

## Stanovení množství transkriptu genu pomocí RT-qPCR

### Princip ÚLOHY

V praxi se často setkáváme s potřebou provést kvantifikaci transkriptu vybraného genu. V současné době se ke kvantifikaci transkriptů vybraných genů využívá především metoda reverzní transkripce ve spojení s metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR).

### Reverzní transkripce

V prvním kroku je nejprve provedena reverzní transkripce izolované celkové RNA, kdy si musíme uvědomit, že mRNA tvoří pouze 1-2% z celkové RNA. Reverzní transkripce (RT) je enzymatický proces, při kterém je podle templátové RNA syntetizována cDNA. RT je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou (RNA-dependentní DNA polymeráza). Pro průběh reakce je tedy nezbytná přítomnost RNA, reverzní transkriptázy, směsi deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP), reakčního pufru a primerů. Zpravidla se pro tyto účely využívají tři typy primerů:

- oligo dT primery – používají se v případě mRNA obsahující polyA 3'-konec, v případě dlouhých transkriptů nemusí dojít k úplnému přepisu
- směs náhodných hexaoligonukleotidů – nasedají náhodně na templátovou RNA, jsou vhodné zejména pro přepis celkové RNA a delších transkriptů
- sekvenčně specifické primery

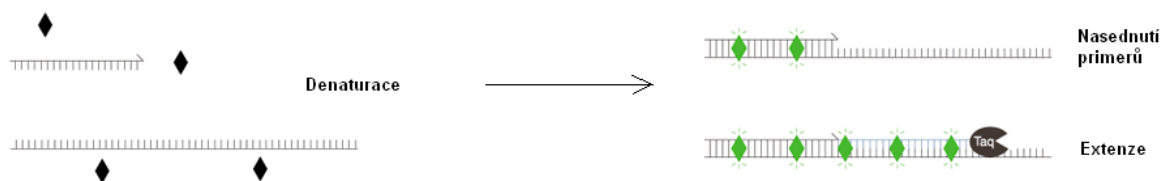
### qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

V následujícím kroku je poté přepsaná cDNA specificky namnožena pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Principem qPCR je kvantifikace množeného produktu v každém jednotlivém cyklu PCR. K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Obvykle se používají interkalační barviva nebo specifické sondy.

#### Interkalační barviva

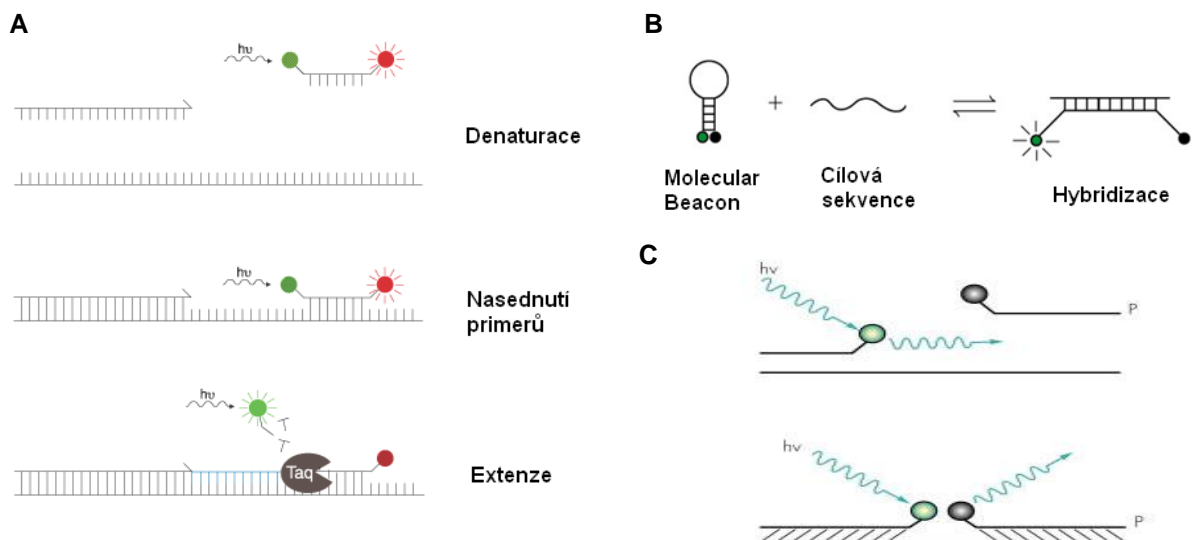
Jako interkalační barvivo se většinou používá barva SYBR Green I, která se interkaluje do dvoušroubovice DNA. Intenzita fluorescence nevázaného barviva po excitaci vlnovou délkou 488 nm je velmi nízká, zatímco po interkalaci dochází k nárůstu fluorescence s maximem při 522 nm. Jak během PCR dochází k množení dvou řetězového produktu, dochází i k postupnému nárůstu fluorescence, která

