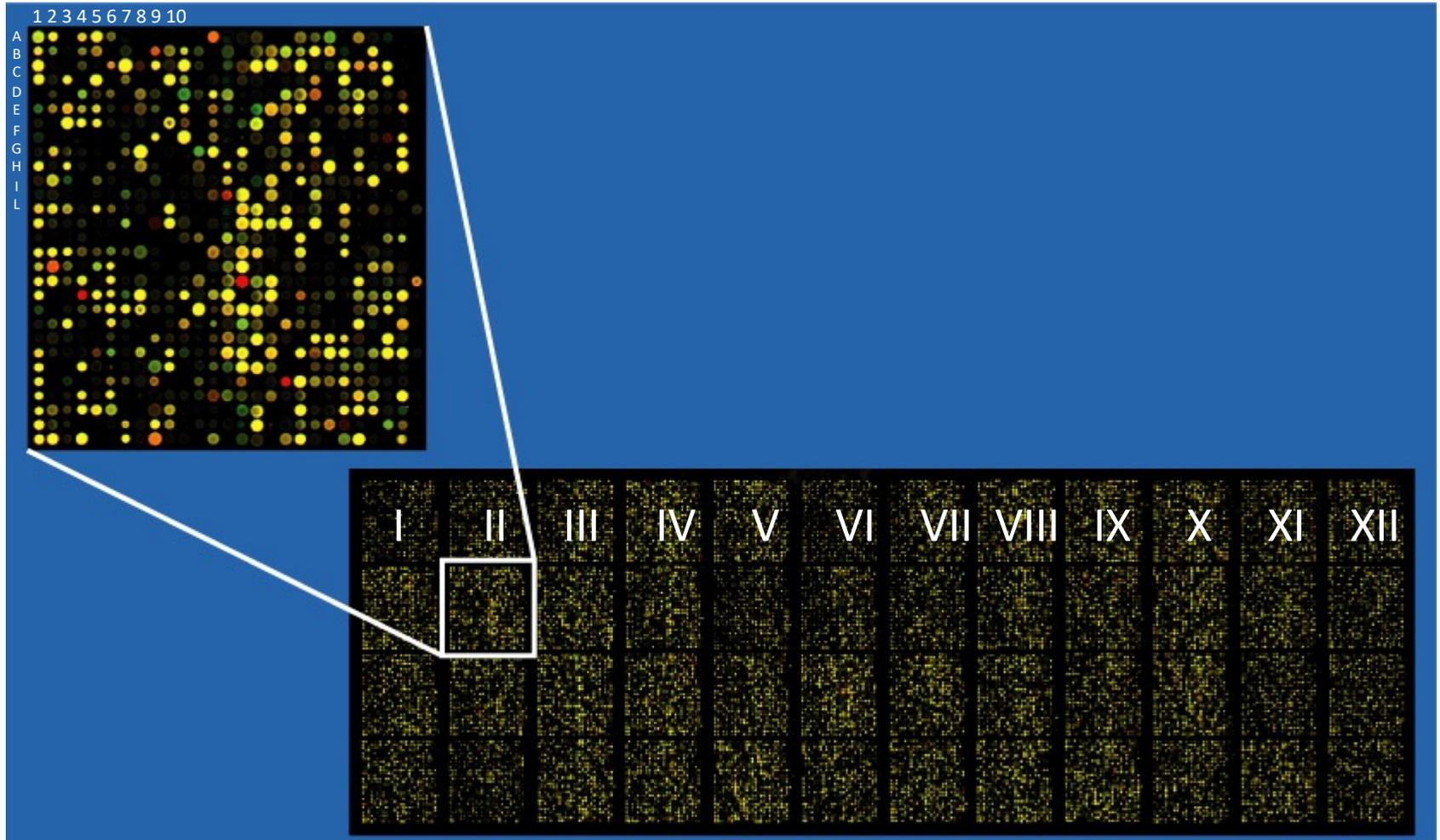


Cos'è un MICROARRAY?





Cos'è un MICROARRAY?

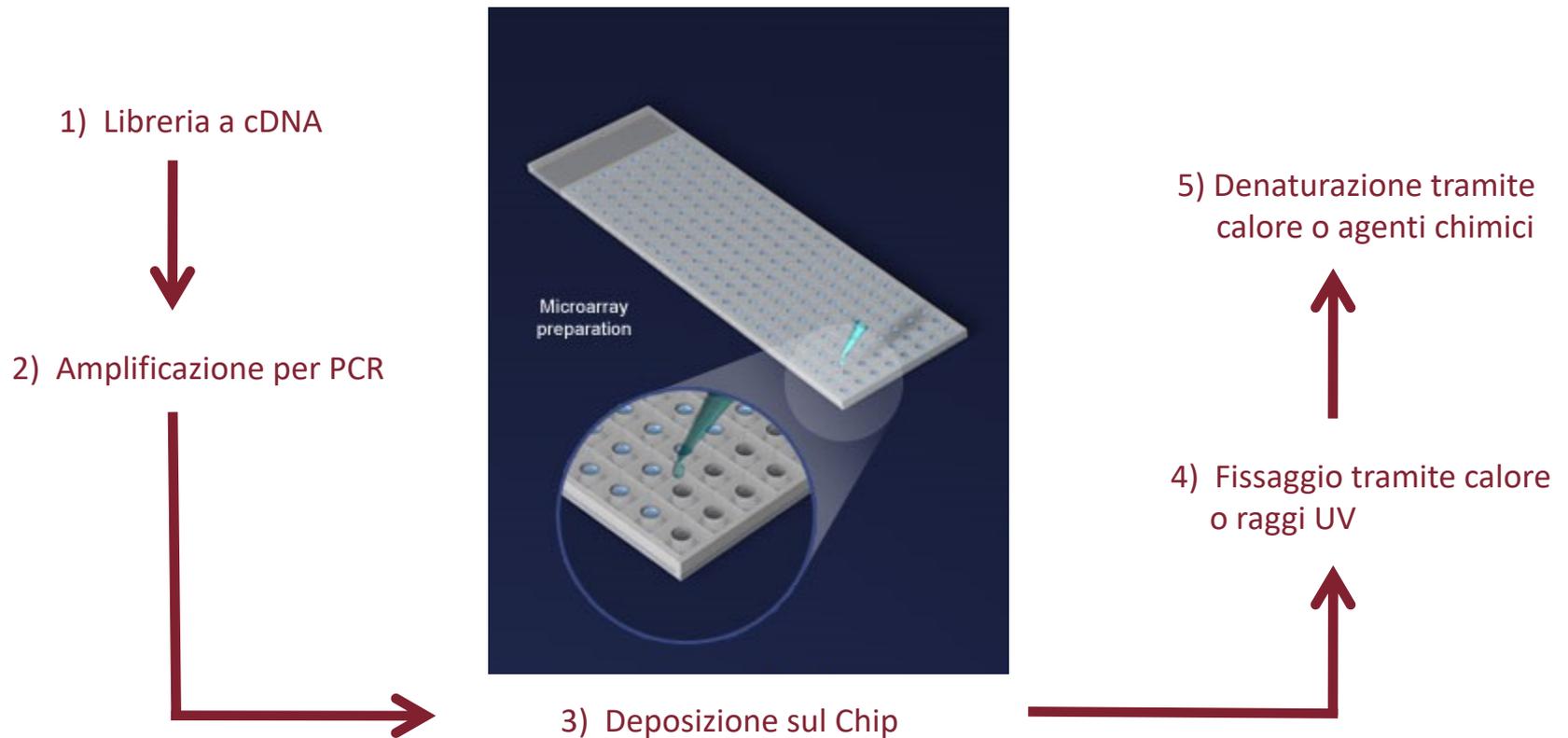




Cosa può essere inserito in un MICROARRAY?

- Peptidi (anticorpi)
- Geni espressi
- Un intero DNA genomico

Come può essere costruito un MICROARRAY? (Chip a cDNA)



Metodo poco laborioso che ha però l'inconveniente di portare ad arrays a bassa densità



Come può essere costruito un MICROARRAY? (Chip ad oligo)

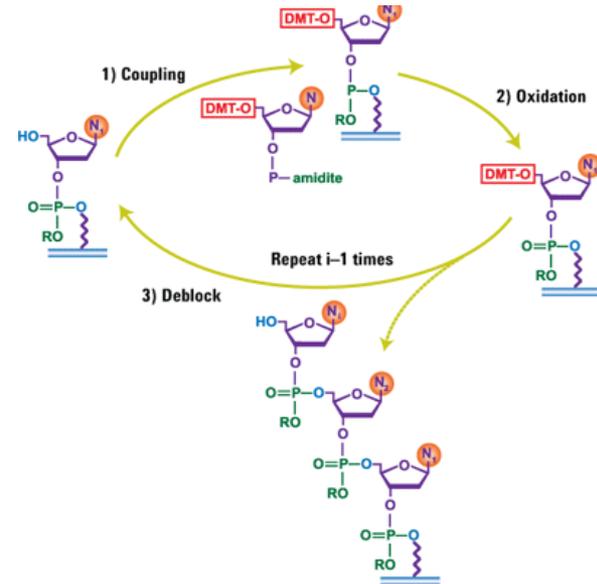
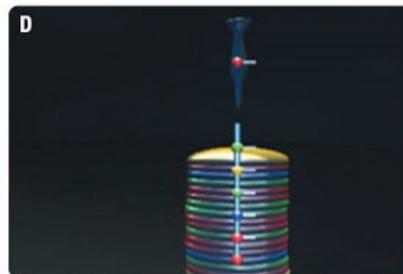
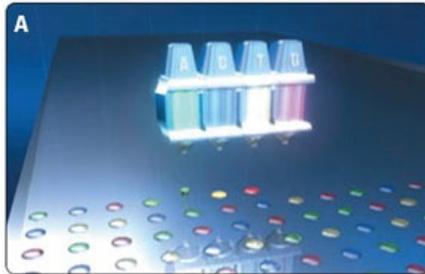
- Metodo InkJet
- Metodo Affymetrix

