

## 4. HODNOCENÍ RELATIVNÍ EXPRESE JABLEČNÉHO IZOALERGENU *Mal d 1.01*

### Cíl úlohy

Mezi nejvýznamnější jablečné izoalergeny patří protein kódovaný genem *Mal d 1.01*, k jehož expresi dochází zejména ve slupce plodů. Míra exprese se zvyšuje s vzrůstajícím měknutím plodů, otláčením dužniny nebo napadením plodů patogeny. Cílem úlohy je stanovit relativní expresi tohoto izoalergenu na základě hodnoty  $\Delta\Delta Ct$  u dvou skupin vzorků odrůdy Jonagold z obchodních řetězců. Jedná se o vzorky s pevnými neotlačenými plody a o vzorky s extrémně otláčenými plody s měkkou dužninou. Jako referenční odrůda byla použita odrůda Jonagold z VŠÚO Holovousy s.r.o. analyzovaná okamžitě po sklizni. Analyzovaná cDNA byla získána z mRNA extrahované ze slupky plodů. Pro amplifikaci byl použit publikovaný primerový pár a vlastní analýzy qRT-PCR vycházela z použití barviva EvaGreen. Jako referenční gen byl použit gen kódující aktin. Cílem úlohy je vyhodnotit hrubá výsledková data qRT-PCR - hodnoty  $Ct$  u sledovaného izoalergenu a aktinu. Hodnota  $\Delta\Delta Ct$  udává relativní míru exprese (%) a je definována jako  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Většina komerčních programů vyhodnocujících relativní expresi genů mnohdy prezentují pouze výslednou hodnotu  $\Delta\Delta Ct$  bez mezivýsledků a průběžných statistických parametrů. Cílem této úlohy není jen porovnání exprese genů u dvou skupin vzorků, ale zejména vyhodnotit a popsat algoritmus vlastního výpočtu. Proto byla připravena výpočtová tabulka, ze které studenti samostatně popíší, jak je hodnota  $\Delta\Delta Ct$  kalkulována.

### Vstupní data

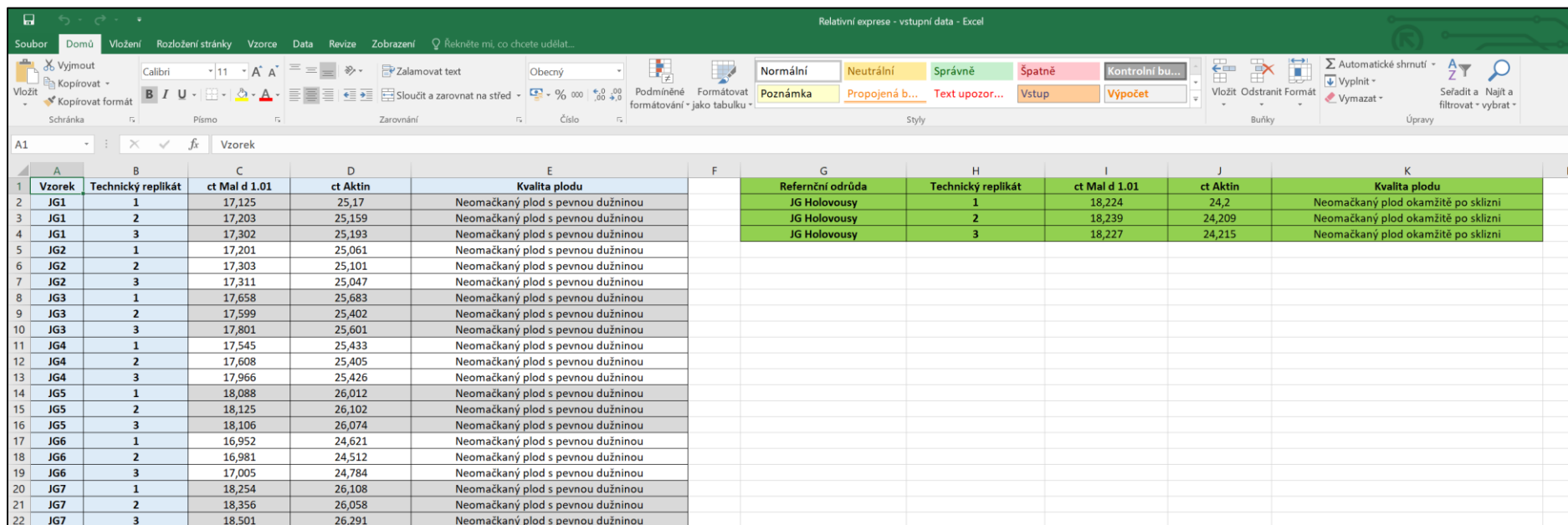
- Hodnoty  $Ct$  izoalergenu *Mal d 1.01* a aktinu

