



## Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego

Agnieszka Ciesielska, Michał M. Sikorski

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Application of real-time PCR technique for validation of microarray experiment

#### Summary

Microarray technology has recently reached the mainstream. It is widely applied in many biological fields of studies. Despite of its uncontested advantages microarray results have to be validated using independent methodology. For this purpose real-time PCR platform has become the most popular method of choice. The ability of PCR product measurement after each cycle is connected here with wide dynamic range of detection. This review is a summary of our knowledge on the technical issue of quantitative PCR utilization in microarray results confirmation.

#### Key words:

microarray validation, real-time PCR, SYBR Green I, TaqMan probes, molecular beacon, scorpion.

### 1. Wprowadzenie

W ostatnich latach jesteśmy świadkami niezwykle szybkiego rozwoju oraz postępującej komercjalizacji technologii i metod znajdujących zastosowanie w poznawaniu wielu dziedzin nauki m.in. genomiki funkcjonalnej roślin i zwierząt.

Wśród tych technologii niezwykle istotne miejsce zajmują mikromacierze DNA, które są obecnie wykorzystywane w licznych badaniach naukowych mających na celu profilowanie ekspresji genów. Popularność metody jest wynikiem jej szerokich możliwości aplikacyjnych i zasobów uzyskiwanych informacji.

#### Adres do korespondencji

Agnieszka Ciesielska,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań;  
e-mail:  
mmsik@ibch.poznan.pl

Przygotowując eksperyment mikromacierzowy należy mieć na uwadze fakt, że uzyskane wyniki mogą okazać się niezwykle trudne w interpretacji (obecność szumów), a fałszywie pozytywne lub negatywne sygnały mogą zagłuszyć prawidłowy obraz profilu ekspresji badanych genów. Z tego względu coraz częściej w literaturze rozważana jest kwestia konieczności potwierdzenia uzyskanych wyników z wykorzystaniem niezależnej metody, czyli tzw. walidacja mikromacierzy.

Do potwierdzenia wyników uzyskanych z mikromacierzy DNA wykorzystać można takie techniki jak Northern blot, DD-PCR (ang. *differential display PCR*), półilościowy oraz ilościowy PCR. Niekiedy stosowane są również metody oparte na analizie proteomu (elektroforeza dwukierunkowa białek, Western blot). Zważywszy jednak na niecałkowitą korelację pomiędzy ekspresją na poziomie proteomu a ekspresją na poziomie transkryptomu, często nie obserwuje się oczekiwanych ilościowych zmian na poziomie białka, które korespondowałyby z otrzymanymi danymi mikromacierzowymi (1).

PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*) niezwykle szybko zyskał miano „złotego standardu” stosowanego dla potwierdzania wyników eksperymentu mikromacierzowego. Dzięki jego zaletom takim jak, czułość oraz szeroki zakres detekcji, specyficzność substratowa i powtarzalność wyników możliwe jest potwierdzenie lub zaprzeczenie istnienia korelacji pomiędzy otrzymanymi danymi.

Prawidłowe przeprowadzenie procesu walidacyjnego wymaga znajomości technicznej strony metody, a zatem sposobów: detekcji produktów, projektowania sond i starterów optymalnych dla przebiegu reakcji, właściwej oceny ilościowej, normalizacji wyników jak również ich analizy statystycznej.

## 2. Systemy detekcji

Specyficzność metody PCR w czasie rzeczywistym zależy zarówno od instrumentu stosowanego do śledzenia sygnału (termocykler sprzężony z urządzeniem umożliwiającym pomiar fluorescencji w trakcie trwania reakcji), jak i od stosowanych technik detekcji produktu PCR i monitorowania reakcji amplifikacji. Opracowano kilka sposobów analizy przyrostu ilości produktów reakcji *real-time PCR* opartych na związkach fluorescencyjnych.

Fluorescencyjne sygnały, które są proporcjonalne do ilości powstającego produktu mogą być generowane przez wiążące się do dsDNA barwniki fluorescencyjne lub przez sekwencyjnie specyficzne fluorescencyjne sondy oligonukleotydowe.

### 2.1. Barwniki wiążące się do dsDNA – detekcja nieswoista

Pierwsze zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym wpływało bezpośrednio z badań Higuchiego i wsp. (2). W trakcie udoskonalania metody, mutagen-



ny, interkalujący bromek etydyny zastąpiono mniej toksycznymi, lecz bardziej specyficznymi i czułymi barwnikami przyłączającymi się do dwuniciowego DNA, np. YO – PRO1 czy SYBR Green I. Niezależnie od mechanizmu wiązania do dsDNA, aby mogły one zostać zastosowane w metodzie *real-time PCR* muszą spełniać dwa podstawowe wymagania: 1) wzrost fluorescencji następuje po związaniu barwnika z dsDNA, 2) barwnik nie wpływa na przebieg reakcji. Obecnie najczęściej wykorzystywanym w reakcji *real-time PCR* barwnikiem wiążącym się do dsDNA jest SYBR Green I (3). Jest to asymetryczny związek cyjaninowy, strukturalnie spokrewniony z barwnikami takimi jak YOYO-1, BEBO oraz TOTO-1 (4).

