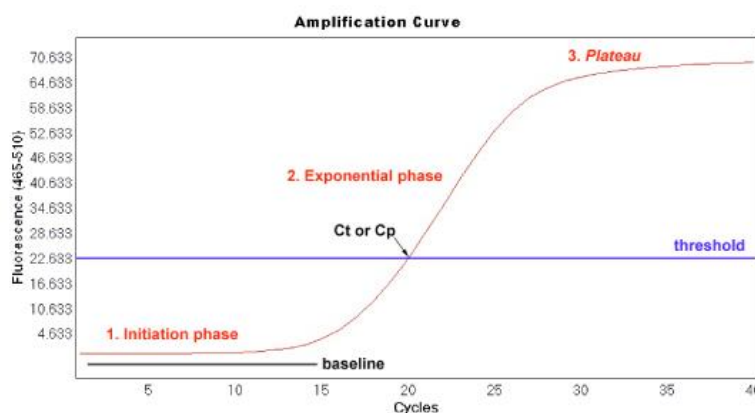


Obliczanie zmiany relatywnej ekspresji genów na podstawie wyników z qPCR

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 Cq. Po zakończonej reakcji, wyniki z Cq 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, należy najpierw zainstalować:

- Numpy
- Pandas
- Openpyxl

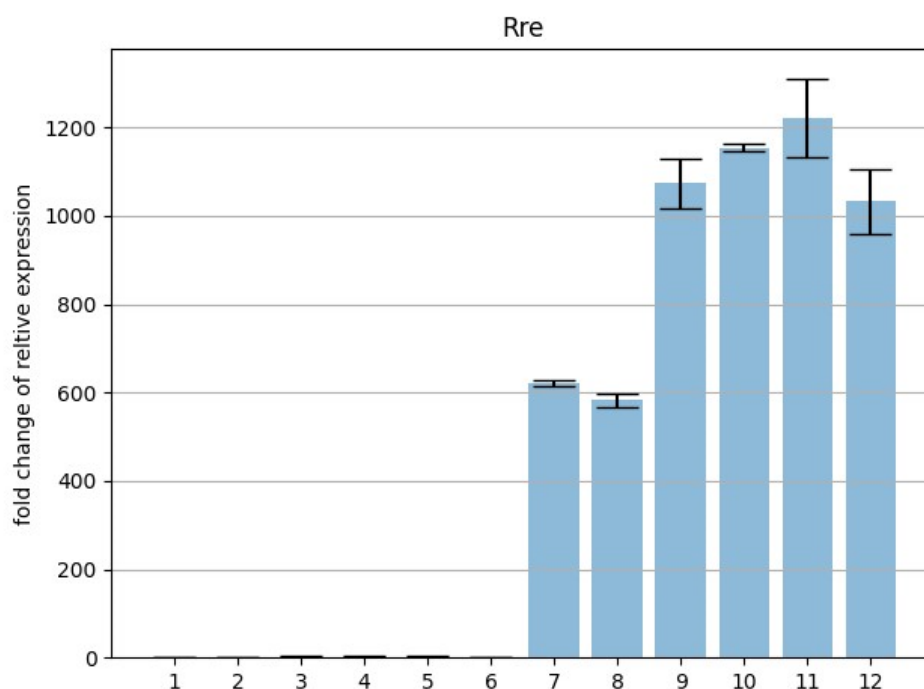
Za pomocą komendy „pip install” w Windows Powershell.

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).

