

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή Τίτλου Ειδίκευσης

Ανάπτυξη μεθόδου ελέγχου ποιότητας του RNA με την χρήση Real-Time PCR με φθορίζοντες εκκινητές

ΜΠΟΥΡΝΕΛΕ ΔΕΣΠΟΙΝΑ

**Επιβλέπων ερευνητής : ΚΑΦΕΤΖΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ
Επιβλέπουσα καθηγήτρια : ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΚΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2006



Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και όλους αυτούς που βρέθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν αυτά τα δυο χρόνια του μεταπτυχιακού.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δημήτρη Καφετζόπουλο για τις επιστημονικές συμβουλές του, τις συζητήσεις και την καθοδήγηση του σ' όλο το διάστημα της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα παιδιά από το εργαστήριο, που με άντεξαν έναν ολόκληρο χρόνο και με την παρουσία τους στις δύσκολες στιγμές αποτέλεσαν για μένα μια σανίδα σωτήριας : τη Μανουέλα, για την τεχνική βοήθεια και τις συζητήσεις αυτοκριτικής, τη Μαρίνα για το χαμόγελο και την αισιοδοξία της, τη Σοφία για τις αστείες ατάκες και τα πειράγματα της και φυσικά τα « μικρουλάκια », το Μαρινάκι και το Νίκο και το μικρούλι, τη Ρίτσα που με την παρέα τους συνέβαλαν στην χαρούμενη ατμόσφαιρα του εργαστηρίου. Για τον Θανάση, δεν ξέρω από πού να αρχίσω. Η παρουσία του ήταν πολύτιμη και καθοριστική για ότι έχω καταφέρει. Οι επιστημονικές συμβουλές και το μεγαλείο του χαρακτήρα του με κάνουν καλύτερο άνθρωπο.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω και στους αγαπημένους μου ανθρώπους, που ήταν δίπλα μου ανελλιπώς και έδωσαν χρώμα σ' αυτήν την περιπέτεια.

Οι συμφοιτητές μου από τα προπτυχιακά χρόνια στο βιολογικό αποτελούν για μένα μια μικρή οικογένεια διεσπαρμένη πλέον σ' όλη την Ελλάδα. Ο τελευταίος χρόνος δε θα περνούσε ποτέ χωρίς τη συμπαράσταση και την παρέα της Δήμητρας. Μαζί στις αγωνίες, στο άγχος, στις καλές και στις κακές στιγμές που ήρθαν αυτό τον χρόνο. Η Μαρία αποτέλεσε στήριγμα στα δύσκολα, πάντα παρούσα στα λιγοστά ξενύχτια και στις ατέλειωτες ώρες συζητήσεων. Η Αφροδίτη, αν και μας εγκατέλειψε το τελευταίο χρόνο για πιο όμορφα μέρη, με τις τακτικές της επισκέψεις στο νησί κατάφερε να είναι πάντα δίπλα μου και να μου μεταδίδει την τρέλα και τον αυθορμητισμό της. Και φυσικά οι υπόλοιποι της παρέας : ο Αντώνης, ο Ανδρέας, ο Γιάννης και ο Δουλάκης αποτελούσαν μια όαση χαλάρωσης και ένα flashback στις μοναδικές στιγμές των φοιτητικών χρόνων.

Τέλος, ότι και να πω θα είναι λίγο για τους γονείς μου και την αδελφή μου. Πάντα δίπλα μου, υπομένουν, δείχνουν κατανόηση και στηρίζουν κάθε επιλογή μου. Τι περισσότερο να πω, από το ότι αποτελούν για μένα την προσωποποίηση της αγάπης...

Ηράκλειο 17/10/2006

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
Σημασία της ποιότητας του RNA για τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης	8
Μέθοδοι ελέγχου της ποιότητας του RNA	9
Έλεγχος της ποιότητας του RNA με PCR	10
Ποσοτικοποίηση RNA με Real-time RT-PCR	11
Κινητική της real-time PCR αντίδρασης	12
Απόλυτη ποσοτικοποίηση με χρήση πρότυπης καμπύλης	13
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	21
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

Abstract

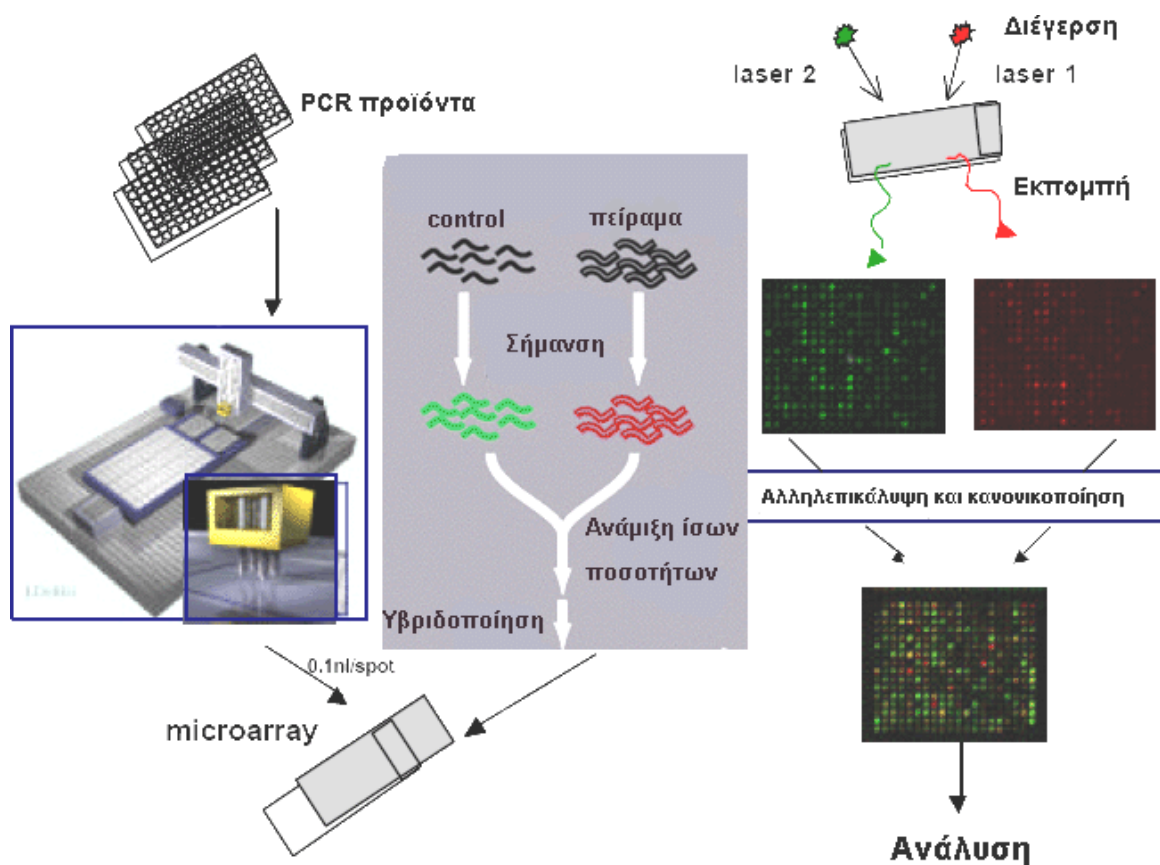
To understand gene function, it is helpful to know where, when, how much a gene is expressed and what other genes are coexpressed with it. By making possible the parallel measurement of gene expression of thousands of genes, microarrays appear as a tempting and valuable tool. Their potential for parallel expression changed the way biological questions were asked into a more global direction. DNA microarrays estimate the expression of each gene by measuring the concentration of the corresponding mRNA. So, the quality of the investigated mRNA is of prime importance for the microarray experiments. In a degraded RNA sample, cleaved mRNA molecules may no longer be representative of the absolute amount of transcripts and of their relative abundance. The conventional methods for RNA quality assessment are not considered to be sufficient. Therefore the necessity arises to develop sensitive methods for estimating the integrity of transcripts after RNA preparation. Here we propose a new quality control method for RNA by means of quantitative reverse transcription real-time PCR assaying the integrity of a long constitutively expressed and abundant transcript.

Περίληψη

Η αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος συνοδεύτηκε από μια πληθώρα δημοσιεύσεων με σκοπό την αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας των γονιδίων. Το μεγαλύτερο μέρος από αυτές τις μελέτες αποτελείται από μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε διαφορετικούς ιστούς (πχ καρδιά, ήπαρ κτλ) ή καταστάσεις (πχ φυσιολογική, παθολογική). Παρόλο το τεράστιο πλήθος πληροφοριών που έχουν προκύψει, η σύνεση και συσχέτισή τους παραμένει ένα εξαιρετικά δύσκολο αντικείμενο. Ο κύριος λόγος αυτού του φαινομένου είναι η έλλειψη ελέγχου ποιότητας κατά τα στάδια παραγωγής των δεδομένων. Το πρώτο στάδιο ελέγχου και καθοριστικό για την περαιτέρω παραγωγή γνώσης είναι η ποιότητα του ίδιου του δείγματος. Η ακεραιότητα του RNA έχει μεγάλη σημασία, κυρίως όταν η τεχνική μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης εκμεταλλεύεται την παρουσία της polyA ουράς στα αγγελιοφόρα μετάγραφα. Λόγω της σημασίας της ποιότητας του RNA, έχουν προταθεί μέχρι σήμερα μια σειρά από μεθόδους εκτίμησής του. Οι μέθοδοι αυτές έχουν μειονεκτήματα: άλλες είναι ποιοτικές και σε μεγάλο βαθμό υποκειμενικές, άλλες κρίνουν την ποιότητα μετά το τέλος όλης της διαδικασίας της μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης, ενώ οι περισσότερες χρησιμοποιούν την ακεραιότητα του ριβοσωμικού RNA ως ενδεικτικό για την ποιότητα του αγγελιοφόρου. Σ' αυτή την εργασία, δείχνουμε τη δυνατότητα της άμεσης ποσοτικής μέτρησης της ποιότητας του αγγελιοφόρου RNA χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο αγγελιοφόρο μετάγραφο. Στο πρώτο στάδιο βρήκαμε το πρότυπο μετάγραφο μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης. Κατόπιν το κλωνοποιήσαμε και σχεδιάσαμε τα υλικά για την εκτίμηση της ποιότητάς του. Τέλος, δείξαμε τη δυνατότητα χρήσης τους για τη μέτρηση της ποιότητας του RNA.

Εισαγωγή

Η απόκριση και η προσαρμογή ενός κυττάρου σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα εξαρτώνται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, που βρίσκονται κωδικοποιημένα στο DNA του. Τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης, ιδιαίτερα στους πολυκύτταρους οργανισμούς ρυθμίζονται από πολύπλοκους μηχανισμούς. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης όπως είναι τα Northern blots, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), αλληλούχηση βιβλιοθηκών cDNA. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της έκφρασης του συνόλου του γονιδιώματος αντί μεμονωμένων γονιδίων. Πρόκειται για μια τεχνολογία - πλατφόρμα που μπορεί να εκμεταλλευτεί το μεγάλο όγκο πληροφορίας από τις αλληλουχήσεις των γονιδιωμάτων και να συμβάλει μαζικά στη μεταγονιδιωμιακή έρευνα. Στηρίζεται στη σήμανση των νουκλεϊκών οξέων με φθορίζουσες ή ραδιοσημασμένες ομάδες και στην υβριδοποίηση τους σε τμήματα DNA που είναι τοποθετημένα σε καθορισμένες θέσεις πάνω σε γυάλινα πλακίδια (DeRisi et al., 1997).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής των μικροσυστοιχιών και παραλαβής προφίλ γονιδιακής έκφρασης.

