

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237994**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432230**

(51) Int.Cl.
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.12.2019**

(54) **Sposób amplifikacji komplementarnego DNA w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją za pomocą starterów genowo i regiono-specyficznych dla prekursora miRNA-944**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
22.02.2021 BUP 04/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.06.2021 WUP 13/21

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
TOMASZ POWRÓZEK, Dębica, PL
**TERESA MAŁECKA-MASSALSKA,
Jakubowice Konińskie, PL**

(74) Pełnomocnik:
recz. pat. Anna Belz

PL 237994 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób amplifikacji uzyskanego cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (ang. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*; RT-qPCR) za pomocą starterów genowo i regiono-specyficznych.

Prekursory miRNA (pri-miRNA) należą do rodziny długich, niekodujących białek cząsteczek kwasu rybonukleinowego (ang. *long non-coding RNA*; lncRNA) oraz stanowią pierwszy, jądrowy produkt transkrypcji genu kodującego określone miRNA (stąd określenie prekursor). W procesie jądrowej i cytoplazmatycznej obróbki pri-miRNA przekształcane są w dojrzałe miRNA. miRNA regulują funkcję genów na poziomie potranskrypcyjnym, tzn. posiadają zdolność do wiązania się do matrycowego RNA (ang. *messenger RNA*; mRNA), wpływając przez na to na poziom syntezowanych w organizmie białek. Rola miRNA w molekularnej regulacji funkcjonowania ludzkich genów została dotychczas opisana w wielu pracach naukowych. Na szczególną uwagę zasługuje jednak rola miRNA w procesie rozwoju chorób nowotworowych, w których obserwuje się zaburzenie ekspresji tych cząsteczek w porównaniu do stanu fizjologii. Istotne różnice w profilu ekspresji miRNA między osobami zdrowymi oraz chorymi na nowotwory złośliwe, a także możliwość ich badania we krwi obwodowej czynią je obiecującymi markerami diagnostycznymi umożliwiającymi wczesne i nieinwazyjne wykrycie raka [Chang TC. i wsp. Genomewide annotation of microRNA primary transcript structures reveals novel regulatory mechanisms, *Genome Res* 2015;25(9): 1401–1409 oraz Peng Y. i wsp. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016; 1:15004.]

Ze względu na obiecujące wyniki badań dotyczących oceny miRNA jako markerów nowotworowych, coraz większą uwagę poświęca się również ich prekursorom, ze względu na ich odmienną biologię w porównaniu do miRNA. pri-miRNA w odróżnieniu od dojrzałych miRNA są strukturami dwuniciowymi o długości ok. 100 par zasad, zlokalizowane są w jądrze komórkowym oraz są bezpośrednimi, niezmodyfikowanymi produktami genów kodujących miRNA [O'Brien J i wsp. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol* 2018;9:402.]. Mimo że ich rola w procesie rozwoju raka jest dotychczas niejasna, to ostatnie doniesienia naukowe zdają się potwierdzać istotną rolę pri-miRNA w procesie rozwoju chorób nowotworowych. W liniach komórkowych oraz materiale komórkowym pobranym od chorych z ostrą białaczką szpikową Rommer i wsp. odnotowali istotnie większą ekspresję prekursora miRNA-221/222 (pri-miRNA-221/222) w porównaniu do dojrzałych cząsteczek miRNA-221 i 222. Obecnie pri-miRNA-221/222 uznaje się za obiecujący onkogen związany z rozwojem ostrej białaczki szpikowej, a ocena jego ekspresji może być użyteczna w ocenie stopnia zaawansowania choroby [Rommer A. i wsp. Overexpression of primary microRNA 221/222 in acute myeloid leukemia. *BMC Cancer* 2013; 13:364.]. W materiale tkankowym pobranym z guzów od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca o utkaniu gruczołowym odnotowano natomiast istotnie wyższą ekspresję prekursora miRNA-3662 (pri-miRNA-3662) w porównaniu do tkanek o utkaniu płaskonabłonkowym i tkanki płucnej nieobjętej procesem nowotworowym. Ocena ekspresji pri-miRNA-3662 umożliwiła odróżnienie tkanki raka gruczołowego od tkanki zdrowej ze 80% czułością oraz swoistością na poziomie 96% oraz od tkanki raka płaskonabłonkowego z czułością 100% i swoistością 80%. Większą wartość diagnostyczną zdaje się posiadać jednoczesna analiza ekspresji prekursora i dojrzałego miRNA. Ocena pri-miRNA-3662 i miRNA-3662 umożliwiła odróżnienie tkanki raka gruczołowego od płaskonabłonkowego z czułością 96% i swoistością 85,7% oraz od tkanki zdrowej z czułością i swoistością odpowiednio 92% i 92% [Powrózek T. i wsp. Analysis of primary-miRNA-3662 and its mature form may improve detection of the lung adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2017; 143(10): 1941–1946.]. Pri-miRNA-3662 podobnie jak jego dojrzała forma miRNA-3662 jest uwalniany do krążenia, stąd może stanowić potencjalny marker diagnostyczny gruczołowego raka płuca. Ocena ekspresji krążącego pri-miRNA-3662 we krwi obwodowej umożliwia wykrycie wczesnych stadiów zaawansowania raka gruczołowego (operacyjne stadia choroby I i II) z czułością 71,4% oraz swoistością 98,5%. Ekspresja pri-miRNA-3662 we krwi obwodowej jest istotnie wyższa u chorych z rakiem gruczołowym płuca w porównaniu do chorych z rakiem płaskonabłonkowym i osób zdrowych [Powrózek T. i wsp. The diagnostic role of plasma circulating precursors of miRNA-944 and miRNA-3662 for nonsmall cell lung cancer detection. *Pathol Res Pract* 2017;213(11): 1384–1387].

