

DIAGEN Biyoteknoloji



mRNA Gen Ekspresyon Analizi

Proje Plan Özeti

- mRNA gen ekspresyon çalışması için gelen A sayıda sağlıklı, B sayıda hasta bireylerde X geni için Y sayıdaki numunenin real time PCR analizleri yapılmıştır. Deney uygulamalarında uygun housekeeping gen normalizatör olarak kullanılmıştır.
- Analiz gurupları içerisinde tüm grupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001) metodu kullanılmıştır. Hasta grubu baz alınarak kontrol grubunun kat değişimi (Fold change, FC) hesaplanmıştır.
- Analiz gurupları için istatistik analizler;
 - A grubu
 - B grubu

Normal dağılımları onaylanan grupların kıyaslaması için Student t-test uygulanarak grup kıyaslamaları çıkarılmıştır.

- A-B grup kıyaslaması

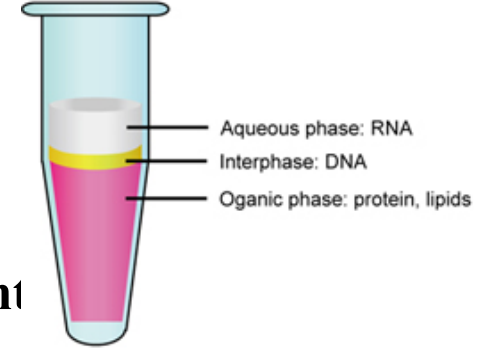
Son olarak çoklu grup kıyaslamalarının birlikte değerlendirilmesi için ANOVA testi uygulanmıştır.



Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

1- Total RNA Ekstraksiyon

Yüksek kalitede Total RNA ekstraksiyonu sağlamak için TRIzol Reagent kullanılmaktadır. Trizol Reagent kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri faz ayrımı ve bir dizi nükleik asit çöktürme yöntemine dayanmaktadır.



2- Nükleik Asitlerin spofotometrik Ölçümleri(nano gram değerleri) ve konsant belirlenmesi

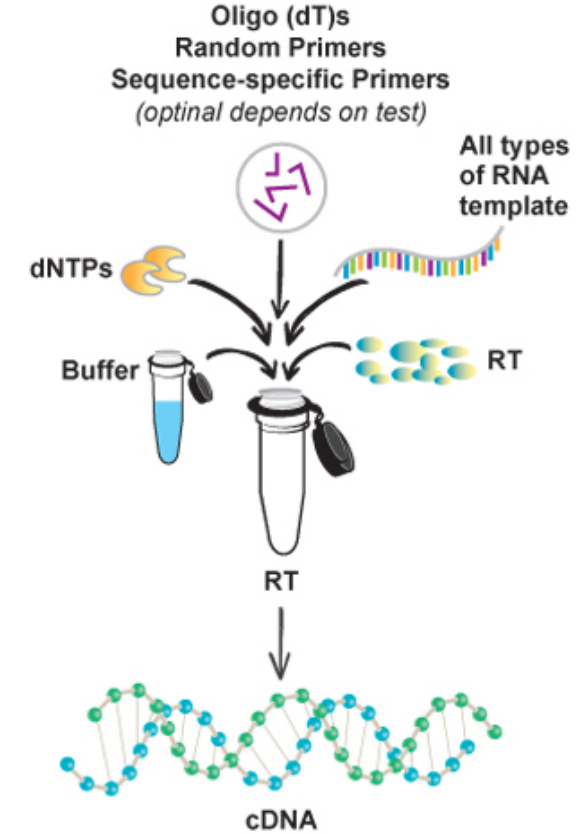
Total RNA ekstraksiyon işleminden elde edilen numunelere ait nükleik asit yükleri (ng değerleri) çalışmanın sonraki basamaklarda kullanılmak üzere belirli bir ng değerine sabitlenir. Bu işlem qPCR aşamasında tutarsız sonuçların önüne geçilebilmesi için önem arz etmektedir.



Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

4- Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi

mRNA gen ekspresyonu çalışmalarında pre-mRNA ve mature-mRNA yapılarının tespiti için Oligo(dT) ve Random Hexamer primerleri ile Revers Transkriptaz işlemi yapılmaktadır. Bu primerler mRNA zincirini uzatarak bir yapıyı kararlı hale getirmektedir. Daha sonra Reverse Transkriptaz enzimi mRNA dizisinin karşı kopyasını sentezler. Elde edilen cDNA, standart PCR için bir şablon olarak kullanılabilir.

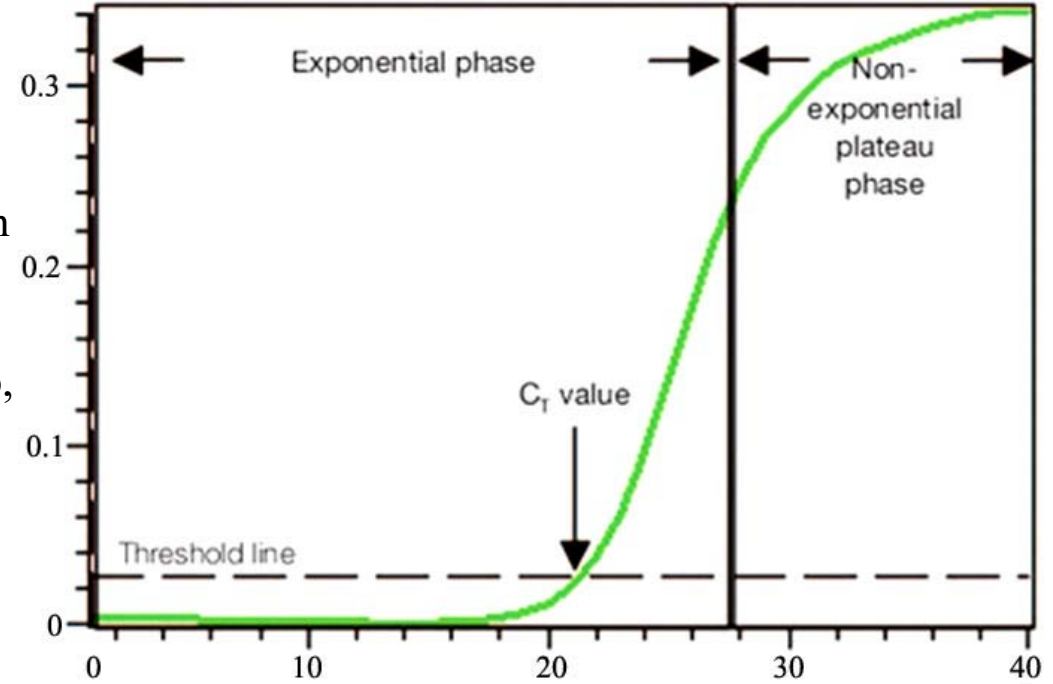


Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

5- qPCR mRNA Gen Ekspresyon Analizleri

Son aşamada mRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, relative ekspresyon analizlerinde kullanılır. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin herbiri için, ilgili mRNA ve ona uygun referans genine ait dizilerin real time PCR cihazı ile çoğaltılması sağlanır. İşlem sonucunda cihazdan alınan veriler $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ metodu ile değerlendirilir. 40 döngü üzerinden yapılan çalışmalarda florasan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) noktadan alınan eşik değeri (Ct, Cp, Cq) hesaplamalarda kullanılır.

Gen Ekspresyon metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak metod)		
Grup	Hedef Gen	Referans Gen
Hasta örnek	A	A*
Control örnek	B	B*
$2^{-[(\Delta Ct(A) - \Delta Ct(A*)) - (\Delta Ct(B) - \Delta Ct(B*))]}$		
"*" Gen ekspresyon çalışmasında standardizasyon için kullanılan referans gen sonucu		