Υπάρχουν δυο κύριες κατηγορίες πλατφόρμας μικροσυστοιχιών : η πρώτη που αντιπροσωπεύεται από την Affymetrix, βασίζεται σε συστοιχίες που συντίθενται φωτοχημικά, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει γυάλινα πλακίδια είτε με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων που έχουν συντεθεί εκ των προτέρων είτε με προϊόντα PCR ακινητοποιημένα στην επιφάνεια τους. Η τεχνολογία της Affymetrix χρησιμοποιεί για κάθε γονίδιο-στόχο αρκετούς ανιχνευτές μήκους 25 ολιγονουκλεοτιδίων, ενώ κάθε φορά ένα μόνο δείγμα υβριδοποιείται σε κάθε συστοιχία. Αντίθετα, η τεχνολογία των τυπωμένων συστοιχιών περιέχει για κάθε γονίδιο-στόχο μόνο έναν ανιχνευτή μήκους 50-70 ολιγονουκλεοτιδίων. Σε αυτήν την περίπτωση, δυο διαφορετικά σημασμένα δείγματα υβριδοποιούνται ταυτόχρονα και το σήμα υβριδοποίησης κάθε δείγματος μετριέται σε διαφορετικό μήκος κύματος (Εικόνα 1).

Οι μικροσυστοιχίες DNA χρησιμοποιούνται για ανίχνευση γονιδιακών διπλασιασμών ή απαιεφών (Albertson, 2003), πολυμορφισμών στην αλληλουχία του DNA (Liljedahl et al., 2003), αλληλεπιδράσεων DNA-πρωτεϊνών (Ren et al., 2000), δευτεροταγούς δομής του RNA (Mir and Southern, 1999), αλλά η κύρια χρήση τους είναι η μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης. Οι μετρήσεις, που παραλαμβάνονται με τη χρήση μικροσυστοιχιών, αποτελούν άμεσο δείκτη της μεταγραφικής κατάστασης κάθε γονιδίου. Μεταβολές στην έκφραση είναι υπεύθυνες για μορφολογικές και φαινοτυπικές αλλαγές, καθώς και ενδεικτικές κυτταρικής απόκρισης σε εξωτερικά ερεθίσματα. Η εφαρμογή της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA στη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης έχει βοηθήσει στην αναγνώριση ιστοειδικών γονιδίων, μοριακών δεικτών για συγκεκριμένες ασθένειες, μοριακών μονοπατιών και στη μελέτη επίδρασης ουσιών σε βιολογικά συστήματα.

Η άντληση βιολογικά χρήσιμης πληροφορίας από την πληθώρα δεδομένων, που προκύπτουν από τις μετρήσεις της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορες συνθήκες, συνιστά μια απαιτητική διαδικασία. Γονίδια με ανάλογο προφίλ έκφρασης έχουν άμεσα ή έμμεσα και λειτουργική σχέση μεταξύ τους. Η ανάλυση των προφίλ γίνεται συνήθως με χρήση κατάλληλων προγραμμάτων στατιστικής, τα οποία χρησιμεύουν για κανονικοποίηση των δεδομένων (διόρθωση των σφαλμάτων που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία) και ομαδοποίηση τους. Για αποτελεσματικότερη επεξεργασία χρησιμοποιούνται στη μικροσυστοιχία προεπιλεγμένα γονίδια-μάρτυρες (control) με βάση τα οποία μπορούν να εξαχθούν συγκριτικά αποτελέσματα.

Σημασία της ποιότητας του RNA για τα πειράματα γονιδιακής έκφρασης

Η ποιότητα του mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στα πειράματα που έχουν ως στόχο τον υπολογισμό της γονιδιακής έκφρασης, όπως είναι η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών και η τεχνική SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Η αποικοδόμηση του RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα στάδια, από την καλλιέργεια των κυττάρων ή την τομή του ιστού μέχρι την απομόνωση, τον καθαρισμό και την αποθήκευση του RNA.

Η κύρια αιτία της αποικοδόμησης του RNA είναι η ύπαρξη των ριβονουκλεασών. Πρόκειται για ένζυμα θερμοσταθερά και ανθεκτικά στην αποδιάταξη τα οποία απαιτούνται για το μεταβολισμό του RNA. Η απενεργοποίηση αυτών των ενζύμων στο στάδιο της απομόνωσης του RNA γίνεται με τη χρήση αποδιατακτικών ουσιών, όπως η ισοθειοκυανική γουανιδίνη, που έχουν την ικανότητα να αποδιατάσσουν αποτελεσματικά τις ριβονουκλεάσες. Ακόμη, ο προτιμότερος τρόπος αποθήκευσης του RNA είναι σε ίζημα με αιθανόλη, όπου οι ριβονουκλεάσες δεν είναι ενεργές.

Αναμφίβολα, η απουσία ενός ολόκληρου, ακέραιου μηνύματος μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή και λανθασμένα αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης. Τα αποικοδομημένα μόρια mRNA πιθανόν να μην είναι αντιπροσωπευτικά της απόλυτης ποσότητας των μεταγράφων και της σχετικής αφθονίας τους και να οδηγούν σε αναξιόπιστα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, τα RNA δείγματα που δεν πληρούν τα κριτήρια ποιότητας πρέπει να μην χρησιμοποιούνται σε πειράματα μικροσυστοιχιών.

Μέθοδοι ελέγχου της ποιότητας του RNA

Ο παραδοσιακός τρόπος ελέγχου της ποιότητας του RNA γίνεται με οπτική ανάλυση του ριβοσωμικού RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Το ριβοσωμικό RNA αποτελεί το 80-90% του συνολικού RNA των κυττάρων. Μετά από ηλεκτροφόρηση του RNA σε πηκτή αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, οι ζώνες 18S και 28S του rRNA είναι ορατές. Το σχετικό μέγεθος των δυο αυτών ζωνών παρέχει μια γενική εκτίμηση της ποιότητας του RNA. Στα δείγματα που θεωρούνται ότι το RNA τους είναι καλής ποιότητας, το μέγεθος της 28S ζώνης πρέπει να είναι διπλάσιο από το μέγεθος της 18S ζώνης του rRNA (David Bowtell, 2002), αφού το 18S rRNA είναι πιο ανθεκτικό έναντι στην αποικοδόμηση από ότι το 28S rRNA. Ωστόσο, αυτός ο έλεγχος της ποιότητας του RNA δεν είναι ακριβής, αφού δε μπορεί με απλή οπτική παρατήρηση να εκτιμηθεί το σχετικό μέγεθος των δυο ζωνών. Ακόμα, μικρά επίπεδα αποικοδόμησης δεν μπορούν να ανιχνευτούν, λόγω της λιγιστής επίδρασης που θα έχει στο μέγεθος της 28S ζώνης του rRNA.

Μια αντίστοιχη αλλά πιο αυτοματοποιημένη μέθοδος για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA αποτελεί η τεχνολογία της Agilent (Agilent RNA LabChip and 2100 Bioanalyzer), όπου μετά από ηλεκτροφόρηση σε μικροτριχοειδή, υπολογίζεται η ποσότητα του ριβοσωμικού RNA σε κάθε δείγμα και οι μετρήσεις απεικονίζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (Anna Almeida, 2004).

Ωστόσο, η χρήση του ριβοσωμικού RNA για την εκτίμηση της ποιότητας του RNA είναι σε θέση να ανιχνεύσει μόνο κάποια μεγάλη ζημιά στο rRNA, ενώ μικρή αποικοδόμηση μπορεί να μην είναι ορατή και ανιχνεύσιμη. Ένα επιπλέον μειονέκτημα είναι ότι με τον τρόπο αυτό δε μελετάται η ποιότητα του mRNA, το οποίο πιθανόν να είναι και πιο ευαίσθητο σε αποικοδόμηση από ότι το rRNA. Επομένως, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ακεραιότητας των μεταγράφων μετά την επεξεργασία του RNA.

Μια απλή μέθοδος για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, που ξεπερνά όλα τα προαναφερθέντα προβλήματα, είναι η ποσοτικοποίηση ενός ή περισσοτέρων μεταγράφων με αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) (Galvin et al., 2000). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση της ποσότητας μορίων που βρίσκονται σε αυξανόμενη απόσταση από την poly-A ουρά ενός μεγάλου μήκους mRNA που εκφράζεται συστατικά (housekeeping). Φυσιολογικά, αν όλα τα αρχικά μόρια του RNA είναι ακέραια και δεν έχουν υποστεί αποικοδόμηση, από την αντίστροφη μεταγραφή ενός mRNA μέσω ενός oligo-dT εκκινητή, θα προκύψει cDNA με ολόκληρο μέγεθος. Αντίθετα, τυχόν αποικοδόμηση θα έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν λιγότερα κομμάτια του 5' άκρου του μεταγράφου σε σύγκριση με το 3' άκρο. Η μέθοδος απαιτεί ένα μεγάλο μετάγραφο και ζεύγη εκκινητών που να πολλαπλασιάζουν διαφορετικές περιοχές κατά μήκος του γονιδίου. Ο βαθμός της αποικοδόμησης του RNA υπολογίζεται από το λόγο του προϊόντος PCR με το ζεύγος των εκκινητών που πολλαπλασιάζουν το 5' άκρο προς το προϊόν στο 3' άκρο.

Επομένως, με την χρήση ενός μεγάλου μήκους μεταγράφου για ένα γονίδιο που εκφράζεται σε όλες τις συνθήκες και σε όλους τους ιστούς μπορεί να εκτιμηθεί η κατάσταση της ποιότητας του RNA.

Έλεγχος της ποιότητας του RNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Ένα παράδειγμα ελέγχου της ποιότητας του RNA με την προαναφερθείσα μέθοδο αποτελεί η πειραματική διαδικασία που ακολούθησαν οι Galvin και συνεργάτες, οι οποίοι χρησιμοποίησαν το μήκος 10Kb μεταγράφο του γονιδίου της συνθάσης λιπαρών οξέων και ποσοτικοποίησαν την ακεραιότητα του μεταγράφου μέσω ημι-ποσοτικής RT-PCR. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε μέσω ενός oligo-dT εκκινητή και τμήματα του μεταγράφου σε διαφορετικές αποστάσεις από το 3' άκρο της poly-A ουράς πολλαπλασιάστηκαν μέσω PCR με τη χρήση ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Η ποσοτικοποίηση έγινε με μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενέργειας σε ένα στάδιο πριν τη φάση plateau της PCR.

Μια αντίστοιχη μέθοδος χρησιμοποιεί και η Affymetrix, όπου υπολογίζονται τα σήματα υβριδοποίησης των probe sets που αντιστοιχούν στο 5' άκρο και στο 3' άκρο των μεταγράφων της ακτίνης και του GAPD, για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA (Affymetrix GeneChip Quality Control). Για να θεωρηθεί ένα δείγμα RNA καλό, πρέπει ο λόγος του σήματος του 3' άκρου προς το σήμα του 5' άκρου να είναι μικρότερος από 2, ενώ μεγαλύτερος λόγος δείχνει την ύπαρξη αποικοδόμησης.

