

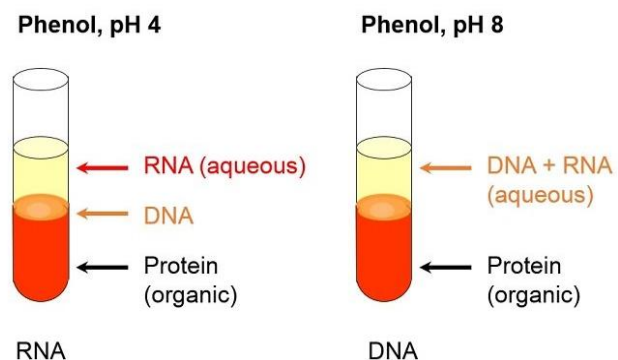
## Stanovení množství transkriptu genu pomocí RT-qPCR

### 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). V rámci této úlohy se seznámíme se základní metodou izolace celkové RNA pomocí fenol-chloroformové izolace za využití komerčního TRI-Reagent činidla s následnou jedno zkumavkou reverzní transkripcí spojenou s qPCR kvantifikací vybraných transkriptů pomocí  $\Delta\Delta C_t$  metody.

### Izolace celkové RNA z listu tabáku

Metoda fenol-chloroformové extrakce se nejčastěji používá k izolaci NA z rostlinných pletiv nebo environmentálních vzorků a velkého množství DNA z krve. Po homogenizaci se ke vzorku přidá směs fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu, která ještě může obsahovat guanidin hydrochlorid (GuHCl). V současné době jsou poté dostupné různé komerční směsi fenolu saturovaného v pufru a GuHCl, jako je např. TriReagent nebo TRIZOL. Po přidání chloroformu do směsi se chloroform nemísí s vodným roztokem buněčného lyzátu, a proto se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a spodní chloroformovou. Protřepáváním se fáze promíchají, přičemž fenol vysráží proteiny přítomné ve vodné fázi. Důležité je poté pH fenolu saturovaného v pufru, při použití kyselého fenolu (pH $\approx$ 4) dochází k separaci RNA do horní vodné fáze a DNA se nachází v interfázi a při použití zásaditého fenolu (pH $\approx$ 8) dochází k separaci DNA do horní vodné fáze. Následně se DNA/RNA vysráží z vodné fáze isopropanolem.



### 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:

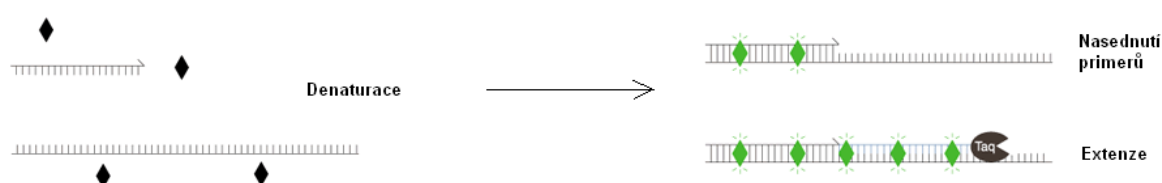
- I. oligo dT primery – používají se v případě mRNA obsahující polyA 3'-konec, v případě dlouhých transkriptů nemusí dojít k úplnému přepisu
- II. směs náhodných hexaoligonukleotidů – nasedají náhodně na templátovou RNA, jsou vhodné zejména pro přepis celkové RNA a delších transkriptů
- III. sekvenčně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

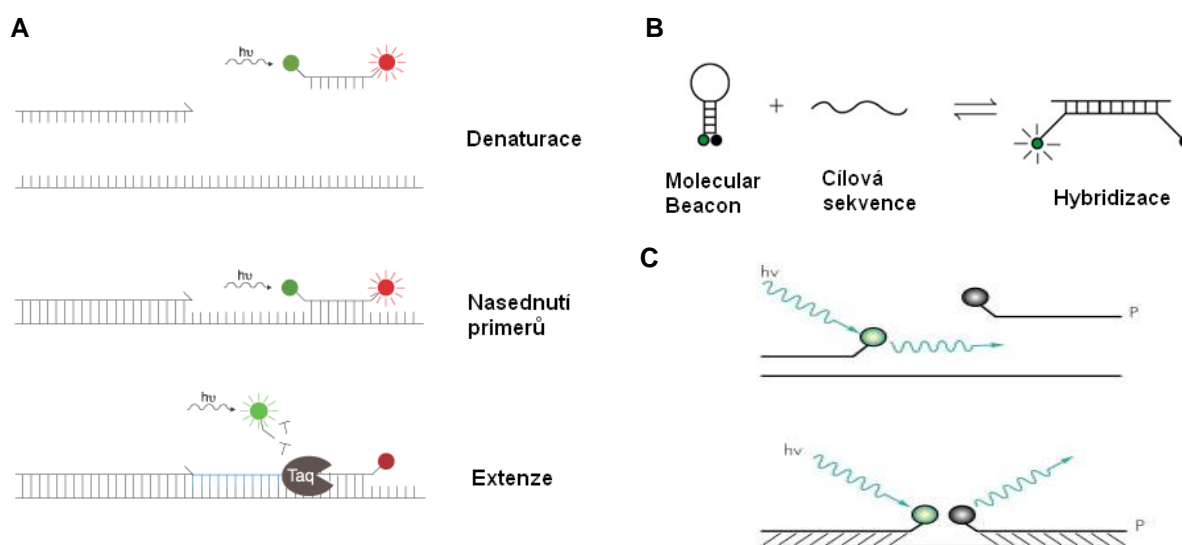
Jako interkalační barvivo se většinou používá barva SYBR Green I, která se interkaluje do dvoušroubovice DNA. Intenzita fluorescence nevázaného barviva po excitaci vlnovou délkou 488 nm je velmi nízká, zatímco po interkalaci dochází k nárůstu fluorescence s maximem při 522 nm. Jak během PCR dochází k 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 množeného 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 zhasěče 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 zhasěč 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 kvantitativní PCR (qPCR) 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:

$$R = (E+1)^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ kdy } E \text{ je efektivita PCR reakce, v ideálním případě je } E = 1$$

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

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

## Cíl úlohy

Cílem úlohy je provést izolace celkové RNA z listu tabáku s následnou kvantifikací transkriptu genu zájmu a house-keeping genu z izolované RNA pomocí metody relativní kvantifikace.

