

Zastosowanie transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET) w ilościowej metodzie oznaczania ekspresji genów na przykładzie sondy TaqMan

Wstęp

Każdy organizm posiada unikatowy kod genetyczny, niezbędny do przekazania informacji do potomnych komórek somatycznych oraz do prekursorów gamet, co jest niezbędne do reprodukcji organizmów żywych. Informacja ta jest zapisana w sekwencji nukleotydów kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Kod genetyczny to uniwersalny system funkcjonujący w przyrodzie, przyporządkowujący sekwencje ułożenia zasad w DNA sekwencji ułożenia aminokwasów w białku. Realizacja kodu genetycznego przez komórkę polega na przepisaniu zakodowanej w sekwencji nukleotydów informacji i przetłumaczeniu jej na sekwencję aminokwasów w białku (rys. 1). Wszystkie organizmy stosują się do tego samego przyporządkowania kodonów poszczególnym aminokwasom. Kod genetyczny jest więc powszechny dla wszystkich organizmów żyjących na naszej planecie.



Rys. 1. Przepływ informacji genetycznej w komórce

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (*Polimerase Chain Reaction*)

W latach 80. kanadyjski biochemik Kary Mullis wraz ze współpracownikami opracowali metodę PCR, czyli łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *Polymere Chain Reaction*) pozwalającą na powielanie dowolnej sekwencji DNA w warunkach *in vitro* [Mullis 1990]. Obecnie jest to jedna z najważniejszych technik biologii molekularnej posiadająca wiele odmian [Bal 2007; Słomski 2008; Węgleński 2000]. Pozwala ona uzyskać ze złożonej mieszaniny fragmentów DNA miliardy kopii ściśle określonego fragmentu, które mogą być użyte do dalszych analiz.

Klasyczna reakcja PCR opiera się na trzech, cyklicznie powtarzających się etapach, różniących się temperaturą i czasem trwania [Bal 2007; Słomski 2002;

Węgleński 2000]. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matryca (cząsteczka kwasu nukleinowego), na podstawie której termostabilna polimeraza DNA dobudowuje komplementarne 2'-deoksyadenozynotrójforylany (dNTPy) będące substratami reakcji. O tym, który fragment będzie namnożony, decydują startery, krótkie jednoniciowe fragmenty DNA o znanej sekwencji, które przyłączają się do matrycy definiując fragment ulegający amplifikacji. W pierwszym etapie reakcji następuje termiczna denaturacja podwójnej nici DNA ($\sim 95^{\circ}\text{C}$), prowadząc do powstania pojedynczych nici kwasu deoksynukleinowego. W drugim etapie obniżenie temperatury umożliwia przyłączenie się starterów do jednoniciowej matrycy DNA, dzięki czemu polimeraza DNA zapoczątkowuje wydłużanie nowej nici DNA w kierunku 5'→3' przez sukcesywne dołączanie pojedynczych, komplementarnych do matrycy dNTPów. W kolejnych cyklach reakcji nowo powstała podwójna nić DNA ulega denaturacji i staje się matrycą w kolejnych cyklach. W reakcji przebiegającej z perfekcyjną wydajnością w początkowych cyklach reakcji liczba kopii wzrasta w ilości 2-krotnej na cykl (2^n). Kiedy powielanie osiąga maximum wydajności, reakcja przestaje mieć charakter eksponencjalny. W kolejnych cyklach polimeraza stopniowo termicznie inaktywacji, a składniki mieszaniny reakcyjnej ulegają wyczerpywaniu. Ocena ilości produktu po zakończeniu reakcji nie daje więc odpowiedzi dotyczącej początkowej ilości cząsteczek matrycowych.

Analiza przyrostu produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

Do oznaczenia ilości matrycowego DNA zawartego w próbce wykorzystuje się zmodyfikowaną technikę PCR (Real-Time PCR), która pozwala na monitorowanie reakcji w czasie, w którym ona przebiega [Słomski 2002; Węgleński 2000]. Istotą reakcji Real-Time PCR jest możliwość monitorowania progresji amplifikacji DNA w fazie eksponencjalnej. Umożliwiają to specyficzne barwniki lub sondy wprowadzone do reakcji, które przyłączając się do produktu reakcji emitują fluorescencję. Wzrost fluorescencji jest proporcjonalny do ilości produktu generowanego w każdym cyklu reakcji, a jej pomiar umożliwiają specjalnie do tego przystosowane termocyklery. Podstawą obliczeń poziomu ekspresji badanego genu jest cykl progowy – C_T (ang. *Cycle Threshold*), czyli cykl, w którym dana próbka osiągnie poziom linii progowej (prostej odcinającej szumy). Jest on skorelowany z początkową ilością matrycy; im większa wyjściowa ilość matrycy, tym niższa wartość C_T [Ahmed 2002].

