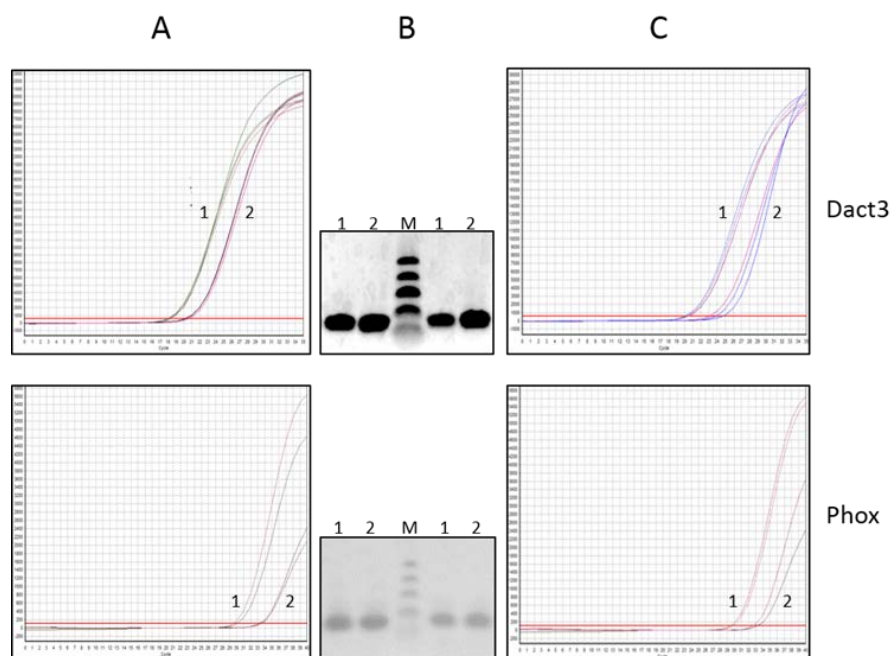


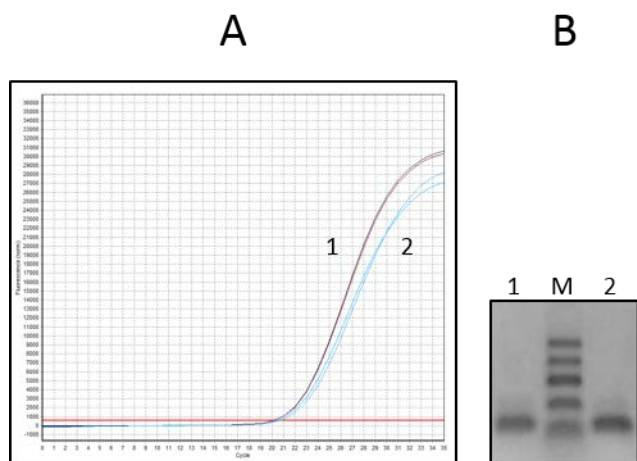
## TP enhancer pro citlivou RT-PCR analýzu

Reverzní transkripce je enzymatická reakce, která přepisuje genetickou informaci z RNA na DNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptáza, která se vyskytuje u řady retrovirů. V současné době se reverzní transkripce využívá v řadě aplikací ve výzkumu a diagnostických testech založených na molekulárně-genetických přístupech. Ty zahrnují izolace stříhových variant genů a hodnocení transkripční aktivity genů v různých tkáních. Pro amplifikaci DNA fragmentů, které jsou obtížně amplifikovatelné v polymerázové řetězcové reakci (PCR), jsme připravili nový reakční pufr zvaný TPP pufr, který zlepšuje amplifikaci DNA fragmentů bohatých na GC oblasti nebo dlouhých DNA fragmentů. V tomto projektu jsme zjišťovali, zda bude TPP pufr zlepšovat účinnost transkripce pomocí M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverzní transkriptázy. Zjistili jsme, že v případě reverzní transkripce obtížně transkribovatelných genů poskytuje TPP pufr lepší výsledky než standardní M-MLV pufr (Obr. 1).



