

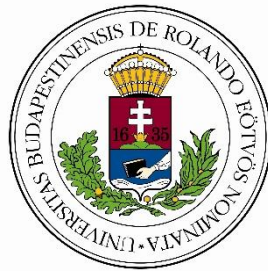


M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológiai Intézet és Kémiai Intézet

# Quantitative real-time PCR laborgyakorlat

Készítette:

Rácz Gergely

Molnár Petra

Nagy Nikolett

2019.

## A PCR elve, alapjai

A PCR a DNS egy jól meghatározott részletét megsokszorozza, amplifikálja, ezáltal detektálhatóvá teszi. A detektálhatóság lehetővé tétele azért fontos, mert a rendelkezésre álló nukleinsav minta gyakran igen kevés. Az eljárás *in vitro* körülmények között a DNS szintézis természetesen lejártszódó folyamatát utánozza.

A PCR elve nagyon egyszerű: a kétszálú DNS-szakaszt (hődenaturációval) egyszálúsítjuk, majd megszintetizáltatjuk mindkét szál komplementer párját. Ezt ciklikusan ismételve exponenciális módon felszaporítható a kiválasztott DNS-szakasz. A reakció egyik kulcsfontosságú tagja a polimeráz enzim, amely csak akkor tud a DNS-hez kapcsolódni, ha az legalább egy rövid szakaszon kettős szálú formában van a reakcióelegyben. Ezt a tényt kihasználhatjuk arra, hogy kizárólag csak az a DNS-szakasz sokszorozódjon fel, amelyiket mi szeretnénk. Mivel a felsokszorozításhoz a két szálát egymástól el kell választani, a reakció megkezdéséhez rövid, mesterséges szakaszokat kell terveznünk. Ezeket nevezzük primereknek. A primer megfelelő körülmények között az adott komplementer szekvenciához be fog kötődni (a hibridizáció mindig a bázispárosodás szabályainak megfelelően zajlik, adeninnel szemben timin, citozinnal szemben guanin található). A primerek szerepe azonban jóval nagyobb, mint a reakció lehetővé tétele, hiszen a primer szekvenciája határozza meg azok betapadási helyét, azaz a reakció helyét is a DNS szálon. A polimerizációs reakció sikerességéhez a primereken kívül egyéb komponensekre is szükség van.

A PCR reakcióelegy összetétele:

### - **templát DNS**

Bármilyen eredetű DNS molekulát felhasználhatunk templátként, attól függően, hogy mi a célunk:

- Genomi DNS: különféle mutációk (pontmutáció, deléción, inzerción) kimutatása, különféle organizmusok (baktériumok, vírusok, GMO-k, stb.) jelenlétének kimutatása, a DNS ujjlenyomatok által igazságügyi és apasági vizsgálatok
- cDNS: Adott gén kifejeződésének vizsgálatánál a génről átíródott mRNS-ek mennyiségének meghatározása a cél. A vizsgálni kívánt mintából RNS-t kell izolálni, majd reverz transzkripción segítségével megszintetizálni a RNS komplementer DNS szálát (cDNS).

A cél DNS kinyerését izolálásnak nevezzük, melynek részleteire jelen leírásban csak a cDNS vizsgálatára vonatkozóan térünk ki.

### - **dNTP**

A reakcióelegynek a DNS-t felépítő mind a négyféle dNTP-t tartalmaznia kell ekvimoláris mennyiségben, hiszen a polimeráz ezeket fogja építőkövekként használni a reakción során.

- **Primerek** (indító oligonukleotidok)

Két kb. 18-25 nukleotid hosszúságú primert kell alkalmaznunk a sikeres amplifikálás véghezviteléhez. A tapadási helyük jelöli ki a terméket (a templát DNS komplementer részletével alakítanak ki kapcsolatot), így a tervezésükre különös gondot kell fordítanunk. Ehhez ismernünk kell a tapadási hely szekvenciáját.

- **DNS-polimeráz enzim**

A legtöbb esetben a Taq polimeráz enzimet használják, amely arról a forróvízesforrásokban élő *Thermus aquaticus* ösbaktériumról kapta a nevét, amelyből az enzimet először izolálták. A Taq polimeráz enzim képes elviselni akár 100°C-ot is. E tulajdonsága miatt használható a 95°C-os denaturációs lépést is tartalmazó PCR reakció során.

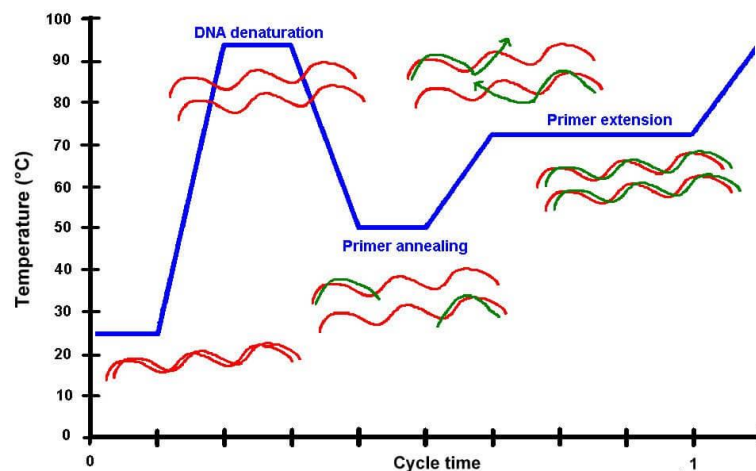
- **Egyéb komponensek**

Mg<sup>2+</sup> ionoknak megfelelő koncentrációban jelen kell lenniük, mivel ezek a Taq polimeráz kofaktorai. Minden esetben pufferoldat biztosítja a reakcióelegy állandó pH-ját és gyakran alkalmaznak BSA-t (szarvasmarha szérum albumint) az enzim stabilizátoraként.