Gen kodujący pri-miRNA-944, który następnie zostaje przekształcony w dojrzałe miRNA-944 zlokalizowany jest w sekwencji intronowej genu *TP63* (ang. *tumor protein 63*) kodującego białko p63, które jest regulatorem proliferacji komórek podstawnych nabłonka. Zwiększoną ekspresję *TP63* oraz p63 od-

notowuje się w guzach nowotworowych o utkaniu płaskonabłonkowym, a w rutynowej diagnostyce histopatologicznej używane są przeciwciała przeciwko białku p63 w celu określenia typu histologicznego nowotworu.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie sposobu amplifikacji cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) za pomocą określonych starterów genowo i regiono-specyficznych dla pri-miRNA-944. Amplifikację cDNA pri-miRNA-944 służącą badaniu jego ekspresji przeprowadza się za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR), która jest techniką dwuetapową. Zgodnie z założeniami RT-qPCR amplifikacji cDNA sekwencji badanej (w tym przypadku pri-miRNA-944) musi towarzyszyć równoległa amplifikacja sekwencji cDNA kontrolnej, która jest niezbędna do wyznaczenia ekspresji badanego pri-miRNA. W wynalazku jako kontrolę reakcji wykorzystano cDNA genu GAPDH (ang. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). Sposób prowadzenia RT-qPCR oraz kontrolę reakcji opisano szczegółowo w dalszej części.

Sposób amplifikacji cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) za pomocą starterów genowo i regiono-specyficznych dla pri-miRNA-944 według wynalazku charakteryzuje się tym, że stosuje się startery genowo-specyficzne (służące przepisaniu sekwencji RNA pri-miRNA-944 oraz GAPDH na komplementarne dla nich DNA – cDNA) wykorzystywane w pierwszym etapie RT-qPCR oraz startery regiono-specyficzne (służące amplifikacji cDNA pri-miRNA-944 oraz GAPDH) wykorzystywane w drugim etapie RT-qPCR posiadające sekwencje nukleotydowe przedstawione w załączniku.

Powyższe startery genowo-specyficzne stosowane są jednocześnie podczas trwania reakcji odwrotnej transkrypcji, tzn. do każdej próbki RNA pochodzącej od osoby badanej dodawane są oba startery (G1 i G2). Natomiast startery regiono-specyficzne stosuje się w parach (F1 z R1 oraz F2 z R2) podczas trwania reakcji qPCR służącej amplifikacji cDNA (startery umożliwiają uzyskanie następujących produktów qPCR: cDNA o długości odpowiednio 87 par zasad (pri-miRNA-944) oraz 118 par zasad (GAPDH)). W tym etapie każda uzyskana próbka cDNA (pochodząca od jednej badanej osoby) oznaczana jest osobno w czterech dołkach na płycie reakcyjnej PCR. W pierwszym dołku prowadzona jest reakcja ze starterami regiono-specyficznymi dla cDNA pri-miRNA-944 (startery: F1 i R1), natomiast w drugim dołku amplifikowane jest cDNA genu kontrolnego (GAPDH) (startery F2 i R2). Trzeci i czwarty dołek na płycie reakcyjnej stanowią powtórzenia powyższych reakcji. Zabieg ten ma na celu poprawę jakości uzyskanych wyników, które zostają następnie matematycznie uśrednione. Sposób rozmieszczenia badanych prób oraz powtórzeń reakcji przedstawiono na przykładzie - rycina 1. Dzięki prowadzeniu reakcji amplifikacji cDNA w aparacie Real-time PCR, wszystkie reakcje mogą być prowadzone w tym samym czasie, co umożliwia bieżący przebieg procesu amplifikacji cDNA oraz zapewnia obiektywną analizę uzyskanych wyników.

