

Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Michał Koper, IGiB UW

Odkrycie odwrotnej transkryptazy



Nagroda Nobla z Medycyny i Fizjologii 1975



Howard
M. Temin

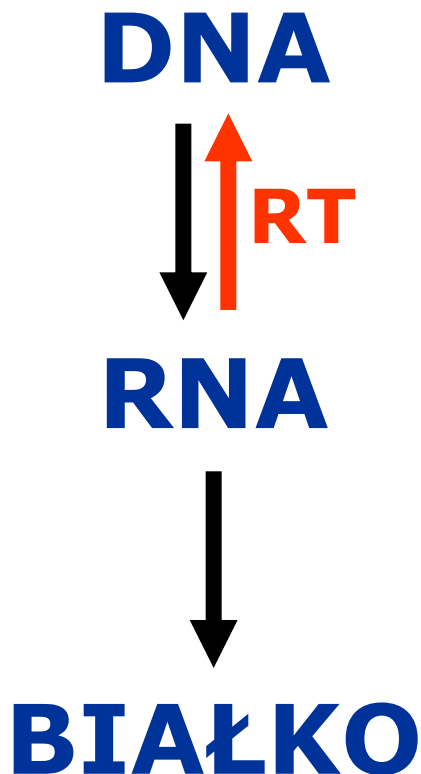


David
Baltimore



Renato
Dulbecco

(wirusy onkogenne)



**RNA ZALEŻNA
POLIMERAZA DNA**

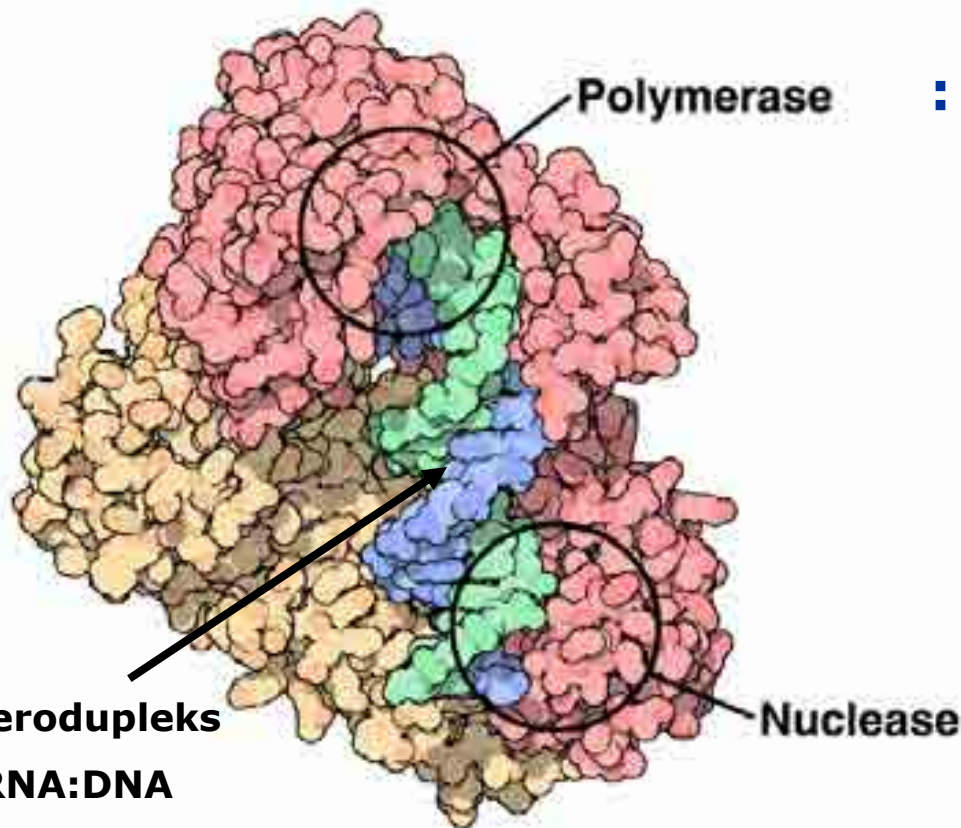
Temin, H. M., and S. Mizutani. 1970. **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.** Nature 226: 12 1 | 2 13.

