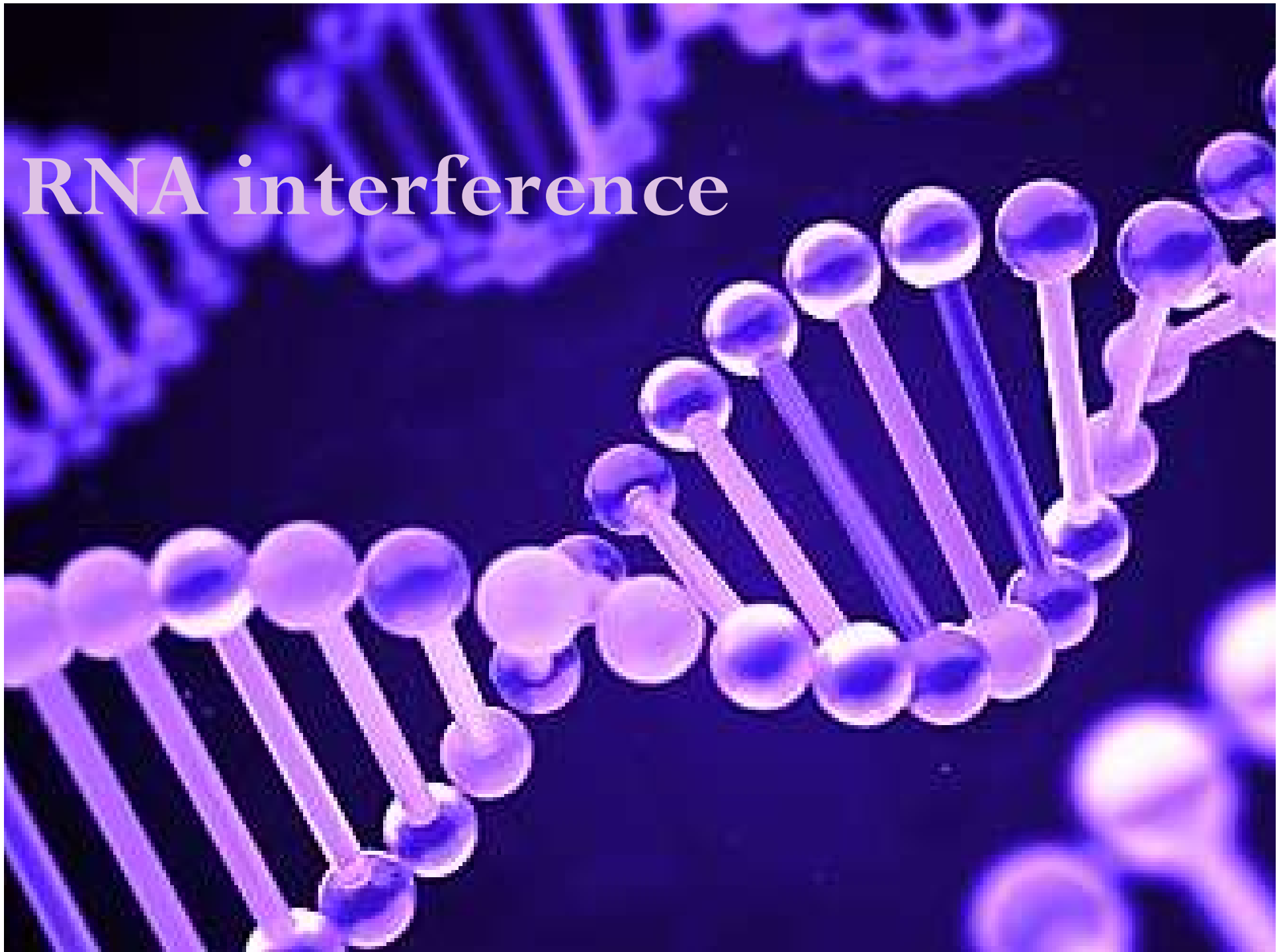


Studium genové exprese: RNA interference a kvantifikace pomocí real-time PCR

Aneta Vrzalová

RNA interference



RNA interference (RNAi)

- RNA interference (RNAi) je v oblasti genomiky jedním z nejvýznamnějších objevů posledních let, za který byli v roce 2006 Andrew Z. Fire a Craig C. Mello oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu.
- Proces sloužící k regulaci genové exprese prostřednictvím dvouvláknové RNA, dochází tedy k interferenci mezi dvouvláknovou RNA a komplementární mRNA (TGS - exprese genů ovlivněna již na úrovni DNA, PTGS – degradace mRNA)

Význam:

- Obrana vůči abiotickému stresu
- Regulace transpozomálních elementů, chromatinu
- Ochrana buněk před cizorodými molekulami - nukleové kyseliny virového původu či transgeny
- Důležitou metodou pro analýzu funkce genů u eukaryot. Selektivním vyřazením funkce určitého genu můžeme pozorovat utlumení příslušného fenotypového projevu.

Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression

Alexander R. van der Krol,¹ Leon A. Mur, Marcel Beld, Joseph N.M. Mol,² and Antoine R. Stuitje

Department of Genetics, Free University, De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

To evaluate the effect of increased expression of genes involved in flower pigmentation, additional dihydroflavonol-4-reductase (DFR) or chalcone synthase (CHS) genes were transferred to petunia. In most transformants, the increased expression had no measurable effect on floral pigmentation. Surprisingly, however, in up to 25% of the transformants, a reduced floral pigmentation, accompanied by a dramatic reduction of DFR or CHS gene expression, respectively, was observed. This phenomenon was obtained with both chimeric gene constructs and intact CHS genomic clones. The reduction in gene expression was independent of the promoter driving transcription of the transgene and involved both the endogenous gene and the homologous transgene. The gene-specific collapse in expression was obtained even after introduction of only a single gene copy. The similarity between the sense transformants and regulatory CHS mutants suggests that this mechanism of gene silencing may operate in naturally occurring regulatory circuits.

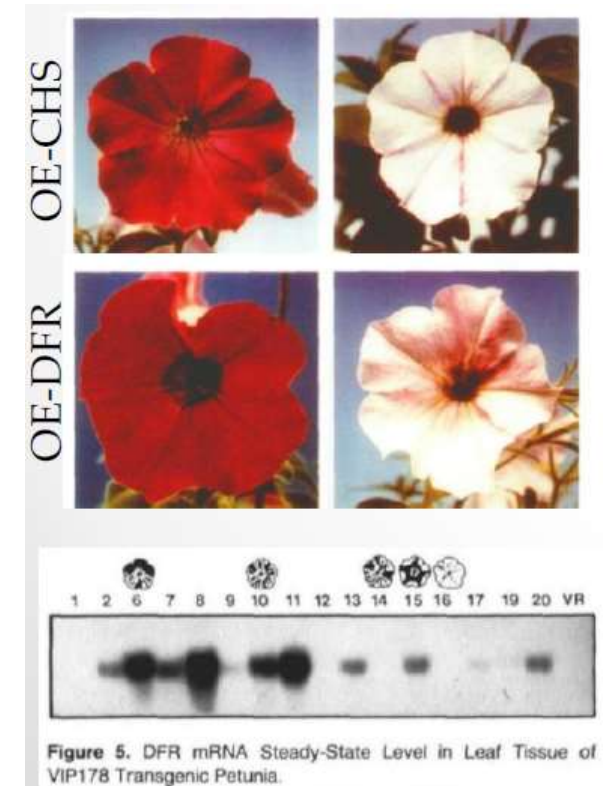


Figure 5. DFR mRNA Steady-State Level in Leaf Tissue of VIP178 Transgenic Petunia.

- Do rostlin vnesen gen pro chalcon syntázu uplatňující se v biosyntéze flavonoidů
- Získané transgenní rostliny ovšem neměly očekávané tmavě nachově zbarvené květy, ale vytvářely květy s bílými oblastmi na tmavém podkladu nebo květy kompletně bílé
- Kontrolní rostliny, do kterých nebyl vpraven gen pro chalcon syntázu, vykazovaly přirozeně se vyskytující květy nachového zbarvení
- Analýza RNA z květů z 12 transformovaných rostlin prokázala oproti rodičovským rostlinám výrazně sníženou úroveň mRNA produkovanou genem pro chalcon syntázu

Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

Fire A¹, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.

+ Author information

Abstract

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous mRNA and suggesting that there could be a catalytic or amplification component in the interference process.

- Molekulární podstatu RNAi odhalili Andrew Z. Fire a Craig C. Mello (1998) při pokusech prováděných na hlístici *C. elegans*
- Cílem bylo vnesení antisense vlákna RNA do *C. elegans* a zablokování genu *unc-22*, jehož mRNA byla komplementární k antisense RNA. Jak očekávali, jednovláknová antisense RNA se navázala na mRNA genu, vznikla dvouvláknová RNA (dsRNA) a translaci cílového proteinu bylo zabráněno

- Dvouvláknová RNA má schopnost umlčovat geny prostřednictvím degradace homologní RNA
- Tato degradace se může dít na úrovni transkripce (Transcriptional gene silencing, TGS), kdy v jádře dochází k metylaci DNA a k modifikaci chromatinu, nebo na úrovni posttranskripční (Post-transcriptional gene silencing, PTGS). Toto umlčování genů pak probíhá v cytoplazmě buňky

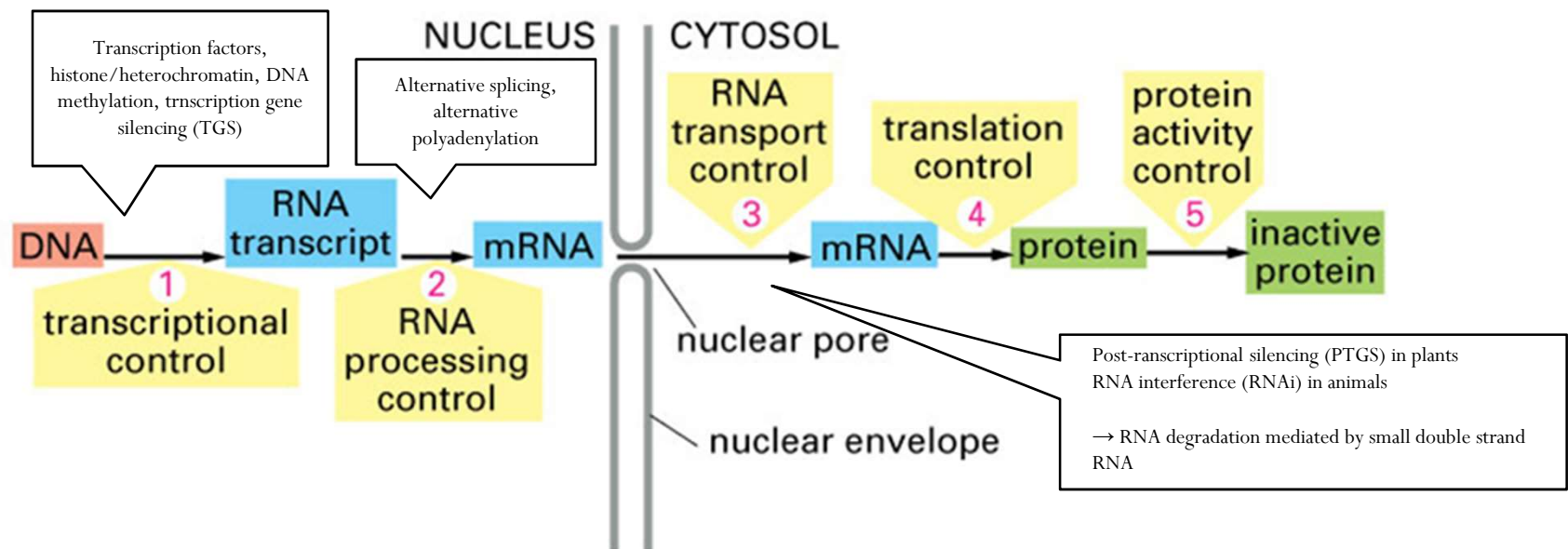
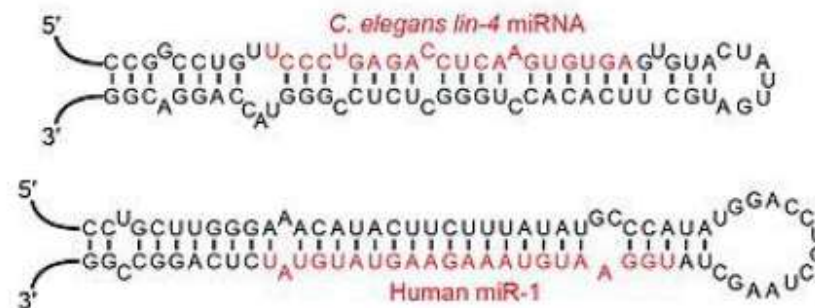
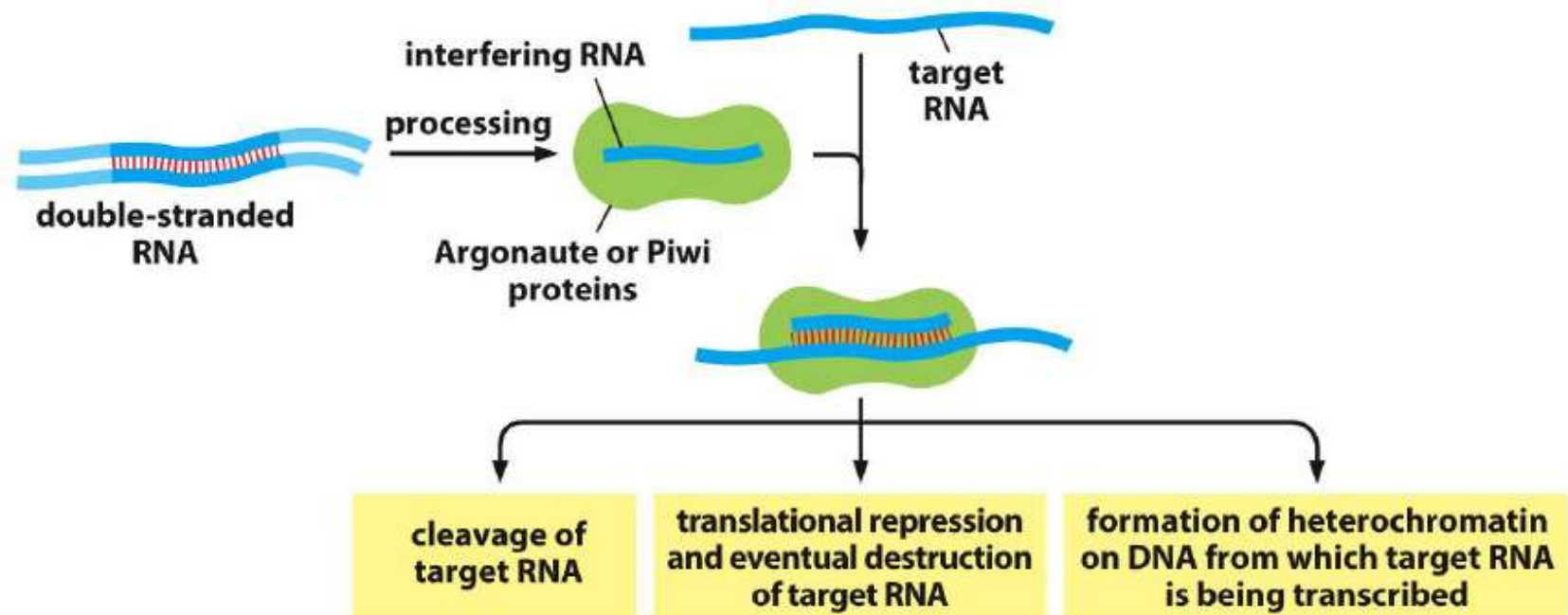


