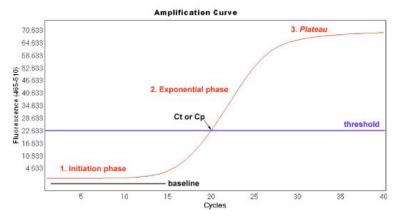
Obliczanie zmiany relatywnej ekspresji genów na podstawie wyników z qPCR

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 przepisanym 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 tresholdu) 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 houskeeping gene – gen podstawowego metabolizmu komórkowego):

$$\Delta Cq = Cq(gene) - Cq(housekeeping gene),$$

Następnie oblicza się relatywną ekspresję:

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

A potem przyrównuje próbki badane do kontrolnej próbki:

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

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

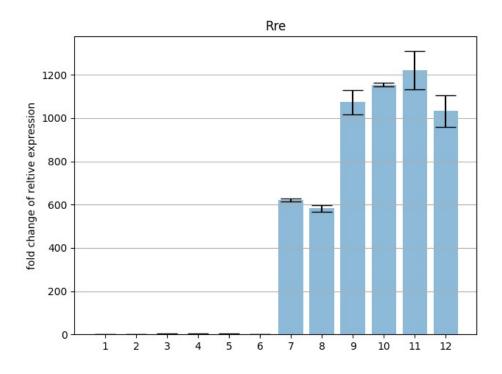
Za pomocą komendy "pip install" w Windows Powershell.

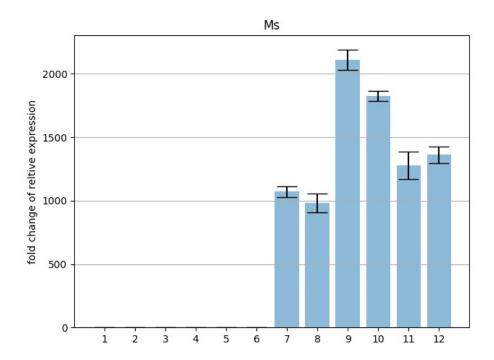
Przygotowany program wykonuje obliczenia na podstawie arkusza z wynikami qPCR: dane.xlsx. Arkusz, z którego pobierane są wartości Cq ma nazwę "0". Wyniki obliczeń program zapisuje do arkusza "Calculations" (Ryc. 2. A), a następnie tworzy wykresy odpowiednio dla genów RRE (Ryc. 2. B), i MS (Ryc. 2. C).