Odwrotna transkryptaza: 2 enzymy w 1

HIV-1 RT

(heterodimer)

**: aktywność RNA zależnej
polimerazy DNA**
(i DNA zależnej Pol DNA)



: aktywność RNazyH

Ding J. i wsp., 1998, J. Mol. Biol. 284; 1095-1111

RT wymaga startera do rozpoczęcia syntezy DNA

**startery
genowo-specyficzne**



**startery oligodT,
mogą być „kotwiczone”
tzn. TTTTTTTTTT(A/C/G)**



**krótkie startery losowe
np. heksamery, oktamery**



Zastosowania odwrotnej transkrypcji

OZNACZENIA JAKOŚCIOWE:

- poznawanie struktury genów (introny)
- wyznaczanie 5' końców RNA
- analiza budowy 3' końców
- wykrywanie ekspresji konstruktów

OZNACZENIA ILOŚCIOWE:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR

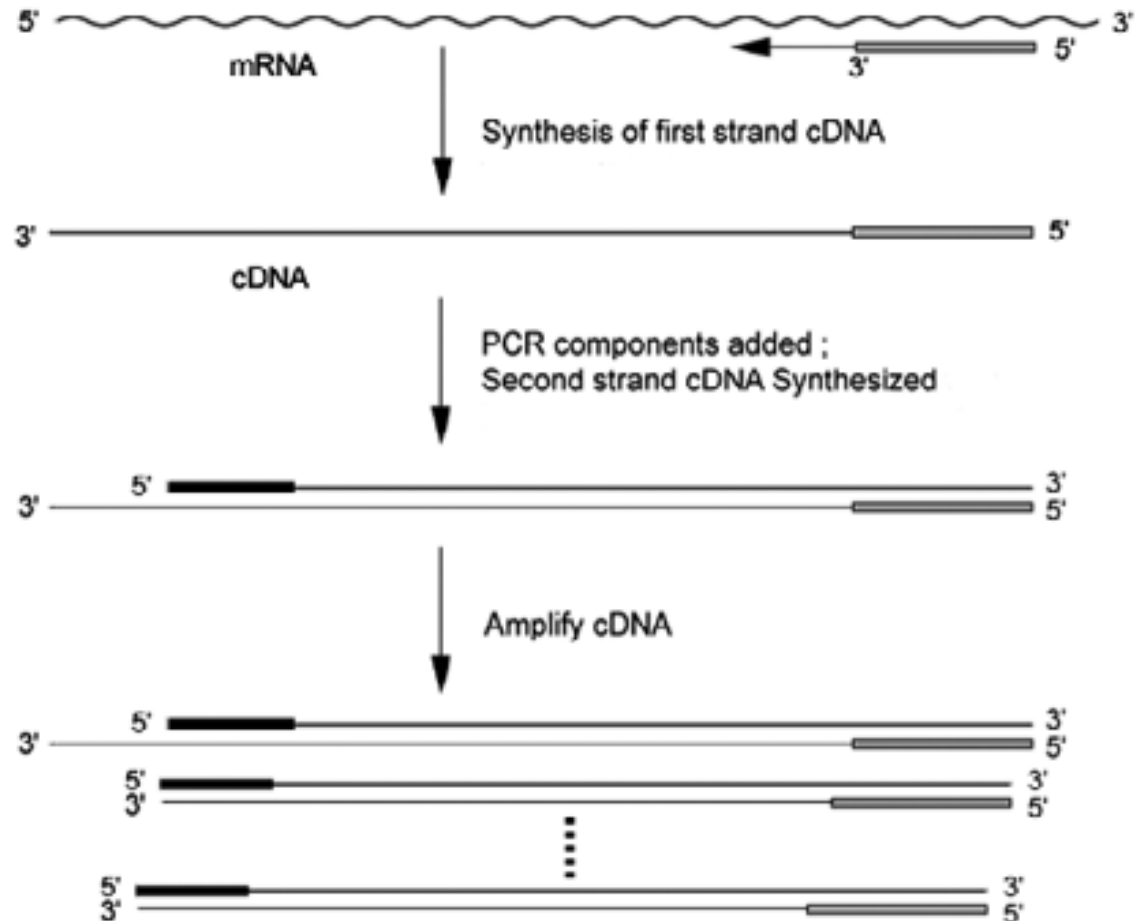
Sekwencjonowanie transkryptomów

Zastosowania odwrotnej transkrypcji

RT-PCR

Oznaczenia ilościowe:

- semiq RT-PCR
- RT-qPCR



Aktywność RNazy H RT dzikiego typu

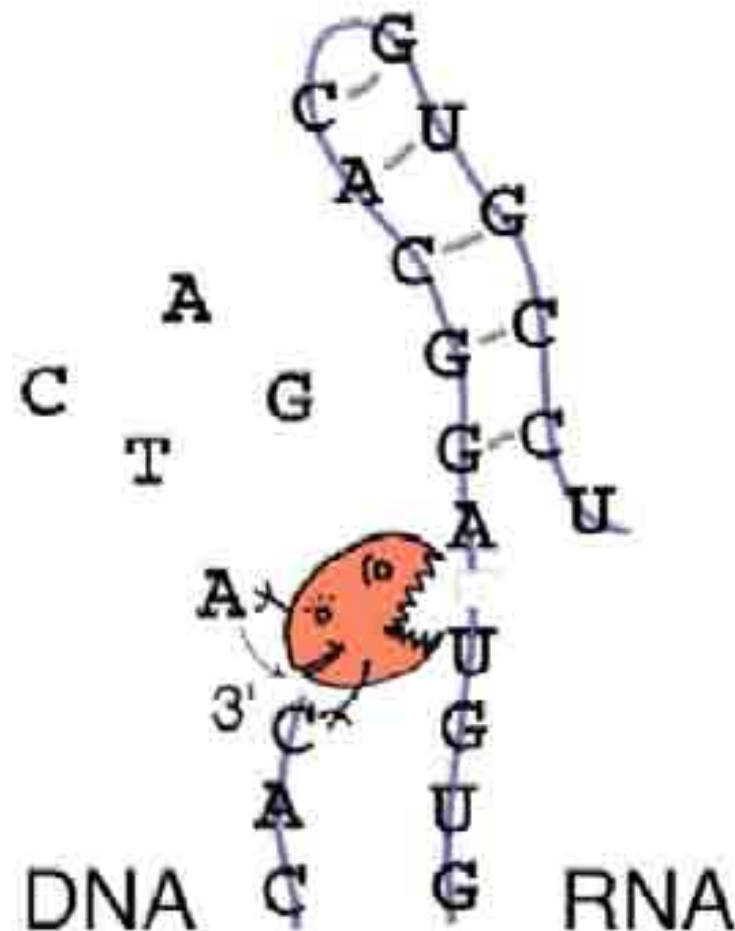
Odpowiedzialna za:

- *usuwanie hybryd DNA:RNA*
- *generowanie starterów PPT*
- *usuwanie starterów tRNA i PPT*

Szczególnie aktywna w miejscach gdzie RNA przyjmuje strukturę 2-rzędową a **RT zwalnia.**

W części dostępnych komercyjnie RT aktywność

obniżono lub usunięto.



Za TATA Biocenter

Właściwości różnych RT

	Temp
MMLV RNase H- Minus (Promega, Germany)	37
M-MLV (Promega)	45
Avian Myeloblastosis Virus (AMV) (Promega)	37
Improm-II (Promega)	45
Omniscript (Qiagen, Germany)	37
cloned AMV (cAMV) (Invitrogen, Germany)	45
ThermoScript RNase H- (Invitrogen)	50
SuperScript III RNase H- (Invitrogen)	50

Sthalberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

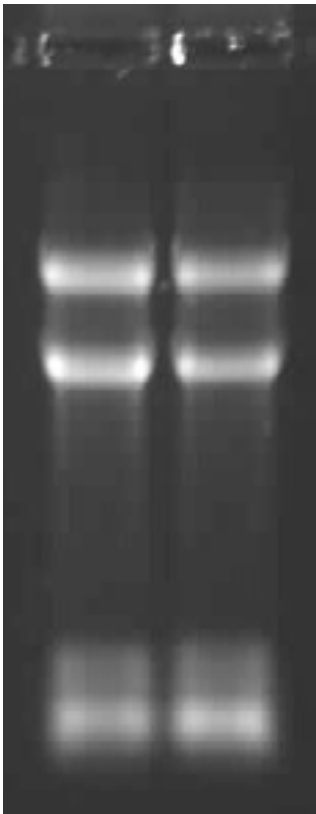
AMV: wirus ptasiej białaczki

MMLV: wirus mysiej białaczki Moloneya

DOBRA PRAKTYKA LABORATORYJNA NA KAŻDYM ETAPIE PRACY Z RNA

Inkubacja z
DNazą, 1h 37°C

- +



**Dla RT jest kluczowa
jakość RNA!**

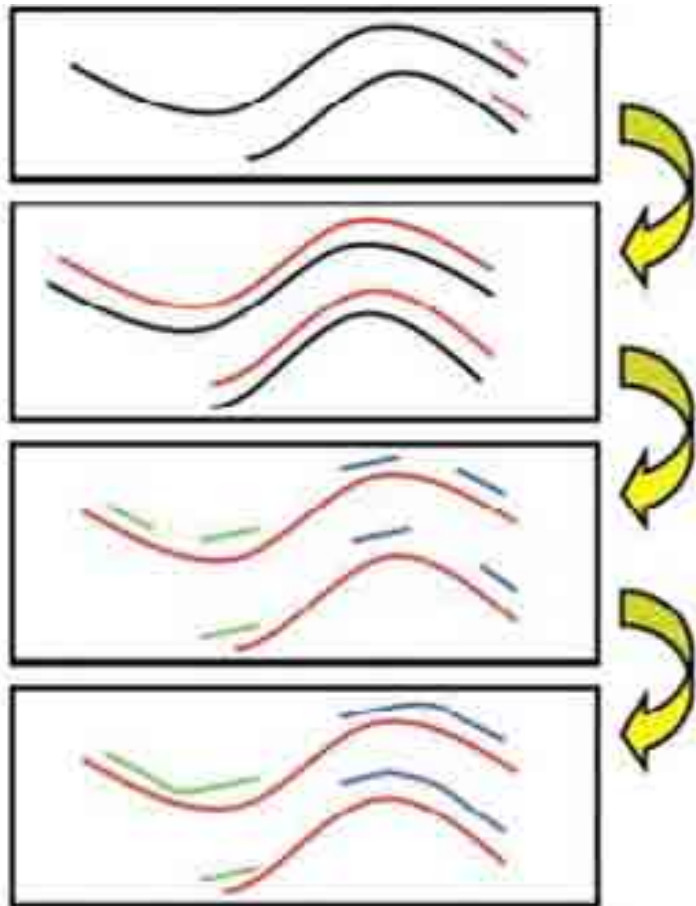
**Konieczna kontrola jakości
RNA po izolacji!**

**Zawsze konieczne
DNazowanie prób!**

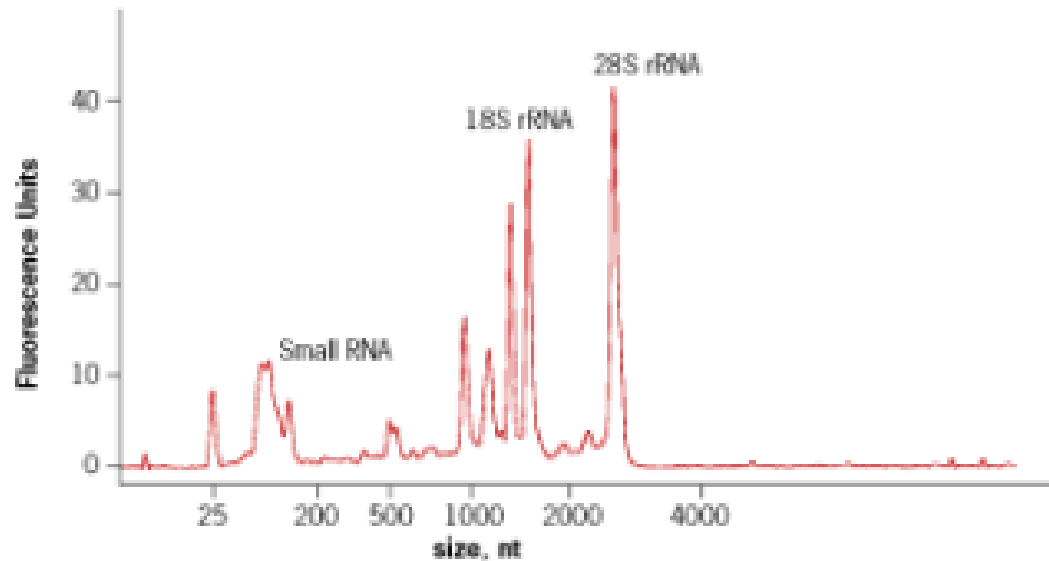
**Zalecane stosowanie
inhibitorów RNaz!**

