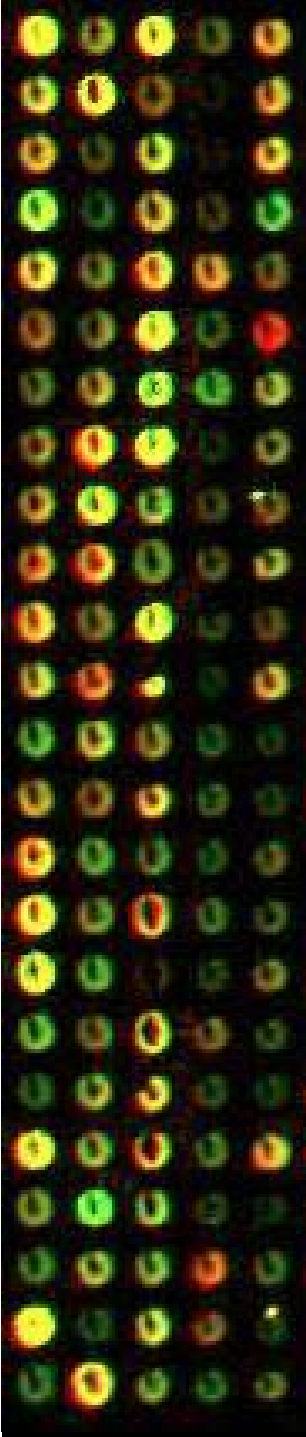


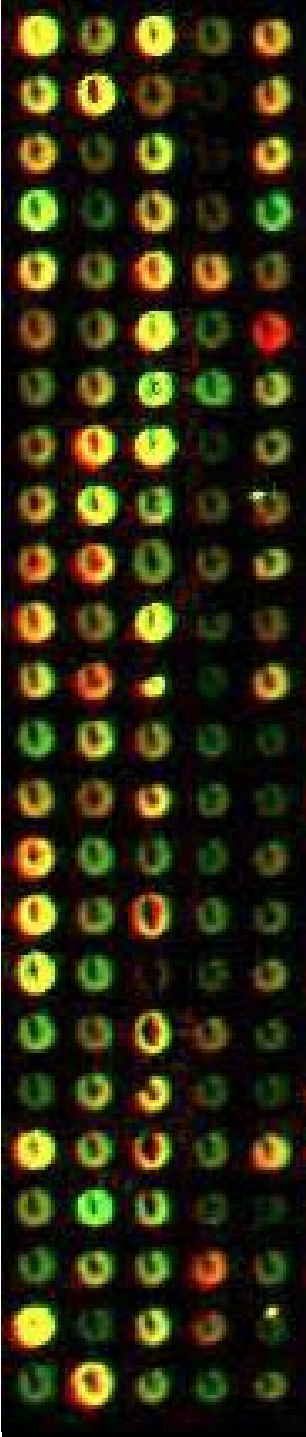
microarray teknolojisi
ekolojik ve evrimsel
çalışmalarda kullanımı

Kahraman İpekdal

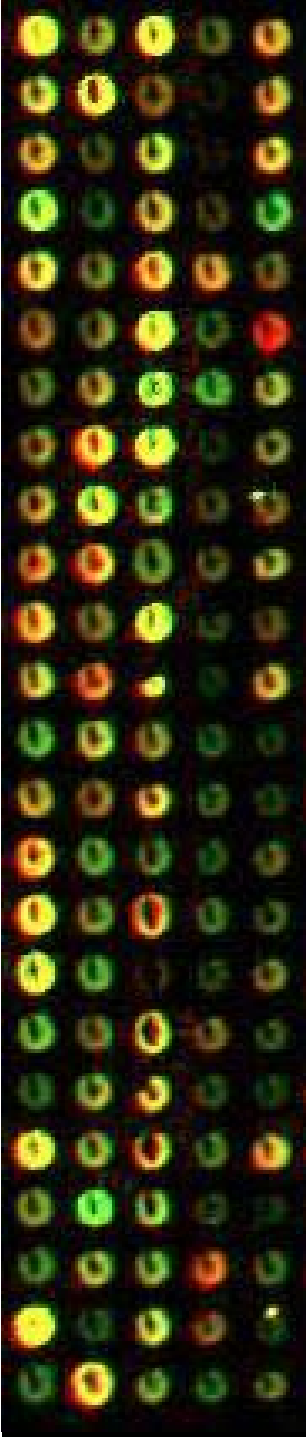
microarray nedir?

- DNA microarray'i (gen ipi, DNA ipi ya da biyoip olarak da bilinir) ekspresyon profili oluşturmak, başka bir ifade ile binlerce genin ekspresyon düzeyini aynı anda izlemek amacı ile cam, plastik veya silikon ip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır.

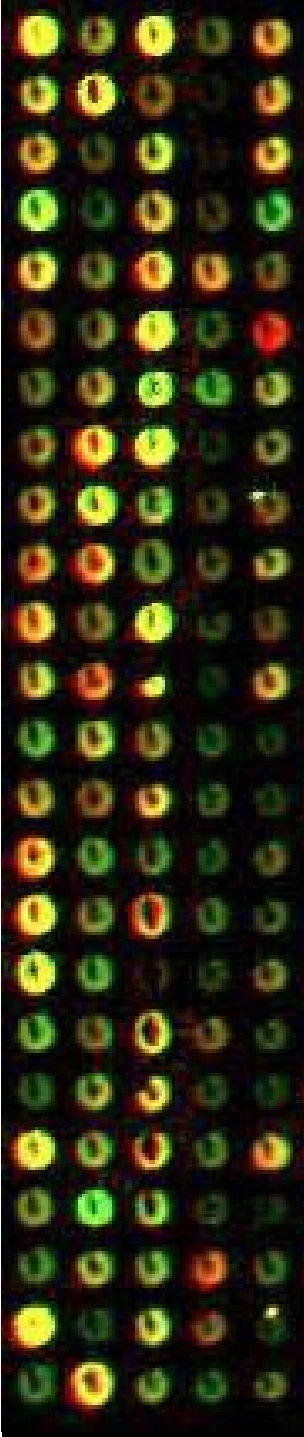




- Bir microarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilir. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentleri (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) **probe** olarak tanımlanmıştır.



