

Projektowanie reakcji multiplex-PCR

Dzięki nowoczesnym, wydajnym zestawom do PCR, amplifikacja DNA nie jest już takim wyzwaniem, jak w latach 80-tych i 90-tych. Wraz z poprawą metodyki, pojawiły się ciekawe pomysły na “unowocześnienie” reakcji PCR i zwiększenie jej wydajności i rzetelności. Przykładem modyfikacji PCR, która wprowadza cały wachlarz nowych możliwości, jest multiplex-PCR.

Czym jest multiplex?

Przez multiplex-PCR rozumiemy każdą modyfikację PCR, która polega na zmieszaniu co najmniej trzech primerów tak, by amplifikacji naraz ulegały dwie różne (lub więcej) matryce. “Multipleksowanie” można przetłumaczyć na polski jako “scalanie” kilku reakcji. Poniżej przedstawiliśmy poglądową rycinę z dwoma podstawowymi przykładami “multipleksów”.

Zalety i ograniczenia metod typu multiplex-PCR

Wiele różnych dziedzin biologii molekularnej doceniło multiplex:

* prowadzenie równocześnie kilku reakcji skraca czas i zmniejsza koszt wykonania oznaczeń (zamiast kilku reakcji PCR wykonujemy jedną), pozwala też na oszczędność matrycy, co może być szczególnie ważne, gdy dysponujemy minimalnymi ilościami unikatowego materiału (tkanka nowotworowa, mikroślady);

*kolejną zaletą reakcji w multipleksie jest możliwość zastosowania wewnętrznej kontroli amplifikacji w reakcjach, w których stwierdzamy

obecność lub brak produktu (dodatni/ujemny). Wówczas poza właściwą reakcją wykonujemy jednocześnie PCR dla jakiegoś fragmentu kontrolnego DNA, który niezależnie od obecności lub braku badanego amplikonu, zawsze będzie dawał produkt. Taka kontrola pozwoli nam odróżnić wynik fałszywie ujemny (nie dodana matryca, nieudana reakcja) od prawdziwie ujemnego;

*podejście multiplex-PCR jest pomocne podczas wykrywania kilku wariantów tego samego genu jednocześnie;

*dzięki scalaniu kilku reakcji możliwe stały się rzetelne pomiary metodą Real-Time PCR, w których z zastosowaniem sond molekularnych możemy monitorować ilościowo naraz kilka transkryptów lub wariantów allelicznych.

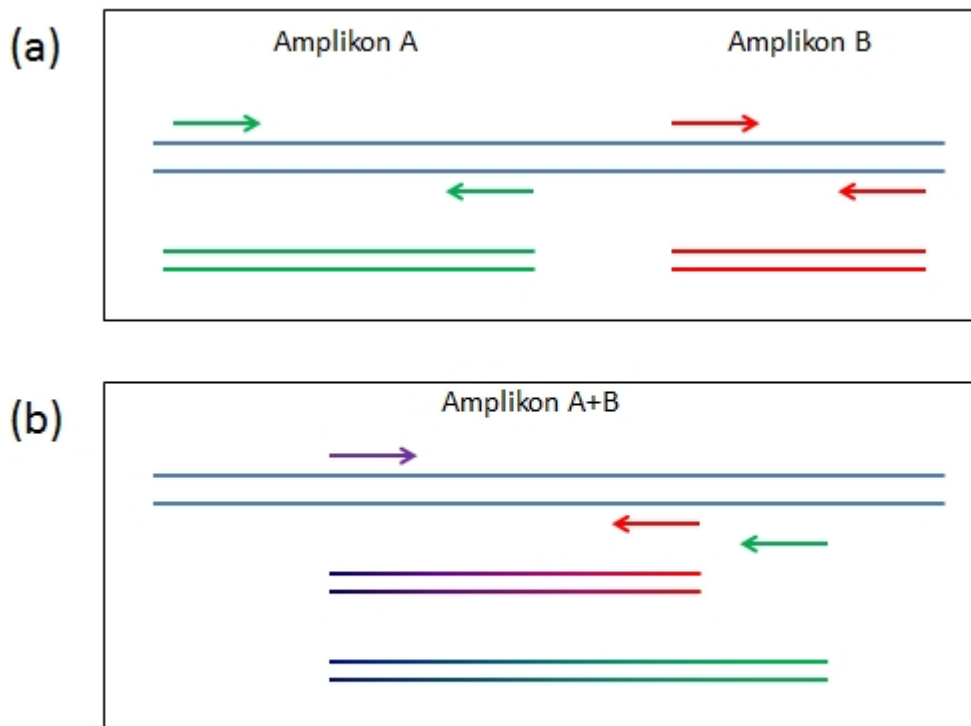
Ograniczenia podejścia multiplex są nieliczne, należą do nich:

*trudność wstępnej optymalizacji reakcji;

problemy w doborze odpowiednich proporcji starterów reakcji

*w niektórych przypadkach w ogóle nie ma możliwości dobrania kilku par starterów tak, by nie tworzyły między sobą par typu primer-dimer;

*w przypadku amplifikacji z cDNA genów o bardzo różnym poziomie ekspresji może dojść do faworyzowania amplifikacji tylko genu o wyższym poziomie ekspresji.



Dwa przykłady multiplex-PCR: z wykorzystaniem dwóch par starterów (a) oraz 3 starterów nacełowanych na różne warianty genowe (b)

Optymalizacja reakcji w multipleksie

Są 2 podejścia do tworzenia tego typu reakcji: pierwsza polega na wstępnym doborze warunków reakcji dla odrębnych amplikonów osobno, a następnie interpolowaniu stężeń odczynników i protokołu amplifikacji tak, by pogodzić ze sobą obie pary starterów. Drugie podejście polega na “pójściu na żywioł”- nie przejmujemy się wydajnością reakcji rozumianych osobno, od razu mieszamy startery i patrzymy, co z tego wyniknie.

Podejście pierwsze jest bardziej racjonalne, jednak więcej kosztuje i jest bardziej czasochłonne. Nie zawsze też opracowanie dobrze działającej reakcji singleplex (pojedynczej) ma przełożenie na kinetykę reakcji multiplex.

Drugie podejście powinno być stosowane przez osoby, które mają już doświadczenie w optymalizacji PCR i znają doskonale chemię, na której pracują. Takie osoby mogą sobie pozwolić na ryzykowne próbowanie “na chybił trafił” warunków reakcji zgodnie z poprzednimi doświadczeniami własnymi.

Podstawowe zasady multipleksowania reakcji

Spróbujmy zatem wypracować jakiś schemat optymalizacji zgodnie ze strategią pierwszą.

1. Wybór amplikonów - jeżeli mamy luksus wyboru wśród kilku par starterów, wybierzmy dwie dla każdego amplikonu tak, by teoretycznie wyliczona temperatura topnienia była jak najbardziej zbliżona. Idealna różnica wielkości obu amplikonów, powinna wynosić 100-200nt, chociaż nie trzeba się trzymać bardzo rygorystycznie tego kryterium. Taka różnica wielkości amplikonów pozwala na łatwy rozdział na żelu, nie doprowadzając do faworyzowania krótszego produktu reakcji i jego preferencyjnej amplifikacji

2. Po otrzymaniu starterów przeprowadzamy optymalizację osobno dla każdej z reakcji PCR, [zgodnie z naszym poradnikiem](#). Trudność polega na dobraniu wspólnych lub zbliżonych warunków termicznych i poziomu magnezu dla obu naszych reakcji. Częściowo te parametry są od siebie zależne i zwiększona ilość magnezu pozwala na podniesienie niewielkie temperatury bez straty wydajności (lecz nie jest to regułą.)

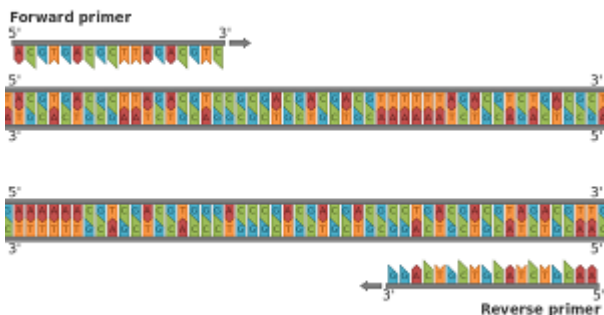
3. “Scalamy” obie reakcje i po rozdzieleniu żelowym analizujemy, czy otrzymaliśmy wyraźne i specyficzne produkty, czy ich stężenie jest zbliżone, czy występują produkty niespecyficzne.

4. Zwykle za pierwszym razem nie udaje się dobrać idealnych warunków. Jeżeli widzimy tylko jeden z produktów, lub jest on w dużej przewadze nad drugim, zmniejszamy o połowę stężenie starterów dla przeważającego produktu. Alternatywnie, zwiększamy o 50% stężenie starterów dla słabszego.

5. Jeżeli otrzymujemy oba produkty, lecz poza nimi występuje produkt niespecyficzny, wykonujemy zwykły gradient termiczny i/lub magnezu dla multipleksu (zgodnie z [Poradnikiem](#))

6. Jeżeli nie otrzymujemy żadnego produktu lub bardzo słabe, pierwszym krokiem jest obniżenie temperatury amplifikacji reakcji (gradient termiczny). Gdy nie daje to efektu, wracamy do temperatury wyjściowej i dodajemy magnezu (o 25-50% w pojedynczej reakcji lub stopniowo w gradiencie). Jeżeli i ten krok nie rozwiązuje naszych problemów, dodajemy 50%-100% dNTP do wyjściowej reakcji. Możemy także zadziałać jednocześnie zwiększając magnez i dNTP, a nawet wydłużając etap annealingu maksymalnie do minuty.

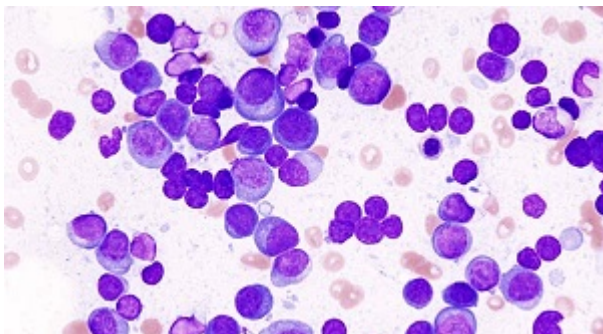
7. Może okazać się, że nie otrzymamy w ogóle produktu. Wówczas rezygnujemy z tej pary starterów lub próbujemy innego zestawu do reakcji PCR (czasami to wystarczy, żeby ruszyć oporną reakcję)



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0

Jeżeli szczęśliwie udało nam się otrzymać produkty, rozważmy dopracowanie reakcji poprzez manipulację stężeniami starterów, magnezu i stężenia matrycy. Multiplex-PCR powinien być niezawodny i powtarzalny. Dobrze działająca reakcja wynagrodzi nam trudy i czas spędzony podczas optymalizacji!



