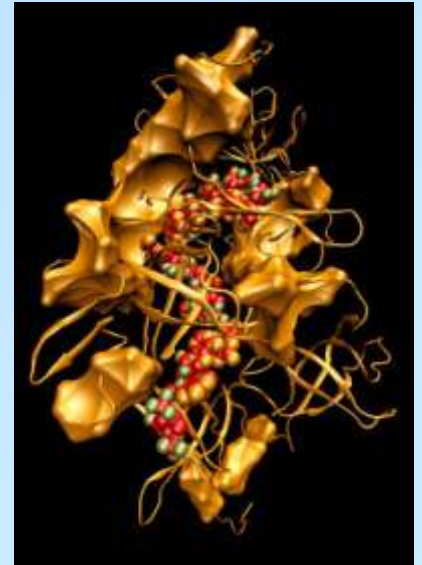


Metody studia genové exprese

Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Laboratoř vývojové biologie

nemcova@iapg.cas.cz



Transkriptom

Genová exprese:

Geny jsou exprimovány tehdy, jsou-li přepsány do RNA (mRNA).

Rozdílná genová exprese:

typ buňky, orgánu, daný časový úsek, buněčný cyklus, životní období organismu

Změny v genové expresi:

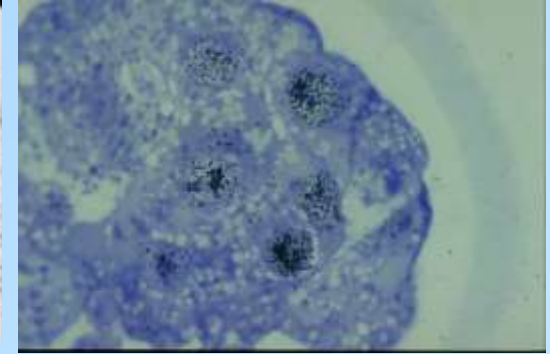
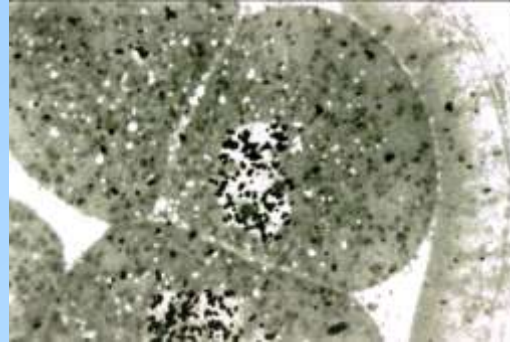
Experimentální podmínky, změny prostředí, léky...

Realizace genové exprese – překlad do proteinu a jeho funkční stav.

Detekce a kvantifikace mRNA, které kódují specifický protein

AUTORADIOGRAFIE in situ

celková úroveň transkripce



HYBRIDIZAČNÍ METODY

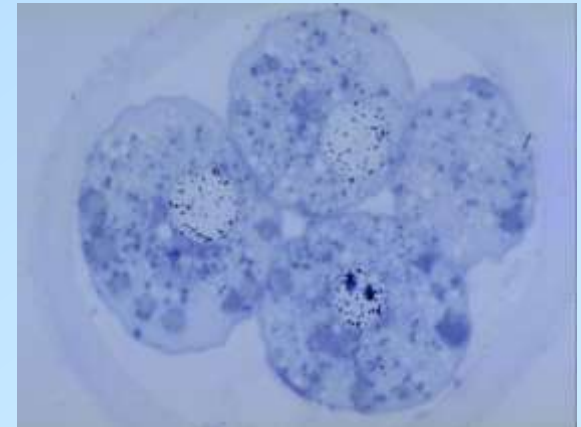
NORTHERN BLOT ANALÝZA

hybridizace na nosiči se separovanou molekulou

RPA – ribonuclease protection assay

hybridizace ve směsi

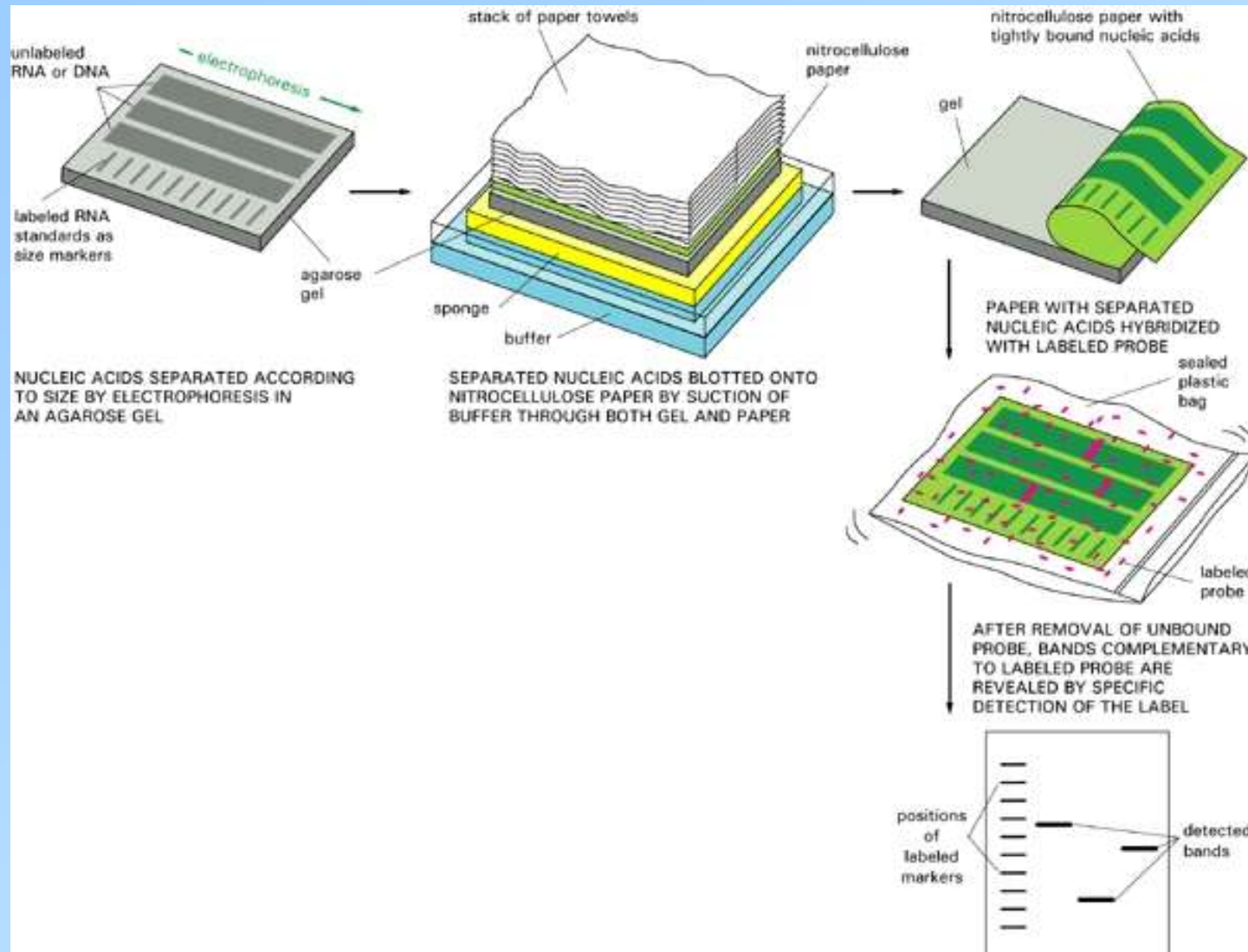
FISH – in situ přímo v buňce



PCR semikvantitativní RT-PCR

kvantitativní RT-PCR (**qRT-PCR**), real-time RT-PCR

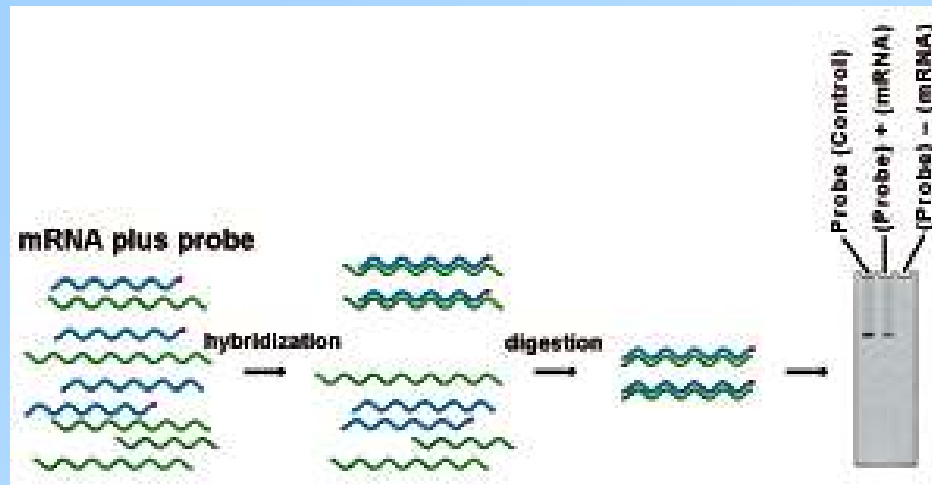
Northern a southern blot analýza



RPA

Sonda

je připravena in vitro-transkripcí z DNA úseku naklonovaného ve vektoru



Nejprve hybridizace, pak kvantifikace

- denaturační gelová elektroforéza, hybridizace (+ autoradiografie....)

