

Технология мониторинга экспрессии клеточных геномов

GE Healthcare Life Sciences

“Together, we make the world healthier through imaginative science”



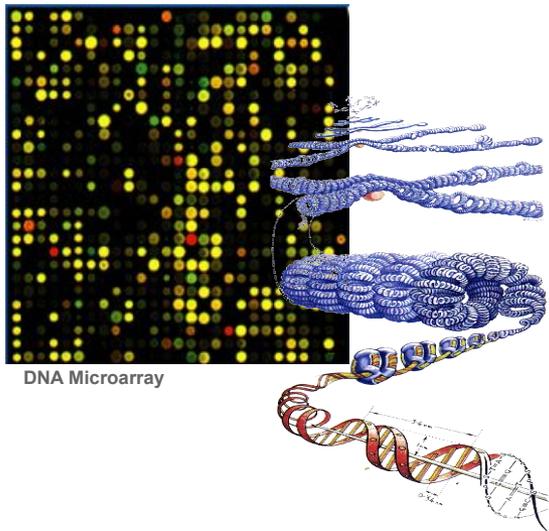
Евгения Чакина

ООО «Аламед»
Официальный дистрибьютор
GE Healthcare Life Sciences



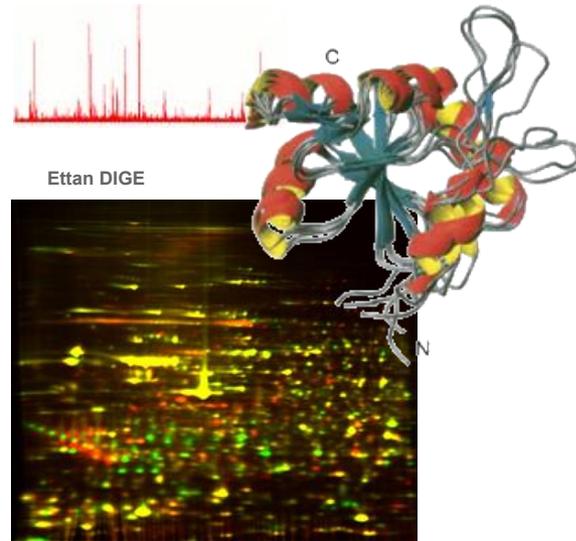
Развитие исследований: от гена до функции

Genomics



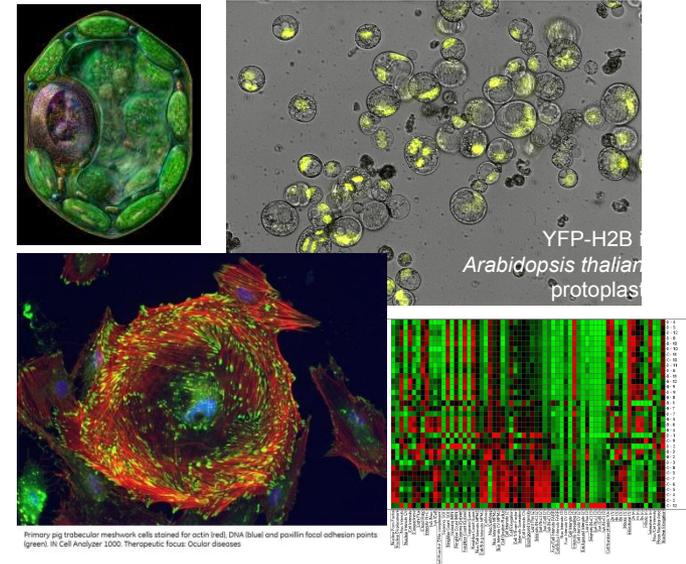
Секвенирование генов, экспрессионный анализ, сайт-специфический мутагенез и др.

Proteomics



Идентификация и характеристика белков, анализ их модификаций и взаимодействий и др.

Cellomics



Исследование клеточных функций, локализации молекул и органелл, клеточного фенотипа и др.

Структурная и функциональная протеомика

Задачи исследователя:

- Определение структуры белка
- Определение функций белка / антитела
- Регуляция
- Межмолекулярные взаимодействия/активность
- Биофармакология

Этапы:

- Пробоподготовка - Очистка белка
- Разделение с высоким разрешением / Анализ структуры
- Анализ функции

Структурная протеомика

2 разных подхода

LC-MS: смесь белков → определение пептидов в смеси

- Разделение предварительно очищенного образца методом ВЭЖХ или УльтраВЭЖХ
- Определение структуры методом MS

2D-MS: один белок → определение структуры белка

- Фракционирование образца методом 2D-фореза, поиск интересующих белков (DIGE), извлечение единичных пятен – молекул белков
- Определение структуры методом MS

Функциональная протеомика

Фундаментальные исследования взаимодействий:

- Изучение кинетики и аффинности взаимодействий молекул
- Задачи: изучение каскадов реакций, функций белков, формирования белковых комплексов

Фишинг: смесь белков → «вылавливание единичной молекулы» → определение структуры

- Получение фракций на FPLC
- Скрининг фракций на чипе – определение взаимодействующей молекулы
- Определение структуры методом MS

Фармацевтические исследования и биотехнология:

- Скрининг кандидатов в фармпрепараты и антител для диагностикумов
- Персонализированная медицина – определение эффективности и метаболизма лекарственных средств

Двумерный электрофорез

2D электрофорез – незаменимый классический метод в протеомных исследованиях, «входной билет в протеомику»

Технология метода основана на последовательном разделении белковых образцов в двух направлениях: по изоэлектрической точке и массам молекул.

Модификация метода 2D-электрофореза – технология

2D-DIGE (анализ дифференциально окрашенных гелей)

- существенно сокращает временные и финансовые затраты за счет мультиплексирования
- повышает точность, достоверность и воспроизводимость результатов за счет унифицированных условий эксперимента и использования внутреннего стандарта.

2D-электрофорез: этапы.



Двумерный электрофорез – результат?



2-D DIGE для экспрессионной протеомики

Традиционный 2D электрофорез

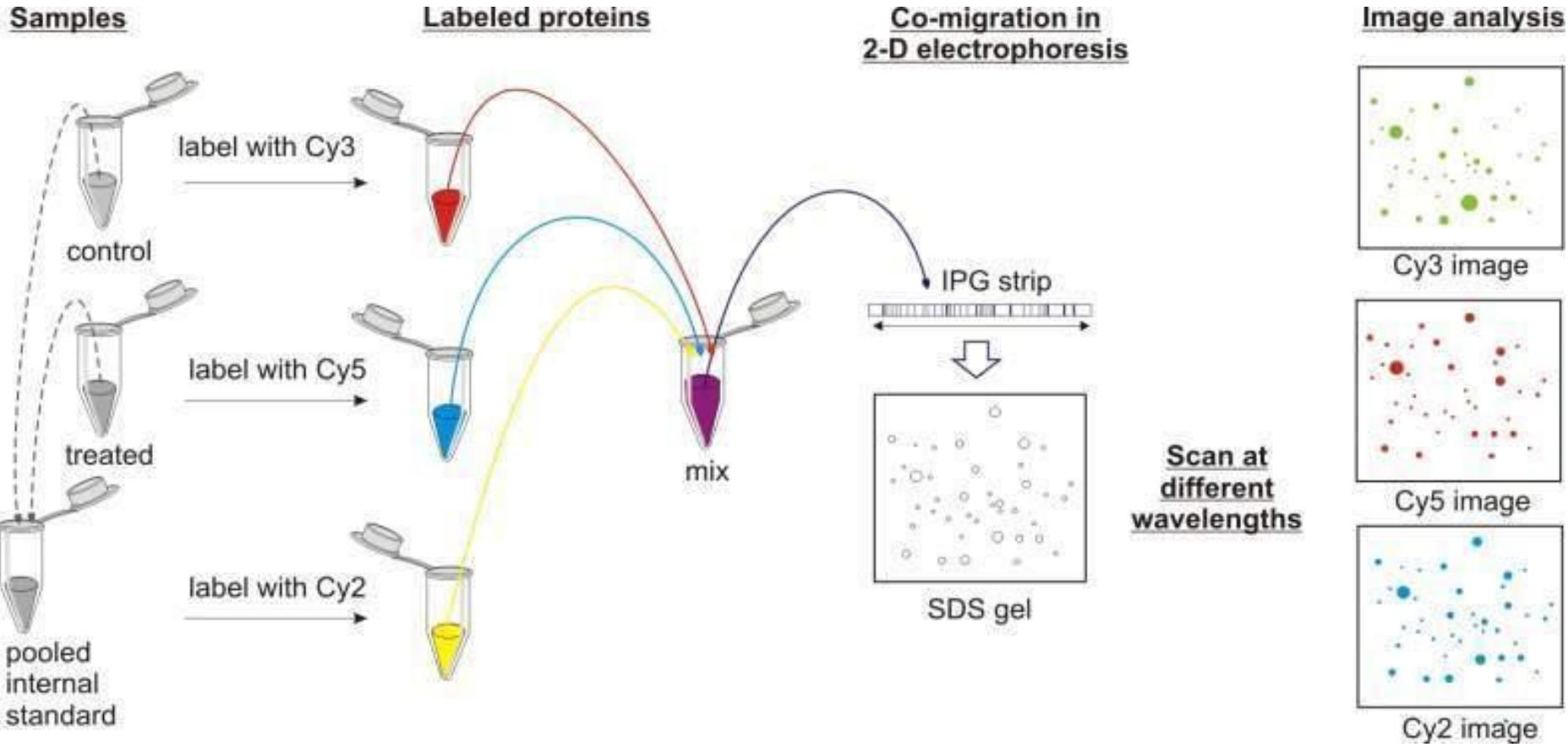
Трудозатратный, большие вариации внутри эксперимента (одна краска для пост-окрашивания, требуются повторные эксперименты для разделения биологических и технических вариаций)