Metody wykrywania białka M w gammopatiach monoklonalnych (I)

W diagnostyce chorób układu krwiotwórczego przebiegających ze zwiększoną liczbą komórek plazmatycznych, niezwykle ważne są badania laboratoryjne stężenia immunoglobulin, wydzielanych przez te komórki. Do dyspozycji lekarza i diagnosty pozostaje kilka metod wykrywania patologicznego białka, takich jak immunoelektroforeza białek surowicy krwi oraz immunofiksacja. Jednakże obecnie jednym z najbardziej

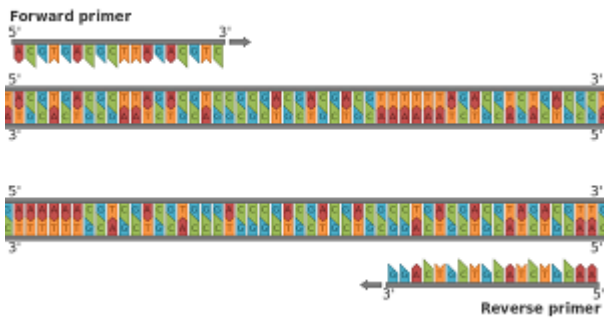
przydatnych, zarówno przy ustalaniu rozpoznania, doborze leczenia, jak i w jego monitorowaniu jest badanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy (ang. *serum Free Light Chains*, sFLC).

Charakterystyka gammapatii monoklonalnych

Do tzw. gammapatii monoklonalnych zalicza się m.in. zespoły MGUS, szpiczaka mnogiego, makroglobulinemię Walderstroema, chorobę łańcuchów ciężkich (HCD), oraz amyloidozę z łańcuchów lekkich. We wszystkich tych schorzeniach mamy do czynienia z rozrostem klonalnym komórek plazmatycznych lub limfoplazmatycznych, które produkują kompletne bądź niekompletne (łańcuchy lekkie/ciężkie) cząsteczki tego samego wariantu immunoglobuliny. Zgodnie z typem struktury wydzielanej immunoglobuliny możemy mówić o monoklonalnym białku IgG, IgA, IgM (wyjątkowo rzadko IgD, IgE), oraz o łańcuchach lekkich kappa i lambda. Do diagnostyki podtypów Ig jeszcze wrócimy, zwróćmy jednak uwagę na wysoce zmienny charakter cząsteczek immunoglobulin. Ze względu na swoją rolę w wykrywaniu obcych antygenów, poliklonalne immunoglobuliny fizjologicznie występujące w ustroju są bardzo różnorodne. Dlatego struktura monoklonalnej immunoglobuliny w gammapatiach jest w zasadzie unikalna dla każdego chorego. Wynika stąd wiele problemów diagnostycznych, o czym za chwilę.

Najnowszy podział gammapatii monoklonalnych jest oparty o odsetek plazmocytów w szpiku chorego, stężenie produkowanej immunoglobuliny (zwanej także białkiem M), stosunek stężeń łańcuchów lekkich kappa i lambda, oraz o objawy konstytucjonalne u chorego. Tetrada objawów klinicznych, określana akronimem CRAB dotyczy zwiększonego poziomu wapnia, uszkodzenia nerek, anemii i ubytków kostnych. W zależności od powyższych kryteriów wyróżniono:

-zespoły MGUS - gammapatie monoklonalne o niezidentyfikowanym znaczeniu (najniższe ryzyko konwersji do pełnoobjawowego szpiczaka);



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0

-szpiczak tłący się (ang. *smouldering myeloma*)- bez objawów konstytucjonalnych, ale istnieje wyraźne ryzyko progresji do pełnoobjawowego szpiczaka;

-szpiczak plazmocytowy - forma objawowa;

-białaczkę plazmocytową - agresywna, uogólniona postać szpiczaka mnogiego o przebiegu ostrej białaczki;

-szpiczak niewydzielający - forma szpiczaka produkująca bardzo niewielkie ilości białka M lub cechujące się bardzo szybką jego degradacją w ustroju;

-makroglobulinemia Walderstroema - typ chłoniaka niezziarnicznego z komórek limfoplazmatycznych, wydzielających immunoglobulinę monoklonalną klasy IgM;

-choroba łańcuchów ciężkich (choroba Franklina, choroba Seligmanna) - bardzo rzadki rozrost monoklonalny z komórek limfoplazmatycznych, wydzielający jedynie fragmenty łańcucha ciężkiego, bez łańcuchów lekkich;

-amyloidoza AL (z łańcuchów lekkich) - choroba spichrzeniowa powodowana odkładaniem się w tkankach nieprawidłowego białka monoklonalnego, produkowanego przez nowotworowy klon plazmocytów [1].

2. Zmienność białka M

Kłopoty diagnostyczne związane z wykrywaniem białka monoklonalnego są spowodowane fizjologiczną heterogennością cząsteczek przeciwciał i różną charakterystyką nowotworowego klonu komórek plazmatycznych/limfoplazmatycznych. Wykazano że w część przypadków gammapatii produkowane jest tylko białko w postaci kompletnych przeciwciał, w innych są to tylko łańcuchy lekkie lub jednocześnie występują łańcuchy lekkie i kompletne Ig. Dodatkowo szpiczaki niewydzielające mogą produkować na tyle

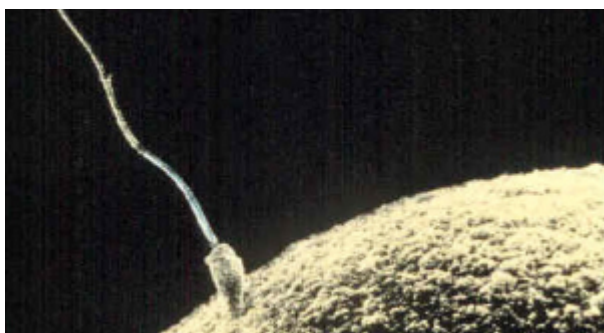
mało białka M, że jest ono niewidoczne w badaniach laboratoryjnych.

Zmienność Ig prowadzi także do problemów z wynikami fałszywie ujemnymi, gdy stosowane testy oparte są o przeciwciała monoklonalne anty-Ig. W przeciwieństwie do poliklonalnych, wykrywają one pojedyncze epitopy na cząsteczkach Ig, które mogą być nieobecne w niektórych wariantach tak zmiennych białek. Osobnym problemem jest ko-migracja immunoglobuliny monoklonalnej (szczególnie IgA) z frakcją białek beta w obrazie elektroforetycznym. W rzadkich przypadkach w szpiczaku obserwujemy białko biklonalne, produkowane równolegle przez 2 odrębne klony szpiczakowe [2].

W części drugiej niniejszego opracowania przedstawimy metody laboratoryjne wykorzystywane w rutynowej diagnostyce gammopatii i wskażemy, jak radzić sobie z powyższymi problemami, aby uniknąć wyników fałszywie negatywnych.

Piśmiennictwo:

1. Dmoszyńska A. Dyskrazje plazmocytowe [W:] Dmoszyńska A. (red.) Wielka Interna - Hematologia, wyd. I, Warszawa, Medical Tribune Polska 2011., str. 532-551.
2. Attaelmannan M, Levinson SS. [Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies](#). *Clinical Chemistry* 2000, 46(8) 1230-1238.



Diagnostyka laboratoryjna nasienia

Żyjemy w czasach, w których coraz większa liczba par ma problemy z poczęciem potomstwa. Klinicyści są zgodni, że najszybsze i najskuteczniejsze diagnozowanie niepłodności opiera się na wszechstronnym badaniu niepłodności u obojga partnerów jednocześnie, z oceną gospodarki hormonalnej oraz prawidłowości wytwarzania gamet. Niestety w praktyce diagnostyka niepłodności trwa długo i zwykle rozpoczyna się od przebadania mężczyzny pod kątem występowania defektów w wytwarzanym nasieniu. Jest to materiał łatwy do pozyskania, a sama procedura badania jest relatywnie szybka i tania, ocenia się, że aż 40% problemów z płodnością par jest związana właśnie z obniżoną zdolnością plemników partnera do zapłodnienia.

Jak pozyskuje się nasienie do badań?

Niestety rutynowo nie praktykuje się pobierania spermy w warunkach domowego zacisza ze względu na konieczność szybkiego wykonania badań po pobraniu materiału. Mężczyzna pobiera nasienie samodzielnie w placówce wykonującej badanie - ma do dyspozycji osobny pokój wyposażony podobnie jak gabinet dla dawców spermy i zapewnioną intymność. Pobranie nasienia w domu jest dopuszczalne, jeżeli pacjent jest wybitnie skrepowany i ma problem z wykonaniem tej czynności w obcym otoczeniu. Są to przypadki indywidualnie uzgadniane z laboratorium, w takich sytuacjach konieczne jest szybkie przetransportowanie ejakulatu w temperaturze 37 stopni do placówki wykonującej badanie (optymalnie w ciągu kilkunastu minut).

Przygotowanie do badania obejmuje okres abstynencji płciowej od 2 do 7 dni. Ze względu na pewną zmienność analityczną badanie powinno zostać wykonane co najmniej dwukrotnie w odstępie czasu co najmniej tygodniowym, maksymalnie 3-miesięcznym. Jeżeli wyniki istotnie się między sobą różnią, wykonuje się trzecie oznaczenie.

Bardzo istotne jest pobranie całej objętości ejakulatu, ponieważ plemniki rozmieszczone są w nim nierównomiernie, z tego względu ilościowa ocena może

być zaburzona przy źle zebranych materiałach.

W przypadku badania mikrobiologicznego nasienia, należy przed pobraniem materiału oddać mocz i umyć dokładnie okolice cewki moczowej (podobnie jak do badania mikrobiologicznego moczu).

Badanie nasienia rutynowo obejmuje kilka etapów:

- ocena makroskopowa: objętość, barwa, ciągliwość (lepkość), pH, stopień upłynnienia, czasami podawany jest także zapach
- ocena mikroskopowa morfologii komórek plemnikowych
- ocena mikroskopowa ilości plemników w ml upłynnionego ejakulatu
- ocena żywotności i ruchliwości plemników
- identyfikacja innych elementów upostaciowanych obecnych w ejakulacie (pasma śluzu, agregaty i aglutynaty plemników, obecność komórek nabłonkowych, niedojrzałych komórek rozrodczych, leukocytów i erytrocytów)
- dodatkowe badania biochemiczne: poziom fruktozy, LDH4, alfa-glukozydazy, kwaśnej fosfatazy , kwasu cytrynowego
- uzupełniające badania bakteriologiczne, histologiczne (ocena zawartości DNA)
- testy czynnościowe: badanie penetracji śluzu

1. Opis makroskopowy

Wstępny opis ejakulatu powinien zostać wykonany jak najwcześniej po pobraniu materiału, by możliwa była **ocena czasu upłynnienia**. Płyn nasienny początkowo wykazuje dużą lepkość, co zabezpiecza plemniki przed uszkodzeniami podczas przechodzenia przez cewkę moczową. W warunkach prawidłowych powinien on ulec upłynnieniu w czasie od kilkunastu do ok. 30 minut, przyjmuje się jednak że patologią jest nieupłynnienie materiału w ciągu godziny.