Figure 8-3 Essential Cell Biology, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Gene silencing by interfering RNAs

miRNA (21-24 nt), piRNA (26-31 nt), siRNA (20-25 nt)



Transcriptional gene silencing (TGS)

- Transkripčního umlčování je dosaženo modifikacemi chromatinu
- Nejvýznamnější a nejprobádanější modifikace představuje metylace DNA a úpravy histonů v podobě jejich metylace a acetylace – sestavení methylačního komplexu
- RdDM (RNA-directed DNA methylation)

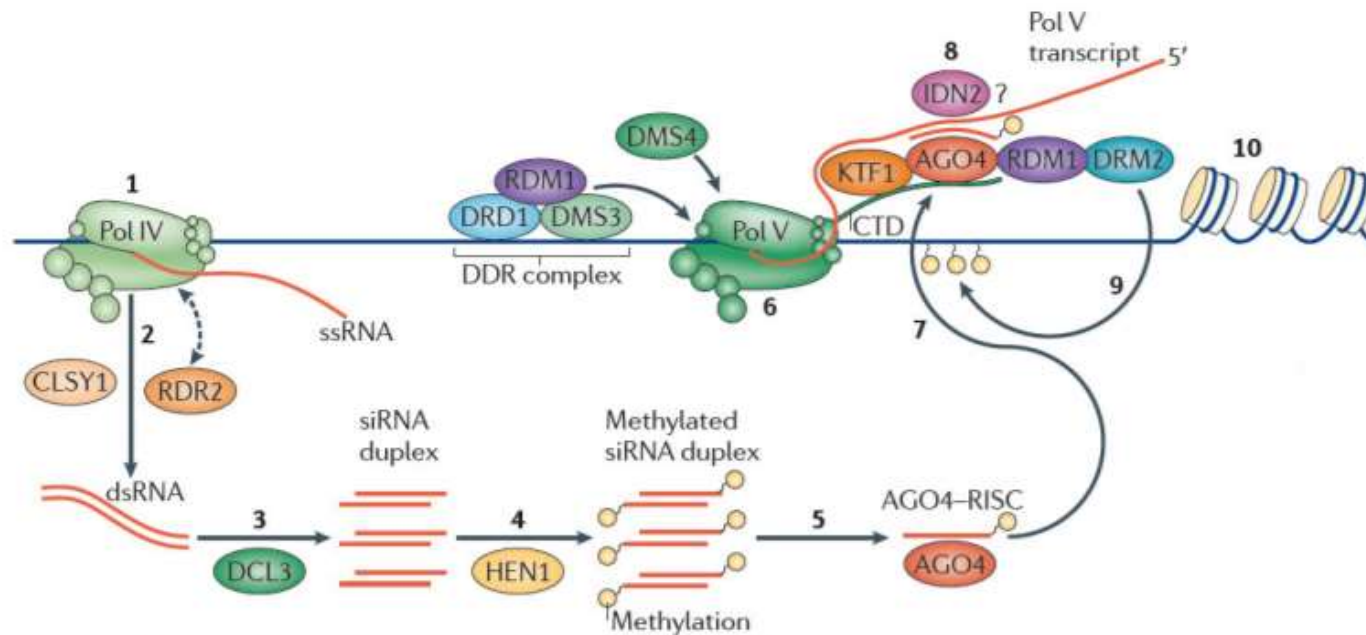
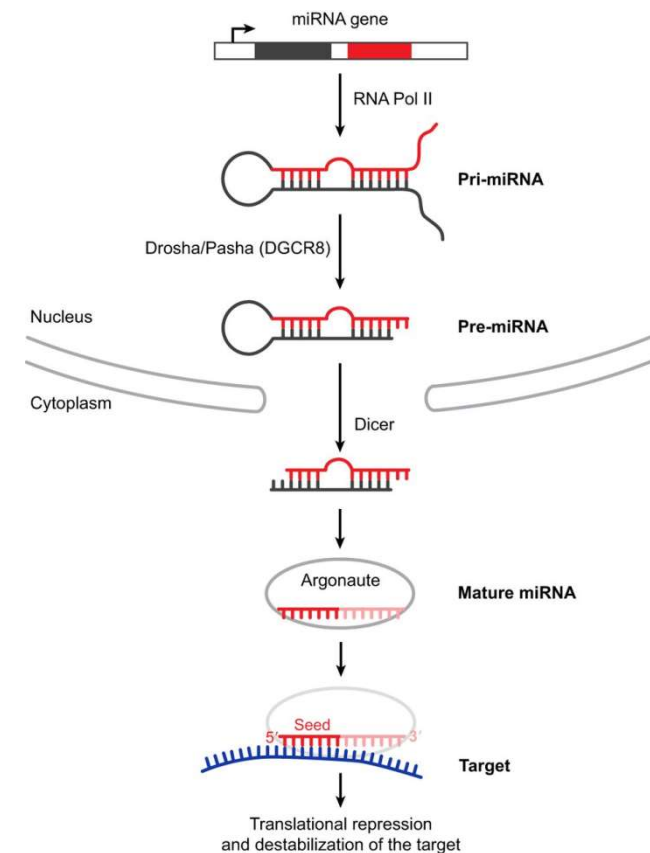
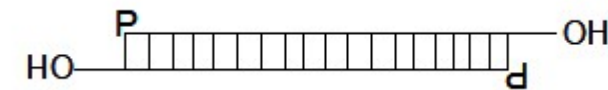


Schéma RdDM: (1) transkripce Pol IV, (2) převod transkriptu na dsRNA, (3) vyštěpení duplexů sRNA, (4) úpravy sRNA duplexů, (5) asociace s AGO4, (6) transkripce Pol V, (7) navedení RISC na transkript Pol V, (8) ustavení metylačního komplexu, (9) metylace DNA a (10) modifikace histonů. Převzato z: (Haag & Pikaard 2011)

Post-transcriptional gene silencing (PTGS)

- Posttranskripční umlčování genů (PTGS) má primárně význam v ochraně rostlin proti virové infekci a transpozomálním elementům, uplatňuje se však i v regulaci endogenní exprese genů
- PTGS je vyvoláno přítomností dsRNA v cytoplazmě rostlinné buňky, bez ohledu na to, jakého je dsRNA původu
- Endogenní a exogenní cesta
- Endogenní cesta vede k inhibici translace a dalším efektům uplatňujícím se ve vývoji rostliny. Exogenní cesta se uplatňuje v reakci na infekci patogeny, vede ke specifické degradaci komplementární RNA a dsDNA virů či transpozomálních elementů.

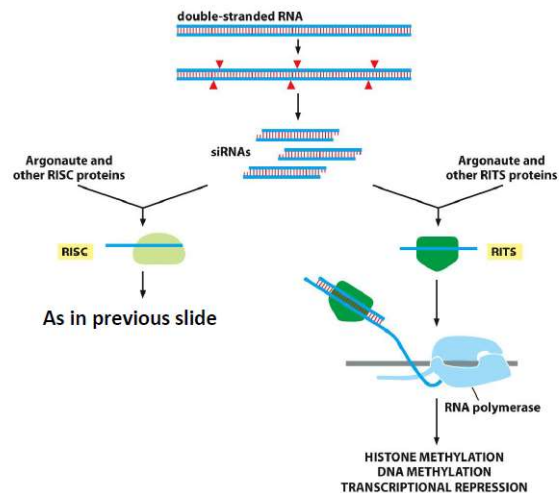
- **siRNA** - Vznikají v iniciační fázi RNA interference z prekursoru, kterým je dlouhá, lineární, dvouvláknová dsRNA; dvounukleotidový přesah na 3'-konci; dsRNA se může nacházet buď přímo v cytoplasmě, nebo se může do buňky dostat z vnějšího prostředí
- **miRNA** – nejvíce zastoupeným typem RNA u rostlin a živočichů;
 1. v jádře exprimovány jako primární miRNA (pri-miRNA) a zpracovány enzymovým komplexem Drosha do 70 nukleotidového vlásenkového prekursoru (pre-miRNA).
 2. pre-miRNA je v cytoplasmě následně rozštěpána Dicerem na dvouvláknové miRNA; Jedno z miRNA vláken je specificky rozpoznáno, např. proteinem Argonaut (AGO), druhé je degradováno.
 3. AGO protein je součástí RISC komplexu, který řídí štěpení cílové sekvence nebo inhibici translace
- **Dicer** je specifická dsRNA endoribonukleáza typu III nacházející se v cytoplasmě.



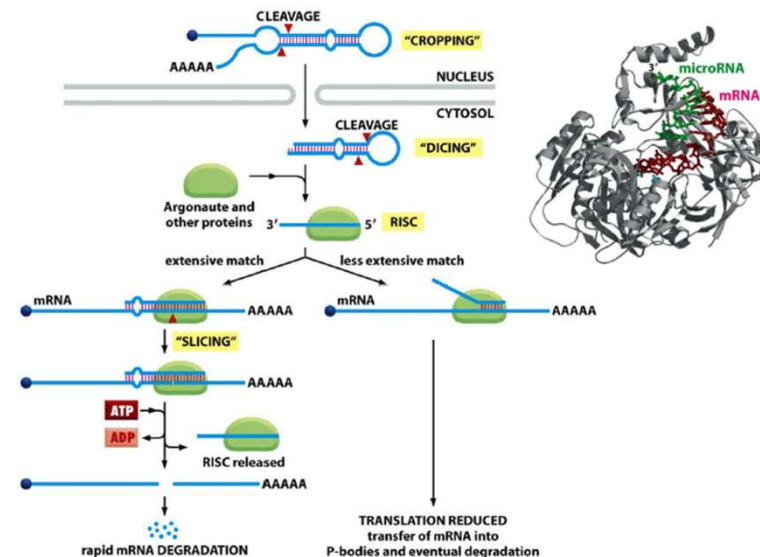
Mechanismus RNA interference

1. EXOGENNÍ CESTA - Aktivace RNAi prostřednictvím exogenní siRNA, cílová mRNA je rozštěpána → pozastavení exprese odpovídajícího genu
2. ENDOGENNÍ CESTA - Regulace exprese endogenních genů prostřednictvím miRNA → mRNA je rozpoznána za pomoci endogenní miRNA a výsledkem je zastavení translace

siRNA- transcriptional gene silencing by methylation



miRNA – posttranscriptional gene silencing by RNA interference



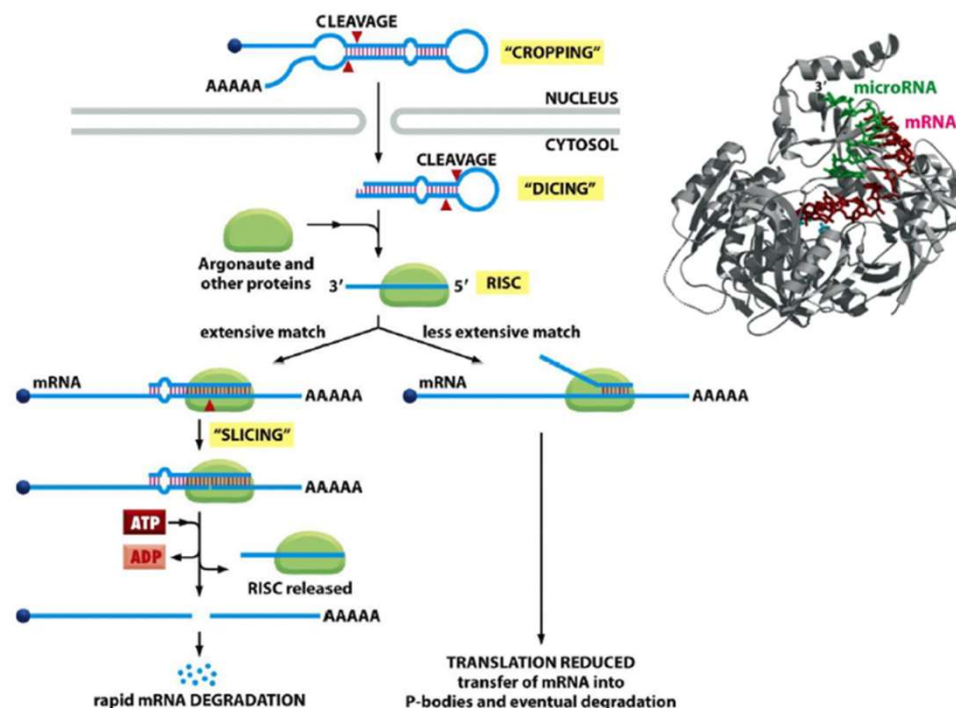
Endogenní cesta

Iniciační fáze – pre-miRNA – miRNA

Efektorová fáze – miRNA začleněna do RISC komplexu a dochází k degradaci sense vlákn, druhé vlákno (vedoucí) miRNA zůstává asociováno s komplexem RISC