A reakcióelegy összemérése után az új DNS láncok szintézise a PCR készülékben folyik. A PCR készülék gyakorlatilag egy rendkívül pontos, programozható termosztát. A PCR eljárás három fő lépése:

1. **Denaturáció:** A reakcióelegyet **95°C**-ra felmelegítjük. Ez a hőmérséklet elegendő ahhoz, hogy a templát DNS két szálát összetartó hidrogén hidak felszakadjanak, és egyszálú DNS molekulák alakuljanak ki. A denaturálás időtartama **15-45 másodperc**. Az első ciklus előtt szükség van egy 3-5 perces denaturálási lépésre, amely a nagyméretű templátláncok felnyitására, valamint a hot start enzim aktiválására szolgál. A hot start polimerázokhoz kezdetben antitest köt, ami meggátolja az enzim aktivitását alacsony hőmérsékleten. 95°C-ra melegítve az antitest denaturálódik, így az enzim aktiválódik. A hot start polimerázok kiküszöbölik az alacsony hőmérsékleten történő aspecifikus reakciót.
2. **Primerek megtapadása (annealing):** A mintákat lehűtjük arra a hőmérsékletre (45–70 °C), ahol a specifikus primerek megtalálják a komplementer szekvenciájukat, de még nem képesek arra, hogy aspecifikus helyre kötődjenek. (Alacsonyabb hőmérsékleten egymással nem komplementer DNS-szakaszok is képesek aspecifikusan kapcsolódni.) A tapadási lépés ideje ugyancsak **15-45 másodperc**, hőmérsékletét a használt primerek olvadáspontja határozza meg. Elvben itt az eredeti DNS két szála is visszakapcsolódhatna, mégsem ez történik, két ok miatt: egyrészt a templát DNS hosszú, sokáig tart, amíg a pontos párosodást megtalálja, másrészt primerből sokkal több van, hamarabb találja meg valamelyikük a komplementer szekvenciát. Ezt a kapcsolódási hőmérsékletet angolul „**annealing temperature**”-nek hívjuk, a **reakció specifitását** elsősorban ez határozza meg.

3. **Polimerizáció (amplifikáció, extenzió):** A primerek bekapcsolódása után szinte azonnal elkezdődik a polimerizáció. Hogy a polimerizáció megfelelően gyorsan haladjon, a reakció hőmérsékletét fel szokták vinni az enzim működési optimumára (72°C). A polimerizáció időtartamát a szintetizált termék hosszúsága, valamint az alkalmazott enzim gyorsasága befolyásolja. A Taq enzim hozzávetőlegesen 1000 bázist képes beépíteni 60 másodperc alatt 72°C-on. A felszorzozni kívánt szakasz hosszának függvényében a reakciót melegítéssel leállítjuk (visszatérés az 1. pontra), ilyenkor szétválik a DNS két lánc, hogy aztán az annealing temperature-ra lehűtve ismét primerek tapadhassanak hozzájuk és újra kezdődhessen a polimerizáció (1. ábra). Az utolsó ciklus után rendszerint még egy hosszabb polimerizációs lépést is alkalmaznak, (72 °C, 5 perc), amely során az esetleg csonkán maradt szálak is kiegészülhetnek.

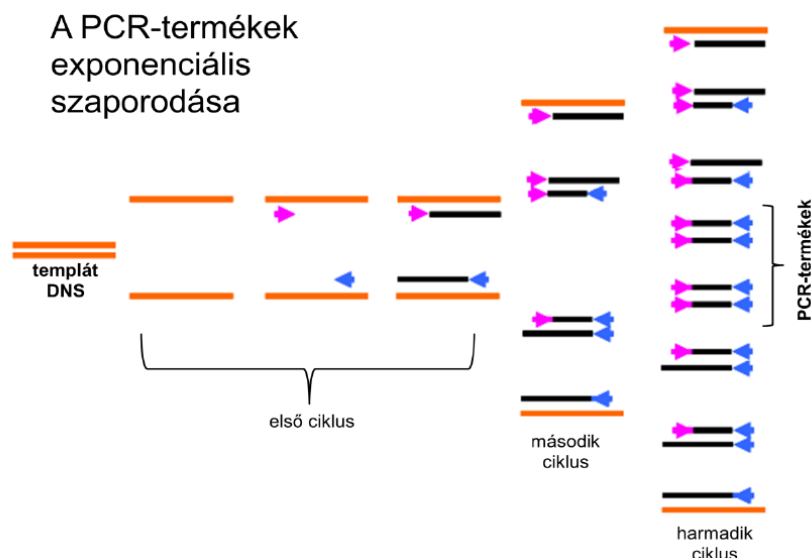


1. ábra

## Exponenciális szaporodás

Tekintsük a hosszú, dupla szálú DNS-templát két szálát! Miután a hődenaturáció miatt a két szál elválik egymástól, mindkét szálra bekötődik egy-egy komplementer primer. Az első reakció során a primerektől kezdve megkezdődik a komplementer szálak szintézise, és ez egészen addig tart, amíg az első ciklust le nem állítjuk. Ebből adódóan az elsőként szintetizálódó új szálak hossza nem előre meghatározott. A második ciklusban már az első ciklus során szintetizálódott, új szálak is templátként fognak részt venni, azaz róluk is keletkezik majd termék. Az erről keletkező termék hosszát azonban már egyértelműen meg fogja határozni a primerpárunk. A keletkező kétszálú szakaszokat minden ciklus után ismét szétválasztjuk, így az eredeti, hosszú szakaszokról is keletkeznek termékek, amelyek hossza továbbra sem jól meghatározott. Azonban ez a növekedés lineáris ütemben követi a ciklusok számát, míg a jól behatárolt, számunkra fontos szakaszok sokszorozódása exponenciálisan zajlik. Az exponenciális szaporodás annyira túlnövi a lineárisat, hogy egy tipikus PCR-reakció 20–30 ciklusa után az eredeti templátok mennyisége elhanyagolható lesz a jól meghatározott szakaszokéhoz képest. Ha  $X$  darab kettős szálú templátom volt kezdetben, és 100%-os hatékonysággal működik a reakció, akkor két ciklus után  $X$  darab kettős szálú szakaszom keletkezik. Az ezt követő minden ciklusban a szakaszok száma duplázódik, tehát  $n$  ciklust követően  $X \cdot 2^{n-2}$  darab szakaszunk keletkezett (2. ábra). Ezeket a „szakaszokat” hívjuk PCR-terméknek, gélen megfuttatva ideális esetben csak ez a homogén, egy csíkban futó DNS-fragment látszik.

A PCR hatásfoka többnyire csak elméletben 100%, a valóságban ennél alacsonyabb (jó esetben 90-100%). Ráadásul a termékek száma csak az első néhány ciklusban növekszik exponenciálisan, egy idő után kezdenek elfogyni a primerek, a dNTP-k és a reakciót katalizálni képes szabad enzimek. Ráadásul az enzimek egy része is tönkre mehet a hőmérséklet-ingadozástól. Ezért az exponenciális növekedés lelassul, végül leáll; többnyire azelőtt, mielőtt az összes beprogramozott ciklus lefutna. Ebből következik, hogy nagy ciklusszám esetén a ciklussorozat végén a termékek száma gyakorlatilag független az eredetileg a mintához adott templátok számától, inkább függ a termék hosszától, a primerek, a dNTP-k és az enzim mennyiségétől.