Ocena objętości możliwa jest albo poprzez zważenie (mniej dokładna), albo poprzez faktyczne zmierzenie objętości po upłynnieniu w naczynku z podziałką lub

w pipecie. Zwykle objętość nasienia pobranego po odpowiednim czasie abstynencji wynosi 2-6ml.

Ocena wizualna materiału po upłynnieniu to opis koloru i przejrzystości – prawidłowa sperma jest opalizująca, nieprzejrzysta, o kolorze białawym i jednolitej konsystencji. Zbyt duża przejrzystość świadczy o małej liczbie plemników z kolei wysoka leukocytoza może powodować mocniejsze zmętnienie. Sperma podbarwiona krwią ma brunatny odcień, niektóre leki i podwyższony poziom bilirubiny wolnej mogą dawać kolor żółty.

Orientacyjna ocena lepkości nasienia wykonywana jest na bagietce szklanej lub w pipecie pasteurowskiej. Prawidłowy materiał nie powinien się „ciągnąć” w formie długich pasm po upłynnieniu, ale kapać dość dużymi kroplami

Pomiar pH wykonuje się paskowo przy pomocy wskaźnika o zakresie odczynów od lekko kwaśnego do zasadowego (prawidłowo sperma jest alkaliczna, pH 7,2-7,8)

2. Opis mikroskopowy

Wstępna ocena wykonywana jest po upłynnieniu (ok 60 min od pobrania), przyżyciowo, w mikroskopie z kontrastem fazowym (zalecany), lub w zwykłym mikroskopie świetlnym. Na powiększeniu 10x (obiektywu) obserwujemy występowanie aglutynatów i agregatów, pasm śluzu oraz innych elementów upostaciowanych.

Następnie zmieniamy powiększenie na 20 lub 40x, by **przyrzeć się ruchliwości plemników**. Plemniki mogą wykazywać ruch postępowy, ruch wirowy w miejscu lub być nieruchliwe. Wg zaleceń WHO powinno się podliczyć co najmniej 200 plemników w 5 polach widzenia w każdym z 2 wykonanych preparatów. Sposób wyliczenia odsetka plemników o danym typie ruchu jest opisany w [polskim opracowaniu wytycznych WHO](#).

W preparacie bezpośrednim **określamy jeszcze rozcieńczenie**, które musimy wykonać, by móc przeprowadzić ocenę ilościową w komorze. We wspomnianym opracowaniu doskonale opisano jak należy wykonać rozcieńczenia.

Zliczenie liczby plemników w całym preparacie i przeliczenie na ml preparatu wykonuje się w komorze zliczeniowej, przy czym rekomendowane jest wykonanie

tego badania w udoskonalonej komorze Neubauera. Do wykonania badania można zastosować także komorę Maklera lub Burkera, należy mieć jednak świadomość, że wyniki uzyskane w tych 3 siatkach różnią się w przypadku oligospermii, stąd rekomendowana jest tylko komora Neubauera.

Z upłynnionej spermy równoległe do preparatu przyżyciowego wykonuje się rozmaz barwiony metodą Papanicolau, lub Shorra. Kryteria WHO dopuszczają także barwienie Diff-Quick. Diff-Quick i Papanicolau mogą także posłużyć do opisu innych komórek (leukocyty, nabłonki), jeżeli w obserwacji przyżyciowej zauważono dużą ilość komórek okrągłych.

Ocena morfologii

Ocena morfologii dokonywana jest pod powiększeniem obiektywu 100x, po wybarwieniu preparatu jedną ze wspomnianych powyżej metod (Diff-Quick, Papanicolau, lub Shorra). Wykonujemy ocenę w dwóch powtórzeniach po 200 plemników, najlepiej z dwóch różnych preparatów.

Plemniki klasyfikujemy jako **prawidłowe lub nieprawidłowe**, w zależności od ukształtowania główki, wstawki i wiciki spermatocyta. Każdy element plemnika powinien być prawidłowo zbudowany, w przeciwnym razie uznajemy taką komórkę za nieprawidłową.

Główka powinna być pojedyncza, kształtu owalnego, z dobrze zaznaczonym akrosomem (lizosomem), zajmującym powyżej 40% powierzchni z przodu główki. Akrosom tworzy charakterystyczne, łukowate przejaśnienie. O ile w obszarze akrosomu można stwierdzić obecność wakuoli (jasne owale), o tyle poniżej nie powinno się stwierdzać ich obecności.

Wstawka znajduje się bezpośrednio za główką, powinna leżeć w długiej osi komórki i być długości porównywalnej z główką.

Wici powinna być pojedyncza, mieć długość ok 10-krotnie większą niż główka o grubości mniejszej niż wstawka i jednolitej grubości. Nie powinna być patologicznie pozakrzywiana (połamana) ani ustawiona pod dużym kątem do wstawki.

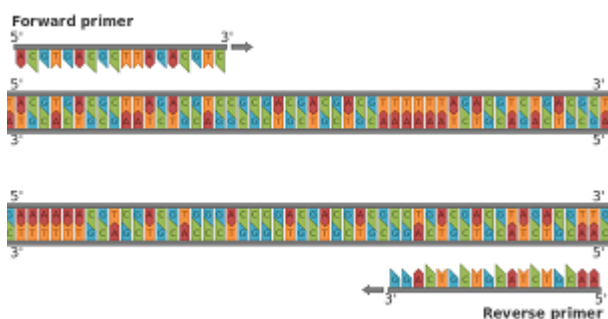
Obecnie dostępne są narzędzia komputerowe, pomagające w zdigitalizowanej ocenie morfologii.

3. Badania uzupełniające

Badania biochemiczne nie są rutynowo wykonywane podczas oceny nasienia, natomiast po stwierdzeniu nieprawidłowości można z ich pomocą dokonać oceny poszczególnych elementów męskiego układu płciowego: prostaty, pęcherzyka nasiennego i najądrza. Odpowiedni skład płynu nasiennego zapewnia odpowiednią żywotność plemników (kwas cytrynowy pełni funkcję osmotyczną), daje im energię do ruchu (fruktoza jako paliwo), zawartość enzymów wskazuje na prawidłowość funkcji nabłonka plemnikotwórczego. Szczególną rolę w diagnostyce biochemicznej ma poziom fosfatazy kwaśnej, który ulega obniżeniu podczas infekcji sterczu.

Badania immunologiczne płynu nasiennego (tzw. test MAR) pozwalają na stwierdzenie obecności przeciwciał, skierowanych przeciwko elementom nasienia. Coraz częściej obserwuje się autoimmunologiczne przyczyny problemów z płodnością. Szczególnie narażeni na rozwinięcie się przeciwciał są mężczyźni o stwierdzonej alergii oraz chorobach z autoagresji, oraz ci z przebytymi infekcjami lub urazami prostaty, jąder i nasieniowodów.

Badanie penetracji śluzu to zaawansowane badanie, testujące zdolność plemnika do przebicia się przez śluz szyjkowy. Defekty enzymatyczne dotyczące białek akrosomalnych mogą powodować brak możliwości penetracji zarówno śluzu jak i otoczki komórki jajowej. Z drugiej strony, kobieta immunizowana przeciwko plemnikom wytwarza w śluzie immunoglobuliny, które podobnie jak w sytuacji męskiej niepłodności z autoagresji, także niszczą plemniki.

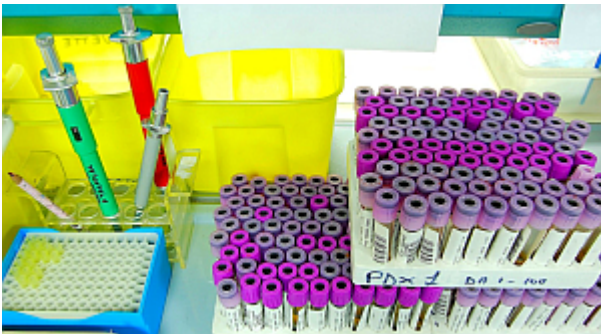


Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0

Marzena Wojtaszewska

Źródło:



Real-Time PCR (VI) – zastosowanie w diagnostyce medycznej

Diagnostyka molekularna w Polsce, pomimo że wciąż jest traktowana jako egzotyczny dodatek do standardowych metod diagnostycznych, nabiera dużego znaczenia także w naszym kraju. Obecnie badania oparte o qPCR są skoncentrowane głównie wokół diagnostyki mikrobiologicznej, coraz częściej jednak wkraczają one także w obszar leczenia przeciwnowotworowego.

W ostatniej części cyklu o Real-Time PCRze chcemy przedstawić praktyczne zastosowania tej techniki nie w badaniach podstawowych, ale w rutynowej diagnostyce medycznej, na co dzień wykonywanej również w polskich laboratoriach.

1. Diagnostyka mikrobiologiczna

Obecnie od skutecznej identyfikacji patogenu, szczególnie w warunkach szpitalnych, zależy szybkie włączenie odpowiedniego leczenia, które zwiększa szansę na wyleczenie pacjenta i znacząco zmniejsza koszty hospitalizacji (bo krótszy czas leczenia oznacza także krótszy pobyt w szpitalu, a zatem mniejsze wykorzystanie drogiej aparatury medycznej i mniejsze ilości potrzebnych leków), stanowiąc także również korzyść dla pacjenta.

W klasycznej diagnostyce mikrobiologicznej opartej o hodowlę drobnoustrojów wykrycie wirusów jest najczęściej niemożliwe. Dlatego podstawowym narzędziem do diagnozowania chorób powodowanych np. przez HBV, HCV, HIV, CMV, EBV (i wiele innych) jest PCR. qPCR ma przewagę czułości nad swoim starszym krewniakiem i pozwala na monitorowanie wirerii w czasie. Jest to szczególnie istotne podczas długotrwałego leczenia chemioterapeutykami przeciwwirusowymi, na przykład wirusowego zapalenia wątroby czy też AIDS. Bardzo intensywny monitoring wirerii jest konieczny także na oddziałach transplantacji, na których dochodzi często do reaktywacji latentnych wirusów u pacjentów w immunosupresji.

Ilościowy PCR w identyfikacji infekcji grzybiczych, podobnie jak w identyfikacji i monitoringu zakażeń wirusowych, także jest pomocnym narzędziem. Grzyby wolno rosną w podłożach, a z wielu preparatów klinicznych trudno jest je wyhodować (na przykład z popłuczyn oskrzelowych w przebiegu aspergillozy płucnej). Co prawda patogeny grzybicze są ogólnie trudne w identyfikacji, ale ilościowy multiplex PCR radzi sobie z nią często lepiej niż rutynowo stosowana ELISA.