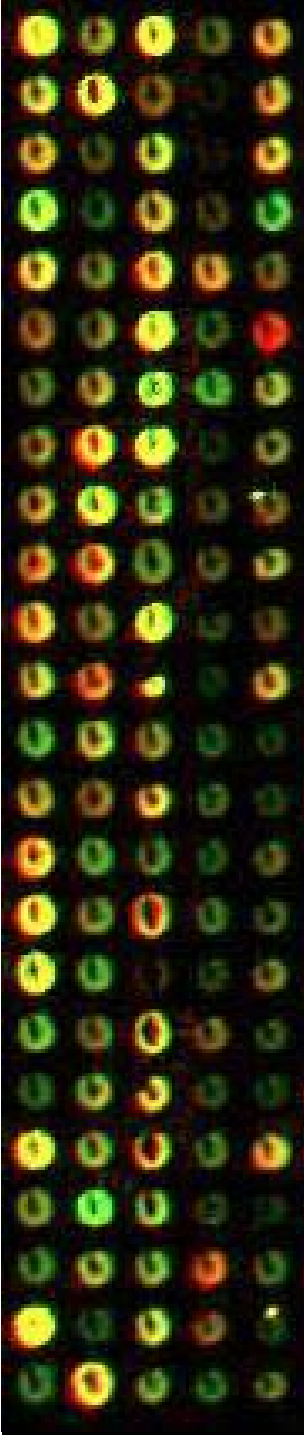
- Microarray teknolojisi DNA nın bir substrata tutturulup bilinen bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek “**Southern blotting**” tekniğinden türetilmiştir.



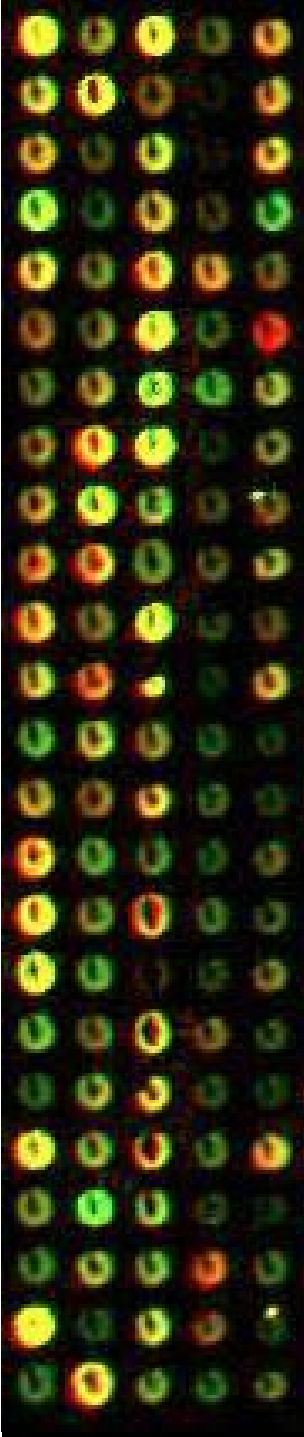
- Gen ekspresyonunun microarray'ler kullanılarak ölçülmesi biyoloji ve tıbbın pek çok alanında uygulanabilirlik arz etmektedir. Örneğin microarray'ler hastalıklı ve normal bir hücrede gen ekspresyonunun karşılaştırılması suretiyle hastalık ile alakalı genlerin belirlenmesinde kullanılabilir.



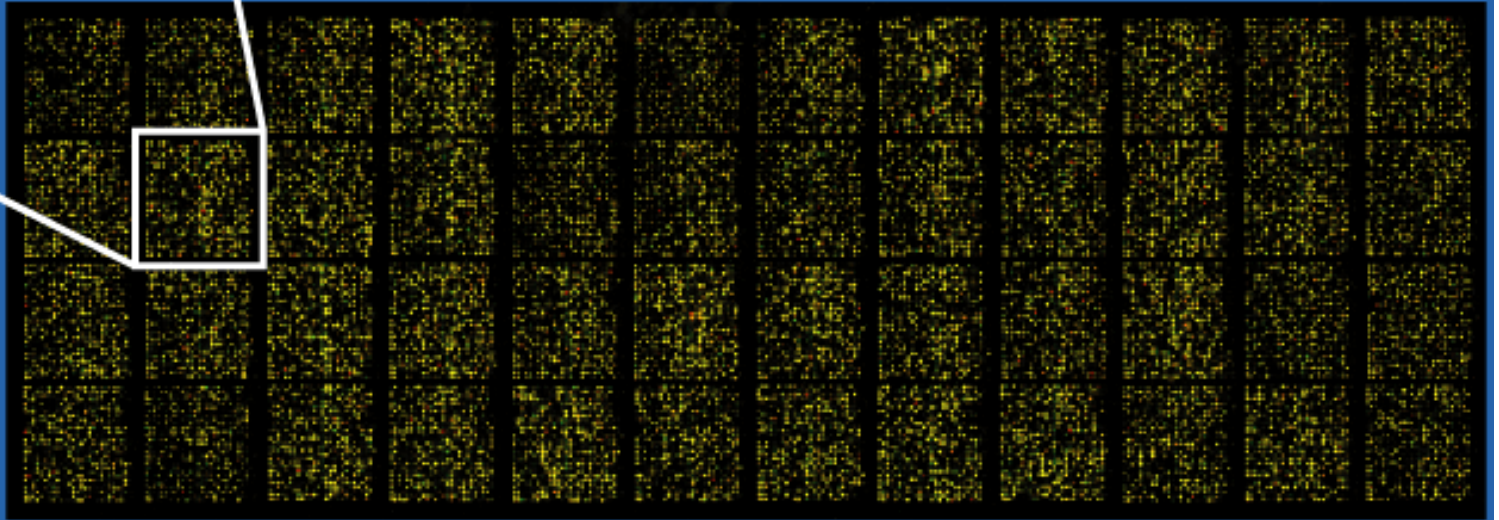
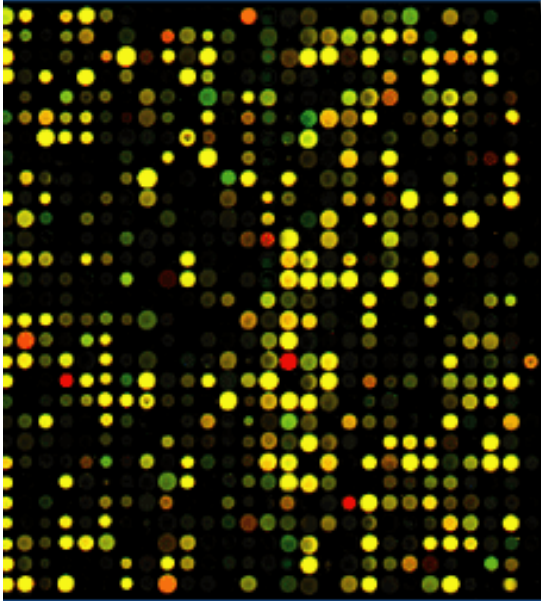
- DNA microarray'leri aktif proteinlere çevrilebilen ya da çevrilemeyen RNA'ların saptanmasında kullanılabilir. Bu tip analizler **ekspresyon analizi** ya da **ekspresyon profili belirleme** şeklinde adlandırılır.