Технология DIGE

Обеспечивает большую точность, воспроизводимость и существенно сокращает трудозатраты и время эксперимента:

- Мультиплексирование – несколько образцов анализируются в одном геле
- «Безобразно но однообразно» – ошибка оператора будет одинакова для всех образцов в геле
- Внутренний стандарт – присутствует во всех гелях в одном эксперименте

Difference gel electrophoresis (DIGE)

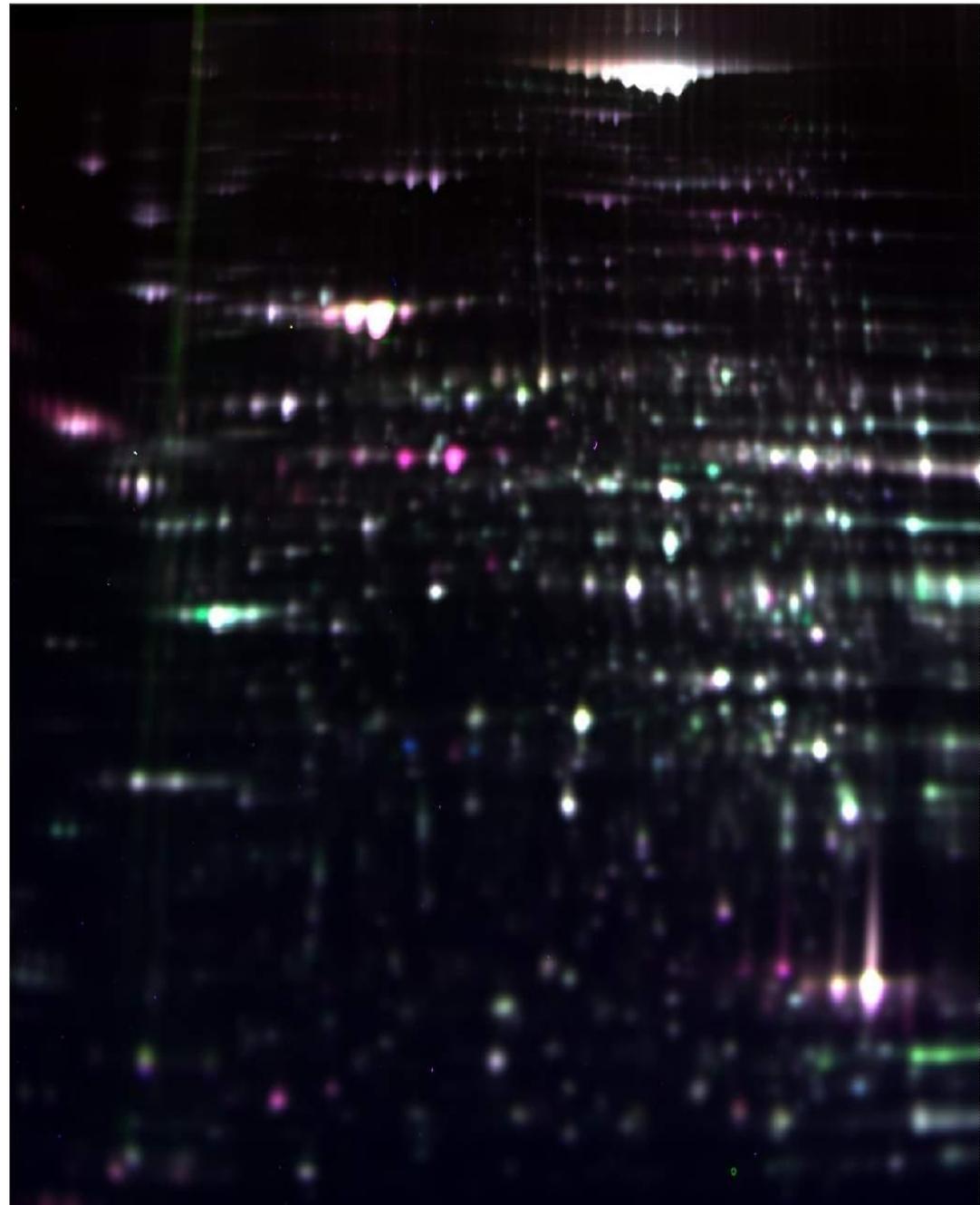


Cy2
Mouse liver proteins
Internal standard

Cy3
Mouse proteins
control

Cy5
Mouse liver proteins
treated

Overlay
Mouse liver proteins



Традиционный 2-D и 2-D DIGE

Традиционный 2D электрофорез (1-

ЦВЕТНЫЙ)
8 образцов: 8 гелей x 3 повтора = 24
геля



**2D-DIGE (3-
цветный)**

8 образцов:
4 геля (без повторностей) = 4
геля



Функциональная протеомика

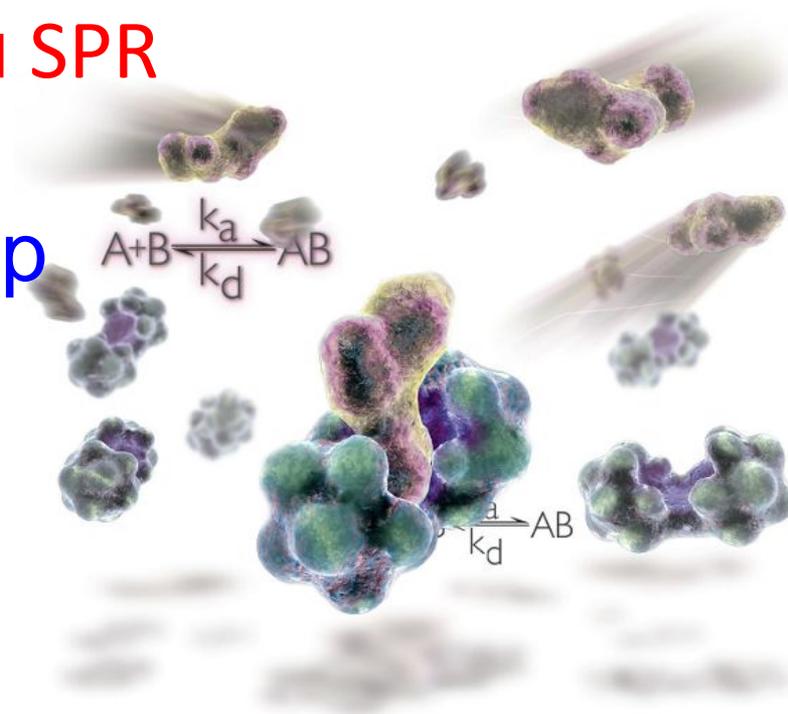
Анализ взаимодействия

молекул:

- Без метки
- В режиме реального времени
- Кинетика взаимодействий

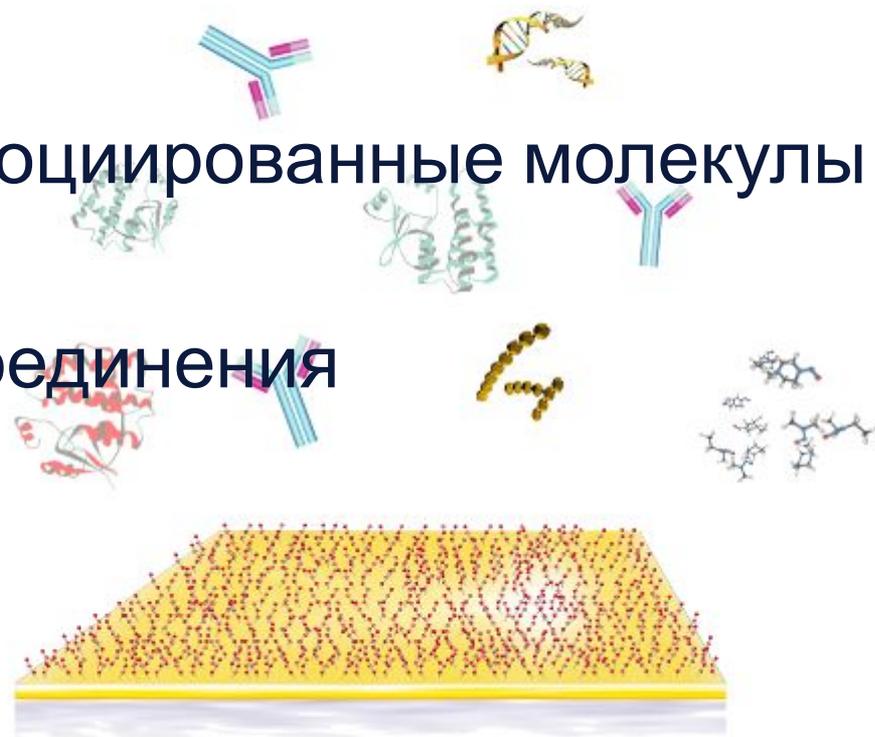
Viascore™ - биосенсоры SPR

MicroCal™ - калориметр



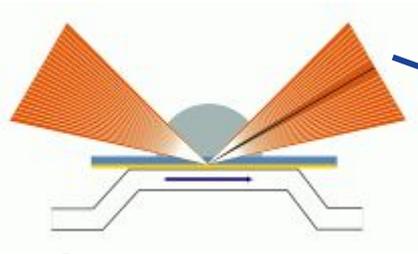
Анализ взаимодействия различных молекул:

- Белки
- Нуклеиновые кислоты
- Липиды и мембран-ассоциированные молекулы
- Углеводы
- Низкомолекулярные соединения
- Целые клетки
- Вирусы/бактерии



Biacore. SPR.

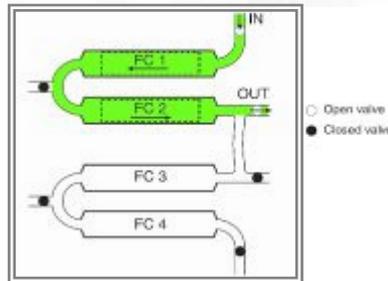
Используются в ведущих академических и биотехнологических лабораториях с 1990 г.



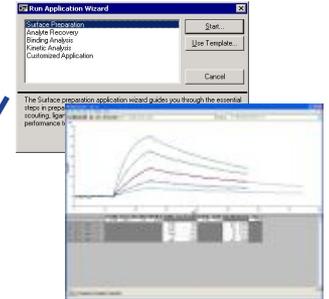
Система
детекции
SPR -
Biacore™



Сенсорный
чип

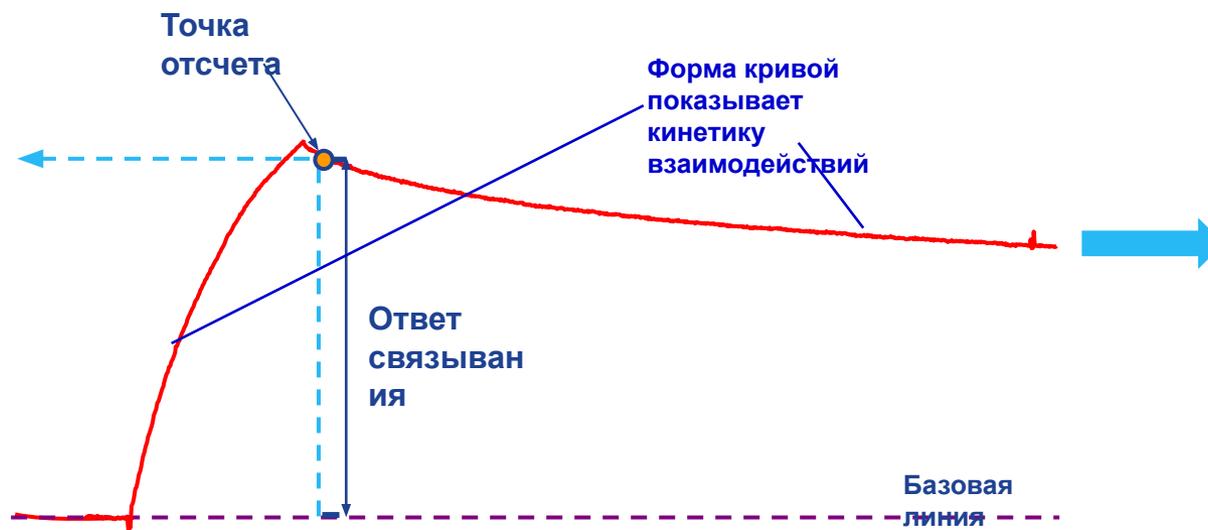


Микрофлюид/
проточные
ячейки

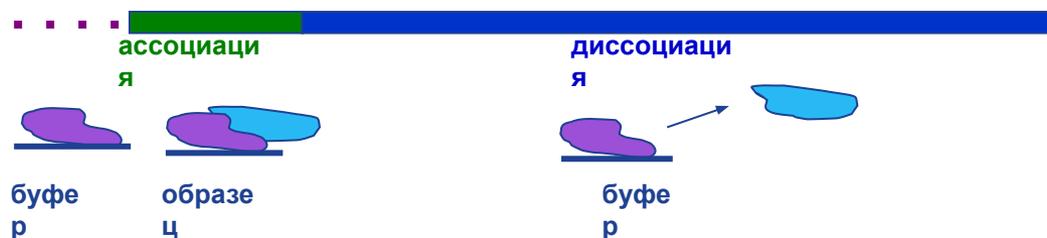


Программное
обеспечение

Сенсограмма SPR



- Специфичность
- Аффинность
- Кинетика
- Концентрация
- Термодинамика



MicroCal™ - принцип



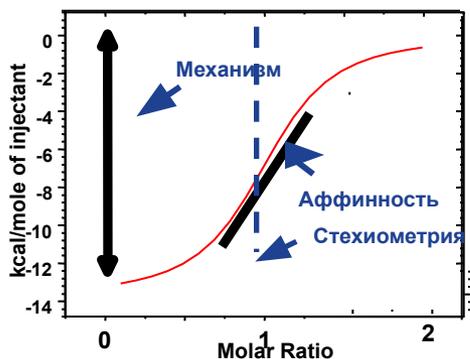
В шприце - лиганд (связываемое соединение)

В экспериментальной ячейке - целевой белок

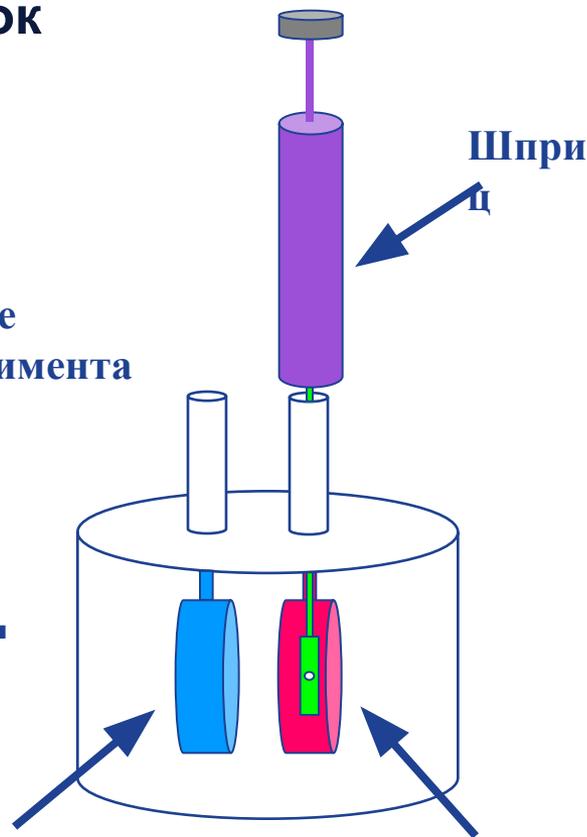
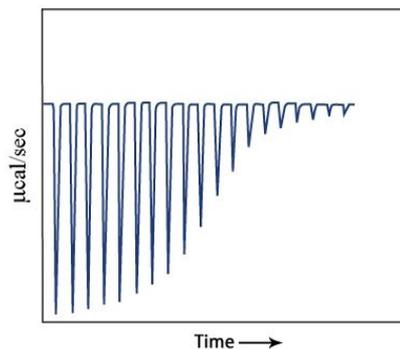
В ячейке сравнения - буфер

Измеряется теплота взаимодействия

Обработанные
данные



Данные
эксперимента



Ячейка
сравни
я

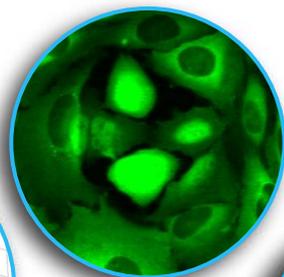
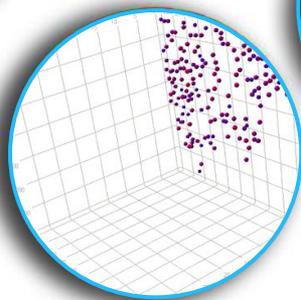
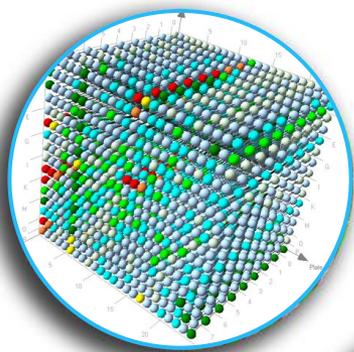
Экспериментальна
я
ячейка

Около 20 лет на рынке – более 10 000 научных публикаций

- Онкология
- Нейробиология
- Иммунология
- Инфекционные заболевания
- Протеомика
- Трансдукция сигнала
- Разработка вакцин, фармпрепаратов и диагностикумов
- Выбор и характеристика связывающих реагентов
- Исследования лекарств и многое другое....