Ποσοτικοποίηση RNA με Real-time RT-PCR

Στην real-time PCR πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του DNA μέσω μιας θερμοσταθερής πολυμεράσης και ενός ζεύγους εκκινητών, όπως και στη συμβατική αντίδραση PCR, με τη διαφορά ότι στη real-time PCR είναι δυνατή η παρατήρηση των προϊόντων που παράγονται μετά από κάθε κύκλο καθώς η αντίδραση προχωράει. Η real-time PCR αποτελεί τη πιο διαδεδομένη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA ή RNA, αφού δεν απαιτεί τη χρήση ραδιοσημασμένων εκκινητών και εμφανίζει το πλεονέκτημα της παρατήρησης των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων, χωρίς να χρειάζεται να ανοίγουμε το σωληνάκι της αντίδρασης, που αυξάνει τις πιθανότητες μόλυνσης των προϊόντων.

Τα κύρια στάδια μιας αντίδρασης real-time PCR είναι :

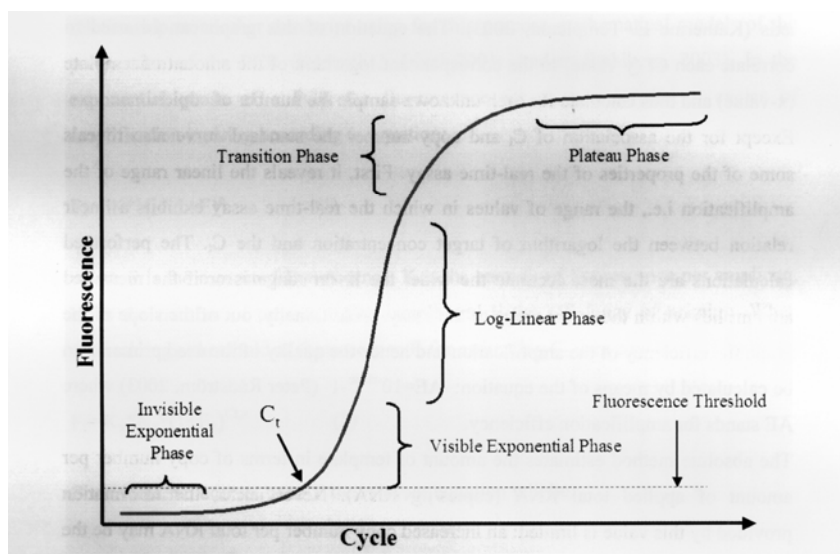
- αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA
- πολλαπλασιασμός και παρατήρηση των επιπέδων των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων
- εύρεση του κύκλου στον οποίο ο φθορισμός φτάνει στο επιθυμητό επίπεδο πάνω από το όριο φθορισμού (C_t)
- υπολογισμός της ποσότητας του προϊόντος στο δείγμα μέσω συσχέτισης του C_t με μια πρότυπη καμπύλη.

Υπάρχουν δυο κύριες κατηγορίες χημικών για τη μέτρηση του προϊόντος κατά τη real-time PCR (Ian MacKay, 2002). Στην πρώτη κατηγορία τα χημικά (Scorpions, Molecular beacons, Taqman) είναι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές που αναγνωρίζουν μια αλληλουχία στο πολλαπλασιαζόμενο προϊόν και όταν υβριδοποιούνται με την αλληλουχία-στόχο εκπέμπουν φθορισμό μετά από απορρόφηση. Ο φθορισμός που εκπέμπεται είναι αναλογικός του παραγόμενου PCR προϊόντος.

Η δεύτερη κατηγορία χημικών περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τη Sybr Green I, η οποία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των προϊόντων στις αντιδράσεις real-time PCR. Η Sybr Green I προσδένεται ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA και εκπέμπει φθορισμό μετά από απορρόφηση. Τα επίπεδα του φθορισμού μετά από κάθε κύκλο σχετίζονται με τον αριθμό των δίκλωνων μορίων DNA στην αντίδραση. Ο φθορισμός αυξάνεται μετά από κάθε κύκλο καθώς αυξάνεται η ποσότητα του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος. Η Sybr Green I έχει το μειονέκτημα ότι προσδένεται και σε μη-ειδικά δίκλινα προϊόντα της αντίδρασης PCR κι έτσι το σήμα φθορισμού δεν είναι ειδικό μόνο για το προϊόν μας. Ωστόσο, αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με αύξηση της θερμοκρασίας, έτσι ώστε να λιώνουν τα μη-ειδικά προϊόντα. Επομένως, η μέτρηση του φθορισμού με την Sybr Green I πρέπει να πραγματοποιείται σε μια θερμοκρασία αρκετά υψηλή για να λιώσουν τα μη-ειδικά προϊόντα, αλλά αρκετά χαμηλή έτσι ώστε το επιθυμητό προϊόν να είναι σε δίκλινη μορφή (Bustin, 2000).

Κινητική της real-time PCR αντίδρασης

Στη διάρκεια μιας αντίδρασης real-time PCR, ο φθορισμός που εκπέμπεται και καταγράφεται σχηματίζει μια σιγμοειδή καμπύλη. Στην αρχή της αντίδρασης, όπου το προϊόν πολλαπλασιάζεται εκθετικά, ο φθορισμός παραμένει σε σταθερά επίπεδα, αλλά το προϊόν δεν είναι ορατό ακόμα, αφού ο φθορισμός του δεν είναι σημαντικά πιο μεγάλος από τον φθορισμό του background. Έπειτα, υπάρχει μια εκθετική φάση, όπου ο φθορισμός ξεπερνά τον φθορισμό του background και συνεχίζει να αυξάνει. Στην συνέχεια, ακολουθεί μια ημιλογαριθμική φάση, που οδηγεί σε ένα μεταβατικό στάδιο στο οποίο μειώνονται τα αντιδραστήρια της PCR και καταλήγει σε μια φάση plateau, όπου ο φθορισμός παραμένει σταθερός (Ian MacKay, 2002).



Εικόνα 2. Κινητική της real-time PCR αντίδρασης

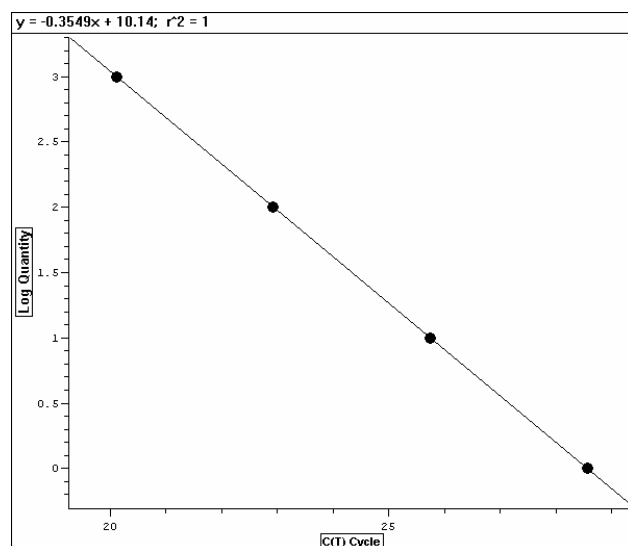
Κατά τη μέτρηση του φθορισμού σε μια real-time PCR αντίδραση, υπολογίζεται ο κύκλος με το όριο φθορισμού (C_t). Το C_t αντιπροσωπεύει είτε τον κύκλο στον οποίο τα επίπεδα φθορισμού της αντίδρασης είναι για πρώτη φορά σαφώς πάνω από το background (Ian MacKay, 2002) είτε τον κύκλο στον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά ένα καθορισμένο κατώφλι (Bustin, 2000; Livak and Schmittgen, 2001). Αυτό το κατώφλι επιλέγεται να είναι στην εκθετική φάση της αντίδρασης, αφού σε αυτό το στάδιο υπάρχει πληθώρα των απαραίτητων αντιδραστηρίων και η αντίδραση πολλαπλασιασμού δεν αναστέλλεται από άλλα προϊόντα που μπορεί να έχουν συσσωρευτεί. Ωστόσο, το C_t από μόνο του δε δίνει πολλές πληροφορίες για την ποσότητα του DNA-στόχου στο δείγμα, αλλά είναι ενδεικτικό για την ποσότητα της μήτρας-DNA, αφού όσο περισσότερο είναι το αρχικό DNA στο δείγμα, τόσο λιγότεροι κύκλοι απαιτούνται μέχρι το καθορισμένο κατώφλι φθορισμού. Επομένως, το C_t πρέπει να συσχετίζεται με τον αριθμό των μεταγράφων του DNA-στόχου στο δείγμα.

Υπάρχουν δυο τρόποι για να γίνει η συσχέτιση του αριθμού των μεταγράφων με τις τιμές του C_t . Στην πρώτη περίπτωση, χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη για την έκφραση της απόλυτης ποσότητας των μεταγράφων σε ένα δείγμα (απόλυτη ποσοτικοποίηση), ενώ στη δεύτερη περίπτωση τα επίπεδα έκφρασης εκφράζονται ως

ποσοστό αλλαγής σε σχέση με ένα γονίδιο το οποίο έχει δείχθει ότι παραμένει σταθερό (σχετική ποσοτικοποίηση).

Απόλυτη ποσοτικοποίηση με χρήση πρότυπης καμπύλης

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση συσχετίζει τις τιμές του C_t με τον αριθμό των μεταγράφων σε ένα δείγμα μέσω μιας πρότυπης καμπύλης. Για το λόγο αυτό το cDNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει κλωνοποιείται σε ένα πλασμιδιακό φορέα και διαφορετικές αραιώσεις του φορέα μαζί με το γονίδιο χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό της πρότυπης καμπύλης. Εναλλακτικά, το γονίδιο κλωνοποιείται σε έναν φορέα που περιέχει έναν T7-υποκινητή για *in vitro* μεταγραφή. Το cRNA που σχηματίζεται μετά την *in vitro* μεταγραφή αραιώνεται διαδοχικά και σε κάθε αραιώση πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή του cRNA σε cDNA. Η πρότυπη καμπύλη σχηματίζεται από τις C_t τιμές αυτού του cDNA (Bustin, 2000).



Εικόνα 3. Πρότυπη καμπύλη με διαδοχικές αραιώσεις του κλωνοποιημένου πρότυπου μεταγράφου

Οι C_t τιμές των αραιώσεων απεικονίζονται σε ένα γράφημα έναντι της λογαριθμικής ποσότητας του προτύπου και σχηματίζεται μια ευθεία που υπακούει στην εξίσωση $Y=MX+C$, όπου M είναι η κλίση της ευθείας και C το σημείο που προσεγγίζει τον άξονα Y . Η εξίσωση αυτή χρησιμοποιείται για να συσχετίσει κάθε τιμή C_t (Y) με τον αντίστοιχο λογάριθμο της ποσότητας του αρχικού υλικού (X) και με αυτό τον τρόπο να υπολογίζει κανείς τις ποσότητες στα άγνωστα δείγματα.