Obr. 1. Srovnání účinnosti reverzní transkripce s využitím M-MLV reverzní transkriptázy při použití TPP pufru nebo standardního pufru pro reverzní transkripci. Byly analyzovány dva genové transkripty, Dact3 (horní panel) a Phox (dolní panel). Reverzní transkripce byla provedena v TPP pufru (1) nebo v běžném pufru pro M-MLV reverzní transkriptázu (2) a následně byla vzniklá cDNA amplifikována pomocí PCR v TPP pufru s přidáními nukleotidy, Taq DNA polymerázou a interkalačním fluorescenčním barvivem SYBR green I. Výsledky jsou prezentovány vynesáním naměřené fluorescence v jednotlivých cyklech PCR (panel A a C) a fotografiemi agarózových gelů, v nichž byly PCR amplikony separovány elektroforeticky a barveny ethidium bromidem (panel B). V panelu B jsou také vyznačeny pozice DNA markerů (M). V těchto experimentech byly pro každý gen použity dvě sady PCR oligonukleotidových primerů. Výsledky za použití jedné sady primerů jsou uvedeny v panelu A a v levé části panelu B a výsledky s druhou sadou primerů jsou uvedeny v panelu C a v pravé části panelu B.

Kvantifikace mRNA s využitím PCR a rutinně používanou Taq DNA polymerázou se obvykle provádí v dvou-krokové proceduře ve dvou zkumavkách. V prvním kroku/zkumavce je mRNA transkribována na cDNA a ve druhém kroku/zkumavce je část materiálu z první zkumavky amplifikována pomocí PCR. Naše experimenty ukázaly, že při použití TPP pufru je možné provést oba kroky (reverzní transkripci a PCR) ve stejné reakční zkumavce a s menší koncentrací jak RNA, tak i reverzní transkriptázy. Přímé srovnání výsledků obou testů (ve dvou nebo v jedné zkumavce) je uvedeno v Obr. 2. Získané výsledky ukazují, že jedno-zkumavkové testy se sníženým množstvím RNA a M-MLV reverzní transkriptázy v TPP pufru dávají výsledky srovnatelné se standardními dvou-zkumavkovými testy.



Obr. 2. Porovnání výsledku reverzní transkripce kombinované s PCR ve dvou-zkumavkovém a jedno-zkumavkovém testu. Ve dvou-zkumavkovém testu (1) byla reverzní transkripce provedena v standardním pufru pro reverzní transkripci s M-MLV reverzní transkriptázou v doporučeném množství enzymu (20 U/ $\mu$ l) a RNA (50 ng/ $\mu$ l) v celkovém objemu 10  $\mu$ l v jedné zkumavce. Jeden  $\mu$ l (10%) reakční směsi po reverzní transkripci byl následně použit k amplifikaci v PCR s využitím TPP pufru. V jedno-zkumavkovém testu (2) byla reverzní transkripce provedena v TPP pufru a se sníženou koncentrací jak RNA (5 ng/ml), tak reverzní transkriptázy (2,5 U/ $\mu$ l). Následně byla provedena PCR v téže zkumavce po dodání nukleotidů, Taq DNA polymerázy, oligonukleotidových primerů a SYBR green I. Výsledky jsou prezentovány vynesením naměřené fluorescence v jednotlivých cyklech PCR (panel A) a fotografií agarózového gelu, v němž byly PCR amplikony separovány elektroforeticky a barveny ethidium bromidem (panel B). V panelu B jsou rovněž uvedeny pozice DNA markerů (M).

**Závěr:** Výsledky ukazují, že TPP pufr zlepšuje účinnost reverzní transkripce a umožňuje zjednodušenou kvantifikaci mRNA za použití sníženého množství jak RNA, tak i M-MLV reverzní transkriptázy.

V případě zájmu o další informace k výsledkům tohoto projektu nebo zakoupení neexkluzivní licence na prototyp soupravy pro zjednodušenou, zrychlenou a zlevněnou analýzu RNA z malých počtů buněk se obraťte na **Centrum pro transfer technologií**, ÚMG AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. 420-241 063 227 nebo 420-602 892 876, e-mail: ctt@img.cas.cz