

UNIDAD DE GENÓMICA
CABIMER

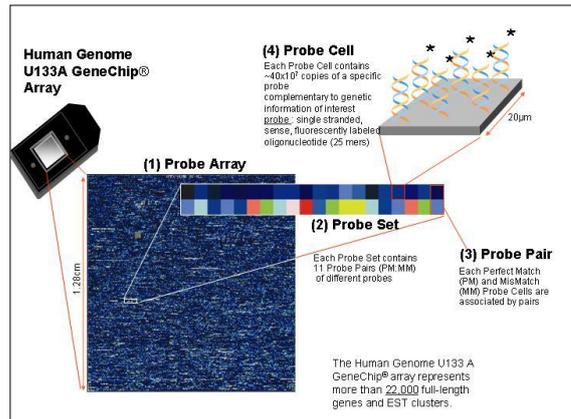
Guía de usuario de Microarray Affymetrix (EXPRESIÓN)

La tecnología de Microarrays, basada en la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos, puesta a punto por Affymetrix permite el análisis funcional del genoma. Dicha plataforma está permanentemente actualizada, es de alta reproducibilidad y exactitud, motivos por los cuales es una de las más utilizadas en el mundo. Esto permite una comparación directa de datos con los de otros laboratorios, y se encuentra en sincronía con las necesidades de nuestra comunidad científica.

Los Microarrays de Affymetrix se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos de 25-mer utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo.

Las muestras de RNA se marcan con biotina y cada muestra se hibrida en un array independiente.

Para su procesamiento se utiliza la Estación Fluídica 450 de Affymetrix. La Unidad dispone del Scanner modelo "3000 7G" para la captura de la imagen, que tras la hibridación se lleva a cabo.



Posteriormente se analizan de forma rutinaria los GeneChips® escogidos según el objetivo del experimento.

Representación esquemática del sistema de análisis de expresión 3' GeneChip® de Affymetrix. Imagen tomada de http://www.weizmann.ac.il/home/ligivol/research_interests.html.

➤ **EL SERVICIO INCLUYE**

Para realizar un análisis completo de Microarrays se **incluyen los siguientes puntos y servicios:**

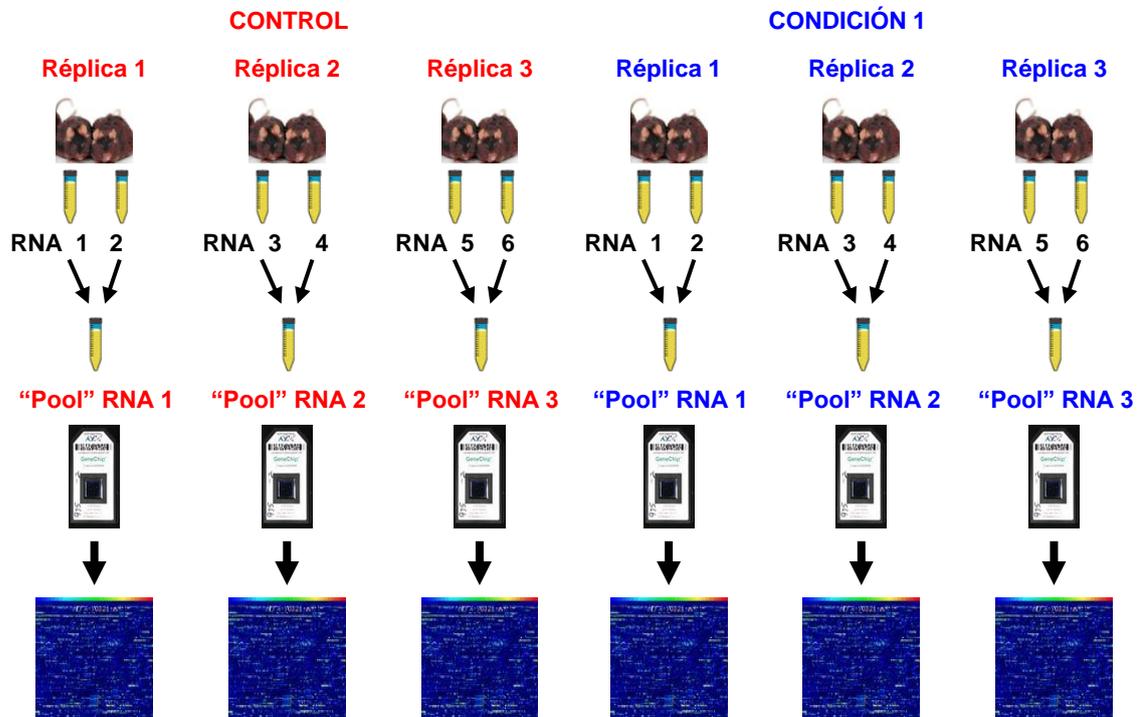
- Asesoramiento respecto al diseño experimental.
- “Análisis de calidad de DNA” (Bioanalyzer 2100/Agarosa). Si no cumplen los requisitos de Calidad/Cantidad se comunicará al usuario vía email.
- Microarrays
- Amplificación y marcaje de la muestra (biotinado).
- Hibridación y lavados de Microarrays.
- Lectura de los arrays mediante el Scanner modelo "3000 7G".
- Análisis de la imagen, Control de calidad y Cuantificación de datos de fluorescencia con el software específico AGCC (datos brutos *.CEL).
- Para los arrays de expresión, miRNA y splicing se incluye el “Análisis Bioestadístico de datos” (limma o anova) si se trata de 3 o más réplicas: procesamiento de los datos de fluorescencia (datos brutos), normalización de datos mediante RMA, valor de cambio de expresión de una condición respecto a su referencia, con los parámetros estadísticos apropiados para establecer un grado de credibilidad (p-value) y anotaciones sobre los transcritos (número de identificación de Affymetrix, símbolo del gen, nombre del gen y descripción con el número de acceso del transcrito correspondiente). En los microarrays de última generación se utilizará el software gratuito de Affymetrix, TAC (*Transcriptome Analysis Console Software*).