2. ábra

## Primerek tervezése

A primereket körültekintően kell megterveznünk, hogy működőképes és specifikus legyen a reakciónk. Ennek természetesen sok termékspecifikus aspektusa van, de van néhány általános érvényű szabály:

- páros tervezés: A primerek egy adott szakaszt fognak közre, így párban tervezzük őket (forward és reverz primer).
- hossz: 20 nukleotid körül legyen (18–25), ennél rövidebb vagy hosszabb primerek aspecifikus feltapadást eredményezhetnek.
- Tm (olvadási hőmérséklet): A két primer olvadási hőmérséklete hasonló legyen.
- báziskompozíció: Változatos nukleotidszekvencia, a guaninok és citozinok mennyisége hasonló a timinek és az adeninek mennyiségéhez (GC arány ~40–60%).
- kerülendő: Komplementer szekvenciák jelenléte másodlagos szerkezetek kialakulását okozhatja, amely konformációváltozás következtében lehetetlenné teheti a célszekvenciához való betapadást (hairpin, primer dimer).
- 3' vég: Jó, ha C vagy G található a 3' végen, de érdemes kerülni a CG vagy GC végeket.

Hogy megkönnyítsük az optimális primerpár tervezését, érdemes primertervező segédprogramokat használnunk, amelyek közül több online is hozzáférhető.

## A PCR alkalmazási területei, feltételei

Mi mindenre lehet használni a PCR-technikát? Nézzük a legfontosabb példákat röviden:

- Genetikai manipuláció (klónozás, irányított mutagenezis)
- Adott élőlények jelenlétének kimutatása (bakteriális, virális fertőzések)
- Szekvencaanalízis (szekvenálás „lineáris” PCR-rel)
- Mutációk, polimorfizmusok kimutatása (öröklődés, genetikai betegségek, apasági vizsgálat)
- Mennyiségi vizsgálatok (specifikus DNS- vagy RNS-szintek mérése)

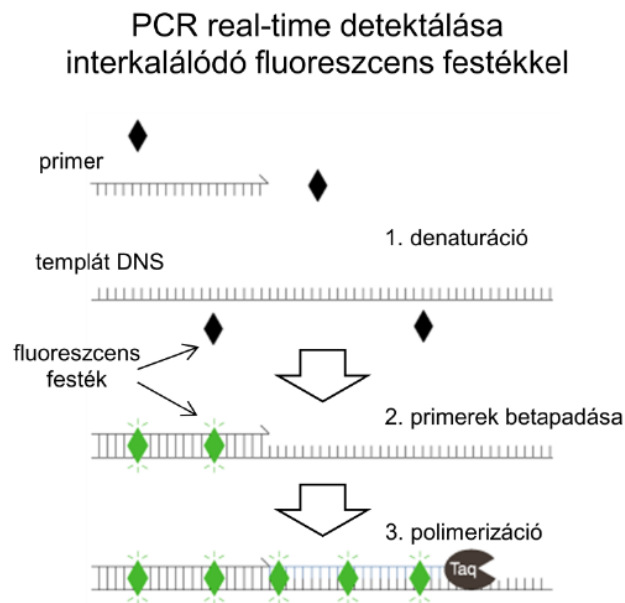
A PCR elméletéből következik és a fenti példákból látszik, hogy bármiféle genetikai szennyeződés nagyban ronthatná a reakció specificitását, hamis pozitív eredményeket produkálva. Ebből következik, hogy a PCR-reakcióhoz használt eszközöknek és oldatoknak kontaminációmentesnek kell lenniük. Ez különösképpen igaz, ha kvantitatív PCR vizsgálatot végzünk. Az eredményes qPCR vizsgálatához az alábbi pontok betartása szükséges:

- A reakció összemérését és az összemért reakcióelegyek qPCR gépben történő felsokszorosítását két külön helyiségben végezzük, amelyek légtere között nincs közvetlen érintkezés, nehogy az esetlegesen kiszabaduló DNS a levegőbe jutva beszennyezhesse a jövőbeli mintákat.
- Mindig új, RN-áz- és DN-ázmentes, steril műanyagárut (Eppendorf és PCR csöveket, pipettahegyet) használjunk. Lehetőség szerint használhatunk szűrővel ellátott pipettahegyeket. A műanyagárut minden esetben légmentesen lezárva tároljuk, és használat után azonnal zárjuk vissza.
- A törzsoldatokat alikvotokban (porciókban) tároljuk. A törzsoldatokkal (enzimmel, festékkel, tömény primeroldattal) való munkavégzést időben el kell különíteni a DNS mintákkal való munkától.
- Tiszta gumikesztyűben, tiszta, dekontaminált laborasztalon, tiszta pipettával rakjuk össze a reakciókat. A minták bemérése után váltsunk kesztyűt, vagy mossuk le vízzel.
- A reakciócsöveket csak a kimérés/bemérés idejére hagyjuk nyitva.
- Amennyire lehet, igyekezzük elkerülni az aeroszolképződést.
- Mindig rakjunk össze egy templát DNS nélküli negatív kontrollt (no template control, NTC), hogy lássuk, volt-e kontamináció. Kontamináció esetén érdemes először a nukleázmentes vizet lecserélni (ez a legolcsóbb), de ha a kontamináció megmaradt, legjobb, ha minden oldatból újat használunk a jövőben.
- Hatósági bizonyítványok kiadására jogosult, ún. akkreditált laboratóriumokban az előírások még szigorúbbak. Külön helyiségben, gyakran steril elszívófülke alatt rakják össze a PCR-reakciót. Kesztyűn kívül szájmaszk és fejtámla használata is kötelező, a szellőzést is speciális úton biztosítják.

## Kvantitatív mérések real-time PCR-rel (qPCR)

A valós idejű, angolul real-time PCR módszer lényege, hogy a DNS sokszorosítást kvantitatívan tudjuk nyomon követni. Ezzel a technikával nagy pontossággal meg tudjuk határozni a DNS templát kiindulási mennyiségét, ami sok szempontból igen hasznos lehet. A meghatározás fluoreszcens jel mérésén alapul, mely a DNS megsokszorozódása (amplifikáció) során növekszik. A fluoreszcens jel és a PCR termék mennyisége közötti kapcsolat alapján felvehető egy PCR amplifikációs görbe. A templát amplifikáció fluoreszcens jelekkel történő valós idejű követésével lehetőségünk van például az mRNS templát mennyiségét, és ezen keresztül a génexpresszió mértékét meghatározni (reverz transzkripció és PCR kombinálásával). A real-time PCR-készülékekben található valamilyen monochromális fényt kibocsátó fényforrás és egy fluoreszcens detektor. A real-time PCR-t többféle módon lehet nyomonkövetni.