Použití :

kvantifikace mRNA

mapování konců mRNA – alternativní splicing

určení pozic intronů

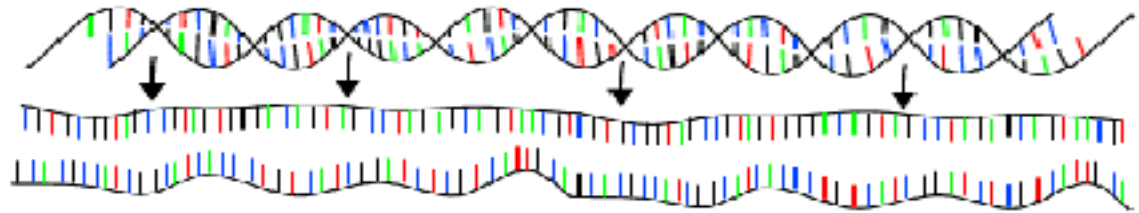
SNP

Vysoce specifické, náročné na čas

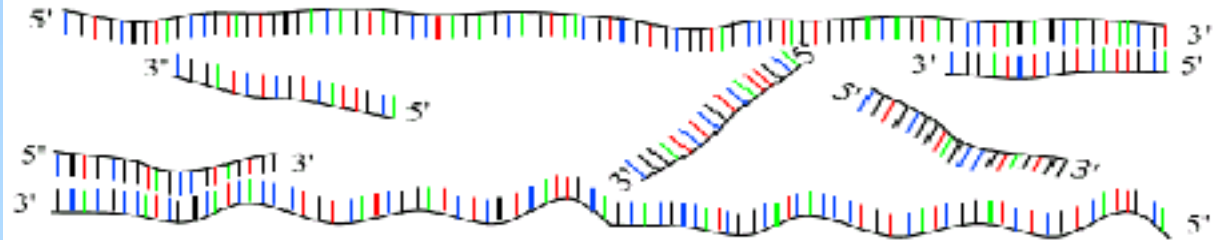
Průběh PCR

polymerase chain reaction

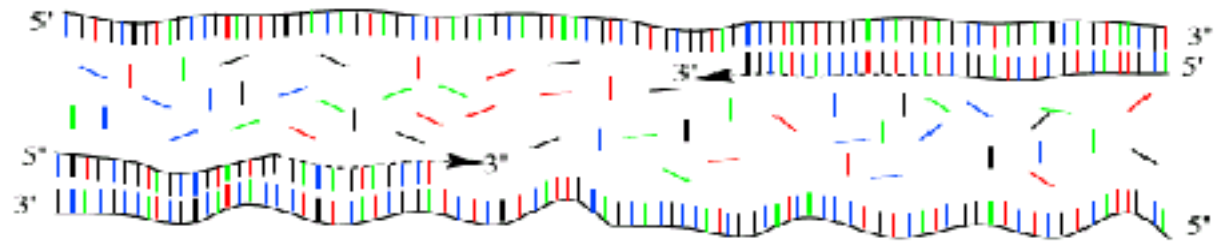
1. krok - denaturace



2. krok – navázání
primerů



3. krok - extenze



Semikvantitativní RT + PCR (RT-PCR)

A. Počáteční amplifikace — two tubes, one-tube

B. Post-PCR analýza (end-point) amplifikovaného produktu

Gelová elektroforéza

- a) Densitometrie
- b) Přenos na membránu



Hybridizace se značenou sondou (většinou celá či parciální cDNA sekvence obsahující inkorporované značené nukleotidy (radioaktivně- ^{32}P či ^{33}P , biotin))

Po odmytí nespecifického značení je signál detekován expozicí na X-ray film či Fuji film a vyhodnocen (na Bas 2500 + SW, streptavidin-křenová peroxidáza)

Real-time detekce amplifikovaných produktů

Real-time - 1-stupňový proces

PCR amplifikace se souběžně prováděnou detekcí během každého cyklu

Základem real-time amplifikace:

Mezi počátečním množstvím templátu a množstvím vznikajícího produktu během exponenciální fáze amplifikace existuje kvantitativní vztah.

Real-time systémy jsou založené na kvantifikaci fluorescenčního signálu

Real-time chemistry

Používané substráty lze zařadit do skupin:

a) nespecifické - nespecificky se vážou na dvouvláknovou DNA - *SYBR GreenI*

Interkalační
barvy

b) specifické - sondy - ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu

Duálně značené
proby

FRET proby

Molecular
beacons

c) samosvítící primery

Amplifluor

Molecular
Scorpions

Pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor - F nebo R) a zhášečem (quencher - Q).

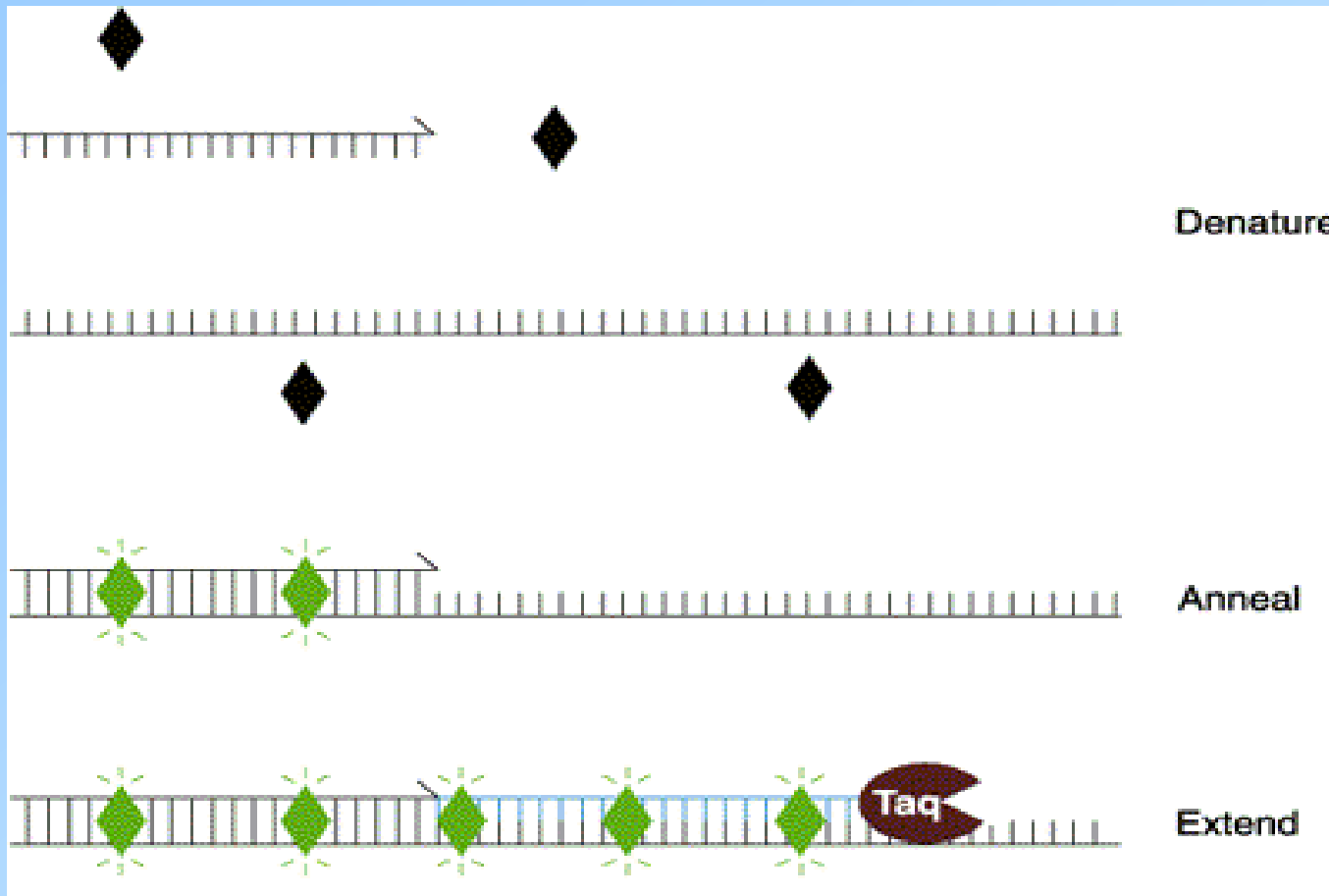
Interkalační (SYBRGreen I)



fluorescenční barva, váže se na dsDNA (citlivost je 25x větší než u EtBr)

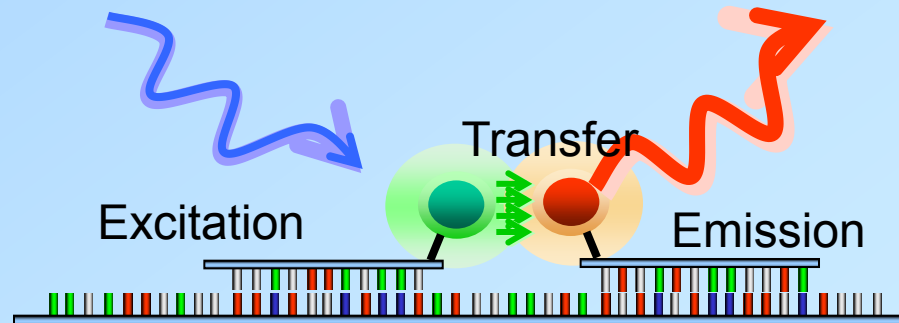
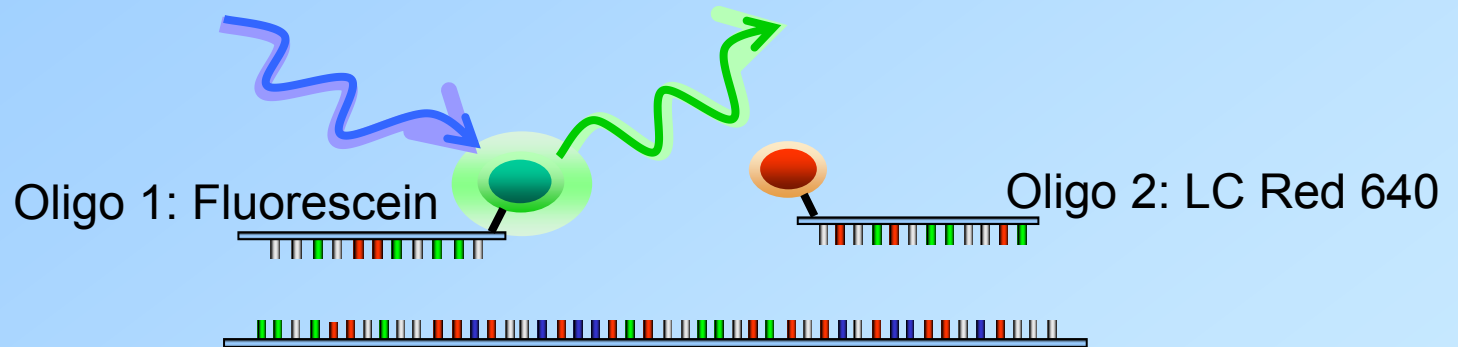
- **nízké počáteční fluorescenční pozadí**
- **po navázání do řetězce vysoký nárůst fluorescence (intenzita signálu odpovídá množství dsDNA)**
- **snadné použití- není potřeba navrhovat složité sondy**
- **umožňuje provedení melting analýzy amplifikovaných produktů**
- **není sekvenčně specifická - umožňuje použití pro nejrůznější templáty**
- **nelze použít pro multiplex analýzy**