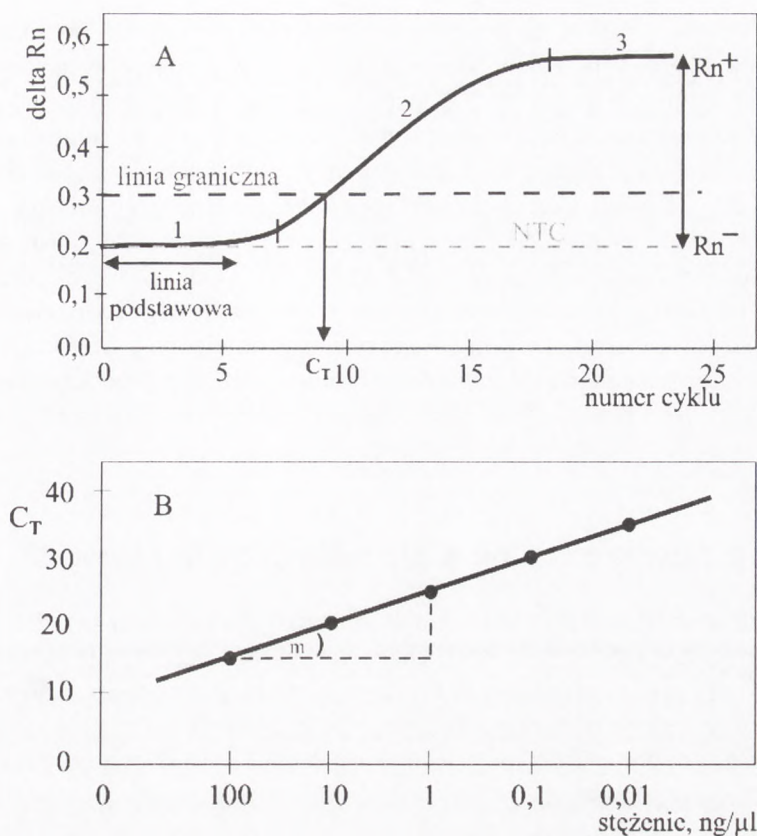
Zawarte w literaturze wyjaśnienie mechanizmu interakcji SYBR Green I z DNA opiera się na możliwości sekwencyjnie niespecyficznego wiązania się tego barwnika do małej bruzdy helisy (4-6). Niezwiązana postać barwnika nie wykazuje wykrywalnej fluorescencji. Powinowactwo wiązania SYBR Green I do dsDNA jest ponad 100-krotnie wyższe niż bromku etydyny, zaś fluorescencja związanego barwnika jest wg J. Wilhelm (4) ponad 1000-krotnie wyższa, zaś wg R. H. Lekanne Deprez (7) 100-krotnie wyższa niż barwnika w stanie wolnym. Z tego też powodu jest on niezwykle przydatny w monitorowaniu akumulacji produktu PCR. Wzbudzenie SYBR Green I następuje przy użyciu światła niebieskiego o długości fali ok. 470 nm. Spektrum emisji jest porównywalne ze spektrum emisji fluoresceiny z maksimum przy ok. 520 nm (4).

Z chwilą rozpoczęcia reakcji PCR wzrastająca ilość nowo syntetyzowanych nici powoduje wzrost sygnału fluorescencyjnego. Największą zaletą barwnika jest możliwość zastosowania razem z nim dowolnej pary starterów i matryc, dzięki czemu metoda ta staje się bardzo uniwersalna i mniej kosztowna. Jednocześnie jest wystarczająco czuła, aby wykryć pojedynczą kopię DNA w mieszaninie reakcyjnej. Ograniczeniem systemu bazującego na SYBR Green I jest rozpoznawanie niespecyficznego sekwencji DNA.

W rzeczywistości zliczana jest każda dwuniciowa cząsteczka DNA obecna w mieszaninie reakcyjnej, łącznie z niespecyficznymi produktami reakcji PCR i dimerami starterów. Istnieje zatem niebezpieczeństwo uzyskania zawyżonych lub fałszywie pozytywnych wyników. Aby przezwyciężyć ten problem i potwierdzić obecność specyficznego produktu wymagane jest wykonanie krzywej topnienia amplikonu.

