

Stanovení množství transkriptu genu pomocí RT-qPCR

Princip:

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:

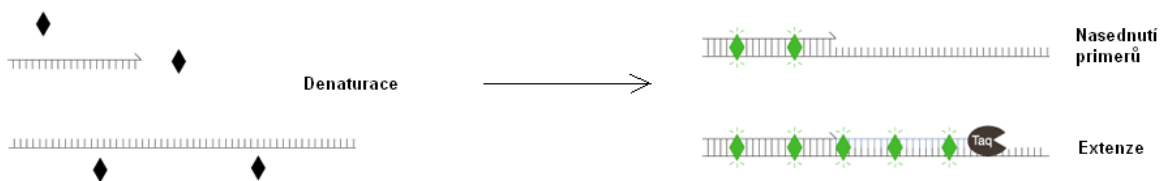
- oligo dT primery – používají se v případě mRNA obsahující polyA 3'-konec, v případě dlouhých transkriptů nemusí dojít k úplnému přepisu
- směs náhodných hexaoligonukleotidů – nasedají náhodně na templátovou RNA, jsou vhodné zejména pro přepis celkové RNA a delších transkriptů
- sekvenčně specifické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

qPCR

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.

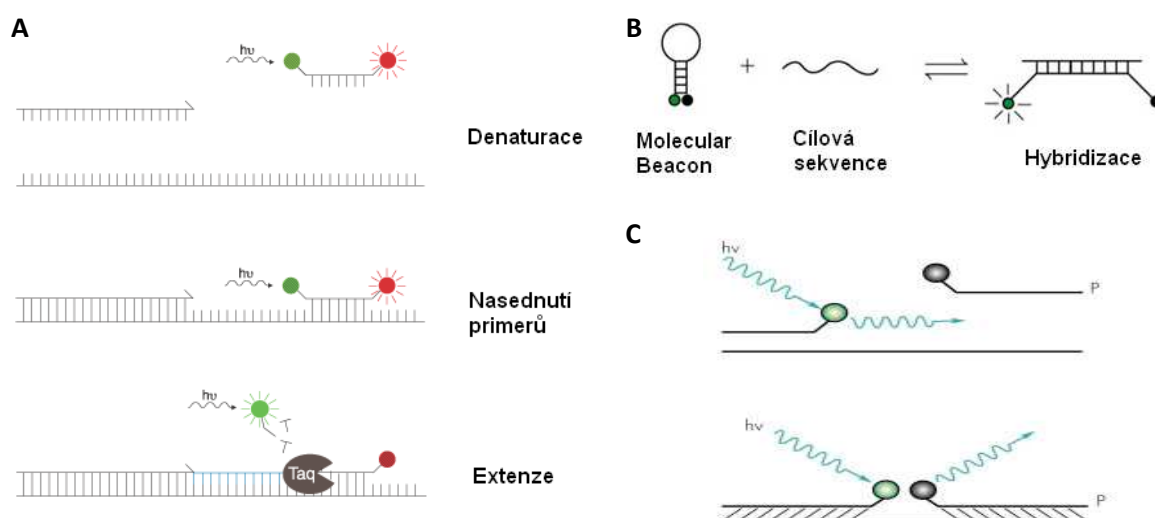
Interkalační barviva

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 dvouřetězcového 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 nespécifickou 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 nespécifických produktů PCR reakce. Nespécifické 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 zhášedce. U sondy, která je v inaktivním stavu, tlumí zhášedce 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 zhášedce 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 zhášedce 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.