Υλικά και μέθοδοι

Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από παγωμένες κυτταρικές πελλέτες της κυτταρικής σειράς MOLT4 που περιείχαν περίπου 5 εκατομμύρια κύτταρα. Η απομόνωση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο από το RNeasy RNA purification kit της εταιρείας QIAGEN σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε κάθε πελλέτα προστέθηκε 0.5 ml διαλύματος RLT με 5μl β-μερκαπτοαιθανόλης και τα κύτταρα αναδεύτηκαν. Κατά τη διάρκεια επώασης σε αυτές τις συνθήκες τα κύτταρα λύνονται, ενώ το μεγαλομοριακό, γενωμικό DNA σπάει σε μικρότερα θραύσματα κάτω από τη μηχανική πίεση εμβόλου και βελόνας σύριγγας από την οποία διέρχεται το μίγμα 5-8 φορές. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση με 0.5ml 70% αιθανόλης των κυτταρικών θραυσμάτων και οργανιδίων, τα οποία κατά τη φυγοκέντρηση συμπαρασύρουν και πολλά μεγαλομόρια αφήνοντας το εκχειλισμένο RNA στο υπερκείμενο. Το RNA, τέλος, καθαρίζεται με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, κατά την οποία το υπερκείμενο εφαρμόζεται σε κολώνα πυριτίου, όπου σε κατάλληλες συνθήκες ιονικής ισχύος το RNA προσδένεται επιλεκτικά, ενώ οι άλλες χημικές προσμίξεις από τα περιεχόμενα του κυττάρου, αδυνατώντας να προσδεθούν στην κολώνα, ξεπλένονται διεξοδικά με 0.7ml διαλύματος RW1 και δυο φορές με 0.5ml διαλύματος RPE. Το καθαρό RNA εκλύεται τέλος από την κολώνα με 40μl νερό απιονισμένο και απαλλαγμένο από RNάσες.

Η συγκέντρωση του RNA που απομονώθηκε από την κολώνα καθορίστηκε με φωτομέτρηση 2μl RNA στο Nanodrop και μέτρηση της απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 260nm ενώ η απορρόφηση μήκους κύματος 280nm και 230nm δίνουν πληροφορίες για την ύπαρξη πρωτεϊνικών ή άλλων οργανικών προσμίξεων, αντίστοιχα. Ιδανικά οι λόγοι A260/A280 και A260/A230 πρέπει να είναι ίσοι με ~2.0.

Η ποιότητα του RNA που παραλαμβάνεται ελέγχεται αρχικά με ανάλυση, ποσότητας περίπου 1μg, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 1XTAE. Επειδή το RNA σχηματίζει δευτεροταγείς δομές, ο καλύτερος τρόπος για την οπτική παρατήρηση της ποιότητας του είναι ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτική αγαρόζης. Αυτό πραγματοποιείται είτε με ηλεκτροφόρηση γλυκοζυλιωμένου RNA σε πηκτική αγαρόζης είτε με ηλεκτροφόρηση αποδιαταγμένου με φορμαμίδιο RNA σε αποδιατακτική πηκτική αγαρόζης. Στην παρούσα εργασία, το RNA αναμίχθηκε με αποδιατακτικό loading buffer φορμαμιδίου κι έπειτα ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτική αγαρόζης.

Επώαση του RNA με DNάση

Αυτό το βήμα εξασφαλίζει την ολοκληρωτική απομάκρυνση του γενωμικού DNA, έτσι ώστε το δείγμα RNA που παραλαμβάνεται να είναι πλήρως απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση με γενομικό DNA. Για το σκοπό αυτό, 5-10 μg RNA επωάζονται με 2μl 10X buffer DNάσης (Promega) και 1μl DNάσης (1u/μl) για 10 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια ακολουθεί καθαρισμός του δείγματος με διαδοχικές εκχυλίσεις

με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1), χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), κατακρήμνιση για 30 λεπτά στους -80°C με οξικό νάτριο 3M pH 5.2 και 100% αιθανόλη, φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στους 4°C , ξέπλυμα με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση του RNA σε νερό επεξεργασμένο με DEPC, που καταστρέφει τις RNάσες.

Σκοπός του καθαρισμού του RNA μετά την επεξεργασία με DNάση είναι η απομάκρυνση του ενζύμου και των διαλυμάτων που πιθανόν να είναι ανασταλτικά για τα επόμενα στάδια επεξεργασία του RNA. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι αυτό το στάδιο καθαρισμού δεν είναι απαραίτητο, αφού τόσο η DNάση όσο και το διάλυμα της δεν επηρεάζουν τις αντιδράσεις που ακολουθούν. Επομένως το στάδιο καθαρισμού μπορεί να παραλειφθεί, καθώς έχει επίσης ως αποτέλεσμα μερική απώλεια του RNA υλικού. Παρόλ' αυτά στην παρούσα εργασία, σε όλες τις περιπτώσεις το στάδιο καθαρισμού μετά την επεξεργασία του RNA με DNάση πραγματοποιήθηκε.

Αντίστροφη μεταγραφή

Η διαδικασία αυτή στοχεύει στην αντίστροφη μεταγραφή όλων των πολυαδενυλιωμένων μηνυμάτων RNA του δείγματος. Η αντίδραση καταλύεται από ειδικό ένζυμο που ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση και έχει τη μοναδική ιδιότητα να συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας σαν μήτρα RNA, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των DNA πολυμερασών, οι οποίες καταλύουν τον πολυμερισμό κατά την αντιγραφή του DNA χρησιμοποιώντας σαν μήτρα DNA αποκλειστικά. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με τη βοήθεια εκκινητή που περιέχει 24 θυμιδίνες (oligodT primer), ο οποίος προσδένεται στη συμπληρωματική του ουρά πολυαδενοσίνης που φέρουν τα μηνύματα RNA και στο 3' άκρο του η πολυμεράση ξεκινά να προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια μεταγράφοντας αντιστρόφως τα μηνύματα RNA. Έτσι εξασφαλίζεται η ειδική μεταγραφή των mRNA μορίων έναντι όλων των άλλων τύπων RNA που αποτελούν το ολικό RNA και τα μόρια μονόκλωνου DNA που παράγονται ονομάζονται συμπληρωματικό DNA (complementary DNA ή cDNA). Ο ίδιος εκκινητής περιλαμβάνει στο 5' άκρο της αλληλουχίας του την χαρακτηριστική αλληλουχία του υποκινητή της RNA πολυμεράσης του φάγου T7. Έτσι παράγονται συμπληρωματικοί κλώνοι (first strand cDNA) αποκλειστικά των πολυαδενυλιωμένων μηνυμάτων mRNA που περιέχονται στο συνολικό RNA του ιστού, οι οποίοι στο 5' άκρο τους περιέχουν τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης.

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, 4μg (11.5μl τελικός όγκος) ολικού RNA επωάζονται αρχικά για 10min@70°C με 1.5μl oligodT-T7 εκκινητή (100ng/μl). Έπειτα, φτιάχνεται ένα μείγμα που περιέχει 4μl 5X First strand buffer, 1μl 0.1M DTT, και 1μl dNTPs (10mM το καθένα- Promega). Το μείγμα αυτό αφού θερμανθεί για 5min@44°C, προστίθεται στο δείγμα του RNA με τον εκκινητή και στο τέλος προστίθεται 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης (Superscript III 200u/μl, Invitrogen). Κάθε δείγμα επωάζεται για 20min@44°C, 1h 45min@50°C και 15min@75°C (απενεργοποίηση της Superscript III). Για την καταστροφή των υβριδίων DNA-RNA, κάθε δείγμα επώαστηκε για 20min@37°C με 1μl RNase-H (2u/μl, Invitrogen).

Εκκινητές

➤ T7-OligodT-VN Εκκινητής

GGGAATTCTAGAAGCTTAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATCT₂₄V

Όπου V : A, C ή G

➤ Εκκινητές για κλωνοποίηση μεταγράφου

▪ Eef2 3' sense : 5' GAGTCGGGAGAGCACATCATCG 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 1686 του EEF2.

▪ Eef2 3' antisense : 5' CGTGTTCCTTTCCCCTTTCTGG 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 3040 του EEF2 και μαζί με τον EEF2 3' sense εκκινητή πολλαπλασιάζουν το 3' τμήμα μεγέθους 1355 bp.

▪ Eef2 5' sense : 5' TCGCTTCTTTCGGTTCTACCTGG 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 22 του EEF2.

▪ Eef2 5' antisense : 5' CGGGTCAGATTTCTTGATGGG 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 1793 του EEF2 και μαζί με τον EEF2 5' sense εκκινητή πολλαπλασιάζουν το 5' τμήμα μεγέθους 1772 bp.

➤ LUX Εκκινητές

▪ EEF2 3' sense : 5' cgttgaGCCTATCTGCCCGTCAAcG 3'

Ο εκκινητής αυτός είναι σημασμένος με την χρωστική JOE και υβριδοποιείται στη θέση 2442 του EEF2.

▪ EEF2 3' antisense : 5' CTGCCAGTGGTCAAACACACAC 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 2501 του EEF2 και μαζί με τον EEF2 3' sense εκκινητή πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα μεγέθους 105 bp.

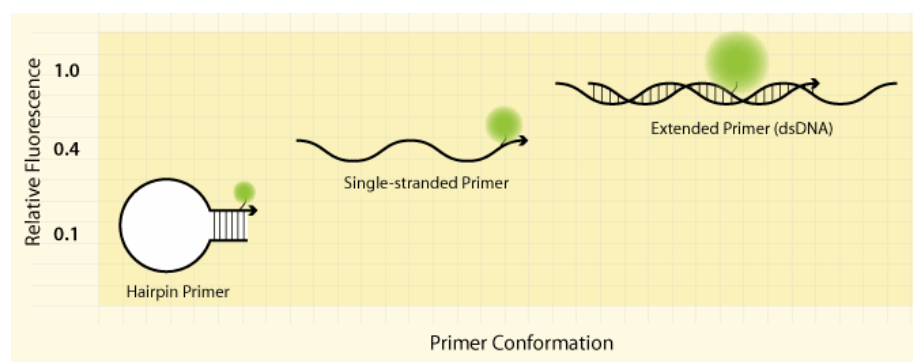
▪ EEF2 5' sense : 5' cgctGAAGGACGAGCAGGAGcG 3'

Ο εκκινητής αυτός είναι σημασμένος με την χρωστική FAM και υβριδοποιείται στη θέση 265 του EEF2.

▪ EEF2 5' antisense : 5' GTCCTTGCTCTGCTTGATGAAGTT 3'

Ο εκκινητής αυτός υβριδοποιείται στη θέση 327 του EEF2 και μαζί με τον EEF2 5' sense εκκινητή πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα μεγέθους 107 bp.

Οι LUX εκκινητές (Invitrogen) αποτελούν μια απλή και αποτελεσματική μέθοδο για την πραγματοποίηση real-time PCR. Κάθε ζεύγος εκκινητών περιέχει έναν εκκινητή που έχει ένα φθοροφόρο προσδεμένο στο 3' άκρο του και έναν εκκινητή μη σημασμένο. Ο σημασμένος εκκινητής έχει στο 5' άκρο του μια μικρή αλληλουχία 4-6 νουκλεοτιδίων η οποία είναι συμπληρωματική με το 3' άκρο του εκκινητή. Η λούπα που δημιουργείται παρέχει ιδανική εξασθένιση του φθορισμού, όταν ο εκκινητής δεν είναι ενσωματωμένος σε δίκλωνο μόριο. Όταν ο εκκινητής ενσωματωθεί στο δίκλωνο DNA στη διάρκεια της PCR αντίδρασης, ο φθορισμός ενισχύεται και το σήμα αυξάνεται μέχρι 10 φορές (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Επίπεδα φθορισμού των LUX εκκινητών ανάλογα με την στερεοδιάταξη τους

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου που θα χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, το 1/10 το ολικού όγκου του δείγματος μετά

την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε μια αντίδραση PCR. Κάθε αντίδραση περιείχε 5μl Taq buffer 10X, 5μl MgCl₂ 25mM, 5μl dNTPs (2.5mM το καθένα), 2.5μl από κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 10μM και 0.5μl Taq πολυμεράση (5u/μl). Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης PCR ήταν 50μl. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR προήλθαν από την Minotech biotechnology.