Nükleik Asit Ekstraksiyon İşlemi

1. *Rattus norvegicus* türüne ait karaciğer numunelerinden 50-100 mg doku mikrosantrifuj tüplere aktarılarak içerisine 1 ml TRIzol reagent solüsyonu ve manyetik boncuk ilave edilmiştir.
2. Doku Süspansiyonları FP120 FASTPREP (Thermo,USA) homojenizatör cihazında 4.0 hızda 20 sn parçalanmıştır.
3. Liziz ve faz ayrımı işlemlerini gerçekleştirmek üzere süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
4. Hazırlanan lizat 12000 G hızda 10 dk +4 ° C'de 5 dakika santrifüj uygulanarak temiz süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
5. Süspansiyona 200 µl kloroform eklenerek, dikkatlice karıştırılmıştır.
6. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk +4 °C sıcaklıkta santrifüj işlemi uygulanmıştır.
7. Farklı bir mikrosantrifüj tüpe aktarılan süpernatant içerisine 0,5 ml isopropanol eklenerek dikkatlice karıştırılmıştır.
8. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifüj işlemi uygulanmıştır.
9. Süpernatant kısmı atılarak oluşan nükleik asit pelleti 1 ml %75 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta tekrar santrifüj yapılarak yıkanmıştır.
10. Üst faz mikrosantrifüj tüpünden uzaklaştırılarak, RNA pelleti kuruyana kadar (15-30 dk) oda sıcaklığında bekletilmiştir.
11. 300 µl nükleaz-free elution bufer eklenerek pellet süspansiyon edilerek, numunelere ait total RNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmektedir.



Nükleik Asit Miktar Tayini ve DNase işlemi

- **Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak** Numunelerin RNA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin aşamaları;

1. Cihaz çalıştırıldıktan sonra nükleik asit sekmesi seçilerek, örnek tipi RNA-40, ışık yolu uzunluğu otomatik olacak şekilde parametreler ayarlanmalıdır.
2. Cihaz kapağı açıldıktan sonra elüsyon bufferdan 2 µl eklenerek körleme işlemi yapılır.
3. Numunelerden sırasıyla 2 µl alınıp ölçüm seçeneği kullanılarak RNA ölçme işlemi tamamlanmaktadır.

- **Serum numunelerine ait nükleik asit çözeltilerinin;**

1. RNA konsantrasyonları 1 µg/ 10 µl olacak şekilde ayarlanır.
2. DNase I enzim (Arcticzymes, Norveç) protokolüne göre; 0,5 µg/ 5 µl total RNA üzerine 1 µl DNase I buffer eklenerek 5 µl tamamlayacak şekilde nükleaz free su eklenir.
3. Süspansiyon 37 °C sıcaklıkta 30 dk inkübasyon işlemi gerçekleştirilir.
4. İnkübasyon işlemi sonucunda 1 µl EDTA ilave edilerek 65 °C sıcaklıkta 10 dk süre ile DNase I enzimi inaktive edilerek, cDNA işlemine hazır hale getirilmiştir.



Sensifat (Bioline) cDNA Kit Reverse Transcriptase İşlemi

1. Buz üzerinde steril tüp içerisinde aşağıdaki bileşenler hazırlanmalıdır.
2. Kısa bir vorteks ve spin yapılır.
3. Revers transkripsiyon işlemi için ABI Veriti 96 cihazı kullanılmaktadır. Cihaz Revers Transkripsiyon işlemi için protokol hazırlanmaktadır.
 - 25 °C 10 dk primer bağlaması
 - 42 °C 15 dk reverse transkripsiyon işlemi
 - 85 °C 5 dk enzim inaktivasyonu
4. Reaksiyon sonunda enzim, 85 °C'de 5 dk 'da inaktive edilerek, cDNA ürünleri -20 °C'de uzun süre muhafaza edilmiştir.

Komponentler	Miktar
Total RNA	Değişken
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µl 'ye tamamla



SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit MRNA Gen Ekspresyonu

1. Soğuk blok üzerinde aşağıdaki tabloya göre bileşenler hazırlanmalıdır.

Komponentler	Derişim	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	2x Mastermix (1,5) buffer	10 µl
mRNA MixB (Primer)	F & R	3,5 µl
mRNA cDNA	10-50 ng	3 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	3,5 µl

1. Thermocycler prosedürü aşağıdaki tabloya göre ayarlanmalıdır.

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C-5 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C-5 sn	40
	Bağlanma	60°C - 30 sn (Okuma)	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