Ha a reakcióelegyhez a DNS két szála közé **interkalálódó** (beékelődő), és az interkalálódás következtében fluoreszkáló festéket teszünk (pl.: EvaGreen, SYBR Green I), akkor a külső gerjesztés hatására létrejött fluoreszcencia mennyisége egyenesen arányos lesz a kettős szálú DNS, tehát az amplikon mennyiségével (3. ábra). A készülék kialakítása olyan, hogy a fluoreszcenciát a PCR-reakció közben is detektálni tudjuk. A real-time PCR-ben az interkalálódó festék fluoreszcenciájának detekciója minden ciklusban a lánchosszabbítási lépés végén történik. Univerzális kettős-szálú DNS-kötő tulajdonságukból következik, hogy bármilyen szekvenciához használhatóak, ugyanakkor a fluoreszcens jel nem specifikus egy adott amplikonra. Különösen fontos ezért a primerek specifitása, és a primer-dimer képződés elkerülése.

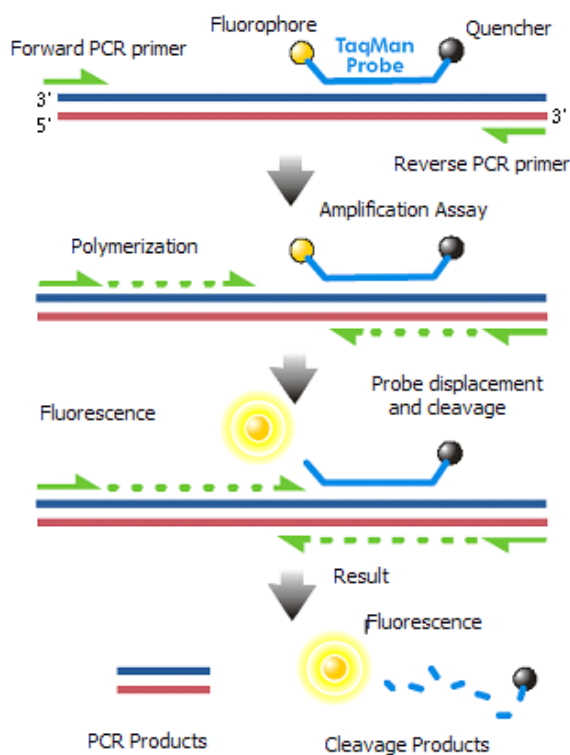


3. ábra

A célszekvenciához olyan próbát (szondát) is alkalmazhatunk (harmadik oligonukleotid), amely nem a forward vagy reverse primer letapadási helyére kötődik, hanem attól különböző helyre, valahol közöttük.

A **Taqman** néven ismert módszernél a szonda oligonukleotid végei különböző fluoreszcens csoportokat tartalmaznak, egy riporter és kioltó (quencher) fluorofórt, amelyek a fluoreszcens rezonanciaenergiatranszfer (FRET) jelenséget kihasználva biztosítják a detektálás lehetőségét. A riporter fluoreszcens emissziós spektruma átfed a quencher gerjesztési spektrumával. A fluoreszcens próbákat úgy tervezik, hogy a két festék fizikailag közel legyen egymáshoz (maximum 10-100 Å). Alapesetben a riportert gerjesztve nem detektáljuk annak fluoreszcenciáját, mert átadja az energiát a quenchernek. A reakció során a riporter és a quencher eltávolodnak egymástól (pl. Taqman próba esetében a festékek közötti oligonukleotidot a Taq polimeráz 5' -3' exonukleáz aktivitásánál fogva lebontja). A FRET megszűntével a riporterre jellemző fluoreszcens szignál detektálhatóvá válik, erőssége a reakció előrehaladtával az amplikon mennyiségének megfelelően nő.

Tehát a quencher molekula a riporter csoporthoz közel kioltja annak emisszióját, ha azonban a DNS-polimeráz elbontja a szondát, a két fluoreszcens molekula az oldatban távol kerül egymástól, és így már képesek vagyunk a riporter molekulán keresztül detektálni a mennyiségi növekedést (a fluoreszcencia jel növekedése és az újonnan szintetizálódó DNS mennyisége egyenes arányos).

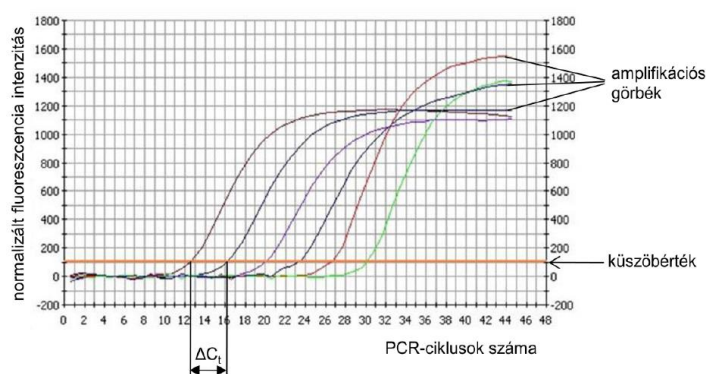


4. ábra



A PCR-reakció exponenciális fázisában a különböző minták fluoreszcenciája összehasonlítható, belőlük az eredeti DNS-mennyiségek aránya mérhető. A valóságban ez egy kicsit másképp történik: Megnézzük, hogy egy minta fluoreszcenciája mikor ér el egy adott küszöbértéket (treshold), és feljegyezzük az ehhez tartozó ciklusszámot (Ct treshold cycle = Cq quantification cycle). A két összehasonlítandó minta Cq értékeinek különbségéből ( $\Delta Cq$ ) számolható az eredeti minták DNS-aránya. Ha például X minta Cq értéke 3-mal nagyobb, mint Y-é ( $\Delta Cq=3$ ), akkor Y mintában  $2^3=8$ -szor annyi DNS volt eredetileg, mint az X-ben (5. ábra). A PCR hatékonysága persze nem 100%-os. Az éles kísérletek előtt hígítási sort használva minden primerpárra meghatározhatjuk az adott körülmények között a reakció határfokát. Ezt az értéket is figyelembe kell vennünk, ha a pontos arányokra kíváncsiak vagyunk. Általában minimum 90%-os hatékonyságot tekintünk elfogadhatónak, ha ennél alacsonyabb, akkor többnyire a primereket le kell cserélni.