Entrambi i metodi prevedono la sintesi in situ di oligonucleotidi complementari alle sequenze dei geni che essi rappresentano

Entrambi i metodi possono portare alla realizzazione di chip ad alta densità

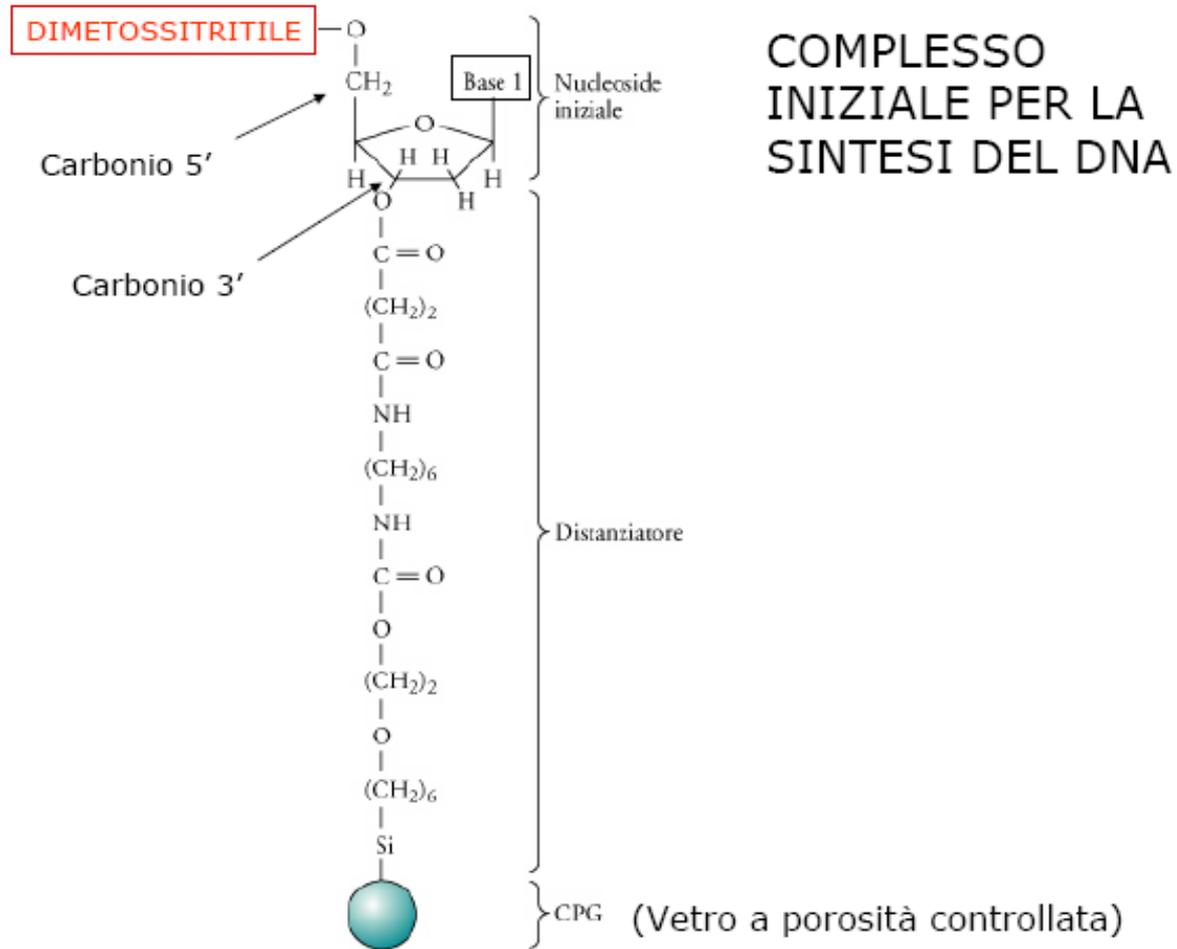


Come può essere costruito un MICROARRAY? (Chip ad oligo) – Metodo InkJet





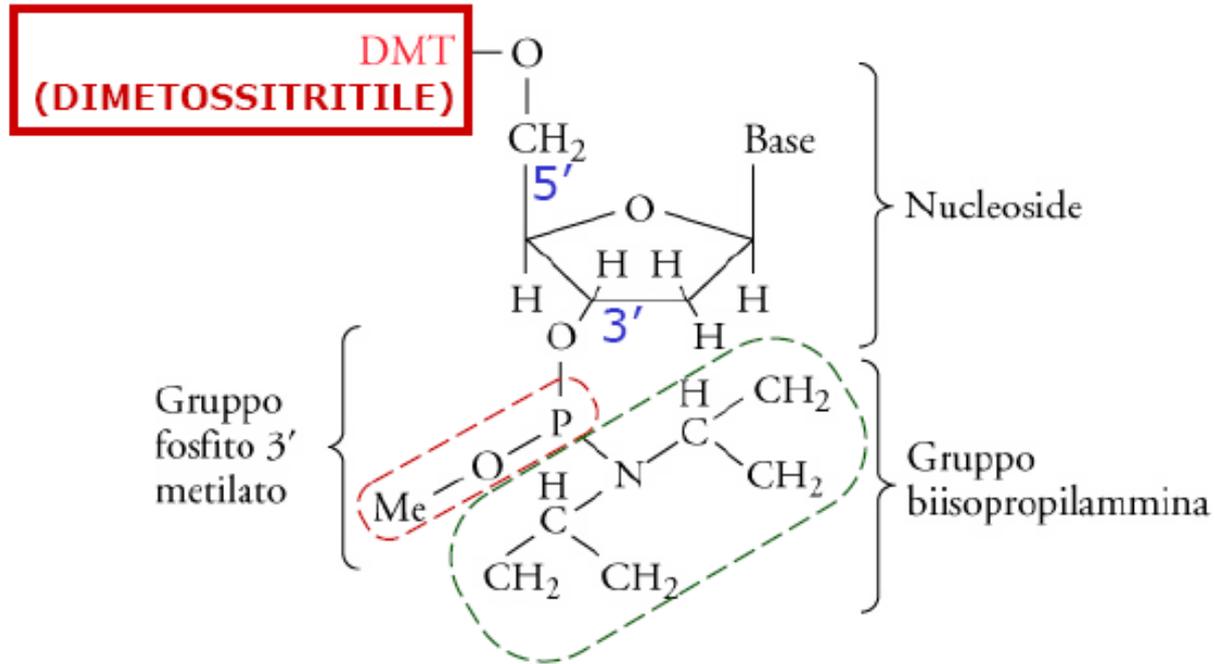
Sintesi di Oligo...





Sintesi di Oligo...

