

DIFICULTĂȚI ÎN ANALIZA EXPRESIEI GENICE COMPARATIVE (RELATIVE) PRIN qRT-PCR

R. Huică¹, Elena Moldoveanu²

Rezumat. Tehnica revers-transcrierii, urmată de polimerizare în lanț cu cuantificare în timp real stă la baza investigării expresiei genice relative (compararea între proba de investigat și un control). O analiză de calitate trebuie să țină seama de anumite cerințe în toate etapele, de la prelevarea probei până la analiza computerizată finală a rezultatelor. Sunt trecute în revistă momente-cheie ale întregului proces, cu precizarea dificultăților și a soluțiilor posibile.

Cuvinte-cheie: qRT-PCR, expresie genică.

Abstract. Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction represents the main technique used in relative gene expression analysis (comparison of the target sample to a control). In order to perform a good analysis, a set of requirements must be observed, ranging from sample collection to the final data analysis of the test results. Key moments of the whole process are reviewed, underlining both difficulties and their possible solutions.

Keywords: qRT-PCR, gene expression.

INTRODUCERE

Reacția polimerizării în lanț (PCR) este folosită de mai bine de două decenii pentru amplificarea cu mai multe ordine de mărime a moleculelor de ADN (acid dezoxiribonucleic), în vederea obținerii de material suficient cantitativ pentru studierea fiziologiei și fiziopatologiei genelor. Metodele PCR clasice folosesc însă analiza punctului terminal, care prezintă dezavantaje majore date de inhibiția reacției de amplificare, competiția între reacțiile de re-hibridizare dintre ampliconi și inițiatori (amorse, primeri), instabilitatea enzimatică și descreșterea concentrațiilor reactivilor (1).

qRT-PCR

Ca răspuns la nevoia depășirii acestor limite, a fost pusă la punct *tehnica de revers-transcriere, urmată de PCR cu cuantificare în timp real (qRT-PCR)*. Aceasta poate

monitoriza cantitatea de produs de transcriere obținut la fiecare ciclu de amplificare, în raport cu cea existentă la începutul reacției. Este posibilă, astfel, determinarea precisă a cantității de matriță de acizi nucleici conținută în lichide biologice, fragmente tisulare sau chiar dintr-o singură celulă.

Avantajele qRT-PCR sunt precizia, sensibilitatea, rapiditatea, lucrul cu probe în cantități mici și posibilitatea adaptării la volume mari de lucru, iar printre aplicațiile acestei tehnici se pot enumera măsurarea cantității absolute a unui fragment molecular (ex. încărcarea virală sau bacteriană), verificarea rezultatelor testelor microarray, analiza mutațiilor și polimorfismelor, analiza expresiei genice.

Opțiunile tehnice pentru qRT-PCR sunt tot mai numeroase și includ: SYBR Green I sau alți fluorocromi, care se cuplează de acizi nucleici, sonde de hidroliză/5'-nucleazice (ex. TaqMan), alte combinații care au la bază cuplul raportor-extinctiv (Molecular Probes, primeri

¹Radu Huică, medic specialist, cercetător științific, Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București.

²Prof. Dr. Elena Moldoveanu, Catedra Biochimie, Facultatea de Medicină și Facultatea de Medicina Dentară a Universității „Titu Maiorescu”; cercetător principal I, Institutul Național de Cercetare - Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babeș”, București.