

Multiplexní analýza s využitím proteinových čipů

Ulrychová M., Vávrová J., Tichý M., Friedecký B.
ÚKBD FN a LF UK Hradec Králové

Sjezd ČSKB, 22.9.2009, Praha

Proteinové biočipy

- Nová a rychle se rozvíjející problematika
- Biočipy využívány převážně v oblasti genomiky a proteomiky, nově v oblasti mikrobiologie, imunologie a biochemie
- rychlý vývoj v posledních letech
- 1994 - název proteomika
- 1847 – jeden z prvních laboratorních testů na stanovení proteinu (Bence-Jonesova bílkovina)
- vyvinuty analytické testy pro stovky proteinů v biologických materiálech
 - elektroforéza a chromatografie (i vícedimenzionální 1982)
 - imunologické a serologické metody

Proteomika

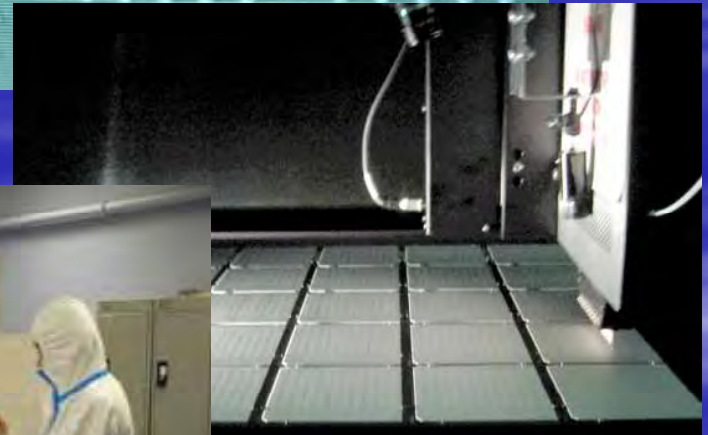
- ❑ **nové postupy** – analýza stovek proteinů, jejich identifikace, kvantifikace, odhalení strukturálních modifikací
- ❑ komplex proteinových směsí v biologickém materiálu
 - ❑ odseparování jednotlivých složek- multidimenzionální chromatografie a elektroforéza, vychytání pomocí protilátek
 - ❑ štěpení proteinů izolovaných ze směsi
 - ❑ analýza peptidů – MS
 - ❑ MALDI-TOF MS
(matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)
 - ❑ SELDI-TOF MS
(surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)
- ❑ nové molekuly použitelné jako biomarkery, fragmenty a modifikace proteinů
- ❑ aplikace postupů proteomiky do klinické praxe

Multiplexní analýza proteinovými čipy

- simultánní stanovení několika analytů založené na imunochemických metodách
- kvalitativní i kvantitativní
- malé množství vzorku
- malé množství reagensí
- rychlost (statimová vyšetření)
- automatizace

Výroba

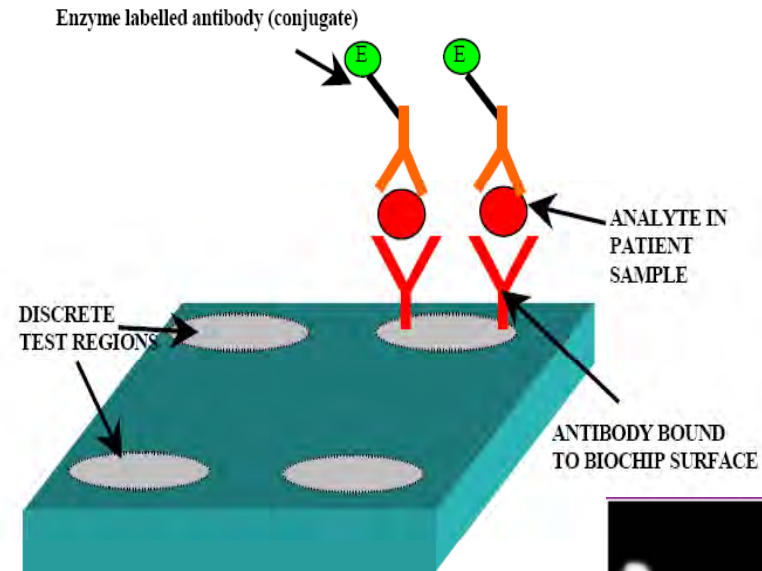
- Microarray Printing Platform



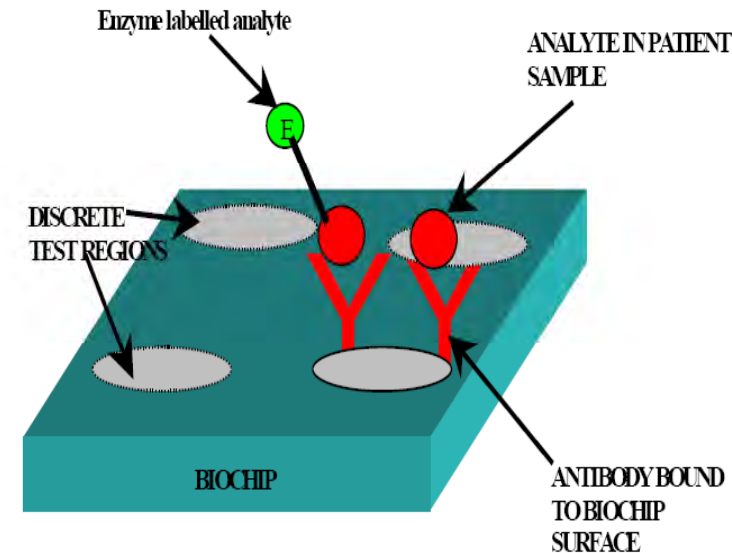
Princip stanovení

- imunoanalýza
 - kompetitivní
 - nekompetitivní

Sandwich Biochip Assay

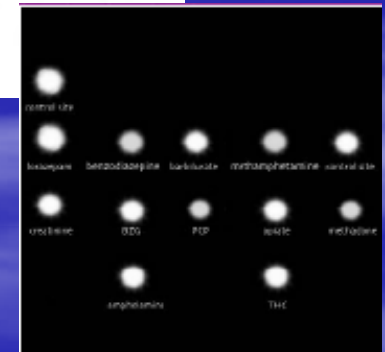


Competitive Biochip Assay



■ Detekce

- Fluorescence
- Chemiluminiscence
- IČ fotometrie



Dostupnost

- První komerčně vyráběné kity
 - Radox Laboratories
 - www.radox.com
 - Thermo Fisher Scientific, Aushon Biosystems
 - www.aushon.com
 - Meso Scale Discovery
 - www.mesoscale.com