SYBRGreenI -mechanismus



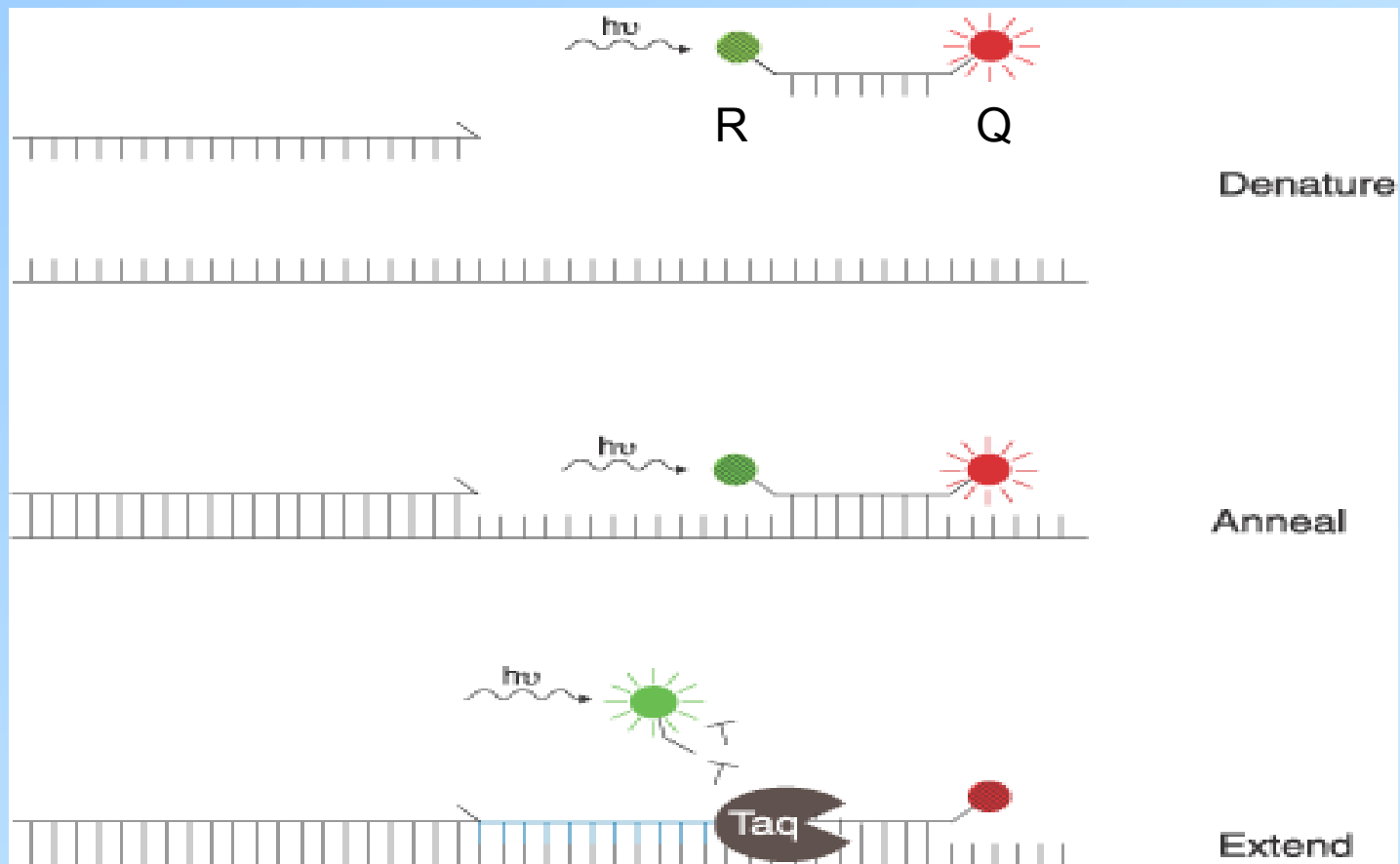
Jednoduše značené FRET sondy

hybridizační sondy

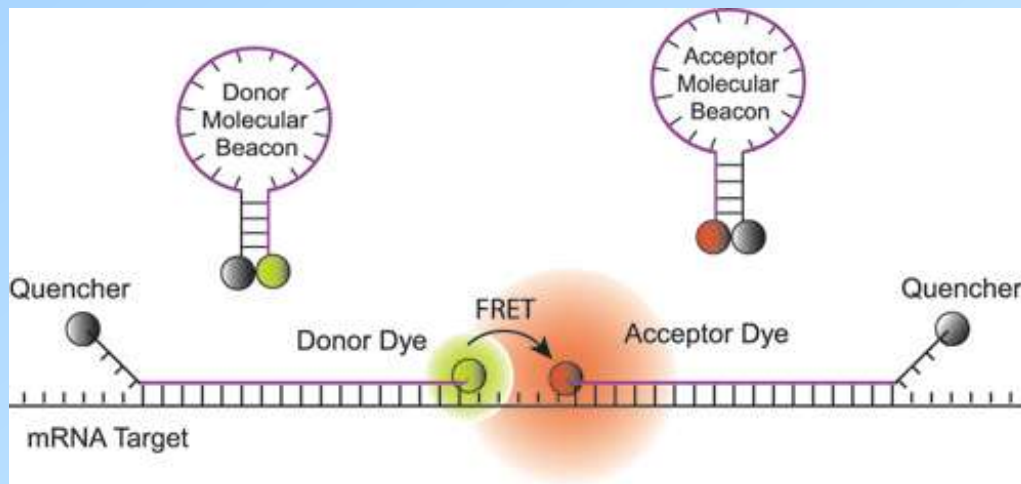
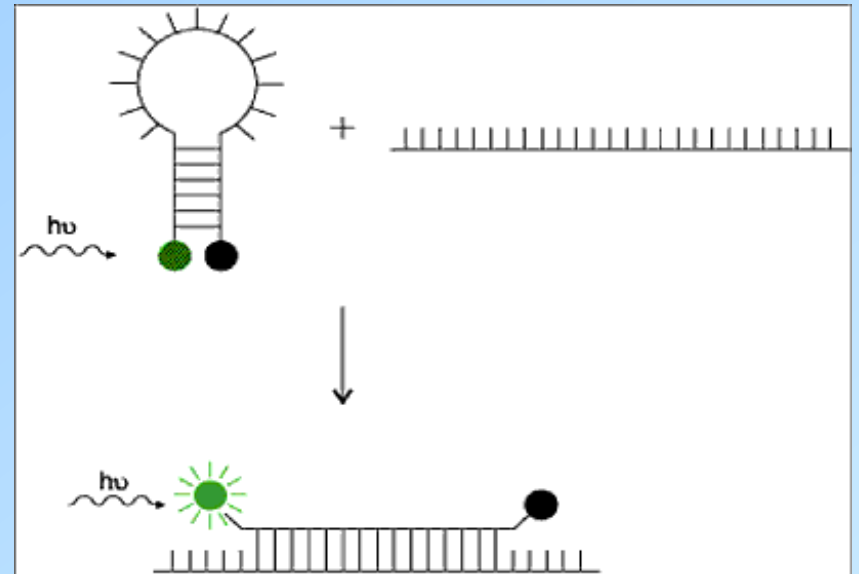
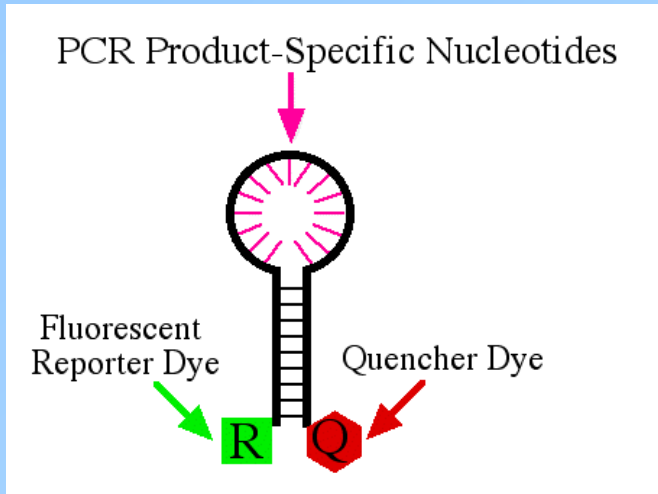


Dvojitě značené sondy (Taqman™ probes)