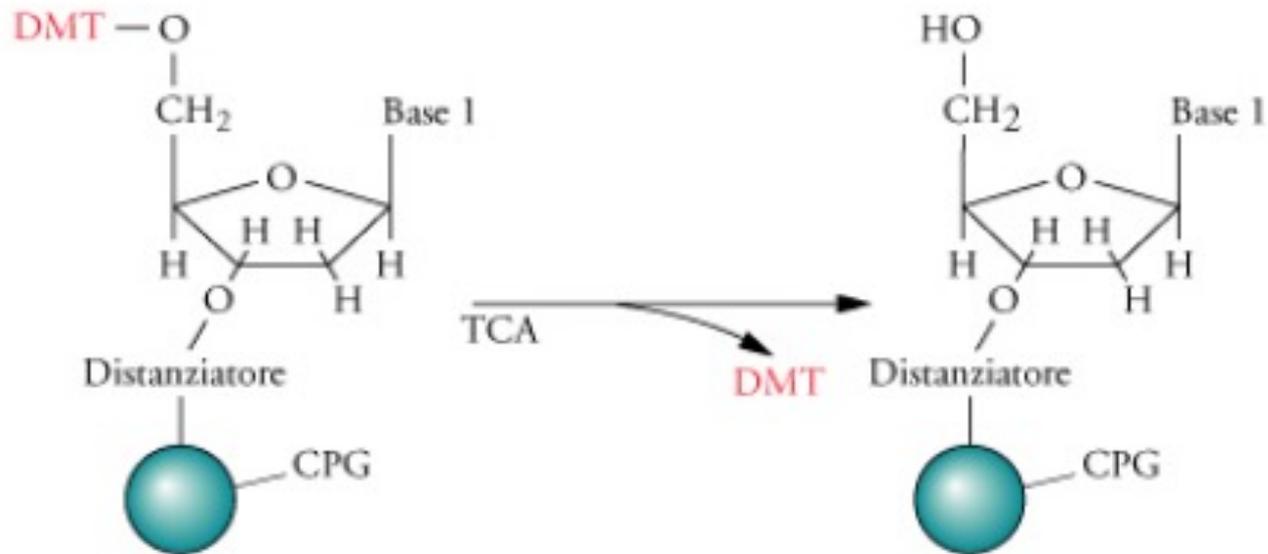
Struttura della fosforamidite





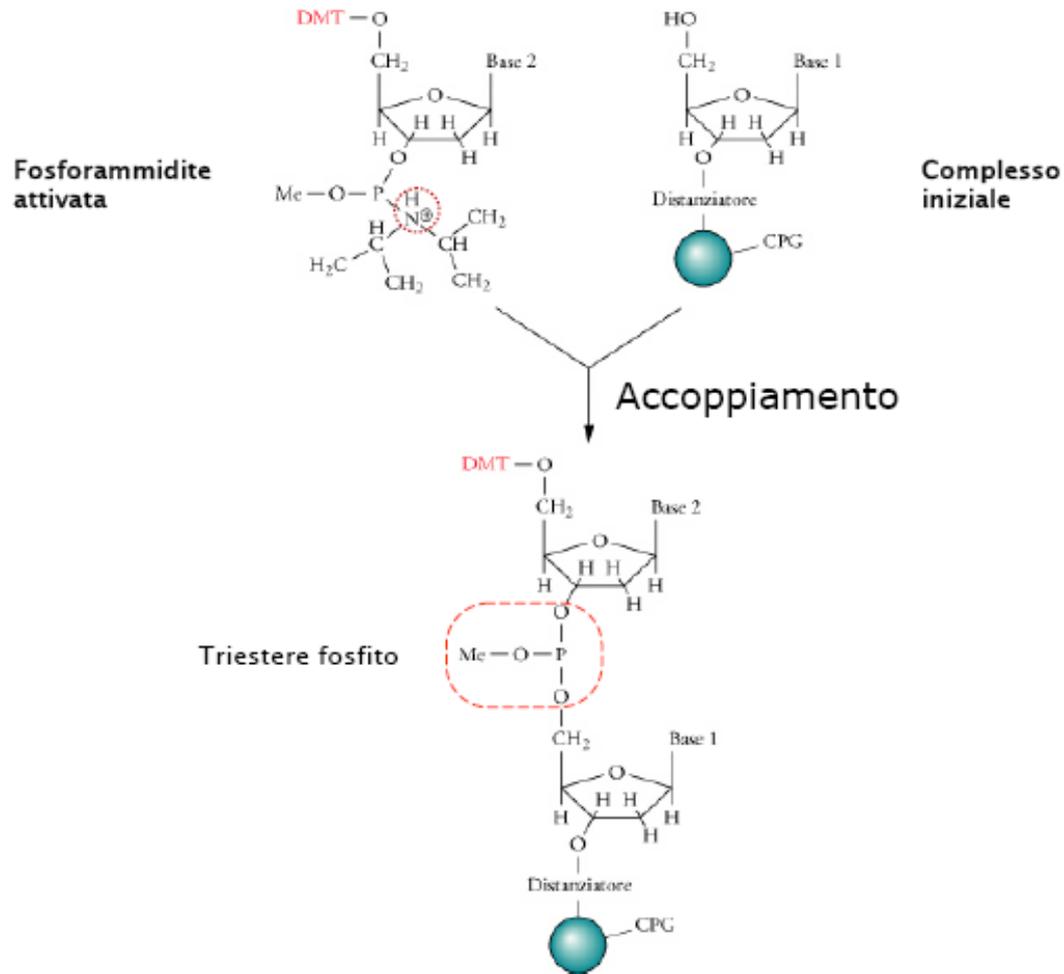
Sintesi di Oligo...

Detritilazione



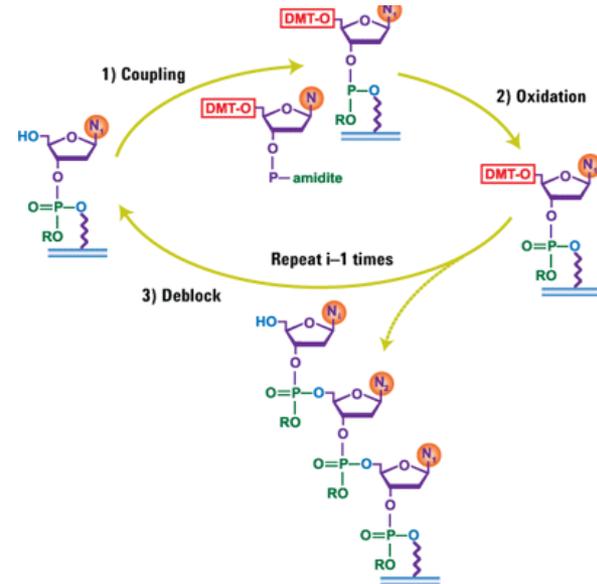
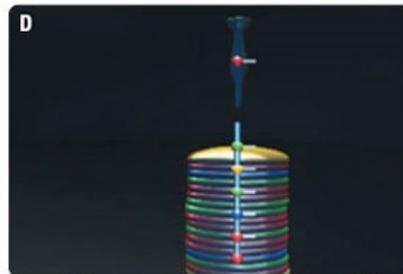
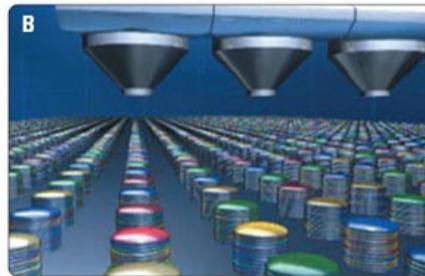
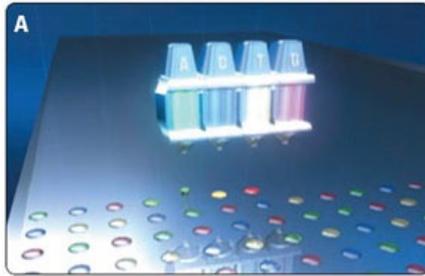


Sintesi di Oligo...



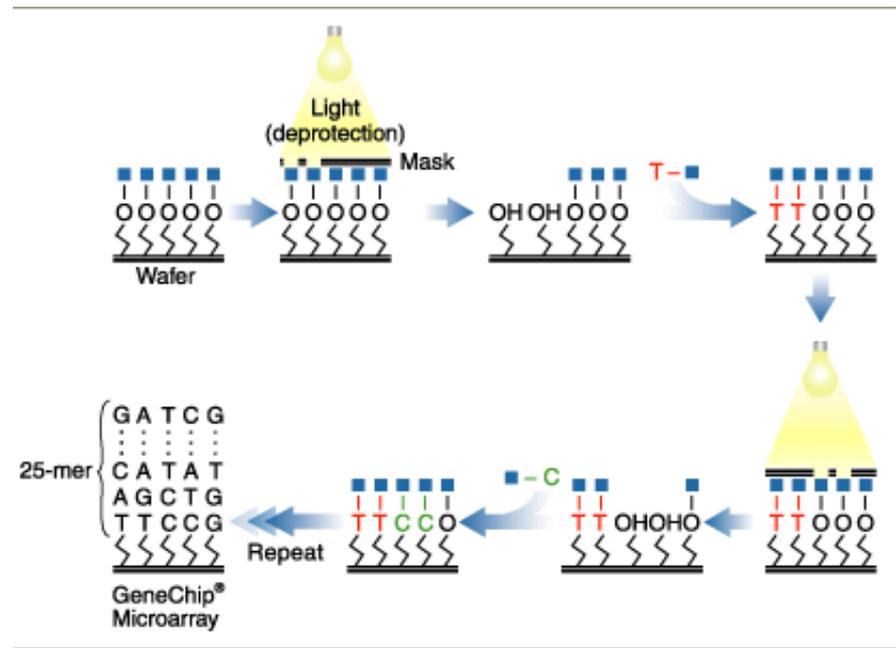
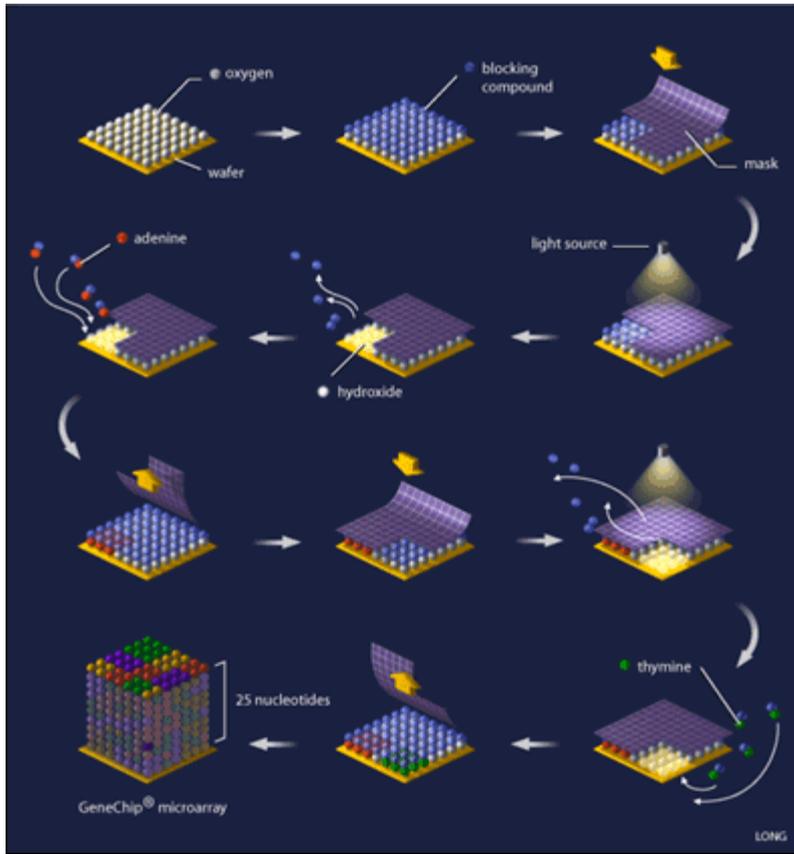