Toto vedoucí vlákno je komplementární k cílové sekvenci určité mRNA, na tu se naváže a dojde k rozštípání mRNA nebo ke znemožnění translace

miRNA – posttranscriptional gene silencing by RNA interference



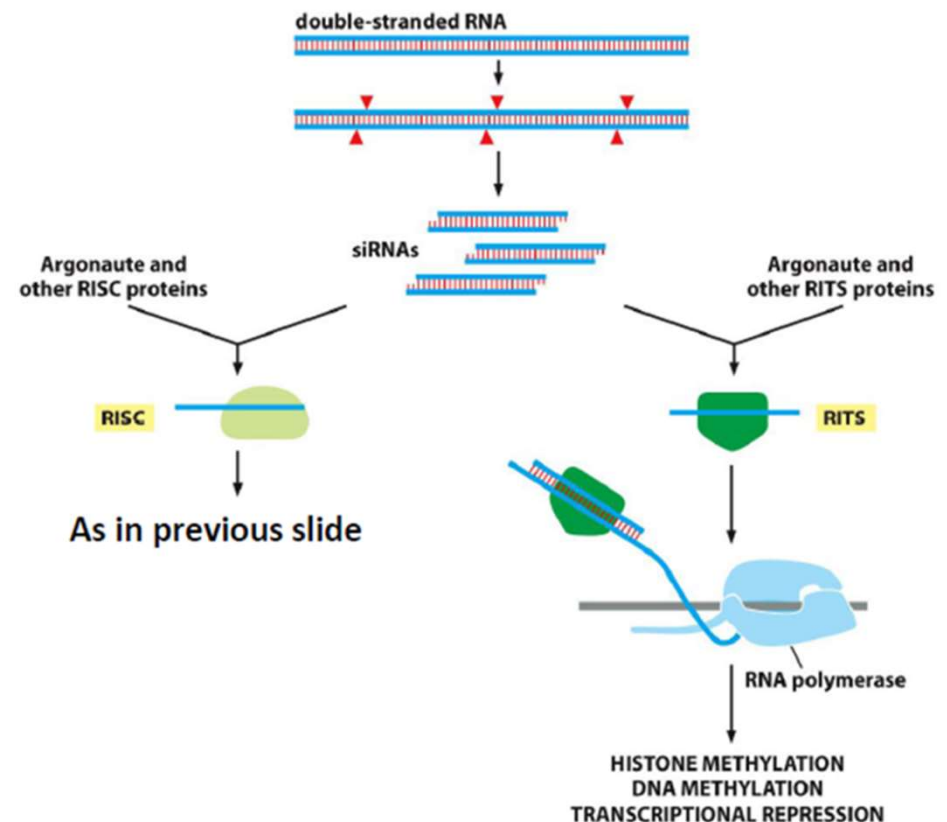
Exogenní cesta

Iniciační fáze - dsRNA exogenního původu rozštěpána enzymatickým komplexem Dicer

Výsledkem štípání jsou malé fragmenty o velikosti 21 – 25 nukleotidů (nt). Tyto fragmenty se nazývají malé interferující RNA – siRNA a je pro ně typický dvounukleotidový přesah na 3'-koncích obou řetězců

Efektorová fáze –

1. siRNA začleněna do komplexu RISC (RNA-induced Silencing Complex) a rozvolněna na jednotlivá vlákna.
2. Sense vlákno siRNA je degradováno, antisense vlákno zůstává součástí RISC komplexu a naváže se na komplementární cílovou mRNA.
3. siRNA zde tedy slouží jako vodítko k nalezení cílové sekvence.
4. mRNA je naštípána a tyto fragmenty jsou poté degradovány nukleázami, což vede ke ztrátě exprese daného genu.
5. Po degradaci cílové mRNA se RISC rozpadá na jednotlivé složky, vedoucí vlákno siRNA se může opět uplatnit



Srovnání miRNA a siRNA

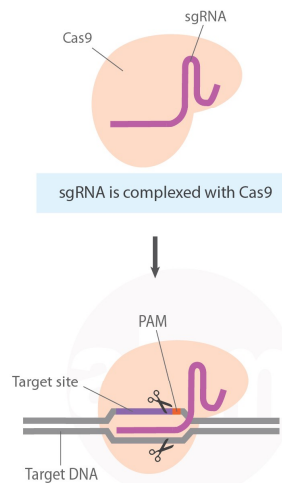
- miRNA je cíleně exprimována (řídí regulaci endogenních genů)
- miRNA vzniká z vlásenkového prekurzoru
- miRNA má velmi přesné koncové sekvence, pouze s malou variabilitou
- siRNA je primárně exogenního původu a jejím zdrojem jsou invazivní nukleové kyseliny, jako jsou viry, transpozony či transgeny
- siRNA vzniká z dlouhé, zcela komplementární dvouvláknové RNA
- siRNA má sklon k větší rozmanitosti

siRNA i miRNA jsou vystřiženy ze svých prekurzorů pomocí enzymu Dicer a jednovláknová forma siRNA i miRNA asociuje s enzymovým komplexem RISC

Gene Knockout

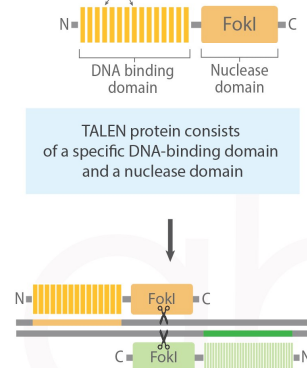
Gene expression is eliminated by creating InDels in the DNA

Using CRISPR

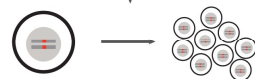


Using TALEN

33 amino acid repeats, differing by 2 amino acids, each of which binds 1 nucleotide



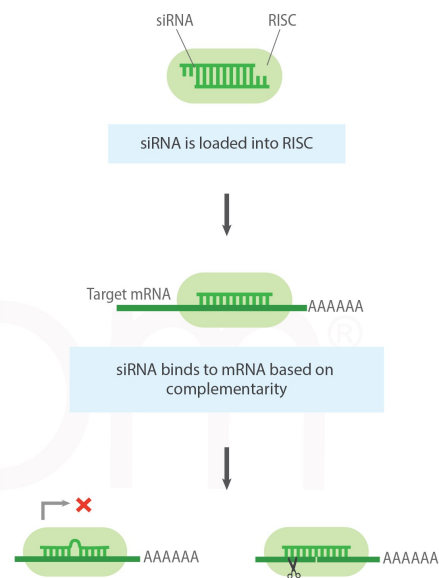
Cas9/TALENs cause a dsDNA break. The process of repair via Non-Homologous End Joining (NHEJ) introduces InDel mutations which disrupt the reading frame of the gene.



vs. Gene Knockdown

Gene expression is reduced by targeting the mRNA

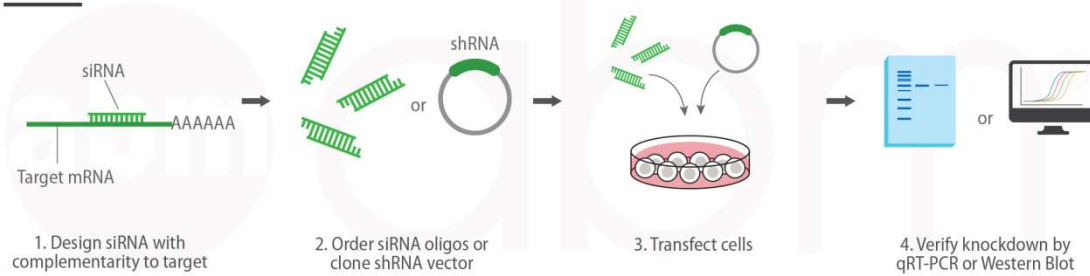
Using RNAi



~70% Knockdown Cells

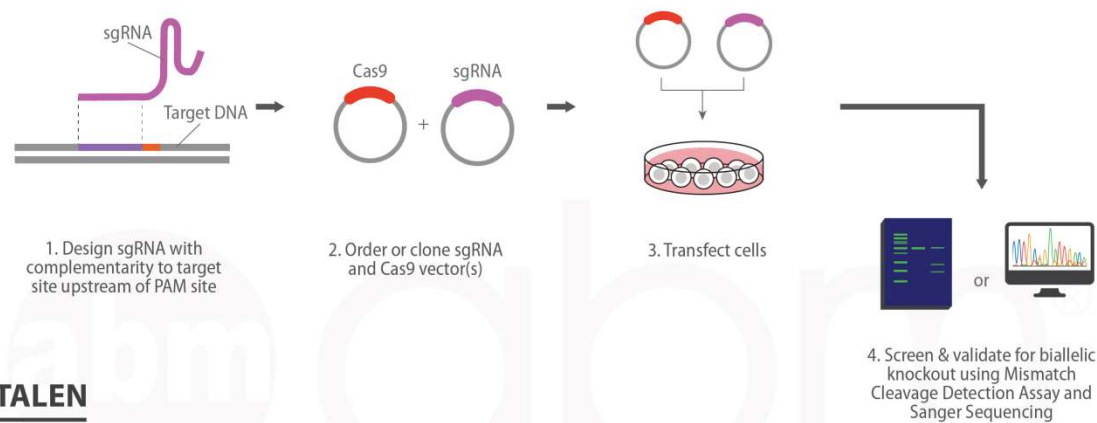
Some mRNA aren't bound, so ~30% gene function remains

RNAi



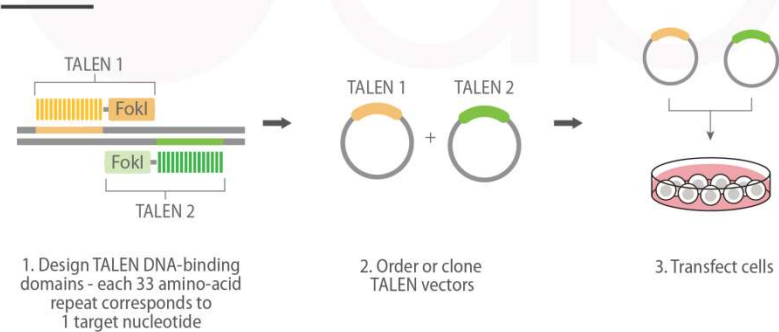
Gene Knockdown Workflow

CRISPR



Gene Knockout Workflow

TALEN



Srovnání

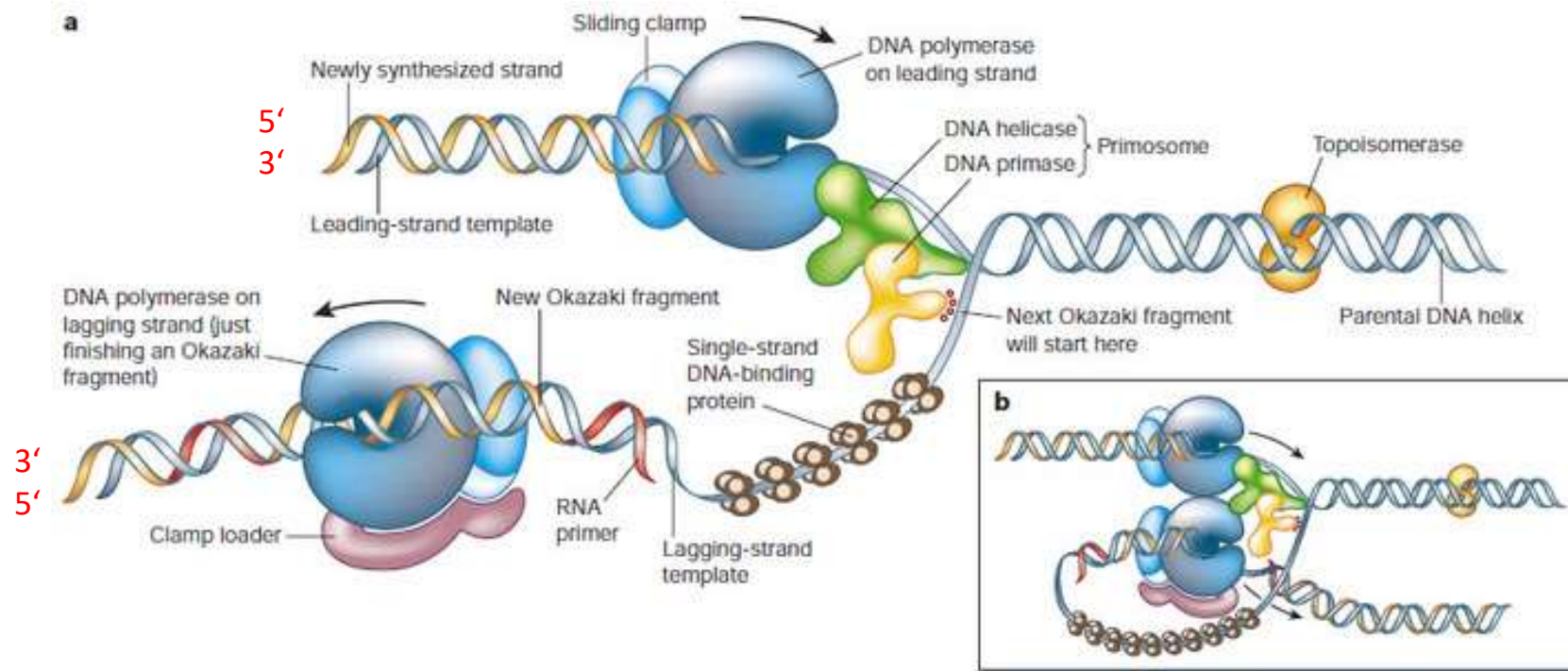
Table 1: Summary of Gene Silencing Methods.

	CRISPR	TALEN	RNAi
Target	Genomic DNA	Genomic DNA	mRNA
Loss-Of-Function Type	Knockout	Knockout	Knockdown
Transgenes	Cas9 & sgRNA (spCas9: ~4.2 kb, saCas9: ~3.4 kb)	2 TALENs (~3 kb each)	siRNA (~20 bp) or shRNA (~80 bp)
Time to Phenotype (design to validation)	Medium	Long	Short (oligo delivery)/ Medium (vector delivery)
Cost	Low	High	Low (vector delivery)/ High (oligo delivery)
Ease of Experiment	Moderate	Difficult	Easy
Off-Target Effects	Low	Low	High
Ease of Design	Easy	Moderate	Easy

M. Boettcher, M. T. McManus, Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN or CRISPR. Mol. Cell. 58, 575 (2015).

Kvantifikace pomocí real-time PCR

DNA replikace *in vivo*

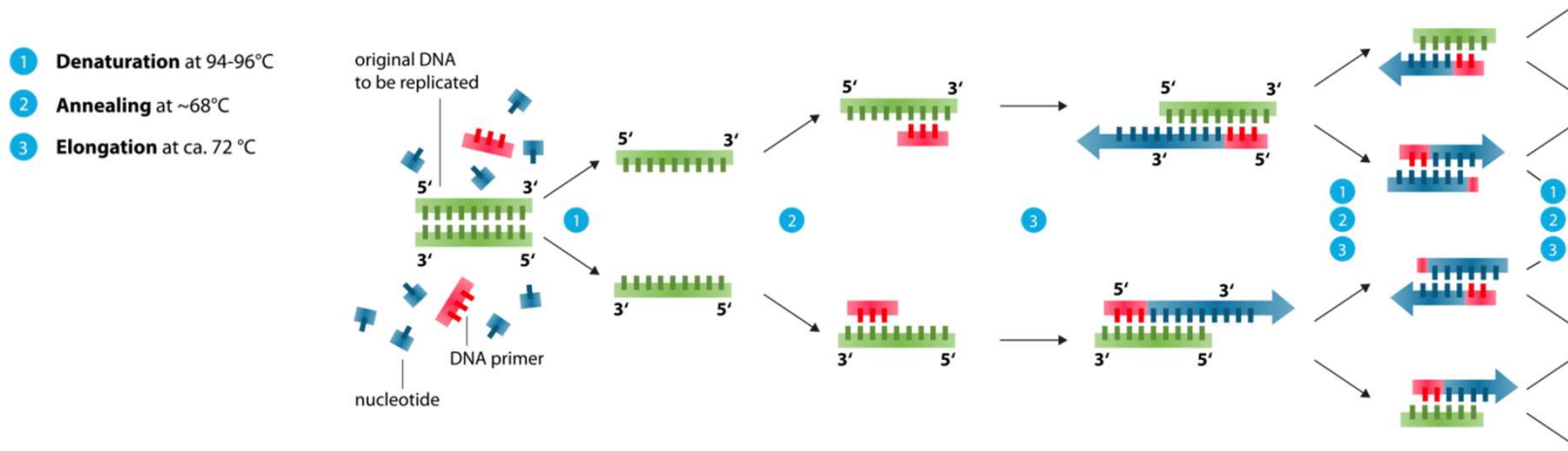


- separace řetězců
- syntéza krátkých RNA primerů
- syntéza dvou nových DNA helixů

