

# Úloha č. 8

## Srovnání dvou “housekeeping” genů pro stanovení relativní kvantity RNA z lidské tkáně

### ÚVOD

RealTime PCR je metoda umožňující amplifikovat DNA ve zkumavce a zároveň sledovat nárůst jejího množství v průběhu času. Ke sledování nárůstu množství DNA v čase se využívá sledování nárůstu fluorescenčního signálu v dané zkumavce. Jednou z možností je využití nespecifických fluorescenčních barev, které se interkalují do dvouřetězcové DNA a způsobují nárůst fluorescenčního signálu, který souvisí s veškerou DNA přítomnou ve zkumavce. Tyto barvy jsou nespecifické a patří k nim nejčastěji využívaná barva SybrGreen.

K dalším možnostem patří využití specifických sond, značených fluorescenčními barvami. Sem patří např. sondy TaqMan, Molecular Beacon, atd. Sondy se specificky vážou na DNA v daném místě a nárůst fluorescenčního signálu pak ukazuje nárůst množství specifického úseku DNA. Vzhledem k možnosti sledování množství amplifikované DNA v čase lze RealTime PCR metody využít ke kvantifikaci DNA ve vzorku. Rozlišujeme dva základní typy kvantifikace – relativní kvantifikaci a absolutní kvantifikaci.

V rámci cvičení bude provedeno srovnání dvou *housekeeping genů* pro stanovení relativní kvantity RNA z lidské tkáně pomocí RealTime PCR. Relativní kvantifikace zjišťuje změny v množství mRNA určitého genu ve skupině vzorků a vyjadřuje ji jako relativní poměr k množství mRNA vnitřní kontroly. Tou je právě *housekeeping gen*, jehož cDNA (vzniklá přepisem mRNA pomocí reverzní transkriptázy) je amplifikována společně se stanovovaným genem.

Skupina *housekeeping genů* jsou geny nutné pro udržení základních buněčných funkcí, a proto by měly být exprimovány ve všech tkáních, za různých pokusných podmínek, v konstantním množství. Příkladem mohou být gen pro  $\beta$ -aktin, gen pro GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza), pro HPRT1 (hypoxantinribosyltransferáza 1), pro B2M (beta-2-mikroglobulin), pro UBB (ubiquitin B), pro TUBA1 (tubulin alfa 1) aj. Tyto geny se používají jako referenční geny, jelikož u zkoumaného genu může dojít k odchylce v kvalitě a množství mRNA mezi různými vzorky. V současné době se nejvíce používají gen pro GAPDH a gen pro  $\beta$ -aktin.

GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) je jedním z důležitých enzymů glykolýzy. Je syntetizován ve všech buňkách eukaryotických organismů a zahrnuje 10-20% celkového množství buněčných bílkovin. Patří do rodiny oxidoreduktáz. GAPDH katalyzuje fosforylaci a oxidaci glyceraldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát v přítomnosti  $\text{NAD}^+$  jako akceptoru elektronů. GAPDH se skládá z 335 aminokyselin. Glykolytická aktivita tohoto enzymu závisí

převážně na dvou aminokyselinách (Cys152 a His179) a na jeho tetramerní struktuře složené ze 4 stejných podjednotek. Gen pro GAPDH se nachází na dvanáctém chromozomu v oblasti p13. Beta-aktin je jednou ze šesti aktinových izoform. Aktiny jsou vysoce konzervativní geny zapojené v buněčné motilitě, stavbě a integritě. Aktin je jedna z nejhojnějších intracelulárních bílkovin eukaryotických buněk. Beta-aktin je jako globulární protein hlavní součástí kontraktilního aparátu a jeden ze dvou nesvalových cytoskeletárních aktinů. Je obsažen jak v cytoskeletu, tak v buněčném jádře. Jeho gen je uložen v oblasti 7p22 a délka syntetizovaného proteinu činí 375 aminokyselin.

Pro izolaci mRNA bude využita izolační souprava **chemagic mRNA Direct Kit**. Magnetický separátor chemagic využívá při izolaci vazbu magnetických částic s navázanou PolyT sekvencí na PolyA konec mRNA. Při analýze budou využity primery a sondy pro detekci specifické sekvence genu pro beta-aktin a genu pro GAPDH. Primery jsou navrženy tak, aby překrývaly oblasti dvou sousedních exonů a bránily tak amplifikaci genomové DNA. Dále bude použit mix **TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit** (Applied Biosystems) umožňující jedнокrokovou reverzní transkripci a amplifikaci s detekcí pomocí TaqMan sondy. TaqMan sondy budou značeny pomocí Yakima Yellow a FAM na 5' konci a nefluorescenčního quencheru ECLIPSE na 3' konci.

Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu referenčnímu genu (*housekeeping*) je možno použít několik metod. Výpočty jsou založeny na srovnávání určitých specifických cyklů, např. Ct (*cycle threshold*) při dosažení stejné úrovně fluorescence. *Threshold* (prahová hodnota) – hraniční přímka charakterizující úroveň nárůstu fluorescenčního signálu. Ct – je počet cyklů, ve kterých fluorescence dosáhne prahové hodnoty. Je to relativní naměřená koncentrace při PCR reakci. Hodnota Ct se zvyšuje se snižujícím se množstvím templátu.