Come può essere costruito un MICROARRAY? (Chip ad oligo) – Metodo InkJet





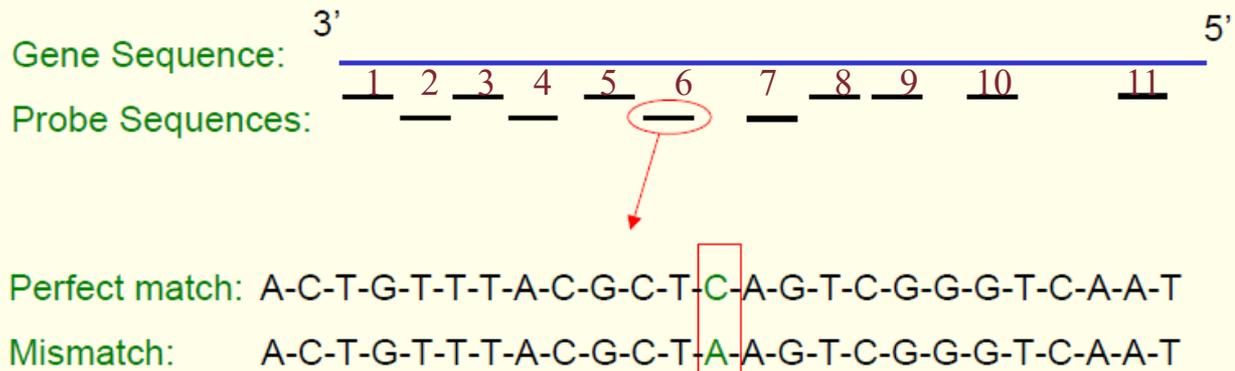
Come può essere costruito un MICROARRAY? (Chip ad oligo) – Metodo Affymetrix





Chip ad oligo: meno immediati

OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAYS (GeneChips)



$$e_g = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J (PM_{gj} - MM_{gj})$$

"average difference" or "signal"

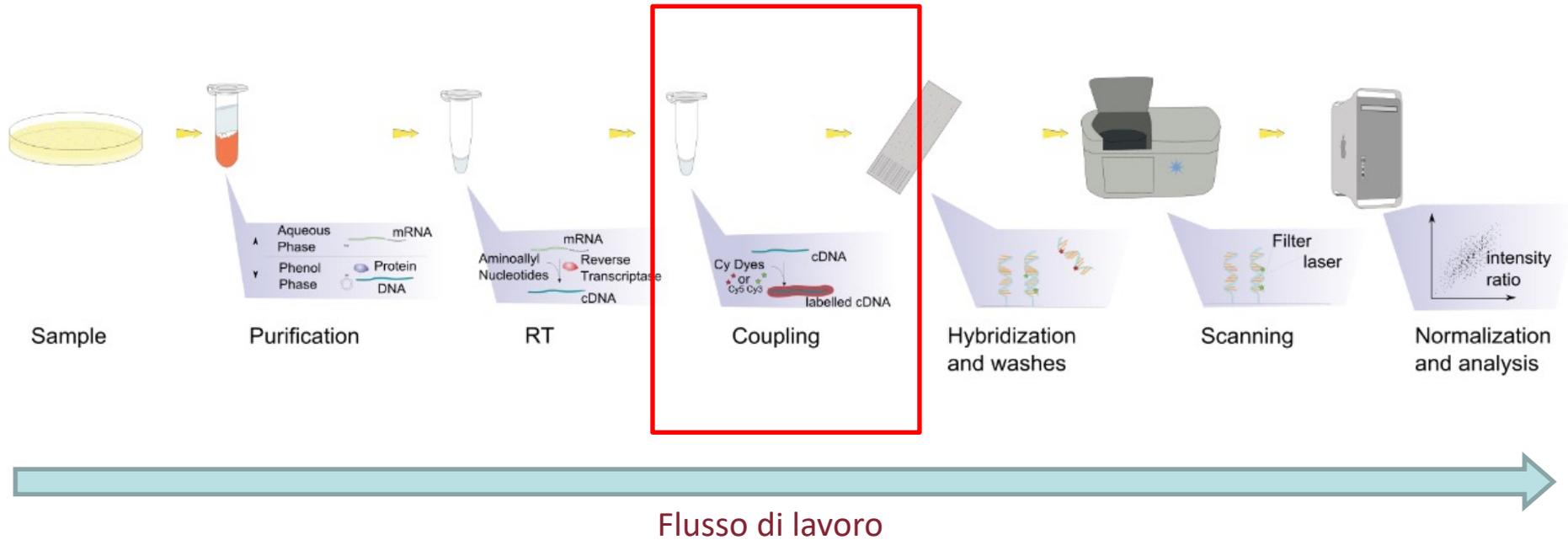


Passiamo alla Tecnica...

Abbiamo detto: “tramite questa tecnica è possibile analizzare tutti i geni espressi in un dato momento e in un dato tessuto o gruppo di cellule”

Il Trascrittoma è l'intero corredo dei geni espressi (cioè dei trascritti, comprese le varianti alternative di splicing) che si trovano in un particolare tipo di cellula o di tessuto, in condizioni ben definite. Può comprendere informazioni sull'abbondanza relativa o assoluta dei trascritti.

Passiamo alla Tecnica... Schematizzazione:

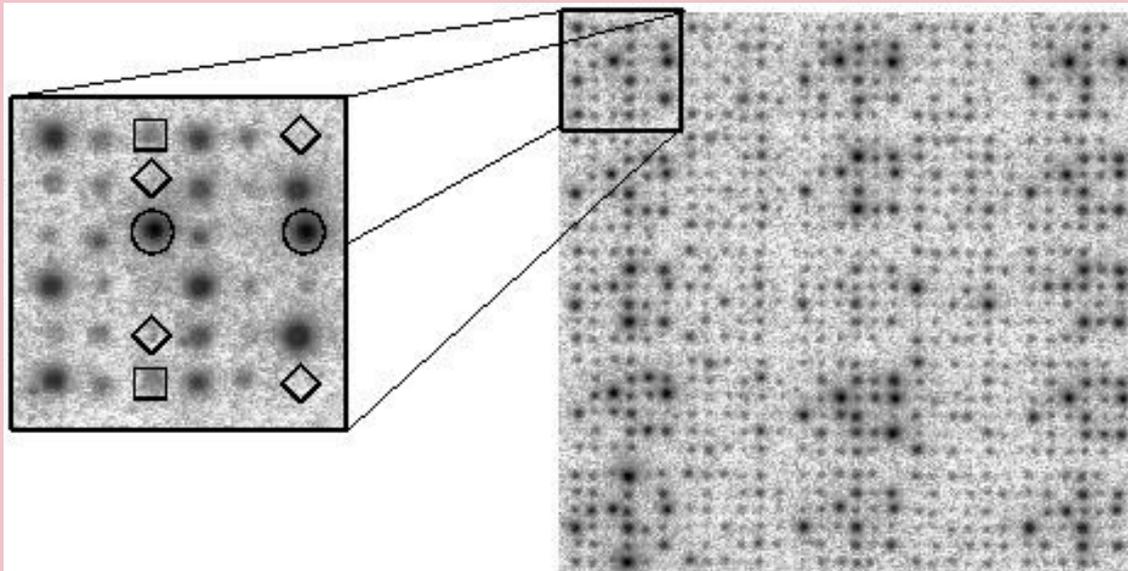




Passiamo alla Tecnica...