Podílí se enzymy:

- DNA primasa
- Helikasa
- DNA polymerasa
- DNA ligasa
- SSB-proteiny

Úvod do PCR



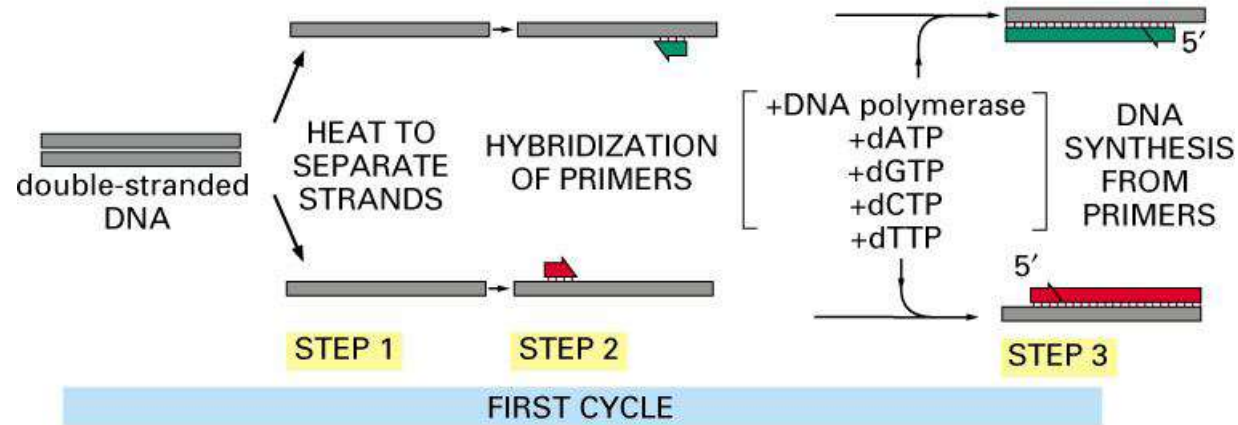
1983 Kary Mullis (Nobelova cena za chemii, 1993)

"Lets you pick the piece of DNA you're interested in and have as much of it as you want."

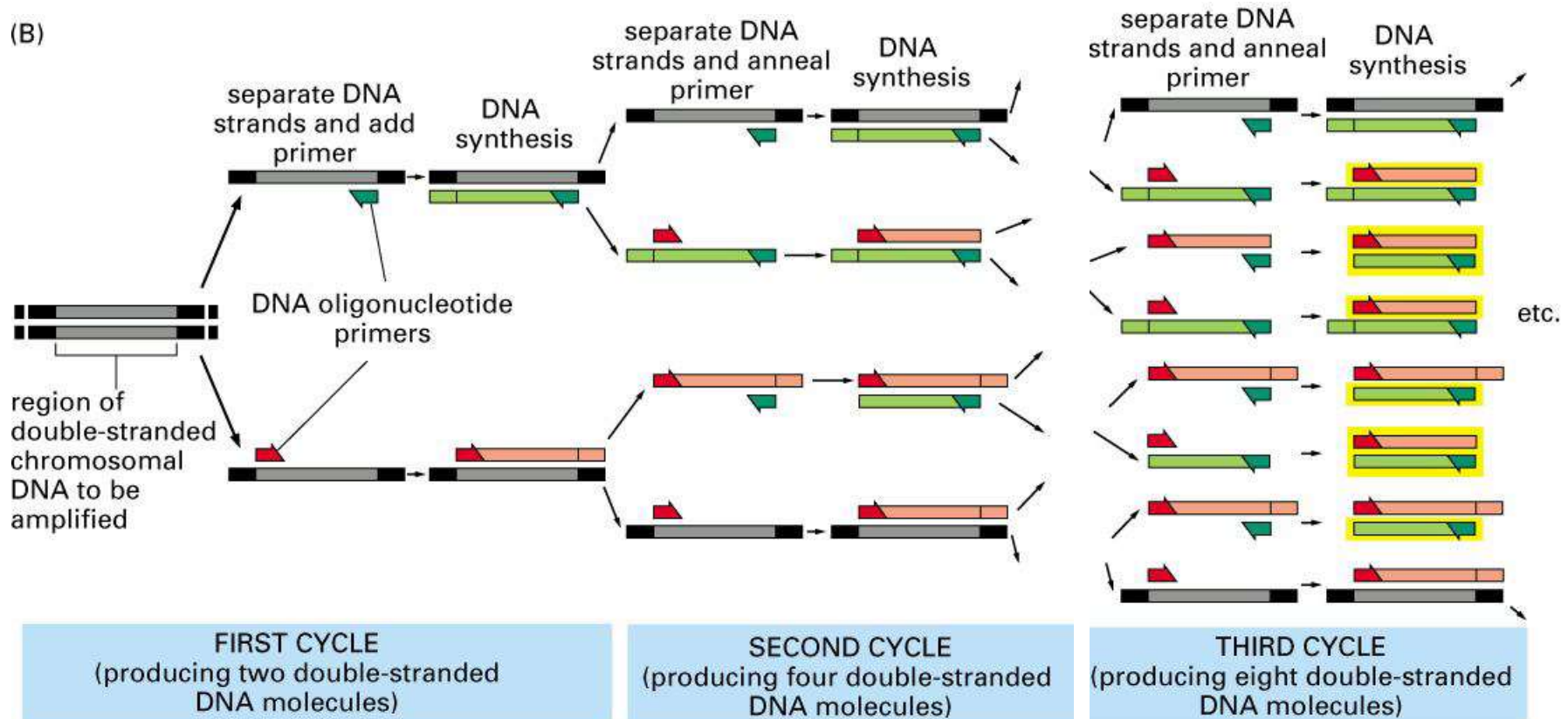
1986 - **Taq** DNA polymeráza (termostabilní) – *Thermus aquaticus*,

1987 - první PCR thermocycler - automatizace PCR

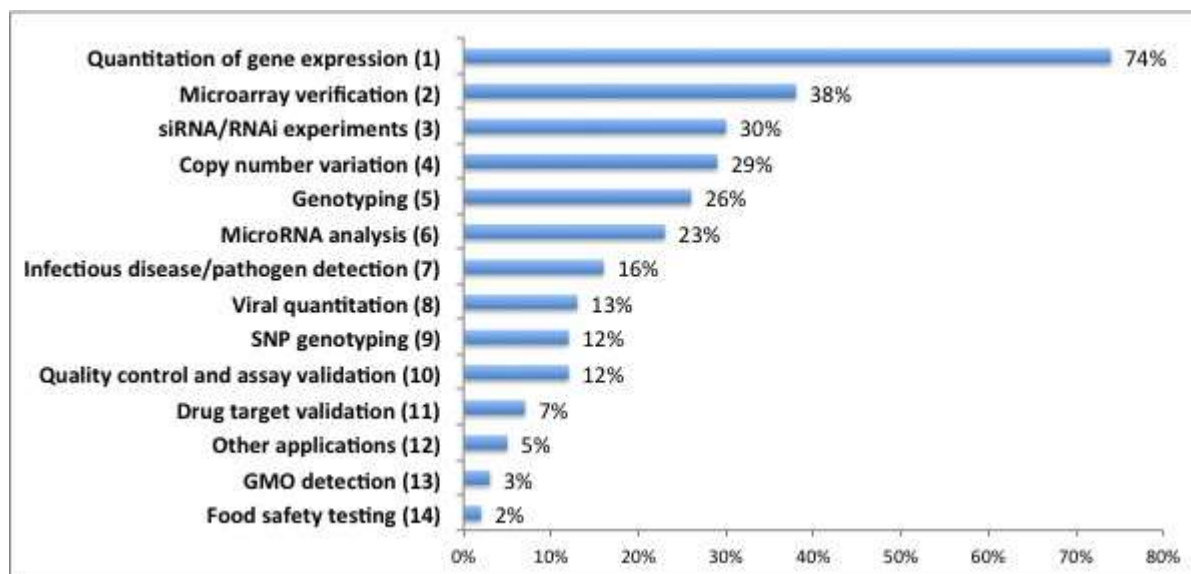
(A)



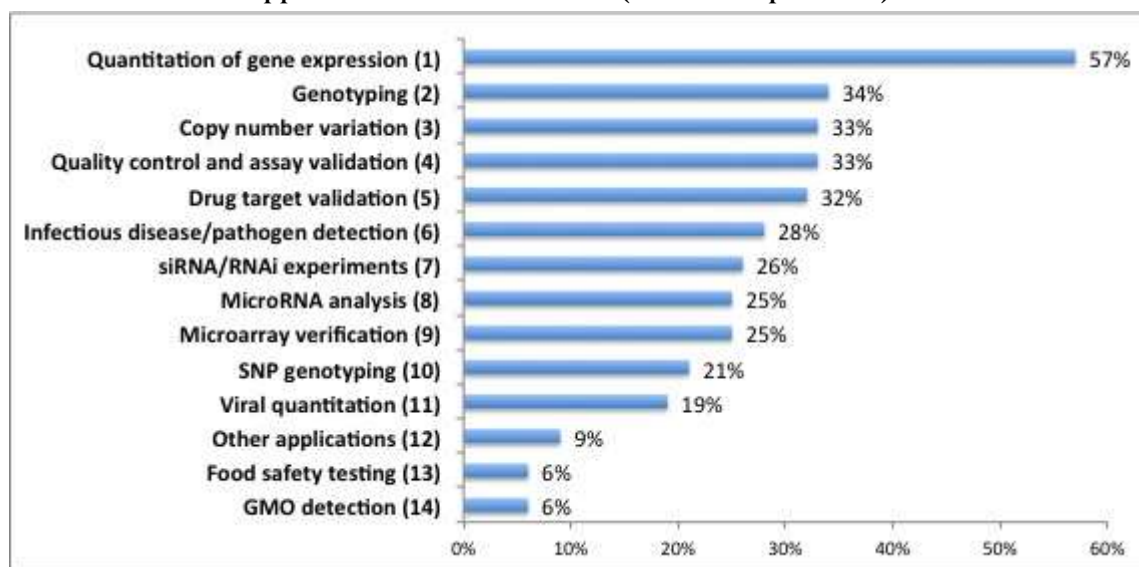
(B)



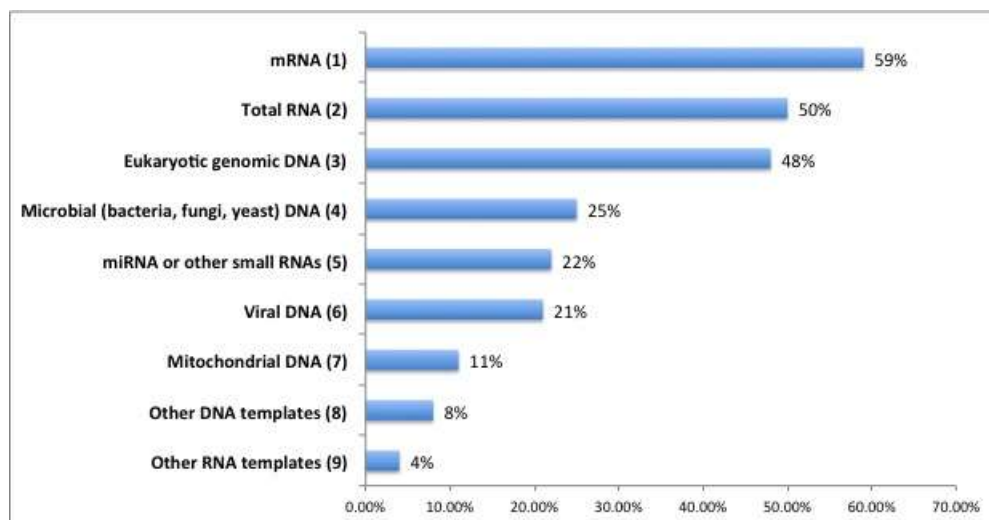
Academic Applications of Real-Time PCR (%Total Respondents)



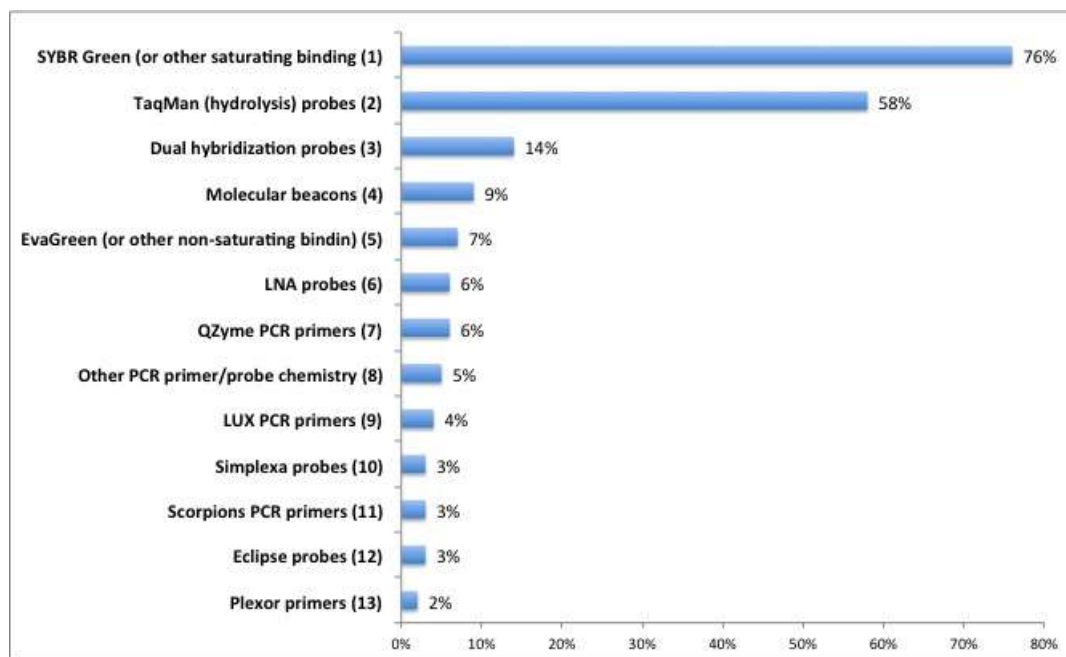
Pharma-Biotech Applications of Real-Time PCR (% Total Respondents)



Overall Ranking of Real-Time PCR Templates (% Total Respondents)



Overall Ranking of Real-Time PCR Primers and Probe Types (% Total Respondents)