W bakteriologii, ze względu na niższy koszt, głównym narzędziem diagnostycznym jest hodowla bakteryjna. Jest też drugi, ważniejszy powód: tylko z hodowli można wykonać antybiogram, który pozwala ustalić lekowrażliwość patogenów. Dlatego rola ilościowego PCRu jest często niedoceniana i traktowany jest on jako mało przydatny dodatek. Nic bardziej mylnego! Łatwo można sobie wyobrazić sytuację, w której rola diagnostyki molekularnej jest nie do przecenienia: u pacjentów hospitalizowanych z powodu zagrażających życiu infekcji liczy się czas. Takie bakterie jak meningokoki wymagają jak najszybszej identyfikacji u pacjentów z bakteryjnym zapaleniem opon mózgowych. Również bakterie o wolnym tempie wzrostu, takie jak przedstawiciele *Mycobacterium* mogą być wstępnie zidentyfikowani metodami biologii molekularnej. Istnieją także bakterie atypowe — pasożyty wewnątrzkomórkowe, które nie dają się wykryć w hodowli, a które

qPCR jest w stanie zidentyfikować.

2. Diagnostyka chorób nowotworowych

Obecnie coraz więcej typów nowotworów posiada swoje dla siebie „sygnatury molekularne” — geny, które uległy rearanżacji, czyli zmianie ilości kopii bądź mutacji w danym typie nowotworu. Te sygnatury mogą służyć do monitorowania leczenia przeciwnowotworowego, zarówno klasyczną chemioterapią, jak też lekami celowanymi. Największe zasługi w monitoringu chorób onkologicznych qPCR ma dla hematologii. Krew, jako tkanka płynna, podlega ciągłemu ruchowi i mieszaniu, w związku z czym komórki nowotworowe ulegają dyspersji i są obecne w każdej próbce krwi. Krew jest łatwym do pozyskania materiałem, co dodatkowo upraszcza diagnostykę. Obecnie najczęściej ilościowo monitoruje się poziom transkryptu BCR-ABL w przewlekłej białaczce szpikowej, PML-RARA w ostrej białaczce szpikowej, miano mutacji JAK2 w przewlekłych nowotworach mieloproliferacyjnych. Ilościowym PCRem możliwe jest też monitorowanie populacji komórek hematopoetycznych dawcy w krwiobiegu pacjenta po przeszczepieniu allogenicznym.

Z nowotworami litymi sprawa nie jest już tak prosta — niezwykle ważne jest odpowiednie pobranie bioptatów zawierających komórki neoplastyczne tak, by utkanie nowotworowe stanowiło większość tkanki. W takich bioptatach identyfikuje się przy pomocy multiplex-qPCRu mutacje w genach odpowiedzialnych za oporność na leczenie celowane, np. EGFR w niedrobnokomórkowym raku płuca czy też K-RAS i BRAF w metastatycznym nowotworze jelita grubego. Ilościowy PCR ma zastosowanie także w określaniu zmian w ilości kopii pewnych genów, przykładowo HER2 w nowotworach piersi. Powyższe badania w guzach litych nie są rutynowo stosowane w naszym kraju, jednak wydaje się że wraz z nowymi schematami terapeutycznymi dla innowacyjnych leków zaczną one być rutynowo stosowane także i u nas.

Czy znacie inne zastosowania ilościowego PCRu w polskiej diagnostyce? Może ktoś z Was wykonuje rutynowo oznaczenia, które pomagają polskim pacjentom? Zachęcam do dyskusji w komentarzach.

Marzena Pieronkiewicz



Jak przygotować wodę wolną od RNAz (H₂O-DEPC) – protokół

Woda wolna od RNAz to podstawa wszelkich manipulacji z RNA, podatnym na działanie wszędobylskich i bardzo stabilnych rybonukleaz. Wodę taką, najlepszej jakości, można zakupić u dystrybutorów większych firm sprzedających odczynniki dla biologii molekularnej. Gotowa woda ultraczysta jest niezbędna w sytuacji, gdy jakość każdej próbki jest niezwykle ważna (np. w diagnostyce medycznej), jednak w placówkach naukowych i przy zastosowaniach niekomercyjnych warto pomyśleć o własnoręcznym przygotowaniu wody do izolacji RNA. Jest to tak zwana „woda DEPC”, nazywana tak od odczynnika, który jest używany do degradacji RNAz.

Dlaczego akurat DEPC?

Dietylopirowęglan to silny środek alkilujący, któremu nie straszne są żadne białka, także bardzo stabilne i powszechne w środowisku RNAzy. Zaletą DEPC jest za to jego termolabilność i rozpad do neutralnych związków chemicznych pod wpływem autoklawowania. DEPC rozpada się na CO₂, H₂O oraz etanol, który w niewielkim stężeniu nie zagraża RNA. W temperaturze pokojowej przy dłuższym przechowywaniu lub przy zbyt wysokim stężeniu dietylopirowęglan ulega przekształceniu do niższych estrów, dlatego jeżeli trąci on owocowym, estrowym zapachem, nie nadaje się już do neutralizacji nukleaz.

Przygotowanie wody wolnej od rybonukleaz:

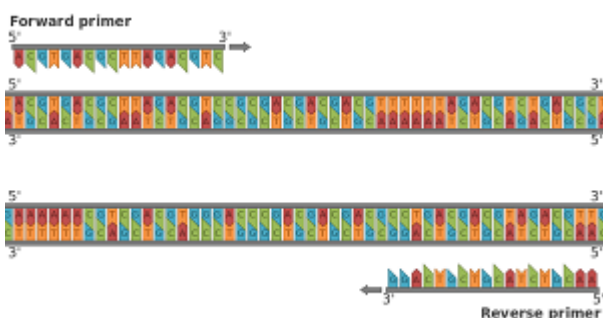
1. Do 1 litra wody destylowanej (najlepiej zaś poddanej odwrotnej osmozie) dodaj 1ml dietylopirowęglanu (DEPC), by otrzymać roztwór 0.1% (v/v) .
2. Dobrze wymieszaj, pozwól roztworowi odstać się w temperaturze pokojowej ok. 60-90 minut
3. Autoklawuj w standardowych warunkach (121*, 15 minut, 1 Bar)
4. *Voila!* Woda wolna od RNAz gotowa. Przed użyciem pozwól jej ostygnąć do temperatury pokojowej. Dobrze jest przepipetować część świeżo przygotowanej wody na małe alikwoty np. do zakręcanych próbek i zamrozić.

Uwagi:

* DEPC jest silnie toksyczny i kancerogenny (odczynnik alkilujący!), należy obchodzić się z nim ostrożnie.

* Dietylopirowęglan jest niestabilny rozcieńczony w wodzie i buforach, dlatego roztwór do autoklawowania przygotowuje się na świeżo, a przechowuje się już po sterylizacji jako czystą wodę DEPC.

Marzena Pieronkiewicz



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0



Labowe „know-how” – bakterie kompetentne i transformacja plazmidowym DNA

Czy zdarzyło Ci się niepowodzenie w tak podstawowej metodzie laboratoryjnej, jaką jest transformacja bakterii obcym DNA? Ta względnie mało skomplikowana metoda potrafi czasem być na tyle kapryśna, by spędzić nam sen z powiek. Wystarczy użyć „starych” lub nie do końca kompetentnych bakterii lub zastosować zbyt wysokie ilości DNA, aby na drugi dzień zamiast pięknych kolonii zobaczyć czyste szalki. Zaoszczędź sobie tej frustracji i użyj sprawdzonego przepisu, który przedstawiam poniżej:

1. 1. Przygotowanie chemicznie kompetentnych *E. coli*

(przed rozpoczęciem procedury przygotuj około 25 ml sterylnego 50 mM CaCl_2 i schłódź go w lodówce)

- zaszczip 1 ml pożywki (LB lub BHI) odpowiednim szczepem *E. coli* (np. DH5 α , TOP10)
- hoduj przez noc w 37 st. z wytrząsaniem (~ 16 h)

- zaszczep 40 ml pożywki 1 ml kultury nocnej i hoduj w 37 st. z wytrząsaniem (sprawdzaj regularnie OD₆₀₀)
- gdy OD₆₀₀ = 0,2 - 0,25 zakończ hodowlę i przetrzymaj bakterie na lodzie przez 15 min
- zwiń hodowlę (5 000 rpm, 10 min, 4 st.)
- rozpuść pelet bakteryjny w 20 ml zimnego CaCl₂ (50 mM)
- inkubuj 20 min na lodzie
- zwiń hodowlę (5 000 rpm, 10 min, 4 st.)
- rozpuść pelet bakteryjny w 1 ml zimnego CaCl₂ (50 mM)
- inkubuj około 30-40 min na lodzie
- po tym czasie bakterie są gotowe do użycia

Uwaga! Bakterie pozostaną kompetentne przez następne 2-3 dni jeśli przechowasz je w lodówce (nie dłużej!) Możesz również przechować je przez dłuższy czas (2-3 miesiące) w -80 st.

1. 2. Transformacja bakterii kompetentnych metodą „heat shock”

- przygotuj porcję chemicznie kompetentnych bakterii (50-100 µl)
- zmieszaj bakterie z wektorem, który chcesz wprowadzić - użyj około 10-30 ng plazmidowego DNA zawieszonego w wodzie
- inkubuj 30-45 min na lodzie
- przełóż próbkę na 90 sek do 42 st. („heat shock”)
- przełóż bakterie z powrotem na lód (5 min)
- dodaj 250 µl pożywki (LB, BHI lub SOC) - możesz ją wcześniej ogrzać do 37 st.
- hoduj przez 30-40 min w 37 st. z wytrząsaniem
- posiej około 100 µl zawiesiny na płytki selekcyjne
- hoduj przez noc w 37 st. (lub przez weekend w temperaturze pokojowej, jeśli doświadczenie wypadło na piątek..)

— uważaj, żeby nie doprowadzić do przerośnięcia kolonii, gdyż w takim wypadku poszczególne klony mogą zrosnąć się ze sobą!

- — wyrosłe kolonie powinny posiadać obce DNA; możesz sprawdzić to

metodami *Colony PCR*, czy *Rapid Colony Screening* lub wyizolować plazmid z pojedynczej hodowli (po jej uprzednim rozhodowaniu) i zsekwencjonować.

Uwaga! Pamiętaj, aby posiać również kontrolę negatywną (bakterie nietransformowane), dzięki której sprawdzisz, czy antybiotyk w podłożu nie uległ rozkładowi.

Pamiętaj również, że podłoża stałe z antybiotykiem pomimo tego, że przechowywane są w lodówce nie nadają się do użycia po kilku miesiącach, gdyż antybiotyk ulega rozkładowi. Jeśli w Twoich bakteriach nie ma wprowadzonego DNA (pomimo obecnych transformantów) może być to wina „starych” szalek.

AM



Najpopularniejsze metody stosowane w biotechnologii – Southern, Northern i Western blot

Southern, Northern i Western blot, czyli w którą stronę świata?