- Microarray'lerin gen ekspresyonu için kullanımı ile ilgili çalışmalar ilk kez 1995'de Science Dergisi'nde yayınlanmıştır.
- Microarray ile tamamlanan ilk ökaryotik genom ise *Saccharomyces cerevisiae*'-ninki olmuştur ve bununla ilgili çalışma da yine Science Dergisi'nde, 1997 yılında yayınlanmıştır.



- Kısaca, diğer tüm sekanslama girişimlerinde olduğu gibi microarray kullanımında da amaç şu sorunun cevabını verebilmektir: Bir organizmanın belirli bir hücre-sinde, belirli bir zamanda ve belirli koşullar altında hangi genler ifade edilmektedir?

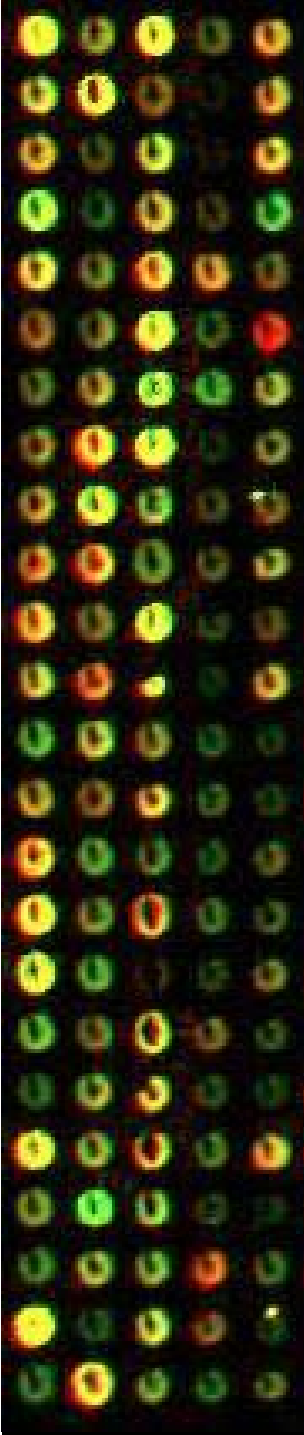


microarray nasıl üretilir?

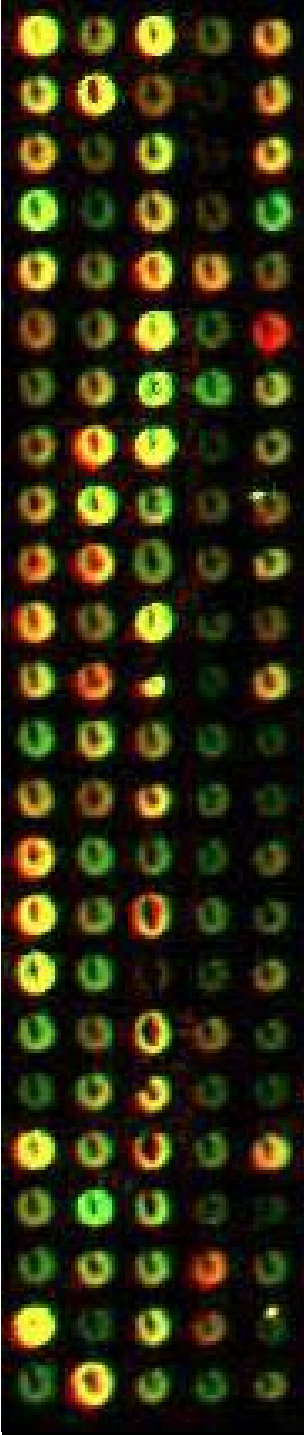
- Microarray'lerin üretiminde çeşitli yöntemler kullanılabilir: Cam lamalar üzerine ince uçlu iğnelerle baskı, önceden hazırlanmış maskelerle fotolitografi, dinamik mikroayna cihazlarıyla fotolitografi, ink-jet baskı, mikroelektrod array'lerinde elektrokimya gibi...



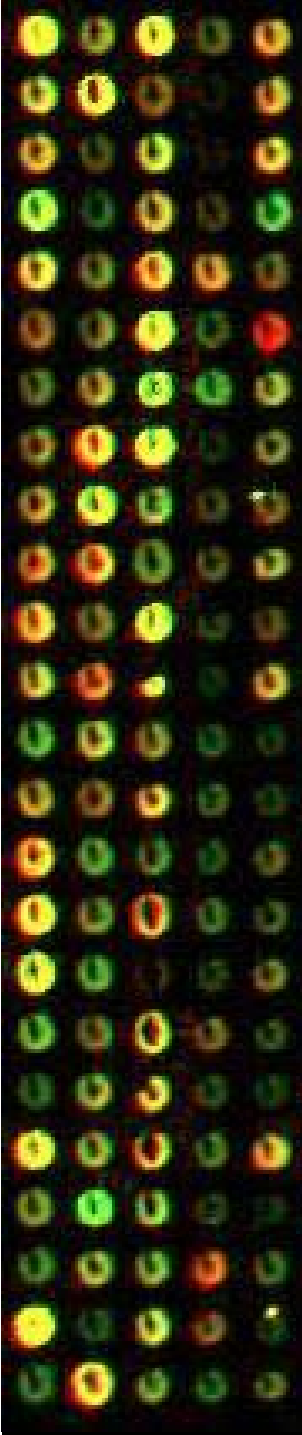
- Microarray üretim aşamalarını şöyle özetleyebiliriz:
- RNA ekstraksiyonu
- İşaretli cDNA hazırlama (rev. transk.)
- Hibridizasyon
- Spin
- Scan



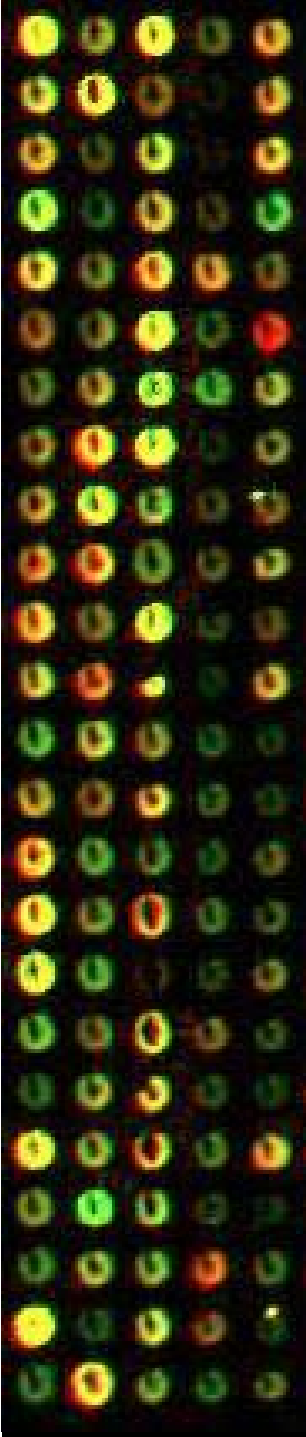
- Gen array'i deneyleri tipik olarak farklı doku ya da koşullardaki ya da bir uygulamadan sonraki (yani farklı zamanlardaki) gen ekspresyon düzeyini tayin etme amacıyla çalışılır. Bu amaçla öncelikle çalışılan konuya göre farklı dokular, koşullar ya da zamanlar baz alınarak RNA ekstraksiyonu yapılır. Bu RNA örnekleri seyreltilerek her bir örneğin eşit yoğunlukta olması sağlanır.