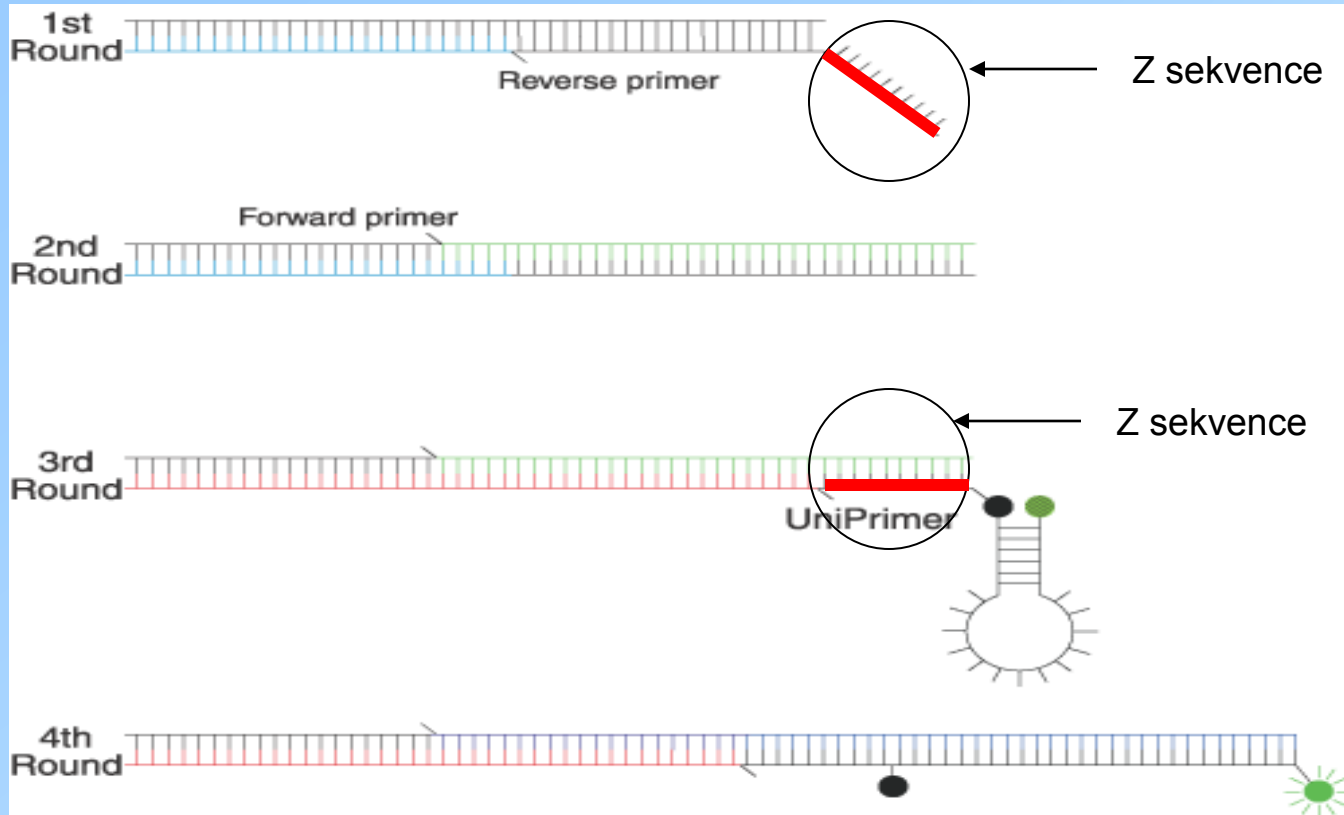
Hydrolyzační sondy



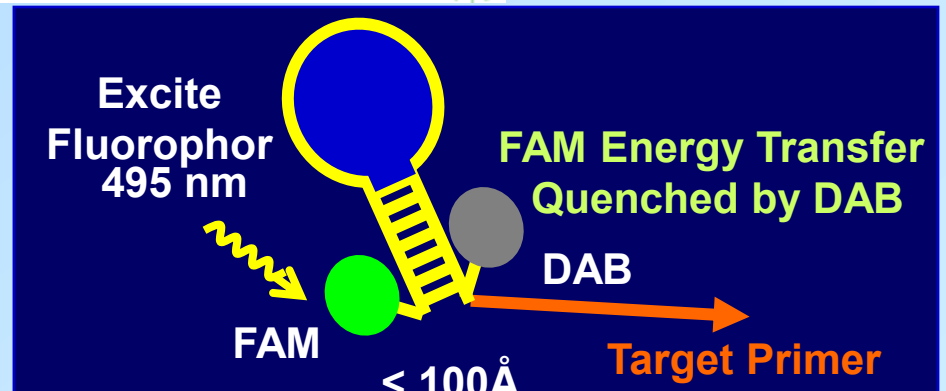
Molecular beacons



Fluorescenční primery

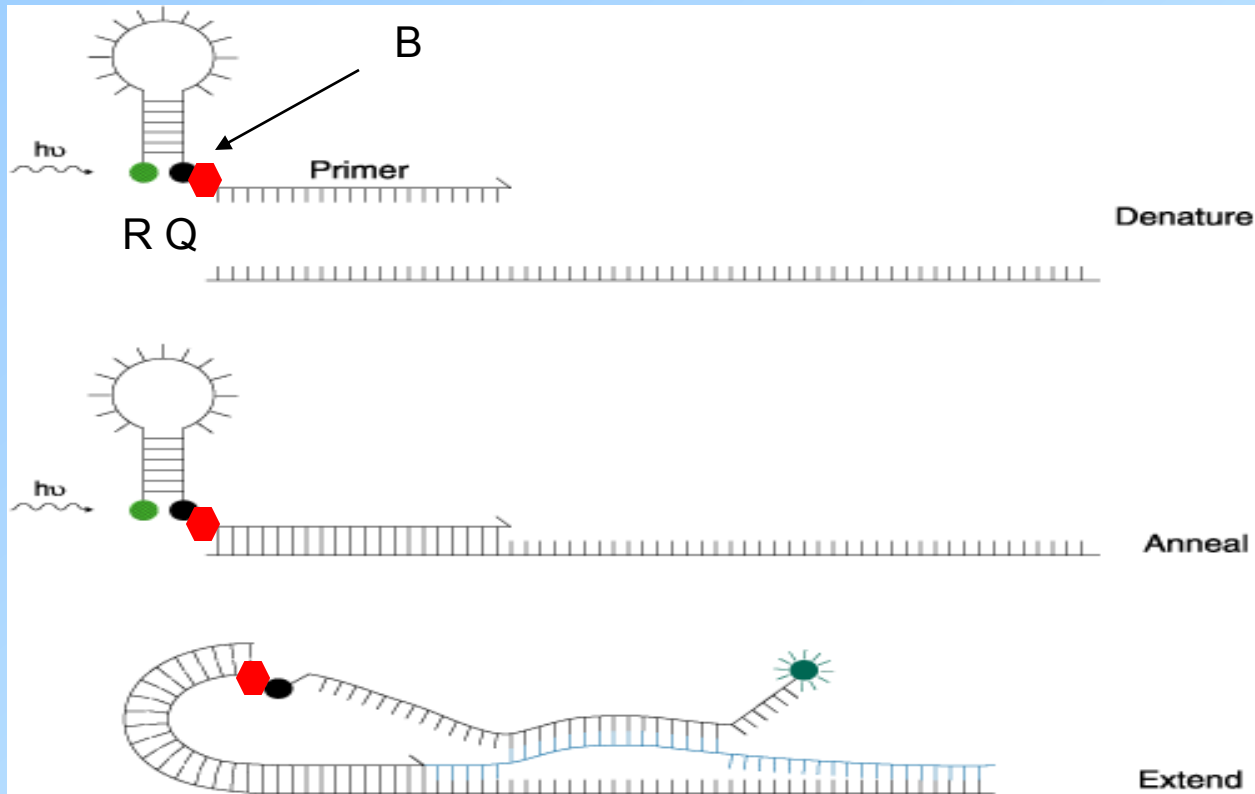


Amplifluor™



Molecular scorpions

(scorpion primers™, sunrise primers™ and lux primers)™



Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Absolutní absolutní standardní křivka

- zjištění přesného množství kopií teplátu ve vzorku
- výsledek v kopiích na množství celkové RNA

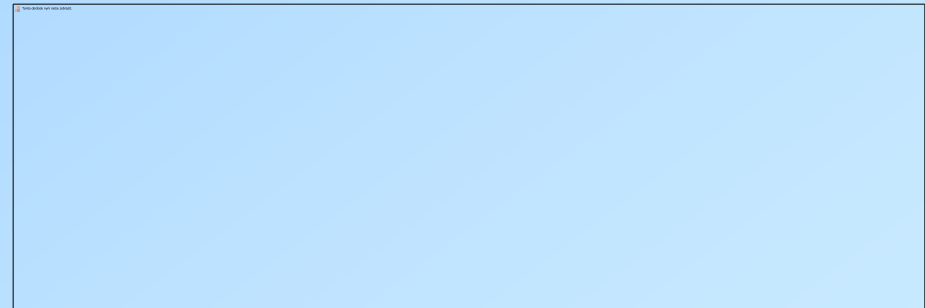
počet buněk

množství vzorku....

vhodný referenční gen (house-keeping gene)

- interní

- externí



Relativní relativní standardní křivka

- zjištění změn množství teplátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole - kalibrátor
 - komparativní C_T metoda
- nevyžaduje standardní křivku, výsledků dosáhováno výpočtem
 - multiplex
- více primerových páru v jedné zkumavce (jeden primerový pár amplifikuje endogenní kontrolu, ostatní sledované geny)

Absolutní kvantifikace

absolutní stand. křivka

Předpoklady a podmínky:

- **nezávisle změřená koncentrace standardu (plazmidové DNA či in vitro transkribované RNA)**

koncentrace je změřena prostřednictvím A_{260} a převedena na počet kopií dle molekulové hmotnosti DNA či RNA

- **standard musí být nekontaminovaný cizorodou NA (plazmidy z E.coli !)**
- **přesné pipetování- ředění standardů přes několik řádů (10^6 - 10^{12})**
- **stabilita standardu**
- **není možné použít DNA jako standard pro absolutní kvantifikaci RNA-
chybí kontrola efektivity reverzní transkripce**

Relativní kvantifikace

relativní stand. křivka

Kvantita je vyjadřována ve vztahu k nějakému zákl.vzorku- kalibrátor.

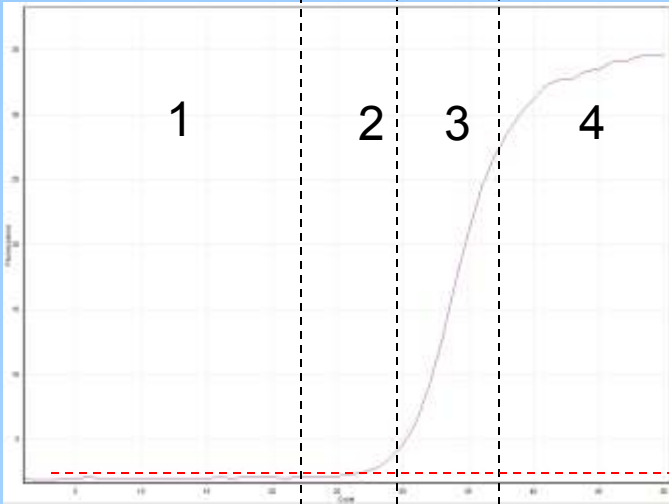
Množství experimentálních vzorků jsou stanovena ze standardní křivky a vydělena cílovým množstvím kalibrátoru. Kalibrátorem se stává jeden ze vzorků a množství ostatních je vyjádřeno jako n- násobné ve vztahu ke kalibrátoru.

Není nutné znát koncentraci standardu, stačí jakákoliv zásobní cílová NA.

Předpoklady a podmínky:

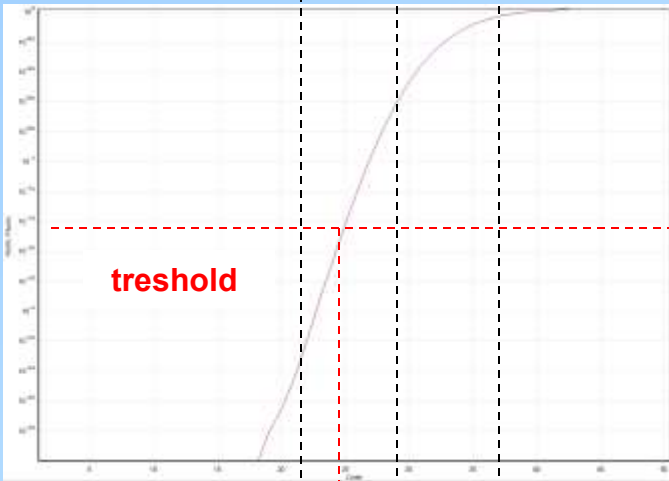
- **přesné ředění zásobní NA**
- **je možné použít DNA pro relativní kvantifikaci RNA (za předpokladu stejné efektivity reverzní transkripce mezi vzorky)**