Zastosowanie powyższych starterów genowo-specyficznych umożliwia szybkie, wydajne i selektywne przepisanie tylko sekwencji RNA pri-miRNA-944 i GAPDH na komplementarne dla nich sekwencje DNA. Dzięki wykorzystaniu sposobu według wynalazku spośród dziesiątek tysięcy RNA obecnych w próbce pacjenta, na cDNA przepisywane są tylko dwie sekwencje niezbędne do dalszych eksperymentów. Znane metody przepisywania RNA, choćby te wykorzystywane w cytowanych publikacjach oparte są na globalnym przepisywaniu RNA na cDNA, tzn. przepisane na cDNA zostają wszystkie sekwencje RNA obecne w próbce badanej osoby. Wynalazek dzięki zastosowaniu starterów genowo-specyficznych umożliwia selektywne przepisanie na cDNA tylko sekwencji RNA pri-miRNA-944 i GAPDH. Zapewnia to po pierwsze wydajne uzyskanie cDNA wyłącznie badanych RNA, a po drugie zwiększa to efektywność amplifikacji w kolejnym etapie eksperymentu, gdyż nie jest ona zaburzana przez inne niepożądane cDNA. Natomiast zastosowanie starterów regiono-specyficznych dzięki korzystaniu ze sposobu według wynalazku umożliwia szybkie, wydajne i stosunkowo tanie otrzymywanie kopii matrycy cDNA pri-miRNA i GAPDH. Znane metody służące amplifikacji cDNA pri-miRNA-944 i GAPDH dotyczą innych fragmentów badanych sekwencji oraz są bardziej kosztowne głównie ze względu na wykorzystanie sond znakowanych fluorescencyjnie w drugim etapie RT-qPCR. Wynalazek dzięki wykorzystaniu regiono-specyficznych starterów umożliwia szybką i czułą, a przede wszystkim specyficzną amplifikację cDNA krążącego pri-miRNA-944 krwi obwodowej z wykorzystaniem barwnika interkalującego, tzn. wysycającego powstającego podczas reakcji PCR cDNA. Uzyskane w reakcji wyniki są odpowiednie do wyznaczenia ekspresji pri-miRNA-944. Opis metody amplifikacji pri-miRNA-944 za pomocą wynalazku opisano poniżej.

Wynalazek może mieć zastosowanie w wykrywaniu nowotworów płaskonabłonkowych zwłaszcza regionów głowy i szyi.

Opis metody RT-qPCR

RT-qPCR jest jedną z podstawowych technik badawczych zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i w rutynowej praktyce diagnostycznej. Metoda ta umożliwia głównie badanie i ocenę ekspresji genów na poziomie mRNA, ale również ocenę ekspresji RNA: lncRNA, miRNA i pri-miRNA. Omawiana metoda składa się dwóch etapów: odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*; RT) oraz reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative polymerase chain reaction*; qPCR). Pierwszy etap RT-qPCR to odwrotna transkrypcja (RT). W etapie tym dzięki wykorzystaniu enzymu odwrotnej transkryptazy oraz starterów reakcji RT wyizolowane z próbek biologicznych RNA przepisywane jest na cDNA. Drugi etap RT-qPCR stanowi PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) podczas którego uzyskane w poprzednim etapie cDNA jest amplifikowane, tj. namnażane dzięki zastosowaniu starterów reakcji specyficznych dla sekwencji badanych i kontrolnych. Dzięki zastosowaniu barwnika interkalującego (wysycającego) cDNA, które jest namnażane podczas PCR, wynalazek umożliwił szybką, czułą i taną ocenę ekspresji badanych RNA.