Analýza bude probíhat na přístroji ABI7300 (Applied Biosystems). Při analýze bude zvolen program kvantifikace. Výsledné hodnoty Ct budou sloužit k propočítání vztahů mezi relativní kvantitou RNA genu pro beta-aktin a genu pro GAPDH.

Pro stanovení koeficientu *R* (poměru množství cílového k referenčnímu genu) se využívá komparativní delta-delta Ct metoda, která vyžaduje velmi blízké efektivity amplifikace obou genů (tj. cílového a housekeepingu). Výpočet *R*:

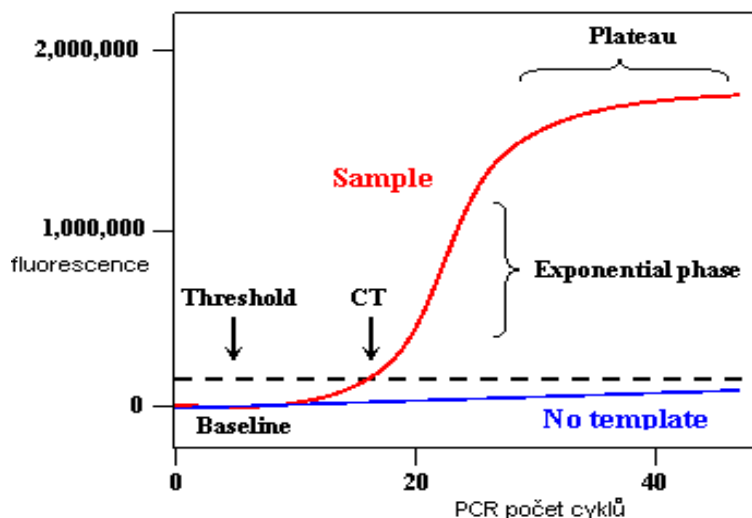
$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

kde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} - \Delta Ct_{\text{kontrolního vzorku}}$$

$$\Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} = Ct_{\text{cílového (target) genu}} - Ct_{\text{housekeeping genu}}$$

Ilustrační obrázek:



## PRACOVNÍ POSTUP

Upozornění: Při práci vždy používejte rukavice. Veškerý materiál v laboratoři je nutno považovat za potenciálně infekční. Vyhněte se kontaktu reagensů s kůží (v případě kontaktu potřísněné místo omyjte důkladně vodou). V laboratoři je zakázáno jíst nebo pít, vyvarujte se požití součástí kitu. Reagencie označené jako hořlavé musejí být drženy v dostatečné vzdálenosti od otevřeného plamene nebo ohně.

### I. Odběr vzorku

*Materiál:* odběrový tampón Copan, kelímek s pitnou vodou

1. Nejméně 60 minut před odběrem nejezte a nepijte, výjimkou je pouze **neslazená nesycená voda**.
2. Před odebráním vzorku si umyjte ruce, vypláchněte si ústa čistou neperlivou vodou a polkněte případný zbytek slin nebo vody v ústech.
3. Vyjměte odběrový tampón ze zkumavky.
4. Štětičkou vytřete sliznici jedné vnitřní části tváře, zároveň štětičkou otáčejte, aby byla využita celá její plocha. Ideální tlak je dosažen v okamžiku, kdy na vnější tváři ucítíte tlak zevnitř. Jednou štětičkou otírejte sliznice tváří přibližně po dobu 1 minuty. Pokud se vám v průběhu stěru tvoří sliny, polkněte je (setřít sliny je nežádoucí!).
5. Po odběru umístěte odběrový tampón do kelímku štětičkou nahoru a přistoupíte k izolaci mRNA. **Štětička odběrového tampónu nesmí přijít do styku s ničím jiným než se sliznicí, z níž se vzorek odebírá!!!**

## II. Izolace mRNA

### *Materiál:*

termotřepačka, mikrocentrifuga, chemagic stojan 2x12, pipeta 100-1000 µl, pipeta 10-100 µl, mikrocentrifugační zkumavky (2 ml),

### **Izolační kit chemagic mRNA Direct Kit**

- M-PVA OdT Magnetic Beads
- Suspension Buffer 1
- Lysis Buffer 2
- Wash Buffer 3
- Wash Buffer 4
- Elution Buffer 5

Pozn. Navíc potřeba fyziologický roztok, nádoba s tekutým dusíkem a PCR voda.

### **Používejte rukavice**

#### **a) Příprava magnetických částic**

1. Suspenzi magnetických částic dobře protřepete a přemístíte 40 µl (nebo až do množství 120 µl) do mikrocentrifugační zkumavky.
2. Umístíte zkumavku do chemagic stojanu 2x12, a to do polohy s magnetem. Ponechejte mikrozkumavku v poloze u magnetu přibližně 1 minutu.
3. Odstraňte skladovací pufr sterilní pipetou.
4. Vyjměte zkumavku z polohy u magnetu a promyjte částice ve 300 µl suspenzního pufru **Suspension Buffer 1**.
5. Zopakujte kroky 2 – 4.
6. Rozsuspndujte magnetické částice **M-PVA OdT Magnetic Beads** v 100 µl lyzačního pufru **Lysis Buffer 2**.