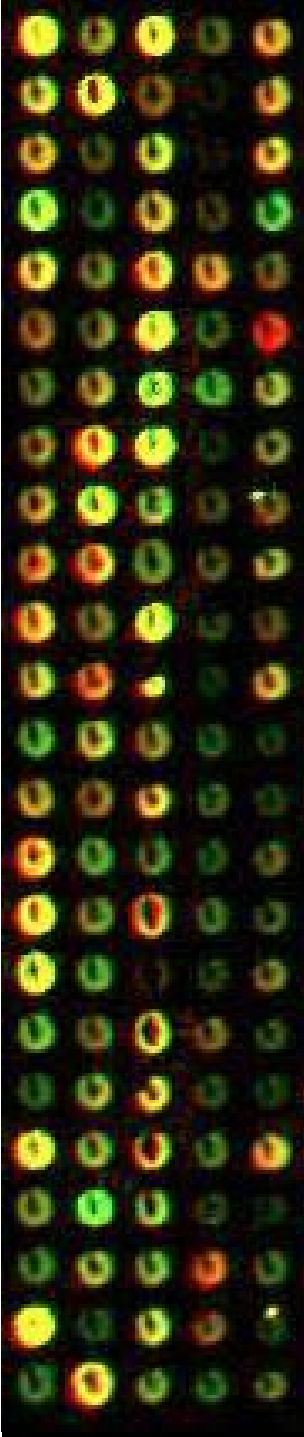
- Kural olarak, asıl RNA populasyonundaki her mRNA molekülü için bu moleküle komplementer olan tek iplikli işaretlenmiş bir cDNA üretilir. Belli bir mRNA'nın yoğunluğu arttıkça cDNA miktarı da artar.



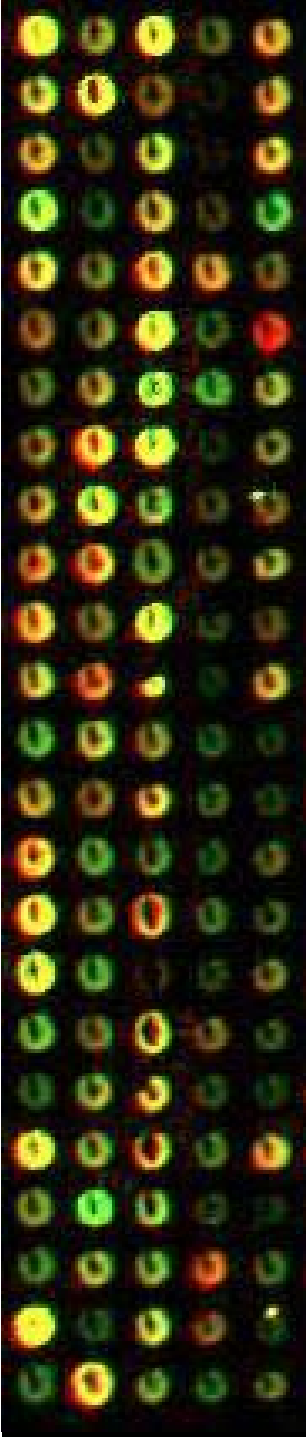
- Problar, işaretli nükleotidlerin varlığında mRNA'nın tek iplikli cDNA'ya reverse transkripsiyonu ile üretilir. Bu nedenle, işaretli prob, aslında mRNA popülasyonunu temsil eden bir cDNA molekülleri popülasyonudur. Tek iplikli bir prob oluşturmak için RNA, mRNA'daki polyA ucu ile baz çifti kurabilen oligo dT primerleri, Reverse Transkriptaz ve işaretlenmiş nükleotidler içeren bir reaksiyon karışımına konur.



- Genellikle işaretlenmiş nükleotidler ya Cy3 ve Cy5 gibi florasan iřaretlerle ya da kimyasal luminesent saptama ile saptanabilen digoksisijenin (DIG) ile etiketlenmiřtir.



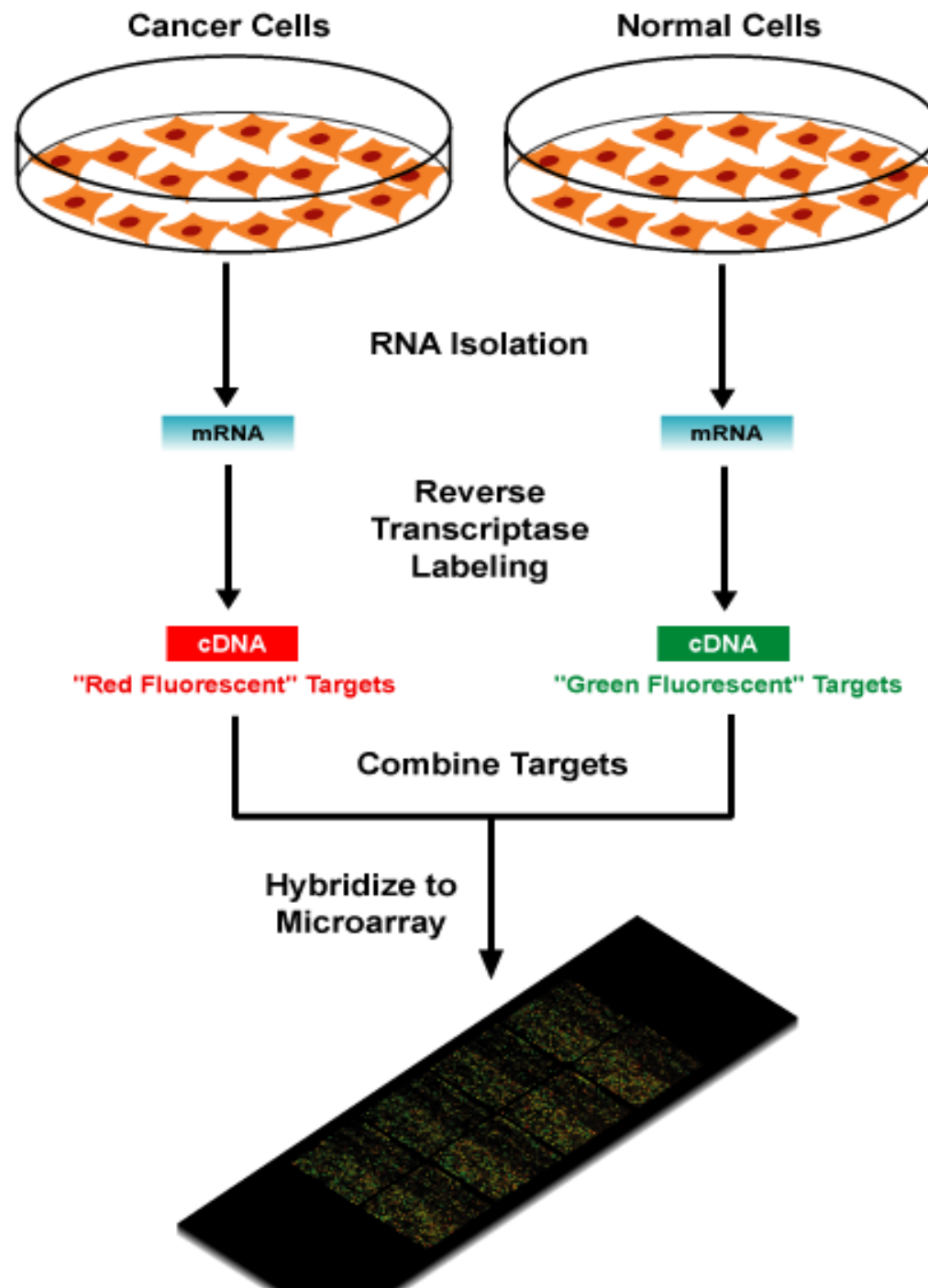
- Problar iki boyutlu bir array'de spotlanmış cDNA'ları içeren filtrelerle hibridize edilir. Ele alınan bir klondaki hibridizasyon miktarı, ilgili gen için bulunan mRNA miktarına karşılık gelir.
- Filtre array'ler prob ile inkübe edilir ve Southern ya da Northern blotting'teki gibi yıkanır.