Jak wspomniano wcześniej, ocena ekspresji wybranych do badania sekwencji RNA wymaga równoległej oceny ekspresji genu kontrolnego, np. GAPDH, którego ekspresja w komórkach jest stała i niezależna od stanu zdrowia i choroby, co czyni go idealną i uniwersalną cząsteczką kontrolną. Ponieważ wydajność amplifikacji oraz namnażanie nowych kopii cDNA w reakcji PCR zależy głównie od jakości przeprowadzonej izolacji RNA oraz reakcji odwrotnej transkrypcji, to bez zastosowania kontroli reakcji uzyskany wynik mógłby być nierzetelny i nieobiektywny. Dzięki równoczesnej analizie cDNA genu kontrolnego z cDNA badanej sekwencji RNA z tej samej próbki badanej, możliwa jest normalizacja wyniku ekspresji badanego RNA. Poprzez normalizację należy rozumieć wyznaczenie cyklu progowego (Ct), tzn. określenie, w którym cyklu qPCR rozpoczyna się wykładniczy przyrost produktu amplifikacji cDNA kontroli i badanej sekwencji (w tym przypadku GAPDH i pri-miRNA-944), a następnie porównanie obu uzyskanych Ct względem siebie, poprzez obliczenie ΔCt ($\Delta Ct = Ct$ dla pri-miRNA-944 - Ct dla GAPDH). Dzięki procesowi normalizacji ostateczny wynik, czyli wartość ekspresji badanego RNA jest rzetelny i obiektywny. Im większe wartości ΔCt , tym mniejsza jest relatywna ekspresja badanej cząsteczki (zależność odwrotnie proporcjonalna). Ekspresję badanego pri-miRNA-944 oblicza się matematycznie z uproszczonego wzoru Pffafli'a (Pffafli MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.):

$$\text{Relatywna ekspresja pri-miRNA-944} = 2^{-\Delta Ct}$$

gdzie $\Delta Ct = Ct_{\text{pri-miRNA-944}} - Ct_{\text{GAPDH}}$

Opis działania wynalazku przedstawiono i omówiono na poniższym przykładzie.

P r z y k ł a d 1. RT-qPCR z wykorzystaniem unikalnych starterów genowo i regiono-specyficznych dla oznaczenia ekspresji pri-miRNA-944

W celu przeprowadzenia reakcji niezbędne są:

1. Wyizolowane z osocza krwi obwodowej całkowite RNA
2. Unikalna mieszanina reakcyjna RT zawierająca startery genowo-specyficzne (G1 i G2) oraz inne odczynniki chemiczne w odpowiednich proporcjach i stężeniach (tabela 1)
3. Termocykler z możliwością ustawienia optymalnych warunków termicznych (tabela 2)
4. Unikalna mieszanina reakcyjna qPCR zawierająca startery regiono-specyficzne (F1 i R1 oraz F2 i R2) oraz inne odczynniki chemiczne w odpowiednich proporcjach i stężeniach (tabela 3)
5. Aparat real-time PCR z możliwością ustawienia optymalnych warunków termicznych qPCR (tabela 4)

RT-qPCR w wariacie oznaczania poziomu ekspresji pri-miRNA-944 oraz GAPDH według wynalazku, prowadzono z wykorzystaniem opisanych wyżej starterów genowo i regiono-specyficznych. W omawianym przykładzie oceniono ekspresję pri-miRNA-944 w osoczu krwi obwodowej u 40 chorych na nowotwory okolicy głowy i szyi o utkaniu płaskonabłonkowym oraz u 40 osób zdrowych. W 8-stanowiskowych probówkach typu strip (pojemność probówek po 0,2 ml; każde stanowisko odpowiada jednej badanej osobie) przygotowano mieszaninę reakcyjną dla RT zgodnie z proporcjami przedstawionymi w tabeli 1. Do przygotowanych mieszanin reakcyjnych dodano startery reakcji RT (starter G1 i G2) oraz wyizolowane wcześniej RNA. Reakcję RT prowadzono w termocyklerze zgodnie z warunkami czasowymi i temperaturowymi przedstawionymi w tabeli 2. W wyniku przeprowadzonej reakcji RT w każdej z probówek uzyskano cDNA sekwencji pri-miRNA-944 oraz GAPDH dla badanych chorych oraz osób zdrowych.