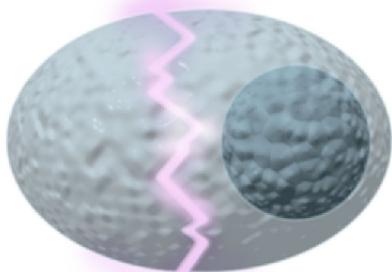
High Content Analysis (HCA) это...

- Анализ «высокого содержания»
- Получение большого количества разноплановых данных по одному образцу
- Многопараметрический анализ данных

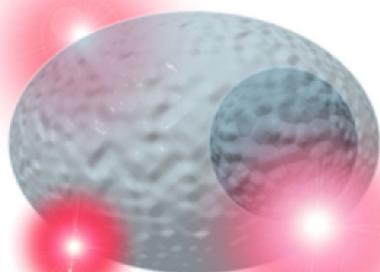


Эволюция клеточного анализа

Деструктивн
ый



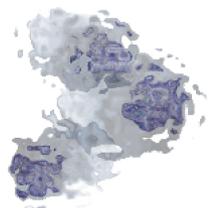
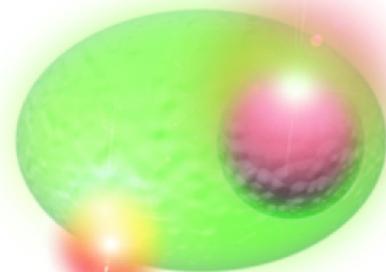
Фиксированн
ый



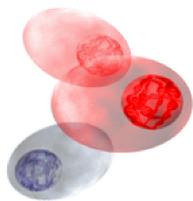
Динамически
й



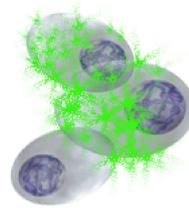
Интегрированн
ый



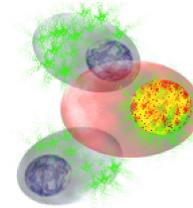
Электрофор
ез



Трансдукция
сигнала

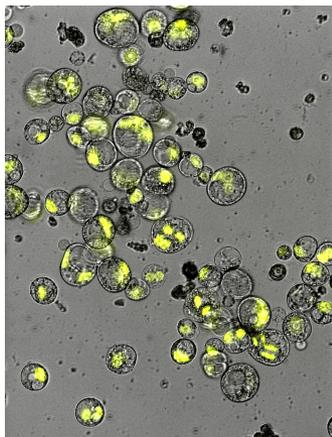


Процессы в
клетке



Взаимодействи
я

Зачем нужен НСА?

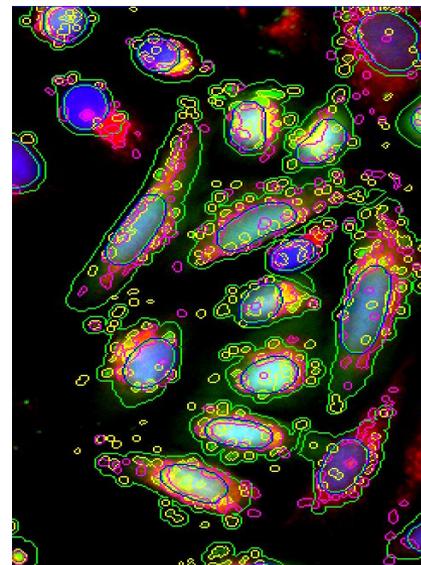


- Сложные многопараметрические эксперименты
- Мультиплексность
- Широкомасштабные скрининговые исследования
- Быстрота получения данных
- Огромное количество данных по одному образцу
- Сохранение изображений и повторные анализы

Исследования

я:

- Изучение функций, локализации и кинетики **в живой клетке**: транслокации, активация рецепторов, фазы клеточного цикла
- Тестирование воздействия внешних условий (токсинов, лекарственных средств, ингибиторов, активаторов и пр.) на живую клетку
- Слежение за несколькими морфологическими параметрами
- Возможность мечения нескольких мишеней