Ocena jakości RNA

Test integralności końców 5'-3' RNA



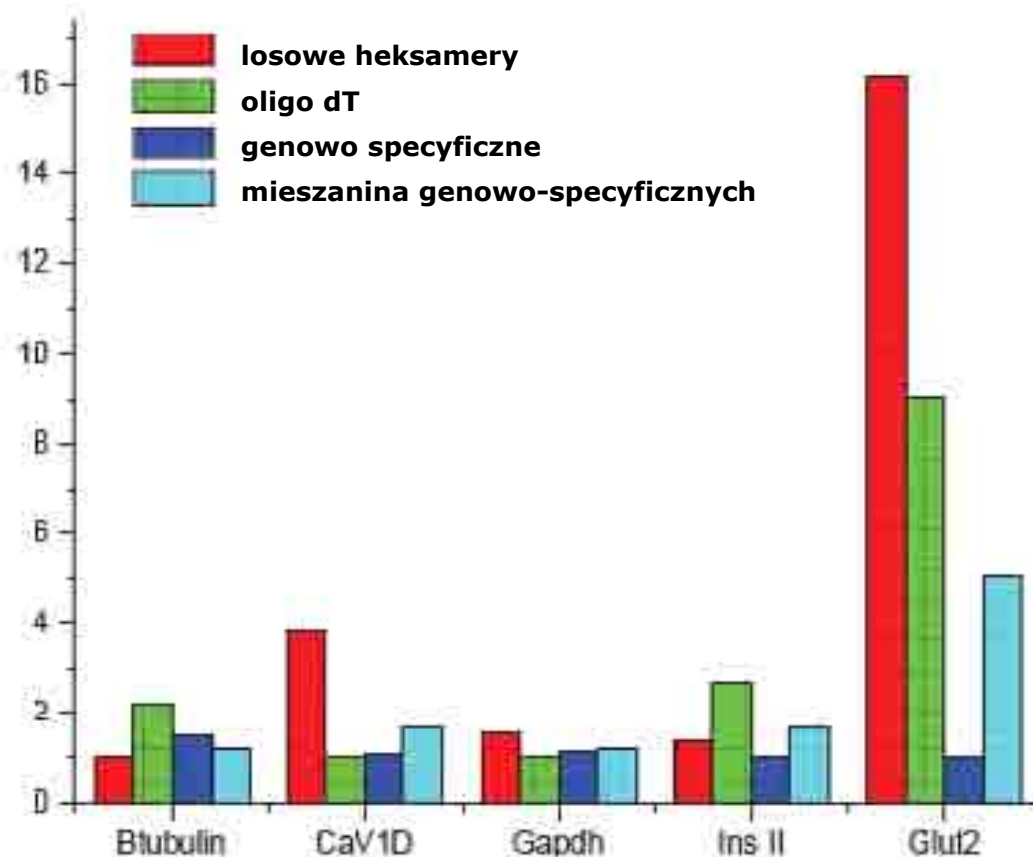
Analizatory mikrocieczowe



- Biorad: Experion
- Agilent: Bioanalyzer
- Elektroforeza kapilarna

Zależność wydajności RT od metody startowania

Wydajność RT



Sthalberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Specyficzność metod startowania

RT priming ^a	β -tubulin ^b	CaV1D ^b	GAPDH ^b	Insulin II ^b	Glut2 ^b
hexamers	19.5	<u>26.5</u>	<u>15.8</u>	16.9	<u>27.5</u>
oligo(dT)	<u>18.1</u>	28.8	16.6	<u>15.9</u>	28.4
specific	18.8	28.7	16.4	17.4	31.8
mix	19.1	27.9	16.2	16.6	29.3
max Δ Ct ^c	1.4	2.3	0.8	1.5	4.4

Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Zależność wydajności RT od metody startowania

RT priming	β -tubulin ^a	CaV1D ^a	GAPDH ^a	Insulin II ^a	Glut2 ^a
β -tubulin	<u>18.8</u>	28.7	19.0	18.8	30.6
CaV1D	27.0	<u>28.7</u>	19.9	22.8	<i>b</i>
GAPDH	23.4	30.1	<u>16.4</u>	20.1	<u>29.7</u>
Insulin2	23.5	31.6	20.0	<u>17.4</u>	31.0
Glut2	25.8	31.9	22.7	22.7	31.8
no primer	27.6	33.7	23.6	23.1	32.6

Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

RT wymaga startera do rozpoczęcia syntezy DNA

**startery
genowo-specyficzne**



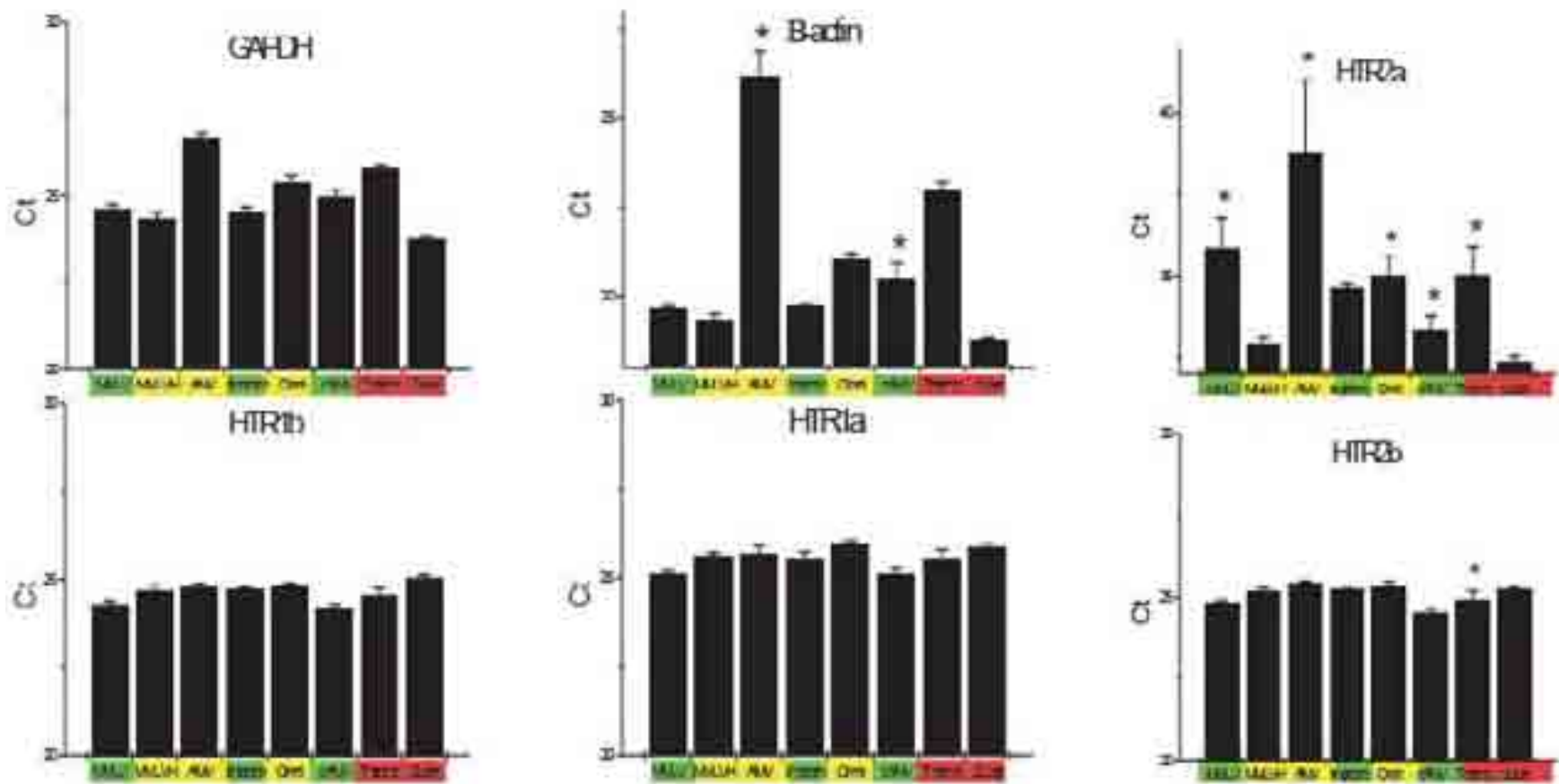
**startery oligodT,
mogą być „kotwiczone”
tzn. TTTTTTTTTT(A/C/G)**