W 96 kołkowej płytce przystosowanej do odpowiedniego aparatu Real-time PCR przygotowano mieszaninę reakcyjną zgodnie z proporcjami przedstawionymi w tabeli 3. W celu lepszego zrozumienia działania wynalazku oraz omówienia przebiegu ostatniego etapu RT-qPCR, tzn. qPCR, opis przykładu oraz interpretację wyników omówiono na wyniku dwóch osób: chorej na raka z wysoką ekspresją pri-miRNA-944 oraz osoby zdrowej z niską ekspresją badanej sekwencji. Dla osoby chorej na raka w dołu nr A1 sporządzono mieszaninę ze starterami regiono-specyficznymi dla pri-miRNA-944 (starter F1 oraz R1), natomiast w dołku nr A2 ze starterami regiono-specyficznymi dla GAPDH (starter F2 oraz R2). Dołki nr A3 i A4 stanowią powtórzenia wspomnianych reakcji. W analogiczny sposób przygotowano mieszaniny reakcyjne dla osoby zdrowej: w dołkach nr B1 i B3 dodano startery dla pri-miRNA-944 (F1 oraz R1), a w dołkach nr B2 i B4 startery dla GAPDH (F2 oraz R2). Przygotowaną płytkę zabezpieczano folią ochronną, umieszczono w aparacie Real-time PCR i zaprogramowano parametry reakcji qPCR (tabela 4). Po zakończeniu qPCR wyniki interpretowano na monitorze komputera podłączonego do aparatu Real-time PCR. Wyznaczone przez oprogramowanie cykle progowe (Ct) reakcji zapisywano w arkuszu programu Microsoft Excel, który wykorzystano również do wyliczenia średnich wartości Ct z dwóch powtarzanych oznaczeń oraz w celu wyznaczenia relatywnej ekspresji pri-miRNA-944 wprowadzając do arkusza kalkulacyjnego uproszczony wzór Pffafli'a. U osoby chorej po uśrednieniu Ct dla pri-miRNA-944 i GAPDH wynosił odpowiednio 28 i 26 cykl qPCR, natomiast dla osoby zdrowej odpowiednio 28 i 22 cykl qPCR (rycina 2 oraz rycina 3). Następnie obliczono ΔCt dla osoby chorej i zdrowej. Wynosiły odpowiednio dla osoby chorej $\Delta Ct_{osoba\ chora} = Ct_{pri-miRNA-944} - Ct_{GAPDH}$ ($\Delta Ct_{osoba\ chora} = 28\text{ cykl} - 26\text{ cykl} = 2\text{ cykle}$) oraz zdrowej $\Delta Ct_{osoba\ zdrowa} = Ct_{pri-miRNA-944} - Ct_{GAPDH}$ ($\Delta Ct_{osoba\ zdrowa} = 28\text{ cykl} - 22\text{ cykl} = 6\text{ cykli}$). Podstawiając uzyskane ΔCt do wzoru Pffafli'a wyliczono ekspresję pri-miRNA-944:

$$\text{Relatywna ekspresja pri-miRNA-944} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\text{Ekspresja pri-miRNA-944}_{osoba\ chora} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-2} = 0,25$$

$$\text{Ekspresja pri-miRNA-944}_{osoba\ zdrowa} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-6} = 0,016$$

Porównując wartość ekspresji pri-miRNA-944 u obu badanych osób ($\text{Ekspresja pri-miRNA-944}_{osoba\ chora} / \text{Ekspresja pri-miRNA-944}_{osoba\ zdrowa}$) można stwierdzić, że ekspresja pri-miRNA-944 jest ok. 15,63 raza większa (0,25/0,016) u osoby chorej na raka w porównaniu do osoby zdrowej.

W badanej grupie 40 chorych na nowotwory głowy i szyi oraz 40 zdrowych ochotników, średnią ekspresję z wszystkich pomiarów pri-miRNA-944 wykorzystano jako wartość progową, tzn. u badanych osób, u których ekspresja badanego pri-miRNA była niższa niż wartość ekspresji dla całej grupy ekspresję uznawano za niską, natomiast u osób z wynikiem powyżej średniej, ekspresję uznawano za wysoką. Następujące wyniki uzyskano dla grupy 40 chorych na raka oraz 40 osób zdrowych:

ekspresja pri-miRNA-944	chorzy (40 osób)	zdrowi (40 osób)
ekspresja wysoka (wynik dodatni)	35 (87,5%)	2 (5%)
ekspresja niska (wynik ujemny)	5 (12,5%)	38 (95%)

Obecność niskiej ekspresji pri-miRNA-944 (wynik ujemny) u osób zdrowych może świadczyć o braku rozwijającego się procesu nowotworowego w obrębie głowy i szyi lub innego raka o utkaniu histologicznym typu płaskonabłonkowego. Natomiast u zdrowych osób z wysoką ekspresją (wynik dodatni) pri-miRNA-944, zalecana jest dalsza diagnostyka, np. w oparciu o badanie obrazowe oraz wywiad i badanie lekarskie mające na celu ustalenie przyczyny nieprawidłowego wyniku badania genetycznego. W przypadku chorych z niską ekspresją (wynik ujemny) pri-miRNA-944, należy ustalić przyczynę uzyskania wyniku ujemnego badania genetycznego - może być to związane, m.in. z wielkością i lokalizacją guza oraz innymi cechami kliniczno-demograficznymi chorych. Obecność produktu qPCR potwierdza prawidłowe przeprowadzenie reakcji RT ze starterami genowo-specyficznymi oraz odpowiednio skonstruowane startery regiono-specyficzne dla badanych sekwencji. Metoda oceniająca ekspresję pri-miRNA-944 z wykorzystaniem opisanych starterów genowo i regiono-specyficznych charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością diagnostyczną, odpowiednio 87,5% i 95%.