Marcatura: es. radioattiva

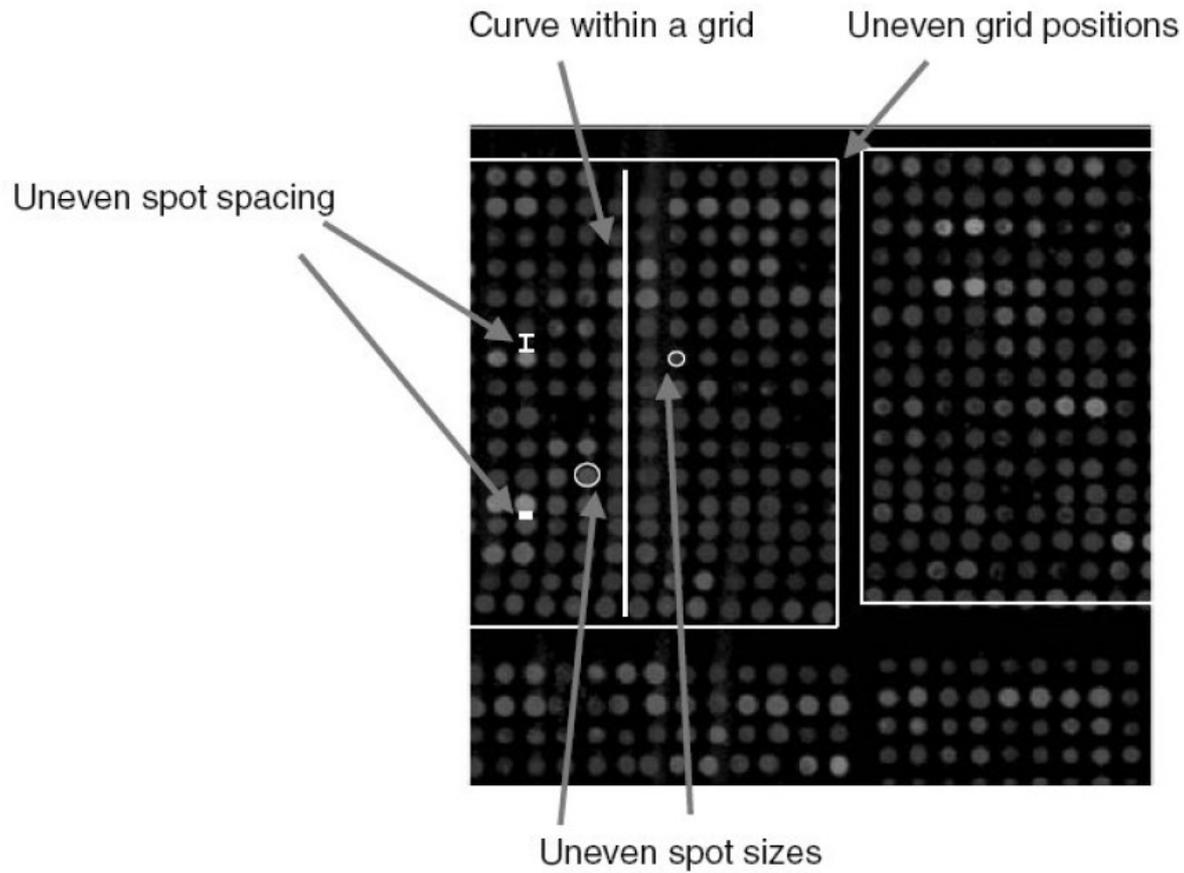
Isotopi radioattivi





Passiamo alla Tecnica...

Scanning:

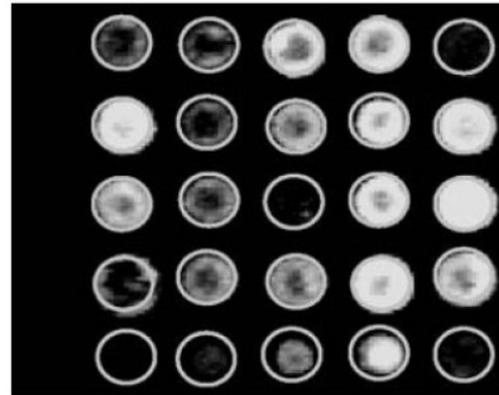


Passiamo alla Tecnica...

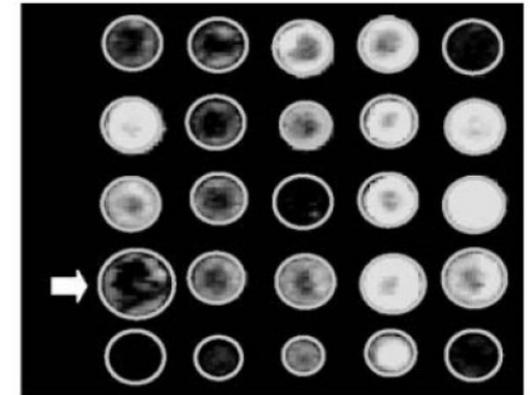
Scanning:

TABLE 4.1: Segmentation Algorithms of Common Image-Processing Software Packages

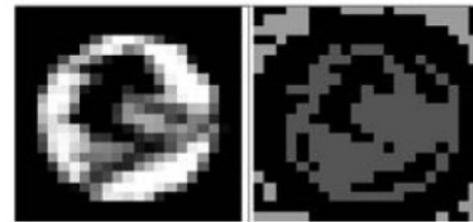
Segmentation Method	Software Implementing Method
Fixed Circle	ScanAnalyze GenePix QuantArray
Variable Circle	QuantArray GenePix Dapple Agilent Feature Extraction
Histogram	ImaGene QuantArray
Adaptive Shape	Spot



(a)

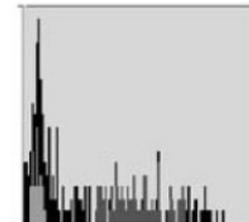


(b)



(c)

(d)

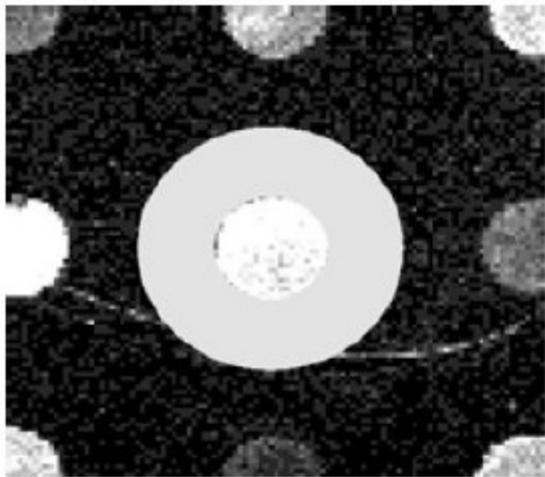


(e)

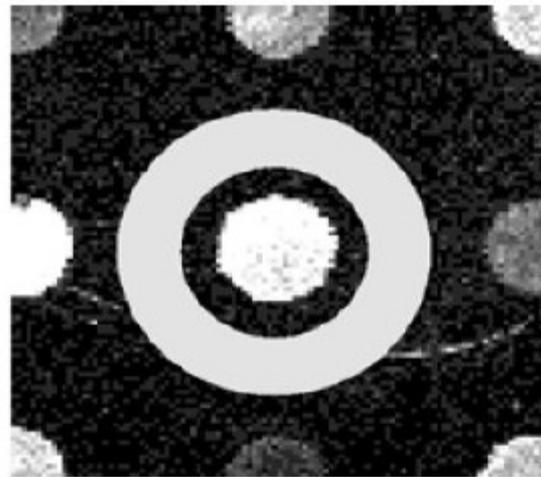


Passiamo alla Tecnica...

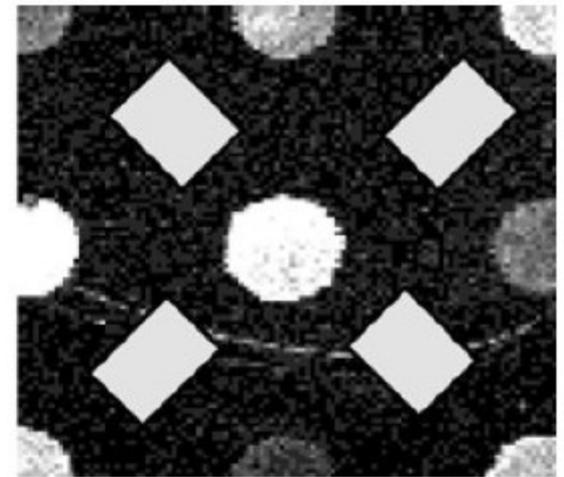
Scanning:



(a)



(b)



(c)

Passiamo alla Tecnica...

Informazione Numerica:

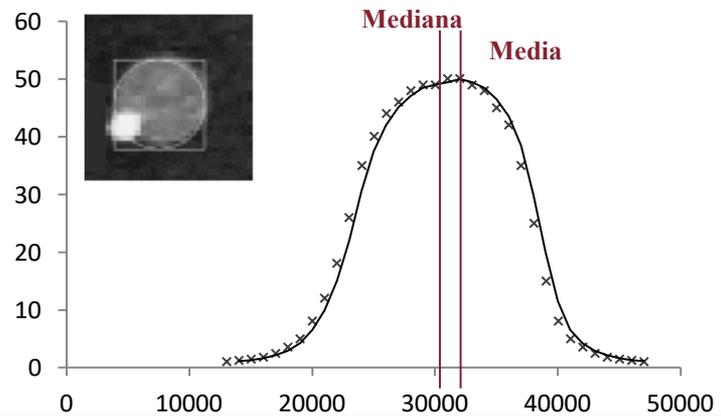
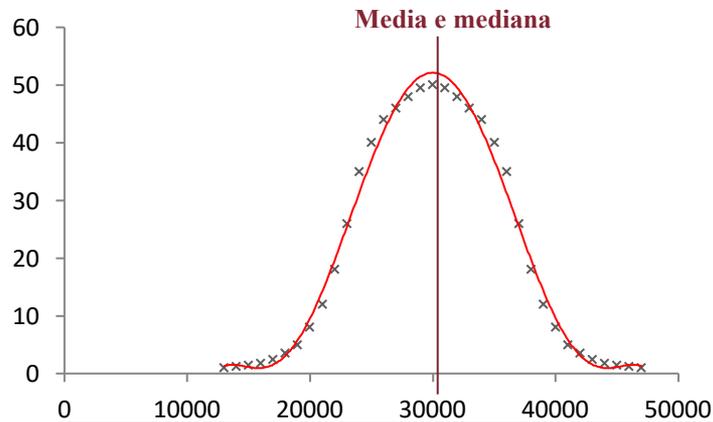
TABLE 4.2: Example Output from ImaGene

