

Labrapport

Introduksjon

Analyser av genuttrykk gjennom fluorisens-basert sanntids kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) er fast praksis i mange medisinske treningsstudier (Kuang et al., 2018). qPCR benyttes til å måle uttrykket av et målgen i prøver fra blant annet blod og muskelvev. Et vanlig bruksområde innenfor treningsfysiologi er for eksempel å måle treningsinduserte endringer i genuttrykk for ulike muskelfibertyper. Selv om denne typen analyse er svært utbredt, finnes det mange ulike protokoller og måter å gjennomføre analysen på. Reproduserbarheten og reliabiliteten til dataen avhenger i stor grad av hvordan eksperimentene gjennomføres og tolkes. For å sikre så reliable tester som mulig, er det viktig med en detaljert og nøye protokoll (Kuang et al., 2018).

Prinsippet bak en qPCR-analyse er å følge PCR i sanntid. For å gjennomføre PCR må vi først ekstrahere RNA fra en biologisk celleprøve. Deretter blir RNAet gjort om til cDNA i en prosess kalt reversert transkripsjon. Med PCR blir dette cDNAet deretter amplifisert opp til milliarder av kopier (Kuang et al., 2018). Hver syklus i en PCR består av tre steg for å kopiere opp det aktuelle DNAet. I første steg (denaturering) blir DNAet utsatt for høy temperatur for å dele DNAet fra dobbeltrådet til enkelttrådet. I det andre steget (annealing) blir temperaturen senket og primere fester seg til templat-trådene. I det siste steget (elongering) øker temperaturen igjen og DNA-polymeraser fester seg til primerne og syntetiserer et nytt dobbeltrådet DNA, likt det vi startet med (Kuang et al., 2018). Deretter vil denne syklusen repetere seg, slik at DNAet dobles eksponentielt for hver syklus. I en qPCR som benytter SYBR green-metoden blir det aktuelle DNAet bundet til fluoresens under hver syklus slik at man kan følge PCR-prosessen i sanntid, ved å ta et bilde som detekterer fluorescensen etter hver syklus (Kuang et al., 2018). Mengden cDNA og fluorescens dobles etter hver syklus, og signalet av fluorescens øker dermed eksponentielt. Hvor raskt signalet av fluorescens når en satt grense kalt syklisk terskel (CT), bedømmer hvor stort uttrykk av et gen vi har. Jo færre sykluser som må gjennomføres for å nå CT, jo større uttrykk av målgenet hadde vi i celleprøven vår (Livak & Schmittgen, 2001).

Metode

I forkant av forsøket hadde labansvarlig forberedt cDNA. qPCR-analyse ble gjort ved bruk av cDNA og en Master mix. Master mixen besto av 5 l Cybr-green, 1 l primer mix (MCH1, MHC2a, MCH2x eller MCHb2m) og 2 l H₂O. På en plate med brønner ble det tilført 8 l Master mix i brønnene sammen med 2 l cDNA. I tillegg til dette lagde vi en fortynningsserie for å teste primerne. Fortynningene vi brukte var 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 og 1/1000000. I 1/1 prøven var det 2 l cDNA og 8 l cmc. Fortynningsserien tok utgangspunkt i denne prøven og ble fortynnet med H₂O. Platen ble så dekket med plast og sentrifugert på 1200rpm i 1 minutt. PCR-prøvene ble analysert ved sanntids PCR (Applied Biosystems 7500 fast Real-TimePCR Systems, Life Technologies AS) og ved bruk av Quant Studio programvare (Applied Biosystems, Waltham, MA USA). PCR-prosessen besto av tre deler, en “Hold stage” en “PCR stage” og en “Melt curve stage”. Det første steget gikk ut på at temperaturen økte med 1,99°C/s opp til 50°C hvor temperaturen forble konstant i 2 min. Videre Økte temperaturen med 1,99°C/s opp til 95°C hvor temperaturen forble konstant i 2 min. Deretter startet selve PCR-prosessen som besto av 40 sykluser. Én syklus besto av 1 sek på 95°C før temperaturen sank med 1,77°C/s ned til 60°C hvor temperaturen ble holdt konstant i 30 sek. Etter hver syklus ble det tatt bilde av brønnenes fluorescens. Avslutningsvis økte temperaturen med 1,99°C/s opp til 95°C hvor temperaturen holdes konstant i 15 sek. Deretter synker temperaturen med 1,77°C/s ned til 60°C hvor temperaturen holdes konstant i 1 min. Temperaturen økte deretter med 0,15°C/s opp til 95°C hvor temperaturen ble holdt konstant i 15 sek. Etter PCR-prosessen var ferdig kunne vi hente ut resultatene i form av CT-verdier.