T a b e l a 1. Stężenia i objętości odczynników stosowanych podczas reakcji odwrotnej transkrypcji (RT) dla oznaczania ekspresji pri-miRNA-944 oraz GAPDH (pierwszy etap reakcji RT-qPCR)

Skład mieszaniny reakcyjnej RT	ilość
Bufor RT (10x)	3 μ l
Mieszanina nukleotydów (25x) (100 mmol)	0,8 μ l
Enzym odwrotna transkryptaza – MultiScribe (50 U/ μ l)	1 μ l
Inhibitor RNAz (20 U/ μ l)	1 μ l
Starter RT (G1) dla pri-miRNA-944 (100 pmol/ μ l)	1 μ l
Starter RT (G2) dla GAPDH (100 pmol/ μ l)	1 μ l
woda wolna od nukleaz	4,2 μ l
Badane mRNA (>1ng/ μ l)	8 μ l
Razem	20 μl

T a b e l a 2. Warunki temperaturowe prowadzenia reakcji RT w wariantcie przystosowanym do oznaczania ekspresji pri-miRNA-944 oraz GAPDH

Etap reakcji RT		Temperatura	Czas
I	Przyłączenie starterów genowo-specyficznych oraz przepisanie RNA na cDNA	37°C	60 minut
II		95°C	5 minut
III	Chłodzenie próbki	4°C	(do momentu schłodzenia)

T a b e l a 3. Stężenia i objętości odczynników stosowanych podczas reakcji qPCR dla oznaczania ekspresji pri-miRNA-944 oraz GAPDH (drugi etap reakcji RT-qPCR)

Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR	ilość
Mix PCR z barwnikiem SYBR Green	13 μ l
Starter F1 dla pri-miRNA-944 lub F2 dla GAPDH	0,8 μ l
Starter R1 dla pri-miRNA-944 lub R2 dla GAPDH	0,8 μ l
woda wolna od nukleaz	1,4 μ l
Badane cDNA (>1ng/ μ l)	4 μ l
Razem	20 μl

T a b e l a 4. Warunki temperaturowe prowadzenia qPCR w wariantcie przystosowanym do oznaczania ekspresji pri-miRNA-944 oraz GAPDH

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli reakcji
Aktywacja polimerazy DNA oraz wstępna denaturacja DNA	95°C	30 sekund	1
Właściwa denaturacja DNA	95 °C	10 sekund	40
Przyłączanie starterów regiono-specyficznych	60 °C	45 sekund	

Rysunek przedstawia na Fig. 1 reprezentatywny przykład przygotowania płytki reakcyjnej dla qPCR w celu oznaczenia ekspresji pri-miRNA-944 oraz kontroli (GAPDH) w pojedynczej próbce cDNA (jedna osoba badana). W dołkach płytki oznaczonych A1–A4 znajduje się mieszanina reakcyjna dla przeprowadzenia qPCR, do dołków A1 i A3 dodano startery F1 i R1 (dla pri-miRNA-944), natomiast do dołków- A2 i A4 startery F2 i R2 (dla GAPDH). Sekwencję badaną (pri-miRNA-944) oraz kontrolną

(GAPDH) oznacza się w dwóch powtórzeniach, odpowiednio pary A1 i A3 oraz A2 i A4. Wynik ekspresji uzyskany w badanych dołkach zostaje matematycznie uśredniony.

Fig. 2 obejmuje przykładowy wynik reakcji qPCR (drugi etap RT-qPCR), a mianowicie wynik chorożo na nowotwór złośliwy okolicy głowy i szyi – obecność wysokiej ekspresji pri-miRNA-944 we krwi obwodowej (wynik dodatni). Na rycinie widoczne są krzywe obrazujące obecność amplifikacji produktu qPCR przy użyciu starterów regiono-specyficznych dla pri-miRNA-944 oraz kontroli reakcji – GAPDH. Zaznaczono również cykle progowe (Ct) dla obu badanych sekwencji, kiedy produkt reakcji qPCR narasta wykładniczo. W celu obliczenia ΔCt od Ct pri-miRNA-944 odejmuje się Ct GAPDH, w tym przypadku różnica wynosi 2 cykle.