**krótkie startery losowe
np. heksamery, oktamery**

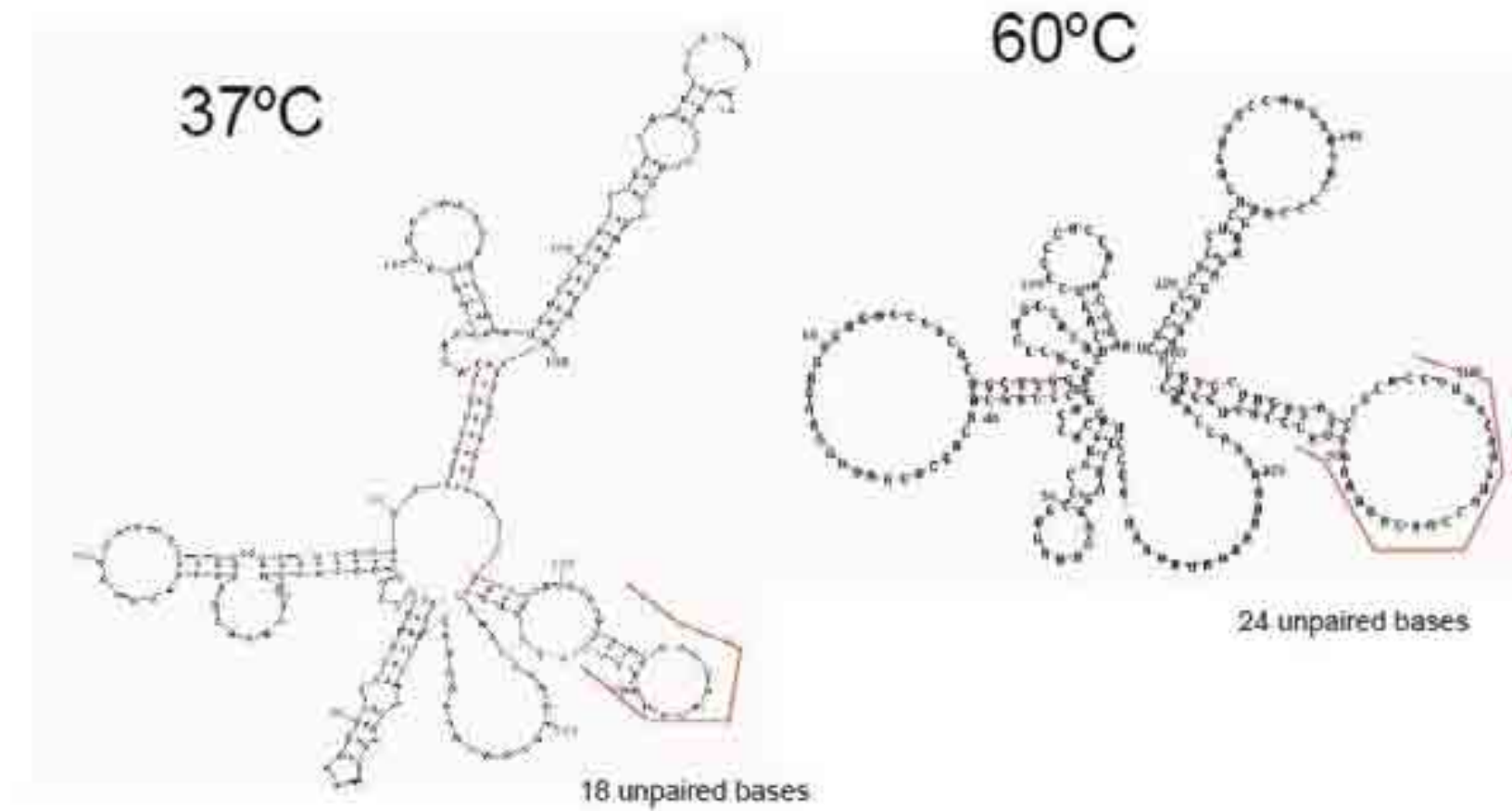


Różnice w wydajności RT mogą sięgać 100X!



Stahlberg i wsp., 2004, Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis, Clin Chem. 50(9):1678-80.

Optymalizacja RT



Za TATA Biocenter