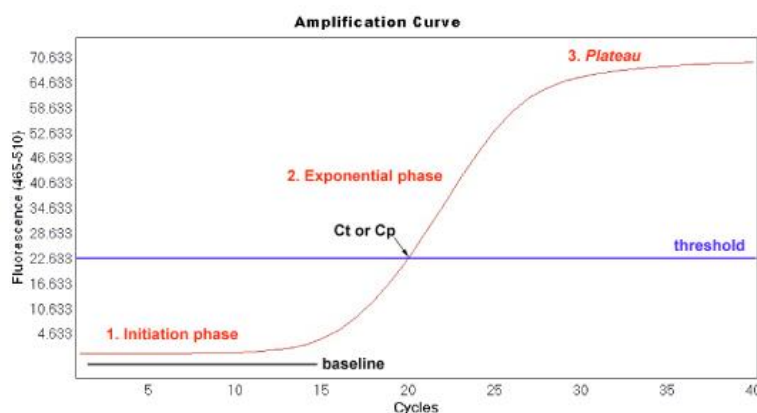


Obliczanie zmiany relatywnej ekspresji genów na podstawie wyników z qPCR

Metoda qPCR służy do ilościowego określenia poziomu ekspresji genów. W swojej pracy badawczej wykorzystuję tę metodę do zmierzenia poziomu reaktywacji wirusa HIV z latencji w komórkach reaktywowanych przy pomocy różnych związków lub manipulacji czynnikami pochodzącymi z komórek gospodarza. Badane geny to fragment Rev-Responsive element (RRE) oraz multiply spliced (MS) HIV RNA.

Obliczenie poziomu ekspresji genów polega na przeprowadzeniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) na RNA wyekstrahowanym z komórek i przepisany na cDNA poprzez reakcję odwrotnej transkrypcji. W reakcji PCR z użyciem odczynnika SYBR green, cDNA ulega amplifikacji (czyli ulega powieleniu z każdym następnym cyklem reakcji), a SYBR interkaluje do powielonych nici (czyli przyczepia się między nici cDNA), dając sygnał fluorescencyjny, który jest mierzony przez maszynę. Sygnał ten ma postać sigmoidy (Ryc.1.), a moment, w którym sigmoida „idzie do góry” (na podstawie ustalonego przez maszynę lub eksperymentatora thresholdu) jest mierzony jako C_q. Po zakończonej reakcji, wyniki z C_q dla poszczególnych próbek można wyeksportować do pliku Excel.



Ryc.1. Wykres przedstawiający sygnał fluorescencyjny mierzony metodą qPCR.

Źródło: <https://www.caister.com/highveld/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>

Obliczenie zmiany relatywnej ekspresji genów polega na przeliczeniu różnicy pomiędzy genem badanym, a genem kontrolnym (który odzwierciedla ilość komórek wziętych do reakcji; zwykle jakiś housekeeping gene – gen podstawowego metabolizmu komórkowego):

$$\Delta Cq = Cq(\text{gene}) - Cq(\text{housekeeping gene}),$$

Następnie oblicza się relatywną ekspresję:

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta Cq},$$

A potem przyrównuje próbki badane do kontrolnej próbki:

$$\text{Fold change} = \frac{\text{relative expression}}{\text{mean(control sample)}}$$

Tak obliczone wartości przedstawia się na wykresie wraz ze słupkami błędu (obliczanymi jako odchylenie standardowe z próbek, które mierzone są zwykle w duplikacie).

Aby uzyskać taki wykres za pomocą obliczeń w Python (wersja 3.11), należy najpierw zainstalować:

- Numpy 1.24.3
- Pandas 2.0.2
- Openpyxl 3.1.2
- Matplotlib 3.1.2

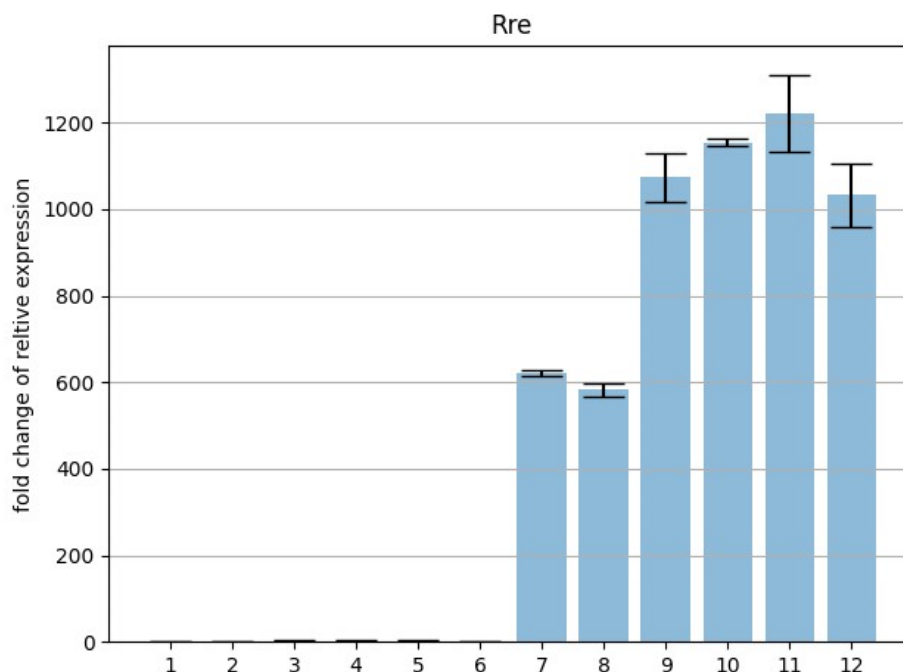
Za pomocą komendy „pip install” w Windows Powershell.

Przygotowany program wykonuje obliczenia na podstawie arkusza z wynikami qPCR: dane.xlsx. Arkusz, z którego pobierane są wartości Cq ma nazwę „0”. Wyniki obliczeń program zapisuje do arkusza „Calculations” (Ryc. 2. A), a następnie tworzy wykresy odpowiednio dla genów RRE (Ryc. 2. B), i MS (Ryc. 2. C).