- Hibridize edilmiş prob DIG işaretleme için kimyasal limünisens, microarray'ler için de doğrudan UV floresans ile tespit edilir. Her spotun sıra yoğunluğu bir CCD kamera ile ölçülür ve veri bir TIF görüntüsü olarak elde edilir.



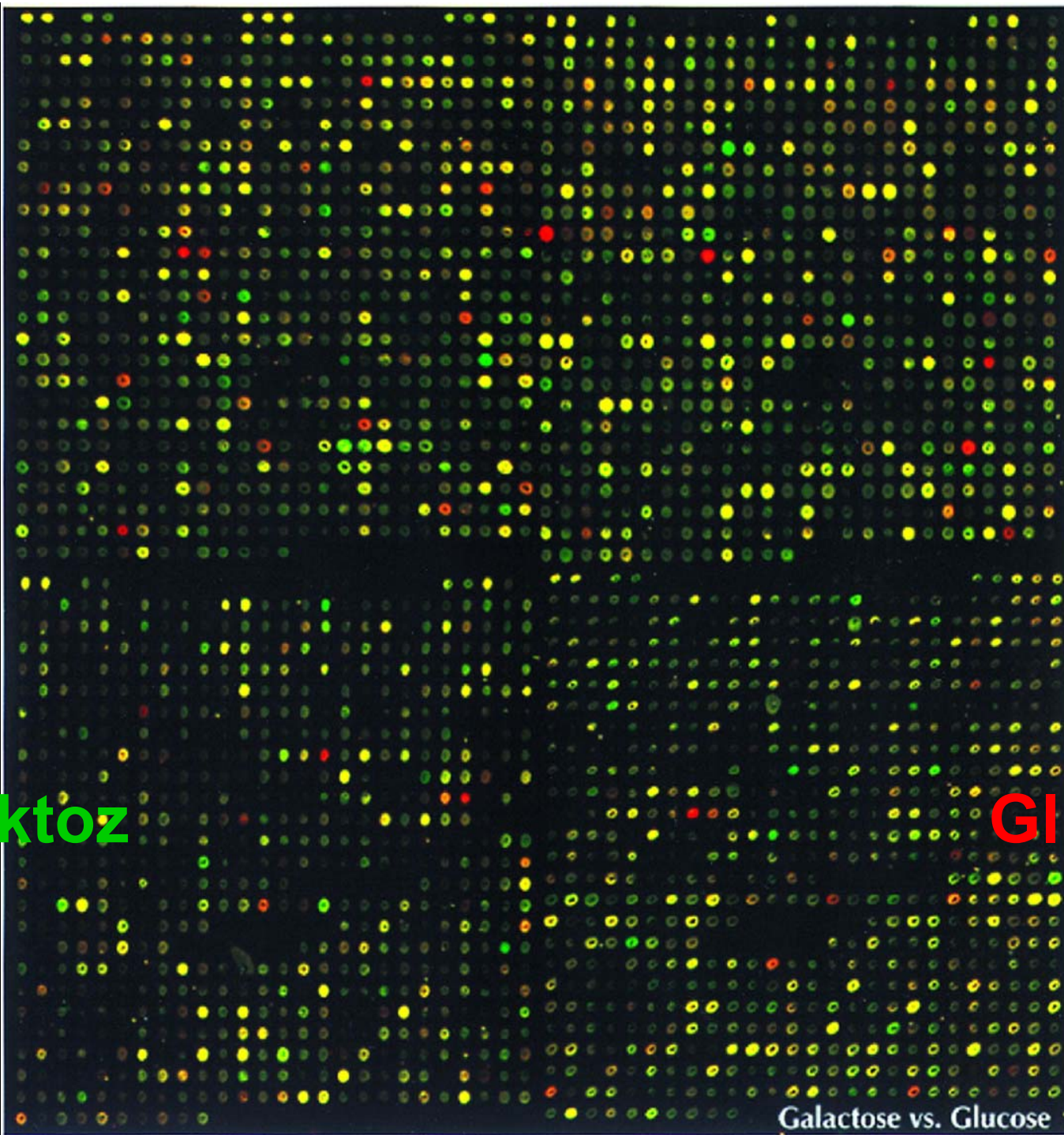
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/chip/chip.html>



