

## **REAL-TIME PCR – nowoczesna technika analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu**

**Joanna Romanek**

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,  
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

**R**eakcja łańcuchowa polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) jest oparta na klasycznej metodzie PCR, którą Kary Banks Mullis opracował w latach osiemdziesiątych (Mullis, 1990). Pozwoliło to naukowcom z całego świata na łatwą i szybką ilościową analizę amplifikowanego DNA (Ferdin i in., 2010). Technika real-time PCR łączy w sobie dwie ważne zalety: wysoką czułość reakcji oraz możliwość monitorowania ilości produktów PCR w każdym cyklu amplifikacji. Higuchi i in. w 1992 i 1993 r. opublikowali pierwsze prace na temat zastosowania techniki real-time PCR. Wykorzystali oni w badaniu bromek etydyny, którego intensywność fluorescencji po związaniu z nicią DNA wzrasta 20-krotnie w porównaniu do formy niezwiązanej. Prowadzenie reakcji w świetle UV w celu zobrazowania DNA oraz zastosowanie nagrywania kamerą video doprowadziło na początku lat 90. XX w. do narodzin metody real-time PCR (Valasek i Repa, 2005). Pierwsze urządzenie umożliwiające wykonanie analizy real-time PCR zostało skonstruowane przez firmę Applied Biosystems. Obecnie wiele firm oferuje w swojej sprzedaży różne specjalistyczne urządzenia do real-time PCR. Technika ta, inaczej zwana quantitative real time polymerase chain reaction (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR) lub kinetic polymerase chain reaction (KPCR) jest skuteczną metodą analizy ilości transkrypcji mRNA ze względu na powtarzalność i wysoką czułość, porównywalną z uzyskiwaną przy zastosowaniu konwencjonalnego PCR połączonego z metodą Southern blot (Espy i in., 2006). W oparciu o techniki fluorescencyjne metoda real-time PCR pozwala na ilo-

ściową ocenę produktów reakcji w każdym jej cyklu. Dzięki temu cała procedura analizy jest prosta, bardzo szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania produktu po zakończeniu reakcji. Analiza qPCR umożliwia pomiar ekspresji kilku genów w jednej próbce, przy jednoczesnym badaniu kilku do kilkunastu próbek (Nygard i in., 2007). Ze względu na bardzo niską stabilność termiczną RNA do analizy ekspresji metodą real-time PCR wykorzystuje się cDNA, uzyskane w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Technika real-time PCR stosowana jest także w celu weryfikacji wyników otrzymanych w efekcie zastosowania nowszych analiz, takich jak mikromacierze (Nashida i in., 2010; Zhang i in., 2010). Inną techniką, alternatywą dla reakcji qPCR, może być PCR konkurujący (competitive-PCR). W mieszaninie reakcyjnej umieszcza się DNA badane oraz DNA kontrolne o znanym stężeniu. W wyniku konkurowania o reagenty ilość produktu DNA kontrolnego jest odwrotnie proporcjonalna do ilości DNA badanego w próbce. Umożliwia to obliczenie ilości cząsteczek matrycy z dokładnością, na jaką nie pozwala nawet metoda real-time PCR (Zentilin i Giacca, 2010).

Analiza ilościowa poziomu ekspresji genu oparta jest na wykorzystaniu kontroli endogennych. Kontrola endogenna zwana jest inaczej genem referencyjnym lub kontrolą wewnętrzną. Gen mogący pełnić funkcje genu referencyjnego, tzw. „housekeeping gene”, ulega transkrypcji w danej tkance na stałym i niezmiennym poziomie. Najczęściej stosowanymi kontrolami endogennymi są geny, pełniące ważne i podstawowe funkcje w komórce (Jura i in., 2006). Dzieląc