Reakční směs (mastermix, MM)

složka	funkce
deionizovaná voda	bez DNas, RNas
reakční pufr	vhodné prostředí pro polymerasu (iontová síla, pH)
Mg ²⁺	vazba s nukleotidy – kofaktor polymerasy, (MgCl ₂ , MgSO ₄)
dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	nukleotidy - stavební kameny polymerace
primer A, primer B	synteticky připravené oligonukleotidy o délce 20-25 nukleotidů, ohraničení amplifikovaného úseku
DNA polymerasa	termostabilní DNA polymerasa, polymerace
templát DNA	DNA izolovaná z buněk, plazmidová DNA (genomové knihovny), buněčný extrakt podrobený lýzi

Reakční směs (koncentrace)

složka	obvyklá koncentrace v reakční směsi	nízká koncentrace	vysoká koncentrace
templát DNA	0,01 ng-1000ng (plazmid-genomová DNA)	nízký výtěžek	nízká specifita nasedání primerů
		přítomnost inhibitorů PCR reakce- EDTA, heparin, $(\text{PO}_4)^{3-}$	
primer A	0,1-1 μM	nízký výtěžek	nízká specifita nasedání primerů
primer B	0,1-1 μM		
DNA polymerasa	0,01-0,05 U/ μl	nízký výtěžek	nízká specifita
Mg^{2+}	1-5mM (množství Mg^{2+} je přímo úměrné množství dNTP)	nízký výtěžek	nízká přesnost DNA polymerasy stabilizace ds DNA – neúplná renaturace – nižší výtěžek stabilizace nespecifické vazby primerů-nespecifické
Reakční pufr	10mM Tris-HCl, 50mM KCl	pH<7 poškození templátu	
dNTP (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)	200 μM pro každý nukleotid	vyšší přesnost	chybné zařazení

Taq DNA polymeráza

- termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (nyní rekombinantně)
- aktivní při pokojové teplotě – nutnost pracovat na ledu
- při teplotách nad 90°C je inaktivní, ale při ochlazení se znovu aktivuje
- pouze 5' exonukleasová aktivita (degradace Okazakiho fr.), nikoliv 3' exonukleasová aktivita (proofreading) • 1 chyba na 10-20tisíc nukleotidů

Problémy

- ❑ PCR je velmi citlivá na kontaminace
- ❑ Častý problém - nespecifická amplifikace

Taq DNA Polymerasa pracuje i při nízkých teplotách (e.g., během nastavování reakce)

“Hot start” PCR je řešení (protilátka proti Taq)

- ❑ Amplifikace je často možná i pro ne zcela známou sekvenci primerů např. DNA jiného biologického druhu

“Degenerované primery” (multiple verze s různými bázemi v klíčové pozici (tryptofan + methionin):

stupeň degenerace:

prettyfly protein má kód degenerovaný na 11 pozicích

tzn. $(4)(2)(4)(2)(4)(4)(2)(2)(2)(4)(2) = 65.536$ krát

P	R	E	T	T	Y	F	L	Y
CCA	CGA	GAA	ACA	ACA	TAC	TTC	CTA	TAC
G	G	G	G	G	T	T	G	T
C	C		C	C			C	
T	T		T	T			T	
	A						T	

“Touchdown PCR” s vyšší přesností v prvních cyklech

- ❑ Maximální velikost produktu +/-5000 bází pro standardní PCR: Long PCR kits mohou amplifikovat až 35 kbází

Navrhování primerů

- Primery by měly být 20-25 bazí dlouhé
- Nutná znalost alespoň části sekvence amplifikované DNA
- Primerové sekvence musí korespondovat se sekvencemi, které na templátové molekule lemují cílový úsek, 3'konce hybridizovaných primerů by měly směřovat k sobě
- Délka primerů (krátké = nespecifita, dlouhé = efektivita pcr se snižuje)
- Procentuální zastoupení G + C by mělo být 50-60% - ovlivňuje Tm (teplota kdy se váže primer na templát)
- Primery v jedné reakci by měly mít srovnatelné Tm
- Vyvarovat se repetitivním sekvencím
- Vyvarovat se komplementaritě uvnitř či mezi primery
- $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$



Nasedání primerů a směr syntézy



Navrhování primerů

Příklad navržení primerů:

Konvence: DNA se vždy zapisuje ve směru od 5'ku 3'konci

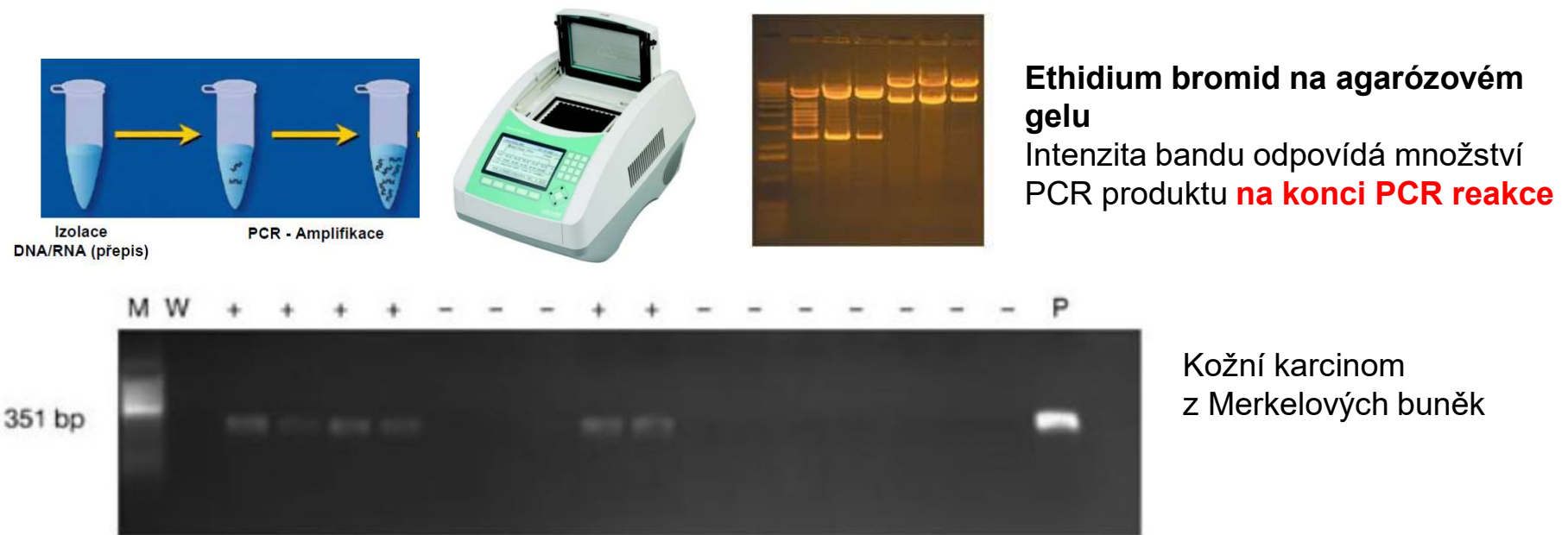
Cílová sekvence: (priming místo podtrženo):

5' TATAAGCCATAACGATATTGCTGAGTCAAGTCCACATATCAT**ATGG**
ATGAGAAATGCTTGTTGGAGCTGATGTTGATTTGGAGAGACTCTCTCT
CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAA**CCAGTTAAAGAGTGT**
GCCAGTAGAG 3'

Forward Primer: 5' ATG GAT GAG AAA TGC TTG TG³

Reverse Primer: 5' ACT GGC ACA CTC TTT AAC TGG³

Kvalitativní PCR (konvenční)



Qualitative PCR detects the presence of Merkel cell polyomavirus in cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) in immunocompetent individuals. From Drowkin et al, 2009: MCPyV detection. (a) The presence of MCPyV in SCCs, genomic normal DNA, and adjacent skin DNA was determined by PCR using VP1 primers. A representational result is shown with 6 of 16 samples tested showing a PCR product at 351 bp. All experiments included DNA from an MCPyV plasmid as a positive control (P) and a negative water control (W). M, molecular weight marker; +, positive for virus; -, negative for virus.

Výhody: efektivita, rychlost analýzy, specifita, citlivost, levná

Nevýhody:

nemožnost automatizace

nízká přesnost, obtížná kvantifikace,

rozlišení pouze na základě velikosti produktu

výsledky těžko interpretovatelné v číslech

end-point analýza

Kvantitativní PCR

- Real-time PCR monitoruje fluorescenci emitovanou v průběhu reakce jako indikátor tvořeného amplikonu v každém cyklu PCR (v reálném čase)
- Speciální real-time PCR termocykléry s detektory umožňují kvantifikaci v reálném čase a díky sběru dat i automatizaci

1. Pozadí

- fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot

2. Exponenciální fáze

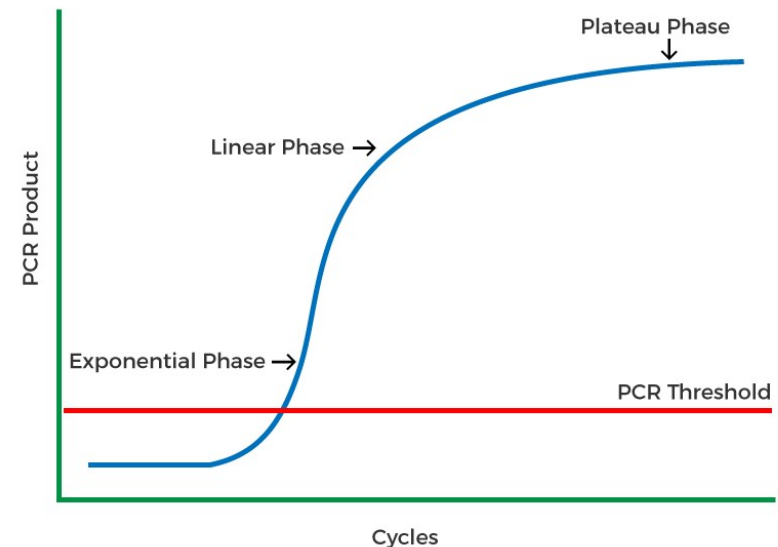
- Jestliže je efektivita reakce 100% – produkt se přesně zdvojnásobí (4-6 cyklů ze 40)
- Nárůst množství DNA je dle 2^n
- Věrně odráží množství templátové DNA = odečtení C_t

3. Lineární fáze

- $2n+1$
- Jsou spotřebovávány reakční komponenty a PCR produkty začínají degradovat

4. Plateau

- End-point analýzy - reakce je ukončena, PCR produkty degradují



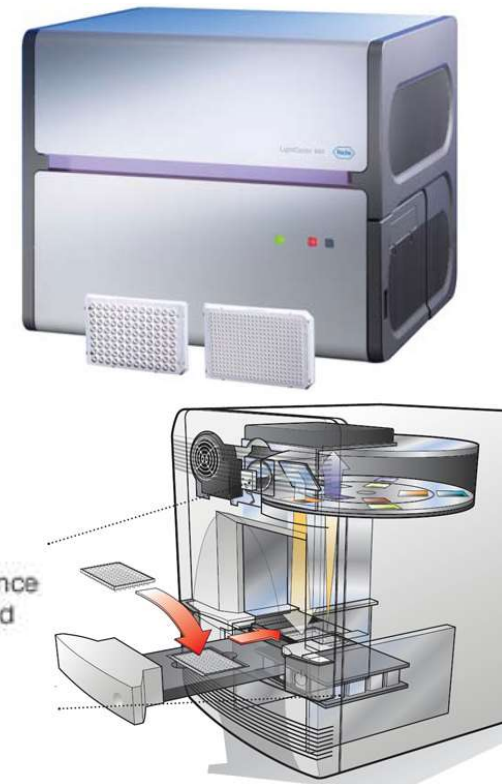
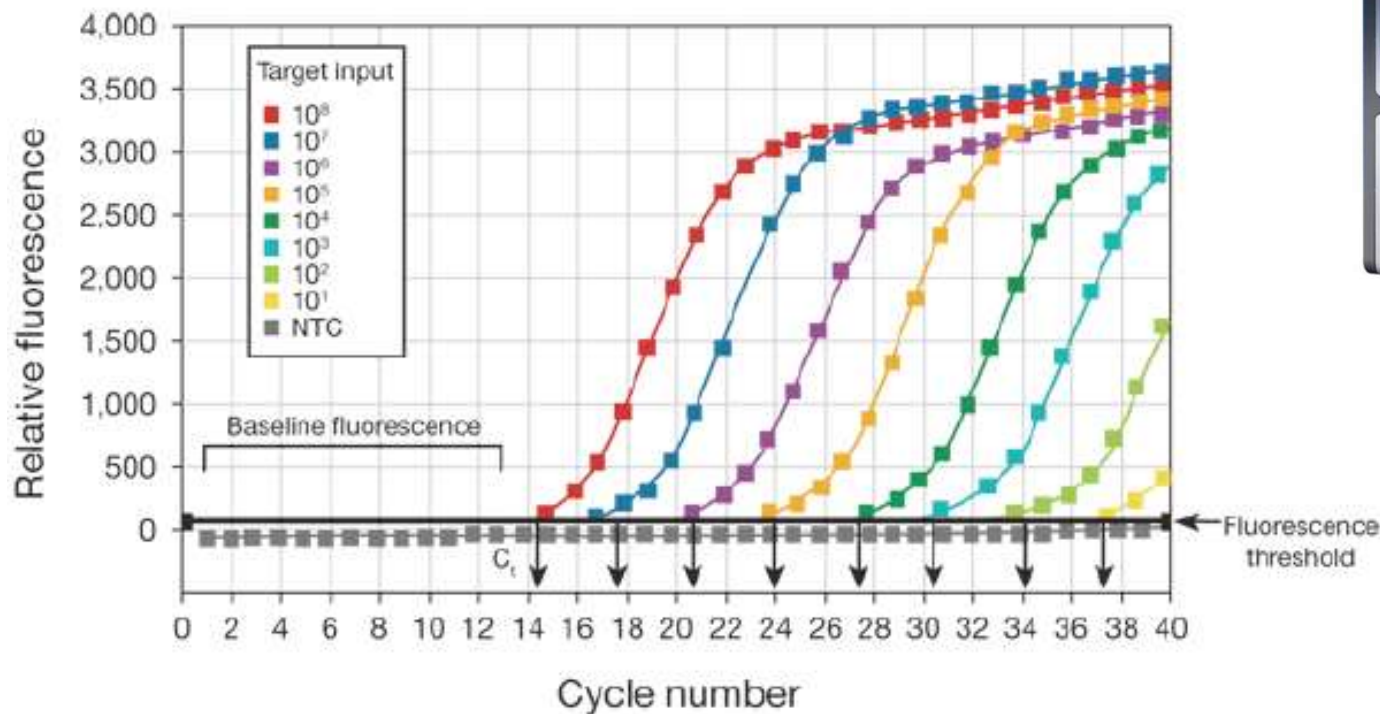
Kvantifikace

Množství DNA se měří v každém cyklu pomocí fluorescenčního barviva – rostoucí signál je přímo úměrný k počtu ampliconů

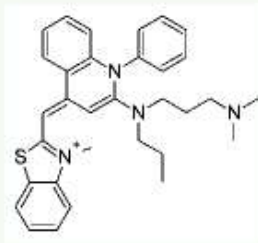
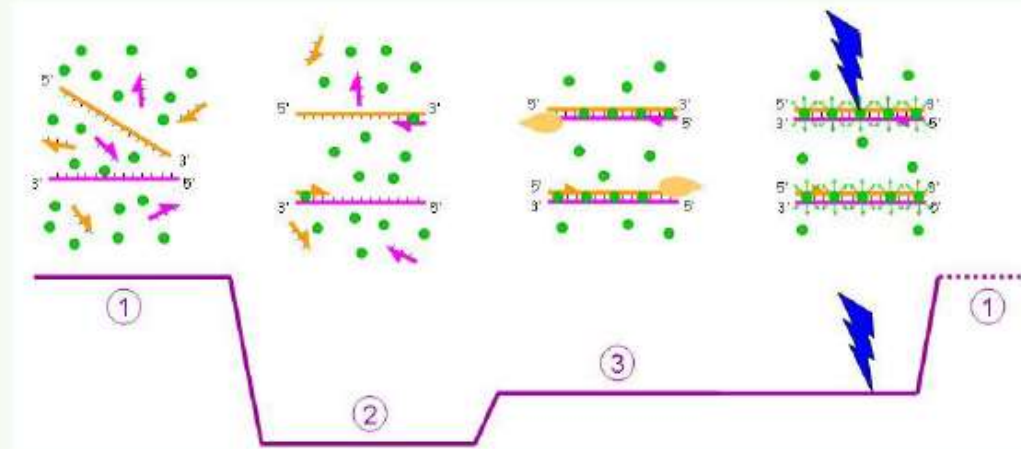
Fluorescence

Signál měřen přístrojem, který v sobě spojuje tepelné cyklování s možností skenování fluorescenčního barviva.