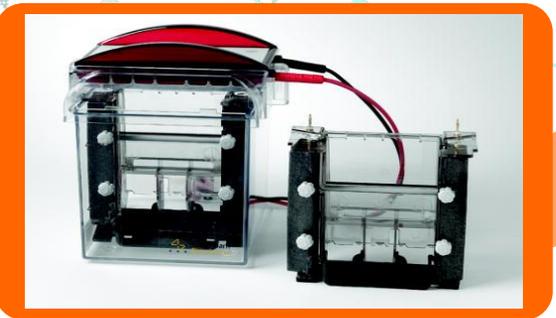
Универсальность и всесторонности



Микроскопия



Цитофлуориметр



Электрофорез



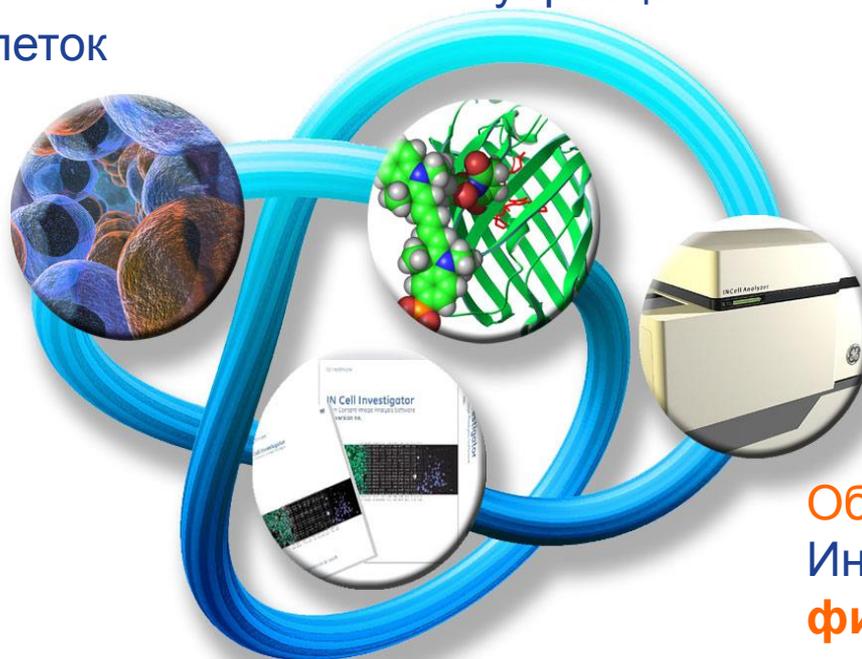
Основные компоненты НСА

Биологический
объект

Культуры клеток
Ткани
Организмы

Реактивы

Флуоресцентные метки

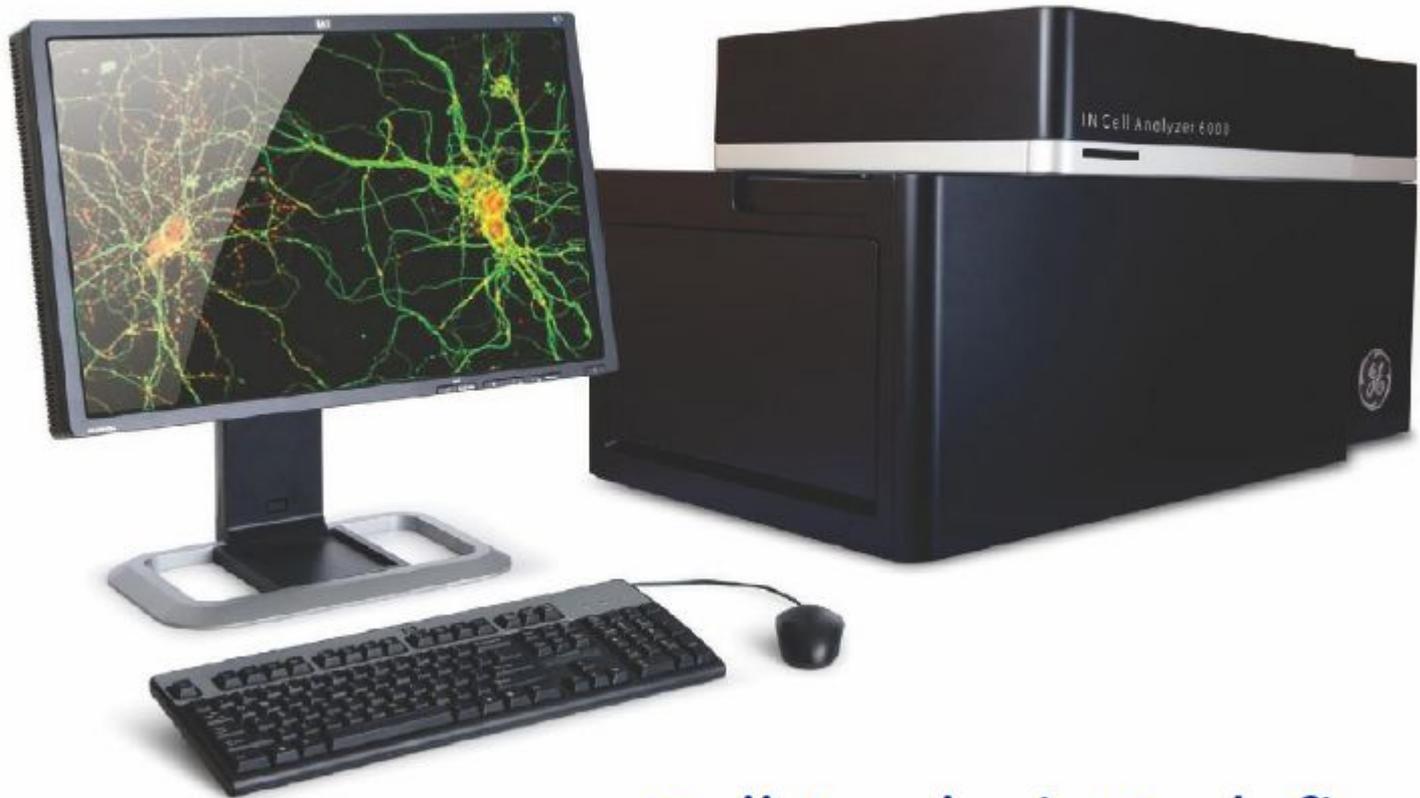


Программное
обеспечение
Для получения,
обработки и хранения
НСА данных

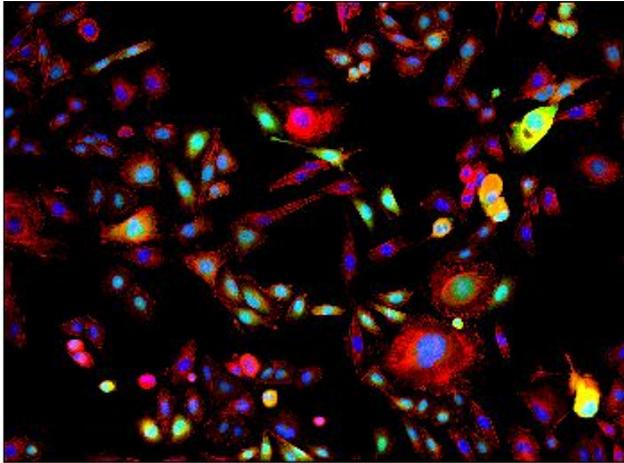
Оборудование
Инструмент для визуализации
**фиксированных и живых
клеток**

Дополнительные модули
(инкубатор, система
дозирования) **для
прижизненного наблюдения**

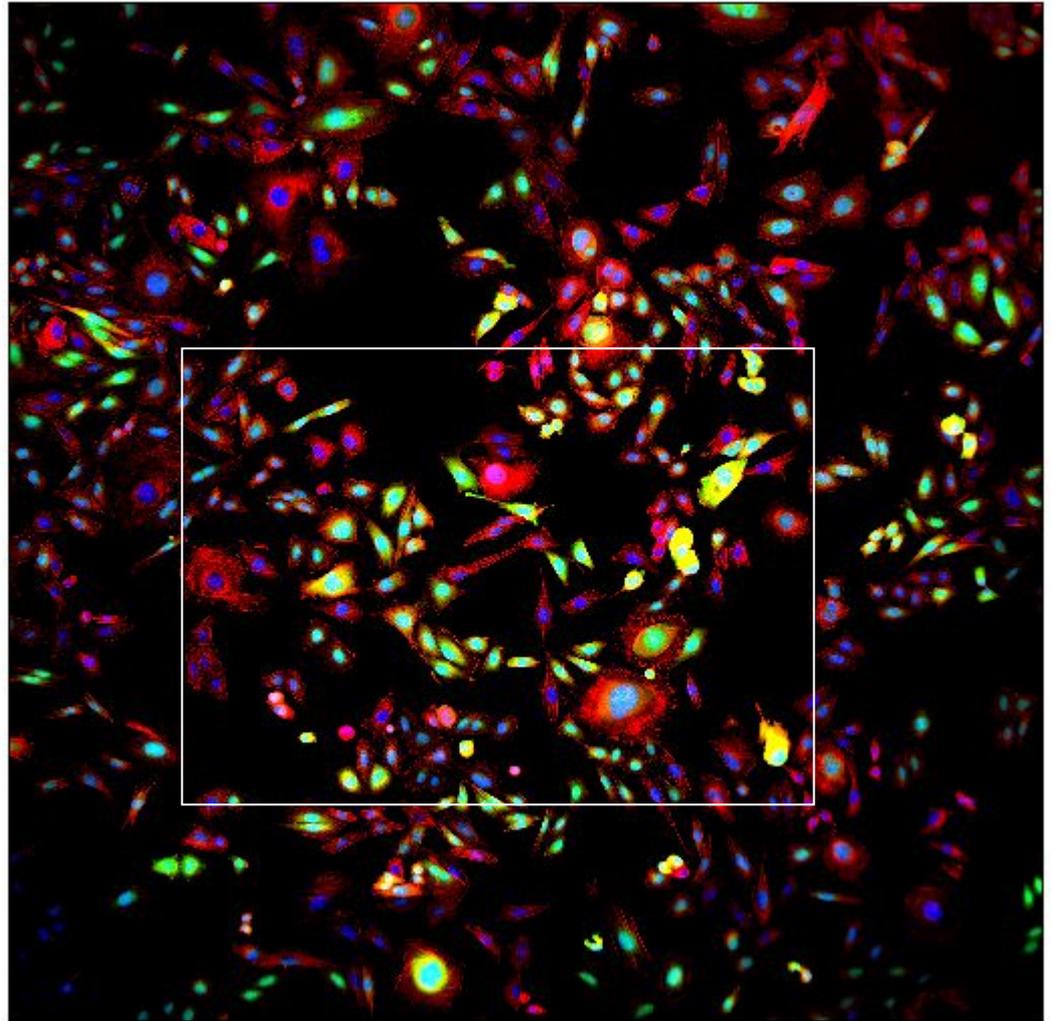
IN Cell Analyzer 2200, 6000



Высоко-производительная камера

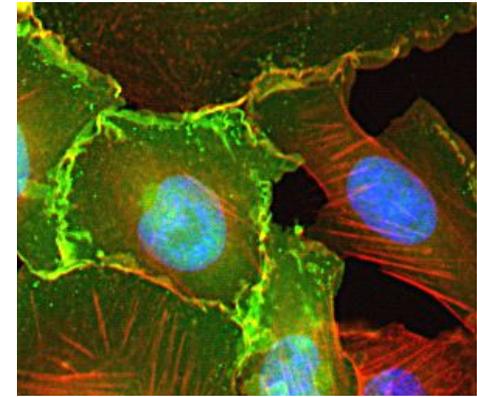
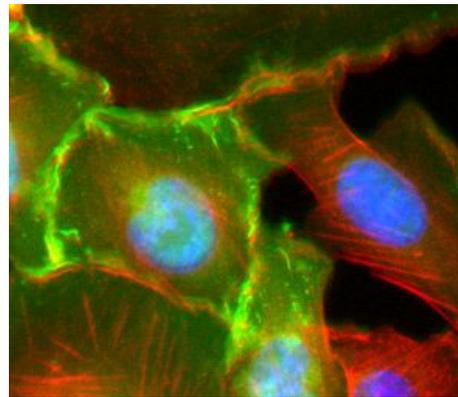


Стандартная CCD-камера
1.4 Мр CoolSNAP ES2
1392 x 1040 пикс.
6.45мкм кв. пикс.
137 клеток при 10X
увеличении

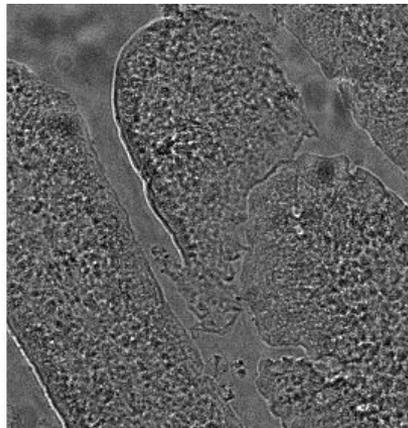
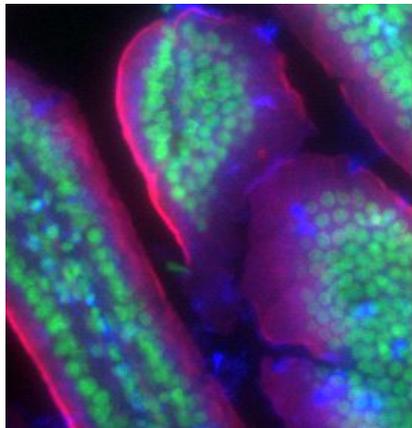