Το πρόγραμμα, που επιλέγεται, είναι ειδικό για κάθε περίπτωση, ανάλογα με το T_m του κάθε εκκινητή αλλά και το μέγεθος του προϊόντος. Το γενικό σχήμα των αντιδράσεων πολυμερισμού, που εφαρμόζονται, φαίνεται στη συνέχεια:

Αρχή : 5 λεπτά στους 94⁰C για αρχική αποδιάταξη
25-30 κύκλοι : 30 δευτερόλεπτα στους 94⁰C για αποδιάταξη
30 δευτερόλεπτα στην επιλεγμένη θερμοκρασία
(T_m- 4⁰C) για υβριδοποίηση των εκκινητών
επιλεγμένο χρόνο στους 72⁰C για επιμήκυνση της αλυσίδας
Τέλος : 5 λεπτά στους 72⁰C για συμπλήρωση των μονόκλωνων άκρων

Πέψη πλασμιδιακού φορέα

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του μεταγράφου ήταν ο pBluescript-T (STRATAGENE). Η αντίδραση πέψης ήταν : 4μl bluescript-T συγκέντρωσης 1.3 μg/μl, 5 μl NEB2 buffer 10X, 5 μl XcmI σε τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl για 3h@37⁰C. Μετά την πέψη του φορέα ακολούθησε κατακρήμνιση με αιθανόλη 100% και επαναδιάλυση σε νερό.

Αντίδραση σύνδεσης πλασμιδιακού φορέα με το κατάλληλο τμήμα DNA (ligation).

Η αναλογία των μορίων του φορέα κλωνοποίησης προς τα μόρια του ενθέματος είναι περίπου 1/5 και η συνολική ποσότητα του DNA, που επωάζεται σε κάθε αντίδραση, είναι ~200ng. Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου T4 DNA λιγάση είναι 0.2 u/λ. Οι αντιδράσεις σύνδεσης τυφλών άκρων (blunt) επωάζονται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (~25⁰ C), ενώ οι αντιδράσεις συμπληρωματικών άκρων επωάζονται 4-16 ώρες στους 16⁰ C. Το 1/10 της αντίδρασης χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών κυττάρων, ενώ για το μετασχηματισμό χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιείται η μισή ποσότητα της αντίδρασης.

Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων για μετασχηματισμό (competent cells).

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο LB, στους 37⁰ C, μέχρι η απορρόφηση των κυττάρων(OD₆₀₀) να γίνει 0.45. Τα κύτταρα επωάζονται για 10 λεπτά στον πάγο και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στους 40⁰ C και στις 3000 στροφές. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα 50 mM CaCl₂ και 10% γλυκερόλης, όγκου ίσου με το μισό όγκο της αρχικής καλλιέργειας. Στην συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για τουλάχιστον μισή ώρα στον πάγο και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στους 40⁰ C και στις 2000 στροφές. Τελικά, επαναδιαλύονται σε όγκο του παραπάνω διαλύματος ίσο με το 1/10 του όγκου της αρχικής καλλιέργειας, μοιράζονται σε ποσότητες των 200μl (aliquots) και φυλάσσονται στους -80⁰ C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Σε 200 μl κυττάρων προσθέτουμε ~100 ng DNA και επωάζουμε για 30-40 λεπτά στον πάγο και μετά για 90 δευτερόλεπτα στους 42⁰C. Έπειτα, αφήνουμε στον πάγο για ένα λεπτό, προσθέτουμε 1 ml θρεπτικό LB και επωάζουμε για 45 λεπτά στους 37⁰C. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα για 5 λεπτά στις 3500 στροφές, αφαιρούμε το περισσότερο υπερκείμενο και το υπόλοιπο, αφού επαναδιαλύσουμε τα κύτταρα, το απλώνουμε σε πιατάκια LB με αμπικιλίνη, τα οποία επωάζουμε για μια μέρα στους 37⁰C.

Real time PCR

Στις real time αναλύσεις εφαρμόζονται ίδιες συνθήκες με τη συμβατική PCR, με μόνη διαφορά την προσθήκη των LUX εκκινήτων για ανάλυση “πραγματικού χρόνου” (real time) και μέτρηση του φθορισμού μετά από κάθε κύκλο.

Οι αντιδράσεις γίνονται σε όγκο 50 μl και έχουν την παρακάτω σύσταση :

5 μl template

5 μl 10x Taq polymerase buffer (Minotech biotechnology)

5 μl MgCl₂ 25mM (Minotech biotechnology)

5 μ l dNTPs τελικής συγκέντρωσης 2.5 mM το καθένα (Promega)
1 μ l LUX primer labeled συγκέντρωσης 10 μ M (Invitrogen)
1 μ l LUX primer unlabeled συγκέντρωσης 10 μ M (Invitrogen)
0.5 μ l Taq polymerase (Minotech biotechnology)
H₂O μέχρι συνολικού όγκου 50 μ l.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης είναι το εξής :

1. 95⁰ C : 2 min
2. 95⁰ C : 15 sec
3. 60⁰ C : 15 sec
4. 72⁰ C : 15 sec
5. plate read
6. 80⁰ C : 1 sec
7. plate read
8. 81⁰ C : 1 sec
9. plate read
10. 82⁰ C : 1 sec
11. plate read
12. go to step 2 for 29 times more
13. perform melting curve from 60⁰ C to 95⁰ C. Read every 0.2⁰ C, hold 1 sec between reads.
14. 15⁰ C : 1 min
15. end.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιλογή του πρότυπου μεταγράφου

Το μετάγραφο που θα επιλεγεί ως πρότυπο για τη μέτρηση της ποιότητάς του πρέπει να συγκεντρώνει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- Να προκύπτει από πολυμερισμό μέσω της RNA πολυμεράσης II, ώστε να έχει αντίστοιχες τροποποιήσεις (capping, πολυαδενυλίωση) και συμπεριφορά σε σχέση με την αποικοδόμηση των υπόλοιπων μεταγράφων. Για παράδειγμα, τα ριβοσωμικά μετάγραφα που παρατηρεί κανείς με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης προέρχονται από μεταγραφή μέσω της RNA πολυμεράσης I είναι πιο σταθερά και δεν αποτελούν καλό κριτήριο για την εκτίμηση της ποιότητας.
- Να είναι μοναδικό. Πολλά γονίδια δημιουργούν παραπάνω από ένα διαφορετικά μετάγραφα μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Εφόσον στα μετάγραφα η απόσταση του κοντινού στην poly-A ουρά κομματιού σε σχέση με αυτήν του μακρινού είναι διαφορετική ή κάποιο από τα δυο κομμάτια απουσιάζει, είναι αδύνατη η εκτίμηση της ποιότητας σε γονίδια που παράγουν πολλαπλά μετάγραφα.
- Να είναι μεγάλο. Το μήκος των περισσότερων μεταγράφων είναι κοντά στις χίλιες βάσεις, με αποτέλεσμα η απόσταση του κοντινού στην poly-A ουρά κομματιού σε σχέση με αυτήν του μακρινού είναι τόσο μικρή, που οι διαφορές στην ποσότητα των δυο κομματιών να είναι οριακές για την εκτίμηση της ποιότητας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση, τόσο πιο πολλές θέσεις αποικοδόμησης προκύπτουν, άρα και πιο εύκολα μπορεί κανείς να εκτιμήσει την ποιότητα του μεταγράφου.
- Να εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και συνθήκες. Να ανήκει δηλαδή στην κατηγορία των γονιδίων που ονομάζονται ως housekeeping. Η απαίτηση αυτή είναι προφανής, για να μπορεί να γίνει ο έλεγχος ποιότητας σε οποιοδήποτε RNA, ανεξάρτητα από τον ιστό προέλευσης.
- Να εκφράζεται σε μεγάλα ποσά. Από τη μια, η μεγάλη έκφραση ενός γονιδίου είναι υποκειμενική. Από την άλλη, επιλέγοντας κανείς ένα γονίδιο που εκφράζεται σε μεγάλα ποσά σε σχέση με τα υπόλοιπα θα βοηθήσει στην καλύτερη ποσοτικοποίησή του και καλύτερη εκτίμηση της ποιότητάς του.

Για την επιλογή του πρότυπου μεταγράφου πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων γονιδιακής έκφρασης (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) για την επιλογή πειραμάτων γονιδιακής έκφρασης σε πολλαπλούς ιστούς με πλατφόρμες που αντιπροσωπεύουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος του συνόλου των μεταγράφων. Με βάση αυτά τα κριτήρια επιλέχθηκαν δυο σειρές πειραμάτων από NOVARTIS (Su et al, PNAS, 2004 - Novartis) που χρησιμοποιούν τις μικροσυστοιχίες Affymetrix GeneChips HGU133A. Στην ιστοσελίδα των δημοσιεύσεων (<http://wombat.gnf.org/index.html> Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) βρέθηκαν και ανακτήθηκαν τα αποτελέσματα των υβριδοποιήσεων. Τα αποτελέσματα αυτά είχαν αναλυθεί και κανονικοποιηθεί με τον αλγόριθμο MAS5 (Affymetrix).

Στα πλακάκια των πειραμάτων αντιπροσωπεύονται 22283 probesets, από τα οποία τα 22239 αντιστοιχούν σε ανθρώπινα μετάγραφα, ενώ τα υπόλοιπα σε μετάγραφα ελέγχου. Τα πειράματα περιλαμβάνουν 98 κυρίως μονές υβριδοποιήσεις από RNA που προέρχεται από 84 διαφορετικές κυτταρικές σειρές και 79 διπλές υβριδοποιήσεις, 158 στο σύνολο, από RNA από ανθρώπινους ιστούς.

Ο αλγόριθμος MAS5, εκτός από τις απόλυτες τιμές γονιδιακής έκφρασης (mas values), δίνει επίσης μια ποιοτική μέτρηση της παρουσίας του μεταγράφου (mas calls) με τρεις δυνατές τιμές :

- P(resent) για μετάγραφα που εκφράζονται στη συγκεκριμένη υβριδοποίηση
- A(bsent) για μετάγραφα που δεν εκφράζονται, και
- M(arginal) για μετάγραφα που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν να ανήκουν σαφώς σε μια από τις δυο παραπάνω κατηγορίες.

Οι τιμές αυτές προκύπτουν συγκρίνοντας για κάθε probepair την τιμή

$$R = (PM-MM) / (PM+MM),$$

με ένα προκαθορισμένο όριο t . Με αυτό τον τρόπο προκύπτει για κάθε probepair ο χαρακτηρισμός presence, όταν το R είναι μεγαλύτερο του t και absence στην αντίθετη περίπτωση. Τέλος, ομαδοποιώντας τις τιμές R για κάθε probeset με το στατιστικό τεστ one-sided Wilcoxon Signed Rank test, ορίζονται οι τιμές P , A και M . Η λογική της διαδικασίας είναι ότι περισσότερα $R > \text{Tau}$ οδηγούν σε μικρότερες p -value και σε χαρακτηρισμό Present.

Οι τιμές mas calls αποσπάστηκαν από τα δεδομένα των υβριδοποιήσεων χωριστά για κάθε πείραμα (κυτταρικές σειρές και ιστοί αντίστοιχα).

