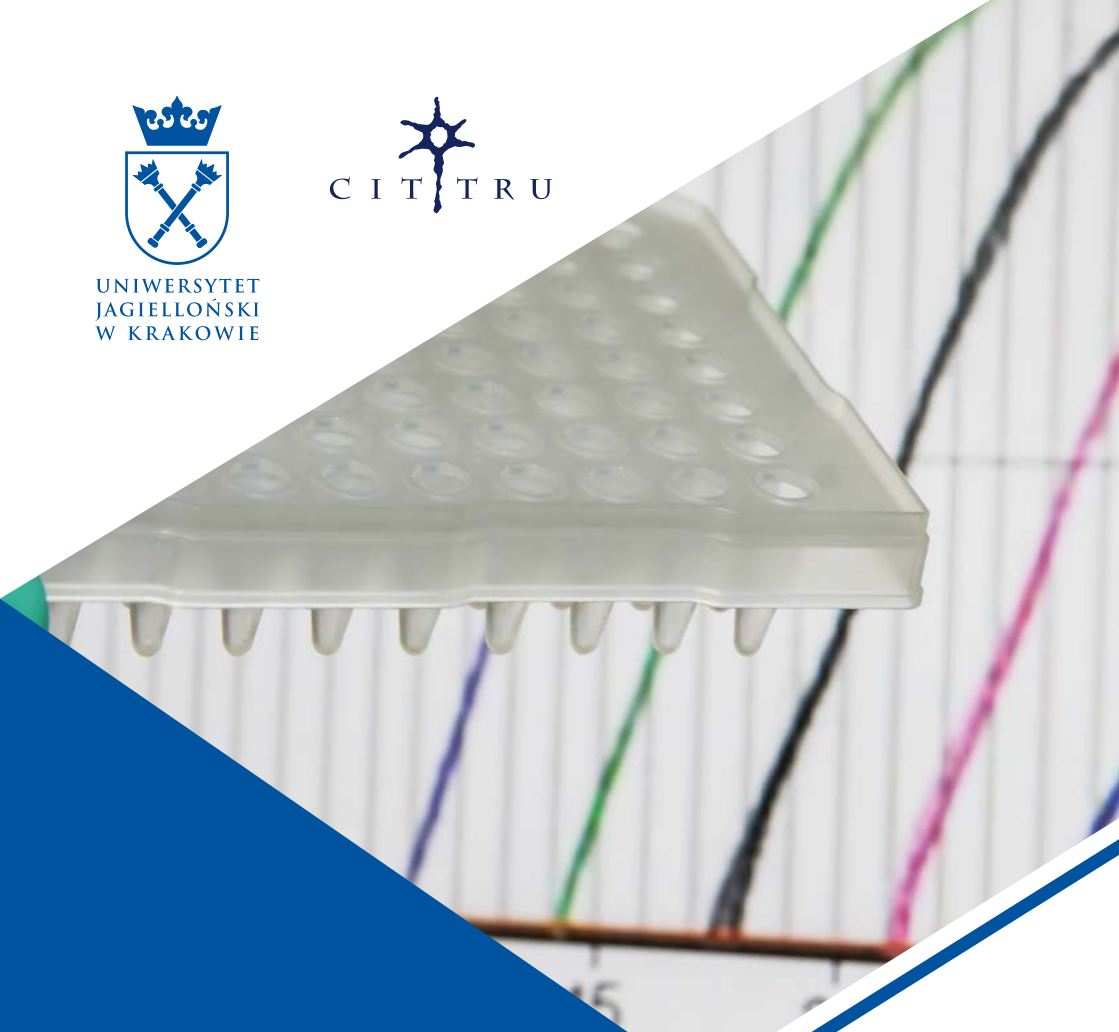




UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE



Analiza danych i wizualizacja wyników z metody **RT-qPCR**

Program komputerowy do analizy danych
i wizualizacji wyników z metody RT-qPCR



Analiza danych i wizualizacja wyników z metody RT-qPCR

1

Metoda qPCR – wyzwania i ograniczenia

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real time quantitative polymerase chain reaction, qPCR*) to metoda analityczna szeroko stosowana zarówno w badaniach naukowych, jak i w diagnostyce. W tej metodzie poziom ekspresji badanych genów jest analizowany w odniesieniu do genu/genów referencyjnych, czyli takich, których poziom powinien być **stały** niezależnie od czynników środowiskowych, jakim podlega komórka, lub od jej stanu fizjologicznego. Istotnym wyzwaniem, a jednocześnie pewnym ograniczeniem metody qPCR jest właściwy wybór genów referencyjnych. Ich dobór arbitralny, dokonany np. jedynie na podstawie literatury, może skutkować błędnym wyznaczeniem poziomu ekspresji genów badanych, a co za tym idzie – błędną interpretacją wyników. Z kolei stosowanie ogólnie dostępnych programów komputerowych do wyboru referencji, takich jak np. geNorm, NormFinder czy BestKeeper, prowadzi do uzyskania różnych wyników, co jest związane z ograniczeniami, jakie mają te algorytmy.

2

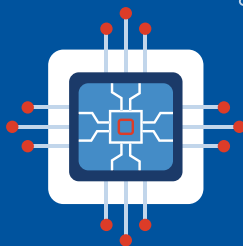
Nowe narzędzie wsparciem badań

Próbując rozwiązać ten problem, zespół naukowy z Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego opracował innowacyjny sposób **analizy danych z metody RT-qPCR**. W tej metodzie analiza jest prowadzona wieloetapowo. W opracowanym narzędziu stosuje się **rozbiecie grupy analizowanych próbek** (model eksperymentalny) na szereg podmodeli składających się z mniejszej liczby próbek (minimalnie z dwóch), **a następnie wytypowanie w każdym z tych modeli najlepszego genu referencyjnego z grupy analizowanych** w danym eksperymencie potencjalnych genów referencyjnych, z wykorzystaniem znanego algorytmu Norm-Finder. Wytypowany w ten sposób gen lub para genów będących najlepszą referencją w danym modelu stanowi następnie podstawę do obliczenia ekspresji względnej genów badanych w poszczególnych modelach i przeprowadzenia validacji spójności otrzymanych wyników.