Vynesení fluorescence proti počtu cyklů, real-time PCR přístroj generuje amplifikační graf, který představuje akumulace produktu po dobu trvání celého PCR reakce

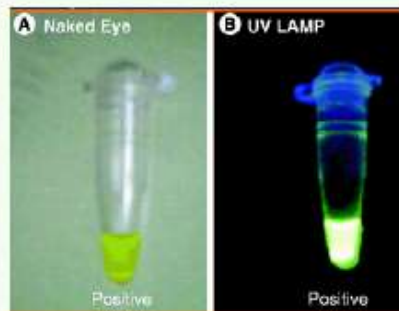


1. SYBRGreen real time qRT-PCR (passive reference dyes)



DNA-SYBRGreen I komplex absorbuje modré světlo ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) a emituje zelené ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$).

Fluorescence SYBRGreenu I úměrná PCR produktu

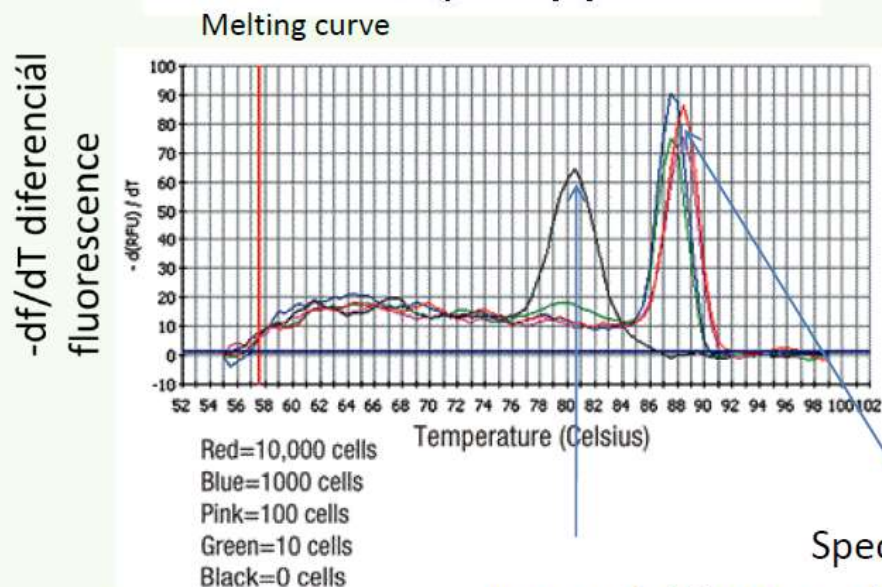
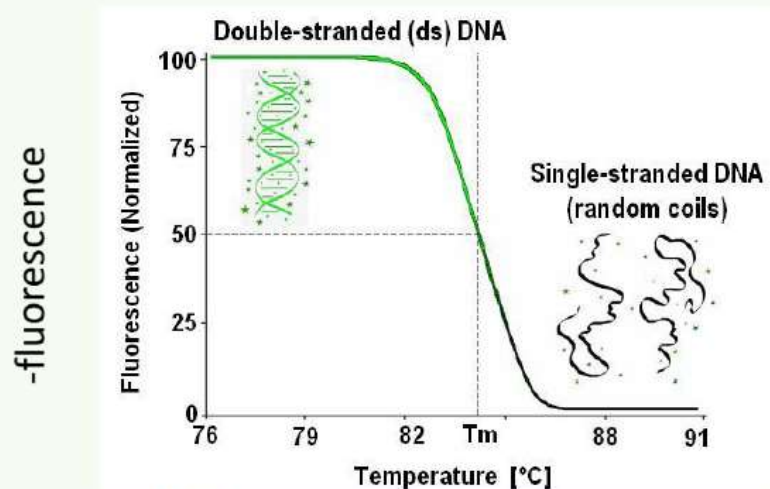


Výhody - levné a snadné

Nevýhody - nespecifické, fluoreskuje nespecifický PCR produkt !!
-proto musí následovat melting curve analýza

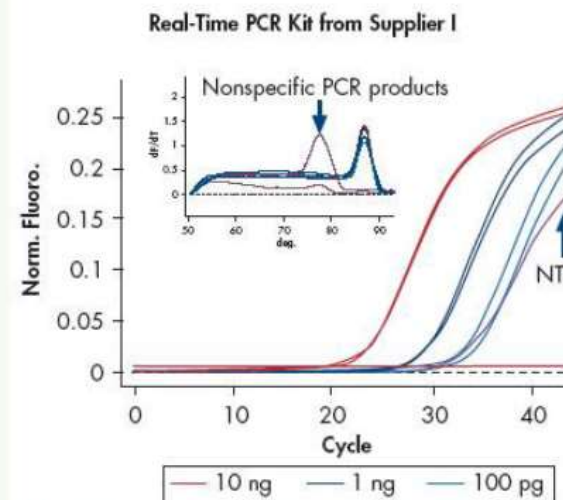
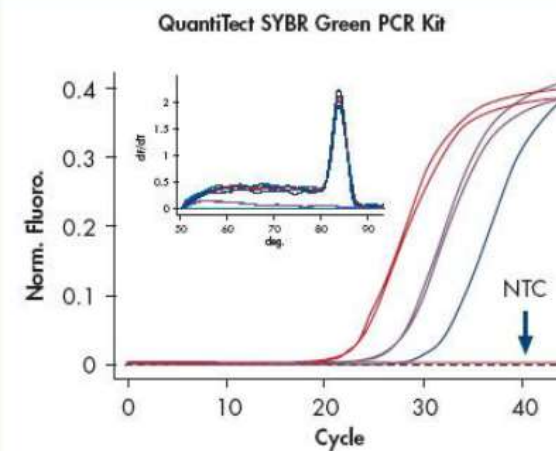
Analýza křivky tání

-jelikož SybrGreen detekuje nespecificky, specifita PCR produktu musí být ověřena Metling analýzou



Specifický produkt – stejná T_m

Nespecifický PCR produkt s jinou T_m



Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) metody v RealTime RT-PCR

qRT-PCR metody:

TaqMan Probes
Molecular Beacons
Hybridization Probes
Eclipse Probes
Amplifluor Assays
Scorpions Primers
LUX Primers
Qzyme Primers

Fluorofory používané pro FRET RT-PCR

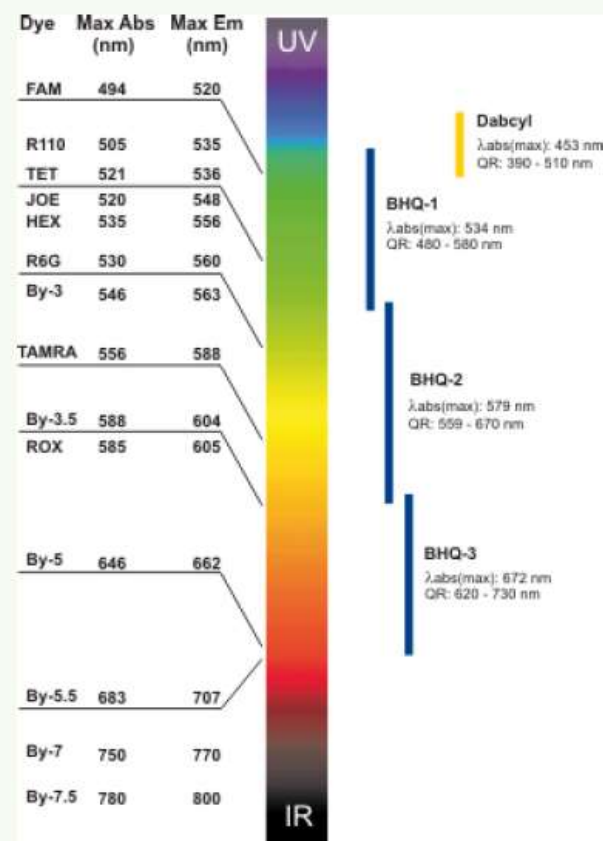
FAM-TAMRA
nebo kombinace s BHQ
Black Hole Quenchers -zhášači

BHQ Dye Absorption Maxima and Quenching Range

Quencher	Abs max	Quenching Range (nm)
BHQ-1	534	480 - 580
BHQ-2	579	550 - 650
BHQ-3	672	620 - 730

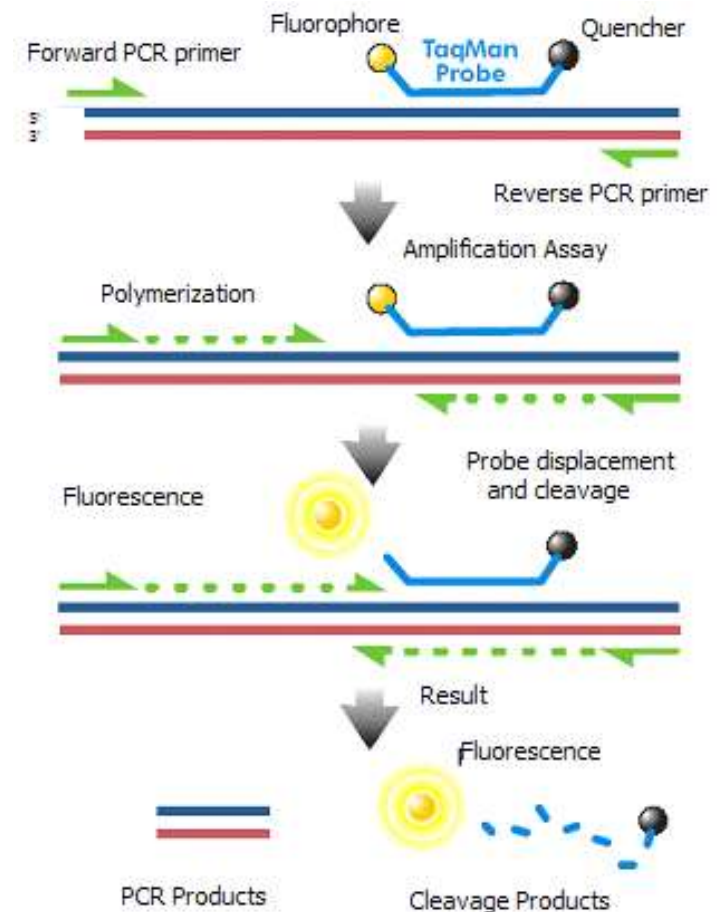
BHQ Dye / Reporter Combinations

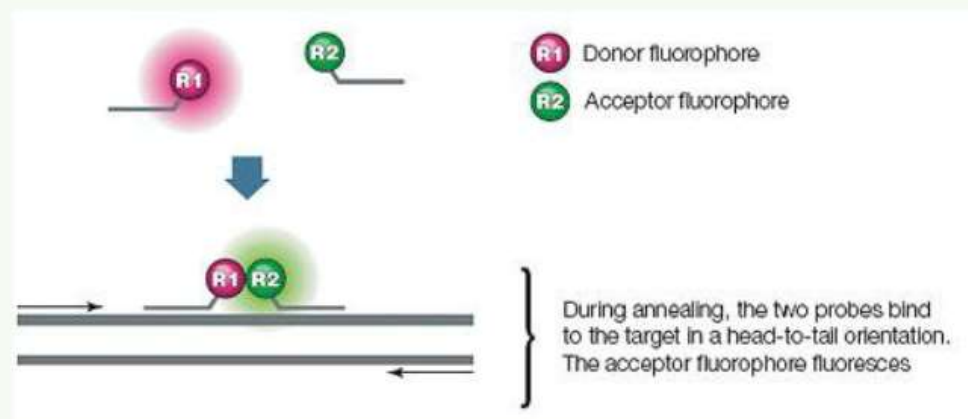
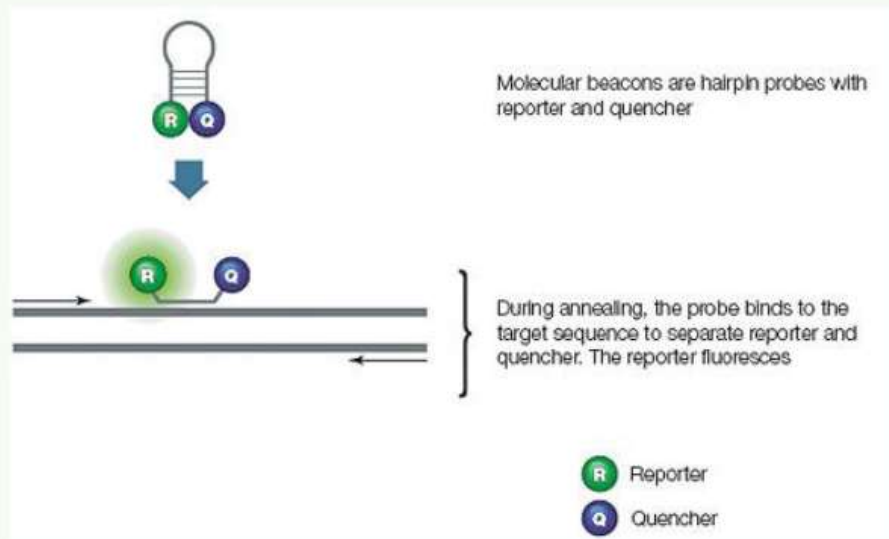
Quencher	Suggested Fluorophores
BHQ-1	FAM, TET, JOE, HEX, Oregon Green [®]
BHQ-2	TAMRA, ROX, Cy3, Cy3.5, CAL Red [™] , Red 640
BHQ-3	Cy5, Cy5.5



qRT-PCR s TaqMan pr óbami

- sekvence o velikosti primeru komplementární k specifickému místu templátu
- kovalentně vázaný **fluorofor** na 5' konci próby
- kovalentně vázaný **zhášec (quencher)** na 3' konci próby
- princip založen na využití 5'-3' exonukleasové aktivity Taq DNA polymerázy
- množství detekované fluorescence je přímo úměrné množství fluoroforu uvolněného z DNA přítomné v PCR reakci
- vysoká specifita detekce





Molecular beacons próby.