Amplifikáció valós idejű detektálása



5. ábra

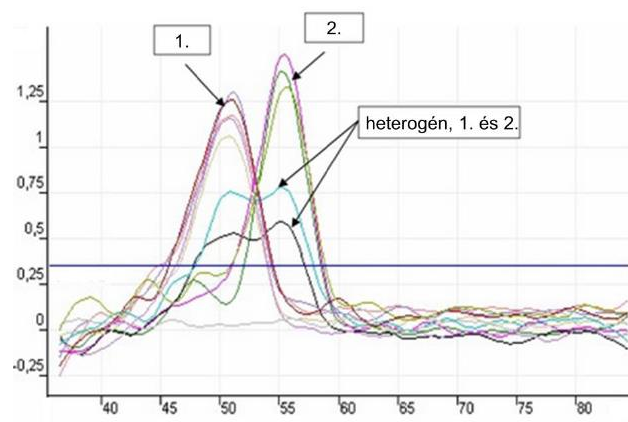
Az esetek többségében a hosszú denaturációs kezdő lépés (95 °C, 5 perc) után kétlépcsős ciklusokat alkalmazunk:

1. 95 °C, 30 sec: ezalatt denaturálódnak az amplitonok
2. x °C, 30 sec: Ezen a hőmérsékleten betapadnak a primerek, és megtörténik a polimerizáció (az enzim optimuma 72 °C, ezen a hőmérsékleten hozzávetőleg 1000 bázist képes beépíteni az enzim 60 másodpercenként, az általunk használt szuboptimális hőmérsékleten a polimerizáció sebessége jóval kisebb).

A felsokszorosítandó szakasz igen rövid, többnyire 60–200 bázispár hosszú, hogy a szuboptimális hőmérsékleten is rövid idő alatt végig érjen az enzim, valamint, hogy minimalizáljuk az amplitonok által felvehető másodlagos szerkezet komplexitását, így elkerüljük a határfok csökkenését.

A reakció specifitását kétféleképp tudjuk ellenőrizni. Az egyik módszer, hogy a reakcióterméket gélen megfuttatjuk. A másik módszer kevésbé idő- és munkaigényes: a PCR-ciklusok befejezése után a PCR-terméket nagyon lassú hőmérséklet-emeléssel melegítjük fel. Amikor a termék eléri a rá jellemző olvadási hőmérsékletet, a két szál elválnak egymástól, a fluoreszcencia hirtelen csökken. A melegítés során detektálható fluoreszcencia kirajzol egy olvadási görbét („melting curve”), melynek deriváltjáról könnyen leolvasható az olvadási hőmérséklet. Mivel a különböző PCR-termékek olvadási hőmérséklete nagy valószínűséggel más és más, több PCR-termék aspecifikus felszaporodása esetén többcsúcsú derivált görbét kapnánk. Ha csak egy csúcsot kapunk, az a reakció specifikusságát jelzi (6. ábra).

Amplikonok specifitásának ellenőrzése  
olvadási görbék analízisének segítségével

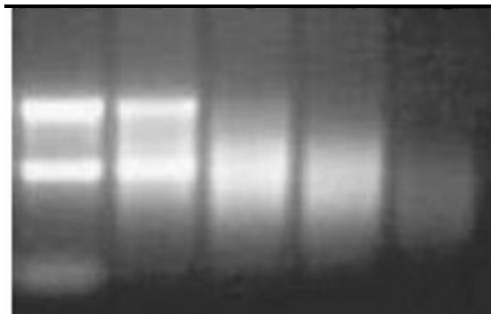


6. ábra

## Reverz transzkripciót követő qPCR (RT-qPCR)

A reverz transzkripció a természetben is előforduló jelenség, melyet retrovírusokban fedeztek föl. Mivel a retrovírusok örökítő anyaga RNS, annak érdekében, hogy a gazdasejt genomjába integrálódhasson, RNS-ét át kell fordítani DNS-re. Ennek eszköze a reverz transzkriptáz enzim. Az RT-PCR technika felhasználási lehetőségei: RNS alapú vírusfertőzések vagy rákos sejtmarkerek azonosítása, transzkripció szintek meghatározása, sejt- vagy szövetspecifikus cDNS könyvtárak létrehozása. Az RT-qPCR technikához tehát a vizsgálni kívánt sejtekből RNS izolálására van szükség. Számos RNS bontó enzim, RNáz létezik, melyek nagyon stabilak, és gyakorlatilag mindenhol jelen vannak. A bőrünkről, hajunkból folyamatosan kerülnek elhalt sejtek a környezetünkbe, melyek RNáz tartalmával számolnunk kell. RNS-izolálásnál tehát elsődleges szempont, hogy megakadályozzuk az RNázok hozzáférését a mintánkhoz.

Az izolálást ebből adódóan **nagyon tiszta körülmények között**, gyorsan, és lehetőleg minél alacsonyabb hőfokon (jégen hűtve) végezzük. Előre letisztított laborasztal és pipetták, tiszta kesztyű, RNázmentes oldatok és műanyagáru elengedhetetlen előfeltételek. Az extrakció elvégzésére többféle módszer is rendelkezésre áll. A hagyományos módszerek különféle reagensek, illetve körülmények hosszadalmas optimalizálása árán igen jó eredményt adhatnak, azonban egyre elterjedtebbek az RNS-izoláló kitek is. Ezek az RNS szilikagél, illetve anioncserélő-oszlop iránti affinitását használják ki. Ha RNS-t izolálunk, annak épségét gélelektroforézissel tudjuk ellenőrizni (elsősorban a riboszomális RNS-eket jelentő, jól elkülönült, két vastagabb csík alapján (7. ábra).



7. ábra

## Az RNS koncentrációjának és tisztaságának meghatározása NanoDrop segítségével

Az izolálás sikerességén lehet javítani a lépések optimalásával, azonban a végeredmény minőségéről minden esetben meg kell győződnünk. Ennek egyik legegyszerűbb módja az igen kis mintaigényű, ún. NanoDrop spektrofotométer használata. A NanoDrop UV-Vis spektrofotométerrel nagyon kis térfogatú fehérje- illetve nukleinsavminták koncentrációja is meghatározható. Nagy előnye, hogy mintaigénye nagyon kicsi (0,5-3  $\mu$ l). Figyelembe véve, hogy az izolált nukleinsav mennyisége nagyságrendekkel a klasszikus küvettás spektrofotométerek mintaigénye alatt (több 100  $\mu$ l) van, ez kulcsfontosságú. A gyakorlat során ismerni szükséges a spektrofotométerek alapvető működési elvét és a Lambert-Beer törvényt. A nukleinsavak mennyiségi meghatározásához általában a 260 nm-en mérhető elnyelést vesszük alapul, mivel a nukleinsavaknak ezen a hullámhosszon van abszorbancia maximumuk. Az elnyelés egyenesen arányos a minta RNS vagy DNS tartalmával.

