

# NORMALIZATION OF GENE EXPRESSION

## NORMALIZACE GENOVÉ EXPRESE

**Bílek K., Knoll A.**

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: [xbilek@node.mendelu.cz](mailto:xbilek@node.mendelu.cz), [knoll@mendelu.cz](mailto:knoll@mendelu.cz)

---

### ABSTRACT

The aim of this study was to verify the usage of candidate reference genes in the porcine skeletal muscles using the real-time PCR. Gene expression is usually related to the expression of internal control, also known as reference or housekeeping gene. Reference genes are specific because of their constant expression profile, thus they are suitable as internal control. One of the critical step is comparison of transcription profiles is selection of accurate reference genes. We chose and evaluated six candidate reference genes. For their evaluation, we used the geNorm application and we evaluated that genes *PPIA* and *H3F* are the most stable genes from our six candidate reference genes. This reference genes will be used for quantification of gene expression. Gene expression analysis has become increasingly important in biological research where e.g. gene expression profiles from muscle have to be compared with meat production.

This work was supported by Czech Science Foundation project No. 523/03/H076 and 523/06/1302

**Key words:** gene, gene expression, real-time PCR, reference gene

### ABSTRAKT

Studie byla zaměřena na ověření stability kandidátních referenčních genů ve svalovině u prasat s použitím metody real-time PCR. Genová exprese zkoumaného genu je obvykle porovnávána k expresi referenčnímu genu resp. housekeeping genu. Pro tyto geny je charakteristická jejich konstantní exprese, proto jsou vhodné jako interní kontrola. Výběr vhodného referenčního genu je hlavním předpokladem pro správné vyhodnocení genové exprese. V této práci jsme vybrali šest kandidátních referenčních genů, optimalizovali PCR podmínky a získaná data jsme analyzovali pomocí programu geNorm. Z vybrané skupiny genů byly určeny jako vhodné referenční geny pouze dva nejstabilnější a to *PPIA* a *H3F*. Tyto geny budou použity pro kvantifikaci genové exprese pomocí metody real-time PCR ve vztahu k masné užitkovosti prasat.

Podpořeno GAČR 523/03/H076 a 523/06/1302

**Klíčová slova:** gen, genová exprese, real-time PCR, referenční gen

## ÚVOD

Genová exprese je proces, při kterém geny kódující informaci jsou „čteny“ a převedeny v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci. Zkoumání genové exprese nám pomáhá pochopit základní mechanismy řídicí buňky. V praxi mohou být tyto informace využité např. pro zkoumání vztahů genové exprese a masné produkce. Vzhledem k tomu, že funkční molekula nesoucí informaci o aktivitě genu (mRNA), tedy genové expresi se může v buňce vyskytovat v minoritním množství z celkové RNA je třeba zajistit detekci i těchto stopových množství mRNA. Pro tyto aplikace je vhodná metoda PCR v reálném čase (Real Time – PCR, RT – PCR, qPCR). Metoda je založena na principu konvenční PCR reakci, ale monitorování PCR produktu probíhá v každém cyklu PCR reakce. Pro kvantifikaci genové exprese se obvykle využívá tzv. relativní kvantifikace genové exprese. Relativní proto, že exprese zkoumaného genu je vztažena „relativizována“ k expresi genu referenčního. Referenční geny jsou známé také jako housekeeping geny, český ekvivalent „provozní geny“. Tento český ekvivalent přesně vystihuje jejich úlohu, jsou to především zajištění životně důležitých biochemických procesů každé buňky (viz. Tab. 1). Vzhledem k potřebě jejich stále exprese mohou tyto geny sloužit jako referenční. Mezi základní metody využívající stabilní exprese housekeeping genů patří metoda  $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$  (Livak a Schmittgen, 2001). Její využití však není neomezené (např. Bustin a Nolan, 2004), metoda je použitelná jen za předpokladu skutečně stabilní exprese referenčních genů. Pokud referenční geny nejsou stabilní, tzn. jejich exprese kolísá, dochází ke zkreslení výsledků a spíše k odhadu než-li ke stanovení exprese zkoumaných genů. Tuto chybu lze eliminovat důkladnou analýzou stability genové exprese zkoumaných genů např. pomocí aplikace geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Z výše popsaných důvodů bylo cílem této studie vybrat skupinu kandidátních referenčních genů a ověřit jejich stabilitu.