poziom ekspresji transkryptu, uzyskany dla badanego genu, przez poziom RNA kontroli endogennej otrzymujemy znormalizowaną wartość, niezależną od wyjściowej ilości dodanej do analizy matrycy. Wybór genów mogących pełnić funkcje kontroli wewnętrznej jest bardzo duży. Najczęściej stosowanymi kontrolami są geny: *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfo-glicerynowego) i *β-aktyna*. Geny te, tak powszechnie wykorzystywane, nie zawsze dają jednak zadowalające wyniki. Jak donoszą Dheda i in. (2004) *β-aktyny* i *GAPDH* w porównaniu z innymi badanymi kontrolami endogennymi nie wykazywały się ekspresją na stałym poziomie w analizowanych tkankach. O niestabilności *GAPDH* wspominają także McCurley i Callard (2008) oraz Wang i in. (2006). Obecnie prowadzone są liczne badania dotyczące doboru najbardziej odpowiedniej kontroli endogennej w zależności do rodzaju tkanki, w której analizowana jest ekspresja. Wyniki uzyskane przez Piórkowską i in. (2010) wykazały, że w tkance tłuszczowej najwyższą stabilnością charakteryzują się takie geny, jak *OAZ1* (ornithine decarboxylase antizyme) oraz *RPL27* (60S ribosomal protein L27). Z kolei, w tkance żołądka dodatkowo wysoką stabilnością wyróżnia się gen *RPS29* (Ribosomal Protein S29) (Oczkowicz i in., 2010). Dlatego, należy każdorazowo dobrać adekwatną kontrolę endogenną do badanego genu oraz do tkanki, z której mRNA zostało wyizolowane. Wybór wysokiej jakości genów referencyjnych ma zasadnicze znaczenie dla interpretacji uzyskanych wyników.

Do detekcji ilości kopii cDNA w badanych próbkach w technice real-time PCR wykorzystuje się cząsteczki wiążące się do specyficznej lub niespecyficznej sekwencji. Detektorami niespecyficznymi są substancje, które po związaniu z dwuniciowym DNA emitują światło o określonej długości fali, są nimi m.in. SYBR Green I, bromek etydyny oraz jodek propidyny. Metoda ta jest tańsza, jednakże ze względu na brak konieczności występowania specyficznej sekwencji DNA obarczona jest największym błędem pomiarowym (Espy i in., 2006).

Detektorami specyficznymi są sondy fluorescencyjne, które w swojej budowie zawierają cząsteczki fluorochromu. Analiza pomiaru ilości kopii mRNA charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Najczęściej wykorzystywane są sondy typu TaqMan, „latarnie

molekularne” (molecular beacons) oraz sondy hybrydazyjnego typu FRET. Metody detekcji oparte są na zjawisku transferu energii rezonansu fluorescencji FRET (fluorescence resonance energy transfer). Cząsteczka fluorochromu, absorbująca określoną długość fali (reporter), przenosi energię na inny fluorochrom, który emituje światło o innej długości fali niż fala zaabsorbowana lub dochodzi do wygaszenia emisji przez związek wygaszający (Espy i in., 2006). Użycie fluorochromów emitujących fale o różnej długości umożliwia jednoczesne wykrywanie kilku sekwencji w jednej próbce. Sonda TaqMan jest to krótki odcinek DNA wyznakowany cząsteczką fluorescencyjną na końcu 5' oraz związkiem wygaszającym na końcu 3'. Aby wzbudzić emisję światła cząsteczka reportera musi zostać oddzielona od wygaszacza. W tym celu stosuje się polimerazę DNA posiadającą aktywność egzonukleazy 5' → 3', która wydłużając nić DNA degraduje od końca 5' związaną z nią sondę (Livak i in., 1995). Sondy typu TaqMan znakowane są najczęściej barwnikami fluorescencyjnymi VIC, FAM, NED, TAMRA albo ROX. „Latarnie molekularne” (molecular beacons) są to sondy zbliżone w budowie do sond TaqMan. Posiadają wygaszacz na końcu 3' i reporter na końcu 5', jednak do ich wzbudzenia polimeraza nie jest wymagana. Sondy te są dłuższe oraz posiadają regiony komplementarne do siebie na końcach 5' i 3', przez co w formie nie związanej z nicią DNA tworzą strukturę „szpilki do włosów”, w której reporter i wygaszacz znajdują się blisko siebie. W trakcie działania warunków denaturujących sonda TaqMan wiąże się z pojedynczą nicią DNA, w wyniku czego traci swoją strukturę 2-rzędową. Koniec 3' oddalony jest od 5' i emisja fali fluorescencyjnej reportera nie jest zaburzana. Sondy hybrydazyjne typu FRET zbudowane są z dwóch krótkich fragmentów DNA. Jedna cząsteczka wyznakowana jest fluorochromem na końcu 5', druga natomiast na końcu 3'. Kiedy obie sondy przyłączą się do nici DNA w niewielkiej odległości od siebie, może zostać zainicjowana reakcja FRET. Wyniki uzyskane po użyciu takiej sondy są najdokładniejsze, ponieważ muszą być rozpoznane przez dwie sekwencje położone w swoim bliskim sąsiedztwie (Espy i in., 2006).