Evidence (Randox)

■ Evidence Investigator

- poloautomatický analyzátor
- zpracování minimálně 9 vzorků v sérii
- manuální pipetování
- délka inkubace – do 2 hod



■ Evidence

- automatický analyzátor
- zpracování minimálně 9 vzorků v sérii
- délka inkubace – do 2 hod



Analýza

■ Měřené analyty

- **Free Thyroid Array**
- **Total Thyroid Array**
- **Fertility Array**
- **Tumour Monitoring Array**
- **Tumour PSA Array**
- **Cell Adhesion Molecule Array**
- **Cytokines & Growth Factors Array**
- **Cardiac Array**
- **Drugs of Abuse Array I**
- **Drugs of Abuse Array II**
- **Cardiovascular disease DNA Array**
- **Colorectal cancer DNA array**
- **cDNA Expression Arrays**

■ Kalibrace

- dodávaná výrobcem, 9 kalibrátorů, data nahraná na kalibrační CD

■ Kontrola kvality

- tři úrovně koncentrací

■ Materiál

- sérum

Cardiac Array

- Troponin I
- Myoglobin
- CK-MB
- Carbonic Anhydrase III (CA III)
- Glycogen Phosphorylase BB (GPBB)
- Fatty Acid Binding Protein (FABP)

Free Thyroid Array

- Thyroid stimulating hormone (TSH)
- Free tri-iodothyronine (FT₃)
- Free thyroxine (FT₄)

Total Thyroid Array

- Thyroid stimulating hormone (TSH)
- Total tri-iodothyronine (TT₃)
- Total thyroxine (TT₄)

Cell Adhesion Molecule Array*

- I - CAM
- V- CAM
- E - Selectin
- P - Selectin
- L - Selectin

Cytokines & Growth Factors Array

- Interleukin-1 alpha (IL-1 α)
- Interleukin-1 beta (IL-1 β)
- Interleukin-2 (IL-2)
- Interleukin-4 (IL-4)
- Interleukin-6 (IL-6)
- Interleukin-8 (IL-8)
- Interleukin-10 (IL-10)
- Interleukin-12 (IL-12)*
- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
- Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF- α)
- Interferon-gamma (IFN- γ)
- Epidermal Growth Factor (EGF)
- Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)

Evidence Multistat

automatický analyzátor
zpracování po jednom vzorku
délka analýzy – 20 minut



Drugs of Abuse Array I [urine]

- Amphetamine
- Barbiturates
- Benzodiazepine 1
- Benzodiazepine 2
- Cannabinoids
- Cocaine metabolite (Benzoylecgonine)
- Methamphetamine
- Methadone
- Opiates
- Phencyclidine
- Creatinine (dilution marker)

Cardiac Array [serum]

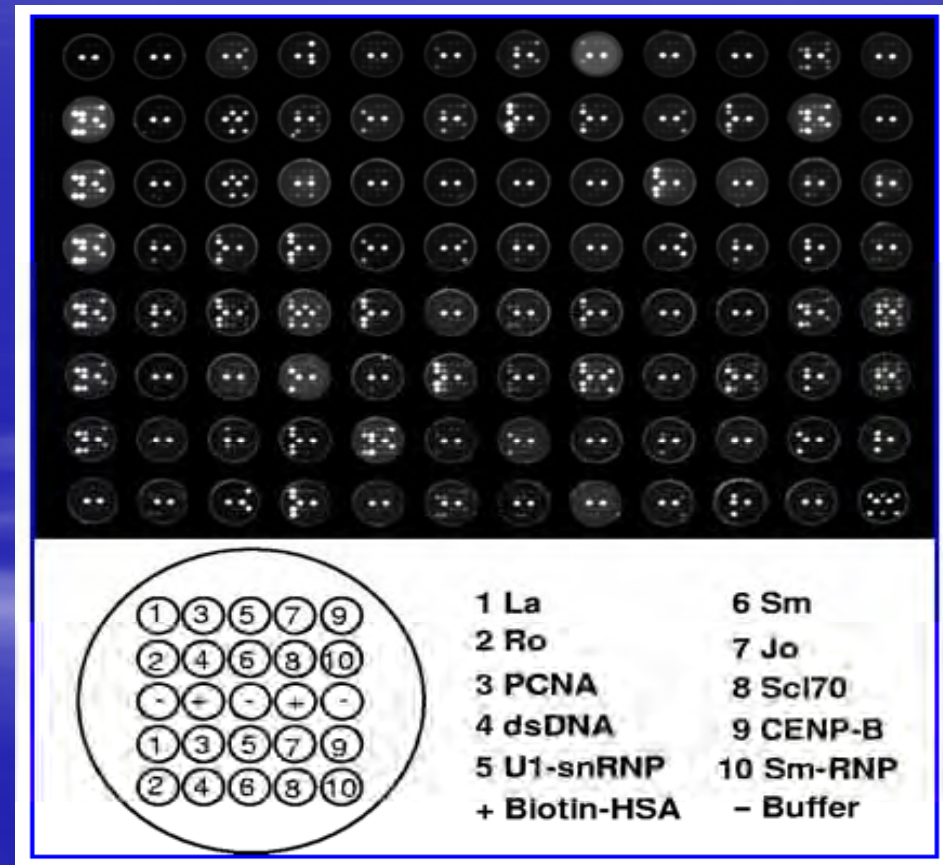
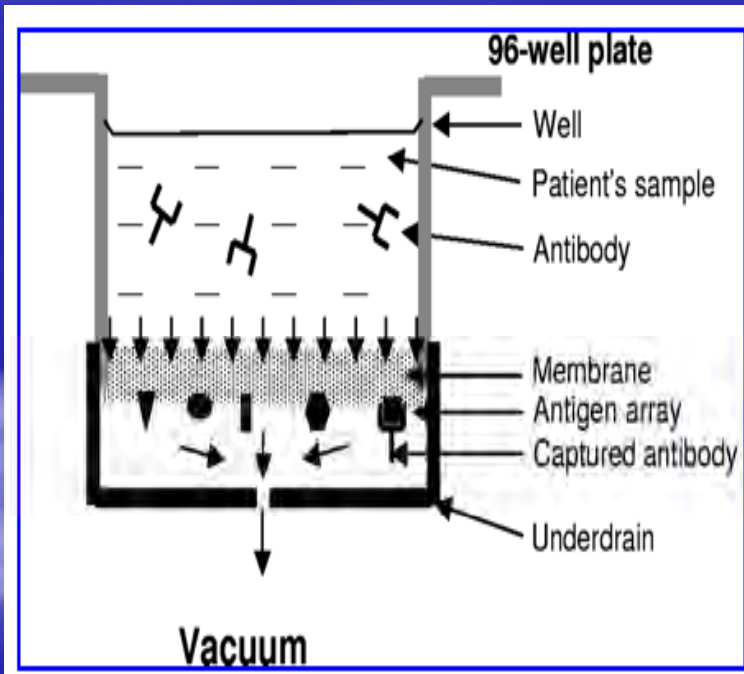
- Creatine Kinase-MB (CK-MB)
- Fatty Acid Binding Protein (FABP)
- Myoglobin
- Cardiac Troponin I (cTnI)