Az elegyünknek azonban nem csak a koncentrációját kell meghatározni, fontos paraméter a tisztasága is. Amennyiben ennek meghatározása a cél, célszerű ún. spektrumot fölvenni, azaz nem csak egy, kitüntetett hullámhosszon végezni a mérést, hanem egy nagyobb tartományban. A nukleinsav- és fehérjeanalitikában felállíthatunk bizonyos arányszámokat, melyek az elegyünk tisztaságát jól jellemzik. Ezek a következők:

- **260/280 arány:** ha kicsi ez az arány, az protein, fenol vagy egyéb, 280 nm-en abszorbeáló szennyeződés jelenlétére utal: RNS esetén 2.0, DNS esetén 1.8 tekinthető megfelelő tisztaságúnak.
- **260/230 arány:** különböző szennyezők (etanol, fenol, guanidin, szénhidrátok, EDTA, tiocianátok) egyaránt rendelkeznek elnyeléssel 230 nm-en, így csökkentik ezt az arányt. 2.0-2.2 között ideális, ha ennél alacsonyabb, az jelzi a kontaminációt.

## A laborgyakorlat leírása

### A mérendő transzkriptumok

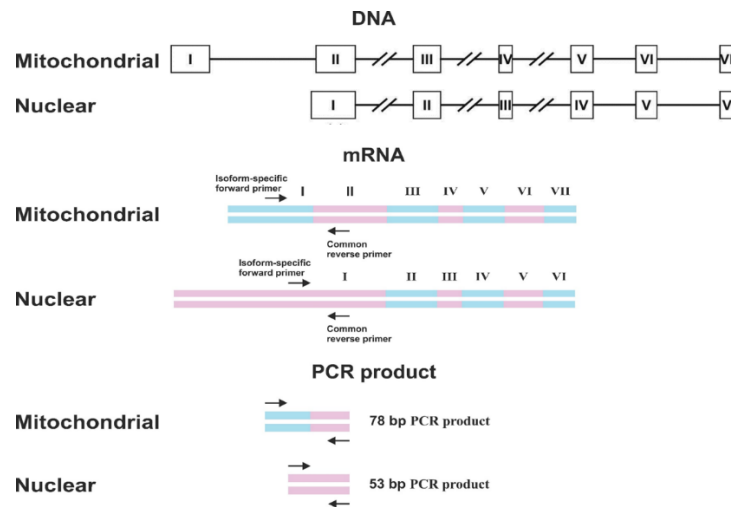
A gyakorlat során a *Dut* gén két izoformájának expressziós szintjét hasonlítjuk össze különböző egérszervekben. Az egereket felboncoltuk, a szerveit kiszedtük, azokból RNS-t izoláltunk. A kapott RNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDroppal meghatároztuk, épségét gélelektroforézissel ellenőriztük. Az RNS mintákból reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t készítettünk. A laborgyakorlat során az előre elkészített cDNS mintákkal fogunk dolgozni.

A *Dut* gén a dUTPáz nevű enzimet kódolja, amely a következő reakciót katalizálja:

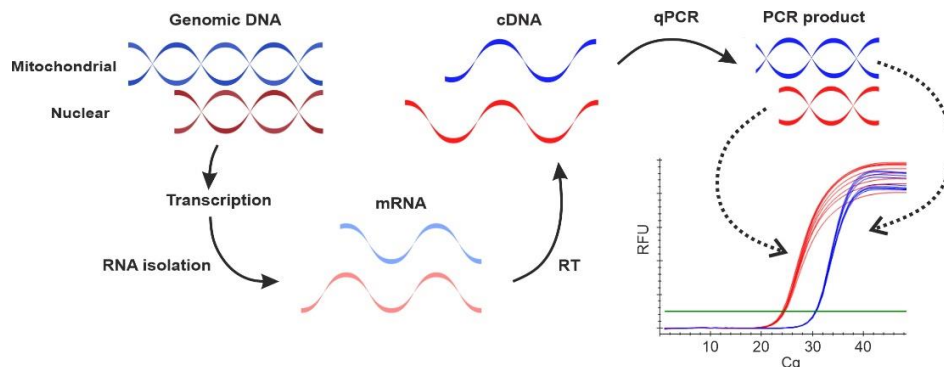


Az enzim fontos szerepet játszik a nukleotid anyagcserében, azonban biokémiai szerepének ismerete nem szükséges a laborgyakorlathoz.

A dUTPáz enzimnek két izoformája ismert egérben (és emberben is): a nukleáris izoforma a sejtmagban lokalizálódik, míg a mitokondriális izoforma a mitokondriumba transzportálódik. Az enzim két izoformáját egyaránt a *Dut* gén kódolja, azonban alternatív splicing révén két különböző transzkript keletkezik, amelyek csak az 5' végükön található első exonban térnek el. Az izoformaspecifikus meghatározáshoz az eltérő első exonba kellett primert tervezni (8. ábra).



8. ábra – A dUTPáz két izoformája. A számozott téglalapok az exonokat jelölik, a közöttük lévő egyenesek pedig az intronokat. A nyilak az alkalmazott primereket jelölik.



9. ábra – A lépések sematikus ábrázolása

## A $\Delta\Delta Cq$ módszer

Az RT-qPCR vizsgálatok döntő többségében az expressziós adatokat egy vagy több referenciagén segítségével normáljuk. A referenciagének az RNS bemérésének pontatlanságát hivatottak kiküszöbölni. Habár az összes RNS mennyiségét meg lehet határozni NanoDrop segítségével, arról nincs információnk, hogy a teljes RNS-poolon belül mennyi az mRNS-ek aránya, illetve ezen belül hogy változik az általunk vizsgált génről származó mRNS. Emiatt a vizsgált gének expresszióját olyan gének expressziójához viszonyítjuk, amelyek expressziós szintje stabil az adott kísérleti körülmények között.