Galaktoz

Glukoz

Galactose vs. Glucose



AFFYMETRIX®




@52001900552056050706401000885092

GeneChip®
J2
Human Genome
U133 Plus 2.0



P/N: 520019
Lot #: 4010008
Exp. Date: 05/07/06
For Research Use Only

AFFYMETRIX®




@52002900588841112406401511225338

GeneChip®
S
Mouse Genome
430 2.0 Array



P/N: 520029
Lot #: 4015112
Exp. Date: 11/24/06
For Research Use Only





Chemiluminescent Microarray Analyzer



Applied Biosystems Human Genome Survey Microarray V2.0



Applied Biosystems Rat Genome Survey Microarray

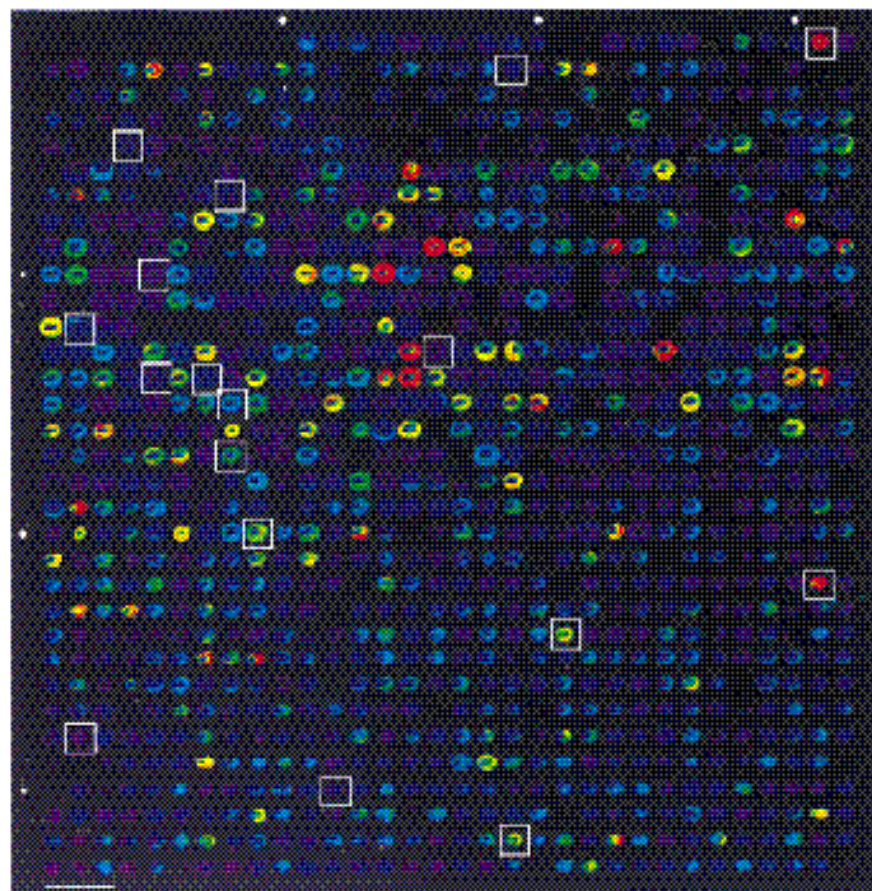


Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit

-Heat Shock

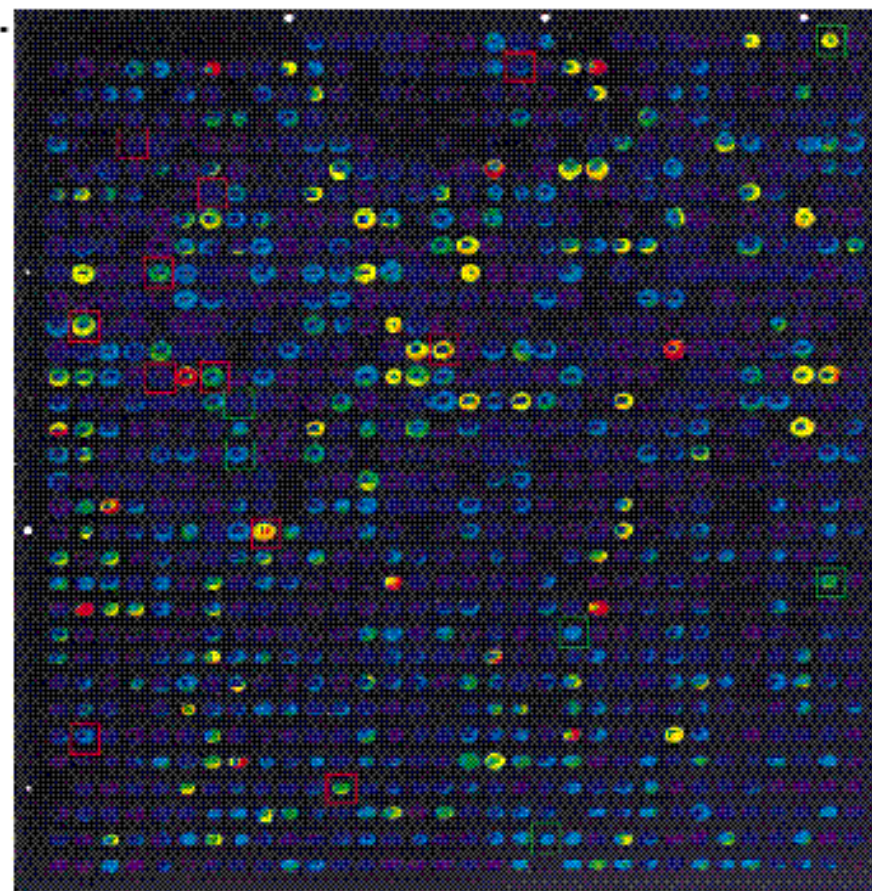
+Heat Shock

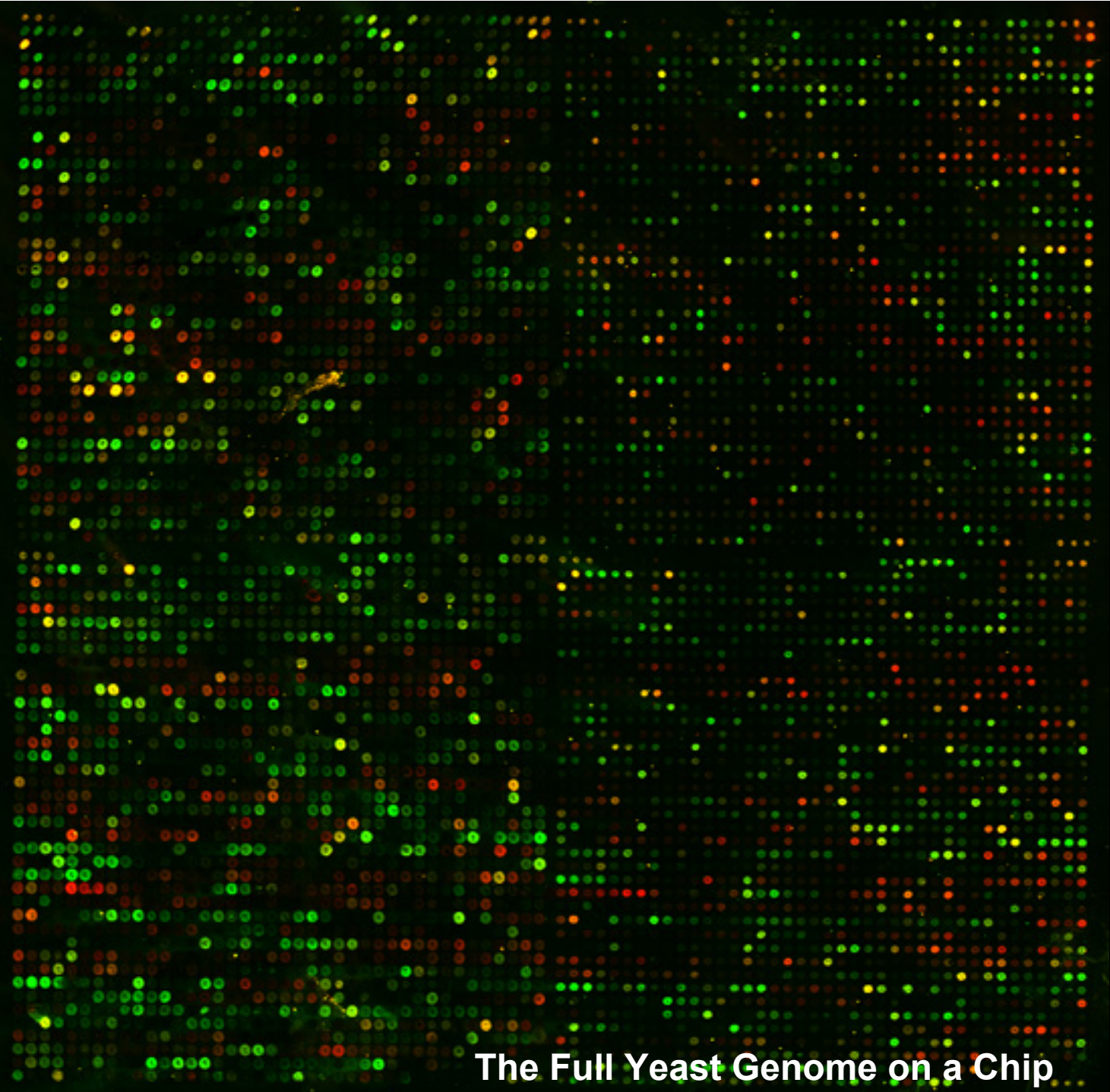
A.



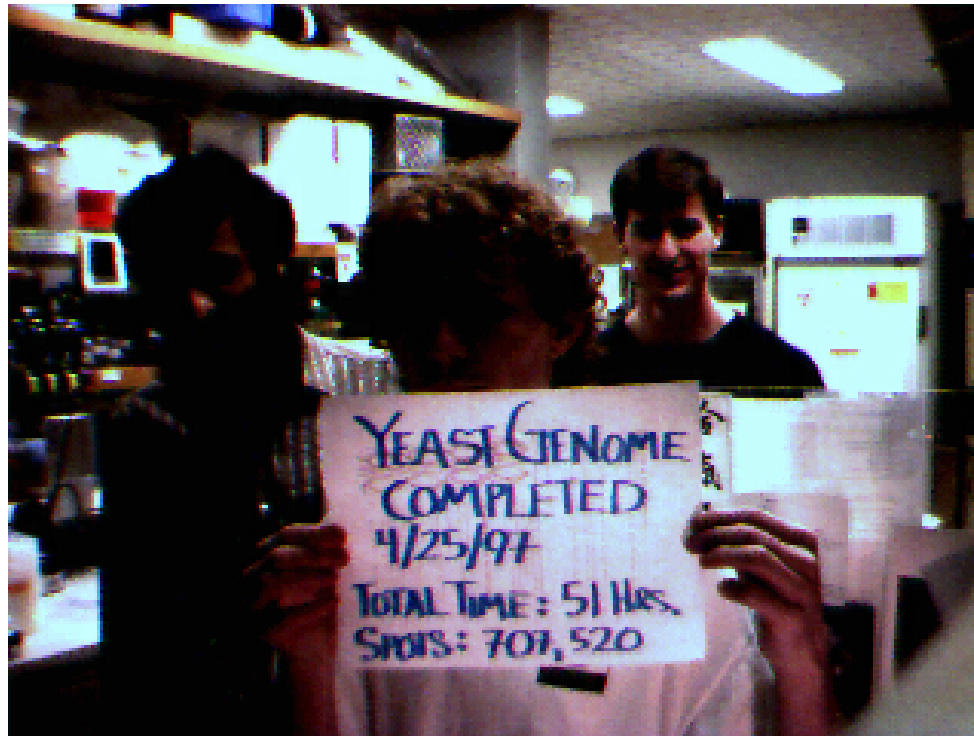
1 mm

B.