Stężenie badanej sekwencji można mierzyć dwoma metodami: stosując analizę bezwzględną lub względną. Metoda bezwzględna dzięki wykorzystaniu krzywych standardowych pozwala na określenie początkowej ilości materiału genetycznego w jednostkach rzeczywistych, np. liczbie kopii oznaczanej sekwencji. W metodach względnych wynik stanowi krotność zmiany ekspresji

badanego genu pod wpływem procedury doświadczalnej w odniesieniu do próby referencyjnej zwanej również kalibratorem, którym zazwyczaj jest próba nie-poddana żadnym manipulacjom eksperymentalnym [Bubner, Baldwin 2004; Ginzinger 2002].

Do analizy przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym opracowano kilka metod różniących się cząsteczkami emitującym fluorescencję. Barwniki takie jak SYBR Green I, bromek etydyny oraz jodek propidyny są detektorami niespecyficznymi, które po związaniu z każdym dwuniciowym DNA obecnym w mieszaninie reakcyjnej, bez względu na jego sekwencję (niespecyficzne produkty reakcji, dimery utworzone przez startery), emitują światło o określonej długości fali. Metoda ta jest więc obarczona dużym błędem pomiarowym. Możliwym obejściem tego problemu jest wykonanie krzywej topnienia. Każdy dwuniciowy DNA znajdujący się w mieszaninie reakcyjnej ma określoną temperaturę topnienia. Określenie temperatury topnienia komponentów reakcji umożliwia wyeliminowanie reakcji niespecyficycznych.

Druga bardziej czuła i specyficzna metoda wykorzystuje znakowane fluorescencyjnie sondy będące oligonukleotydami o sekwencji komplementarnej do badanego fragmentu cząsteczki DNA, które emituje światło w odpowiednich warunkach. Przykładami stosowanych w reakcji Real-Time PCR sond są: TaqMan, Beacons, Scorpions, SimpleProbe, Eclipse, Cyclicons i inne.

Działanie najczęściej stosowanych sond opiera się na zjawisku transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET – ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) pomiędzy fluorochromem a związkiem wygaszającym. Cząsteczka fluorochromu (donor) absorbuje określoną długość fali, a następnie przenosi energię na inny fluorochrom (akceptor), gdzie dochodzi do wygaszania emisji, bądź emitowane jest światło o innej długości fali niż fala zaabsorbowana [Espy i in. 2006]. Teoria ta została opracowana przez Theodora Forstera w latach 40. Pierwsze badania biologiczne, w których wykorzystano FRET, przeprowadzono w 1970 r. w analizie białek. W połowie lat 80. i początku 90. powstały pierwsze publikacje z wykorzystaniem FRET do badań genetycznych DNA.

Zasada działania sondy TaqMan

Sondy TaqMan są oligonukleotydami o długości ok. 20–30 par zasad zawierającymi na końcu 5'-fluorescencyjny barwnik reporterowy, zaś na końcu 3' – wygaszacz. Kiedy sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika i wygaszacza powoduje supresję fluorescencji [Forster 1948; Lakowicz 1983]. Aby wzbudzić emisję światła, cząsteczka reportera musi zostać oddzielona od wygaszacza. Umożliwia to 5'→3' egzonukleolityczna aktywność Taq DNA polimerazy, dzięki której podczas reakcji PCR sonda jest degradowana [Lie, Petropoulos 1998].

Podczas akumulacji produktów PCR w każdym cyklu reakcji sonda rozpoznaje komplementarny fragment DNA i wiąże się z nim. Egzonukleolityczna aktywność Taq DNA polimerazy degradowuje sondę w miejscu między reporterem a wygaszaczem, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu sygnału fluorescencji barwnika reporterowego. Powszechnie stosowane barwniki na końcu 5'-„reporterowe” to: FAM (6-karboksylofluoresceina), TET (tetrachloro-6-karboksylo-fluoresceina) oraz VIC (nazwa zastrzeżona przez ABI, USA). Do barwników wykorzystanych na końcu 3' – „wygaszacze” należą TAMRA (6-karboksylotetrametylorodamina) oraz DABCYL [kwas 4-(dimetyloaminofenyloazo) benzoesowy].

Przykładowe badania ekspresji genów wykonywane w oparciu o technikę Real-Time PCR

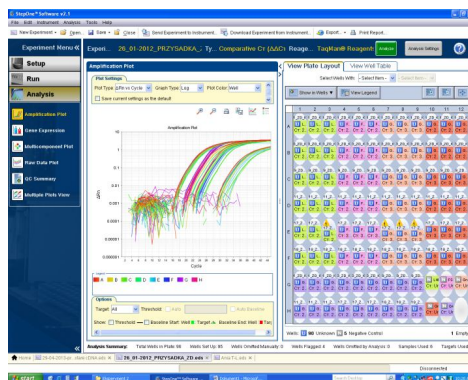
W laboratorium Centrum Eksperymentalnego Badań nad Rozrodem Zwierząt Centrum Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych prowadzone są badania zmian w ekspresji genów gonadoliberyny i podjednostek gonadotropin w strukturach centralnego układu nerwowego świniodzika w okresie najdłuższego i najkrótszego dnia świetlnego. Badania te prowadzone są przy użyciu techniki Real-Time PCR z wykorzystaniem sondy TaqMan.

