

FIRST TEACH-IN WITH REAL – TIME PCR AND RELATIVE QUANTIFICATION

SEZNÁMENÍ S METODOU REAL – TIME PCR A RELATIVNÍ KVANTIFIKACÍ

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, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

Real Time – PCR is a very sensitive and robust method based on the standard principle of PCR reaction. This is very good for gene expression investigation, too. Gene expression is the process by which a gene's coded information is converted into the structured present and operating in the cell. We check Real Time – PCR system convenient for this purpose. For the investigation of this genes expression.

Keywords: Gene , Gene expression, Real Time – PCR

ABSTRAKT

Metoda Real Time – PCR je velice citlivá a robustní metoda založená na principu konvenční PCR. Citlivost této metody je vhodná i pro zkoumání genové exprese. Genová exprese je proces, při kterém geny kódující informaci jsou „čteny“ a převedeny v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci. Předpokládáme použití metody Real Time – PCR především pro toto zkoumání.

Klíčové slova: Gen, Genová exprese, Real Time – PCR

ÚVOD

Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) dovoluje nasyntetizovat určitou, požadovanou část DNA v množství více jak 10^9 kopií. PCR je založena na cyklickém střídání teplot při kterých střídavě dochází k denaturaci dsDNA, nasedání primerů (krátkých oligonukleotidů specifických k cílové sekvenci DNA) a syntéze nového, komplementárního vlákna DNA. Výsledný produkt reakce, po proběhnutí všech cyklů, je elektroforeticky rozdělen a vizualizován na agarózovém gelu. PCR v reálném čase (Real Time – PCR, RT – PCR, qPCR) je metoda založena na principu PCR, množství nasyntetizované DNA se monitoruje po každé jedné reakci, tím je zajištěna vysoká senzitivita a robustnost reakce při které jsme schopni detekovat i malé rozdíly nebo množství DNA. Tento rozdíl činí z Real Time – PCR vhodný nástroj pro aplikace jako jsou kvantifikace nebo

detekce genové exprese. Tyto aplikace jsou již pro konvenční PCR senzitivně nedostupné. Genová exprese je proces, při kterém geny kódující informaci jsou „čteny“ a převedeny v reálně existující buněčnou strukturu nebo funkci. Pro relativní kvantifikaci genové exprese byla vybrána skupina 4 genů u kterých byla zjištěna závislost genové exprese na embryonálním stádiu. Myosin Heavy Chain 3 (MYH3, MyHC) jedním ze základních proteinů zodpovědných za konverzi chemické energie z hydrolýzy ATP na energii mechanickou (Sun *et al.*, 2001); Periostin (POSTN) je exprimován během embryonálního vývoje v srdci zárodku (Kruzynska-Freitag *et al.*, 2001); Tumor Protein p53-Binding Protein 1 (TSF-97, TP53BP1) gen kódující protein vázající multifunkční protein p53 (Iwabuchi *et al.*, 1998); Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase Activation Protein, (YWHAQ, Theta Isoform) protein podílející se na buněčné apoptóze a proliferaci (Malaspina, *et al.*, 2000). Jako referenční gen resp. housekeeping gen (HKG) byl použit gen pro Cyclophylin (Vallée *et al.*, 2003). Jako HKG se označují geny, které mají relativně stále stejnou expresi ve všech tkáních a vývojových stádiích. Vzorky byly získány ze svalové tkáně plodu o stáří 45 dní, tkáň z matek byla odebrána biopsií. Z těchto vzorků byla izolována celková RNA a pomocí reverzní transkripce získána cDNA, která byla použita pro Real Time – PCR. Kvantifikace genové exprese byla vyjadřována jako relativní. Naším cílem je studium možných vztahů genové exprese a případných změn v námi vybraných genech.