IMPACT (Roche)

- ve vývoji - Immunological MultiParameter Chip Technology
 - plně automatický systém, 20 ul sérum
- Kostní markery:
 - osteokalcin
 - PTH
 - PINP
 - β -CrossLaps
- polystyren s vrstvou streptavidinu, naspotované biotinylované protilátky, pro každý marker 10-12 spotů
- druhá monoklonální protilátka značená digoxinem
- detekce další protilátkou fluorescenčně značenou protilátkou proti digoxinu
- 6 standardů, 3 kontroly
- opakovatelnost 1,6 - 6,8 %, mezilehlá přesnost 2,7 - 9,2 %
- ve srovnání s Elecsysem lepší citlivost (fmol/l)

NALIA

- Nanodot Array Luminometric Immunoassay



SearchLight Protein Array Technology

(Thermo Fisher Scientific)

- ❑ Mikrotitrační destičky (96 a 384 jamek)
- ❑ Obdoba ELISA techniky
- ❑ max. 16 spotů v jamce
- ❑ 50 ul vzorku
- ❑ různé způsoby značení

❑ Detekce

❑ CCD systémy

- ❑ Fluorescence

- ❑ Chemiluminescence

Aushon SearchLight® Plus Imaging and Analysis System

- ❑ Infračervené záření

Odyssey® or Aeries® Infrared Imaging System

- ❑ 300 cytokinů and biomarkerů testováno a validováno pro SearchLight Multiplex Platform

- ❑ Printing na zakázku

- ❑ Materiály: různé - S, P, BAL, CSF, tkáňové homogenáty, mikrodialyzáty atd.



Sector Imager (Meso Scale Discovery)

		Imager 6000	Imager 2400	PR 400	PR 100
MULTI-ARRAY	96-well	●	●	●	●
	96-well small spot	●	●	●	●
	384-well	●	●		
	1536-well	●			
MULTI-SPOT	96-well 4 spot	●	●	●	
	96-well 7 spot	●	●		
	96-well 10 spot	●	●		
	384-well 4 spot	●			
	24-well 25 spot	●			
	24-well 64 spot	●			
	24-well 100 spot	●			



Human

Abeta 38	sICAM-1	Myoglobin
Abeta 40	sICAM-3	NFκB Ser 468 (phospho)
Abeta 42	IFN-α2a	NFκB Ser 536 (phospho)
Adiponectin ◀NEW	IFN-β	NFκB (total) *
Akt Ser 473 (phospho)	IFN-γ	Osteocalcin
Akt Thr 308 (phospho)	IGFBP-1	Osteonectin
Akt (total)	IGF-1R (phospho)	Osteopontin
Alkaline Phosphatase	IGF-1R (total)	Osteoprotegerin
sAPPα	IL-1α *	p38 (phospho)
sAPPβ	IL-1β	p38 (total)
sw sAPPβ	IL-2	p53 (phospho)
Aurora A (phospho) ◀NEW	IL-4	p53 (total)
BAD (phospho)	IL-5	p70S6K Thr 421/Ser 424 (phospho)
BAD (total)	IL-6	p70S6K Thr 389 (phospho)
bFGF	IL-7 *	p70S6K (total)
CA 125 ◀NEW	IL-6R	PARP (cleaved)
E-Cadherin ◀NEW	IL-8	PDGFR-β (phospho)
P-Cadherin ◀NEW	IL-10	PICP *
Caspase-3 (cleaved)	IL-12 (total)	PIGF
Caspase-3 (total)	IL-12 p40	Progesterone
c-Jun (phospho)	IL-12 p70	Prolactin ◀NEW
c-Kit (phospho)	IL-13	Protein C ◀NEW
c-Kit (total)	IL-17	RANTES
CKMB	IL-18 *	Rb Ser 608 (phospho) ◀NEW
CRP	IP-10	Rb Ser 780 (phospho) ◀NEW
EGFR Tyr 1173 (phospho)	I-TAC	Rb (total) ◀NEW
EGFR Tyr 1068 (phospho)	Insulin	S6RP Ser 235/236 (phospho)
EGFR (total)	IR (phospho)	S6RP Ser 240/244 (phospho)
Eotaxin	IR (total)	S6RP (total) ◀NEW
Eotaxin 3	IRS-1 (phospho)	SAA
EPO	IRS-1 (total)	Sclerostin
ErbB2 (phospho)	JNK (phospho)	E-Selectin
ErbB2 (total)	JNK (total)	P-Selectin
ERK-1/2 (phospho)	LBP	STAT3 (phospho)
ERK-1/2 (total)	Leptin	STAT5a/b Tyr 694 (phospho) ◀NEW
ERK-5 (phospho) ◀NEW	Luteinizing Hormone (LH)	STAT5a/b (total) ◀NEW
Estradiol	MAPKAPK-2 (phospho)	TARC
FSH	MCP-1	Tau (phospho)
GLP-1 (total active) ◀NEW	MCP-4	Tau Ser 262 (phospho) *
GLP-1 (7-36)amide (active) ◀NEW	M-CSF	Tau (total)
GLP-1 (total)	MEK2 (total)	TGF-β1
GLP-1 (7-36)amide	MEK1/2 (phospho)	Thrombomodulin
Glucagon ◀NEW	MEK1/2 (total)	TIMP-1 ◀NEW
G-CSF	Met (phospho)	TNF-RI
GM-CSF	Met (total)	TNF-RII
GSK-3α (phospho)	sMet *	TNF-α
GSK-3α (total) *	MDC	Troponin T
GSK-3β (phospho)	MIG *	Tuberin (phospho) *
GSK-3β (total)	MIP-1α	VASP Ser 157 (phospho)
HCG *	MIP-1β	VASP Ser 239 (phospho)
HGF	MIP-3α	VASP (total)
HIF-1	MMP-1	VEGF
Histone H3 (phospho)	MMP-2	VEGFR-2 (phospho)
HSP27 Ser 15 (phospho)	MMP-3	VEGFR-2 (total)
HSP27 Ser 78 (phospho)	MMP-9	sVCAM-1
HSP27 Ser 82 (phospho)	MMP-10	sVEGFR1 (sFlt-1)
HSP27 (total)	mTOR (phospho) ◀NEW	sVEGFR2 (KDR)
HSP70 (total)	Myeloperoxidase	