➤ **RECOMENDACIONES PARA EL DISEÑO EXPERIMENTAL**

Antes de utilizar el Servicio de Genómica hay algunos requisitos importantes de los que depende la obtención de resultados fiables y reproducibles, dado la gran inversión de tiempo y dinero en estos experimentos:

- Cuál es el **objetivo** de dicho experimento, es decir, qué respuestas son las que buscamos.
- Establecer los **controles** más apropiados para las muestras a estudiar.
- Definir **nº de réplicas** por cada condición experimental para promediar los resultados y que éstos sean estadísticamente significativos. Como mínimo son necesarias 3.
- En el caso de estudios de expresión, para disminuir la variabilidad de cada individuo es recomendable hacer mezclas ("pooles") de las muestras.



RECOMENDACIONES DISEÑO EXPERIMENTAL.
1 Hibridación = 1 Réplica de 1 Condición Experimental
- **Mínimo 3 Réplicas c/ Condición Experimental**

➤ **REQUISITOS DE LAS MUESTRAS**

1. **Análisis de perfiles de expresión génica**

a. **Aislamiento del RNA:** Es imprescindible que el usuario obtenga un de un RNA de alta calidad y pureza. El método que da mejores resultados es la extracción con TRIzol (Invitrogen cat: [15596-026](#)) según recomienda Affymetrix, con una purificación adicional por columnas RNeasy de QIAGEN (Qiagen RNeasy, cat: [74104](#)). La purificación por Kits de extracción de RNA de Qiagen son igualmente recomendables, fiables y productivas.

b. **RNA resuspendido en Agua libre de RNAsas.**

c. La cantidad dependerá del protocolo de marcaje, usándose uno u otro según la disponibilidad de material de partida para las muestras que vayan a ser marcadas y del tipo de array que se vaya a hibridar:

Tipo Array	Cantidad RNA necesaria	Concentración mínima	Concentraciones menores (pg/μl) o Muestras FFPE
<i>3' Expression Array</i>	> 250 ng RNA total	40 ng/μl	Consultad con la Unidad
<i>Gene Array</i>	100-250ng RNA total	40 ng/μl	
<i>HTA/MTA</i>	100-250ng RNA total	40 ng/μl	
<i>Exon Array</i>	> 500 ng RNA total	100 ng/μl	
<i>miRNA Array</i>	250 ng de RNA total de tejidos o 1 μg de cultivos celulares		

No existe ningún inconveniente en mandar más cantidad de RNA o más concentrada. Si la cantidad de muestra que se puede obtener es problemática, son muestras FFPE o hay cualquier duda sobre ella, ponerse en contacto con la unidad para buscar alguna alternativa y/o solución.

d. **Requerimientos de calidad**

Si la Cuantificación la Realiza el usuario por Espectrofotometría (i.e.: NanoDrop) $A_{260/280} \geq 1,8$; $A_{260/230} \geq 1,5$. Estos datos deben ser anotados en el Formulario de Solicitud en el lugar indicado para ello.