### Potřebné bioinformatické nástroje

- MS Excel a připravená výpočtová tabulka
- Dell Statistica v.13 (Dell Inc. 2015)

## Návod na řešení úlohy

1. V programu MS Excel otevřete soubor se vstupními daty, ve kterém jsou uvedeny hodnoty Ct pro referenční odrůdu Jonagold z VŠÚO Holovousy s.r.o. a 20 hodnocených vzorků plodů těže odrůdy z obchodních řetězců s variabilní kvalitou plodů.



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Vzorek	Technický replikát	ct Mal d 1.01	ct Aktin	Kvalita plodu		Referenční odrůda	Technický replikát	ct Mal d 1.01	ct Aktin	Kvalita plodu
JG1	1	17,125	25,17	Neomačkaný plod s pevnou dužninou		JG Holovousy	1	18,224	24,2	Neomačkaný plod okamžitě po sklizni
JG1	2	17,203	25,159	Neomačkaný plod s pevnou dužninou		JG Holovousy	2	18,239	24,209	Neomačkaný plod okamžitě po sklizni
JG1	3	17,302	25,193	Neomačkaný plod s pevnou dužninou		JG Holovousy	3	18,227	24,215	Neomačkaný plod okamžitě po sklizni
JG2	1	17,201	25,061	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG2	2	17,303	25,101	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG2	3	17,311	25,047	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG3	1	17,658	25,683	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG3	2	17,599	25,402	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG3	3	17,801	25,601	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG4	1	17,545	25,433	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG4	2	17,608	25,405	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG4	3	17,966	25,426	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG5	1	18,088	26,012	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG5	2	18,125	26,102	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG5	3	18,106	26,074	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG6	1	16,952	24,621	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG6	2	16,981	24,512	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG6	3	17,005	24,784	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG7	1	18,254	26,108	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG7	2	18,356	26,058	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						
JG7	3	18,501	26,291	Neomačkaný plod s pevnou dužninou						

2. V programu MS Excel si otevřete soubor s prázdnou výpočtovou tabulkou. Soubor si uložte jako kopii původního souboru s názvem prvního analyzovaného vzorku (JG1). Oblast vyznačená žlutou barvou představuje oblast, kde jsou naprogramovány jednotlivé kroky výpočtu ratia  $\Delta\Delta Ct$ . V této oblasti nesmíte buňky mazat ani přepisovat. Oranžovou barvou je vyznačena oblast s hlavními výsledky. Řádek s vypočítanou hodnotou ratia  $\Delta\Delta Ct$  je vyznačen červeně. Tyto buňky nesmíte rovněž mazat ani přepisovat. Pro vkládání výsledků slouží buňky vyznačené zelenou a modrou barvou.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Referenční odrůda	Ct Mald	AVER Ct Mald	SD Mald	Vk% Mald	Ct ACTin	AVER Ct ACTin	SD Ct ACTin	Vk% Ct ACTin	dílčí 1. delty	AVER 1. delta	SD 1. delta	Vk% 1. delta	Min 1. delta
2	JG Holovousy		#####	#####	#DĚLENÍ_NULOUI		#DĚLENÍ_NULOUI	#DĚLENÍ_NULOUI	#DĚLENÍ_NULOUI	0	0	0	#DĚLENÍ_NULOUI	0
3										0				
4										0				
5										0				
6										0				
7										0				
8										0				
9										0				
10										0				
11	Testovaný vzorek	Ct Mald	#####	#####	#DĚLENÍ_NULOUI	Ct ACTin	#DĚLENÍ_NULOUI	#DĚLENÍ_NULOUI	#DĚLENÍ_NULOUI	0	0	0	#DĚLENÍ_NULOUI	0
12										0				
13										0				
14										0				
15										0				
16										0				
17										0				
18										0				
19										0				
20										0				
21										0				
22	Referenční odrůda	Golden Delicous Holovousy												
23	Mal d 1.01													
24	Ratio delta Ct - průměr	1												
25	Ratio delta Ct - variační koeficient (%)	0												
26														
27	Ratio delta delta Ct - průměr	100												
28	Ratio delta delta Ct - variační koeficient (%)	0												
29														
30														
31														
32	Testovaný vzorek													
33	Mal d 1.01													
34	Ratio delta Ct - průměr	1												
35	Ratio delta Ct - variační koeficient (%)	0												
36														
37	Ratio delta delta Ct - průměr	100												
38	Ratio delta delta Ct - variační koeficient (%)	0												
39														