### 2.1.1. Krzywa topnienia amplikonu

Temperaturą topnienia ( $T_m$ , ang. *melting temperature*.) DNA nazywamy taką temperaturę, w której połowa dupleksów DNA uległa rozpleceniu (6). Jest ona zależna od wielu czynników m.in. stężenia dsDNA, długości oraz składu nukleotydowego, czyli zawartości par G+C i A+T amplikonu. Dla dłuższych cząsteczek DNA wartość  $T_m$  mieści się w granicach 80-100°C. Charakterystyczny dla amplikonu pik na krzywej topnienia można odróżnić od pików pochodzących od artefaktów, np. dimerów starterów, które pojawiają się przy niższych temperaturach topnienia.



Rys. Krzywe generowane podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

A. Krzywa amplifikacyjna: 1 – faza pierwsza reakcji, obejmująca na wykresie słabe fluktuacje odpowiadające sygnałowi tła; 2 – faza druga, logarytmiczna; 3 – faza trzecia, plateau; NTC (ang. *no template control*) – kontrola bez matrycy. B. Krzywa standardowa  $C_T = m \times \log(c) + B$ .

Specyficzność reakcji *real-time PCR* z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I jest weryfikowana przez wykonanie krzywej topnienia amplikonu.

Ze względu na fakt, że temperatura topnienia specyficznego amplikonu jest związana z jego wielkością, wykorzystanie analizy krzywej topnienia eliminuje konieczność przeprowadzenia analizy elektroforetycznej po zakończonej reakcji amplifikacji (niemniej jednak może ona zostać przeprowadzona). Po ostatnim etapie amplifikacji produkty są łagodnie podgrzewane do wyznaczonej temperatury i analizowana jest zmiana fluorescencji (w początkowej fazie obserwowany jest znaczący jej wzrost aż do osiągnięcia  $T_m$ , po czym następuje nagły spadek fluorescencji). Na wykresie przedstawiona jest zależność negatywnego ilorazu pochodnej fluorescencji i temperatury ( $y = -dF/dT$ ) względem temperatury ( $x = T$ ). Pole pod krzywą jest proporcjonalne do ilości produktu.



Ponieważ każdy dsDNA ma specyficzną temperaturę topnienia  $T_m$ , możliwe jest ilościowe określenie w jednej mieszaninie reakcyjnej komponentów mających różne  $T_m$  i w ten sposób wyeliminowanie z ilościowego oznaczenia komponentów niespecyficznych. Krzywa topnienia znajduje również zastosowanie w ocenie czystości zarówno produktu jak również wyjściowej matrycy (brak lub obecność charakterystycznego dla produktu piku na krzywej topnienia, powstałego po reakcji, w której matrycą był całkowity RNA). W przeciwieństwie do elektroforezy, analiza krzywej topnienia pozwala na rozróżnienie produktów o tej samej długości, lecz różnym stosunku par GC/AT. Ponadto dwa produkty o tej samej długości i zawartości par GC, lecz różnym ich rozmieszczeniu mogą posiadać odmienne profile krzywych topnienia (8-10). Połączenie ciągłego monitorowania fluorescencji podczas reakcji PCR z analizą krzywej topnienia zapewnia lepszą detekcję i różnicowanie produktów PCR.

## 2.2. Sondy specyficzne względem sekwencji – detekcja swoista

Problem specyficzności detekcji amplikonu został rozwiązany przez zastosowanie sekwencyjnie specyficznych sond znakowanych fluorescencyjnie i umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR. Proces hybrydyzacji (lub degradacji) zazwyczaj nie interferuje z ekspotencjalną akumulacją produktów PCR. Obecnie stosowanych jest kilka różnych podejść do specyficznych analiz ilościowych bazujących na reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

### 2.2.1. Sondy hydrolityczne – metoda TaqMan

W 1991 r. Holland i wsp. jako pierwsi wykazali, że rozszczepienie podwójnie znakowanej sondy przez 5' nukleazową aktywność Taq DNA polimerazy podczas reakcji PCR może znaleźć zastosowanie w detekcji specyficznego względem danej sondy produktu (11).

W klasycznym systemie TaqMan wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu sondę fluorescencyjną. Sonda TaqMan jest oligonukleotydem o długości 20-30 nukleotydów i  $T_m$  o 5-10°C wyższej niż  $T_m$  starterów (12). Zawiera ona na końcu 5' fluorescencyjny barwnik reporterowy (ang. *reporter dye*), którego spektrum emisji jest tłumione przez inny barwnik fluorescencyjny pełniący rolę wygaszacza (ang. *quencher*), zlokalizowany w dowolnej pozycji zajmowanej przez tyminę lub na końcu 3'. Barwnik tłumiący, zlokalizowany na końcu 3' oligonukleotydu sondy zapewnia jednak bardziej efektywne wyciszenie barwnika reporterowego niż wygaszacz znajdujący się w środkowych pozycjach sondy. Dzięki temu uzyskiwana jest większa fluorescencja podczas rozszczepienia sondy. Dodatkowo, gdy koniec 3' jest zablokowany, sonda nie może być wydłużana jak starter. Do barwników reportero-



wych należą m.in. Oregon Green, FAM, JOE, Yakima Yellow, Cy3, Cy5, ROX, Texas Red, TET i HEX, a do barwników tłumiących np. DABCYL i TAMRA (11,13-15).