Meta Row	Meta Column	Row	Column	Gene ID	Flag	Signal Mean	Background Mean	Signal Median	Background Median	Signal Stdev	Background Stdev	Diameter
1	1	1	1	H3126A06-3	0	29453.02	99.27228	31434	94.5	5165.786	31.88765	14
1	1	1	2	H3126A06-3	0	35591.85	134.6042	35718.5	124	3781.532	54.10425	14
1	1	1	3	H3126C06-3	0	455.3077	109.5556	436	109	112.4157	20.80846	14
1	1	1	4	H3126C06-3	0	780.3725	95.34177	786	95	136.1061	14.2317	14

$$M_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$Me = X_i + (X_{i+1} - X_i) \frac{0,5 - F_{i-1}}{F_i - F_{i-1}}$$

$$\sum_{i=1}^N |x_i - Me| \leq \sum_{i=1}^N |x_i - c| \quad \forall c$$





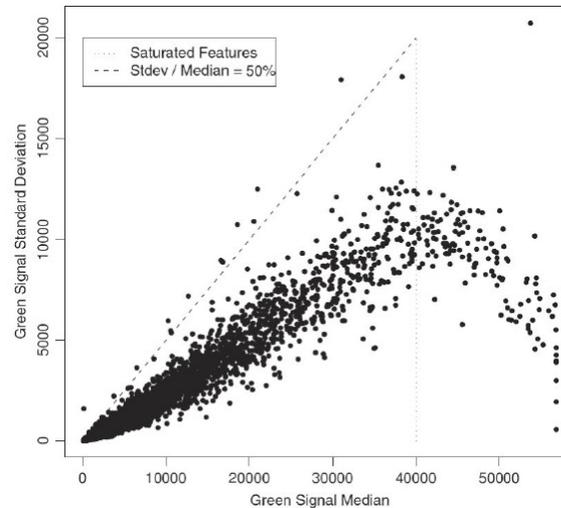
Passiamo alla Tecnica...

Informazione Numerica:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

TABLE 4.2: Example Output from ImaGene

Meta Row	Meta Column	Row	Column	Gene ID	Flag	Signal Mean	Background Mean	Signal Median	Background Median	Signal Stdev	Background Stdev	Diameter
1	1	1	1	H3126A06-3	0	29453.02	99.27228	31434	94.5	5165.786	31.88765	14
1	1	1	2	H3126A06-3	0	35591.85	134.6042	35718.5	124	3781.532	54.10425	14
1	1	1	3	H3126C06-3	0	455.3077	109.5556	436	109	112.4157	20.80846	14
1	1	1	4	H3126C06-3	0	780.3725	95.34177	786	95	136.1061	14.2317	14





SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



NERO

SOGLIA

SOGLIA

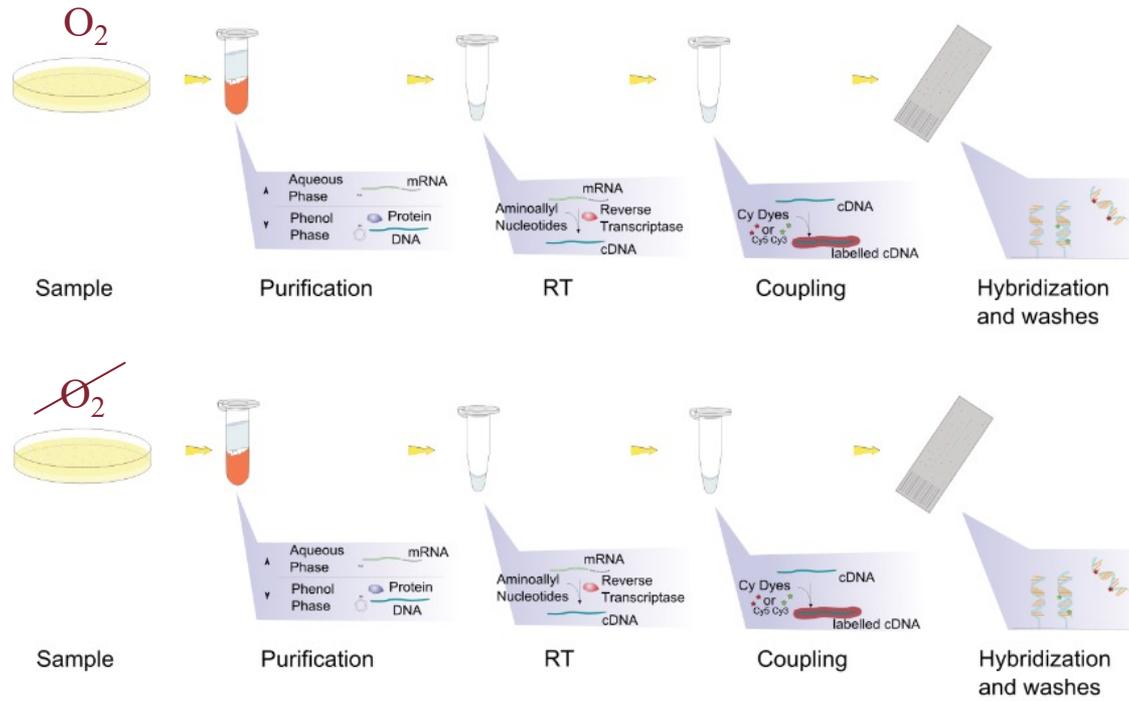
BIANCO



Un esempio pratico...

Problema:

Si hanno due colture di lievito cresciute in due differenti condizioni;
una in condizione di ipossia ed una di controllo



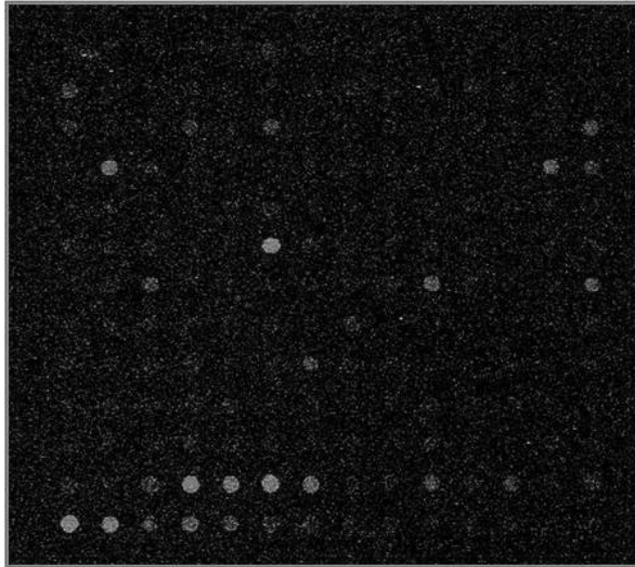


Un esempio pratico...

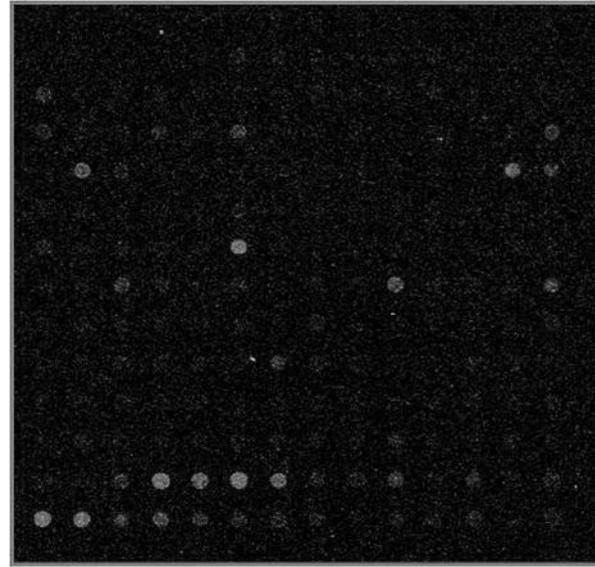
Acquisizione dati e Normalizzazione:

Si hanno due colture di lievito cresciute in due differenti condizioni;
una in condizione di ipossia ed una di controllo