fluorescence



- 1 skrytá fáze
- 2 exponenciální
- 3 lineární
- 4 plateau

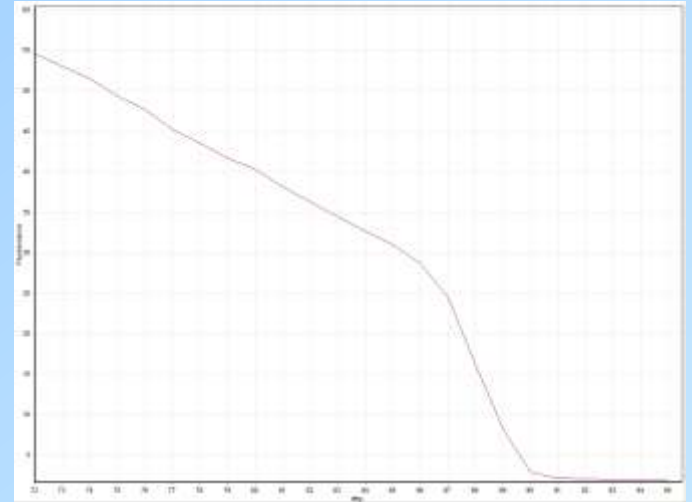
norm. fluorescence



Ct

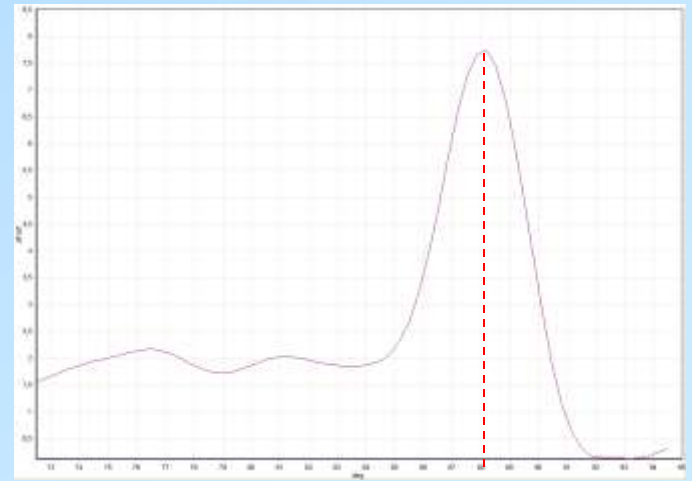
cykly

100% efektivita..... 2^n kopií



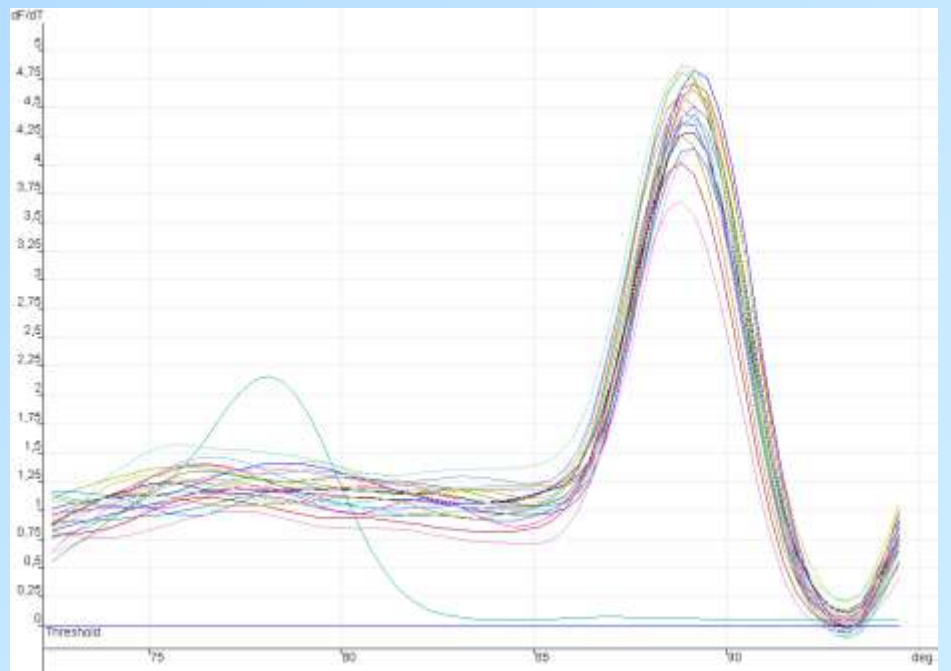
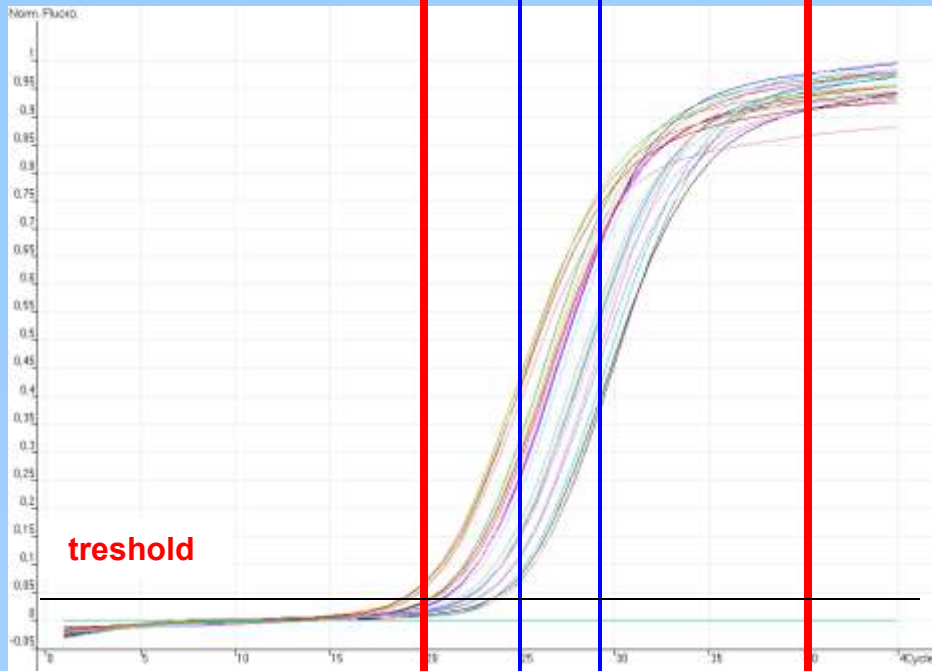
Melting analýza