Podczas reakcji PCR sonda wiąże się specyficznie z matrycą pomiędzy miejscami wiązania starterów. Kiedy sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika reporterowego i wygaszacza powoduje supresję fluorescencji. Na etapie przyłączania starterów sonda hybryduje do amplifikowanego fragmentu DNA i w trakcie etapu wydłużania starterów zostaje zdegradowana przez polimerazę Taq, mającą aktywność 5'→3' egzonukleazy.

Fizyczne uwolnienie barwnika reporterowego od barwnika tłumiącego prowadzi do wzrostu fluorescencji mierzonej przez urządzenie (16). Degradowana sonda uwalnia fluorochrom w każdym cyklu, dodając nowy barwnik do poprzednio uwolnionego. W konsekwencji sygnał fluorescencyjny jest wzmacniany w każdym cyklu. Sygnał ten zależy zarówno od syntezy DNA, jak również od hybrydyzacji i hydrolizy podwójnie znakowanej sondy (17).

System TaqMan używa uniwersalnych parametrów termicznych i warunków reakcji PCR. Specyficznym wymaganiem dla fluorogenicznych sond jest jednak brak zasady G na końcu 5', ponieważ jej obecność blisko barwnika reporterowego wygasza jego fluorescencję nawet po rozszczepieniu. Wskazane jest również unikanie długich powtórzeń jednonukleotydujących (zwłaszcza guaniny lub cytozyny) oraz wewnętrznych niesparowań sondy z matrycą, gdyż wydajność rozszczepienia sondy jest zależna od stopnia komplementarności jej i matrycy (12).

### 2.2.2. Sondy hybrydyzacyjne

Technika ta oparta jest na zastosowaniu dwóch krótkich sond komplementarnych do amplifikowanej sekwencji oraz odpowiednio dobranych starterów. Sondy hybrydyzacyjne stanowią parę, przy czym jedna sonda jest znakowana na końcu 3' za pomocą barwnika będącego donorem energii np. FAM, a druga na końcu 5' przy użyciu barwnika pełniącego funkcję akceptora np. TET, TAMRA, ROX, Cy3, Cy5 (4). Wykorzystane zostaje tu zjawisko FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), czyli transferu energii od fluorofora donorowego do akceptorowego. Ponieważ FRET maleje wraz z odległością, sondy hybrydyzacyjne muszą być tak zaprojektowane, aby hybrydyzowały w sąsiadujących obszarach matrycy DNA (zazwyczaj rozdzielone od 1 do 5 nukleotydami).

Jeśli podczas hybrydyzacji, zwrócone do siebie przeciwnymi końcami sondy, zhybrydują do sekwencji docelowej, wówczas oba barwniki znajdują się blisko siebie i możliwe jest przeniesienie energii wzbudzenia od donora do akceptora. W konsekwencji generowany sygnał mierzony jest za pomocą fluorymetru, a powstała fluorescencja jest proporcjonalna do ilości DNA zsyntetyzowanego podczas reakcji PCR (4,13,14,17).



### 2.2.3. Sondy typu *molecular beacon*

*Molecular beacons* są to sondy DNA mające strukturę spinki do włosów. Sekwencja pętli jest komplementarna do specyficznej matrycy, a sekwencje ją oskrzydłające są wzajemnie do siebie komplementarne i zawierają od 10 do 15 nukleotydów (4). W formie nie zhybrydowanej, gdy struktura szpilki jest zamknięta, barwnik reporterowy i tłumiący umieszczone są na końcach 5' i 3' i znajdują się blisko siebie. W tym przypadku wszystkie fotony emitowane przez barwnik reporterowy są absorbowane przez wygaszacz. W obecności sekwencji komplementarnej, sonda rozwija się i hybryduje do matrycy. Barwnik reporterowy i wygaszacz zostają rozdzielone, a sonda zaczyna emitować fluorescencję. Sondy typu spinki do włosów charakteryzują się wysoką specyficznością, gdyż tworzone przez nie kompleksy sonda – matryca wykazują większą stabilność termodynamiczną niż sonda w formie struktury spinkowej (16).

### 2.2.4. Sondy typu *scorpion*

Sonda typu *scorpion* składa się ze startera połączonego na końcu 5' nieamplifikowalnym łącznikiem z sondą *molecular beacon*. W trakcie wydłużania startera *scorpion* struktura spinki do włosów zostaje rozerwana, a sonda zagina się o 180° i wiąże się do nowo powstałej nici DNA.

W wyniku wydłużenia sondy zwiększa się odległość pomiędzy barwnikami reporterowym i tłumiącym, prowadząc do wzrostu fluorescencji. W porównaniu z systemami TaqMan i *molecular beacons*, sondy typu *scorpion* są efektywniejsze i emitują znacznie silniejszy sygnał fluorescencyjny (14).