O₂



~~O₂~~

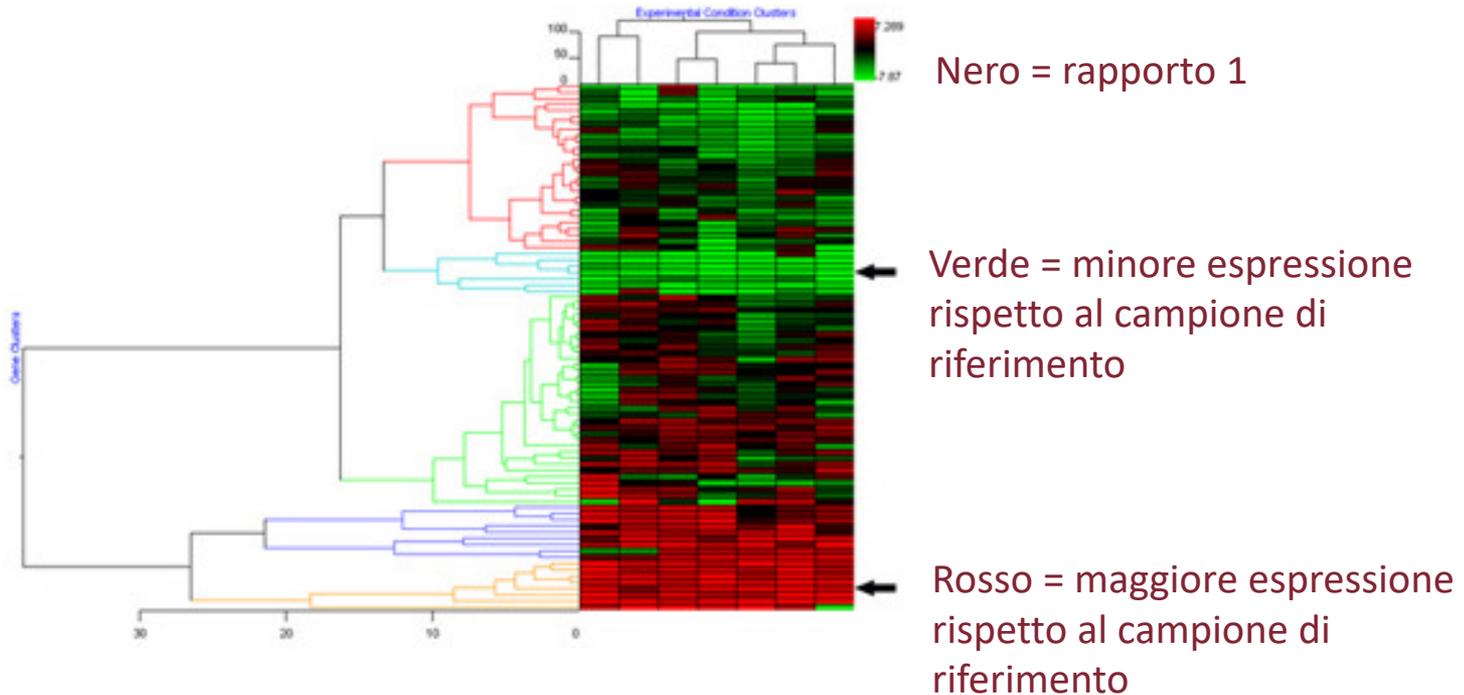




Un esempio pratico...

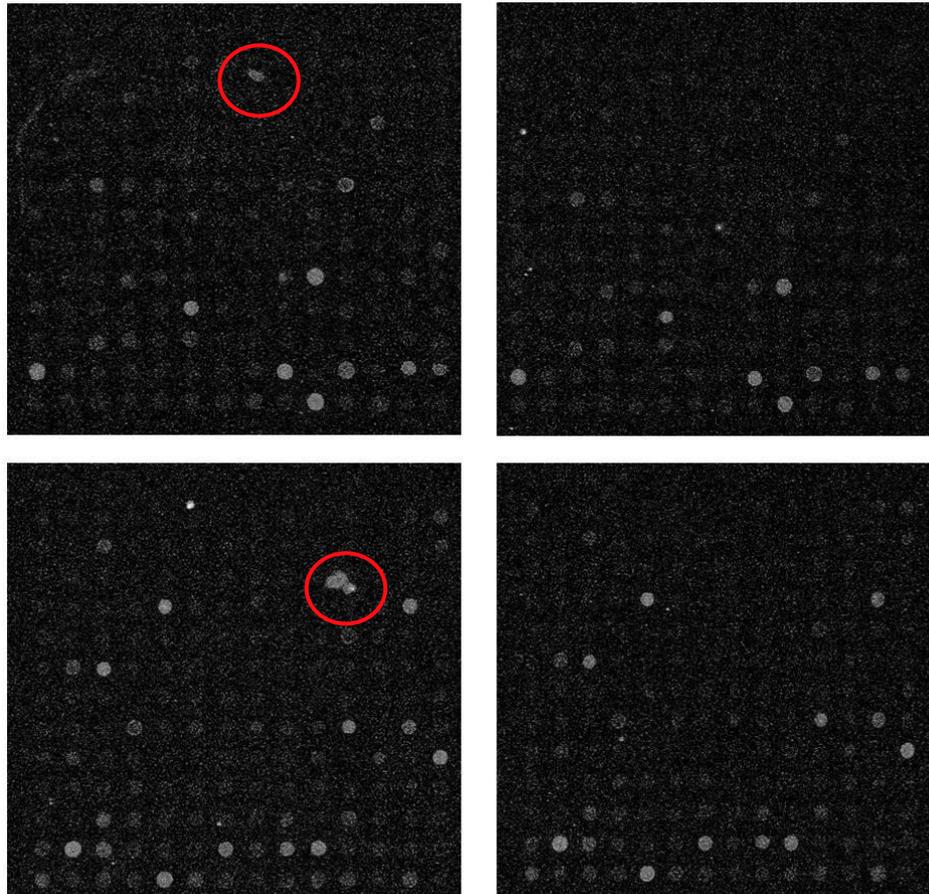
Acquisizione dati e Normalizzazione:

rappresentazioni grafiche immediate che riuniscono i geni in gruppi di espressione con profili simili



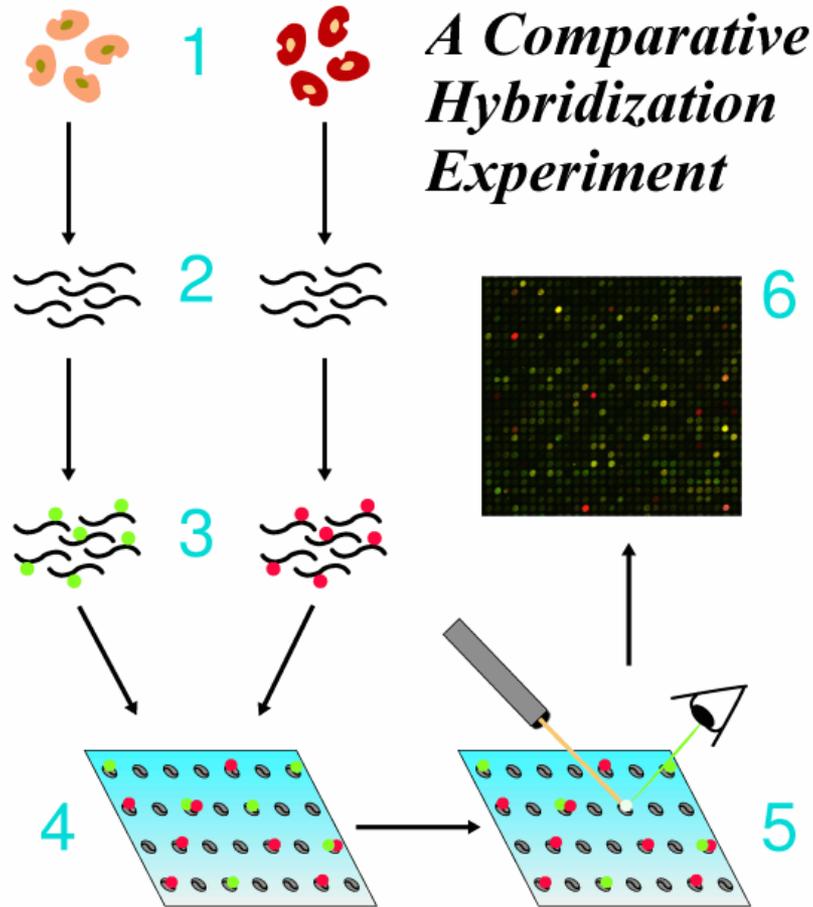


Il problema delle repliche



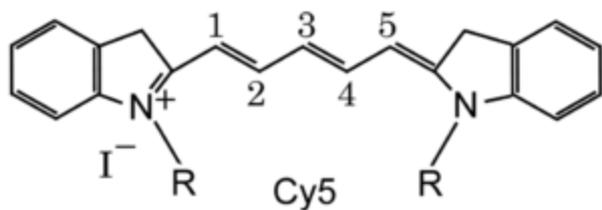
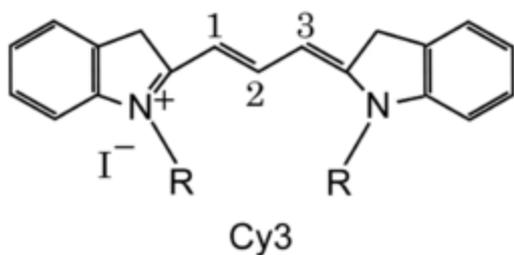


Doppia Marcatura





Doppia Marcatura



Probe	Ex (nm)	Em (nm)	MW	Quantum yield
Cy2	489	506	714	QY 0.12
Cy3	550	570	767	QY 0.15
Cy3B	558	572	658	QY 0.67
Cy3.5	581	594	1102	QY 0.15
Cy5	650	670	792	QY 0.28
Cy5.5	675	694	1128	QY 0.23
Cy7	743	767	818	QY 0.28

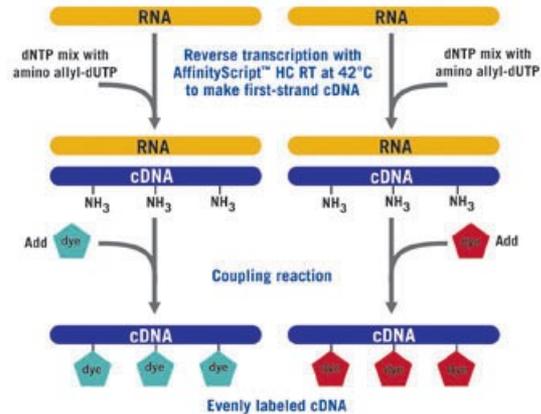


Marcatura diretta

La marcatura diretta consiste nell'incorporazione dei nucleotidi marcati direttamente durante il processo di sintesi di cDNA. Ciò comporta normalmente un'a minore efficienza da parte della retrotrascrizione e un maggior rischio di errori sistematici: **il Cy5 è più difficile da incorporare di Cy3**

Marcatura indiretta

The screenshot shows the Agilent Technologies Genomics website navigation bar. It includes the Agilent logo, the text 'Agilent Technologies | Genomics', a search box, and links for 'Register/Login' and 'Contact Us'. Below this is a main navigation menu with buttons for 'Applications', 'Products', 'Services', 'Support', 'Resources', and 'Shop'. A secondary navigation bar contains links for 'Overview', 'Agilent Microarray Technology', 'Product Finder', 'Related Literature', and 'Related Science'. A 'Agilent.com' button is also visible on the right side.