Широкоформатная камера
4.2 Мр CoolSNAP K4;
2048 x2048 пикс.
7.40мкм кв. пикс.
635 клеток при 10X увеличении

Новейшая технология восстановления изображения (д

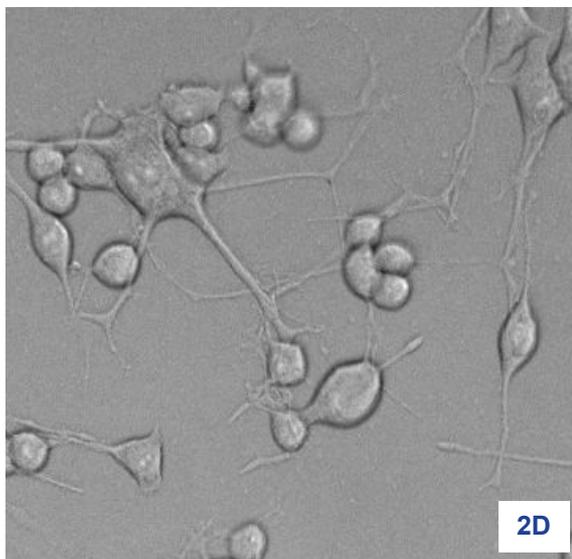


3 режима проходящего света

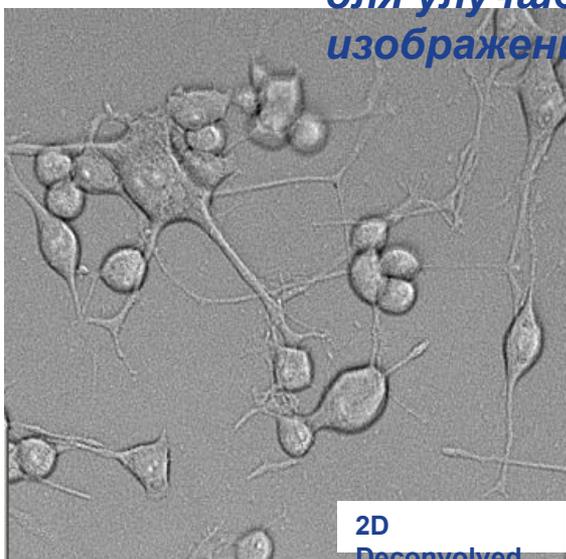


-микроскопия светлого поля
-фазово-контрастная микроскопия
-ДИК (дифференциально-интерференционный контраст) для анализа живых клеток

Использование опции
3D/деконволюции
для улучшения качества
изображения

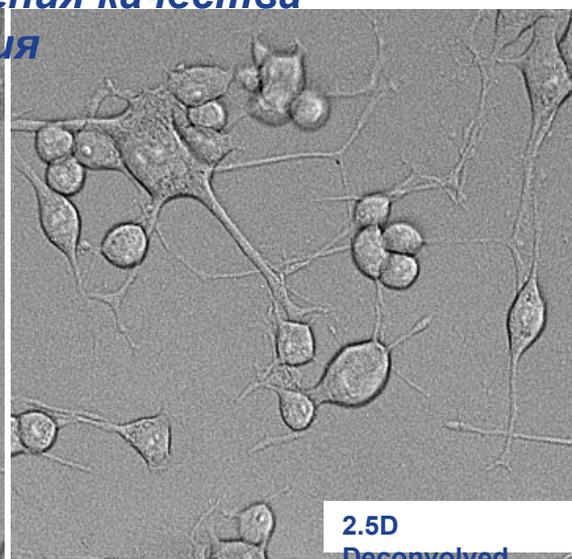


2D



2D

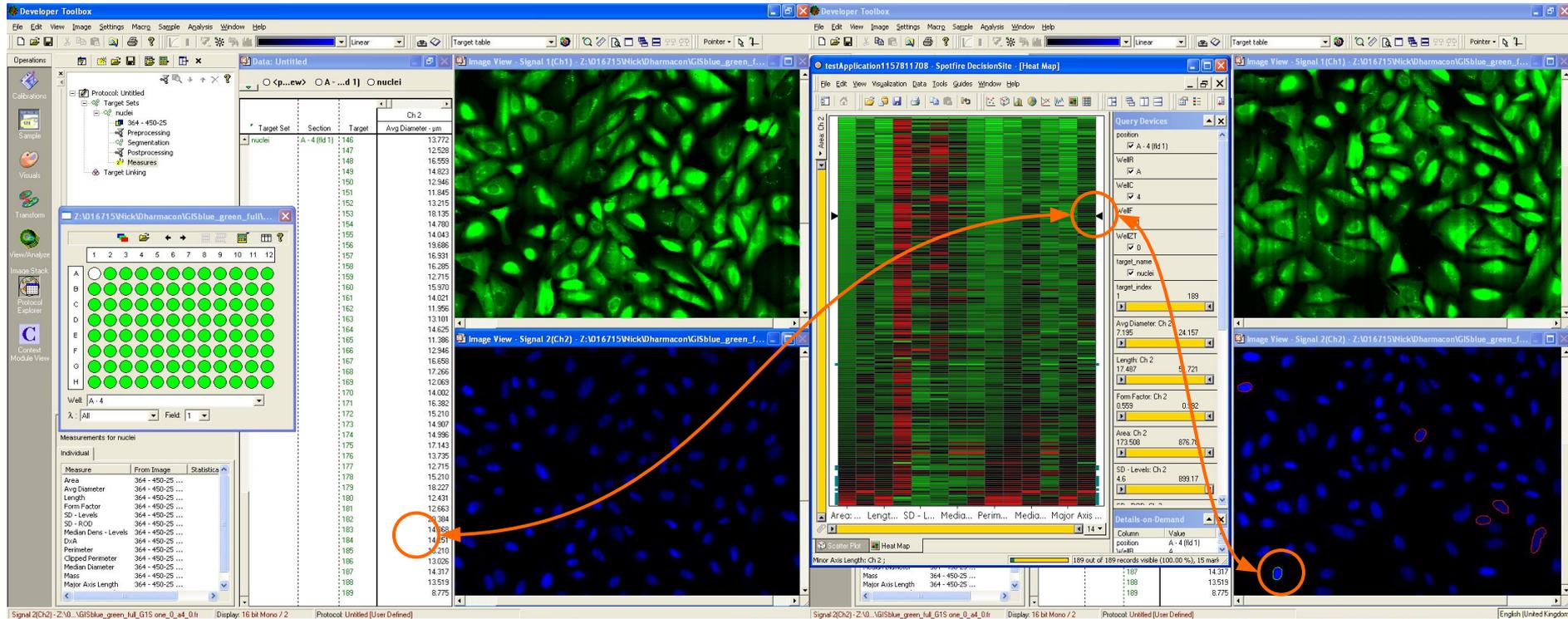
Deconvolved



2.5D

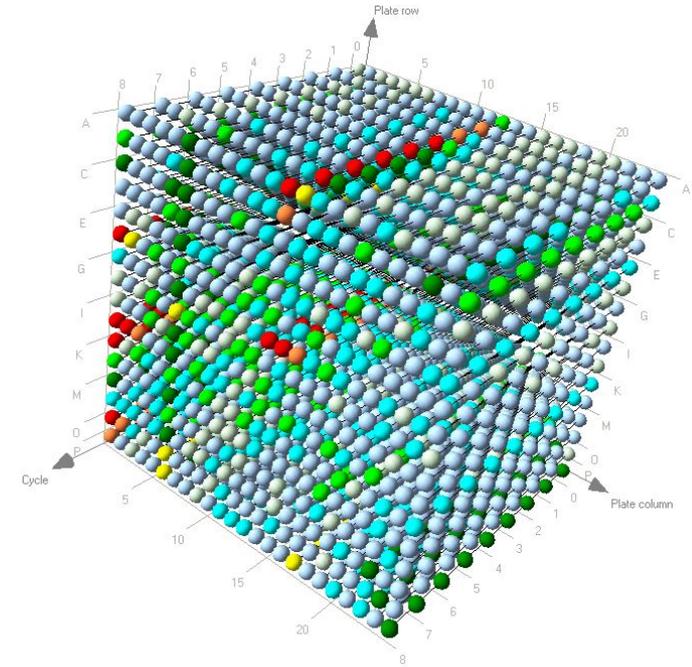
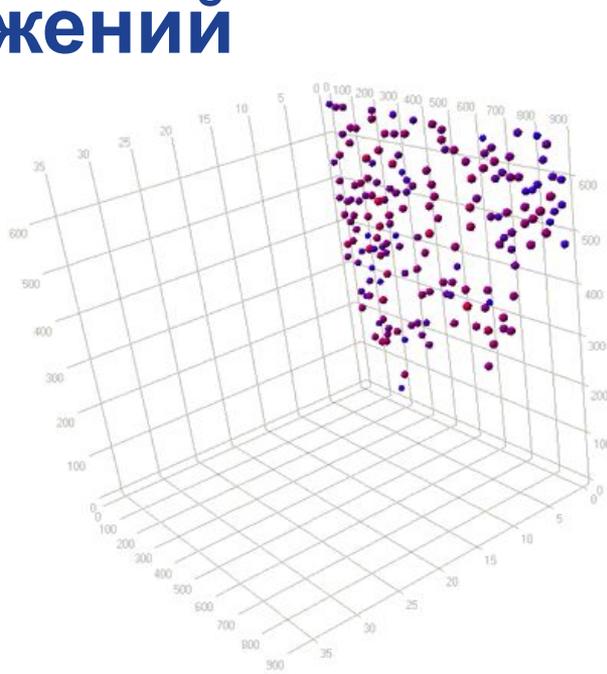
Deconvolved