- Do zeleně vyznačených buněk vložte hodnoty Ct pro referenční odrůdy a do modře vybarvených polí vložte Ct hodnoty analyzovaného vzorku. Pro hodnocení všech dvaceti vzorů byla použita shodná referenční odrůda. Proto jednotlivé soubory pro hodnocení vzorků 1-20 budou mít Ct hodnoty referenční odrůdy shodné. Lišit se budou Ct hodnotami vkládanými do modrých buněk. Vypočítanou průměrnou hodnotu  $\Delta\Delta Ct$  (červené buňky) si zkopírujte do nového souboru MS Excel a označte jej patřičným vzorkem. Tento výsledkový soubor si uložte. Do něj budete vkládat výsledky analýz zbývajících 20 vzorků a data použijete pro další statistickou analýzu.

Vzorová výpočtová tabulka pro vzorek JG1 - Excel

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Referenční odrůda	Ct Mald	AVER Ct Mald	SD Mald	Vk% Mald	Ct ACtin	AVER Ct ACtin	SD Ct ACtin	Vk% Ct ACtin	dílčí 1. delty	AVER 1. delta	SD 1. delta	Vk% 1. delta	Min 1. delta	Max 1. delta
2	JG Holovousy	18,224	18,23	0,007937254	0,043539517	24,2	24,208	0,007549834	0,031187353	-5,976	-5,978	0,009486833	-0,158695767	-5,991	-5,961
3		18,239				24,209				-5,985					
4		18,227				24,215				-5,991					
5										-5,961					
6										-5,97					
7										-5,976					
8										-5,973					
9										-5,982					
10										-5,988					
11	Testovaný vzorek	Ct Mald	17,21	0,088707384	0,51544093	Ct ACtin	25,174	0,017349352	0,068917739	-8,045	-7,964	0,078278349	-0,98290243	-8,068	-7,857
12	JG1	17,125				25,17				-8,034					
13		17,203				25,159				-8,068					
14		17,302				25,193				-7,967					
15										-7,956					
16										-7,99					
17										-7,868					
18										-7,857					
19										-7,891					
20															
21															
22	Referenční odrůda	Golden Delicous Holovousy													
23	Mal d 1.01														
24	Ratio delta Ct - průměr	63,03266294													
25	Ratio delta Ct - variační koeficient (%)	0,656956611													
26															
27	Ratio delta delta Ct - průměr	100													
28	Ratio delta delta Ct - variační koeficient (%)	0													
29															
30															
31															
32	Testovaný vzorek	JG1													
33	Mal d 1.01														
34	Ratio delta Ct - průměr	250,0170736													
35	Ratio delta Ct - variační koeficient (%)	5,405118017													
36															
37	Ratio delta delta Ct - průměr	396,6620985													
38	Ratio delta delta Ct - variační koeficient (%)	5,207004001													
39															

4. Nyní se zaměřte na žlutě vybarvené buňky, ve kterých je zaznamenán algoritmus výpočtu ratia  $\Delta\Delta Ct$ . Algoritmus vyjadřuje matematické propojení jednotlivých mezivýsledků, které jsou ve žluté oblasti rovněž uvedené. Symbol SD je použit pro výpočet směrodatné odchylky výběrového souboru, V<sub>k</sub> pro variační koeficient. Zkratky Min a Max jsou použity pro označení minimálních a maximálních hodnot jednotlivých mezivýsledků. Vlastní algoritmus pracuje na principu jednoduchých matematických operací s vybranými buňkami nebo skupinami buněk, které jsou patrné z popisu obsahu buněk. Nyní se pokuste matematicky popsat celý algoritmus výpočtu hodnoty ratia  $\Delta\Delta Ct$ . Na následujícím obrázku je demonstrována část výpočtové tabulky s konkrétním obsahem vybrané buňky.