Resultat

Vi ser at mengden genuttrykk for de ulike muskelfibertypene har endret seg fra uke 0 til uke 2 Table 1. Genuttrykket for Muskelfibertype 1 (MCH1) har sunket fra 35-27%, muskelfibertype 2a (MHC2a) har økt fra 0,6-72% og muskelfibertype 2x (MCH2x) har sunket fra 63-4%.

Table 1: Prosentvis fordeling av genuttrykk etter uke 0 og uke 2

Gentype	Uke 0	Uke 2
MCH1	35.43	27.33
MHC-2a	0.61	72.21
MHC-2x	63.96	4.61

Antall sykluser for å nå syklisk terksel (CT) har endret seg fra uke 0 til uke 2 Table 2. Antall sykluser har sunket for MCH1 fra 22-17 sykluser. For MHC2a har antall sykluser sunket 27-15 sykluser, og for MCH2x har antall sykluser til CT økt fra 21-23 sykluser. Lavere antall sykluser viser til større genuttrykk.

Table 2: CT-verdier

Gentype	Uke 0	Uke 2
MHC1	22.04	17.29
MHC-2a	27.91	15.89
MHC-2x	21.19	23.19

Tallene er antall sykluser før syklisk terskel er nådd

Diskusjon

Bruken av stabile og egnede gener ved analyse av genuttrykk gjennom fluoresens-basert sanntids kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) krever stabile og egnede gener. I tillegg kreves at protokollen som vi brukte følges nøye. Dersom disse faktorene er på plass kan vi korrekt vurdere, presentere og tolke genuttrykk.

I denne oppgaven har vi valgt å se på endringen i mengden genuttrykk på MHC1, MHC2a og MHC2x uke 0 til uke 2.

Vurderingen og tolkningen av tallene for endring i genuttrykket for de ulike typene virker å være fornuftige. Tabell 1 i (**terzisResistanceExerciseinducedIncrease2007?**) viser en blant annet en endring ved en økt prosentandel MHC2a etter 14 uker med styrketrening. (**andersenMyosinHeavyChain2000?**) viser også at styrketrening reduserer MHX2x og øker MHX2a. I denne oppgaven viser tabell 1 at styrketrening gir endringer som at MCH1 har sunket fra 35-27%, MHC2a har økt fra 0,6-72% og MHX2x har sunket fra 63-4%.

Endringen på MHC2a og MHC2x er stor. Dette kan være at dette var gen fra en veldig utrent person, men det kan også være en feil i eksperimentet. I (**andersenMyosinHeavyChain2000?**) beskrives det at ved å øke muskelaktiviteten, enten gjennom styrke- eller utholdenhetstrening, slås MHC2x-genet av noe som resulterer i en forhøyet andel MHC2a-gen på bekostning av type 2x. Ved inaktivitet reverseres denne prosessen, noe som gjør forekomsten av MHC2x mer vanlig.

Vi har også sett på antall sykluser som trengs for å nå terskel for eksponensiell økning i fluoresense. Lavere antall sykluser viser til større genuttrykk. Genuttrykket for MCH2x var eneste genuttrykk som trengte flere sykluser for å nå CT-verdi på uke 2. Dette kan være en feil i eksperimentet. Ellers ser vi at antall sykluser har sunket for både MCH1 og MHC2a.

Konklusjon

Styrketrening viser seg å gi endringer som en forhøyet andel MHC2a-gen blir mer dominant sammenlignet med type 1 og type 2x.

Referanser

- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLOS ONE*, 13(5), e0196438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>