FlowCytomix Technology

(Bender MedSystems)

- multiplexní analýza na principu sendvičové imunoanalýzy a průtokové cytometrie
- využití klasických průtokových cytometrů
- rychlá analýza bez nutnosti sběru série vzorků

Analyte	Th1/Th2 11plex
Parameters	IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), TNF-alpha, TNF-beta, IFN-gamma

Analyte	Cardiovascular 6plex
Parameters	sCD40L, IL-6, IL-8, MCP-1, sP-selectin, t-PA

Analyte	Adhesion 6plex
Parameters	sE-Selectin, sICAM-1, sICAM-3, sPECAM-1, sP-Selectin, sVCAM-1

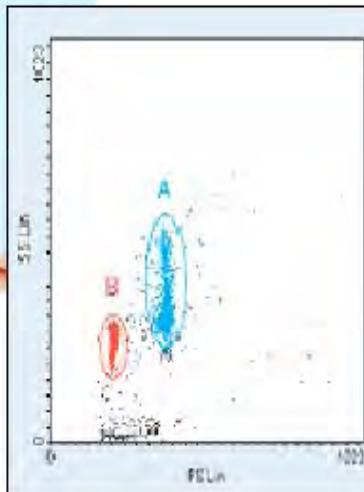
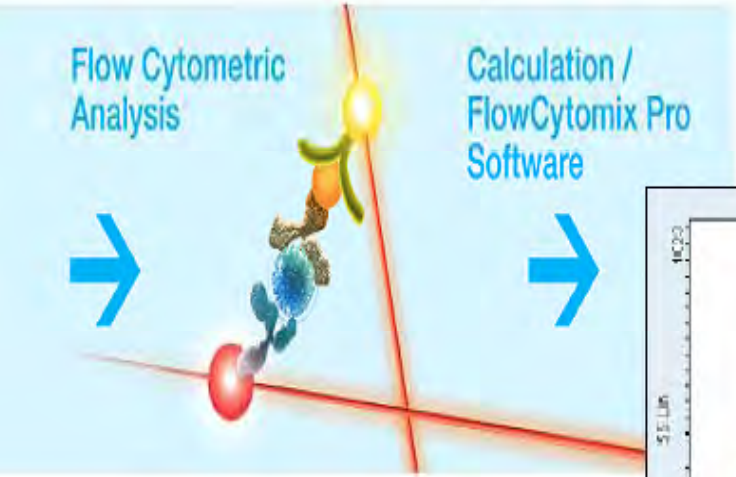
Analyte	Chemokines 6plex
Parameters	MIP-1 alpha, IL-8, MIP-1 beta, G-CSF, MIG, MCP-1

Analyte	Obesity 9plex
Parameters	sCD40L, sICAM-1, IL-6, Leptin, MCP-1, MPO, OPG, Resistin, sTNF-R (60kDa)



1st Incubation / Wash

2nd Incubation / Wash



Bio-barcode assay

- multiplexní – různé sondy
- ultrasenzitivní detekce NK a proteinů
- imunochemická reakce s detekcí bar-code DNA pomocí PCR
- PSA (LOD = amol/l)
- 10^6 x vyšší citlivost proti ELISA metodě
- časově náročné