Данные от одной клетки до популяции

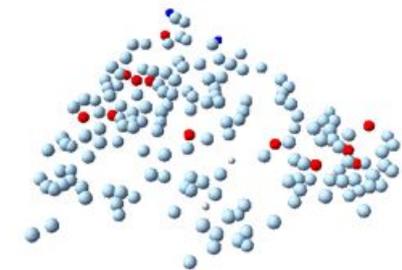
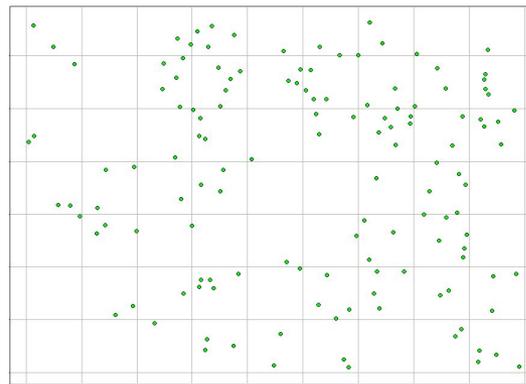
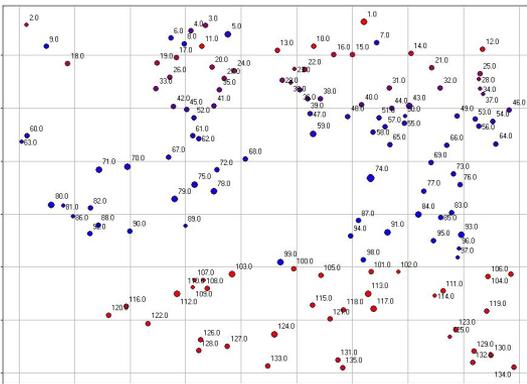


Spotfire – интерактивное получение изображений

Рост
клеток



Клеточная
ТОКСИЧНОСТЬ

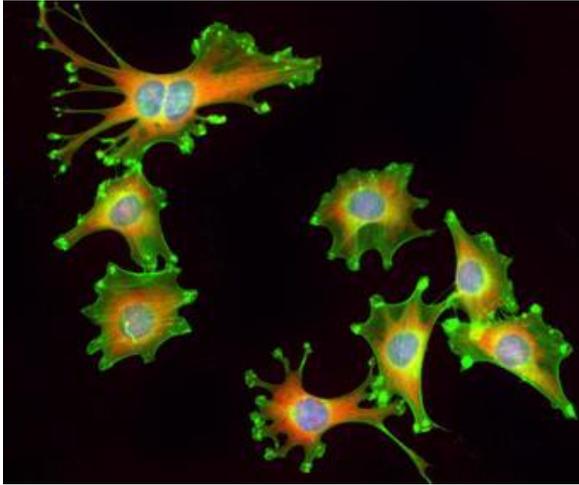


Рост
клеток

Области применения

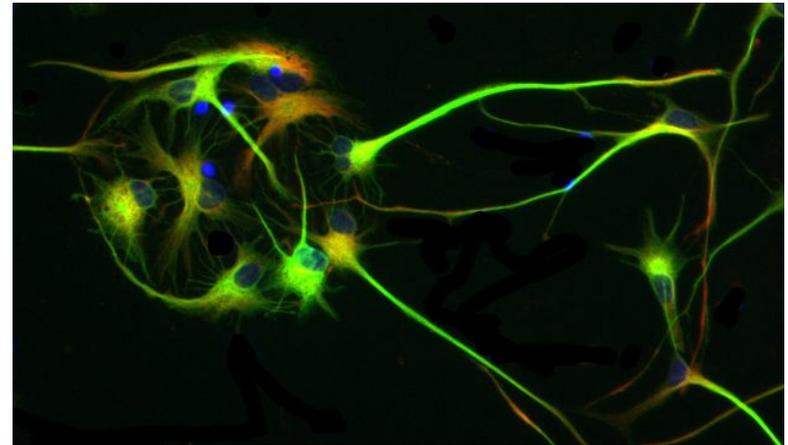
- **Активация рецептора**
- **Токсикологический ответ клетки и апоптоз**
- **Трансдукция внутриклеточного сигнала**
- **Анализ дифференцировки стволовых клеток**
- **Клеточный цикл**
- **Органеллы и внутриклеточный транспорт**
- **Функционирование нейронов**
- **Морфологическое и физиологическое состояние клетки**

Данные пользователей на IN Cell Analyzer



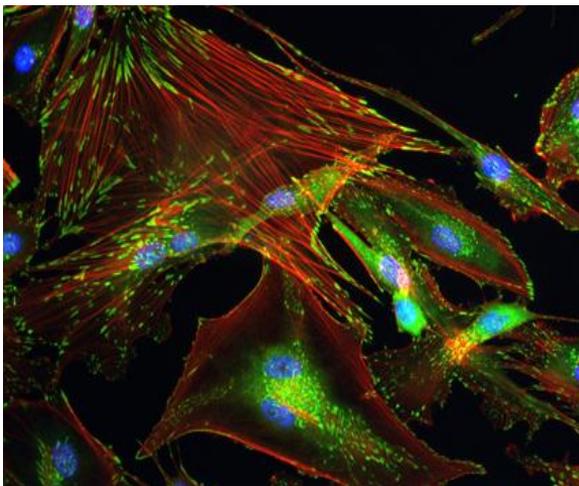
NIH-3T3 fibroblasts overexpressing src causing localization of actin toward podosomes. Cells stained for DNA (blue), actin (green) and phospho-src (red).

Courtesy of Evelyn Griffin, Scripps Florida



Human Neuronal Stem Cells from fetal cortex. Cell stained for DNA (blue), TUJ-1 (neuronal differentiation marker, green) and GFAP (astrocyte differentiation marker, red).

Courtesy of Kymmy Lorrain, Brain Cells Inc

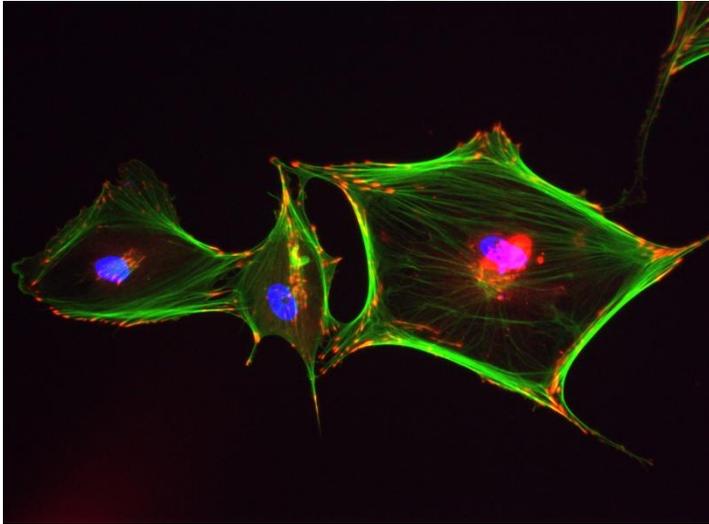


Primary Porcine Trabecular Meshwork cells stained for DNA (blue), actin (rhodamine phalloidin, red) and Paxillin in focal adhesions (green).