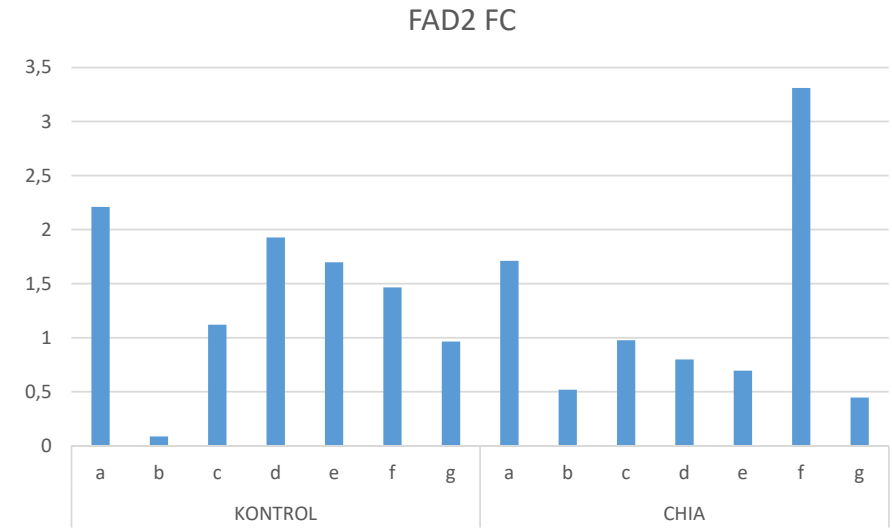
2. PCR ürünlerine ait pikler incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.



Numune Bilgileri Ve qPCR Ct Mean Sonuçları



Gruplar	Numune üzerinde yazan isim	Diagen Numune kodu	FAD2 Ct-1	FAD2 Ct-2	FAD2 Ct Mean	ACTB Ct-1	ACTB Ct-2	ACTP Ct Mean	FAD2 dCt	FAD2 ddCt	FAD2 FC
A Grubu	a	1	31,79	32,38	32,08	24,25	24,28	24,27	7,81	-1,14	2,21
	b	2	37,15	Und.	37,15	24,62	24,73	24,67	12,48	3,52	0,08
	c	3	32,89	32,94	32,92	24,73	23,51	24,12	8,79	-0,16	1,12
	d	4	32,07	33,85	32,96	24,98	24,92	24,95	8,01	-0,94	1,92
	e	5	33,29	31,88	32,58	24,50	24,28	24,39	8,19	-0,76	1,69
	f	6	34,43	32,47	33,45	25,09	25,00	25,04	8,40	-0,55	1,46
	g	1A	30,42	30,31	30,36	21,33	21,38	21,36	9,00	0,05	0,96
B Grubu	a	7	32,98	32,62	32,80	24,47	24,77	24,62	8,18	-0,77	1,71
	b	8	32,23	32,36	32,29	23,42	21,36	22,39	9,90	0,94	0,51
	c	9	31,85	32,72	32,28	23,44	23,14	23,29	8,99	0,03	0,97
	d	10	31,85	31,19	31,52	22,41	22,07	22,24	9,28	0,32	0,79
	e	11	30,70	30,85	30,78	21,34	21,25	21,29	9,48	0,52	0,69
	f	12	30,54	30,38	30,46	23,31	23,15	23,23	7,23	-1,72	3,31
	g	2A	29,93	30,71	30,32	20,23	20,17	20,20	10,11	1,16	0,44