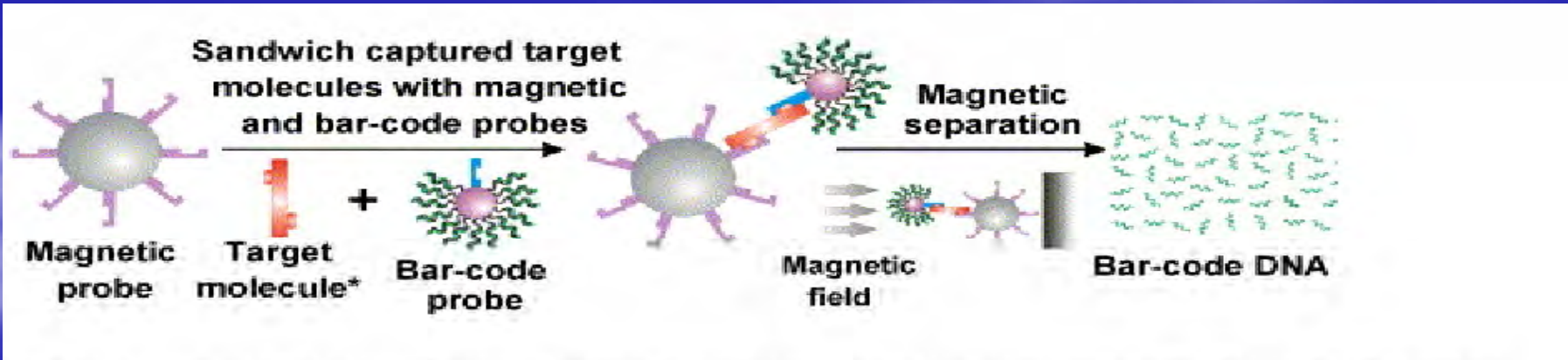


Fig. 4. The bio-barcode assay. The bio-barcode assay takes advantage of two particle probes that are each specific to the target. One is a magnetic particle probe that captures the target from complex media. The other is a gold nanoparticle probe that is also specific to the target of interest but also carries with it hundreds to thousands of DNA sequence barcodes that are chosen to be specific to the target of interest. Detection of the released bio-barcodes can be done using any number of common DNA detection modalities (e.g., microarray, fluorescence, electrochemistry, etc.).

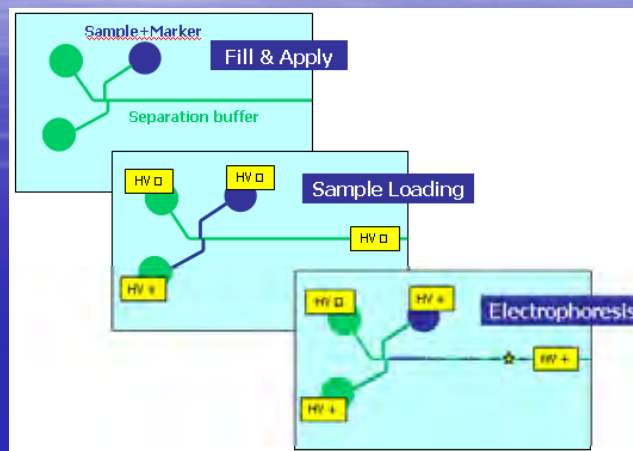
Separační čipové metody

- skleněné nebo polymerové čipy
- mikrofluidní technologie - sítě kanálků a jamek
- tlak nebo elektrokinetické síly, ženou tekutiny skrz kanálky
- umožňuje dávkování vzorku, míchání, ředění
- chromatografické nebo elektroforetické separace
- barvení, detekce na různých principech

- Výhody:
 - jednoduchost použití, rychlost, malé obejmy vzorků, automatizace
- Nevýhody:
 - nutná extrémní čistota chemikálií, prostředí, náchylnost k zanášení