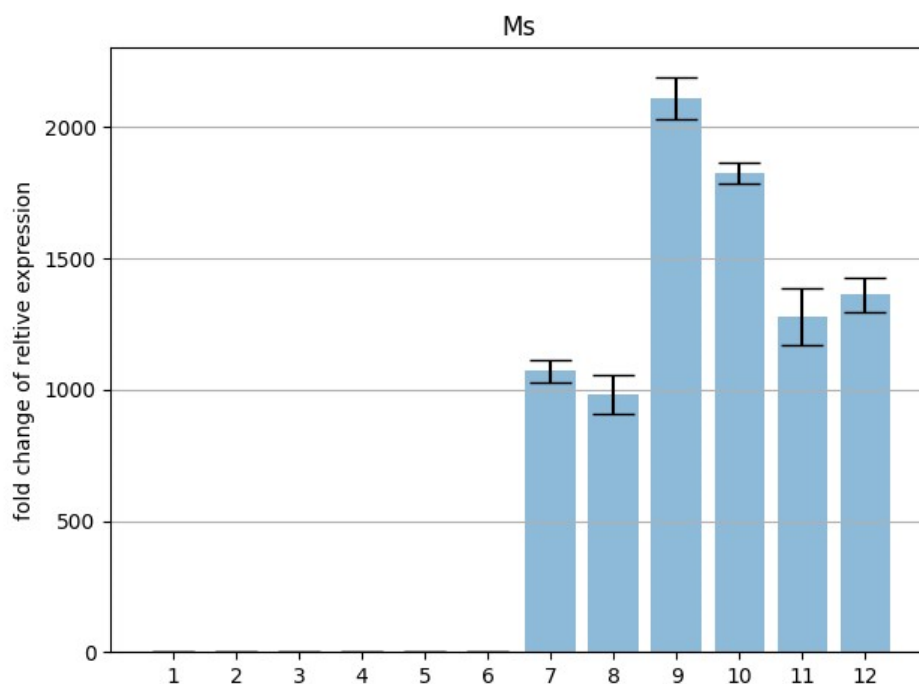
A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	Sample	gapdh	Cq	Mean	ms	DeltaCq	ms	RelativeExpression	ms	RelativeExpression	ms	control sample mean	ms	control sample mean	ms
1	0	1	16.12968164	15.7456917	15.50679358	1.76395E-05	2.14778E-05	1.85259E-05	2.12371E-05	0.342596315	1.011333603	1	1	0.06118107	0.016028136
2	1	2	16.87089894	15.98410229	15.44561663	1.54279E-05	2.24092E-05			0.815173368	1.05114109	1.074266109	1.083188675	0.364412468	0.038665276
3	2	3	16.57478484	15.16785146	15.63522888	2.71658E-05	1.96484E-05			1.435376945	0.925191347	2.217476928	0.943863311	1.106056403	0.026406144
4	3	4	16.90096151	15.19845656	15.71429647	2.65959E-05	1.86005E-05			1.405247798	0.875850222	2.009304735	0.956037733	0.854265512	0.113402264
5	4	5	15.88986535	14.34224067	15.34547556	4.81455E-05	2.40188E-05			2.543897328	1.130982802	2.27533233	1.225029219	0.378800263	0.133001719
6	5	6	15.79384768	15.46037065	15.82070461	2.21802E-05	1.7278E-05			1.171949552	0.813575388	1.434811835	0.81111254	0.371743406	0.003482993
7	6	7	16.6292229	16.424276499	5.420058349	0.011643943	0.023356075			615.2396257	1099.776161	621.0483406	1070.098091	8.214774724	41.97112923
8	7	8	16.70069288	6.478943547	5.664510205	0.011234319	0.019175174			593.596003	928.3611549	582.826318	980.7141009	15.2358477	74.03624617
9	8	9	15.86412373	5.674392759	4.5198847	0.019581122	0.043889223			1034.622213	2052.801916	1078.997508	2110.312149	55.5850771	81.75601615
10	9	10	16.11764684	5.508562406	4.665820574	0.021966329	0.03939963			1160.651157	1855.036555	1154.35677	1826.497471	8.901606985	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	0.023911477			1084.729473	1408.452792	1032.282069	1362.207143	74.17183029	65.40122378
13	12	1		15.60875405	15.53949635	2.00123E-05	2.05994E-05			1.057403685	0.988956397				
14	13	2		15.27421601	15.37088697	2.5235E-05	2.35995E-05			1.33335885	1.111236261				
15	14	3		14.10452209	15.57814124	5.67896E-05	2.04415E-05			2.999576911	0.962535275				
16	15	4		14.30337432	15.47171492	4.94601E-05	2.20054E-05			2.613361671	1.036225243				
17	16	5		14.68440776	15.12352526	3.79798E-05	2.80134E-05			2.006767331	1.319075637				
18	17	6		14.92572157	15.82946579	3.213E-05	1.71734E-05			1.697674118	0.808649692				
19	18	7		6.39728839	5.500102202	0.011863813	0.022095922			625.8570715	1040.420021				
20	19	8		6.52285536	5.51033436	0.010265528	0.021939366			572.0452606	1033.057047				
21	20	9		5.568560081	4.440822075	0.021071545	0.046044668			1113.372804	2168.122383				
22	21	10		5.524295792	4.710908719	0.021728076	0.03818345			1148.062384	1797.958286				
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.