Grup İçi İstatistiksel Analizler



Descriptives

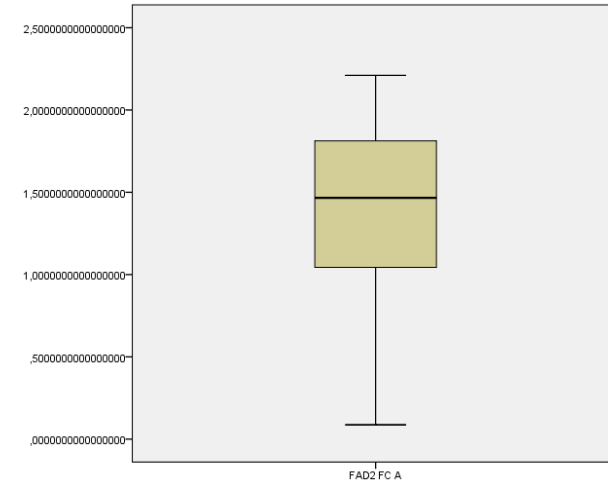
		Statistic	Std. Error
FAD2 FC A	Mean	1,35377036371	,267397332144
		5679	690
	95% Lower Bound	,699472662726	
	Confidence Interval for	317	
	Upper Bound	2,00806806470	
	Mean	5041	
	5% Trimmed Mean	1,37655941353	
		4584	
	Median	1,46615958569	
		0180	
	Variance	,501	
	Std. Deviation	,707466842096	
		987	
	Minimum	,087040407173	
		4961	
	Maximum	2,21029742351	
		75760	
	Range	2,12325701634	
		40796	
	Interquartile Range	,961612713766	
	3352		
Skewness	-,820	,794	
Kurtosis	,675	1,587	

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
FAD2 FC A	7	22,6%	24	77,4%	31	100,0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FAD2 FC A	,149	7	,200*	,958	7	,798



Grup İçi İstatistiksel Analizler



Descriptives

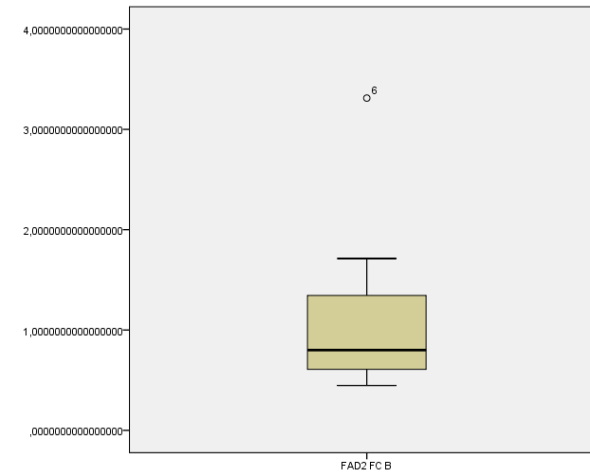
		Statistic	Std. Error
FAD2 FC B	Mean	1,20910259921	,384713780353
		1588	015
	95% Lower Bound	,267741890767	
	Confidence Interval for	052	
	Upper Bound	2,15046330765	
	Mean	6124	
	5% Trimmed Mean	1,13460077426	
		1831	
	Median	,799933484963	
		053	
	Variance	1,036	
	Std. Deviation	1,01785698875	
		3605	
	Minimum	,447333096968	
		7072	
	Maximum	3,31190495055	
		00880	
Range	2,86457185358		
	13810		
Interquartile Range	1,19367493760		
	22322		
Skewness	1,867	,794	
Kurtosis	3,417	1,587	

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
FAD2 FC B	7	22,6%	24	77,4%	31	100,0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FAD2 FC B	,304	7	,049	,769	7	,020