CE a HPLC na čipu

CE - Shimadzu – systém MultiNA

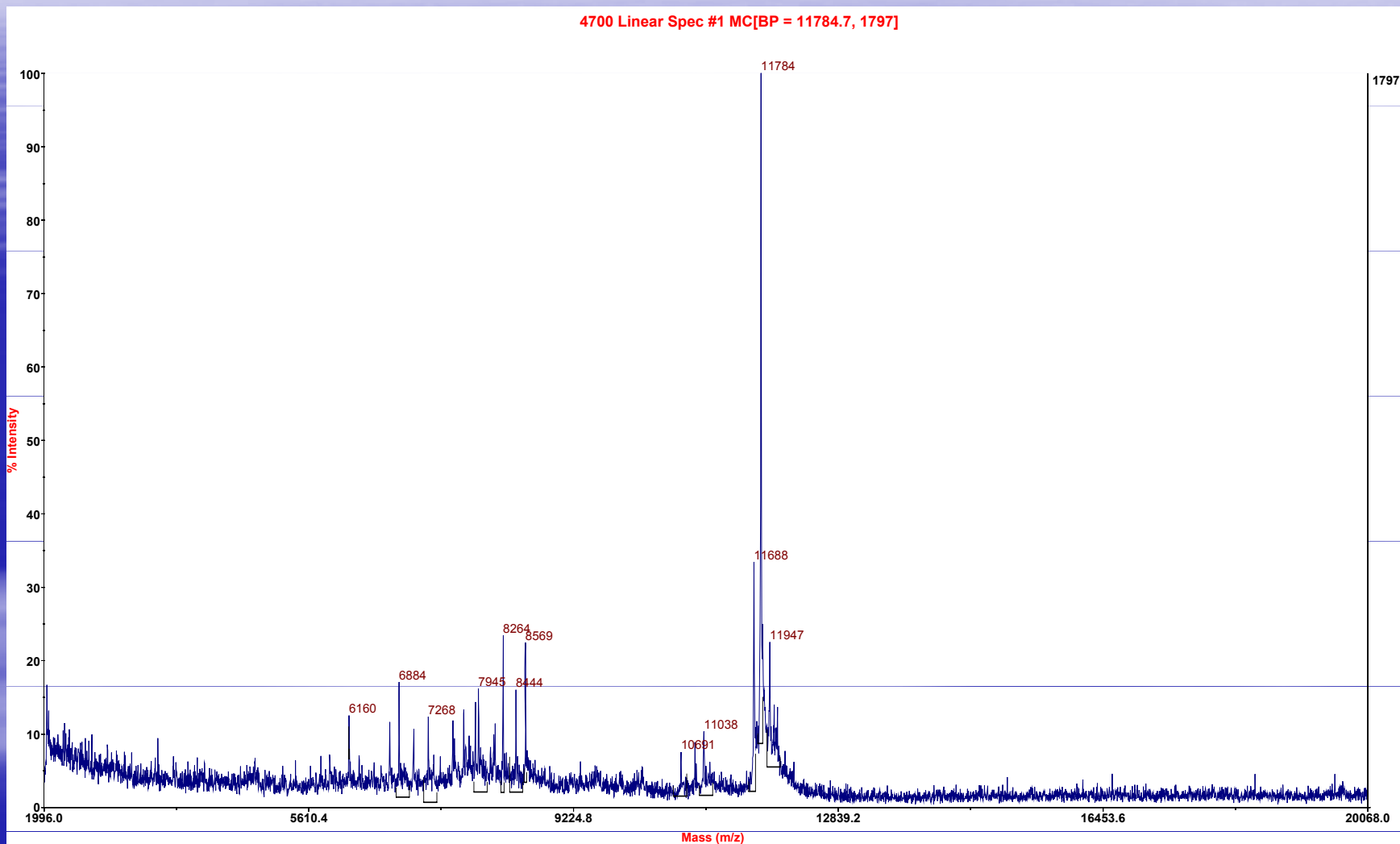


Agilent HPLC-Chip / MS System

v čipu separační kolona
všechny konektory
nanosprej interface



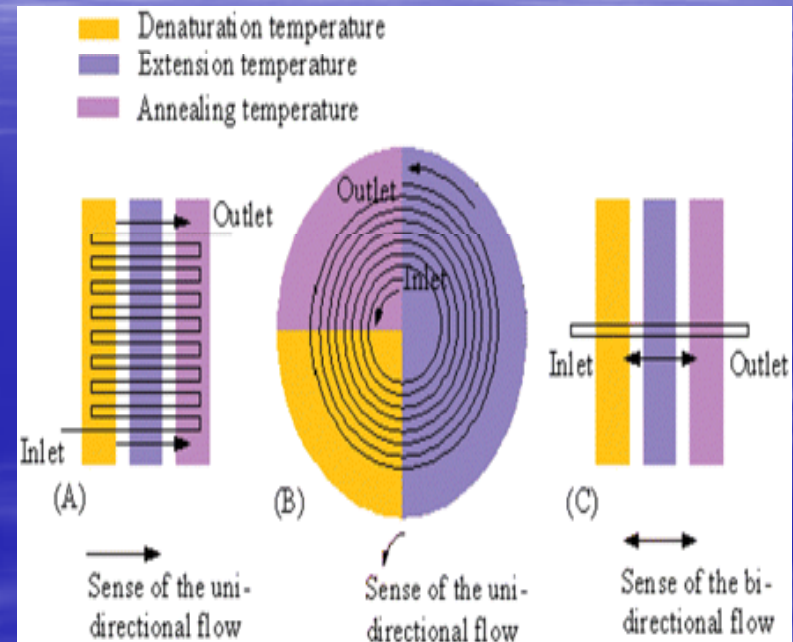
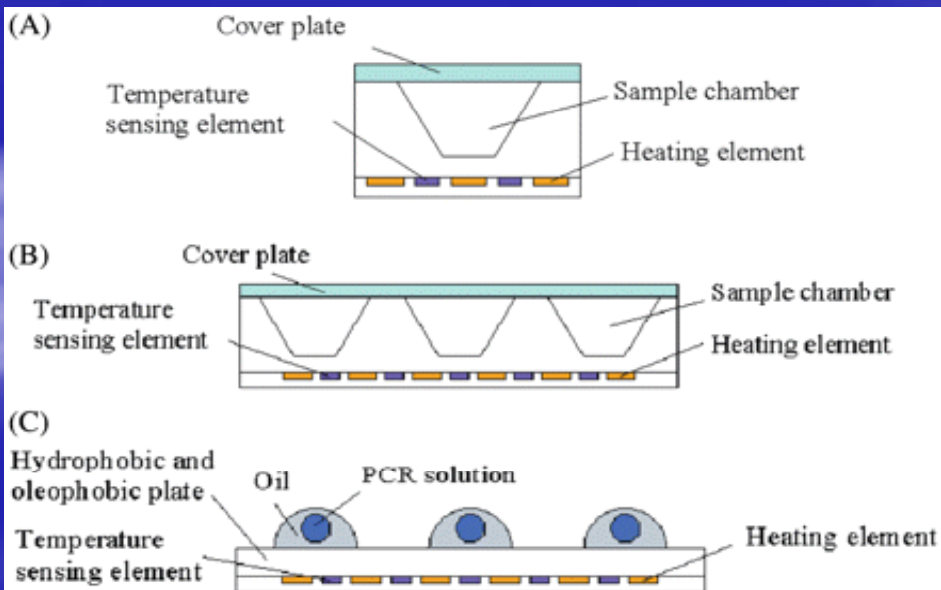
MALDI TOF bílkovin v moči s Bence Jonesovou bílkovinou