## Vlastní provedení analýzy

### Izolace celkové RNA z listů tabáku

1. Do 2,0 ml zkumavky s 50 mg rostlinného pletiva vložte drtící olověný váleček, zmrazte zkumavku v tekutém dusíku a rozdrťte rostlinné pletivo na mlýnku Retsch s parametry – frekvence 15 Hz, čas 2 minuty.
2. Poté vyjměte zkumavku z mlýnku Retsch, otevřete ji, a přidejte 0.5 ml TRI Reagentu. Po rozmrzutí směsí pomocí pinzety vejměte olůvko a inkubujte zkumavku přibližně 5 minut při pokojové teplotě.
5. Poté přidejte 100  $\mu$ l chloroformu, vortexujte 15 s a nechte stát 15 minut při pokojové teplotě.
6. Centrifugujte 15 minut při 15 000 x g a 4°C.
7. Horní fázi přeneste do čisté zkumavky, přidejte 250  $\mu$ l isopropanolu a promíchejte směs převrácením zkumavky (cca. 6krát). Nechte stát 7 minut při pokojové teplotě.
8. Centrifugujte 10 minut při 15 000 x g a 4°C.
12. RNA pelet promyjte 0,5 ml 75 % ethanolu a centrifugujte 10 minut při 12 000 x g a 4°C.
13. Odstraňte ethanol a nechte RNA pelet vyschnout.
14. Rozpusťte RNA pelet ve 20  $\mu$ l DEPC vody.

### Měření koncentrace izolované RNA

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 DEPC vody na koncentraci 0,5 mg/ml do celkového objemu 10  $\mu$ l.

## Jednozkušavková RT-qPCR

1. Rozmrazte směs Luna Universal One-Step Reaction Mix a ostatní reakční komponenty při pokojové teplotě a poté je uložte na led. Po úplném rozmrazení každou složku krátce promíchejte obrácením, pipetováním nebo jemným zvortexováním.
2. Připravte si jednotlivé reakční směsi pro izolované vzorky celkové RNA, kdy k příslušnému počtu reakcí připočítejte 10 % nadbytek:

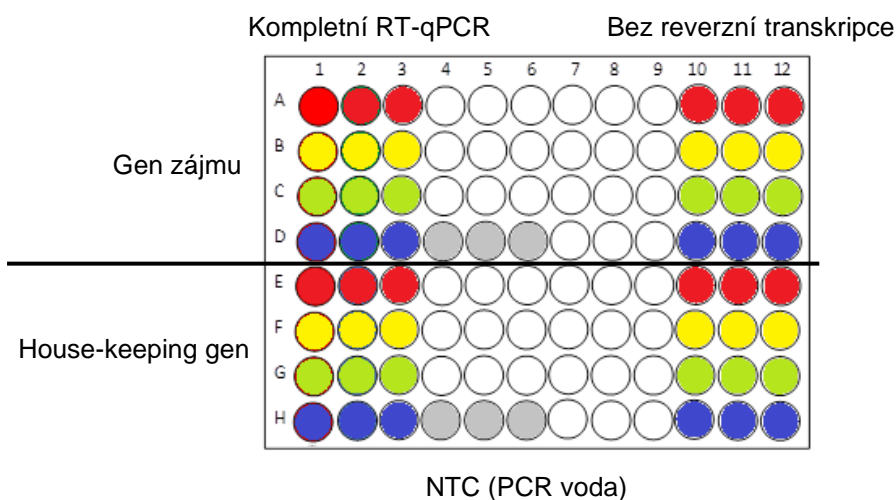
### Reakční směs pro kompletní RT-qPCR:

Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10 µl
Luna WarmStart® RT Enzyme Mix (20X)	1 µl
Forward + Reverse primer (10 µM)	0.8 µl
PCR voda	6.2 µl

### Reakční směs pro reakci bez reverzní transkripce:

Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X)	10 µl
Forward + Reverse primer (10 µM)	0.8 µl
PCR voda	7.2 µl

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



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

KROK	TEPLOTA	ČAS	POČET CYKLŮ
Reverzní transkripce	55 °C	10 minut	1
Počáteční denaturace	95 °C	1 minuta	1
Denaturace	95 °C	10 sekund	
Extenze	60 °C	30 sekund + čtení	45
Křivka tání	60-95 °C		1

## Vyhodnocení

- 1) Vysvětlíme princip různé separace DNA/RNA mezi vodnou a chloroformovou fází v rámci fenol-chloroformové izolace při použití různých pH.
- 2) Vyhodnotíme čistotu a koncentraci RNA, vysvětlíme rozdíly v naměřených hodnotách koncentrace mezi použitými metodami.
- 3) Vyhodnotíme u jednotlivých vzorků získané amplifikační křivky společně s křivkami tání.
- 4) Provedeme relativní kvantifikaci nárůstu/poklesu transkriptu genu zájmu mezi jednotlivými vzorky.
- 5) Na základě dat z qPCR vyhodnotíme míru kontaminace gDNA v izolované RNA.