Sekwencje sond, jak i starterów do analizy real-time PCR można uzyskać z licznych

publikacji lub zaprojektować, wykorzystując specjalistyczne oprogramowanie, takie jak np. Primer Express v. 3.0 (Applied Biosystems), w oparciu o sekwencje znajdujące się w genetycznych bazach danych NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) lub Ensemble. Sondy oraz startery dostępne są również w firmie Applied Biosystems w postaci gotowych do użycia TaqMan® Gene Expression Assay.

Reakcja real-time PCR przeprowadzana jest najczęściej na płytkach 96-dołkowych. Standardowa mieszanina reakcyjna – 50 µl zawiera: 25 µl TaqMan Universal PCR Master Mix, po 5 µl każdego startera (stężenie 50–900 nM), 5 µl sondy (250 nM), 5 µl cDNA (10–100 ng) oraz 5 µl wody (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems). Przed analizą ekspresji genu należy wykonać krzywe kalibracyjne. Jedną z badanych próbek rozcieńcza się, kolejno 10-, 100-, 1000- i 10 000-krotnie, zarówno dla badanego genu, jak i dla kontroli endogennej. Z wyników otrzymanych po analizie wyznacza się wzór krzywej, co umożliwia dokładne określenie wydajności reakcji. W początkowych cyklach reakcji ilość DNA wzrasta w ilości 2-krotnej na cykl i dzieje się tak aż do osiągnięcia fazy plateau, w której następuje zahamowanie reakcji wskutek wykorzystania lub dezaktywacji substratów, takich jak 2'-deoksyadenozynotrójfosforany (dNTPy), polimeraza, startery lub działania inhibitorów. W przypadku, gdy sygnał fluorescencyjny reportera wzrasta do wykrywalnego poziomu, zostaje on przechwycony i wyświetlony jako „wykres amplifikacji” (amplification plot). „Wykres amplifikacji” zawiera w sobie informacje na temat ilości DNA lub RNA. Z kolei „linia bazowa” (baseline) odpowiada sygnałowi fluorescencji emitowanemu przez tło w pierwszych cyklach reakcji PCR jeszcze przed wykryciem amplifikacji produktu. Powyżej linii bazowej emisja barwnika fluorescencyjnego traktowana jest jako sygnał z amplifikacji. W celu wykonania wewnętrznej kalibracji aparatu wykorzystujemy tzw. znormalizowany reporter (Rn). Jest to stosunek intensywności fluorescencji barwnika reporterowego do intensywności fluorescencji barwnika pasywnego (ROX – odnośnik fluorescencji dla aparatu). Linia bazowa nie jest na

stałym poziomie dla wszystkich badanych próbek. W celu standaryzacji wykresu amplifikacji od znormalizowanego reportera odejmuje się wartość linii bazowej. Uzyskana w ten sposób wartość delta Rn ( $\Delta Rn$ ) wykorzystywana jest do dalszych obliczeń. Prosta odcinająca szumy, czyli linia progowa, jest to poziom  $\Delta Rn$  ustalany powyżej linii bazowej w celu wyznaczenia wartości Ct. Linia progowa ustawiana jest w fazie wykładniczego wzrostu reakcji w celu dokonania najbardziej dokładnego odczytu dla wszystkich badanych próbek. Cykl, w którym dana próbka osiągnie poziom linii progowej, jest nazywany cyklem progowym – Ct (ang. Cycle Threshold). Wartość Ct jest logarytmowana i stosowana bezpośrednio (metoda porównawcza Ct) lub pośrednio do analiz ilościowych. Analizę wykonuje się zwykle w trzykrotnym powtórzeniu, a następnie wyniki uśrednia. Liczbę kopii genu oznaczamy poprzez podstawienie uzyskanego pomiaru Ct do krzywej standardowej. Wartość mnożymy przez wydajność reakcji (tak samo dla kontroli endogennej), a następnie dzielimy uzyskany wynik dla genu badanego przez kontrolę endogenną. W ten sposób uzyskujemy znormalizowane wartości, które następnie można porównywać ze sobą.

## Podsumowanie

Real-time PCR szybko stał się nieodłączną metodą szeroko wykorzystywaną w diagnostyce molekularnej (Wang i in., 2006). Powszechnie stosowana jest również do określania poziomu ekspresji genów, istotnych dla metod wspomaganego rozrodu (Lipiński i in., 2003; Opiela i in., 2008, 2010; Skrzyszowska i in., 2006). Technika ta jest bardzo czuła oraz pozwala na jednoczesną analizę ilości ekspresji kilku próbek.