Si además ha comprobado la integridad: $28S/18S \geq 1,2$; $RIN \geq 7$.

No obstante, al llegar las muestras a la Unidad siempre se procede a la determinación de su integridad por medio del Bioanalyzer 2100 (incluido en el servicio).

Si las muestras que no pasan el mínimo de calidad/cantidad exigida, se le comunicará al usuario junto con una explicación y recomendaciones para la obtención de muestras adecuadas.

c. Al menos **3 réplicas** por condición experimental.

d. Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. 

Al llegar las muestras a la Unidad se procederá a la cuantificación de éstas así como a la determinación de su integridad por medio del Bioanalyzer 2100. Las que no pasen un mínimo de calidad exigida se le comunicará al usuario junto con una explicación y recomendaciones para la obtención de muestras adecuadas.

2. Análisis de regulación y genomas completos

Para ello, los distintos tipos de Microarrays disponibles hasta el momento son los de "Promoter Arrays", "ENCODE Arrays" o los de "Tiling Arrays". Según la aplicación los requisitos son los siguientes:

Mapeo Transcripcional

- a. **Cantidad de RNA:** RNA total aislado mediante columnas RNeasy de QIAGEN (Qiagen RNeasy, cat: 74104). No menos de 6ug de RNA total para muestras de ratón y humanos (concentración mínima de 0,24 µg/µl); y 7ug de RNA total para muestras de levaduras (*S.cerevisiae*, *S.pombe*), *Drosophila*, *C. elegans* y *A.thaliana* con una concentración mínima de 1ug/uL.
- b. Muestras resuspendidas en **Agua libre de RNAsas/DNAsas**.
- c. Al menos **3 réplicas** por condición experimental.
- d. Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. 

ChIP-on-Chip

- a. **Cantidad de DNA inmunoprecipitado.** Entre 5-50 ng según el estudio, con un enriquecimiento de entre 5 y 8 veces.
- b. Muestras resuspendidas en **Agua libre de RNAsas/DNAsas**.
- c. Recomendable **2 ó 3 réplicas** por condición experimental.
- d. Todas las muestras (en tubos eppendorf de 1.5mL) deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. 

Para cualquier duda puede ponerse en contacto con el Servicio de Genómica a través de las siguientes direcciones de correo electrónico, Eloisa Andujar, Mónica Pérez, Andrés Aguilera o en el teléfono 954 467 828.

➤ ENVÍO DE MUESTRAS

Las muestras de RNA/DNA, una vez purificadas y en las concentraciones indicadas en los apartados anteriores se enviarán congeladas en nieve carbónica **en tubos Eppendorf® de 1,5 mL en Agua libre de RNAsas**, junto con una copia original impresa del **Formulario de Solicitud** cumplimentado correctamente. 

Si por algún motivo ajeno a la Unidad, una vez realizada la solicitud, el usuario cancelara la misma, el material fungible correspondiente le será facturado.

La dirección a la cual pueden ser remitidas es:

Unidad de Genómica
Centro Andaluz de Biología Molecular y
Medicina Regenerativa (Cabimer)
Avda. Américo Vespucio s/n
Parque Tecnológico Cartuja´93
41.092 SEVILLA

Horario de recepción de muestras: 9:00 h a 17:00 h (9:00h a 14:00h Julio y Agosto)

El envío de las muestras **debe ser comunicado previamente** por teléfono (954-467828) o por e-mail (eloisa.andujar@cabimer.es/monica.perez@cabimer.es).

Por su parte, la Unidad de Genómica comunicará vía e-mail la recepción de las mismas así como cualquier problema que pueda surgir tras los controles de calidad realizados sobre éstas.

➤ **ENTREGA DE LOS RESULTADOS**

Una vez terminado el experimento y obtenidos los datos de su análisis, los resultados se le enviarán al usuario vía e-mail o ftp junto con un informe final (*.pdf) explicando el procedimiento empleado técnica y analíticamente, así como la evaluación de los controles de calidad del experimento y procesamiento y normalización de datos.