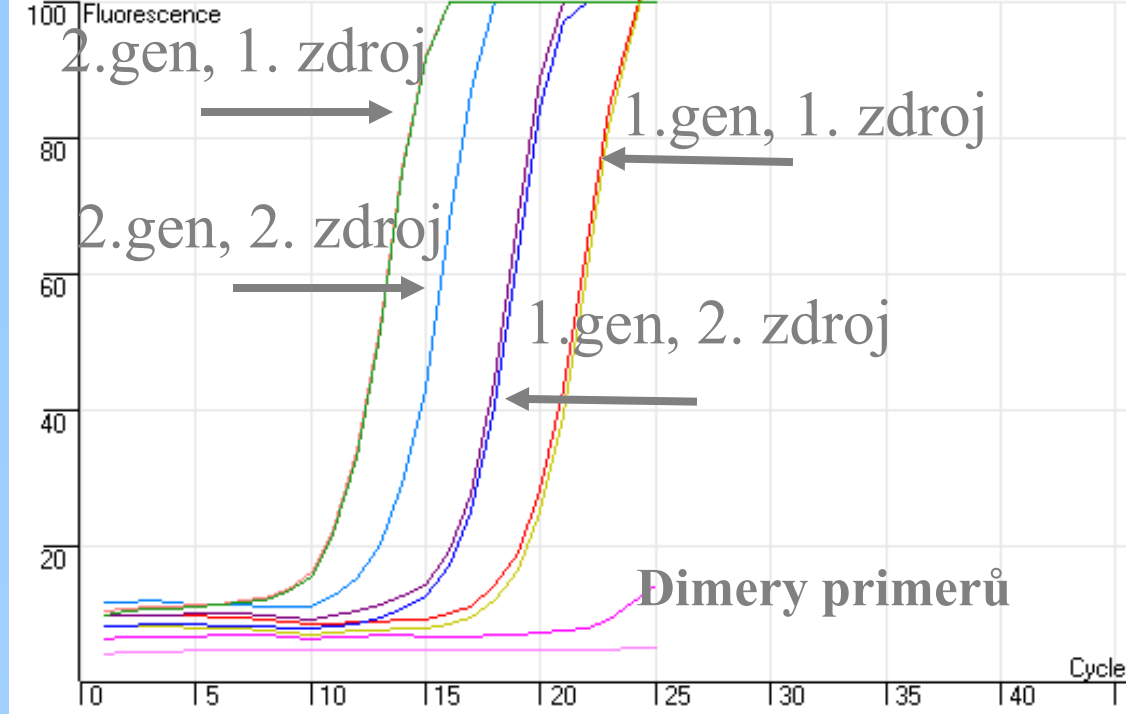
dF/dt



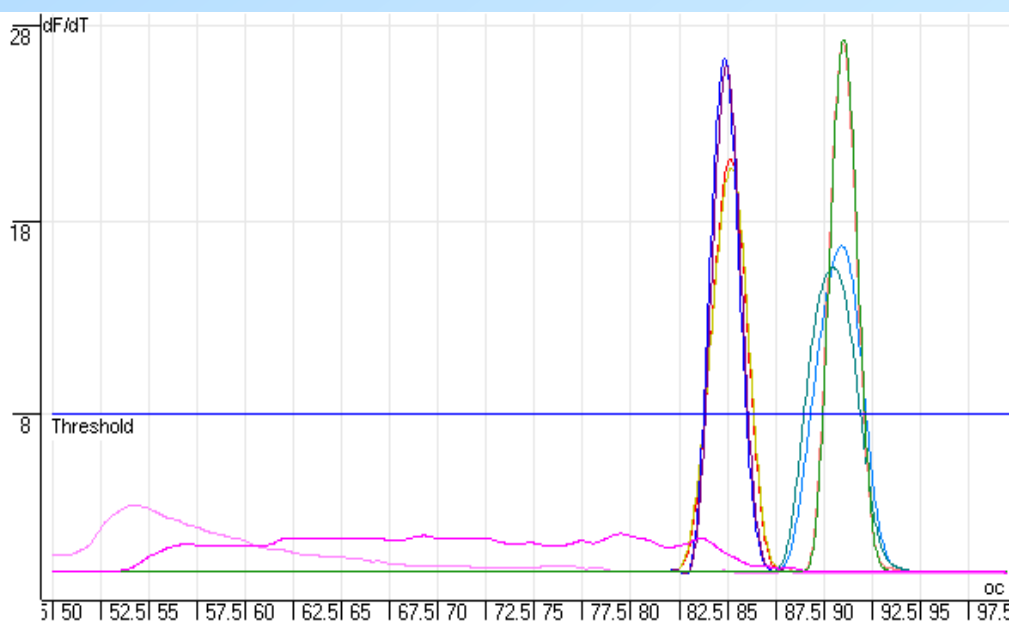
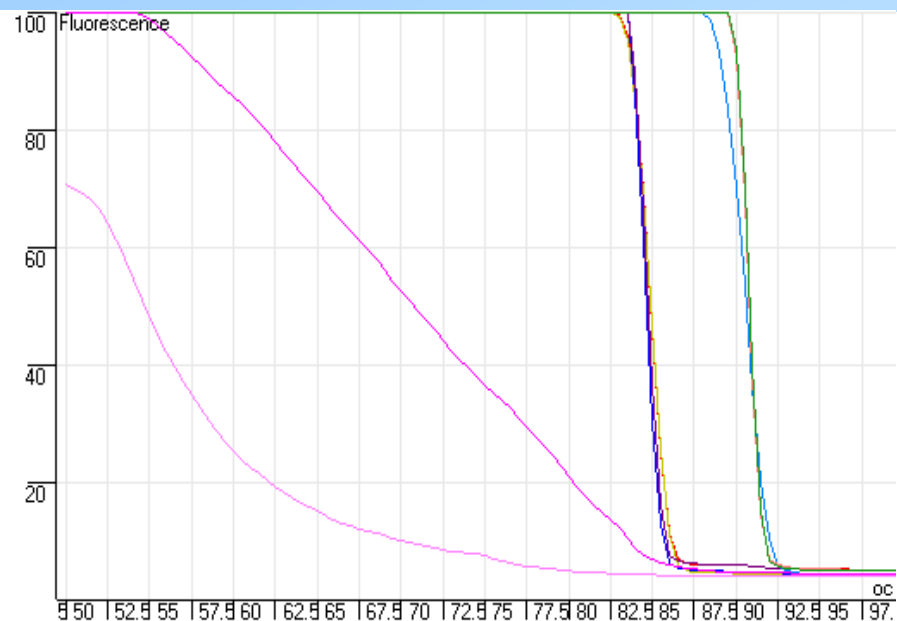
Tm

teplota





2 geny
2 zdroje RNA



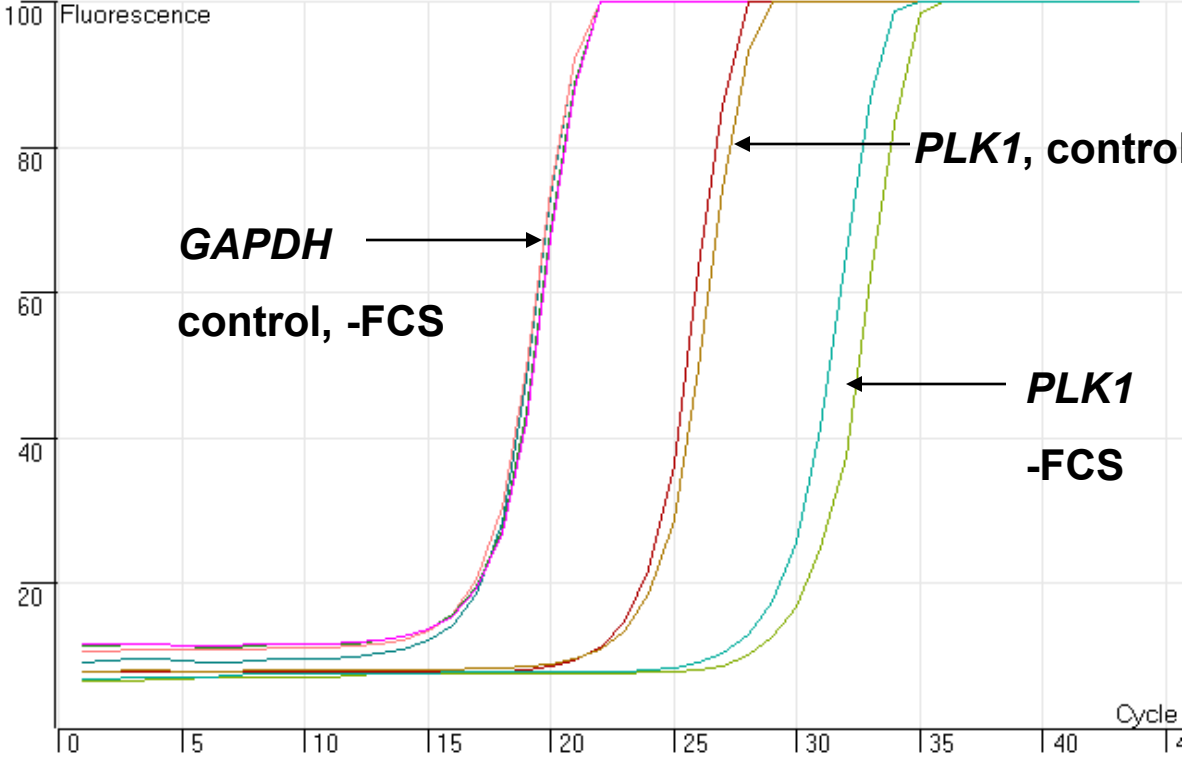
Výhody a nevýhody PCR

Výhody:

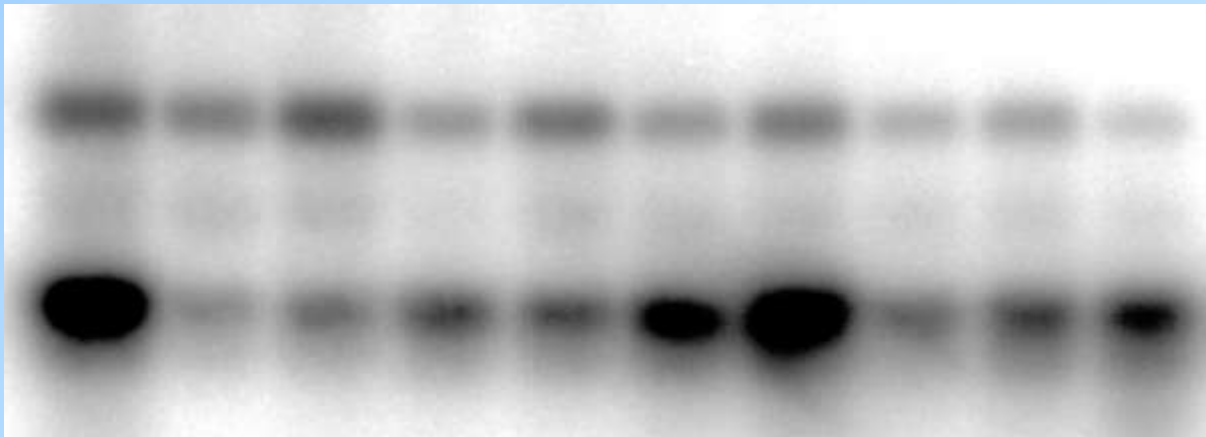
- PCR je vysoce sensitivní v důsledku exponenciální amplifikace templátu DNA
(uvádí se, že zachytí geny 1 nádorové buňky na cca 100 000 zdravých buněk)
- PCR je vysoce specifická v důsledku specifity navázání primerů
(zvláště při použití sond)
- PCR je rychlá metoda (minuty až hodiny)

Nevýhody:

- minimální množství kontaminace může vést k negativním výsledkům
- přítomnost inhibitorů PCR může vést k negativním výsledkům
- PCR detekuje transkript, ne funkční protein



*Srovnání
semikvantitativní
a real-time
RT-PCR*



GAPDH

PLK1

control

-FCS

Aplikace real-time PCR (RT-PCR)

Kvantifikace genové exprese

Ověření výsledků arrayí, DD, SSH

Monitorování léčby, MRD

Real-time imuno-PCR (IPCR)

Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Detekce patogenů, HRM

Diagnóza virových infekcí (CMV, meningokok)

Citlivost bakterií k antibiotikům a detekce rezistentních kmenů

In vivo imaging buněčných procesů

Studie mitochondriální DNA

Detekce methylací

Detekce inaktivace X chromozomu

Detekce trisomií

Analýza mutací, delecí, aberací

Haplotypizace

Kvantitativní analýza mikrosatelitů

Prenatální diagnóza

Forenzní genetika

**Ověření výsledků získaných
z mikročipů**

Mikročipy



1997 – Londýn, Affymetrix

moderní technologie, na nosiči není fixován vzorek, ale naspotovány či přímo nasyntetizovány cDNA sondy....

- možnost detekce velkého množství (stovky – sta tisíce) genů v jedné analýze!!
- počítačový software pro vyhodnocení

Typy mikročipů

- DNA mikročipy (“cDNA arrays”)

PCR produkty (nebo dlouhé nasyntetizované oligonukleotidy známých genů ~25-60 nt,) jsou naspotovány na skleněné mikroskopické sklíčko, silikonové či nylonové membrány pomocí spotovacího robota (*Ink-jet microarrays* od Agilent)

- Oligonukleotidové mikročipy:

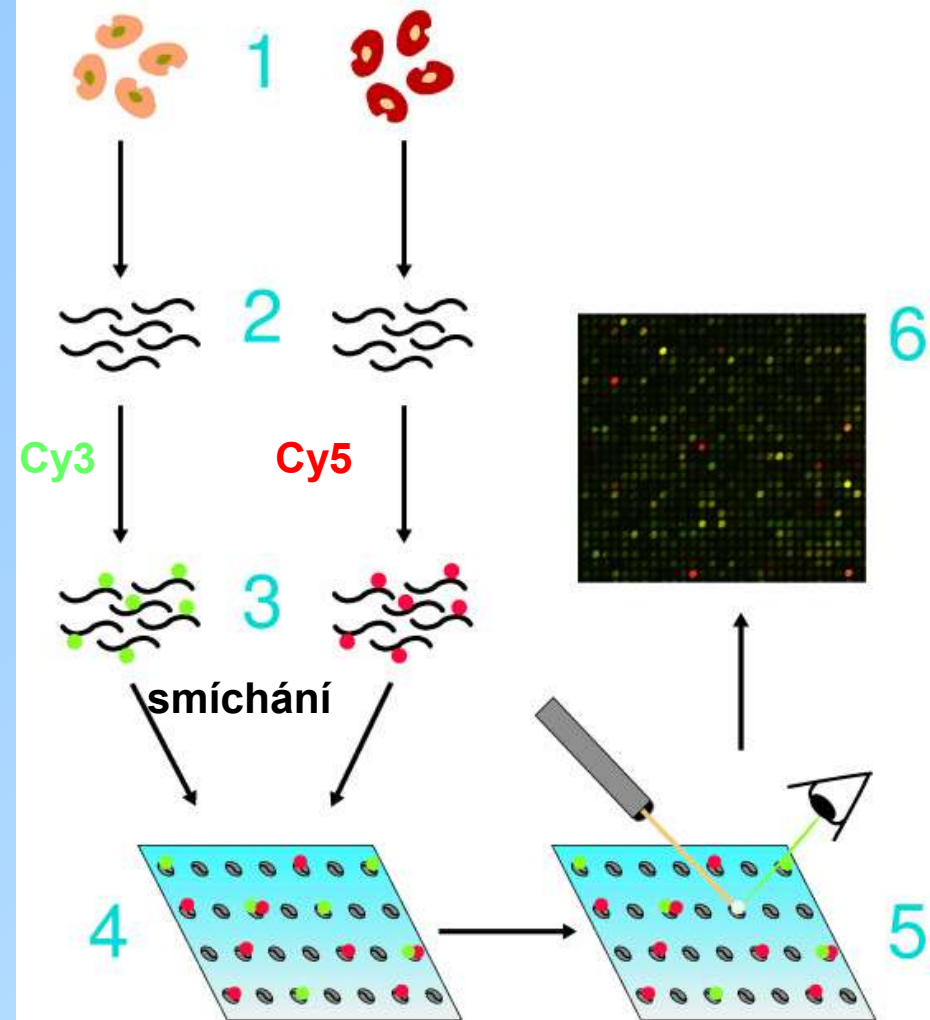
- velké množství kratších oligo 20-25 nt/gen