Wszystkie systemy detekcji oparte na fluorescencyjnych sondach umożliwiają selektywną wizualizację tylko oczekiwanego produktu reakcji, co sugeruje wysoką specyficzność i dokładność. Jednakże niespecyficzne produkty, które mogły powstać podczas przebiegu reakcji i wpływać na jej przebieg, pozostają nie wykryte.

Oba sposoby detekcji, zastosowanie barwników lub sond fluorescencyjnych, wykazują podobne ograniczenia takie jak powtarzalność oraz zakres czułości (7).

## 3. Projektowanie oligonukleotydów

Optymalna długość produktu reakcji *real-time PCR* z zastosowaniem fluorescencyjnych sond mieści się w zakresie 70-150 par zasad, zaś SYBR Green I nie więcej niż 300 par zasad (18). Amplifikacja krótszych produktów jest bardziej wydajna oraz wykazuje większą tolerancję na warunki reakcji. Pełna denaturacja krótkich fragmentów DNA w zakresie temperatury 92-95°C jest bardziej prawdopodobna niż fragmentów długich; w konsekwencji umożliwiające jest bardziej efektywne wiązanie starterów i sond do ich komplementarnych sekwencji w matrycy DNA.



Biorąc pod uwagę, że szybkość dobudowy kolejnych nukleotydów przez polimerazę Taq wynosi 30-70 zasad na sekundę, czas polimeryzacji w reakcji *real-time PCR* wynosi zaledwie 15-30 sekund.

Selekcja starterów i sond zależna jest od wielkości amplikonu oraz lokalizacji sondy. W celu uniknięcia fałszywie pozytywnych wyników, pochodzących z amplifikacji genomowego DNA, miejsca wiązania przynajmniej jednego startera powinny znajdować się na granicy egzon – egzon (cDNA). W przypadku, gdy nieznane są granice intron – egzon konieczne jest wcześniejsze wykonanie trawienia RNA z wykorzystaniem DNazy I.

Optymalna długość starterów obejmuje 15-20 nukleotydów oraz zawartość par GC od 20-70%. Temperatury topnienia startera *forward* i *reverse* nie powinny różnić się więcej niż o 1-2°C. Sekwencje bogate w pary GC są podatne na niespecyficzne interakcje, które mogą zmniejszać efektywność reakcji i generować fałszywe sygnały. Selekcja starterów posiadających w obrębie ostatnich pięciu nukleotydów końca 3' tylko jedną lub dwie pary GC zmniejsza ryzyko wzajemnego ich parowania i formowania dimerów starterów, podobnie jak zastosowanie *hot-start* polimerazy.

Wydłużanie starterów następuje natychmiast po ich hybrydyzacji do matrycy, która wkrótce po tym maskowana jest przez nowo zsyntetyzowaną nić DNA. Aby zapewnić wcześniejszą hybrydyzację sondy niż starterów do matrycy, wartość jej  $T_m$  powinna być przynajmniej o 10°C wyższa od wartości  $T_m$  starterów i wynosić w przybliżeniu 68-70°C (13,14,19).

#### 4. Graficzna analiza danych otrzymanych w reakcji *real-time PCR*

Wszystkie odmiany PCR w czasie rzeczywistym, niezależnie od sposobu detekcji, opierają się na tej samej zasadzie pomiaru liczby kopii DNA. Po każdym cyklu mierzony jest poziom fluorescencji w odpowiadającym wybranemu fluorochromowi zakresie widma.

Wartość  $Rn^+$  jest ilorazem intensywności emisji fluorescencji barwnika reporterego i intensywności emisji wygaszacza podczas amplifikacji. Od wartości tej odejmowany jest poziom tła, czyli wartość oznaczona symbolem  $Rn^-$ , będąca średnim poziomem fluorescencji w początkowej fazie reakcji, zazwyczaj obejmującej 3-15 cykli (ang. *baseline*).

Wartość  $Rn^-$  jest ilorazem intensywności emisji fluorescencji barwnika reporterego przez intensywność wygaszacza przed rozpoczęciem amplifikacji. Uzyskane w ten sposób wartości względnego wzrostu fluorescencji ( $\Delta Rn$ ) po każdym cyklu [ $\Delta Rn = (Rn^+) - (Rn^-)$ ], proporcjonalne do ilości powstającego produktu PCR, nanoszone są na wykres zależności wielkości sygnału od czasu określonego przez liczbę cykli. W przypadku prawidłowo wykonanej reakcji dla rozcieńczeń standardów, wykresy przedstawiają równoległe krzywe sigmoidalne o identycznym nachyleniu. Kolejnym etapem jest ustalenie linii progowej (ang. *threshold*) umieszczonej powyżej nieswo-



istych odchyień  $\Delta R_n$  i w obrębie logarytmicznego wzrostu. W praktyce, wybór linii progowej należy często do operatora, lecz może być ona arbitralnie ustalana przez program komputerowy. Dla każdej z badanych próbek oznaczana jest liczba kopii  $C_T$  (ang. *copy threshold*) definiowana jako numer cyklu, w którym krzywa amplifikacyjna przecina linię progową, czyli następuje wykrywalny wzrost fluorescencji (12,20,21).