se měří vždy na konci elongační fáze každého cyklu. Nevýhodou interkalačního barviva je, že nerozlišuje případnou kontaminaci nespecifickou dsDNA a může rovněž interkalovat mezi dimery primerů. Z tohoto důvodu je nutné po proběhnutí amplifikace u interkalačních barviv provést analýzu křivky tání, která se používá k odlišení specifických a nespecifických produktů PCR reakce. Nespecifické produkty mají odlišnou (obvykle nižší)  $T_m$  než produkty specifické.



### Specifické sondy

Pro specifickou detekci množení produktu jsou využívány specifické fluorescenční sondy, které dělíme do dvou základních skupin, na sondy hydrolyzační (*TaqMan*) a hybridizační (*FRET*, *Molecular Beacons*). TaqMan sonda je krátký úsek DNA, který hybridizuje s cílovou sekvencí uvnitř amplifikované oblasti. Na 5'konci sondy je navázané fluorescenční barvivo a na 3'konci je molekula zhášeče. U sondy, která je v inaktivním stavu, tlumí zhášeč všechno záření emitované fluorescenčním barvivem. V průběhu reakce se využívá 5' exonukleázová aktivita Taq polymerázy, která během elongace štěpí navázanou sondu, čímž dochází k oddálení molekuly zhášeče od fluoroforu a narůstá fluorescenční signál (A). Systém molekulárních majáků využívá vysoce specifické sondy ve tvaru vlásenky. Jejich střed je komplementární s amplifikovanou sekvencí, zatímco konce vlásenky jsou komplementární navzájem. Na obou koncích DNA je opět navázán zhášeč a fluorescenční barvivo. Není-li sonda navázaná na komplementární úsek DNA má tvar vlásenky, molekuly fluoroforů jsou v těsné blízkosti a intenzita fluorescence je minimální. Po navázání sondy dochází k rozložení vlásenkové struktury, oddálení fluoroforů a nárůstu fluorescenčního signálu (B). Systém FRET sond využívá hybridizace dvou sond v těsné blízkosti a rezonančního přenosu energie z jedné sondy na druhou. K nárůstu fluorescence poté dochází pouze v případě specifického nasednutí sond vedle sebe (C).



## Vyhodnocení

Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je úměrná množství nově vzniklé DNA. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikační křivky a hodnoty Ct (Cycle threshold), při které došlo k překročení nastavené hladiny fluorescence. Pro vyhodnocení real-time PCR se může použít buď relativní, nebo absolutní kvantifikace.

Absolutní kvantifikace umožňuje přímo určit výchozí počet kopií cílových molekul. Pro stanovení je třeba sestavit kalibrační křivku pro sérii standardů a z této křivky se pak odečítá koncentrace neznámého vzorku. Nejčastěji je poté exprese stanovovaného genu vyjadřována jako poměr koncentrace stanovovaného genu a je koncentrace kvantifikovaného genu a tzv. house-keeping genu, jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní.