## **b) Izolace**

1. Do 2 ml zkumavky přidejte 500  $\mu$ l chlazeného fyziologického roztoku, vložte stěrovku, ustříhnete přibližně 1 cm od štětečku a přeneste na 10 min do třepačky.
2. Vytáhněte štěteček pinzetou a zcentrifugujte na 1000 x g po dobu 5 minut.
3. Vhodte mikrozukavky na přibližně 10 sekund do tekutého dusíku a pak je vytáhněte dlouhou pinzetou, vraťte do stojánku (přidržíte víčka, aby tlak v mikrozukavce nezpůsobil nežádoucí otevření); tento krok ještě jednou zopakujte.
4. Přidejte 900  $\mu$ l Lysis Buffer 2 k buněčnému peletu a rozsuspendujte v třepačce 5 minut za normální laboratorní teploty.
5. Centrifugujte lyzát po dobu 5 minut na 12 000 x g k vytvoření pelety ze zbytku buněk.
6. Přemístěte supernatant do zkumavky s promytými magnetickými částicemi M-PVA OdT Magnetic Beads.
7. Rozsuspendujte částice v lyzátu a inkubujte 2 minuty při 70°C.
8. Udržujte 7 minut při pokojové teplotě s občasným mírným promícháním.
9. Po inkubaci umístěte zkumavku do magnetického separátoru (pozice u magnetu) a vyčkejte, dokud nejsou všechny částice přitaženy ke stěně zkumavky. Odsajte veškerý supernatant a potom přemístěte zkumavku z pozice u magnetu.
10. Přidejte 900  $\mu$ l promývacího pufru Wash Buffer 3 a na termotřepačce řádně rozsuspendujte částice peletky. Poté ponechte 1 minutu při laboratorní teplotě.
11. Separujte magnetické částice na magnetickém separátoru a odstraňte supernatant.
12. Zopakujte promývací proceduru ještě dvakrát (kroky 10 a 11) s 1000  $\mu$ l promývacího pufru Wash Buffer 4.
13. Do mikrozukavky přidejte 75  $\mu$ l PCR vody a řádně částice rozsuspendujte na termotřepačce.
14. Inkubujte suspenzi 2 minuty při 70°C, s důkladným protřepáním pro posílení kompletní eluce mRNA.
15. Po inkubaci umístěte mikrozukavku do magnetického separátoru na dobu dvou minut, dokud všechny magnetické částice nejsou z eluátu odseparovány a dokud není supernatant čistý. Eluát s čistou mRNA přeneste do čisté mikrozukavky bez RNáz.

### III. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

*Materiál:*

TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit

**TaqMan® RT-PCR Mix:**

- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, and dUTP)
- ROX™ passive reference
- Optimized buffer components

**TaqMan® RT Enzyme Mix:**

- ArrayScript™ UP Reverse Transcriptase
- RNase inhibitor

Primery použité k amplifikaci:

fwBACT	5' - GGGACGACATGGAGAAAATCT - 3'
revBACT	5' - ACATGATCTGGGTCATCTTCT - 3'
fwGAPDH	5' - AGGTCGGAGTCAACGGATTT- 3'
revGAPDH	5' - AATGAAGGGGTCATTGATGG -3'

Sondy TaqMan použité k detekci:

pGAPDH	FAM 5' - TGGTCACCAGGGCTGCTTTTAA 3' ECLIPSE
pBACT	HEX 5' - TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC 3' ECLIPSE

Pro jednokrokovou reverzní transkripci a amplifikaci napipetujte do zkumavek uvedené reakční složky až do celkového objemu 20 µl:

<b>Reakční složky GAPDH</b>	<b>Objem reakčních složek</b>
TaqMan® RT-PCR Mix (2 X)	10,0 µl
fwGAPDH (10 µM)	0,6 µl
revGAPDH (10 µM)	0,6 µl
pGAPDH (5 µM)	0,8 µl
TaqMan® RT Enzyme Mix (40 X)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
mRNA	4 µl

<b>Reakční složky Beta-actin</b>	<b>Objem reakčních složek</b>
TaqMan® RT-PCR Mix (2 X)	10,0 µl
fwBACT (10 µM)	0,6 µl
revBACT (10 µM)	0,6 µl
pBACT (5 µM)	0,8 µl
TaqMan® RT Enzyme Mix (40 X)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
mRNA	4 µl

Real-time PCR bude provedena v termocykléru ABI7300 (Applied Biosystems, USA) podle teplotního programu:

48°C            15 min            (reverzní transkripce)

95°C            10 min            (aktivace AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure))

95 °C            15 sec            45x    (denaturace)

60 °C            1 min                       (annealing /elongace)