Wartość  $C_T$  jest proporcjonalna do logarytmu wyjściowej ilości matrycy w próbie. Im więcej kopii badanej sekwencji było w momencie rozpoczęcia reakcji, tym mniej cykli potrzeba, aby poziom fluorescencji, pochodzący z powstałych produktów, przekroczył wartość  $C_T$  (oznacza to mniejszą wartość  $C_T$ ). Detekcja małych ilości kopii genu wymaga większej liczby cykli niż wartość  $C_T$  (22-24).

## 5. Analiza ilościowa i normalizacja wyników

*Real-time PCR* umożliwia ilościową analizę wyjściowego stężenia matrycy, której można dokonać na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest ocena absolutna, drugim zaś relatywna.

### 5.1. Ocena absolutna – metoda krzywej standardowej

Ocena absolutna pozwala ustalić całkowitą wyjściową ilość matrycy w badanej próbie, wyrażoną w liczbie kopii lub stężeniu. Określenie poziomu ekspresji genu w takiej postaci możliwe jest dzięki zastosowaniu zewnętrznych standardów. Funkcją standardu może pełnić cRNA lub cDNA docelowego genu, syntetyzowane *in vitro* ssDNA oraz sklonowany, powielony i oczyszczony fragment sekwencji docelowego genu w wektorze plazmidowym.

Standard powinien również posiadać następujące cechy: 1) identyczne z analizowanymi próbkami miejsca wiązania starterów i sond, 2) identyczne lub bardzo zbliżone do analizowanych prób sekwencje między miejscami wiązania starterów, oraz 3) równoważną wydajność reakcji z wydajnością reakcji badanej próby. Stężenie standardu DNA lub RNA oznaczane jest przez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 260 nm (16,25,26).

Na podstawie wartości  $C_T$ , uzyskiwanych dla kolejnych rozcieńczeń standardu, wykreślana jest krzywa regresji (zwana krzywą standardową, ang. *standard curve*) logarytmu stężenia matrycy (oś X) w stosunku do otrzymanych wartości  $C_T$  (oś Y). Liczbę kopii w badanej próbie ustala się przez naniesienie uzyskanych wartości  $C_T$  prób badanych na krzywą standardową, której równanie przedstawia się wzorem:

$$C_T = m \times \log(\text{conc}) + B$$

gdzie:

$C_T$  – linia progowa,  $\log(\text{conc})$  – logarytm stężenia,  $m$  – nachylenie krzywej,  $B$  – wartość  $C_T$  dla stężenia równego jednej jednostce.



Nachylenie krzywej odzwierciedla wydajność reakcji amplifikacji, która obliczana jest wg wzoru:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/m)} - 1$$

gdzie:

Eff – wydajność reakcji (ang. *efficiency*), m – nachylenie krzywej (ang. *slope*).

Wydajność reakcji powinna mieścić się w przedziale 90-100%. Nachylenie krzywej wynoszące -3,322 odpowiada 100% wydajności reakcji, zaś m = -3,8 odpowiada wydajności równej 83%.

O wiarygodności otrzymanych wyników świadczy wartość współczynnika korelacji ( $R^2$ , ang. *correlation coefficient*, *square regression coefficient*).  $R^2$  oznacza procent danych zgodnych ze statystyczną hipotezą, który w kontekście ilościowym określa procent danych znajdujących się na krzywej standardowej, tworzonej przez serie rozcińczeń standardu.

Zbyt niska wartość współczynnika korelacji oznacza, że zadane standardy nie mogą być odpowiednio dopasowane do krzywej, a w konsekwencji uzyskane wyniki są nierzetelne. Prawidłowa wartość  $R^2$  zbliżona jest do 0,99. Nie wszyscy autorzy uważają ten rodzaj oceny ilościowej za ocenę całkowitą. Ginzinger (18) oraz Tichopad i wsp. (27) twierdzą, że metoda krzywej standardowej nie jest metodą absolutną, bez względu na pochodzenie i staranność oznaczenia stężenia standardów.

## 5.2. Względna analiza ilościowa

Rzetelna analiza ilościowa wymaga korekcji eksperymentalnych odchyień indywidualnych wydajności odwrotnej transkrypcji badanych prób. Wynika to stąd, że różnice wydajności odwrotnej transkrypcji skutkują w ilości cDNA, która nie koresponduje z wyjściową ilością RNA. Normalizacja względem genu o stałym poziomie ekspresji, stanowiącym tzw. wewnętrzny gen referencyjny (ang. *housekeeping gene*), jest obecnie powszechnie akceptowaną metodą korekcji nieznaczących wariacji spowodowanych różnicą w wydajności odwrotnej transkrypcji, jak również wyjściowej ilości RNA (14).