Oferta współpracy przy wdrażaniu wynalazku

Opisywane rozwiązanie jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. Prace nad dalszym rozwojem technologii prowadzi Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Centrum Transferu Technologii CITTRU UJ **poszukuje podmiotów zainteresowanych współpracą przy wdrażaniu tego wynalazku.**



Program pozwala na określenie rzeczywistego poziomu ekspresji genów badanych i prawidłową interpretację biologiczną wyników.

3

Wartość współczynnika spójności

W ramach każdego z modeli prowadzone są analizy statystyczne bazujące na odpowiednio dobranych testach, pokazujące istotności statystyczne różnic w ekspresji genu badanego w obrębie danego modelu. Kolejnym etapem jest **porównanie spójności otrzymanych wyników/wartości i ich statystycznej istotności dla danego genu badanego** w obrębie wszystkich badanych modeli. Przygotowany przez zespół naukowy Uniwersytetu Jagiellońskiego program wyznacza tzw. *coherence score* (współczynnik spójności) opisujący poziom spójności otrzymanych wyników. Osiągnięcie niezadowolającej wartości tego współczynnika – poniżej akceptowalnej przez badacza – prowadzi do kolejnego etapu analizy, tj. ponownego wyboru genów referencyjnych we wszystkich badanych modelach, ale odbywa się on po uprzednim usunięciu z listy potencjalnych genów referencyjnych tego, który na poprzednim etapie uzyskał najniższy poziom stabilności (czyli np. z grupy wyjściowych n genów referencyjnych usuwany jest ten o najniższym wyniku stabilności i następnie właściwy gen referencyjny jest wybierany spośród pozostałych $n-1$ potencjalnych genów referencyjnych).

4

Jednoczesna i niezależna analiza wielu genów badanych

Nowe rozwiązanie łączy w sobie funkcjonalności programów wyznaczających najlepsze geny referencyjne oraz programów typu arkusze kalkulacyjne, które pozwalają na **analizę poziomu ekspresji genu badanego, analizę statystyczną i interpretację graficzną wyników**. Jego istotnymi elementami są zaimplementowanie określonego schematu analizy danych RT-qPCR (usuwanie genów o najniższej stabilności z następującą po tym analizą danych surowych) oraz wprowadzenie wartości współczynnika spójności określającego rzetelność/wiarygodność przeprowadzonej analizy. Usprawnieniem całości procesu jest też automatyczne generowanie tabel oraz wykresów pudełkowych prezentujących otrzymane wyniki analizy, włącznie z zaznaczonymi na wykresie istotnościami statystycznymi między badanymi elementami danego modelu (ryc. 1). Program umożliwia jednoczesną i niezależną analizę wielu genów badanych.

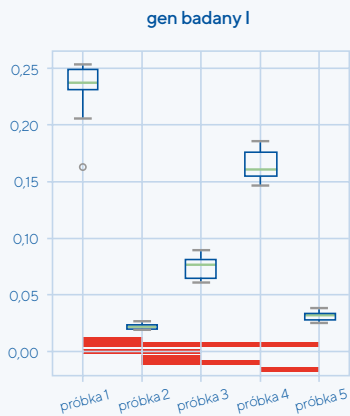


Ryc. 1. Przykładowy wynik analizy.

A

wartość stabilności wytypowanego genu referencyjnego w modelu eksperymentalnym:

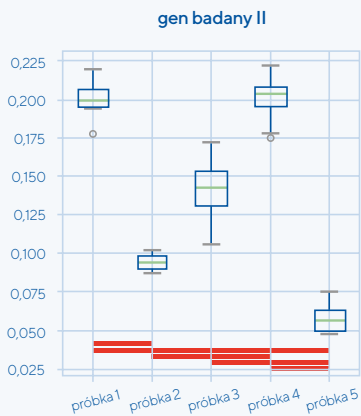
0,196718



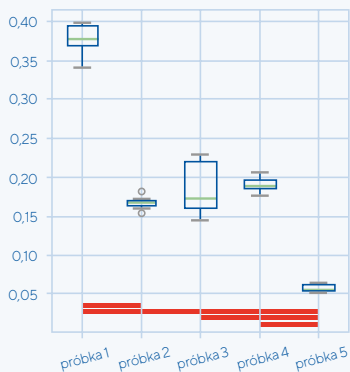
B

zakres wartości stabilności wytypowanych genów referencyjnych w modelach pomocniczych:

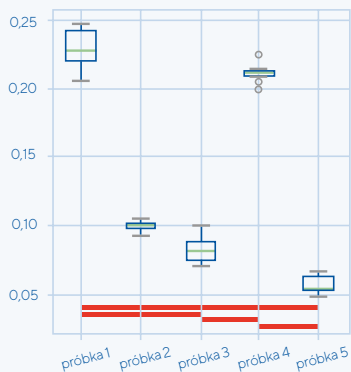
0,012949–0,227386



gen badany III



gen badany IV



Szczegółowych
informacji udziela:

dr Renata Bartoszewicz
Broker technologii

tel. 12 664 42 08, 515 493 518

e-mail: renata.bartoszewicz@uj.edu.pl

Centrum Transferu Technologii CITTRU
Uniwersytet Jagielloński