A reverz transzkripció során az összes mRNS (és egyéb RNS is) átíródik cDNS-sé. A cDNS mintából azonos térfogatokat használunk a különböző gének expressziós szintjének méréséhez, így ezek szintje összevethető. A viszonyítást a következőképpen végezzük: a vizsgált gén  $Cq$  értékéből kivonjuk a referencia gén  $Cq$  értékét (illetve a  $Cq$  értékek átlagát). Amennyiben több referenciagént használunk, akkor a mért  $Cq$  értékek számtani átlagát képzik. Az így kapott érték a  $\Delta Cq$ , amely már független a RNS bemérésének pontatlanságától. Több minta összehasonlításakor pedig a  $\Delta Cq$  értékeket vetjük össze, két  $\Delta Cq$  érték különbségét  $\Delta\Delta Cq$ -nak nevezik, amelyről a módszert is elnevezték.  $(1+E)^{\Delta\Delta Cq}$ -szoros a különbség a vizsgált gén expressziós szintjében a két mintában.

A laborgyakorlat során két referenciagént mérünk: a GAPDH és a PPIA nevű enzimek expresszióját. A gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) egy glikolitikus enzim, míg a peptidilprolil izomeráz A (PPIA) egy, a fehérjefoldingban résztvevő enzim.

## A genomi DNS szennyezésének vizsgálata

Fontos megvizsgálni, hogy a mért jel valóban a cDNS molekulák amplifikációjának következménye-e, és nem a genomi DNS (gDNS) szennyezés következtében történik. Az alkalmazott primerek ugyanis a gDNS-ről is képesek terméket képezni abban az esetben, ha a két primer azonos exonhoz tapad ki, vagy az adott transzkriptum megtalálható a genomban retroszeudogén formájában. A retroszeudogének retrovirális eredetű, intronokat nem tartalmazó genomi szekvenciák. GAPDH és PPIA retroszeudogének többszörös kópiában szerepelnek a genomban.

A gDNS szennyezés vizsgálata céljából olyan kontrollokat alkalmazunk, amelyek még a reverz transzkripciót megelőzően a cDNS mintákkal azonos módon készülnek, azonban reverz transzkriptáz enzimet nem tartalmaznak (no reverse transcriptase control, NRT). Az NRT-k tehát a potenciális genomi szennyezést azonos mértékben tartalmazzák, mint a cDNS minták, azonban cDNS nem képződik az enzim hiányában. A mérés eredménye akkor elfogadható, ha több nagyságrendnyi különbség van a cDNS és NRT minták között.

## A mérés kivitelezése

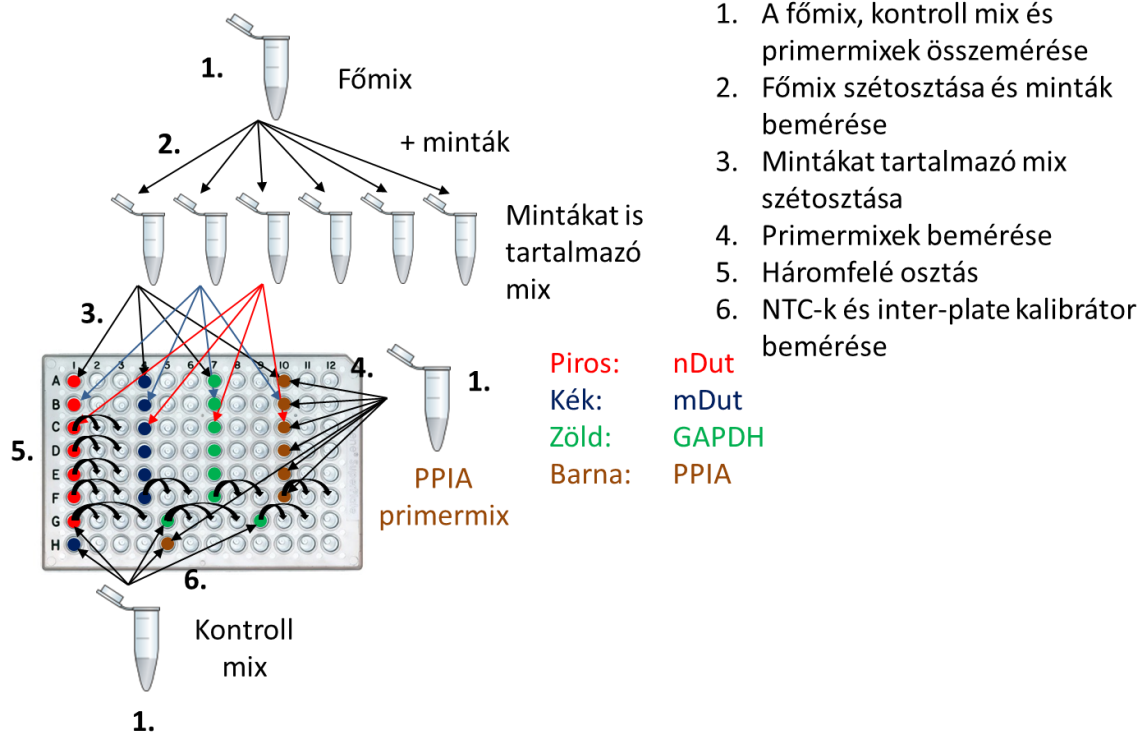
A mérés elvégzéséhez számos mix elkészítése szükséges, ezeknek a pontos összetétele lejjebb található. A mérés során ún. génmaximalizáló módszert alkalmazunk, melynek lényege, hogy az összes vizsgált gén egy plate-en mérhető. A módszer alkalmazhatóságának feltétele egy részletes optimalizálás.

Az összemérés sematikusán a 9. ábrán látható, amely számozva mutatja a következő lépéseket:

1. Először elkészítjük a **főmixet**, ami tartalmazza a Taq polimeráz enzimet, a dNTP-eket, magnéziumot, puffert, az interkalálódó EvaGreen festéket és nukleázmentes vizet. A négy transzkript amplifikációjához különböző primerek szükségesek, amelyek különböző koncentrációban működnek optimálisan, így szükség van a négyféle **primermix** elkészítésére, hogy ezekből azonos térfogatot tudjunk bemérni. A **kontrollmixet** szintén elkészítjük.
2. A **főmixet** 6 részre osztjuk (99  $\mu$ l), mivel mindhárom mérendő szervhez tartozik egy cDNS minta és egy NRT kontroll. Ezekbe azonos mennyiségű templátot (cDNS mintát) mérünk (4  $\mu$ l-t).
3. A **mintákat tartalmazó mixeket** a PCR plate négy welljébe szétosztjuk a négy transzkript (nukleáris és mitokondriális dUTPáz, GAPDH, PPIA) mérése céljából. Egy adott **mintát tartalmazó mixből** mindig az 1., 4., 7. és 10. oszlopba pipettázunk 24  $\mu$ l-t. A minták a plate-en egymás alatt helyezkednek el az A-F sorokban.
4. A **mintákat tartalmazó mixhez** hozzámérjük a **primermixet** PCR plate-en, így kapjuk a **reakciómixeket**. Az A-F sorokban az 1. wellbe nDut **primermixet** mérünk, a 4. wellbe mDut, a 7. wellbe GAPDH, valamint a 10. wellbe PPIA **primermixet** mérünk (egységesen 6  $\mu$ l-t).
5. A **reakciómixeket** föl-le pipettázással alaposan elkeverjük és három részre szétosztjuk, így három technikai párhuzamos mérését végezzük.
6. A **kontrollmixből** az NTC kontrollok, valamint **inter-plate kalibrátor** mérését végezzük. Az NTC-k vizsgálatához **kontrollmixet**, nukleázmentes vizet és **primermixet** mérünk össze plate-en. Az nDut NTC mixet a G1 wellbe, az mDut NTC mixet a H1 wellbe, a GAPDH NTC mixet a G5 wellbe, míg a PPIA NTC mixet a H5 wellbe mérjük össze. Az így keletkező **NTC mixeket** négy részre osztjuk, négy technikai párhuzamos méréshez. Az inter-plate kalibrátor összeméréséhez **kontrollmixet**, **GAPDH primermixet** és az **inter-plate kalibrátor** templátot mérjük össze a G9-es wellbe, amelyet három részre szétmérünk a G9-G11 wellbe.

Az NTC kontrollok nem tartalmaznak semmilyen templátot, így ideális esetben nem történik amplifikáció sem. Ha mégis történik, az kontamináció következménye. Az inter-plate kalibrátor célja, hogy több külön PCR plate-en elhelyezkedő minták is összehasonlíthatóak legyenek. Ehhez egy sok részre kiporciózott mintát használunk, így mindig pontosan ugyanolyan koncentrációk mellett végezhető a reakció. A futások közti Cq értékek különbségét szisztematikusnak tekintjük a teljes plate-re, ezzel korrigálhatjuk az értékeket.

A plate elkészültekor minden well 10 µl elegyet tartalmaz. A plate-et ragadós fóliával lezárjuk, és qPCR készülékbe helyezük. A protokoll befejezte után az eredményeket a qPCR készülék saját software-e segítségével kiértékeljük.



10. ábra – Az összemérés menete



## **A mixek összetétele:**

### nDut mix

- 25 µl forward nDut primer (100 µM)
- 25 µl reverse nDut primer (100 µM)

### mDut mix

- 6,25 µl forward mDut primer (100 µM)
- 25 µl reverse mDut primer (100 µM)
- 18,75 µl nukleázmentes víz

### GAPDH mix

- 7,5 µl forward GAPDH primer (100 µM)
- 7,5 µl reverse GAPDH primer (100 µM)
- 45 µl nukleázmentes víz

### PPIA mix

- 7,5 µl forward PPIA primer (100 µM)
- 7,5 µl reverse PPIA primer (100 µM)
- 45 µl nukleázmentes víz

### Főmix

- 403 µl MyTaq HS mix (Bioline) – tartalmazza az enzimet, dNTP-ket, magnéziumot, puffert
- 40,3 µl EvaGreen festék (Biotium)
- 170,5 µl nukleázmentes víz

### Kontroll mix

- 105 µl MyTaq HS mix (Bioline) – tartalmazza az enzimet, dNTP-ket, magnéziumot, puffert
- 10,5 µl EvaGreen festék (Biotium)
- 10,5 µl nukleázmentes víz

### Mintákat tartalmazó mixek:

- 99 µl főmix
- 4 µl minta (vese (B3c, B3R), vastagbél (B4c, B4R), csecsemőmirigy (A12c, A12R))

### Reakciómixek

- 24 µl mintákat tartalmazó mix
- 6 µl primermix

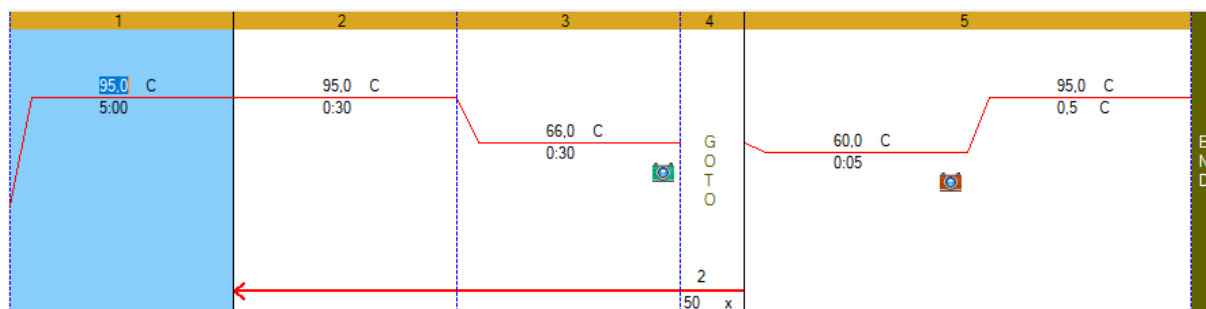
### NTC mixek

- 24 µl kontrollmix
- 8 µl primermix
- 8 µl nukleázmentes víz

### Inter-plate kalibrátor (IPC)

- 18 µl kontrollmix
- 6 µl GAPDH primermix
- 6 µl inter-plate kalibrátor templát

## qPCR protokoll



11. ábra

95°C – 5 perc

50 ciklus: 95°C – 30 másodperc

66°C – 30 másodperc

60→95°C olvadásgörbe felvétele (0,5°C-onként vesszük fel a pontokat 5 másodpercenként)

### Ajánlott irodalom

Nyitrai László: Géntechnológia és fehérjemérnökség

Wundelich Lívius: Molekuláris biológiai technikák

Pataki Zoltán: A NanoDrop használata nukleinsav mérésre. Labtutorials in Biology

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Stryer, L. (2002). Biochemistry. New York: W.H. Freeman.

Allison, L. A. (2007) Fundamental Molecular Biology. Blackwell Publishing

Rácz GA, Nagy N, Gál Z, Pintér T, Hiripi L, Vértessy BG, Evaluation of critical design parameters for RT-qPCR-based analysis of multiple dUTPase isoform genes in mice. FEBS Open Bio. 2019; 9(6):1153-1170.

### Ajánlott egyéb oktatóanyagok

[PCR](#)

[PCR video](#)

[PCR video #2](#)

[Overview of qPCR video](#)

[Reverse transcription video](#)

[Reverse transcriptase – effects of Ct value video](#)