Oligonucleotidy (25–40 bp) , které tvoří vlásenku „hairpin“ díky 5-6 komplementárním bázím . Po hybridizaci nastává uvolnění FRET a donorový fluorofor emituje s kratší vlnovou délkou.

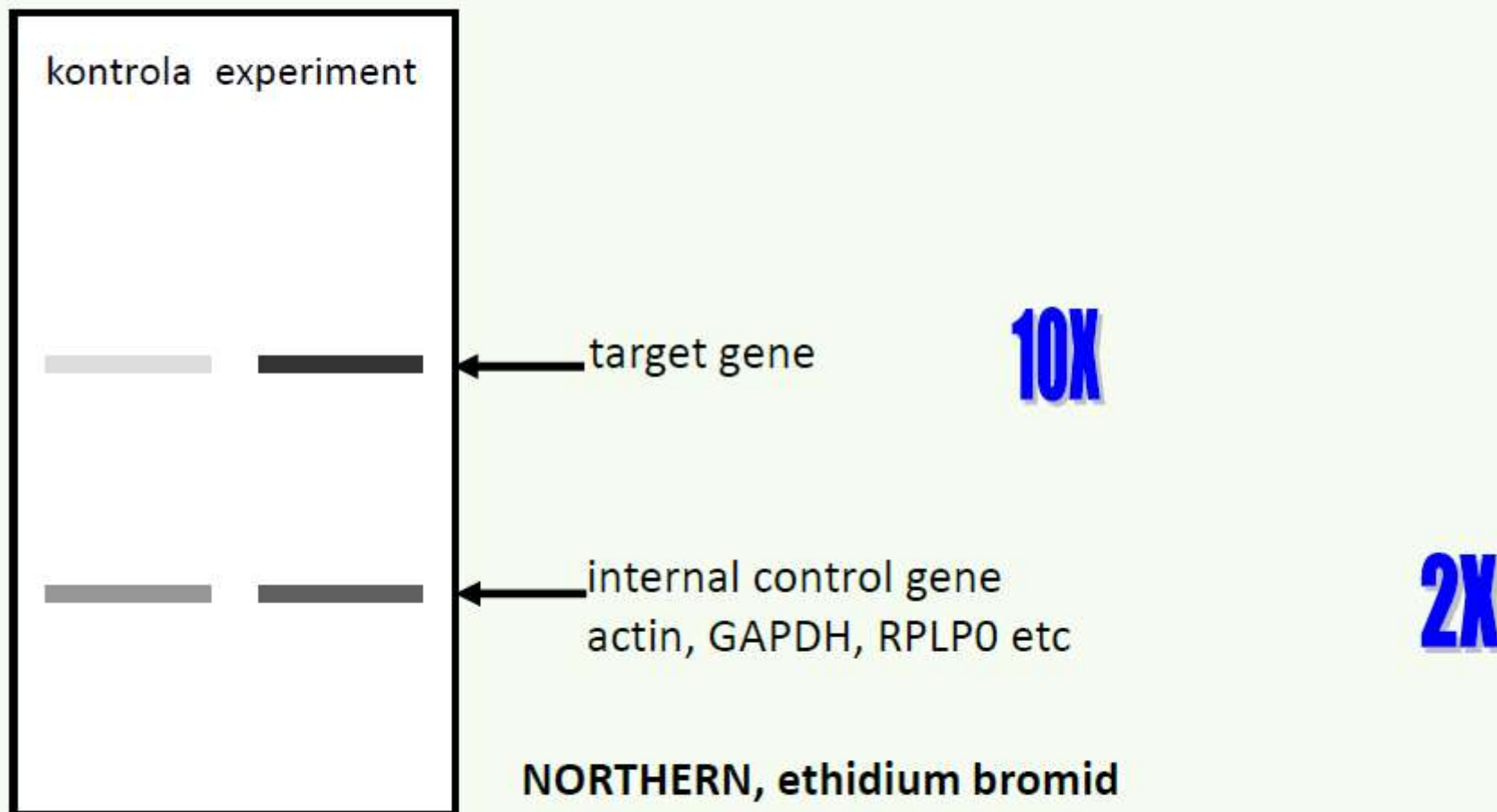
Používá se DNA polymeráza BEZ 5-exonukleázové aktivity, beacons nejsou degradovány během PCR reakce.

Hybridization Probes

Hybridizují pouze k jednomu řetězci, próby se uvolňují během syntézy komplementárního řetězce (zháší se FRET). FRET nastává, hybridizují-li obě próby současně v těsné blízkosti. FRET koreluje s množstvím PCR produktu.

Základní principy kvantifikace

- denzitometrické určení „velikosti“ bandu

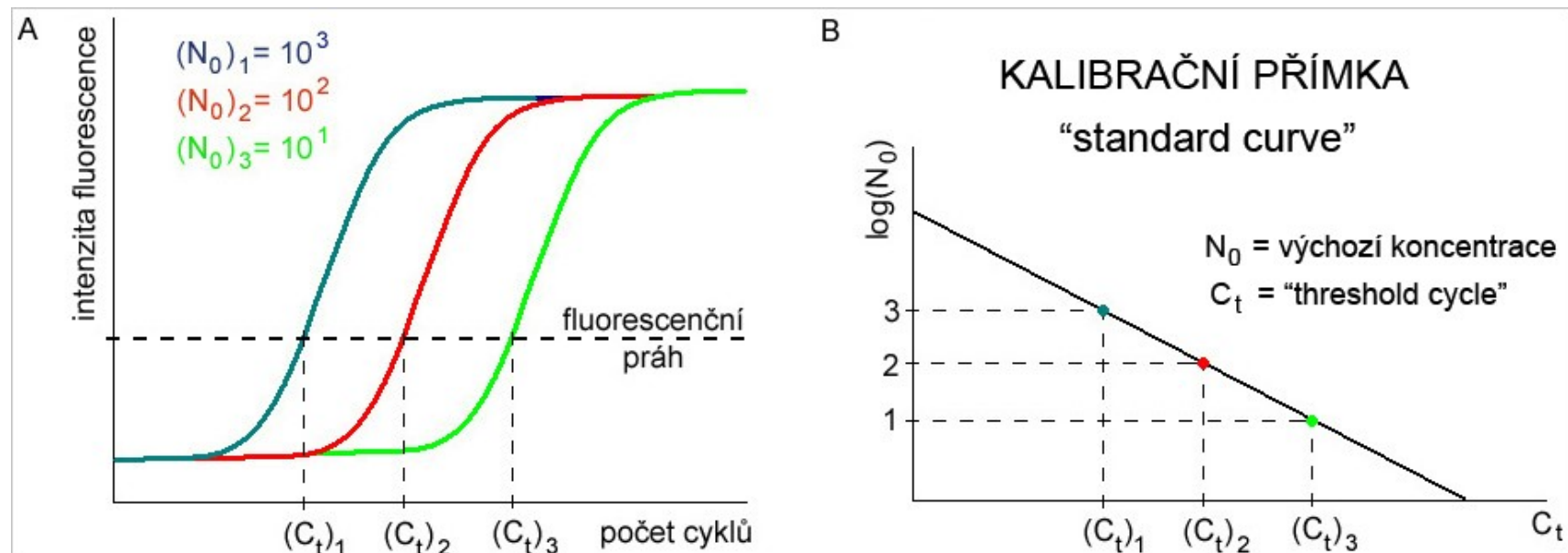


Relativní indukce exprese testovaného genu $10/2 = 5$

Kvantifikace – absolutní vs. relativní

Absolutní

- Přímou determinuje výchozí počet kopií cílových molekul (např. kopie ug/uL)
- Založena na existenci lineárního vztahu mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a C_T příslušné amplifikační křivky
- Amplifikuje se vzorek o neznámé koncentraci společně s diluční sérií **standardů** o známé koncentraci, vzniká **kalibrační přímka** (*standard curve*), ze které lze odečíst výchozí koncentraci neznámého vzorku
- Využití v detekci specifických mikroorganismů



Relativní

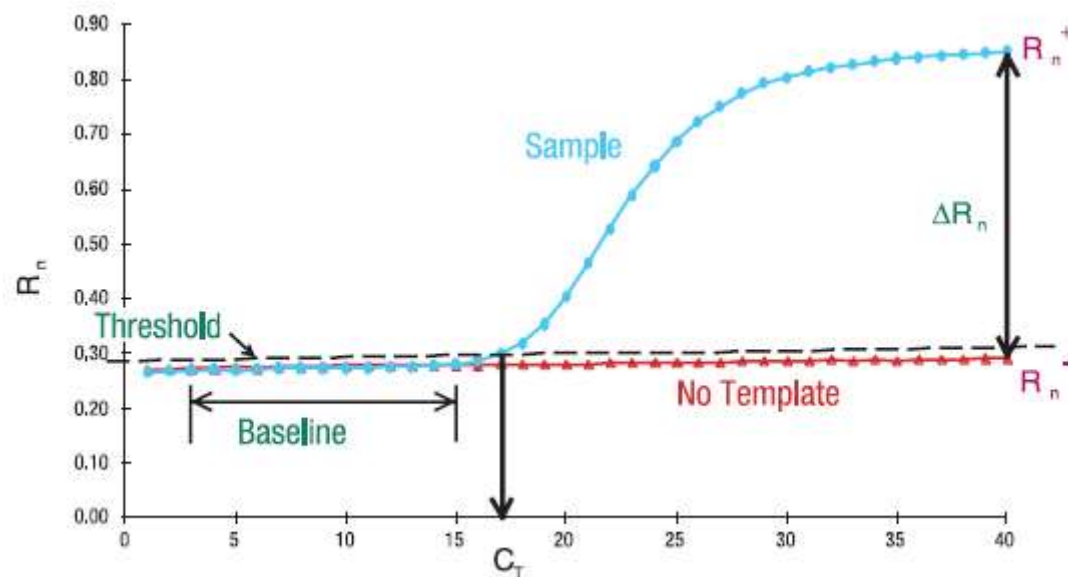
- Porovnává se relativní změna genové exprese (*relativní expresní poměr*) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku
- **CT amplifikační křivky daného genu se vždy normalizuje oproti CT housekeeping genu**
- Použití referenčního vzorku (endogenní, interní kontroly)
- Ideální pro stanovení míry genové exprese, zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky

Srovnávací

- Matematické stanovení
- Kalibrační vzorek použit jako 1 standard
- Ideální v případech, kdy stačí vyjádření v podobě poměrů, k ověřování trendů

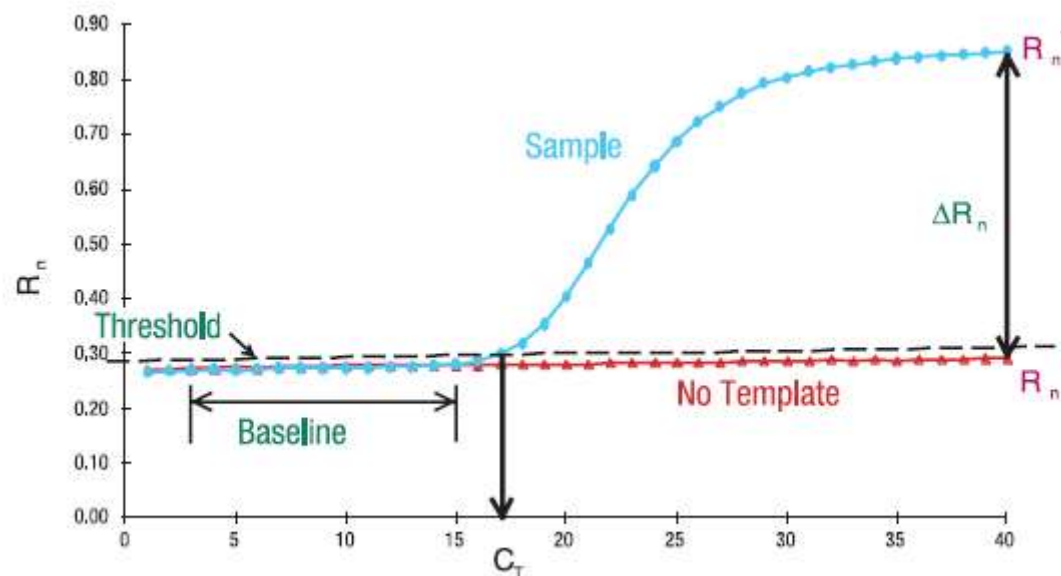
ΔR_n (Rn-baseline)

- **Rn+** je hodnota Rn reakce obsahující všechny komponenty, hodnota Rn- je hodnota Rn slepé (negativní, bez templátu, NTC) reakce (hodnoty baseline)
- **ΔR_n** hodnota představuje rozdíl mezi Rn+ a Rn-, zároveň je tedy indikátorem velikosti síly signálu tvořeného během PCR
- **ΔR_n** je vynášeno proti počtu cyklů PCR, čímž jsou tvořeny amplifikační křivky a stanoveny hodnoty CT



C_T (cycle of threshold)

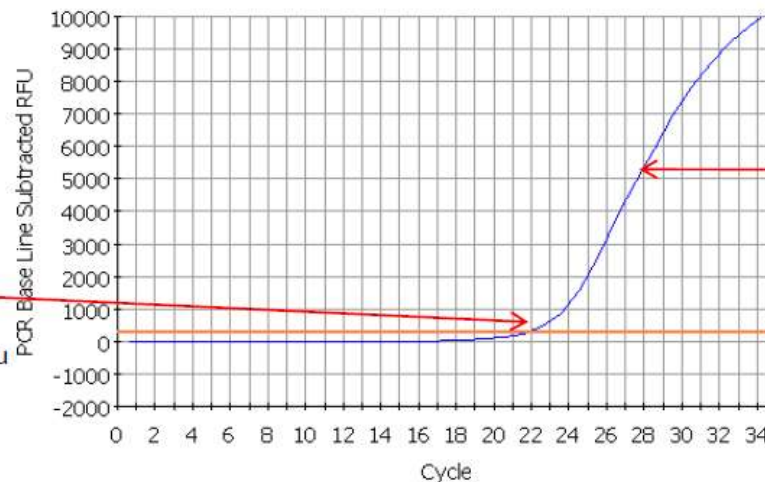
- **Threshold** – pozadí/práh detekce vznikající fluorescence (v místě protnutí amplifikační křivkou je definováno C_T)
- **Hodnota C_T** udává **cyklus**, ve kterém dojde **poprvé k významnému vzestupu ΔR_n** , což koreluje s počátečním množstvím templátu v reakci
- Základní parametr používaný v kvantifikaci
- Hodnota C_T nad 40 znamená žádnou amplifikaci a nemůže být použita k výpočtům pro kvantifikaci
- Teoreticky jediná kopie cílové molekuly by měla vytvořit C_T hodnotu 40 za předpokladu 100% efektivity reakce