	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD
1	SD 1. delta	Vk% 1. delta	Min 1. delta	Max 1. delta	Dílčí Ratia	AVER Ratio	SD Ratio	Vk% Ratio	Min Ratio	MaxRatio	dd1	dd2	dd3	dd4	dd5	dd6	dd7	dd8	dd9
2	0,009486833	-0,158695767	-5,991	-5,961	62,94413274	63,03266294	0,414097246	0,656956611	62,29307995	63,60198997	0	-0,009	-0,015	0,015	0,006	0	0,003	-0,006	-0,012
3					63,33802601						0,009	0	-0,006	0,024	0,015	0,009	0,012	0,003	-0,003
4					63,60198997						0,015	0,006	0	0,03	0,021	0,015	0,018	0,009	0,003
5					62,29307995						-0,015	-0,024	-0,03	0	-0,009	-0,015	-0,012	-0,021	-0,027
6					62,68289905						-0,006	-0,015	-0,021	0,009	0	-0,006	-0,003	-0,012	-0,018
7					62,94413274						0	-0,009	-0,015	0,015	0,006	0	0,003	-0,006	-0,012
8					62,81338009						-0,003	-0,012	-0,018	0,012	0,003	-0,003	0	-0,009	-0,015
9					63,20645513						0,006	-0,003	-0,009	0,021	0,012	0,006	0,009	0	-0,006
10					63,46987077						0,012	0,003	-0,003	0,027	0,018	0,012	0,015	0,006	0
11	0,078278349	-0,98290243	-8,068	-7,857	264,1108939	250,0170736	13,51371789	5,405118017	231,8422997	268,3551937	-2,069	-2,058	-2,092	-1,991	-1,98	-2,014	-1,892	-1,881	-1,915
12					262,1048065						-2,06	-2,049	-2,083	-1,982	-1,971	-2,005	-1,883	-1,872	-1,906
13					268,3551937						-2,054	-2,043	-2,077	-1,976	-1,965	-1,999	-1,877	-1,866	-1,9
14					250,2107562						-2,084	-2,073	-2,107	-2,006	-1,995	-2,029	-1,907	-1,896	-1,93
15					248,310249						-2,075	-2,064	-2,098	-1,997	-1,986	-2,02	-1,898	-1,887	-1,921
16					254,2316788						-2,069	-2,058	-2,092	-1,991	-1,98	-2,014	-1,892	-1,881	-1,915
17					233,6167651						-2,072	-2,061	-2,095	-1,994	-1,983	-2,017	-1,895	-1,884	-1,918
18					231,8422997						-2,063	-2,052	-2,086	-1,985	-1,974	-2,008	-1,886	-1,875	-1,909
19					237,3710199						-2,057	-2,046	-2,08	-1,979	-1,968	-2,002	-1,88	-1,869	-1,903

5. V závěrečném kroku analýzy si otevřete soubor MS Excel, který jste si samostatně vytvořili a do kterého jste ukládali výsledky jednotlivých analýz tj hodnoty ratiá  $\Delta\Delta Ct$ . Soubor obsahuje tabulku tvořenou dvaceti řádky. Každý řádek obsahuje číslo vzorku (JG1 – JG20), hodnotu ratiá  $\Delta\Delta Ct$  a kvalitu plodů (2 kategorie). Vaším úkolem je zvolit vhodnou statistickou metodu v programu Dell Statistica v.13, který umožní vyhodnotit, zdali existují statisticky významné rozdíly v průměrné hodnotě ratiá  $\Delta\Delta Ct$  mezi skupinou vzorků s pevnými neotlačenými plody a skupinou vzorků s extrémně otlačenými měkkými plody. Náповědou pro volbu statistické analýzy vám může být následující obrázek.

The screenshot displays the Dell Statistica v.13 software interface. The main window shows a data table with 10 columns labeled 'Prom1' through 'Prom10' and 10 rows. A dialog box titled 'Základní statistiky a tabulky: Tabulka1' is open, listing various statistical tests. The 'Popisné statistiky' (Descriptive statistics) option is selected.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Prom1	Prom2	Prom3	Prom4	Prom5	Prom6	Prom7	Prom8	Prom9	Prom10
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										

**Základní statistiky a tabulky: Tabulka1**

Základní výsledky

- Popisné statistiky
- Korelační matice
- t-test, nezávislé, dle skupin
- t-test, nezávislé, dle proměn.
- t-test, závislé vzorky
- t-test, samost. vzorek
- Rozklad & jednofakt. ANOVA
- Rozklad
- Tabulky četnosti
- Kontingenční tabulky
- Tabulky vícenásob. odpovědí
- Testy rozdílu: r, %, průměry
- Pravděpodobnostní kalkulátor

Buttons: OK, Stomo, Možnosti, Otevři data, SELECT, OK, V