- komerčně dostupné

- sondy jsou syntetizovány in situ pomocí fotolitografie (*GeneChip* od *Affymetrix*), tisku tryskou (*OligoChips* od *Agilent*) nebo elektrochemické syntézy (*Combimatrix*)

Referenční vzorek

Experimentální vzorek



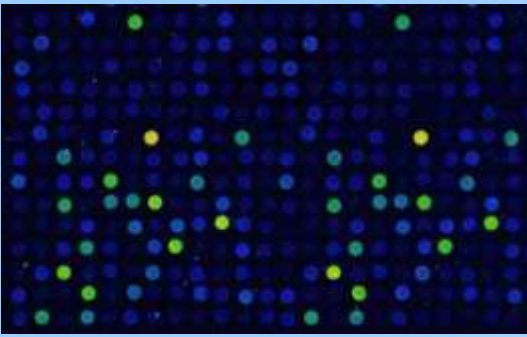
Kroky:

- 1 Experiment – 2 vzorky
- 2 Izolace mRNA, příprava aRNA, amplifikace cDNA
- 3 Značení fluorescenční látkou
- 4 Hybridizace na DNA čip
- 5 Detekce navázané cDNA – laserová technologie – čtečka
- 6 Analýza dat – počítačové databáze

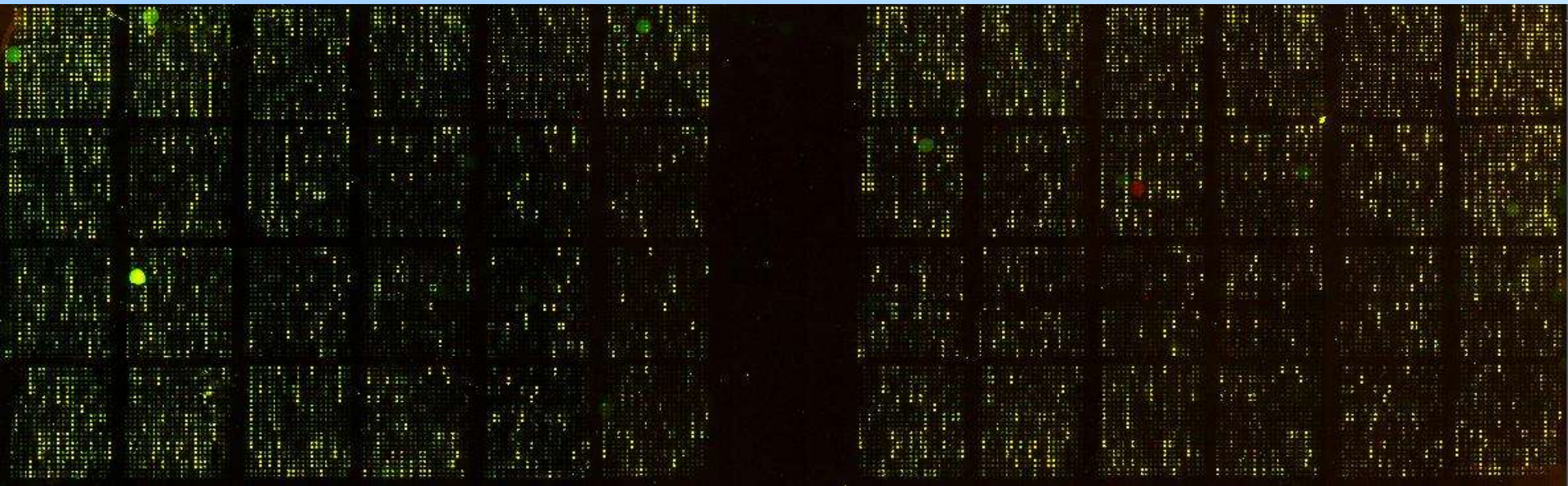
Předzpracování a normalizace dat,
odstranění podezřelých hodnot

Aplikace technologie mikročipů

- Genová exprese – identifikace rozdílně exprimovaných genů
 - typy buněk, tkání; během léčby; různé experimentální stimulační; normální vs. nemoc
 - identifikace společně exprimovaných genů
 - nové spojení mezi geny, stanovení stupně podobnosti mezi biologickými vzorky, signální dráhy, tvorba biologických sítí
- Molekulární diagnostika:
 - klasifikace nemocí, detekce patogenů, detekce mutací; detekce SNP
- Vývoj léků
 - identifikace cílů, nežádoucí účinky



Mikročip v ultrafialovém světle



As defined by Schena et al. (Science 270, 467-470, 1995), a DNA microarray is "an ordered array of nucleic acids, proteins, small molecules, that enables parallel analysis of complex biochemical samples".

Aktivace embryonálního genomu - EGA

na počátku dělení – embryonální genom neaktivní
vývoj závisí na maternálních produktech
nakumulovaných v oocyту během oogeneze

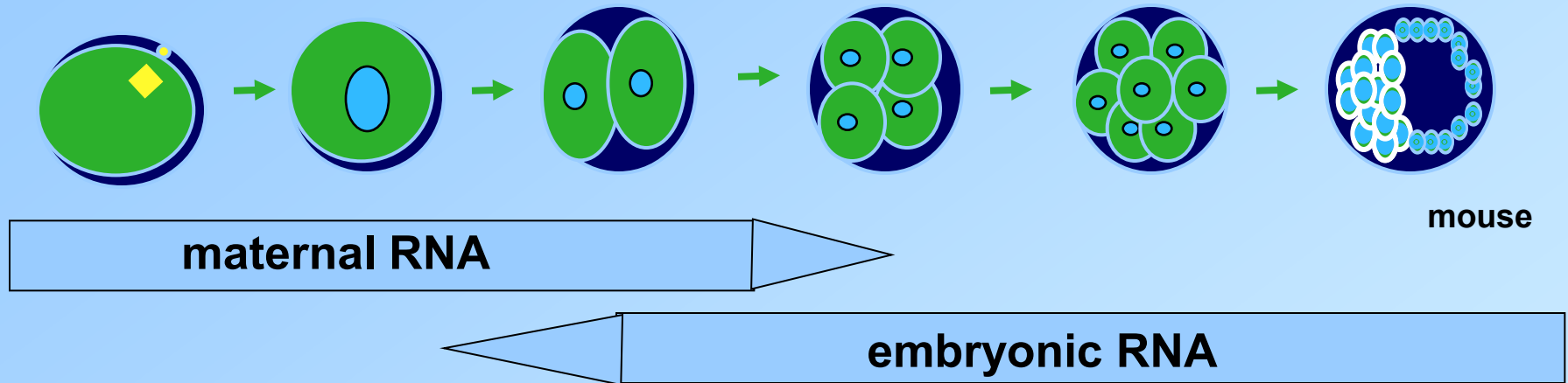
v průběhu dalších fází – degradace maternálních mRNA a proteinů
a aktivace embryonálních genů (závislá na čase
uplynutém od oplození, nikoliv na vývojovém
stupni)

EGA kritická událost pro úspěšný vývoj

mechanismus regulující EGA je u savců konzervovaný,
načasování rozdílné

Genová exprese

MGA - maternal gene activation → ZGA (EGA) - zygotic(embryonic) gene activation



Minor gene activation

X

Major gene activation

Nízká úroveň

Vysoká úroveň

transkripční aktivity

Myš:

pozdní 1-b

2- b

Skot:

mezi 1- a pozdní 4-b

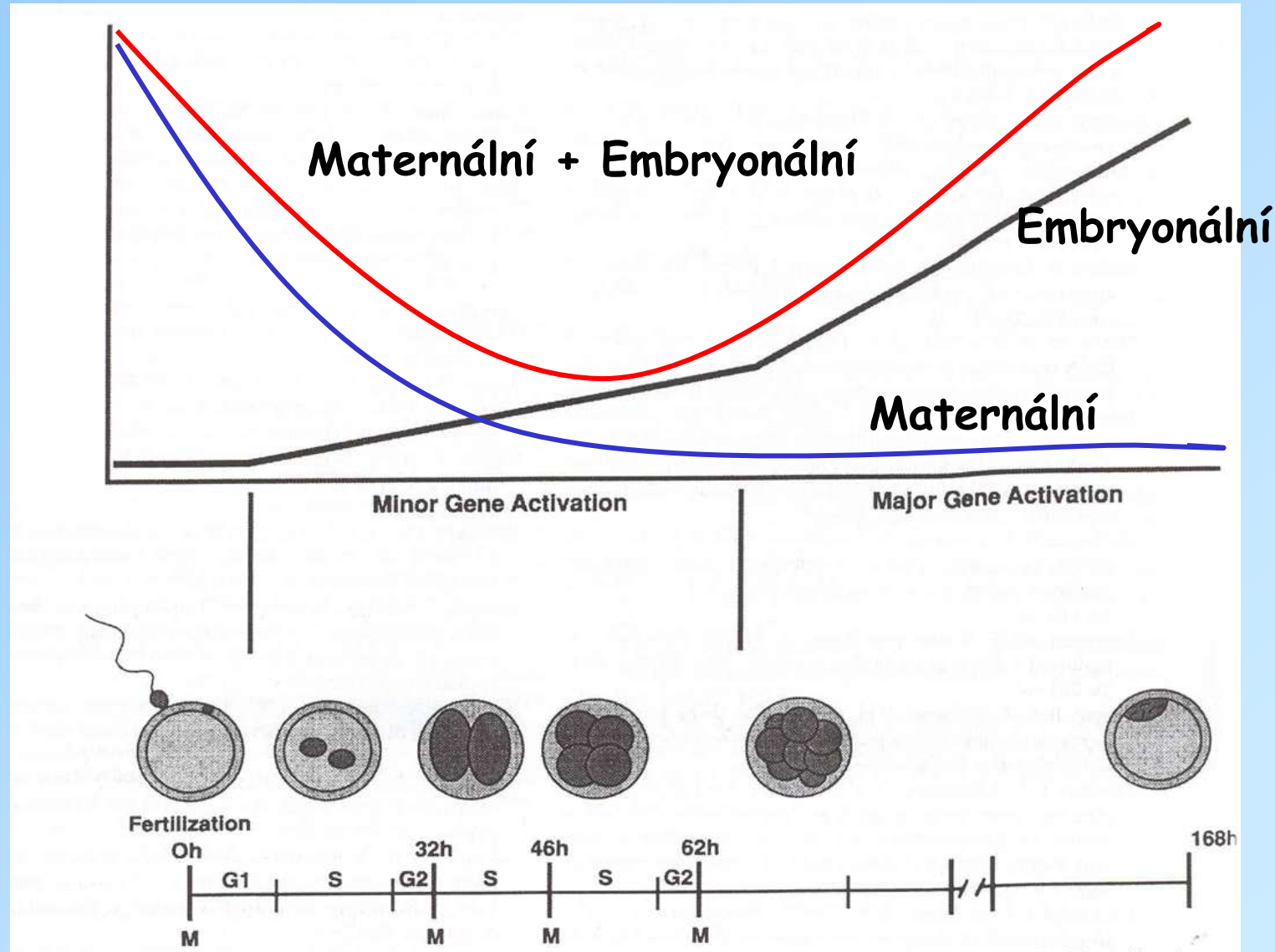
8- b

Králík:

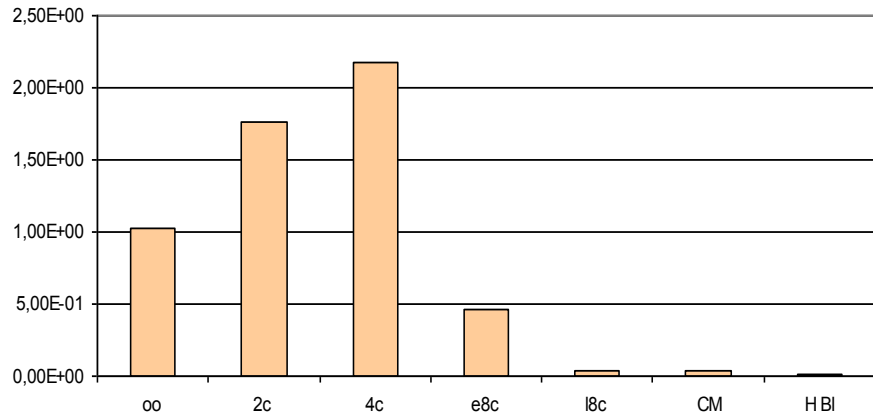
2- b

8/16- b

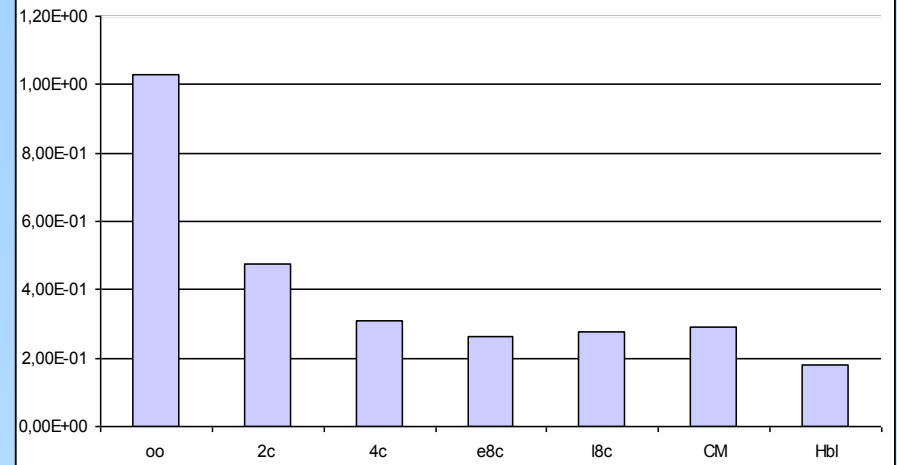
Typy transkriptů u skotu



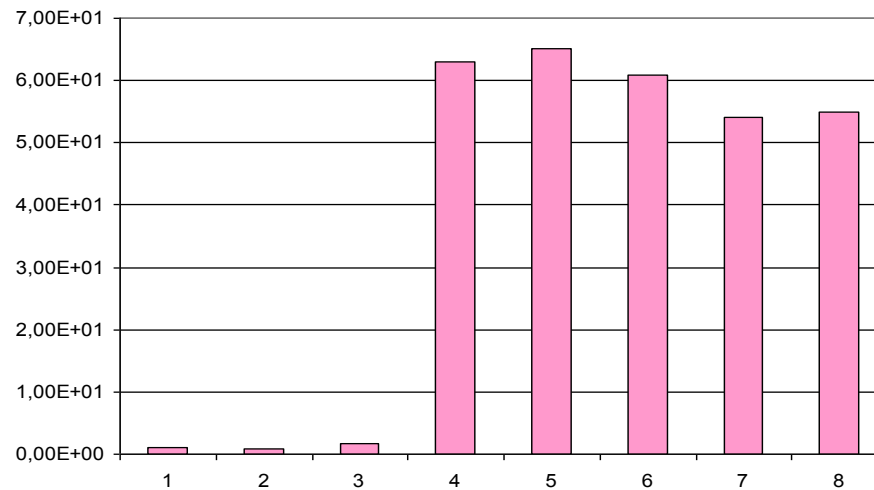
MATER



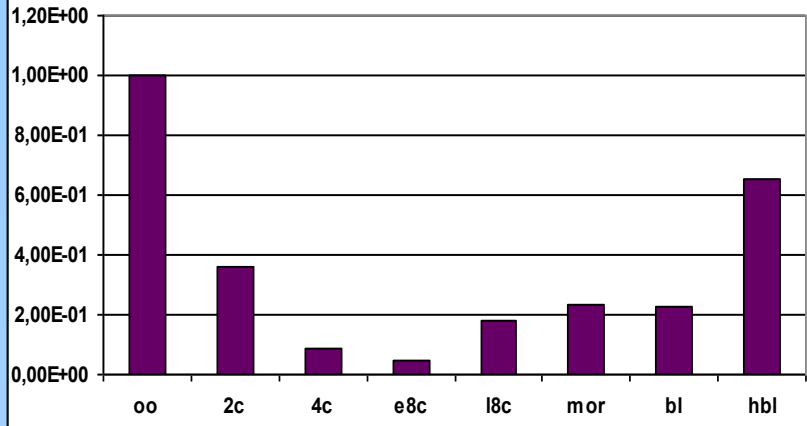
H2A.1



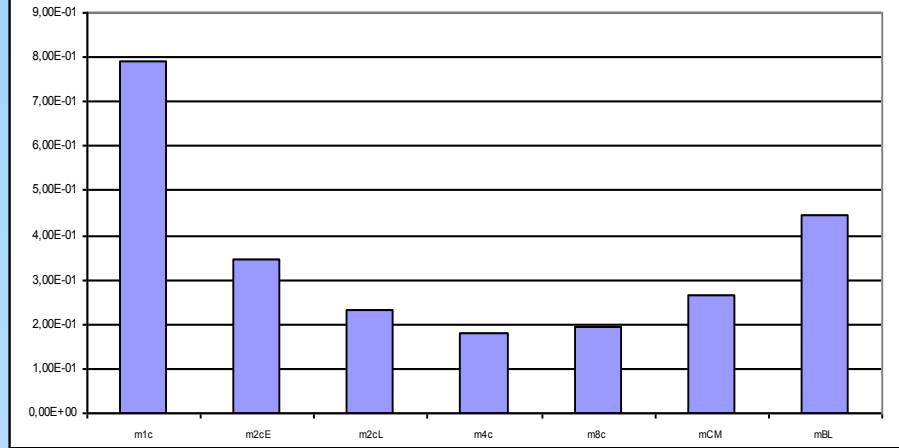
H2AZ



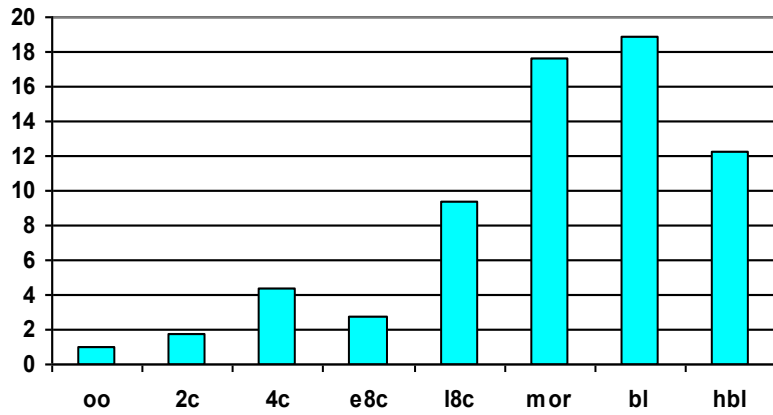
EIF4E



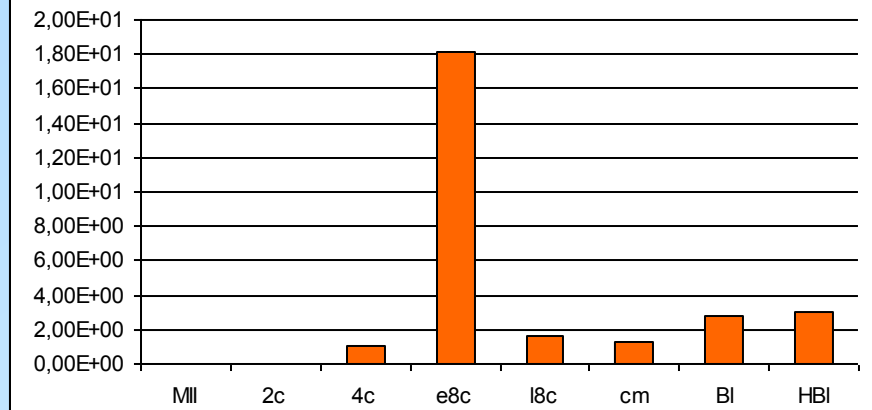
Prp



SFRS3



KMD4D





DĚKUJI ZA POZORNOST