MATERIÁL A METODIKA

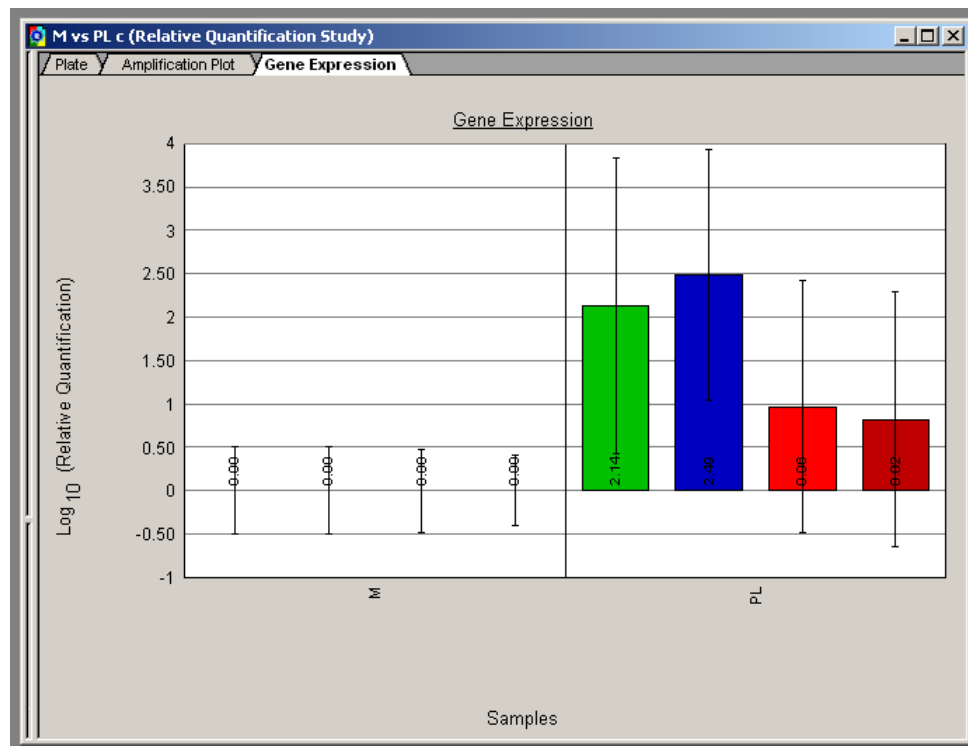
Vzorky tkáně byly odebírány ze stehenní svaloviny plodů o stáří 45 dní a ze stelení svaloviny prasnice plemene ČBU. Vzorky z prasnice byly odebírány biopsií. Nativní vzorky uchovány v RNAlater (Sigma) při -20 °C. Homogenizace vzorků probíhala v homogenizátoru FastPrep FP 120 (ThermoSavant) Pro izolaci RNA resp. mRNA byl použit komerční kit FastRNA Pro Green Kit (Q-BIOgene), výtěžek celkové RNA byl detekován spektrofotometricky na přístroji GeneQuant (Pharmacia Biotech) a ověřen na denaturačním polyakrylamidovém gelu. Izoláty vzorků byly skladovány při -50 °C. Reverzní transkripce o jednotné koncentraci 2 µg celkové RNA na reakci byla provedena pomocí kitu Omniscript RT (QIAGEN). Pro přípravu primerů byl použit program Primer Express (Applied Biosystems) a Oligo. Vlastní PCR reakce probíhala v přístroji 7500 Real Time – PCR System (Applied Biosystems), vyhodnocovací software SDS 1.2 (Applied Biosystems), chemismus SYBR Green PCR Master Mix, pro zamezení kontaminace byla do každé reakce aplikována Uracil N-glykosylasa (GeneAmp, 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).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Momentálně máme k dispozici pouze pilotní reakce s výše zmíněnými geny a jedním housekeepingovým genem. Úvodní kontaminované reakce nás donutily použít v každé reakci Uracil N-glykosylasu a dTTP nahradit dUTP (Longo *et al.*, 1990). V tab. 1 je grafický příklad relativní genové exprese vypočítané pomocí metody ddCt. Geny plodu: MYH3, POSTN,

TPB, YWHAQ (PL) jsou standardizovány k HKG a vztaženy k detektoru resp. k expresi vzorku prasnice (M). Výsledky jsou znázorněny v logaritmické škále.

Tab. 1: Relativní genová exprese genů: MYH3 POSTN, TPB, YWHAQ.



ZÁVĚR

Po standardizaci této metody na našem pracovišti plánujeme využít metody Real Time – PCR pro rutinní testování genové exprese a alelické diskriminaci požadovaných genů. V nejbližším horizontu plánujeme porovnání: jednokrokového (RT a Real Time – PCR v jedné zkumavce) a dvoukrokového postupu reakce; různých komparativních metod výpočtu relativní kvantifikace apod.

Podpořeno: GAČR 523/03/H076

LITERATURA

Iwabuchi K., Li B., Massa H. F., Trask B. J., Date T., Fields S. (1998): Stimulation of p53-mediated Transcriptional Activation by the p53-binding Proteins, 53BP1 and 53BP2. J Biol Chem, 273(40): 26061-26068.

Kruzynska-Frejtag A., Machnicki M., Rogers R., Markwald R. R., Conway S. J. (2001): Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. Mechanisms of Development, 103: 183-188.

Longo M. C., Berninger M. S., Hartley J. L. (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1): 125-128.

Malaspina A., Kaushik N., de Belleruche J. (2000): A 14-3-3 mRNA Is Up-Regulated in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord. *J. Neurochem.*, 75(6): 2511-2520.

Sun Y. M., da Costa N., Birrell R., Archibald A. L., Alzuherri H., Chang K. C. (2001): Molecular and quantitative characterisation of the porcine embryonic myosin heavy chain gene. *J Muscle Res Cell Motil*, 22(4): 317-327.

Valle'e M., Beaudry D., Roberge C, Matte J. J., Blouin R., Palin M. (2003): Isolation of Differentially Expressed Genes in Conceptuses and Endometrial Tissue of Sows in Early Gestation. *Biology of Reproduction*, 69: 1697–1706.