The Full Yeast Genome on a Chip



Statistics

6116 Yeast Genes

96 Intergenic regions

+ lots of control samples

Primers purchased from Research Genetics

Total spots printed: 707,520

Total Arrays: 110

Optimal Time to print: 47.1 Hours

Actual Time to print: 52 hours

Actual Speed: 226.7 spots/min

Total Cycles: 1608

Total Water Usage: 23 Liters

Tip Spacing: 221 μ M

Taps per tip: 176,880

Credits: Joe DeRisi

Vishy Iyer

Paul Spellman

Jeff Ravetto

Tracy Ferea

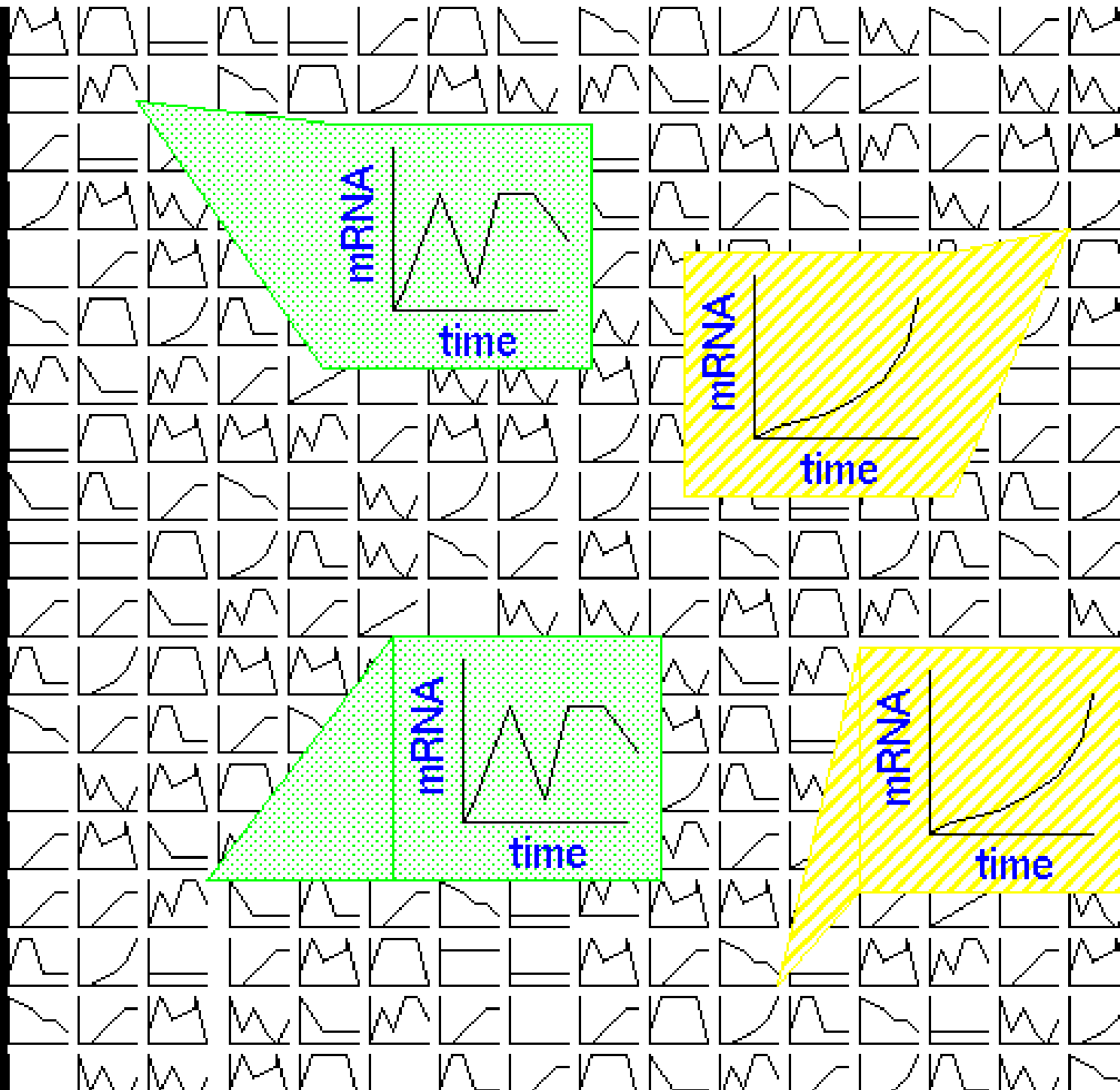
Tai Roe

Kathleen Hayashibara

Raji Pillai

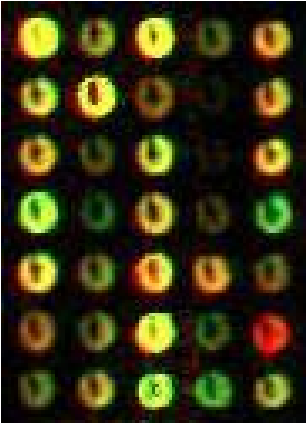
Lolita Penland

Bill Sabala

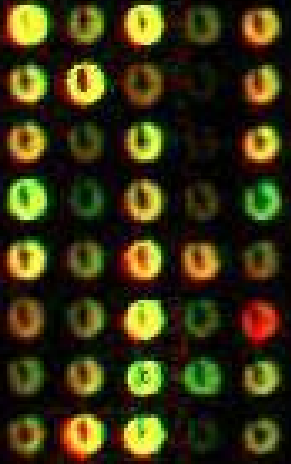




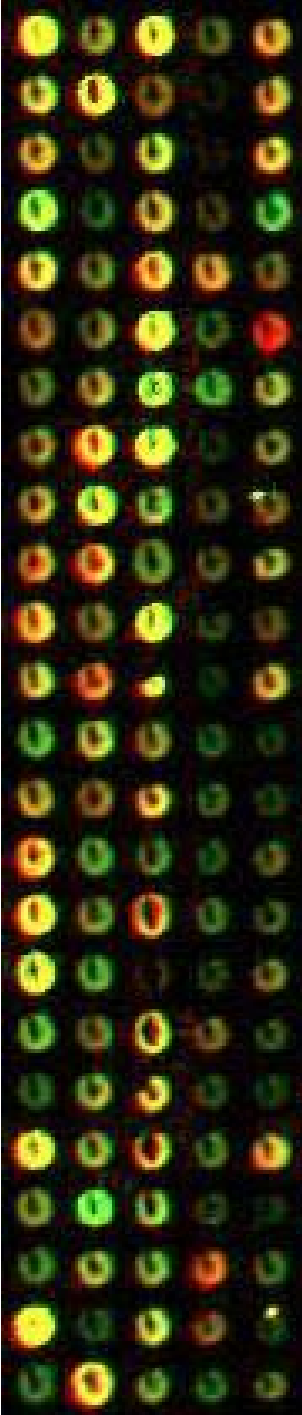
**ekolojik ve evrimsel
çalışmalarda nasıl
kullanılır?**



- Hihara *et al.* (2001) bir tüm genom microarray'i kullanarak bir siyanobakteri cinsi olan *Synechocystis* spp.'de düşük ışık koşulundan yüksek ışık koşuluna aktarılmışın gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini inlemişlerdir. Bu çalışmada, daha önce yüksek ışık uyumu ile ilgili olduğu gösterilen genlere ek olarak pek çok yeni gen de tanımlanmıştır.



- *Arabidopsis*'te yaralanma ve herbivor böcek etkisi arasındaki fark transkript profili ile ortaya konmuş, lahana keleşleri larvalarının beslenmesinin bitkilerde özgül olmayan stres cevabı oluşturmadığı ve hatta muhtemelen, bu cevabın oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Reymond *et al.*, 2000).



Sıkıntılar

- Türler arası microarray denemeleri her tür için bir tane array hazırlamanın çok da gerekli olmadığını göstermektedir. *Arabidopsis* microarray'leri *Arabidopsis* ve *Brassica napus* tohumlarındaki ekspresyon profili için iyi uyuşmaktadır. Yalnız burada bir noktaya dikkat etmek gerekir. Microarray'lerin türlerarası deneylerde kullanımı model organizmada bulunmayan yeni genlerin saptanmasına neden olur.



Sıkıntılar

- Pek çok düzenleyici gen (protein sentezi, enzim aktivasyonu ve metabolit bertarafı gibi olaylardan sorumlu gen) mRNA yığılması düzeyinde bulunmaz ve dolayısıyla da bu teknoloji ile saptanamaz.
- Ayrıca microarray çalışmalarının maliyeti de yüksektir ve ekolojik problemin çözümünden elde edilecek kârın bu maliyeti karşılaması gerekmektedir.

The image consists of a 10x10 grid of small, square panels. Each panel shows a dense field of stars, with a few stars highlighted in a bright yellow-green color. The background is dark, and the stars are small, white or light-colored dots. The highlighted stars are scattered across the grid, with a notable concentration in the upper-left and upper-right quadrants. The overall effect is a mosaic of star fields, with the highlighted stars appearing as prominent features in each panel.

Bitti...