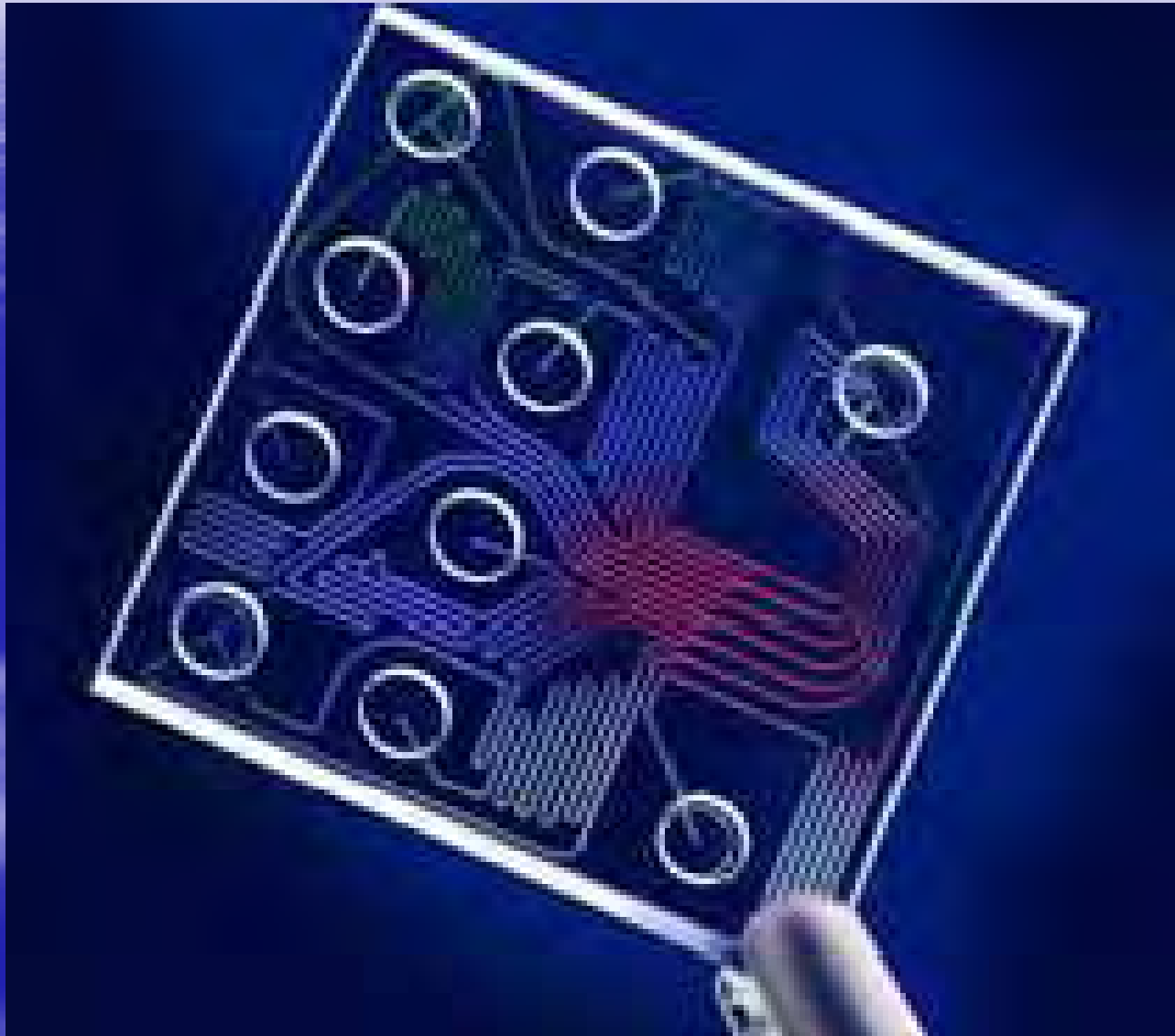
Lineární hmotnostní spektrum měřené v pozitivním módu, rozsah m/z je od 2 000 do 20 000

PCR

- mikrofluidní čipy
- vyhřívané bloky pro jednotlivé fáze PCR
- Chunsun Zhang et al. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 13 , 4223-4237



Lab-on-a-Chip

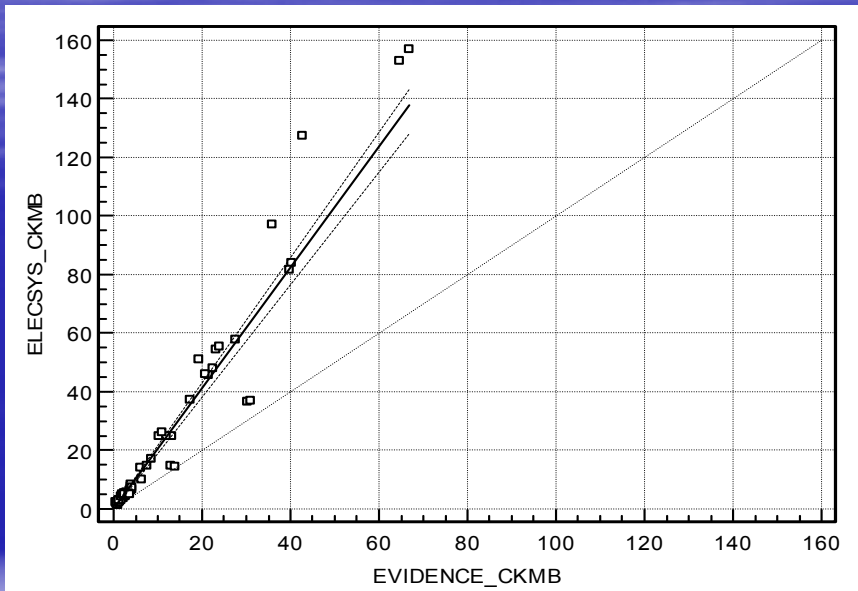


Problémy imunochemických čipů

- Analytická optimalizace metod
 - detekce, délka inkubace, promývání, jednotné ředění pro všechny analyty,
- Standardizace metod - srovnání s jinými imunochemickými technikami
- QC – selhání u jednoho parametru, odmítnutí výsledků pro celý panel ???

Standardizace metod

$$Y = 2,0656 X + 0,0946$$

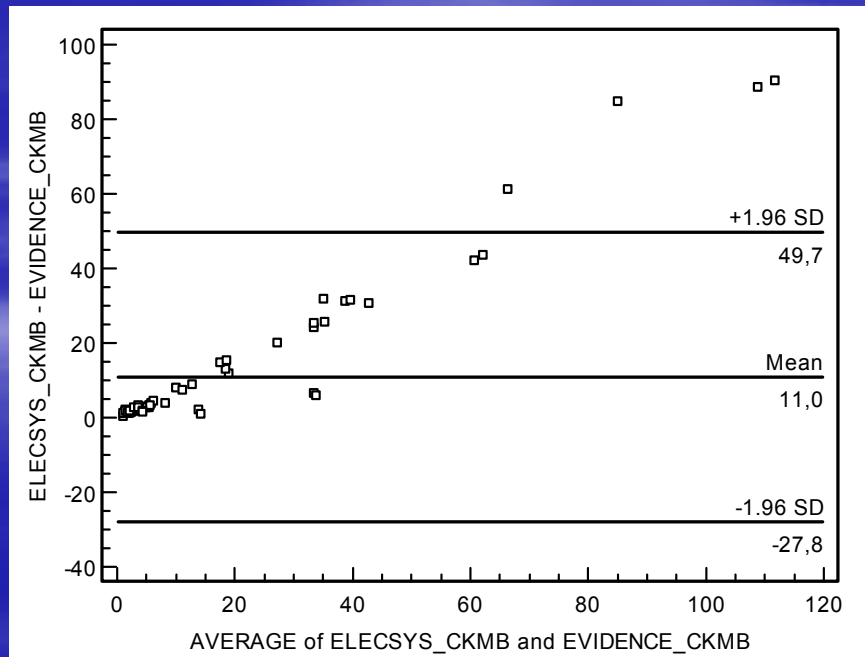


ELECSYS_CKMB (Roche)