W laboratorium znajduje się aparat do detekcji Real-Time StepOnePlus (Applied Biosystems) (rys. 2). Reakcje przeprowadzane są na płytkach umożliwiającym jednoczesne wykonanie 96 analiz.



Rys. 2. Real-Time StepOnePlus (Applied Biosystems)

Przykładowy wykres przyrostu amplifikacji badanych genów przedstawiony jest na rys. 3. Występujące krzywe wskazują na spadek ekspresji badanego genu w stosunku do próby kontrolnej.



Rys. 3. Wykres przyrostu amplifikacji w czasie rzeczywistym

Podsumowanie

Metoda Real-Time PCR jest nieodłączną i jedną z podstawowych metod szeroko stosowanych w inżynierii biomedycznej. W porównaniu z klasyczną techniką PCR jest szybsza i bardziej czuła. Dokładność wyniku w dużej mierze zależy od użytej w reakcji cząsteczki emitującej fluorescencję. Sondy molekularne, których konstrukcja oparta jest na zjawisku FRET, są detektorami bardziej specyficznymi w porównaniu z barwnikami emitującymi światło, takimi jak SYBR Green I, przez co analiza pomiaru ilości kopii produktu charakteryzuje się wysoką czułością.

Literatura

- Ahmed F.E. (2002), *Detection of genetically modified organisms in foods*, „Trends in Biotechnology”, nr 5.
- Bal J., red. (2007), *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*, Warszawa, ISBN: 978-83-01-14703-7.
- Bubner B., Baldwin I.T. (2004), *Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants*, „Plant Cell Rep.”, nr 23.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill III F.R., Smith T.F. (2006), *Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing*, Clinical Microbiology Reviews.
- Forster T. (1984), *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, „Ann Phys (Leipzig)”, nr 2.
- Ginzinger D.G. (2002), *Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream*, „J. Mol. Endocrinol”, nr 30.
- Lakowicz J.R. (1983), *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, chapter 2.
- Lie Y.S., Petropoulos C.J. (1998), *Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays*, „Current Opinion Biotechnol”, 9.

Mullis K.B. (1990), *The unusual origin of the polymerase chain reaction*, Sci Am.
Słomski R., red. (2008), *Analiza DNA. Teoria i praktyka*, Poznań, ISBN: 978-83-7160-496-6.
Węgleński P., Bartnik E., (2000), *Genetyka molekularna*, Warszawa, ISBN 830111830X.

Streszczenie

„Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) zajmuje bardzo ważne miejsce w badaniach biologii molekularnej. Wiele technik inżynierii biomedycznej wykorzystuje produkty tej reakcji do dalszych analiz. Real-Time PCR jest metodą opartą na klasycznej metodzie PCR. Mimo swojej krótkiej historii jej popularność i obszar zastosowania wciąż wzrasta. Jej głównymi zaletami jest większa czułość, precyzyjność oraz możliwość ilościowej oceny produktu w komórkach lub tkankach. Zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET) jest podstawą działania sondy TaqMan jako jednej z wielu wykorzystywanych do monitorowania przyrostu produktu amplifikacji w kolejnych cyklach reakcji.

Celem niniejszej pracy był zwięzły opis metody z przedstawieniem jej najważniejszych zalet oraz możliwości zastosowania w praktyce na przykładzie badań prowadzonych w Centrum Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych.

Słowa kluczowe: inżynieria biomedyczna, biologia molekularna, PCR.

The application of fluorescence resonance energy transfer (FRET) method for the quantitative determination of gene expression with using TaqMan probe

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) takes a very important place in the study of molecular biology. Many biomedical engineering techniques use the products of this reaction for further analysis. Real-Time PCR is a method based on the classical method of PCR. Despite its short history, its popularity and area of use is still increasing. Its main advantages are high sensitivity, precision and the ability to quantitatively evaluate the product in cells or tissues. The phenomenon of fluorescence resonance energy transfer (FRET) is the basis of action TaqMan probe as one of many used for monitoring the growth of the product amplification in the subsequent reaction cycles.

The aim of this study was brief description of the method with presentation of the most important advantages and possibilities of practical application as an example of research conducted at the Center for Applied Biotechnology and Basic Sciences.

Key words: biomedical engineering, molecular biology, PCR.