Fig. 3 pokazuje przykładowy wynik reakcji qPCR (drugi etap RT-qPCR), a mianowicie wynik osoby zdrowej – obecność niskiej ekspresji pri-miRNA-944 we krwi obwodowej (wynik ujemny). Na rycinie widoczne są krzywe obrazujące obecność amplifikacji produktu qPCR przy użyciu starterów regiono-specyficznych dla pri-miRNA-944 oraz kontroli reakcji – GAPDH. Zaznaczono również cykle progowe (Ct) dla obu badanych sekwencji, kiedy produkt reakcji qPCR narasta wykładniczo. W celu obliczenia ΔCt od Ct pri-miRNA-944 odejmuje się Ct GAPDH, w tym przypadku różnica wynosi 6 cykli.

Wykaz sekwencji nukleotydowych:

a) startery genowo-specyficzne (służące przepisaniu sekwencji RNA pri-miRNA-944 oraz GAPDH na komplementarne dla nich DNA - cDNA) wykorzystywane w pierwszym etapie RT-qPCR:

1. starter genowo-specyficzny (G1) dla RNA pri-miRNA-944:

5'- ATGGGAGACACAGC - 3'

2. starter genowo-specyficzny (G2) dla RNA GAPDH:

5'- GGACTGAGATTGGC - 3'

b) startery regiono-specyficzne (służące amplifikacji cDNA pri-miRNA-944 oraz GAPDH wykorzystywane w drugim etapie RT-qPCR:

1. starter sensowny (F1) dla cDNA pri-miRNA-944:

5'- GTTCCAGACACATCTCATCTGATA - 3'

2. Starter antysensowny (R1) dla cDNA pri-miRNA-944:

5'- TCCCAGACACAGCTCATCCG - 3'

3. Starter sensowny (F2) dla cDNA GAPDH:

5'- CCATCTCAGTCGTTCCCAAAGT - 3'

4. Starter antysensowny (R2) dla cDNA GAPDH:

5'- AGGTGATCGGTGCTGTTCC-3'

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób przepisywania sekwencji RNA oraz amplifikacji cDNA w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) za pomocą starterów genowo i regiono-specyficznych dla prekursora miRNA-944, **znamienny tym**, że stosuje się startery genowo-specyficzne (służące przepisaniu sekwencji RNA pri-miRNA-944 oraz GAPDH na komplementarne dla nich DNA-cDNA) posiadające sekwencje nukleotydowe przedstawione w załączniku, wykorzystywane w pierwszym etapie RT-qPCR oraz startery regiono-specyficzne (służące amplifikacji cDNA, pri-miRNA-944 oraz GAPDH) wykorzystywane w drugim etapie RT-qPCR zawierające sekwencje nukleotydowe przedstawione w załączniku.

