

# Bi9310c Úvod do kvantitativní RT-PCR – cvičení

## Zadání úlohy pro doktorské studenty

### Úvod:

Studujete vliv látky X na plicní buňky. Při experimentech pomocí *microarrays* jste zjistili, že látka X ovlivňuje hladiny mRNA 5 genů asociovaných s plicním surfaktantem. Jedná se o geny SFTP A1, SFTP A2, SFTP B, SFTP C a SFTP D. Rozhodnete se ověřit zjištěné výsledky pomocí *two step qPCR* (zpětná transkripce a vlastní PCR reakce se dělají zvlášť).

Rozhodli jste se pro relativní kvantifikaci a jako referenční gen jste na základě doporučení z literatury pro danou tkáň zvolili GAPDH (budete pracovat v duplexu, tedy sonda pro GAPDH a pro gen zájmu budou v jedné jamce). Právě vám dodali nový přístroj (který se kalibruje pomocí ROXu) včetně spotřebních plastů.

cDNA z vašich buněk již také máte k dispozici. Jedná se o následující vzorky:

Buňky	X 0	X 0,25 ng/ml	X 2,5 ng/ml	X 25 ng/ml	X 250 ng/ml	X 2500 ng/ml
Linie A	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky
Linie B	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky
Primární kultura	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky	3 misky

### Úkoly:

- a) Připravte seznam věcí, které potřebujete objednat pro váš qPCR experiment (včetně kódů a cen) od firmy Applied Biosystems (tabulka uvádí složení jedné jamky v 96 jamkové destičce).

	Objem [ $\mu$ l]
<b>2x Gene Expression Master Mix</b>	12,5
<b>Gene Expression Assay (gen zájmu-FAM)</b>	1,25
<b>Endogenous Control (GAPDH-VIC)</b>	1,25
cDNA	2
PCR voda	8
Celkem	25

Váš šéf počítá každou korunu, proto vám dal za úkol spočítat i variantu s chemií od firmy Roche (pozn.: pokud šéfa překvapíte a nachystáte 2. variantu od nějaké jiné firmy, zlobit se nebude).

	Koncentrace	Objem [ $\mu$ l]
<b>Primer Mix (UPL Ref. Gene Assay)</b>	20 $\mu$ M	0,4
<b>Probe (UPL Ref. Gene Assay)</b>	10 $\mu$ M	0,4
<b>Primer (GOI) forward</b>	20 $\mu$ M	0,4
<b>Primer (GOI) reverse</b>	20 $\mu$ M	0,4
<b>UPL probe (GOI)</b>	10 $\mu$ M	0,4
<b>LightCycler® TaqMan® Master</b>	5x	4,0
PCR voda		9
cDNA		5
Celkem		20

Design primerů a výběr sondy od firmy Roche se provádí přes stránky Universal probe library: <http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>

Pro každý biologický vzorek budete pipetovat 3 pokusné jamky + 1 jamku No RT kontroly (při zpětné transkripci nebyla použita reverzní transkriptáza). Na každou 96 jamkovou destičku napipetujete 5 vzorků No template kontroly (voda místo cDNA, značí se NTC nebo No RNA).

Předtím je zapotřebí udělat kalibrační křivky pro zjištění efektivity PCR pro referenční gen i všech genů zájmu. Za tímto účelem použijeme RNA z neovlivněných buněk linie A. RNA, resp. přepsanou cDNA zředíme a do reakce ji budeme dávkovat v 6 různých množstvích (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg a 1 pg). Každou koncentraci pipetujeme na destičku v triplicátu + 2 kontroly pro každou sondu (viz bod b)).

- b) Na dokumentovém serveru naleznete 3 soubory. V jednom (*Kalibrace 1 a 2 - rozvržení destiček.xls*) je zobrazeno rozložení vzorků tak, jak jste je pipetovali na destičku za účelem sestavení kalibračních křivek pro jednotlivé proteiny. Ve zbylých dvou (*Kalibrace\_1-28-11-2010.xls*, *Kalibrace\_2-28-11-2010.xls*) naleznete výsledky. Z výsledků sestavte grafy, z nichž určíte efektivitu PCR jak pro každý gen zájmu, tak pro referenční gen ve směsi s genem zájmu.