Η απαίτηση για μετάγραφο που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς καθορίστηκε με βάση τις τιμές mas calls των γονιδίων ελέγχου, καθώς και γνωστών housekeeping γονιδίων, όπως η ACTB και η GAPDH. Με βάση τα θετικά μας μετάγραφα ελέγχου ορίσαμε ως κατώφλι έκφρασης σε κάθε πείραμα, την μέγιστη δυνατή τιμή (98 P και 158 P αντίστοιχα) επιτρέποντας 3 οριακές τιμές M για κάθε πείραμα, που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε τεχνικό ή στατιστικό λάθος. Με αυτή τη διαδικασία από τα 22239 ανθρώπινα probesets καταλήξαμε σε 3823 για τα πειράματα που αφορούν τις κυτταρικές σειρές και 401 για τα πειράματα που αφορούν τους ανθρώπινους ιστούς. Κατόπιν επιλέξαμε την ένωση αυτών των probesets και καταλήξαμε με 386 κοινά. Για αυτά τα probesets παραλήφθηκαν οι πληροφορίες που αφορούν τα γονίδια στα οποία αντιστοιχούν από την κατασκευάστρια εταιρεία (Affymetrix – NetAffx Annotation Update Release 19).

Affymetrix - NetAffx™ Analysis Center - Mozilla Firefox

File Edit View Go Bookmarks Tools Help

http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx

home | login | register | your profile | contact search site

AFFYMETRIX

PRODUCTS & APPLICATIONS | SUPPORT | NETAFFX | SCIENTIFIC COMMUNITY | CORPORATE 中文 | 日本語

NETAFFX™ ANALYSIS CENTER

The NetAffx™ Analysis Center enables researchers to correlate their GeneChip® array results with array design and annotation information. This resource provides you with unprecedented access to array content information, including probe sequences and gene annotations. You can quickly search for genes and/or SNPs, compare and refine results, and export data into Excel_friendly formats.

To learn more, explore the tools below or review help material available through [support](#).

TOOLS AND ANNOTATIONS

-> [NetAffx Analysis Center](#) (click to get started, login required)

RELEASE NOTES

April 19, 2006

- **Annotation Update - Release 19.** Expression Array annotations are updated for 21 organisms including human, mouse, rat, canine, bovine, barley, xenopus, rhesus and mosquito, all Exon and Genotyping products are also updated. This release incorporates the latest bovine genome and NCBIV35 Mouse genome builds and improved GO annotation coverage for all the arrays.

March 16, 2006

- NetAffx Support for the Mouse and Rat Exon Arrays is available as of today. Go to the Exon Query link in the Menu.

March 10, 2006

- Corrections to genetic map data were posted for Genotyping Arrays. Analysis Center interface, csv files and GTYPE files are updated.

February 15, 2006

- Content GeneChip Citrus Genome Array is now available for analysis and search on the NetAffx site.

Εικόνα 5. Ιστοσελίδα του NetAffx της Affymetrix

Από αυτές ελέγχθηκαν τα probesets που αντιστοιχούν σε ένα και μόνο γονίδιο (ένα Entrez Gene ID) και από αυτά κρατήθηκαν αυτά που παράγουν ένα μετάγραφο και το μέγεθός του να είναι μεγαλύτερο από 3000 βάσεις, καταλήγοντας σε 32 probesets.

probeset	Gene Title	Entrez Gene	length
207783_x_at	HECT, UBA and WWE domain containing 1	10075	13644
200926_at	ribosomal protein S23	6228	3314
204102_s_at	eukaryotic translation elongation factor 2	1938	3148
200003_s_at	ribosomal protein L28 /// ribosomal protein L28	6158	4209
200092_s_at	ribosomal protein L37 /// ribosomal protein L37	6167	1586
200614_at	clathrin, heavy polypeptide (Hc)	1213	6525
208120_x_at	FKSG49 /// FKSG49	400949	3633
200004_at	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 /// eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	1982	3792
209563_x_at	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	801	3705
48612_at	Nedd4 binding protein 1	9683	7106
211452_x_at	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	9208	3648
201544_x_at	poly(A) binding protein, nuclear 1	8106	3080
200759_x_at	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	4779	4779
208905_at	cytochrome c, somatic	54205	5508
207040_s_at	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	6767	3196
221483_s_at	cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	10776	5162
210774_s_at	nuclear receptor coactivator 4	8031	3487
212383_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a isoform 1	535	4122
203445_s_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2	10106	4795
208598_s_at	HECT, UBA and WWE domain containing 1	10075	13644
218020_s_at	testis expressed sequence 27	60685	3005
200743_s_at	tripeptidyl peptidase I	1200	3498
216221_s_at	pumilio homolog 2 (Drosophila)	23369	6111
203546_at	importin 13	9670	3593
212295_s_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	6541	7239
218198_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32	55760	3070
208667_s_at	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	6767	3196
200742_s_at	tripeptidyl peptidase I	1200	3498
212217_at	prolyl endopeptidase-like	9581	6273
31826_at	KIAA0674	23307	4572
202466_at	polymerase (DNA directed) sigma	11044	3861
216205_s_at	mitofusin 2	9927	4539

Εικόνα 6. Τα 32 γονίδια στα οποία καταλήξαμε μετά την βιοπληροφορική ανάλυση.

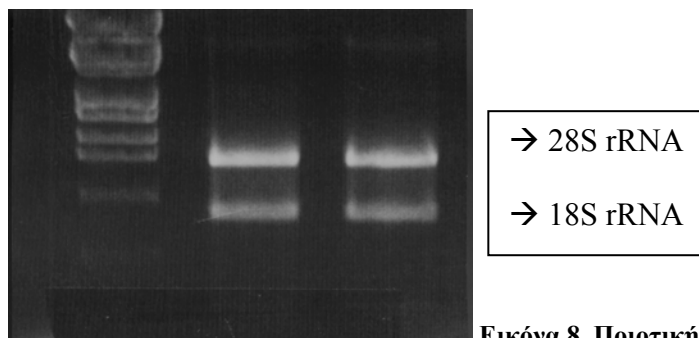
Από αυτά επιλέχθηκαν τα τέσσερα με τις μεγαλύτερες και πιο σταθερές τιμές έκφρασης (mas values). Ακολούθησε έλεγχος για ομολογία με άλλα μετάγραφα με τον αλγόριθμο BLAST (blast transcript sequence με NCBI-GENOME- HUMAN-BLASTn-build RNA) καταλήγοντας στο μετάγραφο του ευκαρυωτικού μεταγραφικού παράγοντα επιμήκυνσης 2 (EEF2 - NM_001961.2). Το μετάγραφο αυτό, με μήκος 3148 βάσεων, είναι το πρότυπο μετάγραφο που χρησιμοποιήθηκε ως αντιπροσωπευτικό για την ανάλυση της ποιότητας του συνόλου των μεταγράφων. Ο EEF2 είναι μέλος της οικογένειας των παραγόντων μετάφρασης που προσδένουν GTP, είναι απαραίτητος για την πρωτεϊνόςύνθεση και η μοριακή του λειτουργία συνίσταται στη μετακίνηση της νεοσχηματιζόμενης πρωτεϊνικής αλυσίδας από την A-θέση στην P-θέση του ριβοσώματος.

Gene Title	length	AVEt	AVE	MINt	MIN
HUWE1	13644	22071.24	10230.37	8082.1	2089.5
RPS23	3314	9549.554	10976.3	2840	3975.6
EEF2	3148	7554.549	3774.441	2389.4	1744.3
RPL28	4209	5942.251	6180.974	2280	3234.4

Εικόνα 7. Τα 4 τελικά γονίδια της ανάλυσης και η επιλογή του πρότυπου μεταγράφου EEF2.

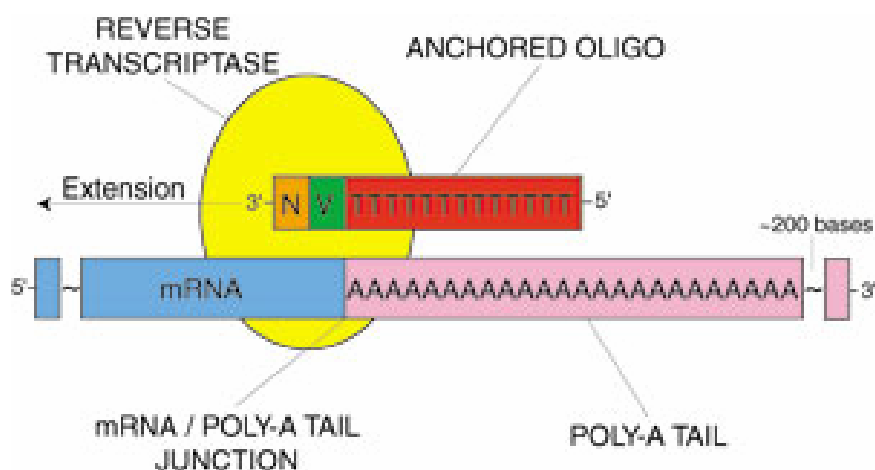
Απομόνωση μεταγράφου

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από την κυτταρική σειρά MOLT4 με τη χρήση του RNeasy RNA purification kit της εταιρείας QIAGEN και επεξεργασία του RNA με DNάση με σκοπό την ολοκληρωτική απομάκρυνση του γενωμικού DNA από το δείγμα. Η εικόνα του RNA μετά την απομόνωση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, όπου διακρίνονται οι δυο ζώνες των 28S και 18S ριβοσωμικών RNA.



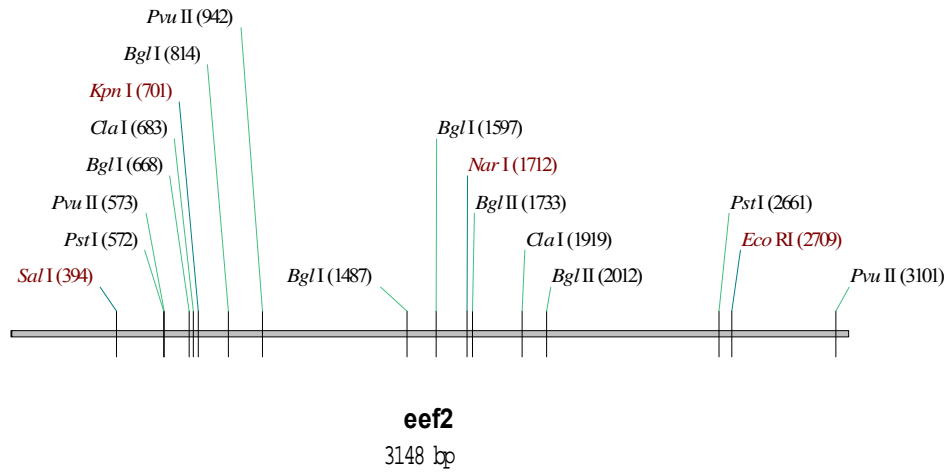
Εικόνα 8. Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του RNA

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής όλων των πολυαδενυλιωμένων μηνυμάτων RNA του δείγματος με τη χρήση του oligodT-T7 εκκινητή, ο οποίος όπως φαίνεται και από την εικόνα, προσδένεται στη συμπληρωματική του poly-A ουρά που φέρουν τα μηνύματα RNA και στο 3' άκρο του η πολυμεράση ξεκινά να προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια μεταγράφοντας αντιστρόφως τα μηνύματα RNA.

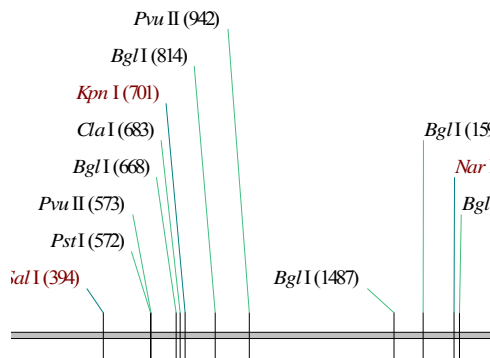


Εικόνα 9. Η σύνθεση του cDNA με την χρήση του oligodT-T7 εκκινητή.