Poziom ekspresji badanego genu w ocenie relatywnej determinowany jest i przedstawiany jako stosunek między ilością transkryptu genu badanego a ilością transkryptu wewnętrznego genu referencyjnego we wszystkich próbach. Wartość ta jest kolejno porównywana pomiędzy próbami np. pochodzącymi z różnych organów lub też tkanek.

Idealny gen kontrolny powinien posiadać niezmienny poziom ekspresji w różnych organach i tkankach organizmu oraz w różnych warunkach eksperymentalnych. Do najczęściej stosowanych genów referencyjnych należą m.in. geny  $\beta$ -aktyny, ubikwityny, tubuliny, 18S i 28S rRNA, cyklofilin, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) oraz  $\beta$ -glukuronidazy (14,27).



Procedury obliczeniowe różnią się w zależności od tego czy transkrypty badanego genu amplifikują się z porównywalną wydajnością do wydajności amplifikacji transkryptów wewnętrznego genu referencyjnego, czy też te wydajności są znacznie różne (28).

## 6. Wybór genów do walidacji

W wielu eksperymentach z wykorzystaniem mikromacierzy DNA liczba badanych genów jest zbyt duża, aby móc dla każdego z nich indywidualnie przeprowadzić proces walidacji. Wybór genów do dalszych analiz nie pozostaje zatem bez wpływu na ostateczny kształt otrzymanych wyników. Ważną kwestią jest uważne przyjrzenie się „rzędom wielkości” regulacji genów, tzn. ile razy ekspresja danego genu ulega zwiększeniu lub zmniejszeniu w porównaniu z kontrolą. Łatwiej jest szacować zmiany w ekspresji genów, których mRNA naturalnie występuje w komórce na wysokim poziomie, niż dla genów, których poziom ekspresji *in vivo* jest bardzo niski. Wykazano, że korelacja pomiędzy wynikami mikromacierzy i PCR w czasie rzeczywistym dla genów, których ekspresja ulega zmianie więcej niż 2-krotnie jest silna i zbliżona do 90% (29). Często jest zanik tej korelacji pomiędzy wynikami otrzymanymi obiema metodami w sytuacji, gdy wynik z analizy mikromacierzy sugeruje niższą niż dwukrotną zmianę w poziomie ekspresji badanego genu, np. dla 1,4-krotnej zmiany w poziomie regulacji genu korelacja ta wynosi już tylko 40% (30).

Innym zagadnieniem pozostaje posiadanie wiedzy dotyczącej przewidywanych profili ekspresji genów. Łatwiej jest sprawdzać poprawność wyniku mikromacierzowego dla genu, którego profil ekspresji jest znany. Jeśli badacz posiada taką możliwość, sugeruje się, żeby wykorzystać taki gen do walidacji, choćby w celu kontroli samego procesu walidacyjnego. Zalecane jest również sprawdzenie *a priori* poprawności otrzymanych wyników z użyciem metod *in silico* opierających się na wykorzystaniu opublikowanych danych literaturowych dostępnych w bazach danych, np. NCBI. Przystępując do następnego etapu, jakim jest eksperymentalne sprawdzenie uzyskanych wyników należy umiejętnie zaprojektować miejsca wiązania starterów i sond, które zostaną wykorzystane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Błąd na tym etapie znacząco wpływa na wynik ilościowego PCR. Startery i sondy w miarę możliwości powinny obejmować swym zasięgiem region analogiczny do tego, do którego projektowane były sondy mikromacierzowe. W literaturze nie podaje się wytycznych wyznaczających minimalną liczbę genów, które powinny zostać sprawdzone z użyciem PCR w czasie rzeczywistym. Wybór ten leży w gestii indywidualnego badacza, jednakże nie ulega wątpliwości, że im liczba badanych genów jest większa, tym rzetelniejsze oraz bardziej informatywne stają się uzyskane wyniki.

## 7. Podsumowanie

Technologia mikromacierzy DNA stała się niezwykle potężnym narzędziem badawczym w rękach badaczy reprezentujących różne dziedziny nauki. W ostatnich latach nacisk położony był na udoskonalanie technicznej strony metody, aby możliwe stało się uzyskiwanie powtarzalnych wyników. Teraz, kiedy została ona już opracowana, na pierwszy plan wysunęło się zagadnienie weryfikacji uzyskanych wyników. Wśród metod możliwych do zaaplikowania prym wiedzie zdecydowanie PCR w czasie rzeczywistym, i to ta metoda jest w zdecydowanej większości wybierana przez badaczy. Pamiętać należy, że aby uzyskany wynik był miarodajny, weryfikacja musi zostać wykonana w tym samym laboratorium oraz na tym samym materiale biologicznym, którego dotyczą wyniki mikromacierzy (31). Nie należy również pominąć kwestii jakości i czystości badanych prób, od której uzależniony jest rezultat przeprowadzanej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wyeliminowanie czynników związanych z tłem sprawia, że uzyskany wynik ilościowy jest łatwiejszy do interpretacji.