W biologii molekularnej i biotechnologii powszechnie wykorzystuje się metody pozwalające na detekcję różnych specyficznych cząsteczek. Mogą to być sekwencje DNA (metoda Southern blot), RNA (Northern blot) lub białek (Western blot). Na czym polegają te techniki, do czego są wykorzystywane oraz dlaczego do ich nazwania wykorzystano kierunki

świata? To wszystko postaram się przybliżyć poniżej. Zaczniemy jednak od początku

Potrzeba możliwości wykrywania różnych cząsteczek w genomie organizmów żywych zrodziła się na długo przed pierwszymi próbami transformacji roślin czy zwierząt. Przełomem okazało się odkrycie nowej klasy enzymów nukleolitycznych — endonukleaz restrykcyjnych, występujących w komórkach bakteryjnych oraz pełniących funkcję obronną w przypadku zakażeń bakteriofagami. Aktywność enzymów restrykcyjnych polega na specyficznej fragmentacji DNA. Hydrolizie ulegają nieliczne, ściśle określone wiązania fosfodiesterowe. Ich wybór jest uwarunkowany występowaniem specyficznych sekwencji nukleotydowych rozpoznawanych przez enzym.

Southern Blot

Wszystko zaczęło się w 1975 roku, kiedy to brytyjski biolog Edwin Southern opracował metodę hybrydyzacji DNA:DNA (tak, to od jego nazwiska powstała nazwa tej metody). Polega ona na wyszukaniu komplementarnych sekwencji DNA w mieszaninie fragmentów powstałych po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi. DNA pocięte przez odpowiednie restryktazy rozdzielane jest w żelu agarozowym według długości fragmentów, następnie denaturowane i przenoszone na filtr nitrocelulozowy lub nylonowy z wykorzystaniem metody sączenia kapilarnego. Hybrydyzacja ze znakowaną izotopowo sondą umożliwia odnalezienie komplementarnych do niej sekwencji. Coraz częściej do znakowania sond molekularnych używa się również ligandów rozpoznawanych przez swoiste przeciwciała sprzężone z enzymami. Szersze zastosowanie znajdują sondy znakowane digoksygeniną lub biotyną, w których wykrycie ligandu przebiega z zastosowaniem reakcji immunochemicznych i kolorymetrii, a także sondy, których końcowym etapem detekcji jest chemiluminescencja. Po hybrydyzacji konieczne jest kilkukrotne przepłukanie filtru, aby usunąć niespecyficznie związaną sondę. Ostatnim etapem jest wykrycie zhybrydyzowanego produktu metodą określoną przez wprowadzony do sondy znacznik (na przykład przez autoradiografię).

Metodę Southern blot wykorzystuje się bardzo często w diagnostyce, na przykład w celu wykrycia obcego DNA. Innym sposobem wykorzystania tej techniki jest możliwość potwierdzenia lub wykluczenia obecności transgenu w genomie biorcy, a także do określenia liczby kopii i chromosomowych loci, w których pojawia się transgen.

Northern blot

Hybrydyzacja znajduje również zastosowanie w badaniu poziomu ekspresji określonych genów. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu metodę northern blot (nazwa tej techniki powstała w nawiązaniu do techniki Southerna), w której informację na temat ekspresji genu otrzymuje się na podstawie hybrydyzacji RNA:DNA. Wykonuje się ją w analogiczny sposób do hybrydyzacji Southerna, z tą różnicą, że rozdzielany w żelu agarozowym kwasem nukleinowym jest RNA. Pierwszym etapem jest rozdzielenie w żelu agarozowym w warunkach denaturujących mieszaniny transkryptów syntetyzowanych w komórce białek, a następnie ich przeniesienie na nylonowy filtr, który jest poddawany hybrydyzacji ze znakowaną sondą molekularną, złożoną z sekwencji kodującej dany gen.

Wykorzystanie techniki northern blot do analizy transkryptów z różnych tkanek w różnym czasie umożliwia określenie miejsca i czasu ekspresji danego genu.

Western blot

Opisane powyżej analizy wykorzystywane są do detekcji określonych sekwencji kwasów nukleinowych. Dzięki metodzie western blot (nawiązanie do poprzednich nazw) możliwe jest wykrycie konkretnych białek w homogenacie komórkowym lub ekstrakcie białkowym. Podobnie jak w przypadku detekcji kwasów nukleinowych, badane białka rozdzielane są elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym, następnie przenoszone na membranę nitrocelulozową lub nylonową w wyniku transferu kapilarnego lub elektrotransferu. Następnym etapem jest detekcja z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał znakowanych radioaktywnie lub enzymatycznie po zablokowaniu membrany przed niespecyficznym wiązaniem przeciwciał. W znakowaniu enzymatycznym wykorzystywane są enzymy katalizujące (po dodaniu odpowiedniego substratu) reakcję barwną.

Metoda western blot znalazła zastosowanie w diagnostyce chorób bakteryjnych (borelioza) i zakażeń wirusowych (wirus HIV, koronawirus wywołujący SARS czy wirus HSV), a także niektórych chorób pasożytniczych (wągrzyca spowodowana przez larwy tasiemca uzbrojonego) oraz genetycznych (niektóre formy niedokrwistości Fanconiego).

Dla zainteresowanych kilka animacji:

— [Southern blot](#),

— [Northern blot](#),

— [Western blot](#).

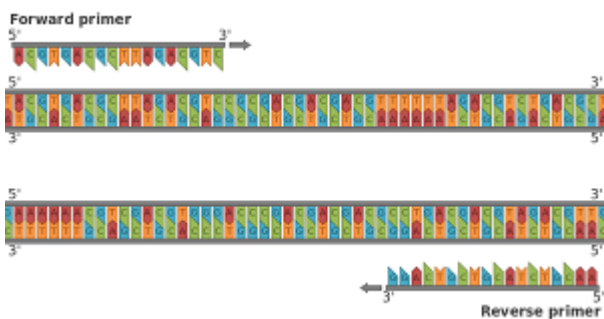
Katarzyna Kamel

Źródło:

Buchowicz J., *Biotechnologia molekularna*, Warszawa 2007.

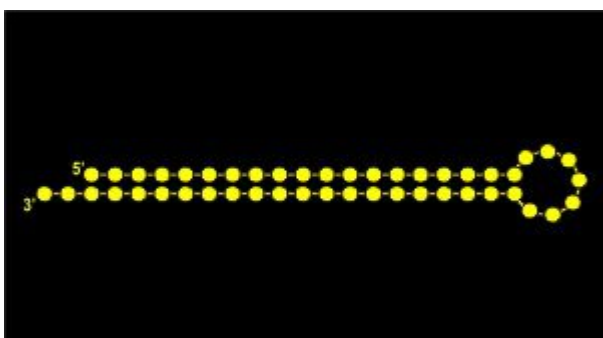
[Hylostet](#).

Słomski R., *Analiza DNA — teoria i praktyka*, Poznań 2008.



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0



[Programy do projektowania siRNA](#)

Zjawisko interferencji RNA poznane zostało stosunkowo niedawno, bo w latach 90. XX wieku. Bardzo szybko jednak doceniono jego rolę, bo już w 2006 roku za jego odkrycie Andrew Z. Fire oraz Craig C. Mello otrzymali

nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. O tym, że decyzja o uhonorowaniu tego odkrycia jest słuszna może świadczyć duża ilość publikacji opisujących RNAi, jak również wiele prób wykorzystania go w terapii różnych chorób. Kluczowym elementem w procesie interferencji jest krótki dwuniciowy RNA. Wsparcie w jego przygotowaniu niosą programy pomagające w projektowaniu krótkich interferencyjnych RNA. Są to bardzo przydatne narzędzia, których zadaniem jest ułatwienie przygotowania RNA o takiej sekwencji i budowie, aby doprowadzić do wyciszenia wybranego genu.

Interferencyjne RNA zostało już zaprezentowane w dwóch artykułach opublikowanych na stronach Doliny Biotechnologicznej. [Pierwszy z nich](#) był omówieniem zjawiska interferencji RNA. W [kolejnym artykule](#) natomiast zostały omówione różne właściwości, o których warto pamiętać podczas projektowania krótkich RNA.

Warto przypomnieć, że podstawowym warunkiem prowadzącym do wyciszenia wybranego genu jest dokładne sparowanie antysensownej nici siRNA z docelowym mRNA.

Choćby częściowa niehomologiczność krótkiego RNA może być przyczyną niespecyficznego i nieplanowanego wyciszenia innego genu niż planowany, czego skutkiem jest wystąpienie niepożądanych efektów (ang. *off-target effects*) [1]. W ostatniej fazie procesu interferencji RNA udział bierze dwuniciowy krótki RNA. Każda z jego nici zbudowana jest z 21 nukleotydów. Stwierdzono jednak, że można również wykorzystać w wyciszaniu genów także nieco inaczej zbudowane RNA. Warto przypomnieć w tym miejscu sisiRNA (ang. *small internally segmented interfering RNA*) - dupleks zbudowany z trzech nici: antysensownej liczącej 21 nukleotydów oraz dwóch krótkich zamiast jednej sensownej. W badaniach interferencji RNA wykorzystano też siRNA o strukturze spinki do włosów (ang. *short hairpin - shRNA*). Skutecznie zastosowano również nietypowe cykliczne siRNA (ang. *dumbbell siRNA*).

Projektując siRNA trzeba wziąć pod uwagę opisane powyżej i poprzednio uwarunkowania, jak również kilka innych dotyczących sekwencji krótkiego RNA [2].

Dobór sekwencji krótkiego RNA musi zapewnić homologię nici antysensownej z

wybranych mRNA. Jednocześnie też dobierając sekwencję mRNA i siRNA należy brać pod uwagę dostępność nici mRNA, oraz czy wybrana sekwencja pozwoli zaprojektować poprawnie zbudowane krótkie RNA. Ważnym parametrem jest ilość par GC w projektowanym siRNA. W literaturze można napotkać dwa nieco różniące się zakresy. Pierwszy to przedział pomiędzy 31,6 a 57,9% [3], drugi natomiast mieści się w zakresie pomiędzy 36 i 52%. Pożądane jest by w przypadku nici antysensownej procent nukleotydów G i C na odcinkach od drugiego do siódmego oraz od ósmego do osiemnastego nukleotydu zawierał się pomiędzy 19 i 52%. Warto przy tym pamiętać, że pomiędzy 10 i 11 nukleotydem wypada miejsce gdzie następuje hydroliza sparowanej nici mRNA.

Sekwencje GGGG lub CCCC niosą ryzyko tworzenia się nie pożądanych struktur szpilkowych. Z kolei więcej niż trzy kolejne A lub U może być odczytane przez polimerazę III jako miejsce transkrypcji poli U [5].

Podstawą powstania i utrzymania odpowiedniej struktury RNA jest szereg zależności termodynamicznych określonych dla poszczególnych fragmentów RNA, jak i dla całej cząsteczki.