Dodatkowo, wygenerowane przez oprogramowanie wyniki, uzyskane z różnych doświadczeń, można zestawiać i porównywać ze sobą. Technika ta nie jest jednak bez wad. Dokładność wyników zależy w dużej mierze od wykorzystanych sond oraz kontroli endogennych. Wadą analizy jest stosunkowo wysoka cena sprzętu używanego do reakcji qPCR.

## Literatura

- Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37: 112–119.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 165–256.
- Ferdin J., Cerar T., Strle F., Ruzić-Sabljić E. (2010). Evaluation of real-time PCR targeting hbb gene for *Borrelia* species identification. *J. Microbiol. Methods*, 82: 115–119.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413–417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026–1030.
- Jura J., Węgrzyn P., Jura J., Koj A. (2006). Regulatory mechanisms of gene expression: complexity with elements of deterministic chaos. *Acta Biochim. Pol.*, 53: 1–10.
- Lipiński D., Jura J., Kalak R., Pławski A., Kala M., Szalata M., Jarmuz M., Korcz A., Słomska K., Jura J., Gronk P., Smorag Z., Pieńkowski M., Słomski R. (2003). Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J. Appl. Genet.*, 44: 165–174.
- Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.*, 4: 357–362.
- McCurley A.T., Callard G.V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol. Biol.*, Nov 12; 9: p. 102.
- Mullis K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Amer.*, 262: 56–61, 64–65.
- Nashida T., Sato R., Imai A., Shimomura H. (2010). Gene expression profiles of the three major salivary glands in rats. *Biomed. Res.*, 31: 387–399.
- Nygard A.-B., Jørgensen C.B., Cirera S., Fredholm M. (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.*, Aug 15; 8: p. 67.
- Oczkowicz M., Różycki M., Piórkowska K., Pieszczyńska-Kajtoch A., Rejduch B. (2010). A new set of endogenous reference genes for gene expression studies of porcine stomach. *J. Agricult. Food Sci.*, 19: (4): 570–576.
- Opiela J., Kątska-Książkiewicz L., Lipiński D., Słomski R., Bzowska M., Ryńska B. (2008). Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, 69: 546–555.
- Opiela J., Lipiński D., Słomski R., Kątska-Książkiewicz L. (2010). Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim. Reprod. Sci.*, 118: 188–193.
- Piórkowska K., Oczkowicz M., Różycki M., Ropka-Molik K., Pieszczyńska-Kajtoch A. (2010). Novel porcine housekeeping genes for real-time RT-PCR experiments normalization in adipose tissue: Assessment of leptin mRNA quantity in different pig breeds. *Meat Sci.*, 87 (3): 191–195.
- Skrzyszowska M., Smorag Z., Słomski R., Kątska-Książkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipiński D., Szalata M., Pławski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pieńkowski M. (2006). Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod.*, 74: 1114–1120.
- Valasek M.A., Repa J.J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 29: 151–159.
- Wang Y., Barbacioru C., Hyland F., Xiao W., Hunkapiller K.L., Blake J., Chan F., Gonzalez C., Zhang L., Samaha R.R. (2006). Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*, Mar 21; 7: p. 59.



Zentilin L., Giacca M. (2010). The renaissance of competitive PCR as an accurate tool for precise nucleic acid quantification. *Methods Mol. Biol.*, 630: 233–248.

Zhang Z., Xu J., Sheng Z., Sui Y., Palli S.R. (2010). Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *J. Biol. Chem.* (w druku), doi: 10.1074/jbc.M110.191684.

Do przygotowania niniejszego opracowania wykorzystano również materiały szkoleniowe oraz informacje podawane przez producentów sprzętu do real-time PCR.

## REAL-TIME PCR – THE MODERN TECHNIQUE FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS AT THE TRANSCRIPT LEVEL

### Summary

Real-time PCR is a technique which was developed in the early nineties of the twentieth century. However, despite that fact, this method quickly became an integral part of molecular diagnostics.

The aim of this article was to explain in an approachable way the principles of real-time PCR reaction including advantages and disadvantages of the method.



Relikty gospodarki leśnej nad Czarną Hańczą – pozostałości po starej XVII-wiecznej smolarni w Studzianym Lesie

*Relics of forest management on the Czarna Hańcza river – remains of an old 17th-century wood tar factory in Studziany Las*

(fot. D.D.)