Relativní kvantifikace popisuje relativní změnu exprese genu vůči vnitřnímu standardu. Jako vnitřní standard se využívá tzv. house-keeping gen, jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní. Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu house-keeping genu je možno použít několik metod. Metody používané pro výpočet relativní kvantifikace jsou buď již zmíněná metoda kalibračních křivek, nebo častěji používaná srovnávací  $\Delta\Delta Ct$  metoda. Základním předpokladem při srovnávací  $\Delta\Delta Ct$  metodě je, že amplifikace cílového i house-keeping genu probíhá se stejnou účinností. K výpočtu celkového množství cílového genu se poté používá vztah:

$$R=2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

kde:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  testovaného vzorku -  $\Delta Ct$  kontrolního vzorku

$\Delta Ct$  testovacího vzorku =  $\Delta Ct$  cílového genu -  $\Delta Ct$  house-keeping genu

## **Cíl úlohy**

Cílem úlohy je provést kvantifikaci transkriptu genu zájmu z izolované RNA buněk tabáku a provést vyhodnocení změny exprese pomocí metody relativní kvantifikace v časech 0 hodin a 24 hodin. Jako house-keeping gen bude použit gen pro elongační faktor 1 alfa (EF1a).

## **Vlastní provedení analýzy**

1. Na přístroji NanoDrop změříme při 260 nm koncentraci izolované RNA a z poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  vyhodnotíme čistotu izolované celkové RNA.
2. Poté změříme koncentraci RNA na přístroji Qubit pomocí RNA HS kitu a výsledky porovnáme.
3. Celkovou RNA naředíme pomocí PCR vody na koncentraci 0,5 mg/ml do celkového objemu 10 ul.
4. Provedeme reverzní transkripci pomocí reverzní transkriptázy ImProm II (Promega, USA):

*Složení reakční směsi:*

2,0 µl	ImProm-IITM 5x ředěný reakční pufr
2,2 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	dNTP
0,5 µl	Náhodné Hexamery
0,5 µl	ImProm-II reverzní transkriptáza
0,2 µl	RNAsin
2,1 µl	PCR voda
2,0 µl	RNA (0,2 mg/ml)

Vzorky vložíme do cycleru a spustíme následující program:

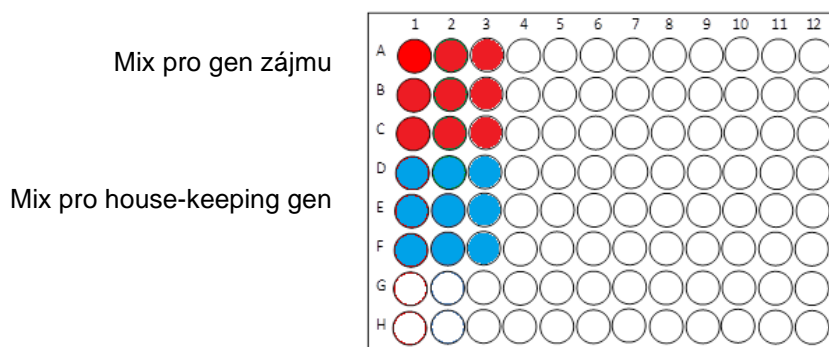
25 °C	10 minut
42 °C	45 minut
70 °C	15 minut

5. Po proběhnutí reverzní transkripce přidáme ke směsi ve zkumavce 10 ul PCR vody a provedeme qPCR reakci pomocí GoTaq®qPCR Master Mixu (Promega, USA):

*Složení reakční směsi pro gen zájmu a house-keeping gen (10 reakcí):*

75 µl	Luna® qPCR Master Mix
50 µl	PCR voda
5 µl	F+R primer (10 µM)

6. Poté napipetujeme dle schématu do stripů 13,0 ul připravené reakční směsi.  
7. Následně přidáme k reakční směsi jednotlivé vzorky (2,0 ul) dle schématu, kdy reakce se vzorky provedeme v triplicátu:



Následně vzorky v destičce stočíme, destičku vložíme do přístroje LightCycler® 480 a spustíme následující program:

*Amplifikace*

krok	počet cyklů	teplota	čas
1	1	95 °C	2:30
2	45	95 °C	0:15
		60 °C	0:40

*Křivka tání*

3	1	95 °C	0:15
		60 °C	0:30
		95 °C	0:15

## Vyhodnocení

Vyhodnotíme u jednotlivých vzorků získané amplifikační křivky společně s křivkami tání a provedeme relativní kvantifikaci nárůstu/poklesu transkriptu genu zájmu mezi časem 0 a 24 hodin.