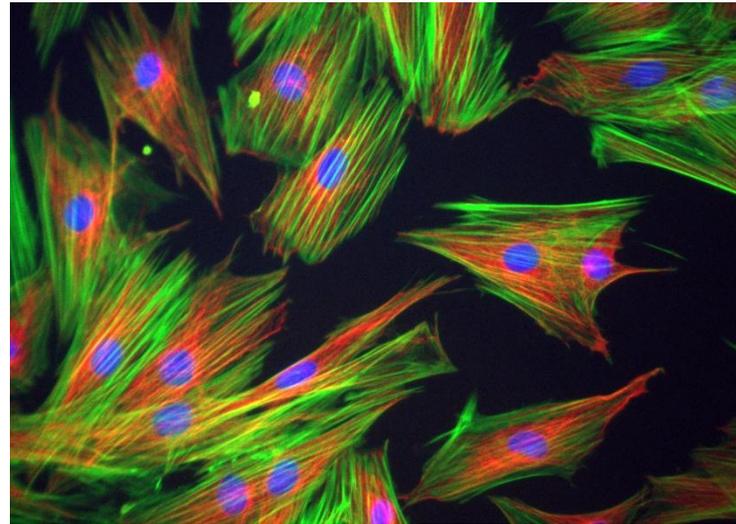
Courtesy of Carmen Laethem, Aerie Pharma



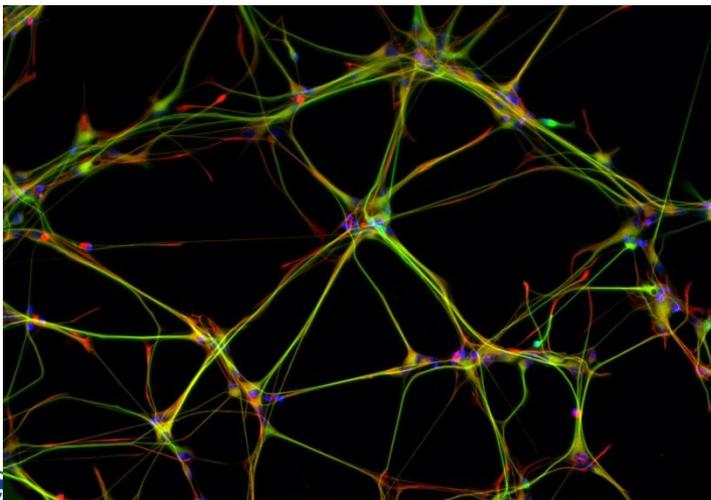
Данные пользователей на IN Cell Analyzer



Primary pig trabecular meshwork cells stained for actin (green), DNA (blue) and paxillin focal adhesion points (red). IN Cell 1000 **Courtesy of Carmen Laethem, Aerie Pharma**



Rat cardiac H9C2 cells stained for DNA (blue), actin (red) and tubulin (green). IN Cell 1000. **Courtesy of Connla Edwards, Trinity College Dublin**



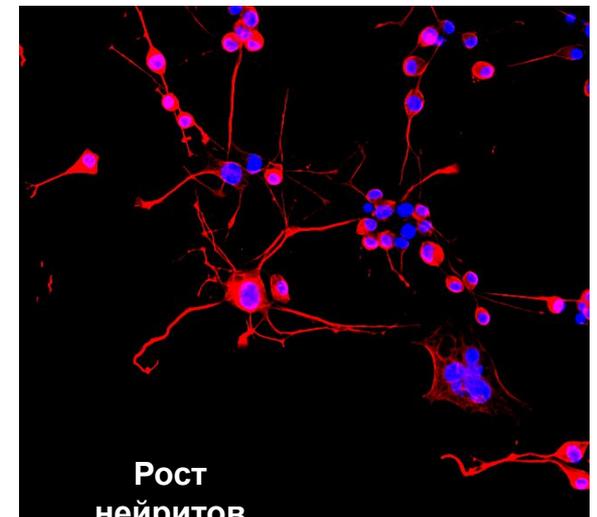
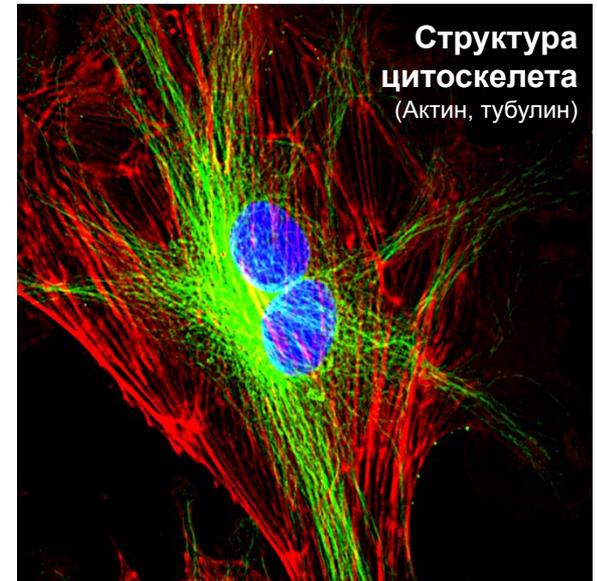
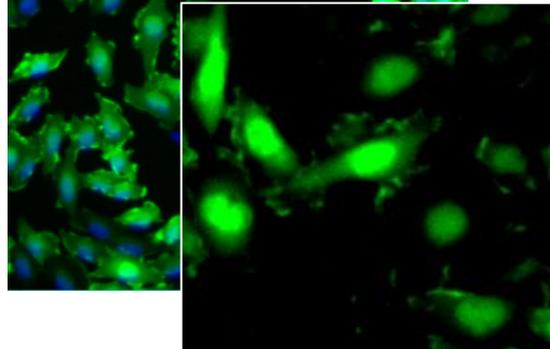
Human neural stem cells stained for neuronal TUJ-1 (green), astrocyte GFAP (red) and DNA (blue). IN Cell 1000. **Courtesy of Kymmy Lorrain, BrainCells Inc., USA**

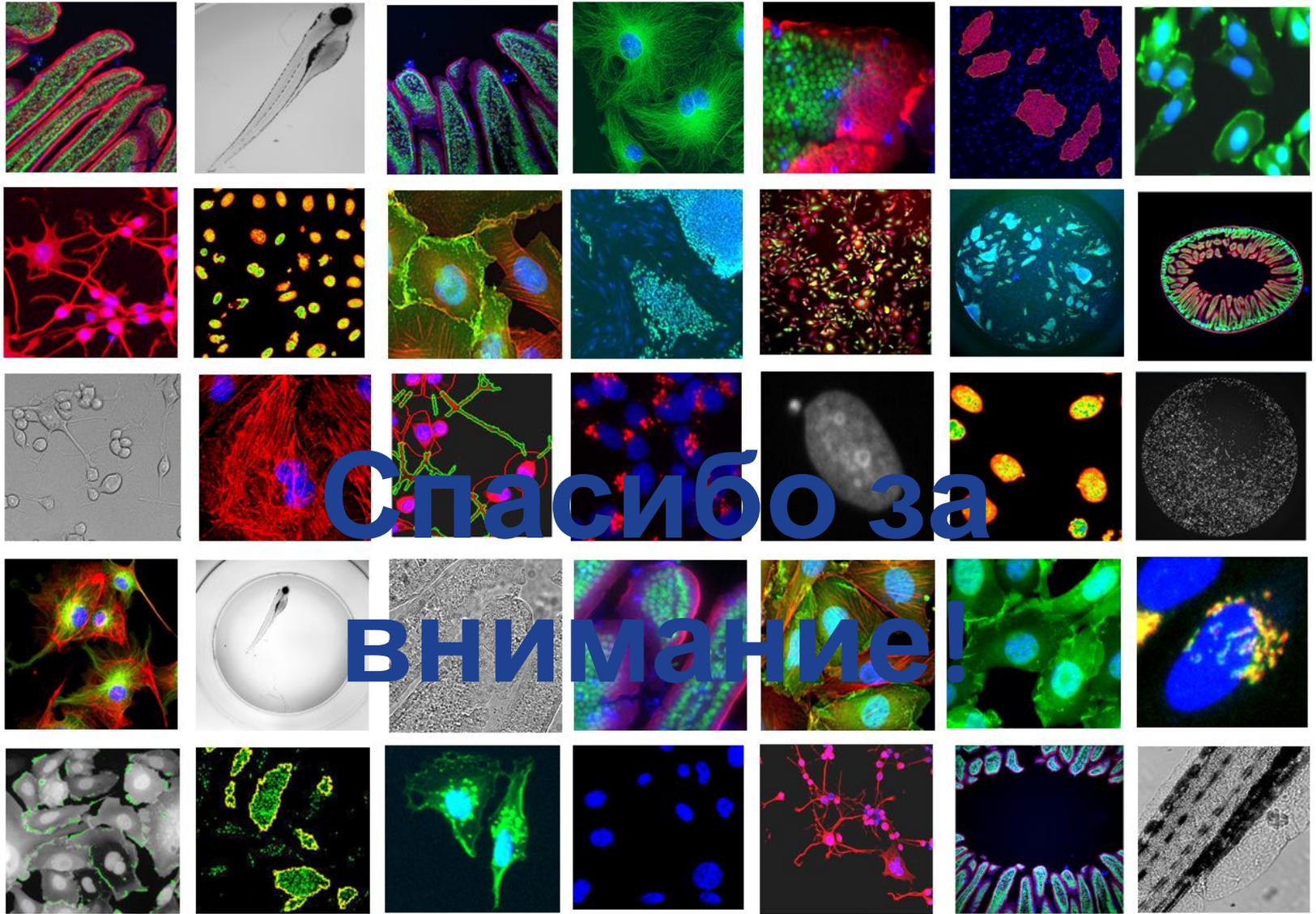
Качество изображений – это основа



До воздействия

+
Этопозил





Спасибо за
внимание!