Α

0 1 16.128/81841 15,77458171 15,50679358 1.783956-05 2.147786-05 2.1822596-05 2.123716-05 0.425596-15 1.0913133903 1 1.09.1618733867 1 2 1.87059841 15,7874864 15,6197266 2.240626-05 1.9824610 0.182596-05 1.981873868 1.09514109 0.074265109 1.0885875 0.3 3 4 18.90058151 1.51873864 1.56352288 2.7159826 1.98086351 1.10 0.7142647 0.239191347 2.217478228 0.943863311 1.00 4 5 1.88086855 1.43427789 4.9448566 1.8809665 2.244987282 1.19082082 2.75332331 1.28252218 0.3734222 0.239331735 0.8825223 1.09534019 0.7534222 0.934853311 1.0 4 5 1.88086855 1.434247789 2.4498722 1.434247789 2.2498722 1.198220221 0.3734222 2.2498722 1.198220221 0.3734222 2.2498722 1.19822022 2.2498722 1.19822022 1.198220222 1.19822022 2.2498722 1.19822	
1	std ms_s
2 3 16.577478484 15.67825846 15.65822888 2.7165885.05 1.96484E-05 3 4 16.509056151 15.1742667 2.658955E-05 1.86005E-05 1.405247786 0.2579191347 2.217478282 0.948863311 1.101 4 5 15.8898655 14.34224076 15.3442785 2.44887328 1.130962802 2.27532333 1.25202219 0.37555022 2.7778E-05 1.171494552 2.54887328 1.130962802 2.27532333 1.25202219 0.37778E-05 1.1778E-05 1.1778E-05 1.1778E-05 1.1778E-05 1.1778E-05 1.17778E-05 1.1778E-05 1.177	18107 0.01602
3	12468 0,03966
4 5 18,8989835 14,342/4967 15,345/7596 4,91895-05 2,491896-05 2,249897328 1,193982002 2,27533233 122,5022219 0,327 5 6 7,738,748 16,292229 6,442/7349 5,420088349 0,01143943 0,02356075 615,2394788 1,739,776161 621,948488 1,77746-05	56403 0,02640
5 6 15,7384768 15,409370565 15,209025 1171949552 0,1357338 1,43411835 0,81111254 0,33256075 6 7 16,6292295 4,64274699 5,62058349 0,01144344 0,023526075 615,2394257 1,098,71511 2,098,71513 0,01144341 0,019715714 9,000,700,700,700,700,700,700,700,700,70	65512 0,11340
6 7 16,222229 6,424772499 5,42008249 0,0164343 0,02356075 615,239227 109,776161 121,042848 1070,098298 12,777,7761109 15,842273 1,8542273 5,85451007 1,8542273 1,8542273 3,8542273 1,8542273 3,8542273 1,974714109 1,8542273 1,8542273 3,8542273 1,974714109	08263 0,13300
7 8 16,70062268 6,475943477 5,664510206 0.011224319 0.019715714 593,586003 929,3611549 852,0223181 90,7141009 13 8 9 1,56412373 5,54193279 4,5198847 0,019581122 0,019581122 0,019581122 0,019581127 1,01958122 0,02581275 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122 0,01958122	43406 0.00348
8 9 158412273 5,67432279 4,5198847 0,045569223 103,4622213 202,5251916 (107,89780) 211,11249 202,521916 (107,89780) 211,11249 202,521916 (107,89780) 211,11249 202,521916 (107,89780) 211,11249 202,521916 (107,89780) 211,11249 202,521916 (107,89780) 211,11249 211,11249 212,11249	74724 41,9711
9 10 16.1746564 5.80856206 4.668320574 0.02395632 0.03393953 116.0551157 1855.036565 115.45677 126.49747 8.98 10 11 1.59962011 1.53862053 1.538677 126.64303 127.243073 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 128.243273 14.243273 14.0462279 1.064273273 104.724273 1	58477 74,0382
10	50771 81,7560
11	06985 40,3605
12 1 15,0075485 15,5349685 2,00725-05 2,09946-05 1,057403685 0,98665397 13 2 15,2724501 13,73708857 2,5235-05 2,33996-05 1,33338858 1,111238261 14 3 14,10452209 15,57814124 5,67896-05 2,04415-05 2,299578911 0,962535275 15 4 14,3037342 15,47171422 4,94011-05 2,2004-05 2,213416-07 1,20225243 16 5 14,8440776 13,235256 3,79798c-05 2,0134-05 2,0134-05 2,0134-05 17 6 14,92572157 15,8234-5579 3,2136-05 1,71734c-05 1,837547118 0,0084-952 18 7 6,3972833 5,50010202 0,01185381 0,01185381 0,01185381 1,000000000000000000000000000000000000	
13 2 15,27421601 15,3708897 2,52356-05 2,399595-05 1,33338885 1,11125661 14 3 14,10452209 15,7781474 5,76956-05 2,044185-05 2,9995,7991 0,962535275 15 4 14,30337422 15,47171492 4,94011-05 2,20064-05 2,613361671 1,03625243 16 5 14,86440776 15,12525256 3,797986-05 2,01344-05 2,00567331 1,19107637 17 6 14,32572157 18,8294579 3,2138-05 1,71744-05 1,597874118 0,00844992 18 7 6,39728393 5,501012020 0,011868313 0,0225522 62,8157015 1,040,40021	83025 65,4012
14 14,2022 15,57814124 5,67896-05 2,04415-05 2,999576911 0,96258275 15 4 14,0327422 15,4771492 4,946911-05 2,20064-05 2,613361671 1,03622543 16 5 14,6840776 15,1235236 3,79798-05 2,00146-05 2,00147637 1,131078637 17 6 14,9272157 15,62346579 3,218-05 1,71734-05 1,59754118 0,00844962 18 7 6,37928839 5,601012022 0,011685813 0,002095522 668,6870715 1,040,420021	
15 4 14.0037422 15.47771492 4.94091E-05 2.2006E-05 2.613361671 1.036225243 16 5 14.68440778 15.12525268 3.79798E-05 2.8014E-05 2.005672331 1.319078537 17 6 14.92572157 15.82246579 3.213E-05 1,7174E-05 1.597874118 0.008449692 18 7 6.39728393 5-500102020 0.011686313 0.02205522 626.8570715 1040.40021	
16 5 14 684407% 15 1235256 3,797985-05 2,801345-05 2,005767331 1,3197637 17 6 14,3572157 15,2246579 3,2136-05 1,717346-05 1,6397674118 0,080649992 18 7 6,3972833 5,500102202 0,011863913 0,022995522 628,8570715 1040,420021	
77 6 14.52571275 15.82346579 2.2135-05 1.71734E-05 1.55774118 0.808549952 1.55774118 0.008549952 1.5577418 0.008549952 1.55774118 0.008549952 1.55774118 0.008549952 1.55774118 0.008549952 1.55774118 0.008549952 1.55774118 0.008549118 0.008549118 0.008549118 0.008549118 0.008549118 0.008549118 0.00	
18 7 6,39728839 5,500102202 0,011863813 0,022095522 626,8570715 1040,420021	
19 8 6 529285538 5 51033438 0 010826528 0 021939366 572 0492606 1033 067047	
20 9 5,568560081 4,440822075 0,021071545 0,046044668 1113,372804 2168,122383	
21 10 5,524295792 4,710908719 0.021728076 0.03818345 1148,062384 1797,958286	
22 11 5,512153894 5,289719508 0,021911713 0,025564409 1157,765391 1203,760816	
23 12 5,752886592 5,161150994 0,01854422 0,027947228 979,8346645 1315,961494	

В





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.