Lowest value = 1,19 ug/l
Highest value = 156,90 ug/l
Arithmetic mean = 20,63 ug/l
Median = 5,24 ug/l
Standard deviation = 33,44 ug/l

EVIDENCE_CKMB (Randox)

Lowest value = 0,42 ug/l
Highest value = 66,73 ug/l
Arithmetic mean = 9,67 ug/l
Median = 2,60 ug/l
Standard deviation = 14,28 ug/l



QC

Ulrychova, M et al. Využití technologie proteinových biočipů pro stanovení kardiálních markerů u pacientů s akutním infarktem myokardu, KBM, 4, 2008, 248-251.

Evidence Investigator

- Nepřesnost (CV) z 10 měření
- Vzorky: směsné kontroly
- panel – Cardiac Array

	CKMB	MYO	GPBB	FABP	CA3	CTNI
Concentration (µg/l)	3.9	86.3	8.4	3.2	4.0	1.6
	13.2	124.6	27.9	18.9	29.6	7.0
	30.9	120.7	68.1	43.8	39.6	12.0
Interassay CV (%)	7.5	13.5	6.6	5.0	7.0	8.7
	6.9	11.6	4.2	5.7	9.3	6.0
	8.6	15.6	7.9	8.7	9.8	9.0

Di Serio et al. Proteomic approach to the diagnosis of acute coronary syndrome: Preliminary results. Clin. Chim. Acta, 357, 2005, 226-235.

Interassay CV (%)	9.1	18.7	23.7	8.4	18.2	7.8
	7.3	16.8	30.8	5.9	19.0	6.9
	9.7	16.4	34.0	6.3	17.1	6.3

QC

- Ellington, AA et al. Measurement and Quality Control Issues in Multiplex Protein Assays: A Case Study, Clin Chem.,55, 2009, 1092-99.

SearchLight Protein Array Technology

Nepřesnost měření v dubletech

Vzorky: směsné kontroly a plazma

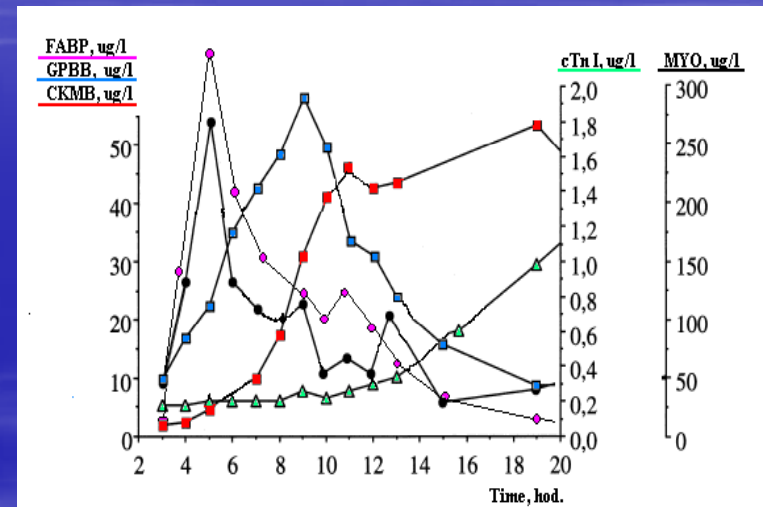
2 panely – cytokiny

procentuální zastoupení vzorků s nepřesností (CV) větší než:			
	10%	20%	30%
Panel A			
IL-6	33,1	12,8	6,0
IL-8	50,7	26,1	14,9
TNF-RI	40,6	17,3	7,9
TRAIL	78,6	60,9	46,3
P-selektin	23,1	8,1	3,8
RAGE	38,4	18,3	11,1
Panel B			
MCP-1	38,8	21,1	13,1
TNF-RII	29,1	14,6	9,8
MMP-1	45,8	28,0	20,9
MMP-2	31,0	14,7	10,2
TIMP-1	18,7	5,3	2,5
TIMP-2	20,7	9,4	6,5
RANTES	29,9	14,8	8,4
E-selektin	19,1	6,9	3,8
ICAM	28,0	13,3	8,0
Průměr	35,2	18,2	11,6

Aplikace v klinické biochemii

Multianalytový přístup k diagnostice kardiologických onemocnění

- AIM vs. stabilní, nestabilní AP
- hypertrofická kardiomyopatie
- kardiotoxicita cytostatik
- radifrekvenční ablace
- hepatopatie



	CKMB ug/l	MYO ug/l	GPBB ug/l	FABP ug/l	CA III ug/l	cTnI ug/l
při příjmu	17,66	363,77	46,71	76,56	95,69	3,23
po 24 hod	31,67	97,77	18,59	8,43	71,45	18,14
po 2-3 dnech	3,05	58,89	16,37	3,88	40,65	4,47
Referenční meze	3,9	59,0	7,3	4,5	55,0	0,4

Závěr

- přehled současných možností využití technologie proteinových biočipů
- metody používané zatím v oblasti výzkumu
- rychlý rozvoj
- i přes současné problémy velký potenciál do budoucna
- použitelnost v klinických laboratořích
 - rozšíření spektra analytů
 - zjednodušení laboratorních postupů
 - zlepšení diagnostiky

Děkuji za pozornost

