

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:

- 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 [μ l]
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 [μ l]
Primer Mix (UPL Ref. Gene Assay)	20 μ M	0,4
Probe (UPL Ref. Gene Assay)	10 μ M	0,4
Primer (GOI) forward	20 μ M	0,4
Primer (GOI) reverse	20 μ M	0,4
UPL probe (GOI)	10 μ M	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. přeřpanou 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.
-
- c) 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 ΔC_T , průměrné ΔC_T , $\Delta \Delta C_T$ a $R=2^{-\Delta \Delta C_T}$. Výsledné hodnoty R zpracujte také graficky ve formě sloupcových grafů i s chybovými úsečkami.
- d) Na základě výsledků kalibračních křivek zahrňte do výpočtů také korekci na základě efektivity PCR.
- e) U dvou vzorků pro sondu SFTP1A1 jste detekovali produkt i v případě No RT kontroly, ale v No template (No RNA) kontrole pro sondu SFTP1A1 jste nedetekovali nic. Co z toho vyplývá?