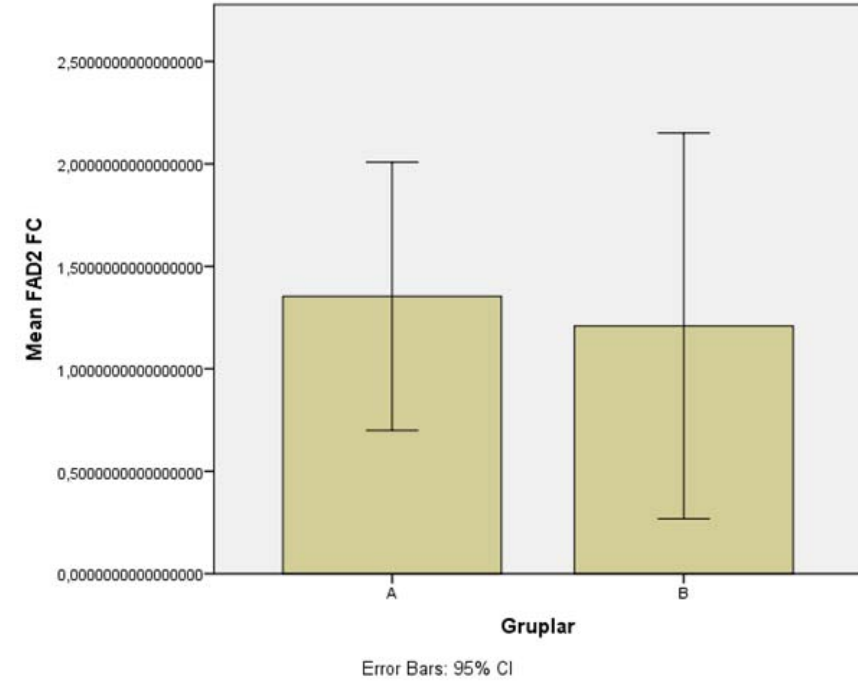
Gruplar Arası İstatistiksel Analizler

Group Statistics

Gruplar	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	
FAD2 FC	A	7	1,353770363715679	,707466842096987	,267397332144690
	B	7	1,209102599211588	1,017856988753605	,384713780353015

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means			
		95% Confidence Interval of the Difference			
		Lower	Upper		
FAD2 FC	Equal variances assumed	-,876138079197623	1,165473608205805		
	Equal variances not assumed	-,890061609333325	1,179397138341507		
		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	
FAD2 FC	Equal variances assumed	,763	,144667764504091	,468514702044243	
	Equal variances not assumed	,763	,144667764504091	,468514702044243	
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
FAD2 FC	Equal variances assumed	,537	,478	,309	12
	Equal variances not assumed			,309	10,700



Ekler

RT-qPCR: Kantitatif eş zamanlı PCR işlemi, hücre hatları içindeki her bir hücrede ifade edilen gen ekspresyon düzeylerinin belirlemek amacıyla kullanılan hassas bir yöntemdir.

Melting Curve Eğrisi: DNA zincirinin ayrılma özelliğinden faydalanarak çift iplik yapının denatüre olduğu sıcaklığın tespit edilmesini sağlayan RT-qPCR erime erisi analizidir.

Ct (Cp-Cq): real time PCR cihazlarında amplikasyon döngüleri sırasında alınan florosan ışımaya ait threshold çizgisi üzerinde bulunan eşik değeri.

dCt (Δ Ct): Ekspresyon seviyesini belirlemek istediğimiz genin Ct değeri ile normalizatör genin Ct değerinin farkı

ddCt ($\Delta\Delta$ Ct): Ekspresyon seviyesi hesaplanmak istenilen genin gruplar arasında ki farkı

2^{ΔΔCt} (2^{ΔΔCt}): Ekspresyon seviyesi belirlenmek istenilen genin gruplar arasında ki katsayı (FC) değeri, gen ekspresyon çalışmalarında katsayı değişimi verileri kullanılmaktadır.

İstatiksel Analiz;

Çalışmanın istatiksel analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. RT-qPCR analizleri ile elde edilen NPY ve AGRP genlerinin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasıyla elde edilen verilerin değerlerin sonuçları grup ortalamalarına karşı test edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde özetlenmiştir. Grup analizlerinin normal dağılımı sağlamasından dolayı kıyaslamalar için t-test ve ANOVO kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için Post-Hoc çoklu karşılaştırma testi Tukey kullanılmıştır.

Log transformasyon hakkında;

Cihaz kayıtları sonrasında normalizasyon işlemi (livak metod) gerçekleştirilen verilerin aşırı düşük veya yüksek ifadeli gen ekspresyon katasyıları vermeleri istatistik analizlerde veri dağılımlarını etkilemektedir. Normalize edilmiş nispi gen ekspresyon seviyelerinin logaritmik transformasyonları gerçekleştirilerek aşırı ve düşük ifadeli gen ekspresyon seviyelerine eşit ağırlık atfederek veri dağılımları daha simetrik hale getirilmiştir. Böylelikle aykırı değerlerin etkisibüyük ölçüde ortadan kaldırılarak daha sade bir hal alması sağlanmıştır(1).

Referance

1. Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. Anal Biochem 2008;379:127–9.
2. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. methods, 25(4), 402-408.