Z punktu widzenia termodynamiki najtrwalsza jest struktura o najniższej energii swobodnej, będącej sumą energii poszczególnych fragmentów struktury cząsteczki. Istotnym parametrem dla kwasów nukleinowych jest temperatura topnienia (T_M - ang. *melting temperature*). Jest to temperatura, w której 50% badanego w próbie RNA lub DNA ulega denaturacji [6]. Dla siRNA wartość ta z reguły nie przekracza 20°C. Większa ilość par GC może zwiększyć stabilność struktury RNA. Z kolei duża ilość par AU będzie destabilizować dupleks. Co jest ważne w przypadku, gdy siRNA będzie wykorzystywane w temperaturze na przykład 37°C. Mało stabilny region ze względu na zależności termodynamiczne znajduje się pomiędzy dziewiątym i czternastym nukleotydem w dupleksie siRNA [7].

Podstawy przewidywania struktury RNA

Wymienione wyżej zależności zostały wykorzystane podczas opracowywania algorytmów, które stały się podstawą do stworzenia programów wspomagających projektowanie siRNA.

Narzędzia pozwalające generować możliwe wersje drugorzędowej struktury RNA są wykorzystywane od lat 90. XX wieku. W oparciu o zastosowany algorytm

pozwalają one przewidywać budowę drugorzędową dla wybranych sekwencji RNA. Niektóre z tych programów oparte są na badaniu właściwości termodynamicznych RNA [8]. Program mając podaną sekwencję przelicza wartości energii swobodnej i proponuje różne wersje struktury drugorzędowej, jakie mogą powstać dla podanej sekwencji nukleotydów. Za przykład tego typu programu może posłużyć [m-fold](#), który został opracowany przez zespół Michaela Zukera. Jest to program, który może być przydatny również w przypadku projektowania siRNA, aby dla wybranej sekwencji przetestować parametry termodynamiczne cząsteczki [9].

Programy wspomagające projektowanie siRNA mają za zadanie wspomóc dobór sekwencji RNA homologicznej do fragmentu mRNA. W ich przypadku algorytmy opracowane są nie tylko w oparciu o termodynamiczne podstawy istnienia dupleksów. Brane są też pod uwagę inne wspomniane właściwości siRNA.

Przegląd wybranych programów wspomagających projektowanie siRNA

BLOCK-iT™ RNAi designer

Program dostępny pod adresem <https://rnaidesigner.lifetechnologies.com> został udostępniony przez Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA), jako strona internetowa.

Daje on możliwość wyboru sześciu opcji różnych krótkich RNA. W tym miRNA i siRNA, specjalnych siRNA oferowanych przez firmę udostępniającą program. Możliwe jest także generowanie struktury szpilki do włosów shRNA.

Procedura działania została podzielona na pięć kroków:

1. Należy podać Accession number lub sekwencję nukleotydową.
2. Wybrać należy region mRNA: Otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame* - ORF), 5' UTR lub 3'UTR.
3. Wybrać organizm z pośród trzynastu możliwych na czele z człowiekiem dla porównania sekwencji w bazie BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*). Dzięki temu można sprawdzić czy wybrane siRNA nie będzie homologiczne względem innych genów, niż wybrany do wyciszenia.
4. Należy wybrać procent par GC. Możliwy wybór zamyka się w przedziale od 20 do 90%.
5. Wybór algorytmu. Do wyboru jest domyślny algorytm lub alternatywnie Tuschl's Motif Pattern [10].

Długość siRNA jest ograniczona do 19 nukleotydów. W przypadku struktur szpilek do wyboru są trzy sekwencje pętli: GAGA, AACG i CGAA [5].

GenScript siRNA Target Finder

Program znajduje się na stronach GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA) - <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>. Dostępny jest po zarejestrowaniu się i zalogowaniu na stronie <http://www.genscript.com/>. W programie istnieje możliwość ustawienia parametrów stosowanego algorytmu - metody (Statistical Model (pattern:AAN19) lub Machine Learning (pattern:N21)). Do wyboru jest procent udziału par GC - domyślnie jest to przedział 30-60%. Można wybrać maksymalną ilość otrzymywanych siRNA. Do wyboru jest też organizm i tkanki - z tym, że mimo większej listy wyboru różnych zwierząt baza jest dostępna dla człowieka, myszy i szczura. Na koniec przed rozpoczęciem sprawdzania siRNA należy wkleić sekwencję cDNA wybranego mRNA. Program generuje tylko siRNA o długości 21 nukleotydów. Dla struktur szpilekowych jest dostępna pętla TTGATATCCG [5].

Oligowalk for siRNA design

Program został opracowany przez zespół David H. Mathews z University of Rochester Medical Center. Dostępny jest pod adresem http://rna.urmc.rochester.edu/cgi-bin/server_exe/oligowalk/oligowalk_form.cgi. Działanie programu opiera się na przeliczeniu danych termodynamicznych związanych z hybrydyzacją nici antysensownej do mRNA niosącego gen przeznaczony do wyciszenia [11]. Obsługa programu jest bardzo prosta i sprowadza się do wpisania nazwy oraz sekwencji lub wysłaniu pliku z sekwencją w formacie fasta. Wadą programu jest brak aktualizacji od 2008 roku.

RNAi codex

Program został opracowany przez Cold Spring Harbor Laboratory. Dostępny jest pod adresem <http://codex.cshl.edu/>. Program jest opracowany pod kątem pracy z shRNA. Struktur szpilekowych można szukać korzystając z dostępnych opcji lub przez wysłanie pliku z sekwencją. Program ma ograniczenia. Wyszukiwanie ograniczone jest do sekwencji człowieka, myszy i szczura. Dostępne są tylko sekwencje pętli dwóch ludzkich miRNA mir-30 oraz mir-1. Długość ramienia shRNA liczy 21 par nukleotydów [12].

RNAi explorer

Kolejny z programów można znaleźć na stronie

<http://www.genelink.com/sirna/RNAicustomorder.asp>. Został opracowany przez Gene Link Inc. (Westchester, NY, USA). Oddzielna strona jest przeznaczona dla shRNA: <http://www.genelink.com/sirna/shRNAi.asp> Obie jednak są do siebie podobne. Istnieje możliwość wprowadzenia danych o sekwencji w postaci GeneID, Accession Number. Można też przesłać plik lub wkleić samą sekwencję. Istnieją też opcje do wyboru udziału par GC. Jest tu wybór tylko między trzema podanymi zakresami: 30-40, 40-50 oraz 50-60%. Program generuje siRNA zawierające 19 par nukleotydów. W przypadku shRNA program jest bardziej rozbudowany. Są do wyboru trzy sekwencje pętli: TTCG, TCAAGAG, GAAGCTTG lub inna do samodzielnego wpisania. Długość shRNA jest również dostępna jako opcja do wyboru [5].

RNA Wizard v3.1

Program firmy InvivoGen jest dostępny pod adresem http://www.sirnawizard.com/design_advanced.php.

Wyróżnia się umieszczoną na górze prostą instrukcją obsługi. Pod nią jest miejsce na wpisanie nazwy, wklejenie sekwencji (maksymalnie: 9600bp) i ustawienie parametrów. Standardowo przewidziane jest siRNA zbudowane z nici po 21 nukleotydów, ale istnieje możliwość zmiany. Do wyboru są trzy bazy danych dla mRNA i miRNA SEED. Wybór jest ograniczony do człowieka, myszy i szczura. W wersji rozbudowanej, którą można wybrać z bocznego paska można również wprowadzić ograniczenia dla wybranego regionu siRNA, można wybrać procentowy udział par GC. Również z bocznego paska można wybrać wersję programu pozwalającą zbudować z siRNA strukturę szpilkową. Domyślna sekwencja pętli to TCAAGAG [5].

siDesign Center

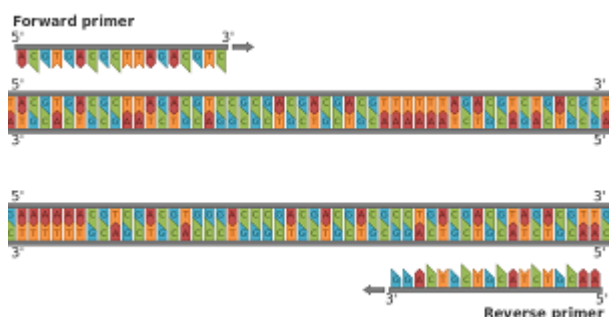
Ten program dostępny jest pod adresem: <http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/>. Znajduje się na stronie GE Healthcare Dharmacon Inc. Obsługa programu odbywa się w czterech krokach. Sekwencję można wprowadzić bądź podając jej dane np. Accession number, bądź też wpisując sekwencje w formacie fasta. W drugim kroku wybiera się region mRNA, który będzie miejscem hybrydyzacji nici antysensownej z mRNA. Do wyboru jest 5' lub 3' UTR lub ORF. W kroku trzecim wybiera się procentowy udział par GC. Jako domyślny proponowany jest przedział 30-64%. W kroku czwartym można skorzystać z sprawdzenia bazy BLAST. Program generuje siRNA

złożone z 19 par nukleotydów. Dział pomocy dla użytkowników jest napisany bardzo szczegółowo zaczynając od wyjaśnienia podstawowych pojęć. Jest też przy tym bardzo przejrzystie ułożony, dzięki czemu początkujący użytkownik nie pogubi się w tej lekturze [5].

siDirect version 2.0

Ostatni z opisywanych szerzej programów znajduje się pod adresem <http://sidirect2.rnai.jp/>. Strona programu jest bardzo oszczędna i na początek pokazuje tylko miejsce na wpisanie accession number lub wklejenie sekwencji. Opcje dostępne są pod linkiem na dole strony. Program pozwala na wybór jednego z trzech algorytmów: Ui-Tei [13], Reynolds [4], Amarzguioui [3]. Możliwy jest też wybór jednej z trzech kombinacji wymienionych algorytmów. Można również regulować temperaturę topnienia, czy procentowy udział par GC. Bardzo przejrzystie opracowana została strona pomocy z graficznym przedstawieniem poszczególnych opcji [14].

Korzystając z wyżej prezentowanych lub innych dostępnych programów zazwyczaj projektuje się od trzech do pięciu dupleksów siRNA skierowanych na dany gen. W ten sposób można wybrać najaktywniejsze cząsteczki, nie powodujące niepożądanego wyciszania genów [15]. Poza wymienionymi wyżej programami powstało jeszcze kilkanaście podobnych programów. Nie wszystkie z nich są obecnie dostępne. Zapewne każdy użytkownik będzie w stanie znaleźć taki program, który okaże się być wygodnym w obsłudze i jednocześnie będzie generował sekwencje siRNA spełniające wszystkie wymagania związane z wyciszaniem wybranego genu.