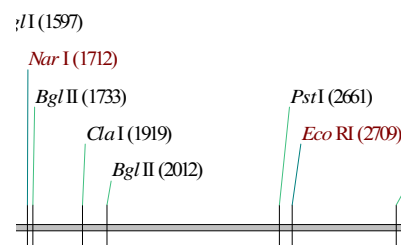
Υλικό από την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση PCR για την απομόνωση του μεταγράφου EEF2 με τη χρήση εκκινητών που πολλαπλασιάζουν το 5' τμήμα μεγέθους 1772bp (θέση 22-1793 bp) (Εικόνα 11) και το 3' τμήμα του μεταγράφου μεγέθους 1355bp (θέση 1686-3040 bp) (Εικόνα 12).



Εικόνα 10. Το μοναδικό μετάγραφο του EEF2



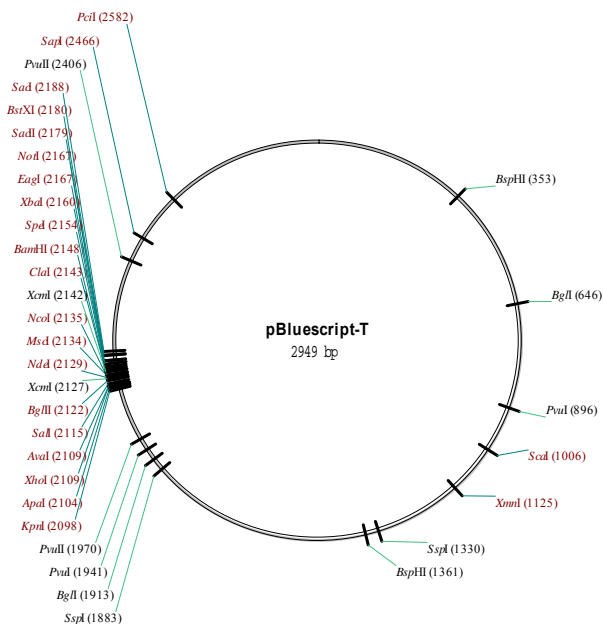
Εικόνα 11. Το 5' τμήμα του μεταγράφου



Εικόνα 12. Το 3' τμήμα του μεταγράφου

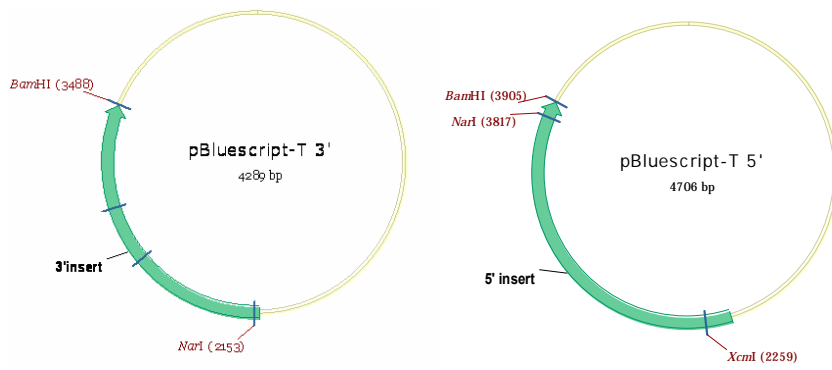
Κλωνοποίηση μεταγράφου σε φορέα pBluescript-T

Πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα pBluescript-T με το ένζυμο XcmI, το οποίο κόβει στις θέσεις 2127 και 2142 στο multicloning site του φορέα. Πέψη του φορέα με XcmI είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ευθύγραμμου φορέα με μια βάση T να προεξέχει στα 3' άκρα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης του 5' και του 3' τμήματος, που προήλθαν από PCR με τον φορέα και μετασχηματισμός σε βακτηριακά κύτταρα DH5α. Τα κύτταρα απλώθηκαν σε πιατάκια LB με Xgal και IPTG και επιλέχθηκαν οι θετικοί κλώνοι (λευκές αποικίες).



Εικόνα 13. Ο χάρτης του φορέα pBluescript-T που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του μεταγράφου

Με διαδοχικές πέψεις έγινε έλεγχος της φοράς που είχαν κλωνοποιηθεί τα δυο τμήματα του μεταγράφου στον φορέα και επιλέχθηκαν δυο κλώνοι στους οποίους τα δύο ένθετα να έχουν μπει με την ίδια κατεύθυνση στον φορέα. Πραγματοποιήθηκε πέψη των δυο κλώνων με τα ένζυμα NarI και BamHI, απομόνωση από πηκτική αгарόζης του 3' τμήματος και του φορέα μαζί με το 5' τμήμα και καθαρισμός του DNA με τη χρήση του Nucleospin kit από την Macherey-Nagel. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσης ανάμεσα στον φορέα με το 5' τμήμα και το 3' τμήμα, με σκοπό την κλωνοποίηση ολόκληρου του μεταγράφου στον φορέα pBluescript-T. Μετά τον μετασχηματισμό σε βακτηριακά κύτταρα DH5α, επιλέχθηκαν οι θετικοί κλώνοι (λευκές αποικίες), κάποιιοι από τους οποίους, μετά από διαγνωστικές πέψεις, αλληλουχήθηκαν.

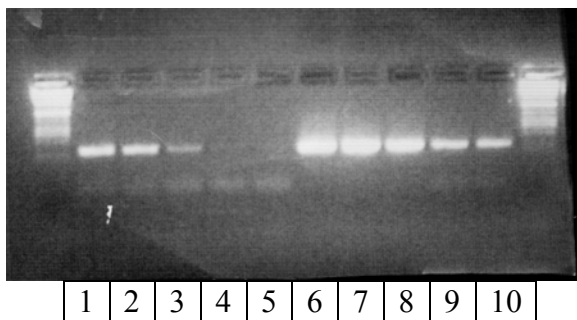


Εικόνα 14. Κλωνοποίηση του 3' και του 5' τμήματος του μεταγράφου *EEF2* στον φορέα pBluescript-T.

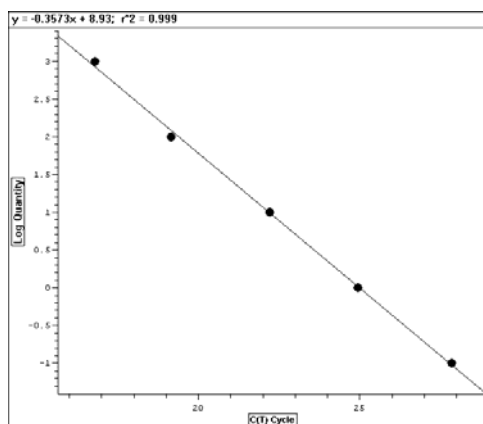
Real-time PCR με χρήση LUX εκκινητών

Το κλωνοποιημένο μετάγραφο ποσοτικοποιήθηκε σε διαδοχικές αραιώσεις τόσο μέσω της real-time PCR και μετρώντας τα επίπεδα φθορισμού των αντίστοιχων φθοροφόρων (FAM και JOE) στα κατάλληλα μήκη κύματος, όσο και με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης μετά από συμβατική PCR 30 κύκλων (Εικόνα 15). Οι αραιώσεις του πλασμιδίου με το κλωνοποιημένο μετάγραφο που χρησιμοποιήθηκαν τόσο στην real-time PCR όσο και στη συμβατική PCR ήταν : 1ng/μl, 0.1ng/μl, 0.01ng/μl, 0.001ng/μl και 0.0001ng/μl.

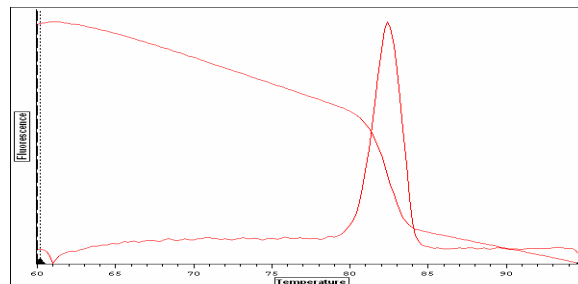
Όπως φαίνεται (Εικόνες 16-19), το κλωνοποιημένο μετάγραφο ποσοτικοποιείται με μεγάλη ακρίβεια και για τα δυο τμήματα του κι επιπλέον δεν εμφανίζονται παραπροϊόντα (π.χ διμερή εκκινητών) που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα.



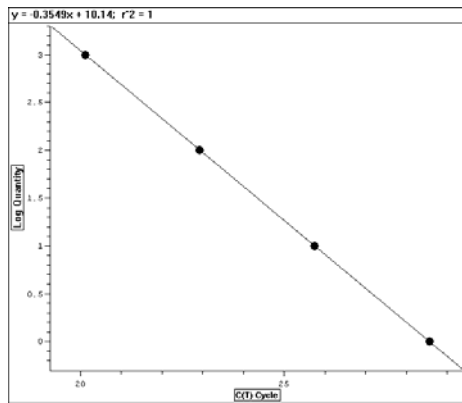
Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης μετά από συμβατική PCR 30 κύκλων. Τα δείγματα 1-5 είναι τα προϊόντα της PCR με τους 3' εκκινητές από το πυκνό προς το αραιό. Τα δείγματα 6-10 είναι τα προϊόντα της PCR με τους 5' εκκινητές από το πυκνό προς το αραιό.



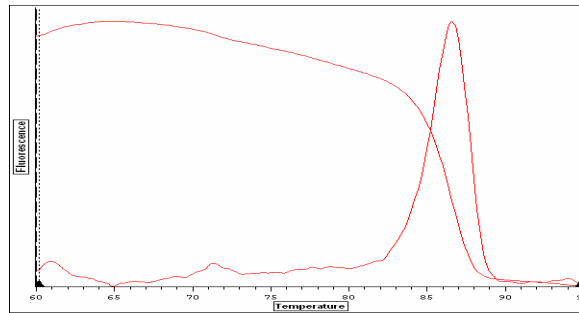
Εικόνα 36. Πρότυπη καμπύλη του 5' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με τη χρήση εκκινητή σπιασμένου με FAM



Εικόνα 27. Καμπύλη τήξης του 5' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με τη χρήση εκκινητή σπιασμένου με FAM.

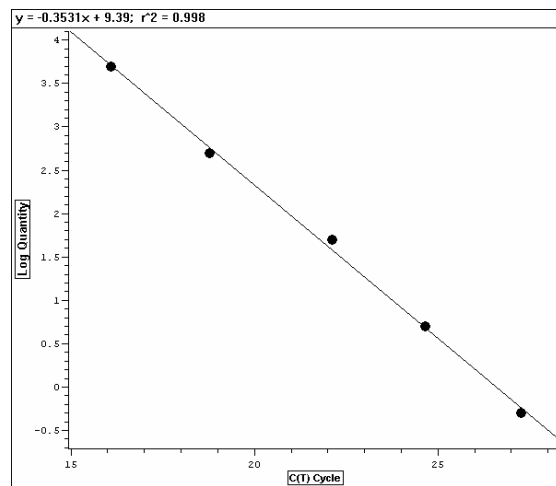
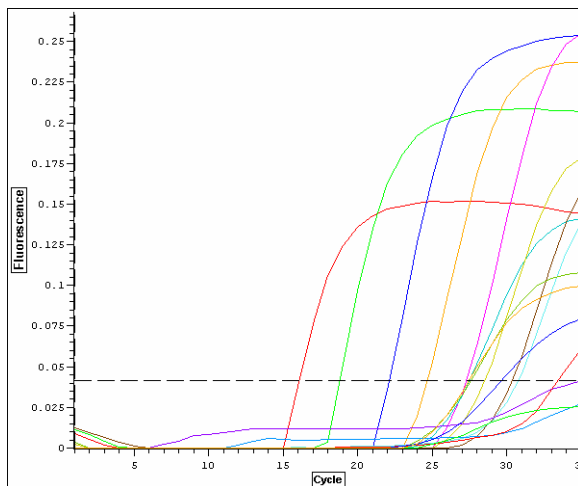


Εικόνα 48. Πρότυπη καμπύλη του 3' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με την χρήση εκκινητή σπιασμένου με JOE.



