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 SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC a SFTPD. 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:**

1. 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 [μl] |
| **2x Gene Expression Master Mix** | 12,5 |
| **Gene Expression Assay (gen zájmu-FAM)** | 1,25 |
| **Endogenous Control (GAPDH–VIC)** | 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 [μl] |
| **Primer Mix (UPL Ref. Gene Assay)** | 20 μM | 0,4 |
| **Probe (UPL Ref. Gene Assay)** | 10 μM | 0,4 |
| **Primer (GOI) forward** | 20 μM | 0,4 |
| **Primer (GOI) reverse** | 20 μM | 0,4 |
| **UPL probe (GOI)** | 10 μM | 0,4 |
| **LightCycler® TaqMan® Master** | 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 triplikátu + 2 kontroly pro každou sondu (viz bod b)).

1. 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.

1. Napipetovali jste pět 96 jamkových destiček se vzorky z linie A (*Experiment - rozvržení destiček.xls*). Výsledná data po qPCR experimentu ze stroje 7500 Real-Time PCR System od Applied Biosystems jste importovali do Excelu (*Experiment\_1-5.xls*). Spočítejte ΔCT, průměrné ΔCT, ΔΔCT a R=2-∆∆Ct. Výsledné hodnoty R zpracujte také graficky ve formě sloupcových grafů i s chybovými úsečkami.
2. Na základě výsledků kalibračních křivek zahrňte do výpočtů také korekci na základě efektivity PCR.
3. U dvou vzorků pro sondu SFTPA1 jste detekovali produkt i v případě *No RT* kontroly, ale v *No template (No RNA)* kontrole pro sondu SFTPA1 jste nedetekovali nic. Co z toho vyplývá?