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0

Przedstawione programy zostały opracowane przez grupy zajmujące się badaniami interferencji RNA lub przez firmy zajmujące się produkcją

odczynników czy syntezą oligonukleotydów dla potrzeb biologii molekularnej. Prezentują różny poziom dostępności ustawień parametrów mających wpływ na jakość projektowanych siRNA. Programy bardziej rozbudowane są z pewnością trudniejsze do obsługi dla szczególnie dla użytkowników, którzy rozpoczynają swoją pracę przy projektowaniu siRNA. Z drugiej strony jednak większa liczba opcji do ustawienia przez użytkownika daje możliwość lepszego doboru sekwencji krótkiego RNA - takiej która będzie skutecznie wygaszała ekspresję tylko wybranego genu.

Piśmiennictwo

1. Jackson AL. et al. [Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity](#). RNA. 2006, 12, 7: 1179-1187.
2. Olszak K. Właściwości małych interferencyjnych RNA. Dolina Biotechnologiczna. 24.05.2016
<http://dolinabiotechnologiczna.pl/nawosci/wlasciwosci-malych-interferencyjnych-rna/>
3. Amarzguioui M. Prydz H. [An algorithm for selection of functional siRNA sequences](#). Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004, 316, 1050-1058.
4. Reynolds A. Et al. [Rational siRNA design for RNA interference](#). Nat. Biotechnol. 2004, 22, 326-330.
5. Fakhr E. et al. [Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing](#). Cancer Gene Ther. 2016, 23, 4:73-82.
6. Freier SM. Et al. [Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability](#). Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Dec; 83(24): 9373-9377.
7. Khvorova A. Et al. [Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias](#). Cell 2003; 115: 209-216.
8. Mathews DH. Et al. [Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure](#). J. Mol. Biol. 1999, 288, 911-940.
9. Zuker M. [Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction](#). Nucleic Acids Res. 2003, 31, 13, 3406-3415, 2003.
10. Elbashir S. et al. [Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in](#)

[cultured mammalian cells](#). Nature. 2004, 411, 6836: 494-8.

11. Lu ZJ, Mathews DH. [OligoWalk: an online siRNA design tool utilizing hybridization thermodynamics](#). Nucleic Acids Res. 2008. 36: W104-W108.

12. Olson A. Et al. [RNAi Codex: a portal/database for short-hairpin RNA \(shRNA\) gene-silencing constructs](#). Nucleic Acids Research. 2005, 34, D153-D157.

13. Ui-Tei K. Et al. [Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference](#). Nucleic Acids Res. 2004, 32, 936-948

14. Naito Y. Et al. [siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect](#). BMC Bioinformatics. 2009, 10:392

15. Sierant M. [Modyfikowane chemicznie dupleksy siRNA](#). Biotechnologia. 2010, 3, 90: 146-172.



PCR bez izolacji - testujemy Direct PCR Kits od ThermoFisher Scientific

Specjalnie dla Was przetestowaliśmy w naszym laboratorium odczynniki firmy Thermo Scientific umożliwiające przeprowadzanie reakcji PCR z pominięciem etapu izolacji DNA.

Kity te, których dystrybutorem jest firma [ABO](#), zawierają wysokiej jakości polimerazę typu HotStart odporną na wiele inhibitorów zawartych w tkankach oraz z domenę wiążącą się z DNA, wzmacniającą jej wydajność. Zestawy zawierają także Dilution Buffer oraz odczynnik DNARelease Additive pozwalające na łatwiejsze uwolnienie DNA z wielu różnych tkanek. Testowaliśmy 3 typy kitów:

- 1) **Phire® Animal Tissue Direct Kit** przeznaczony głównie do reakcji z użyciem tkanek zwierzęcych takich jak: uszy i ogony mysie, rybie płetwy, tkanki Drosophila, itp. - pełna lista na www.thermoscientific.com/directpcr;
- 2) **Phusion® Human Specimen Direct Kit** przeznaczony do reakcji z użyciem preparatów pochodzenia ludzkiego: wymazów z policzka, próbek śliny, paznokci, zębów, włosów, próbek skóry, a także preparatów utrwalonych w parafinie;
- 3) **Phusion® Blood Direct Kit** dedykowany głównie do reakcji z pełnej krwi obwodowej zarówno świeżej jak i mrożonej pobranej na wiele różnych antykoagulanów.

Do reakcji PCR, używa się tkanki, której fragment dodaje się bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor, startery oraz polimerazę. Ciekawym rozwiązaniem jest dołączone do zestawów **urządzenie „Harris Uni-Core”** podobne do ołówka automatycznego, które pozwala na pobranie niewielkich porcji tkanek i przełożenie ich bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej.



Reakcje z użyciem 3 powyższych testów prowadzono zgodnie z protokołami

producenta. **Zaskakujące są krótkie czasy denaturacji (1-5sek)**, jak również **pominięcie temperatury przyłączania starterów (!)**. Testowe reakcje PCR prowadzono w końcowej objętości mieszaniny reakcyjnej 50µl zgodnie z rekomendacjami producenta, podobnie skład mieszaniny PCR-mix również prowadzono ściśle wg zaleceń producenta.

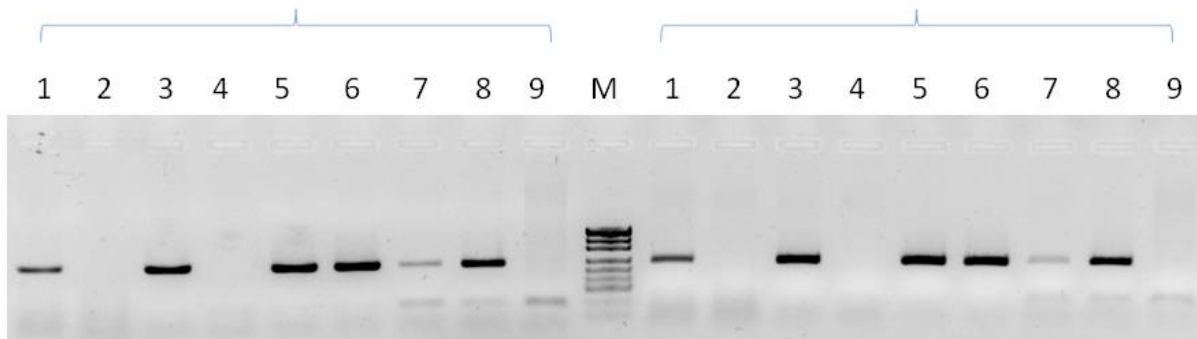
Reakcje prowadzono z zastosowaniem starterów dostarczonych w zestawach w celu zminimalizowania ryzyka niepowodzenia reakcji. Po zakończonej reakcji, próbki rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym i wizualizowano w świetle UV.

Po użyciu testu dedykowanego do tkanek zwierzęcych - test nr 1 - próbki zawierały kolejno: fragmenty preparatów parafinowych (A i B) zawieszonych w niewielkiej kropli wody, próbki tych samych preparatów zawieszonych w Dilution Buffer, dwie różne próbki z krwi obwodowej (zamrożonej), leukocyty z tych samych próbek krwi zawieszonych w Dilution Buffer. W przypadku tego testu porównano jakość rozdziału elektroforetycznego po zastosowaniu buforu obciążającego zawartego w zestawie dostarczonym przez producenta oraz buforu dotychczas stosowanego w laboratorium. Wyniki na rycinie:

Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct Kit

Bufor obciążający używany w laboratorium

Bufor obciążający z zestawu



1 – preparat A

2 – preparat B

3 – preparat A w dilution Buffer

4 – preparat B w dilution Buffer

5 – krew C

6 – krew D

7 – leukocyty z krwi C w dilution buffer

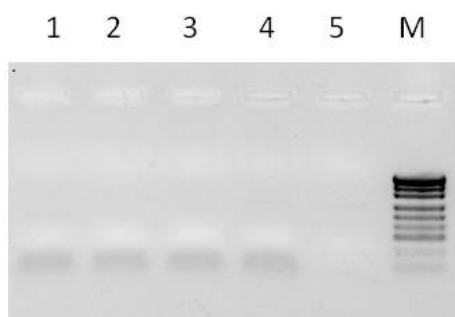
8 – leukocyty z krwi D w dilution buffer

9 - ϕ

rażki, nie uzyskano prążków w próbkach 2 i 4 pochodzących z tej samej tkanki, w takich przypadkach producent zaleca modyfikację warunków reakcji poprzez dodanie np. jonów Mg lub profilu termicznego (optymalizacja czasu denaturacji lub wydłużenie czasu elongacji). Po zastosowaniu buforu obciążającego stosowanego w laboratorium i buforu zawartego w zestawie Thermo Scientific Phire ® Animal Tissue Direct Kit nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy jakością i intensywnością prążków na żelu.

W drugiej kolejności testowano zestaw nr 2 dedykowany do preparatów parafinowych. Do PCR pobrano 4 fragmenty różnych preparatów, jednak w wyniku reakcji w żadnej próbce amplifikacja nie przebiegła właściwie - nie uzyskano prążków, po powtórnym przeprowadzeniu testu niestety nic się nie zmieniło.:

Phusion Human Specimen Direct Kit

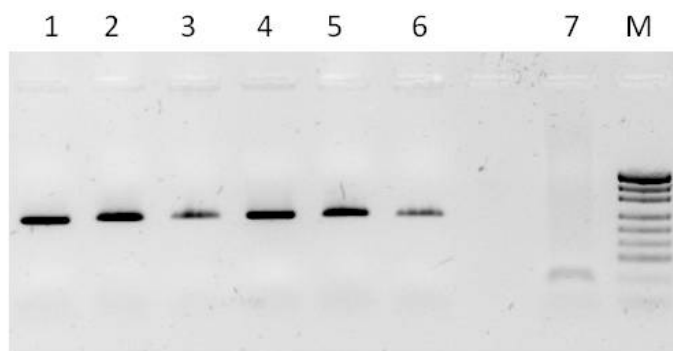


- 1 – preparat A
- 2 – preparat B
- 3 – preparat C
- 4 – preparat D
- 5 – ϕ

Analizując przyczynę niepowodzenia, wydaje się nam prawdopodobne, że kit Thermo nie jest dedykowany do bloczków parafinowych gorszej jakości, które nadal są w Polsce bardzo powszechne. Bardzo złej jakości polska parafina oraz sposób przeprowadzania materiału mogą uniemożliwiać wykonanie z sukcesem reakcji PCR przy użyciu kitu Thermo Scientific. Dlatego najprawdopodobniej ten zestaw do reakcji PCR ze skrawków parafinowych w polskich realiach nie będzie się sprawdzał.

Jako 3. testowano odczynniki przeznaczone do reakcji bezpośrednio z krwi obwodowej. Producent zaleca dodanie nawet do 10 μ l krwi, w naszych testach użyto tych samych próbek co w kicie nr 1 (C, D), jednak do analiz pobierano kolejno po 1 μ l, 5 μ l i 10 μ l. Po reakcji przeprowadzonej zgodnie z zalecanym protokołem uzyskano oczekiwane produkty we wszystkich próbkach:

Phusion Blood Direct Kit



- 1 – krew C 1 μ l
- 2 – krew C 5 μ l
- 3 – krew C 10 μ l
- 4 – krew D 1 μ l
- 5 – krew D 5 μ l
- 6 – krew D 10 μ l
- 7 – ϕ

Prążki nr 3 i 6 wydają się słabsze, natomiast wynika to z mniejszej objętości próbek pobieranych do elektroforezy – po reakcji pozostała duża ilość resztek komórek na dnie probówki.