Tab. 1 Vybrané kandidátní referenční geny a jejich funkce v buňce

Symbol	Gen	Funkce
<i>ACTB</i>	actin, beta	strukturní protein
<i>ESD</i>	esterase D/formylglutathione hydrolase	regulační enzym
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glykolytický enzym
<i>H3F3A</i>	H3 histone, family 3A	chromozomální protein
<i>HPRT1</i>	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1	puriny syntetizující enzym
<i>PPIA</i>	peptidyl-prolyl isomerase A	transportní protein

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky tkáně byly odebírány ze stehenní svaloviny plodů o stáří 45 dní a ze stelení svaloviny prasnice plemene ČBU. Nativní vzorky byly uchovány v RNAlater (Sigma). Homogenizace vzorků probíhala v homogenizátoru FastPrep FP 120 (ThermoSavant). Pro izolaci RNA byl použit kit FastRNA Pro Green Kit (Q-BIOgene), výtěžek celkové RNA byl měřen spektrofotometricky na přístroji GeneQuant (Pharmacia Biotech) a ověřen na denaturačním polyakrylamidovém gelu. Izoláty vzorků byly skladovány při -50 °C. Reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu Omniscript RT (QIAGEN). Pro přípravu primerů byl použit program Primer Express (Applied Biosystems) a Oligo v4.0, sekvence primerů viz. Tab. 2. Vlastní PCR reakce probíhala v přístroji 7500 Real Time – PCR System, software SDS 1.2, chemismus *Power SYBR Green* a Uracil N-glykosylasa (vše od Applied Biosystems). Teplotní profil reakce: úvodní teplota pro působení UNG: 50 °C/2 min., PCR: 95 °C/10 min., 40 x (95 °C/15 s, 60 °C/1 min.).

Tab. 2 Sekvence primerů vybraných kandidátních genů

Gen	Sekvence	Délka PCR produktu (bp)
<i>ACTB</i>	CATCAGGAAGGACCTCTACGC GCGATGATCTTGATCTTCATGG	129
<i>ESD</i>	GGCTCTCTGGTTTAACTTGCAC GCCAAAATCCCAGCTCTCAT	152
<i>GAPDH</i> *	CAGCAATGCCTCCTGTACCA GATGCCGAAGTTGTCATGGA	70
<i>H3F</i>	AAGAAACCTCATCGTTACAGGC TTTGAAGTCCTGAGCAATTTC	132
<i>HPRT1</i>	AAGGACCCCTCGAAGTGTTG CACAAACATGATTCAAGTCCCTG	122
<i>PPIA</i> *	GCACTGGTGGCAAGTCCAT AGGACCCGTATGCTTCAGGA	71

\* Sekvence označených primerů byly převzaty z publikace Vallée *et al.*, 2003.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci jsme vybrali šest kandidátních referenčních genů a navrhly odpovídající primery pomocí databáze BLAST (viz. Literatura). Geny nebyly vybrány náhodně, ve studii jsou použity jak běžně používané housekeeping geny jako např. *GAPDH* a *HPRT1*, tak geny vybrané na základě vysoké aktivity a/nebo stability (Hsiao *et al.*, 2001). Dále na základě výsledků z analýzy real-time PCR jsme pomocí aplikace geNorm ověřili stabilitu vybraných genů. Z výsledné stability genů je zřejmá neshoda genové exprese, tzn. v souladu s prací Hsiao *et al.*, 2001, jsme dospěli k výsledku, že geny které mají vysokou aktivitu, nemusejí nutně patřit k těm nejstabilnějším jako např. *GAPDH*. Naopak v našem případě jsou nejstabilnější geny *PPIA* a *H3F*, což nejsou běžně používané referenční geny resp. interní kontroly genové exprese. Vzhledem k tomu, že geny *PPIA* a *H3F* mají stabilní expresi, lze jeden nebo druhý využít v modelu  $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$  (Livak a Schmittgen, 2001). Využití obou genů je

možno v modelu, který dokáže zahrnout do rovnice výpočtu genové exprese více než jeden referenční gen, jako např. Pfaffl M.W., 2001.

Graf 1 Stabilita referenčních genů



## ZÁVĚR

Podařilo se nám vybrat a navrhnout primery pro šest kandidátních referenčních genů. Tyto geny analyzovat a vyhodnotit jejich stabilitu. Z vybrané skupiny genů byly určeny jako vhodné referenční geny pouze dva a to nejstabilnější *PPIA* a *H3F*. Geny budou použity pro kvantifikaci genové exprese pomocí metody real-time PCR ve vztahu k masné užitkovosti prasat. Naším cílem je studium možných vztahů genové exprese a případných změn v námi vybraných genech.

## LITERATURA

Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9): e45.

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* Dec;25(4):402-408.

Vallee M., XD., Roberge C., Matte J.J., Blouin R., Palin M.F. (2003): Isolation of differentially expressed genes in conceptuses and endometrial tissue of sows in early gestation. *Biol Reprod.* Nov;69(5):1697-1706.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>]

Bustin S.A., Nolan T. (2004): Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. of Biomolecular Tech.* Sep;15(3):155-66.

Hsiao L.L., Dangond F., Yoshida T., Hong R., Jensen R.V., Misra J., Dillon W., Lee K.F., Clark K.E., Haverty P., Weng Z., Mutter G.L., Frosch M.P., Macdonald M.E., Milford E.L., Crum C.P., Bueno R., Pratt R.E., Mahadevappa M., Warrington J.A., Stephanopoulos G., Stephanopoulos G., Gullans S.R. (2001): A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics.* Dec 21;7(2): 97-104.