Rysunki

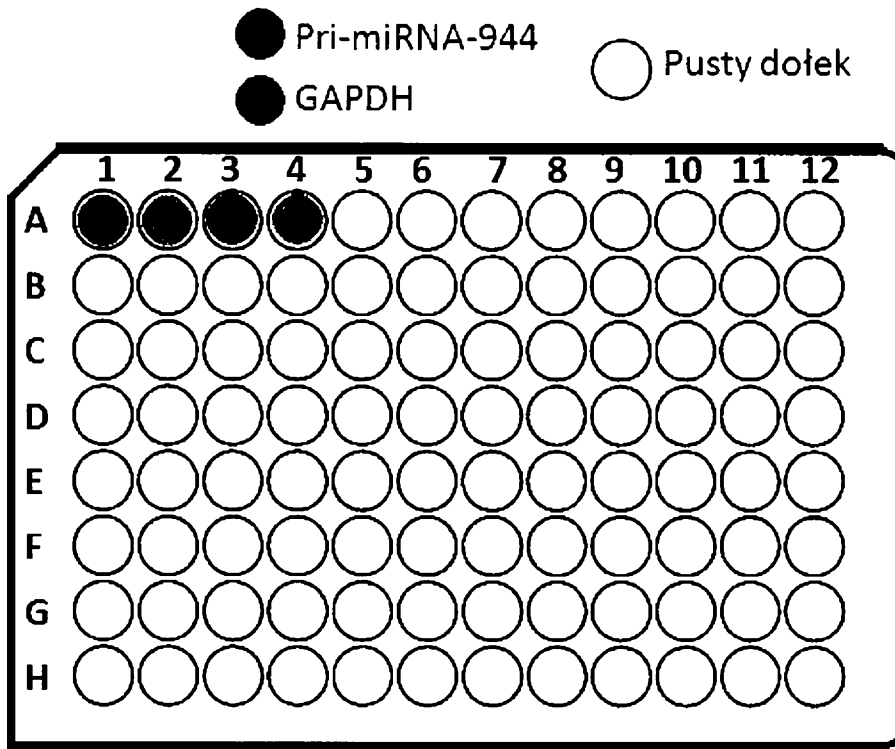


Fig.1

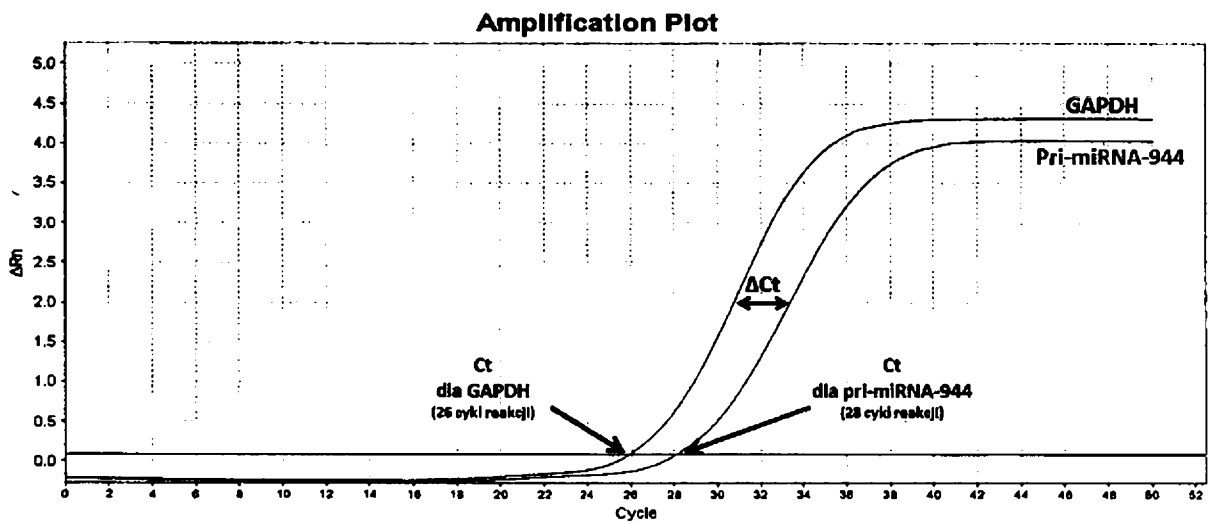


Fig.2

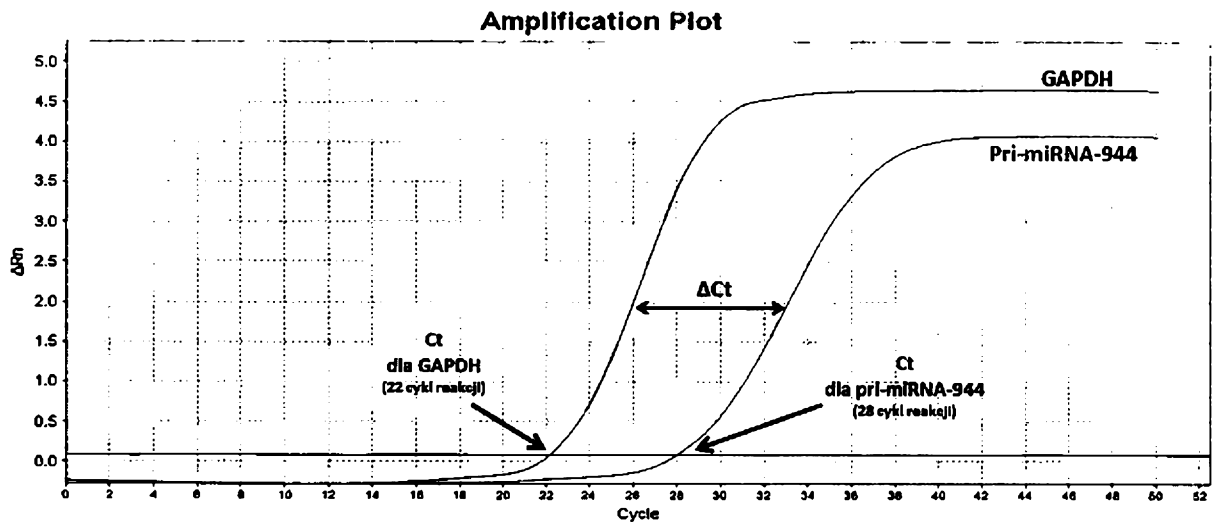


Fig.3