Podsumowując – testowane odczynniki spełniają nasze oczekiwania (w przypadku kitu nr 2, wydaje nam się, że po pewnych modyfikacjach składu mieszaniny reakcyjnej udałoby się uzyskać produkt reakcji).

Ogromną zaletą odczynników typu „direct” jest oszczędność czasu: przygotowanie reakcji, PCR i elektroforeza zajmują niespełna 2 godziny!

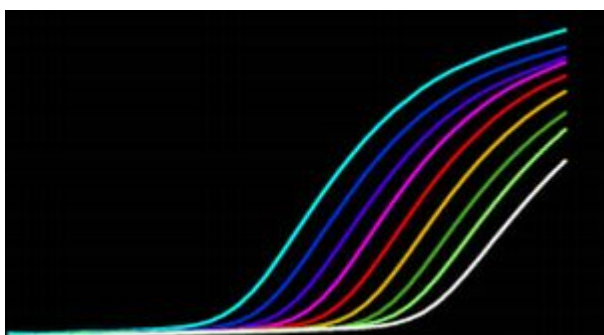
Uzyskane produkty znajdują się na właściwej wysokości. **Miłą niespodzianka jest też cena odczynników:** w przypadku Phire® Animal Tissue Direct PCR Kit cena wynosi ok 1500 zł brutto za 200 reakcji, co w przeliczeniu daje ok. **7,5 zł za jedną reakcję**. W przypadku zakupu Phusion® Blood Direct PCR Kit na 500 reakcji, cena brutto za cały zestaw wynosi ok 2000 PLN – czyli **tylko 4 zł za**

próbkę!

Biorąc pod uwagę, że pomijamy całą procedurę związaną z izolacją materiału genetycznego i oszczędzamy nasz cenny czas, cena wydaje się być bardzo atrakcyjna. Tym bardziej, że oferowane zestawy spełniają nasze oczekiwania.

dr n. med. Magdalena Zawada

diagnosta laboratoryjny, specjalista w zakresie genetyki laboratoryjnej



Przygotowanie liniowych standardów do reakcji Real-Time PCR (protokół)

Niejednokrotnie zdarza się, że projektujemy własną metodykę opartą o technikę Real-Time PCR. Największym problemem przy optymalizacji gotowej metody, zarówno na etapie badań naukowych, jak i standaryzacji oraz komercjalizacji, jest przygotowanie odpowiednich standardów.

Jak zrobić to najprościej?

Krzywe standardowe przygotowuje się zwykle na bazie plazmidów- kolistych lub linearyzowanych (poprzez cięcie restrykcyjne). Pokutuje teoria, że takie cząsteczki zachowują się podczas Real-Time PCRu tak samo jak mieszanina różnych cząsteczek we właściwej reakcji z cDNA, podczas gdy reamplifikacja

produktu PCR ma inną kinetykę niż właściwego cDNA, przez co ilościowanie jest zafałszowane.

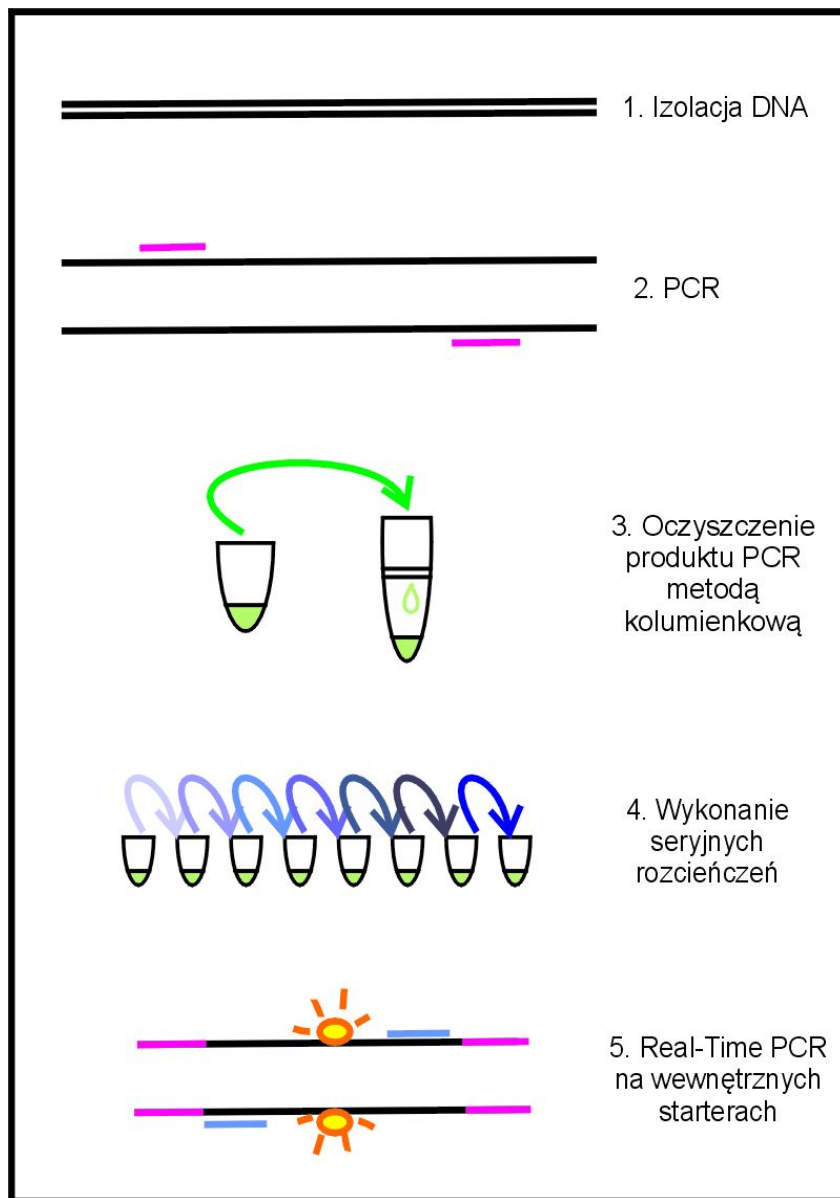
Niewielu zdaje sobie sprawę, że jest to mit. Zamiast linearyzowanych cząsteczek plazmidu wystarczy użyć produktu PCR namnożonego na „szerszych” starterach, niż startery używane podczas właściwej reakcji ilościowej.

Oto prosty przepis na standardy:

- * Zaprojektuj specyficzny, dobrze działający PCR na starterach zewnętrznych względem starterów użytych do Real-Time'u o ok. 100-200nt z każdej strony (patrz rycina)
- * Zamplifikuj dużą ilość matrycy na zewnętrznych starterach. Oczyszczyć produkt na kolumnkach, pozbywając się zanieczyszczeń i buforu reakcyjnego. (KITy do oczyszczania produktu PCR oferowane są na polskim rynku przez wiele firm)
- * Zmierz przy pomocy Nanodropa lub innego spektrofotometru stężenie matrycy wobec buforu użytego do elucji produktu PCR.
- * Przelicz stężenie według poniższego wzoru:

Liczba kopii w 1ul $Lk = (x * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{długość matrycy w pz} * 1 \times 10^9 * 650)$, gdzie x to wartość stężenia wyrażona w ng/ul. Żeby zrobić to szybko i bez pomyłek, użyj [gotowego kalkulatora](#)

- * Rozcieńcz standard w dowolny sposób. Pierwszego stężenia przygotuj tyle, żeby starczyło go na wszystkie eksperymenty, jeżeli zabraknie go, należy kolejny batch pierwszego standardu wywzorcować w Real-Time PCR z uwzględnieniem standardu używanego wcześniej!



Przykład:

- * Produkt Real-Time PCRu ma 223 pz. Zewnętrzne względem nich startery mają 580pz.
- * Po amplifikacji i sprawdzeniu na żelu agarozowym jakości i wysokości prążka (silny, wąski prążek produktu o wielkości ~580pz) oczyszczamy próbkę na żelu.
- * Zmierzone stężenie wynosi 26ng/ul.
- * Wstawiamy wartości 26 i 580 w odpowiednie miejsca kalkulatora (lub liczymy ręcznie).

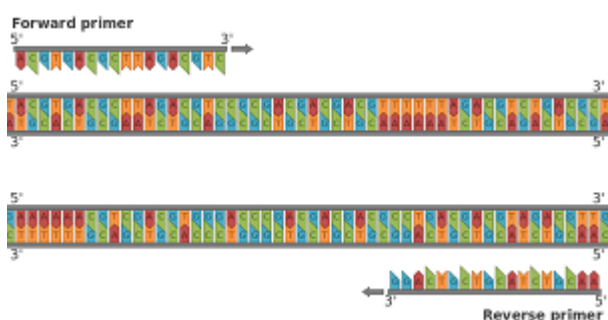
Wyliczona wartość to **$4,15 \times 10^{10}$**

* Żeby przygotować kolejne rozcieńczenia pipetujemy np. po 90ul H₂O (lub buforu do elucji, zależy czym eluowaliśmy) do kolejnych próbek, po czym do pierwszego rozcieńczenia dodajemy 10ul. Przygotowanego standardu, vortexujemy, następnie do 2-go standardu 10ul pierwszego itd. Podczas Real-Time'u definiujemy kolejne stężenia jako $4,15 \times 10^{10}$, $4,15 \times 10^9$, $4,15 \times 10^8$ itd.

Uwagi dotyczące metody:

Metoda obliczenia opiera się na założeniu, że średnio mol 1 pary zasad waży 650g (czyli 1 para zasad 650 Daltonów). Oczywiście można obliczyć dokładną wagę naszej matrycy, używając skryptu zliczającego ilość par GC i AT, mnożąc to następnie przez ich wagę, ale doświadczenie podpowiada, że jest to niepotrzebne.

Stężenie oczyszczonego produktu PCR mierzone spektrofotometrycznie także nie jest bardzo dokładne, ale jeżeli amplifikacja poszła dobrze, taka dokładność wystarcza. Jeżeli zmierzone stężenie produktu jest mniejsze niż 10ng/ul (czyli mocno zawyżone z powodu bliskiego poziomu tła), polecam powtórzyć amplifikację, to na pewno lepsze niż powtarzanie całej procedury przygotowania standardów, jeżeli okazałoby się że ilościowy PCR nie chodzi przy 10 czy też 100 kopiach na reakcję.



Multiplex-PCR wprowadza nowe możliwości

Źródło: Wikimedia Commons, autor Zephyris, licencja CC BY SA 3.0