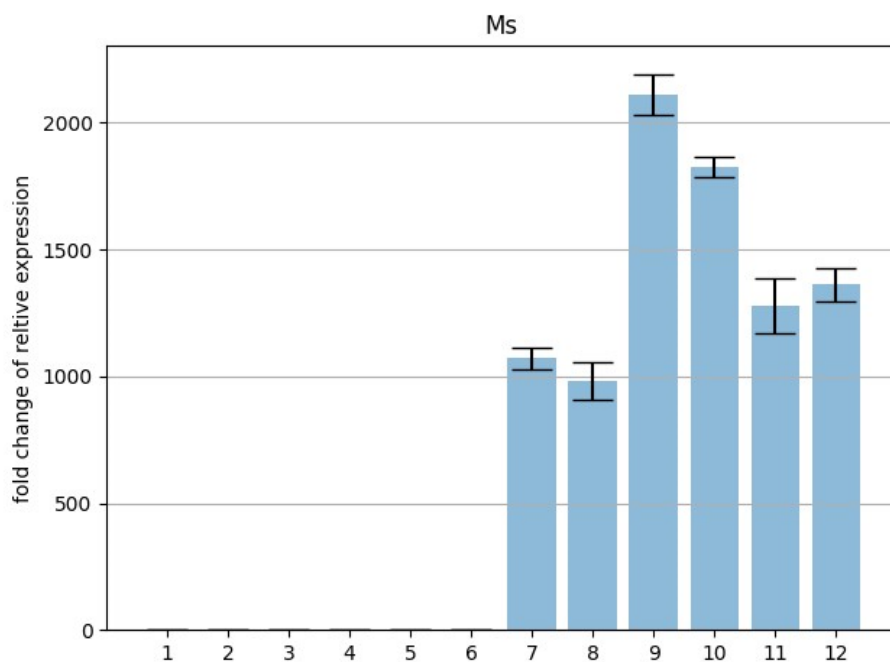
A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Sample	gapdh	CqMean	re_DeltaCq	ms_DeltaCq	re_RelativeExpression	ms_RelativeExpression	re_control sample mean	ms_control sample mean	re_fold_change	ms_fold_change	re_mean	ms_mean	re_std	ms_std
1	0	1	16.12968164	15.77456917	15.50679358	1.78395E-05	2.14778E-05	1.89259E-05	2.12371E-05	0.942596315	1.011333603	1	1	0.08118107	0.016028136
2	1	2	16.87069394	15.98410229	15.44561663	1.54279E-05	2.24092E-05			0.815173368	1.05514109	1.074265109	1.083188675	0.366412468	0.039665276
3	2	3	16.57479494	15.18785146	15.63522088	2.71658E-05	1.86404E-05			1.435378945	0.525191347	2.217476328	0.943863311	1.106656403	0.026406144
4	3	4	16.90096151	15.19846556	15.71429647	2.65955E-05	1.86005E-05			1.405247798	0.875850222	2.009304735	0.956037733	0.854265512	0.113402264
5	4	5	15.88988635	14.34224067	15.34547556	4.81455E-05	2.40188E-05			2.543897328	1.130982802	2.27533233	1.225029219	0.378080263	0.133001719
6	5	6	15.78384769	15.46037065	15.82070461	2.21802E-05	1.7279E-05			1.171949552	0.813575388	1.434811835	0.81111254	0.371743406	0.003462993
7	6	7	16.6252229	6.424276499	5.420050349	0.011643943	0.023366075			615.2366257	1099.776161	621.0483486	1070.098091	8.214774724	41.97112823
8	7	8	16.70069288	6.475943547	5.664510206	0.011234319	0.019175174			593.596003	928.3611549	582.8226318	980.7141009	15.2358477	74.03824617
9	8	9	15.86412373	5.674392759	4.5198847	0.019581122	0.043589223			1034.622213	2052.501916	1073.997508	2110.312149	55.6850771	81.75601615
10	9	10	16.11784684	5.50562406	4.66520574	0.021966329	0.03039563			1160.651157	1855.036655	1154.35677	1828.497471	8.90160869	40.36050203
11	10	11	15.99612011	5.361682653	5.11664593	0.024320511	0.028822795			1285.040809	1357.189656	1221.4031	1280.475236	89.99731165	108.4905728
12	11	12	15.8482572	5.606161544	5.063157061	0.020529445	0.029911477			1084.729473	1408.452792	1032.280269	1362.207143	74.17183025	65.40122378
13	12	1	15.60875485	15.53949685	2.00123E-05	2.09964E-05			1.057403685	0.98866397					
14	13	2	15.27421601	15.37088697	2.5239E-05	2.35996E-05			1.33335885	1.111296251					
15	14	3	14.10452209	15.57814124	5.67698E-05	2.04415E-05			2.999576911	0.962535275					
16	15	4	14.30337432	15.47171492	4.94601E-05	2.20064E-05			2.613361671	1.036225243					
17	16	5	14.68440776	15.12352526	3.79799E-05	2.80134E-05			2.006767331	1.319075637					
18	17	6	14.93572157	15.82946579	9.213E-06	1.71734E-05			1.637674118	0.808949592					
19	18	7	6.3972839	5.500102202	0.011863813	0.022095522			626.8570715	1040.420021					
20	19	8	6.529285538	5.51033438	0.010826528	0.021939366			572.0452606	1033.067047					
21	20	9	5.968560081	4.440622075	0.021071545	0.046044688			1113.372804	2168.122383					
22	21	10	5.824295782	4.710908719	0.021728076	0.03818345			1148.062384	1787.959286					
23	22	11	5.512153894	5.289719508	0.021911713	0.025564409			1157.765391	1203.760816					
24	23	12	5.752886592	5.161150994	0.01854422	0.027947228			979.8346645	1315.961494					

B



C



Ryc.2. Arkusz „Calculations” z obliczeniami wykonanymi przez program (A), Wyniki przedstawiające zmianę relatywnej ekspresji genu RRE (B) i MS (C).

Zaletą powyższego programu jest możliwość rozszerzenia jego możliwości o obliczenie wyników qPCR z innych eksperymentów, w tym celu należy np. zmienić nazwę genu, zmienić liczbę próbek lub dodać kolejny gen badany. Należy przy tym jednak utrzymać nazwę próbek jako liczby, zaczynając od 1.