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 - ΔCt kontrolního vzorku

ΔCt testovacího vzorku = ΔCt cílového genu - ΔCt house-keeping genu

Cíl:

Cílem úlohy je provést kvantifikaci transkriptu PR1a genu z izolované RNA rostlin tabáku a provést vyhodnocení změny exprese pomocí metod Absolutní a 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 A260/A280 vyhodnotíme čistotu izolované celkové RNA.
2. Celkovou RNA naředíme pomocí PCR vody na koncentraci 0,2 mg/ml do celkového objemu 10 ul.
3. Provedeme reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy ImProm II (Promega, USA):

Složení reakční směsi:

2 μ l	ImProm-IIITM 5x ředěný reakční pufr
2,2 μ l	MgCl ₂
0,5 μ l	dNTP
0,5 μ l	Náhodné Hexamery
0,5 μ l	ImProm-II reverzní transkriptáza
0,2 μ l	RNAsin
2,6 μ l	voda
1,5 μ l	mRNA (0,2 mg/ml)

Vzorky vložíme do cycleru a spustíme následující program:

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

4. Během reverzní transkripce naředíme PCR vodou plazmidy pGEMT-Easy s vklonovanými geny PR1a a EF1a na koncentrace 100, 10 000, 100 000 a 1 000 000 kopií/ul.
5. Po proběhnutí reverzní transkripce provedeme qPCR reakci pomocí GoTaq® qPCR Master Mixu (Promega, USA):

Složení reakční směsi pro PR1a gen (9 reakcí):

67,5 μ l	GoTaq® qPCR Master Mix
43,7 μ l	Voda
4,5 μ l	FPR1a primer (10 μ M)
4,5 μ l	RPR1a primer (10 μ M)
1,3 μ l	CTR 100x

Složení reakční směsi pro EF1a gen (9 reakcí):

67,5 µl GoTaq® qPCR Master Mix

43,7 µl Voda

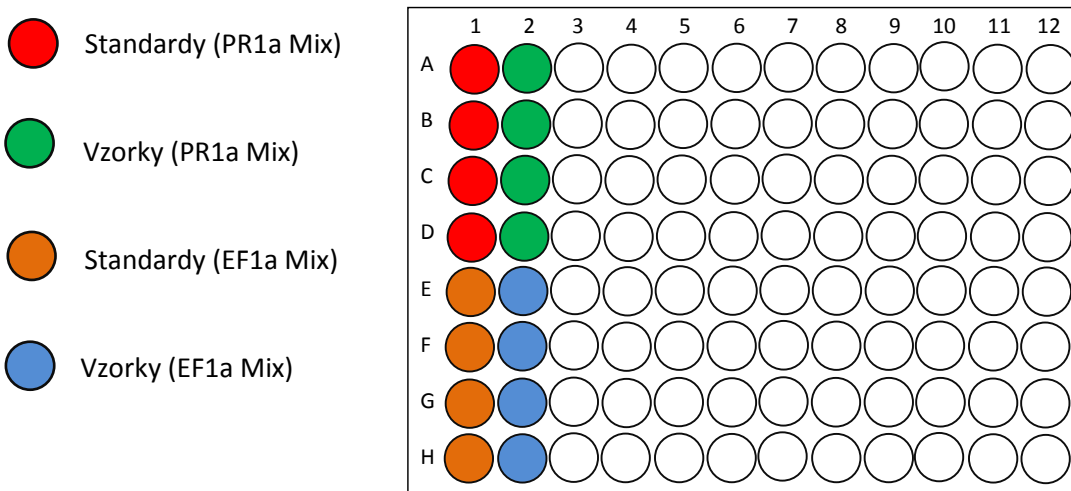
4,5 µl FEF1a primer (10 µM)

4,5 µl REF1a primer (10 µM)

1,3 µl CTR 100x

Poté napipetujeme dle schématu do jamek na 96-jamkové destičce 13,5 ul připravené reakční směsi.

Následně přidáme k reakční směsi jednotlivé standardy a vzorky dle schématu, kdy reakce se vzorky provedeme v duplikátu:



Následně vzorky v destičce stočíme, destičku vložíme do přístroje ABI7300 a spustíme následující program:

Amplifikace

krok	počet cyklů	teplota	čas
1	1	95°C	2:30
2	45	95°C	0:20
		60°C	0:40
Křivka tání			
3	1	95°C	0:15
		60°C	0:30
		95°C	0:15

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