Εικόνα 59. Καμπύλη τήξης του 3' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με JOE.

Κατόπιν, η ποσοτικοποίηση επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας RNA που προέρχεται από κύτταρα, όπως περιγράφεται παραπάνω. Οι αραιώσεις της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής που χρησιμοποιήθηκαν στην real-time PCR ήταν 20%, 10%, 5% και 2.5% του ολικού όγκου της. Η ποσοτικοποίηση του κάθε τμήματος του μεταγράφου στα RNA δείγματα έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη του αντίστοιχου τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου (standards) (Εικόνες 20-23).

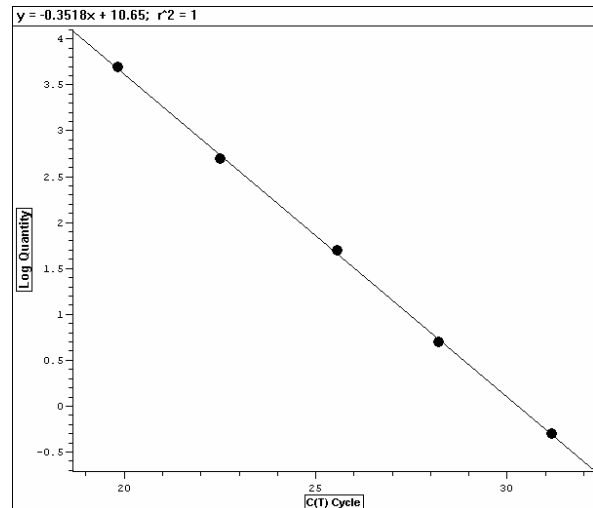
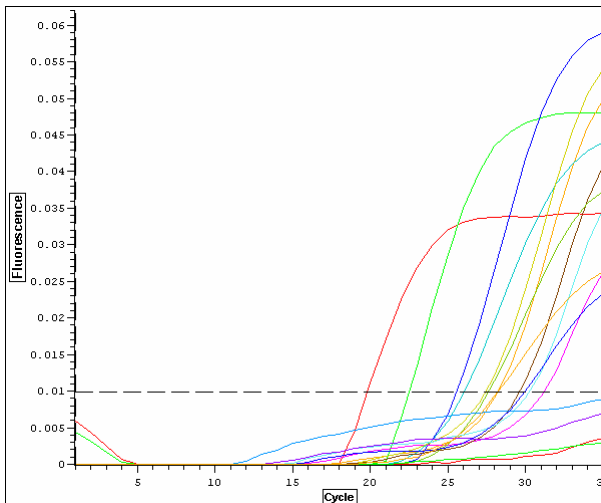


Εικόνα 20. Ποσοτικοποίηση του 5' τμήματος του μεταγράφου στο ολικό RNA με βάση την πρότυπη καμπύλη του 5' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με την χρήση εκκινητή σημασμένου με FAM.

Well /Set	Dye	Content	C(t)	pg	Well /Set	Dye	Content	C(t)	pg
B1	FAM	Standard	16,08	5000	C1	JOE	Standard	19,82	5000
B2	FAM	Standard	18,79	500	C2	JOE	Standard	22,5	500
B3	FAM	Standard	22,13	50	C3	JOE	Standard	25,55	50
B4	FAM	Standard	24,65	5	C4	JOE	Standard	28,21	5
B5	FAM	Standard	27,27	0,5	C5	JOE	Standard	31,17	0,5
B6	FAM	4λ RT	27,47	0,4907	C6	JOE	4λ RT	26,07	30,26
B7	FAM	2λ RT	28,5	0,2135	C7	JOE	2λ RT	27,41	10,26
B8	FAM	1λ RT	30,35	0,0474	C8	JOE	1λ RT	29,61	1,725
B9	FAM	0.5λ RT	30,76	0,0339	C9	JOE	0.5λ RT	30,25	1,026
		1λ RT					1λ RT		
E2	FAM	multiplex	29,63	0,0848	E2	JOE	multiplex	29,96	1,299

Εικόνα 21. Ποσοτικοποίηση του 5' τμήματος του μεταγράφου στο ολικό RNA με βάση τις τιμές των standards του κλωνοποιημένου μεταγράφου με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με FAM.

Εικόνα 22. Ποσοτικοποίηση του 3' τμήματος του μεταγράφου στο ολικό RNA με βάση τις τιμές των standards του κλωνοποιημένου μεταγράφου με τη χρήση εκκινητή σημασμένου με JOE.



Εικόνα 23. Ποσοτικοποίηση του 3' τμήματος του μεταγράφου στο ολικό RNA με βάση την πρότυπη καμπύλη του 3' τμήματος του κλωνοποιημένου μεταγράφου με την χρήση εκκινητή σημασμένου με JOE.

Συζήτηση

Η ανάγκη για έλεγχο ποιότητας των πειραμάτων γονιδιακής έκφρασης είναι επιτακτική στη μεταγονιδιωματική εποχή. Στο επίπεδο της ποιότητας του αρχικού αγγελιοφόρου RNA, οι λύσεις που έχουν δοθεί είναι ανεπαρκείς. Υπάρχουν διάφορα εμπορικά προϊόντα που επιχειρούν να δώσουν μια ποιοτική εκτίμηση της κατάστασης των μεταγράφων μετά από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για ένα ή περισσότερα από τα χαρακτηρισμένα από τη βιβλιογραφία ως housekeeping γονίδια, αλλά η εκτίμηση παραμένει οπτική μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και κατά συνέπεια υποκειμενική. Οι περισσότεροι ερευνητές ελέγχουν την ποιότητα του RNA με ηλεκτροφόρησή του και ποιοτικό / υποκειμενικό έλεγχο του με ανάλογο τρόπο, εκτιμώντας το βαθμό αποδόμησης των ριβοσωμικών RNA, που αποτελούν και το μεγαλύτερο μέρος του ολικού RNA. Μάλιστα, ο έλεγχος αυτός τα τελευταία χρόνια έχει γίνει ποσοτικός χρησιμοποιώντας Bioanalyzer, όπου υπολογίζεται η ποσότητα του ριβοσωμικού RNA σε κάθε δείγμα και οι μετρήσεις απεικονίζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα. Όμως η διαφορά στην ποσότητα των ριβοσωμικών μηνυμάτων δεν είναι προϊόν της αυξημένης μεταγραφής τους, αλλά αντίθετα της πολύ μεγαλύτερης σταθερότητάς τους. Για τον παραπάνω λόγο είναι κακή πρακτική η αναγωγή της εκτίμησης της αστάθειας των αγγελιοφόρων μεταγράφων στην εκτίμηση της αστάθειας των ριβοσωμικών.

Στην παρούσα εργασία κάναμε βιοπληροφορικό έλεγχο σε δεδομένα γονιδιακής έκφρασης που περιλαμβάνουν πάνω από 160 διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές. Με αυτό τον τρόπο αναγνωρίσαμε ποια μετάγραφα εκφράζονται όντως σε όλους τους ιστούς και μπορέσαμε να τα κατατάξουμε σε αυξανόμενα επίπεδα μέσης έκφρασης, όπως και σε σταθερότητα αυτής της έκφρασης. Για να πετύχουμε ακριβέστερη εκτίμηση της ποιότητας επιλέξαμε επίσης μετάγραφα με τουλάχιστον τριπλάσιο μήκος από το μέσο όρο, όπως επίσης και μοναδικά μετάγραφα, ώστε να αποφύγουμε την περίπτωση ιστο-ειδικού εναλλακτικού ματίσματος, που θα οδηγούσε σε αδυναμία χρήσης του επιλεγμένου πρότυπου μεταγράφου για καθολικό έλεγχο ποιότητας. Πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος της μοναδικότητας του μεταγράφου με τον αλγόριθμο BLAST και σχεδιάστηκαν εκκινητές εκατέρωθεν ιντρονίων, ώστε να εξασφαλιστεί ακόμα καλύτερα το αποτέλεσμα του ποιοτικού ελέγχου του RNA, αποφεύγοντας τον πολλαπλασιασμό τυχόν υπολειμμάτων γενωμικού DNA.

Παράλληλα, το μετάγραφο ανακτήθηκε από ολικό RNA κυττάρων και κλωνοποιήθηκε για να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό σημείο ελέγχου. Χρησιμοποιώντας το, δείξαμε τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του σε διαδοχικές αραιώσεις του με την ταυτόχρονη χρήση των δυο ζευγαριών εκκινητών και τέλος την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζουν τα συγκεκριμένα τμήματα και σε υλικό που προέρχεται από ανάστροφη μεταγραφή ολικού RNA.

Ανάλογα με το ερευνητικό ερώτημα που θέτει ένας ερευνητής και το σχεδιασμό των πειραμάτων του έχει διαφορετικές απαιτήσεις για την ακεραιότητα του αρχικού του υλικού. Για παράδειγμα, είναι διαφορετική η απαίτηση για μέτρηση γονιδιακής έκφρασης που έχει σχεδιαστεί να μετράει στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή και διαφορετική για μέτρηση επιπέδων μεταγράφων εναλλακτικού ματίσματος. Για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης χρειάζεται η μέτρηση της ποιότητας σε δείγματα RNA που έχουν υποστεί διαφορετικό βαθμό κατάτμησης, ώστε να είναι σε θέση ο

ερευνητής ανάλογα με τις απαιτήσεις της εργασίας του να επιλέγει ένα σαφές όριο ανοχής για την ποιότητα του αρχικού του υλικού.

Βιβλιογραφία

Albertson, D. G. (2003). Profiling breast cancer by array CGH. *Breast Cancer Res Treat* 78, 289-298

Anna Almeida, Thierry, J-P, Henri Magdelenat and Francois Radvanyi. (2004). Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction : influence of tissue handling. *Analytical Biochemistry* 328, 101-108

Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.

David Bowtel and Joseph Sambrook. (2002). DNA microarrays. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.

Galvin H. Swift, Michael J. Peyton and Raymond J. MacDonald. (2000). Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques* 28, 524-531.

Ian M. Mackay, Katherine E. Arden and Andreas Nitsche. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30, 1292-1305.

Liljedahl, U., Karlsson, J., Melhus, H., Kurland, L., Lindersson, M., Kahan, T., Nystrom, F., Lind, L., and Syvanen, A. C. (2003). A microarray minisequencing system for pharmacogenetic profiling of antihypertensive drug response. *Pharmacogenetics* 13, 7-17

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR. *Methods* 25, 402-408.

Mir, K. U., and Southern, E. M. (1999). Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 17, 788-792.

Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E. (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290, 2306-2309.

Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., Cooke, M. P., Walker, J. R., Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *PNAS* 101, 6062-6067.