Základní principy kvantifikace pomocí Real Time RT-PCR

Threshold Ct

-kvantitativní parametr množství mRNA ve vzorku
-čím menší Ct-tím větší množství mRNA

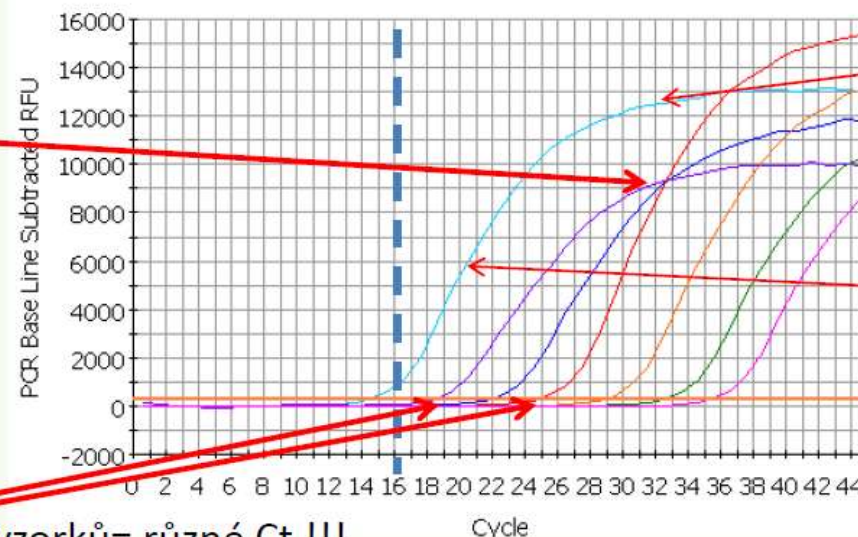


Křivka ukazující množství PCR produktu v „reálném čase“
-měří se v každém cyklu

Threshold (práh)-

nastaven automaticky nebo manuálně na začátku exponenciální fáze PCR

Stejná exprese vzorků na gelu !!!!!
-chyba !!!



Fáze „plató“ – PCR reakce již není kvantitativní !!!!

Fáze exponenciálního růstu PCR produktu

Různá exprese vzorků= různé Ct !!!

-real time přístup eliminuje chybu při kvantifikaci mRNA při RT-PCR

Zohlednění účinnosti (efektivity) PCR

- Přesnější kvantifikace
- 100% účinnost pouze v ideálních případech
- Účinnost přidání primerů, složení reakce, přítomnost PCR inhibitorů, enhancerů

CYKLUS (n)

100%	= 2.00x	→	reakce běží 2^n
90%	= 1.90x	}	reakce běží eff^n
80%	= 1.80x		
70%	= 1.70x		

Cyklus	Účinnost PCR reakce		
	100%	90%	80%
1	2	2	2
2	4	4	3
3	8	7	5
4	16	13	10
5	32	24	18
6	64	47	34
7	128	89	61
8	256	169	110
9	512	322	198
10	1024	613	357
11	2048	1164	642
12	4096	2213	1156
13	8192	4205	2082
14	16384	7990	3748
15	32768	15181	6746
16	65536	28844	12143
17	131072	54803	21859
18	262144	104127	39346
19	524288	197841	70823
20	1048576	375899	127482
21	2097152	714209	229468
22	4194304	1356998	413042
23	8388608	2578296	743477
24	16777216	4898762	1338258
25	33554432	9307649	2408865
26	67108864	17684534	4335958
27	134217728	33600614	7804725
28	268435456	63841168	14048506
29	536870912	121298219	25287310
30	1073741824	230466617	45517159

100 % = 2^{10}

Efektivita qPCR (%)

Účinnost reakce lze kalkulovat ze sklonu (slope) standardní křivky

- Je dána směrnici lineárního vynesení CT vůči logaritmu počtu kopií

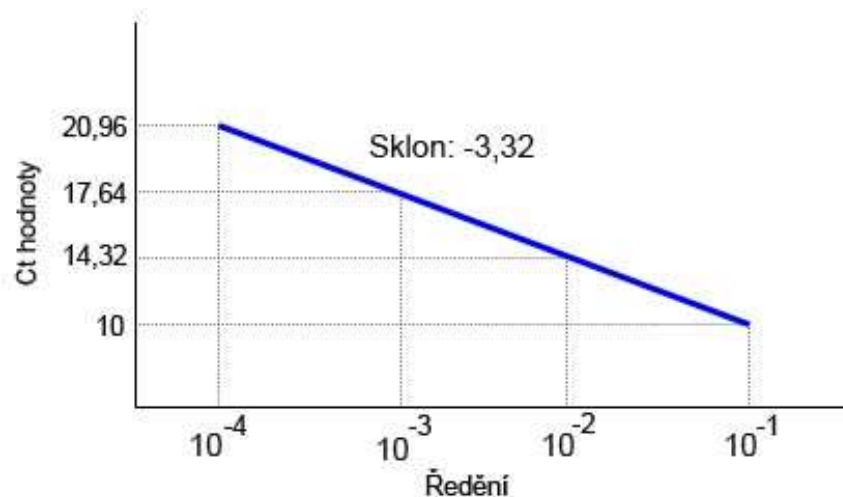
$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \text{ (x100 pro \%)}$$

- Exponenciální amplifikace:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{slope})}$$

- Efektivita reakce:

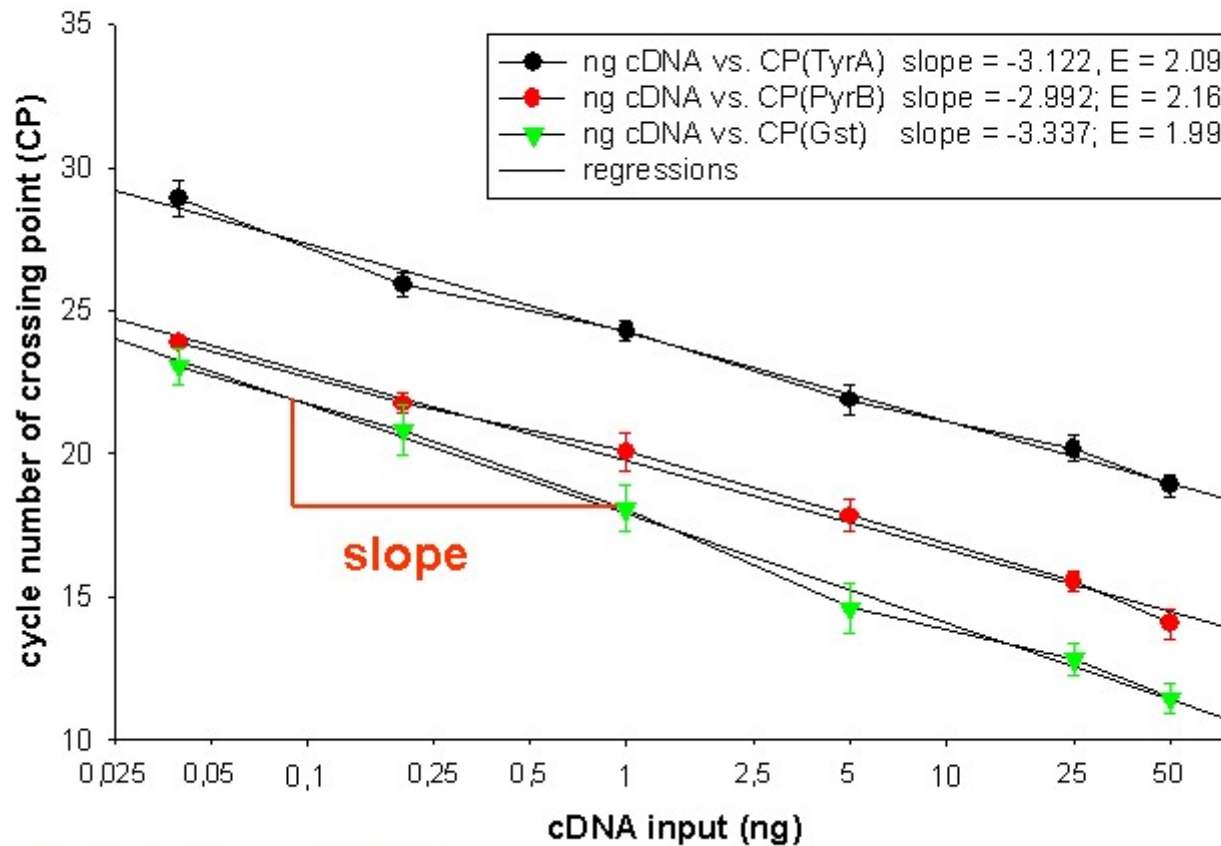
- 100% (2 kopie v každém cyklu) dělá směrnici -3,3219
- ideálně v rozmezí 90-110%



Slope	Amplification	Efficiency
-3.60	1.8957	0.8957
-3.55	1.9129	0.9129
-3.50	1.9307	0.9307
-3.45	1.9492	0.9492
-3.40	1.9684	0.9684
-3.35	1.9884	0.9884
-3.30	2.0092	1.0092
-3.25	2.0309	1.0309
-3.20	2.0535	1.0535
-3.15	2.0771	1.0771
-3.10	2.1017	1.1017

Efektivita v rozmezí 90 % až 110 % (-3,58 až -3,10)

Calculation of real-time PCR efficiency



Gene.Quantification@wzw.tum.de © 2002

Příklad: stanovení efektivity PCR pro referenční gen (Gst), analyzovaný gen 1 (TyrA) a 2 (TyrB).
Směrnice přímek vypočítány z CT (v průsečících s regresní přímkou) vůči počátečnímu množství DNA (průměr ze tří měření)

PFAFFLova metoda kvantifikace s kalkulací efektivity PCR

M.W. Pfaffl, Nucleic Acids Research 2001 29:2002-2007

AFTER 1 CYCLE

100% = 2.00x

90% = 1.90x

80% = 1.80x

70% = 1.70x

CYCLE	AMOUNT OF DNA 100% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 90% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 80% EFFICIENCY	AMOUNT OF DNA 70% EFFICIENCY
0	1	1	1	1
1	2	2	2	2
2	4	4	3	3
3	8	7	6	5
4	16	13	10	8
5	32	25	19	14
6	64	47	34	24
7	128	89	61	41
8	256	170	110	70
9	512	323	198	119
10	1,024	613	357	202
11	2,048	1,165	643	343
12	4,096	2,213	1,157	583
13	8,192	4,205	2,082	990
14	16,384	7,990	3,748	1,684
15	32,768	15,181	6,747	2,862
16	65,536	28,844	12,144	4,866
17	131,072	54,804	21,859	8,272
18	262,144	104,127	39,346	14,063
19	524,288	197,842	70,824	23,907
20	1,048,576	375,900	127,482	40,642
21	2,097,152	714,209	229,468	69,092
22	4,194,304	1,356,998	413,043	117,456
23	8,388,608	2,578,296	743,477	199,676
24	16,777,216	4,898,763	1,338,259	339,449
25	33,554,432	9,307,650	2,408,866	577,063
26	67,108,864	17,684,534	4,335,959	981,007
27	134,217,728	33,600,615	7,804,726	1,667,711
28	268,435,456	63,841,168	14,048,506	2,835,109
29	536,870,912	121,298,220	25,287,311	4,819,686
30	1,073,741,824	230,466,618	45,517,160	8,193,466

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}}$$

Testovaný gen
housekeeping

Ratio - udává relativní změnu exprese
(násobek změny exprese cílového
genu mezi *kontrolou* a *treatovaným*
(testovaným) vzorkem

E_{target} E_{ref} – efektivita PCR reakce vypočítaná
z kalibrační křivky

-je-li $E=2$ – ideální exponenciální množení
PCR produktu – **neexistuje !**

naproti tomu Delta-Delta metoda

$$\text{ratio} = 2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$$

- předpokládá 100% účinnost PCR reakce **E=2!!!!**

$$\text{Rozdíl } \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{target}} - \Delta\text{Ct}_{\text{referenční (housekeeping)}}$$

Pfafflova metoda kvantifikace

- Získanou hodnotu účinnosti PCR zahrneme při kvantifikaci srovnávaných vzorků

$$R \text{ (ratio)} = \text{Eff.}(\text{ref.})^{\text{CT}(\text{ref.})} / \text{Eff.}(\text{target})^{\text{CT}(\text{target})}$$

VZOREK	GEN	CT
Č.1 (UT)	GAPDH	17.37
	CYP1A1	30.78
Č.2 (TCDD)	GAPDH	16.91
	CYP1A1	18.9

Reference:

$$\text{Eff}_{\text{GAPDH}} = 1.89 \text{ (95\%)}$$

Target:

$$\text{Eff}_{\text{CYP1A1}} = 1.95 \text{ (98\%)}$$

$$R_1 = 1.89^{17.37} / 1.95^{30.78} = 0.000075$$

$$R_2 = 1.89^{16.91} / 1.95^{18.9} = 0.143$$

Z těchto výsledků můžeme konstatovat, že exprese genu CYP1A1 je u vzorku Č.2 1906x vyšší než u vzorku 1.

Relativní kvantifikace - vliv dioxinu na expresi genu *CYP1A1*

1. Na buněčnou linii LS180 byly aplikovány látky: DMSO (neg. ctrl), TCDD
2. Izolace celkové RNA a přepis do cDNA
3. qRT-PCR – studované geny *GAPDH* a *CYP1A1*

	GAPDH					CYP1A1												
	1	2	3	aver	SD	1	2	3	aver	SD	delta ct	SD delta	delt delt	SD delt	fold to UT	range		aver range
UT	17.4	17.33	17.37	17.37	0.04	30.68	30.76	30.89	30.78	0.11	13.4	0.11	0.0	0.11	1.00	1.08	0.93	0.11
TCDD	16.88	17.18	16.67	16.91	0.26	18.89	18.87	18.94	18.90	0.04	2.0	0.26	-11.4	0.26	2740.08	3278.55	2290.04	698.99

$$\Delta Ct_1 = Ct(\text{target 1}) - Ct(\text{ref 1})$$

$$\Delta Ct_2 = Ct(\text{target 2}) - Ct(\text{ref 2})$$

$$\Delta Ct_{TCDD} = Ct(\text{target CYP1A1}) - Ct(\text{ref GAPDH})$$

$$\Delta Ct_{UT} = Ct(\text{target CYP1A1}) - Ct(\text{ref GAPDH})$$

$$\text{Fold induction} = 2^{\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2}$$

$$\text{Fold induction} = 2^{\Delta Ct_{TCDD} - \Delta Ct_{UT}}$$



Děkuji za pozornost!