En el caso de **Estudios de expresión** se les enviará los ficheros *.CEL (*raw data*) y *.CHP (*normalized data*) que contienen toda la información de cada microarray y un documento Excel en el que se incluyen los datos brutos y normalizados por estadístico, así como el análisis comparativo apropiado.

Este documento Excel incluye varias Hojas que contienen concretamente la siguiente información:

- a. La primera hoja contiene los **datos normalizados por RMA** (Robust Microarray Average), que sólo da valores numéricos en log₂, pero que permite la comparación directa entre el valor de expresión de un gen en un experimento, con el de otro experimento (ya sea réplica u otra condición experimental distinta). También se muestra en esta hoja el símbolo del gen correspondiente, así como la descripción. Estos valores corresponden a las intensidades relativas de las hibridaciones de las moléculas de RNA/DNA con cada sonda representada en el array (Unidades de Fluorescencia).
- b. En las demás Hojas (según comparaciones), vuelven a estar los datos normalizados de cada réplica, se mostrarán una serie de parámetros y algoritmos que corresponden al **Análisis Estadístico** realizado por LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) o unpaired/paired One-Way ANOVA entre los que se incluyen: Nivel de cambio de expresión, Grado de confianza, etc.... Esto permitirá al usuario establecer cortes significativos para poder seleccionar grupos de genes diferencialmente expresados.

Esta información se ofrece en un **plazo máximo de 15 días desde su comienzo** (salvo excepciones) desde el comienzo del análisis, el cual será comunicado al usuario vía email

Además, para todos los Arrays de Expresión (excepto los *3'-IVT Analysis*), Affymetrix ha desarrollado un Software Gratuito de Análisis que permite: Normalizar Datos, Test estadístico para Seleccionar Genes Diferencialmente Expresados/Eventos de Splicing que sean Significativos, relacionarlos con Rutas Metabólica, Representaciones Gráficas, etc...: [Transcriptome Analysis Console \(TAC\) Software](#).

En el caso de **Estudios de regulación génica** (ChIP-on-Chip) se les enviará los ficheros de datos brutos *.CEL, así como los datos normalizados (*BAR) y los intervalos de enriquecimiento positivo según criterios generales establecidos en la unidad para cada organismo (*BED).

Así mismo, al igual que en los Arrays de expresión, Affymetrix ha desarrollado un Software Gratuito para el análisis de este tipo de Arrays denominado [Tiling Array Software](#) (TAS).

➤ **TARIFAS**

Consultar con la Unidad.

➤ **INFORMACIÓN DE INTERÉS**

Affymetrix

<http://www.affymetrix.com>

3' Expression Array (3' IVT Analysis)

GeneChip® Human Genome U133 2.0 Arrays

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131537/AFFY/Human+Genome+U133A+2.0+Array#1_1

GeneChip® PrimeView™ Human gene Expression Array

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod530005/AFFY/PrimeView%26%23153%3B+Human+Gene+Expression+Array+#1_1

Whole-Transcriptome Expression Profiling

Gene Array (Gene-Level and Exon Analysis)

GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131453/AFFY/Human+Gene+ST+Arrays#1_1

Transcriptome Array (Gene-Level and Splicing Alternative Analysis)

GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/prod760002/AFFY/Human+Transcriptome+Array+2.0#1_1

Exon Array

GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131452/AFFY/Human+Exon+ST+Array#1_1

miRNA (miRNA, snoRNA and scaRNA of Human, Mouse, Rat, Other)

http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131473/AFFY/miRNA+Array#1_1

Gene Regulation Analysis

Tiling Array (Chip on Chip)

GeneChip® Human Tiling 2.0R Array Set (14 arrays)

http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/human_tiling_2.affx#1_2

Tiling Array (Transcript Mapping)

GeneChip® Human Tiling 1.0R Array Set (7 arrays)

http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/human_tiling.affx

Analysis Softwares

Software for RNA Analysis Solutions Microarrays

Transcriptome Analysis Console (TAC) Software

http://www.affymetrix.com/estore/browse/level_seven_software_products_only.jsp?categoryIdCicked=&productId=prod760001#1_1

Tiling Array Analysis Software

Tiling Array Software (TAS)

http://www.affymetrix.com/estore/partners_programs/programs/developer/TilingArrayTools/index.affx