### Stosowane skróty

FAM:	6 – karboksylfluoresceina
TET:	tetrachloro-6-karboksylfluoresceina
JOE:	2,7-dimetoksy-4,5-dichloro-6-karboksylfluoresceina
HEX:	heksachloro-6-karboksylfluoresceina
TAMRA:	6-karboksytetrametylorodamina
DABCYL:	kwasy 4-(4'-dimetylamino)fenylo) benzoesowy
ROX:	6-karboksyl-N,N,N',N'-tetrametylorodamina

Praca finansowana z funduszy projektu badawczego MNiSzW nr N N301 2042 33.

### Literatura

1. Rajeevan M. S., Ranamukhaarachchi D. G., Vernon S. D., Unger E. R., (2001), *Methods*, 25, 443-451.
2. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R., (1992), *Biotechnology*, 10, 413-417.
3. Haugland R. P., (2002), *Molecular Probes Inc.*, 9<sup>th</sup> ed., Eugene, Oregon, USA.
4. Wilhelm J., Pingoud A., (2003), *ChemBioChem*, 4, 1120-1128.
5. Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A., Mills A. G., Gorn V., Singer M. J., (2000), *Analytical Biochemistry*, 285, 194-204.
6. de Medici D., Croci L., Delibato E., di Pasquale S., Filetici E., Toti L., (2003), *Applied and Environmental Microbiology*, 3456-3461.
7. Lekan Deprez R. H., Fijnvandraat A. C., Ruijter J. M., Moorman A. F. M., (2002), *Analytical Biochemistry*, 307, 63-69.
8. Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T., (1997), *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.
9. Giglio S., Monis P. T., Saint C. P., (2003), *Nucleic Acids Research*, 31, 22.
10. Harasawa R., Mizusawa H., Fujii M., Yamamoto J., Mukai H., Uemori T., Asada K., Kato I., (2005), *Microbiol. Immunol.*, 49, 859-863.
11. Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7276-7280.



12. Lie Y. S., Petropoulos C. J., (1998), *Current Opinions in Biotechnology*, 9, 43-48.
13. Bustin S. A., (2000), *J. Mol. Endocrinology*, 25, 169-193.
14. Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Boulion R., Mathieu C., (2001), *Methods*, 25, 386-401.
15. Bustin S. A., (2002), *J. Mol. Endocrinology*, 29, 23-39.
16. Wong M. L., Medrano J. F., (2005), *BioTechniques*, 39.
17. Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P., (1997), *BioTechniques*, 22, 130-138.
18. Ginzinger D. G., (2002), *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
19. Malinen E., Kassinen A., Rinttila T., Palva A., (2003), *Microbiology*, 149, 269-277.
20. Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M., (1996), *Genome Research*, 6, 986-994.
21. Lockey C., Otto E., Long Z., (1998), *BioTechniques*, 24, 744-746.
22. Morrison T. B., Weis J. J., Wittwer C. T., (1998), *BioTechniques*, 24, 954-962.
23. Bernard P. S., Wittwer C. T., (2002), *Clin. Chem.*, 48, 8, 1178-1185.
24. Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., Leong F. T., Douglas S. H., Field S. L., Bell S. M., Combaret V., Puisieux A., Mighell A. J., Robinson P. A., Inglehearn C. F., Isaacs J. D., Markham A. F., (2003), *BMC Biotechnology*, 3, 18.
25. Moody A., Sellers S., Bumstead N., (2000), *Journal of Virological Methods*, 85, 55-64.
26. Fronhoffs S., Totzke G., Stier S., Wernert N., Rothe M., Bruning T., Koch B., Vetter H., Ko Y., (2002), *Molecular and Cellular Probes*, 16, 99-110.
27. Tichopad A., Didier A., Pfaffl M. W., (2004), *Molecular and Cellular Probes*, 18, 45-50.
28. Larionov A., Krause A., Miller W., (2005), *BMC Bioinformatics*, 6, 62.
29. Dallas P. B., Gottardo N. G., Firth M. J., Beesley A. H., Hoffmann K., Terry P. A., Freitas J. R., Boag J. M., Cummings A. J., Kees U. R., (2005), *BMC Genomics*, 6, 59.
30. Morey J. S., Ryan J. C., van Dolah F. M., (2006), *Biol. Proced.*, 8, 175-193.
31. Wang Y., Barbacioru C., Hyland F., Xiao W., Hunkapiller K. L., Blake J., Chan F., Gonzalez C., Zhang L., Samaha R. R., (2006), *BMC Genomics*, 7, 59.