La marcatura indiretta, al contrario consiste nell'incorporazione dei nucleotidi marcati successivamente al processo di sintesi di cDNA



Problemi con la doppia marcatura

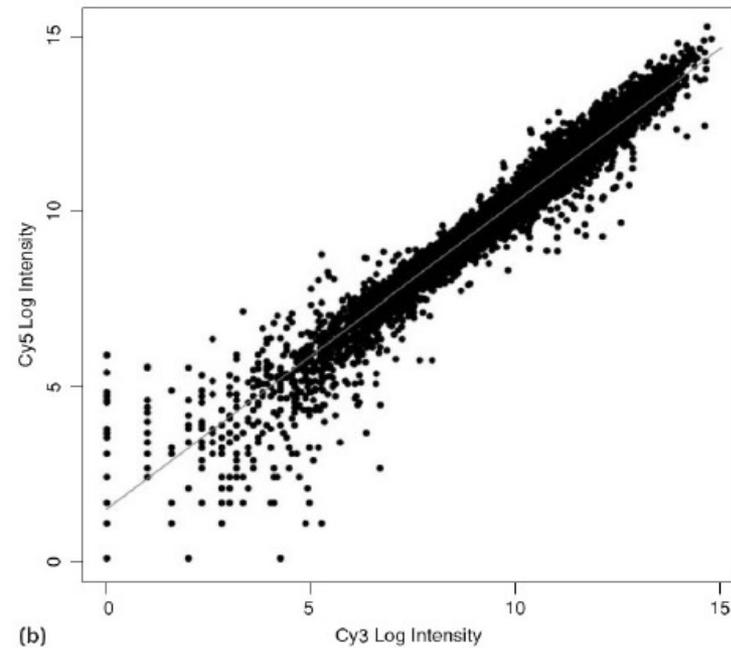
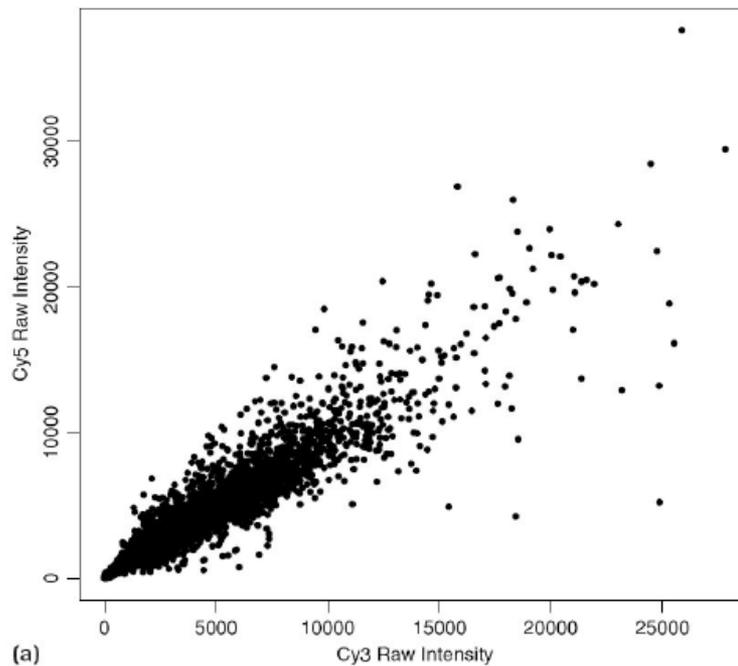
1. L'intensità di emissione non è uguale per entrambi i fluorocromi
2. Lo scanner non legge le stesse intensità per entrambi i fluorocromi
3. Problemi di degradazione dei fluorocromi



Passaggio ai logaritmi

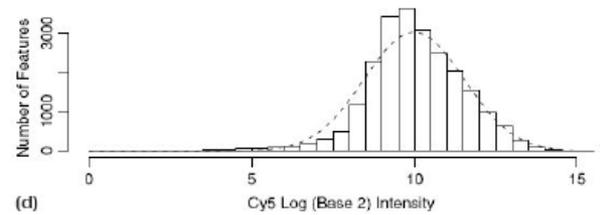
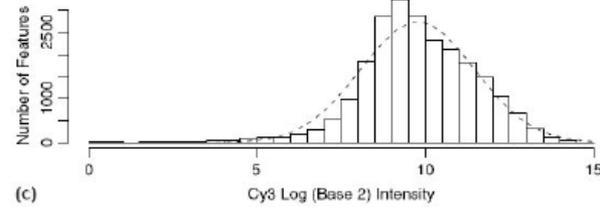
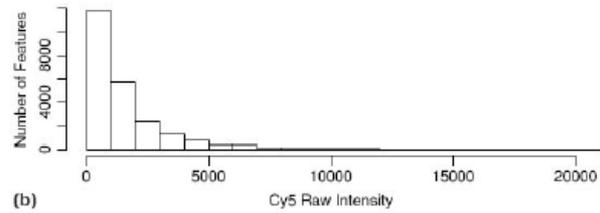
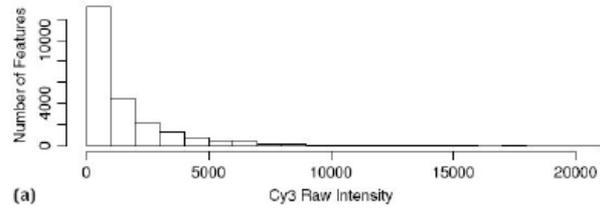
I dati vengono trasformati dalla loro forma originaria alla forma logaritmica:

1. Ragionevole distribuzione dei campioni su tutto l'intervallo di intensità
2. La variabilità dovrebbe essere costante per tutte le intensità
3. La distribuzione degli errori sperimentali dovrebbe essere approssimativamente normale





Passaggio ai logaritmi





Passaggio ai logaritmi

$$E = \text{Log}_2 C^1 - \text{Log}_2 C^2$$

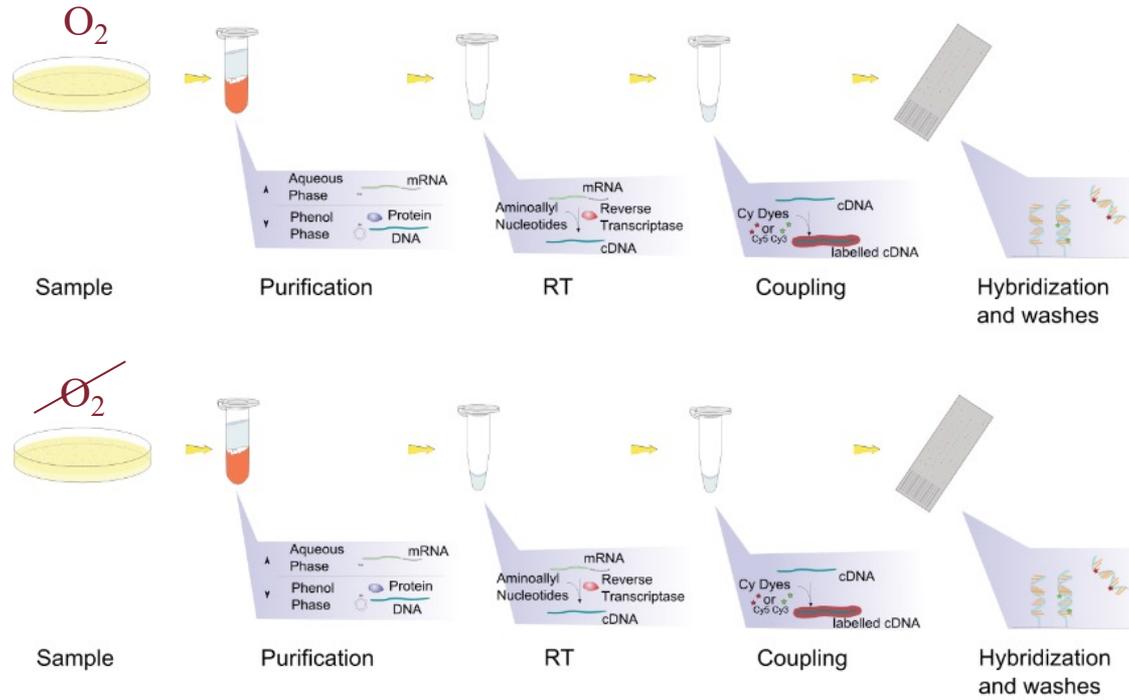
TABLE 5.2: Conversion from Fold Ratios to Log (to Base 2) Ratios

Fold Ratio	Log (to Base 2) Ratio Difference
4-fold down-regulated	-2
3-fold down-regulated	-1.58
2-fold down-regulated	-1
1.5-fold down-regulated	-0.58
No change	0
1.5-fold up-regulated	0.58
2-fold up-regulated	1
3-fold up-regulated	1.58
4-fold up-regulated	2

Un esempio pratico...

Problema:

Si hanno due colture di lievito cresciute in due differenti condizioni;
una in condizione di ipossia ed una di controllo





SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA