



# qRT-PCR transfekce kryostat

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Mgr. Pája Janovská

RNDr. Joža Večeřa, Ph.D.

[jipro@sci.muni.cz](mailto:jipro@sci.muni.cz)



# po izolaci RNA

## ○ One step qRT-PCR (BFU)

- kombinace syntézy prvního cDNA řetězce (reverzní transkripce) a PCR reakce ve stejné zkumavce
- + zjednodušení reakčního postupu a snížení rizika kontaminace
- + rychlejší zpracování velkého množství vzorků
- + díky tomu, že se amplifikují všechny mRNA (cDNA) dosáhneme vyšší senzitivity (stačí i 0.01 pg celkové RNA)
- možné použít jen „sequence-specific“ primery
- celá reakce je použita pro jedno PCR, nemožnost opakování

## ○ Two step qRT-PCR (OFIŽ)

- nejprve se provádí reverzní transkripce z celkové RNA pomocí oligo dT primeru za vzniku cDNA (do reakce vstupuje 1 ug celkové RNA)
- PCR probíhá v nových zkumavkách (do reakce vstupuje 1,5 ul cDNA z přepisu)
- + z jednoho přepisu je možné provést cca 25 PCR reakcí (různé primery)
- + možnost optimalizovat PCR s použitím různých polymeráz, primerů atp.
- + srovnání exprese různých genů na stejném vzorku
- vyšší riziko kontaminace
- více pipetovacích kroků

# zpětný přepis do cDNA

1. Změření koncentrace vyizolované RNA (Nanodrop) + kontrola kvality RNA
  - absorbance A260 nesmí být vyšší než 1 (případně ředit a měřit znova)
  - poměr absorbancí A260/280 musí být kolem 2
2. Spočítat kolik ul **RNA je 1 ug**, který vstupuje do RT
$$22.92 \text{ ng/ul} \dots \times 10 = 229.2 \text{ ng/ul}$$
$$229.2 \text{ ng} \dots 1 \text{ ul}$$
$$1000 \text{ ng} \dots \times \text{ul} \text{ (4,36 ul)}$$
3. Doředit do 16 ul sterilní RNase-free MQ H<sub>2</sub>O
4. Přidat 2 ul 10 uM směsi **nukleotidů** (PCR grade)... ??? WS *40 ul.... 10 uM*
5. Přidat 2 ul 20 uM **primeru poly(dT)<sub>15</sub>** ... ??? WS *2 ul..... 0.5 uM*
6. Mix – C – annealing primerů 10 min/37°C – přenos na 4°C
7. Přidat 4 ul 10xcc pufru pro transkriptázu s 0.1 M DTT (zrušení disulfidových můstků)
8. Přidat 2 ul **reverzní transkriptázy** (např. M-MLV - Moloney Murine Leukemia Virus)
9. Přidat 14 ul sterilní RNase-free MQ H<sub>2</sub>O  
Celkový objem 40 ul
10. Inkubace 50 min/37°C pak denaturace transkriptázy 10 min/90°C

# Příklad výstupu z Nanodropu

<1

=2

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
K	Default	2/24/2010	16:33 PM	22.92	0.573	0.288	1.99	0.50
APO	Default	2/24/2010	16:34 PM	26.56	0.664	0.327	2.03	0.57
ROS	Default	2/24/2010	16:35 PM	15.11	0.378	0.201	1.88	0.69
CAM	Default	2/24/2010	16:36 PM	20.01	0.500	0.247	2.02	0.63
DOX	Default	2/24/2010	16:37 PM	5.48	0.137	0.072	1.91	0.19
GELD	Default	2/24/2010	16:38 PM	10.92	0.273	0.126	2.17	0.42
ETO	Default	2/24/2010	16:38 PM	11.31	0.283	0.150	1.89	0.34

10x ředěný vzorek RNA

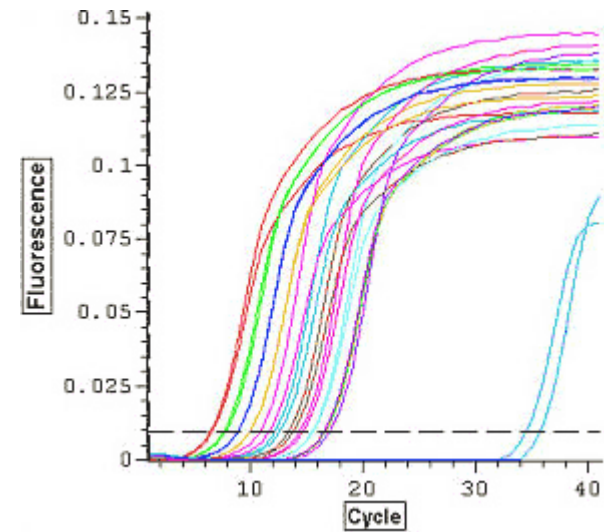
A260... RNA

A280... DNA

A230... proteiny

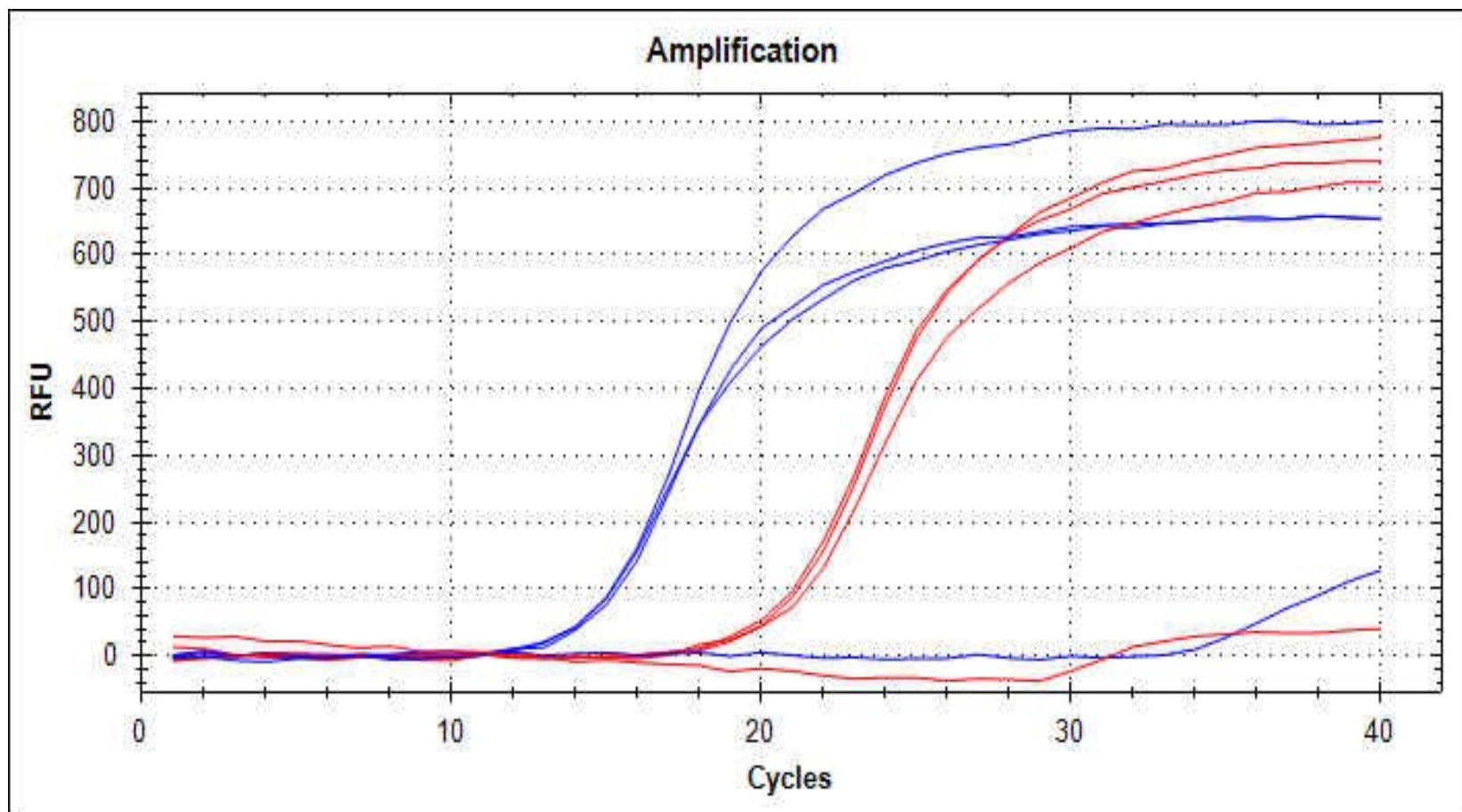
# Real time PCR

<http://www.youtube.com/watch?v=3H9oabhqDAc>  
<http://www.youtube.com/watch?v=HU6GUGvDLeg>



- LightCycler 480 (Roche)
- Do reakce se přidává Sybr Green (fluoreskuje jen po interkalaci do nově vytvořené DNA)
- Po každém cyklu se změří fluorescence vzorku
- Čím vyšší fluorescence, tím více produktu vzniklo
- Čím více molekul cDNA ve vstupu, tím dříve se začíná množit exponenciální řadou (dřívější cyklus – výstupní parametr  $C_p$ )
- Master mix: 1,5  $\mu$ l cDNA z přepisu +
  - 10  $\mu$ l Sybr Green (2xcc LightCycler 480 SYBR green I master kit)
  - 0,33  $\mu$ M každého z primerů (SS 20 mM... ???  $\mu$ l)
  - Doředit do 18,5  $\mu$ l sterilní RNase-free MQ H<sub>2</sub>O (celkový objem 20  $\mu$ l)

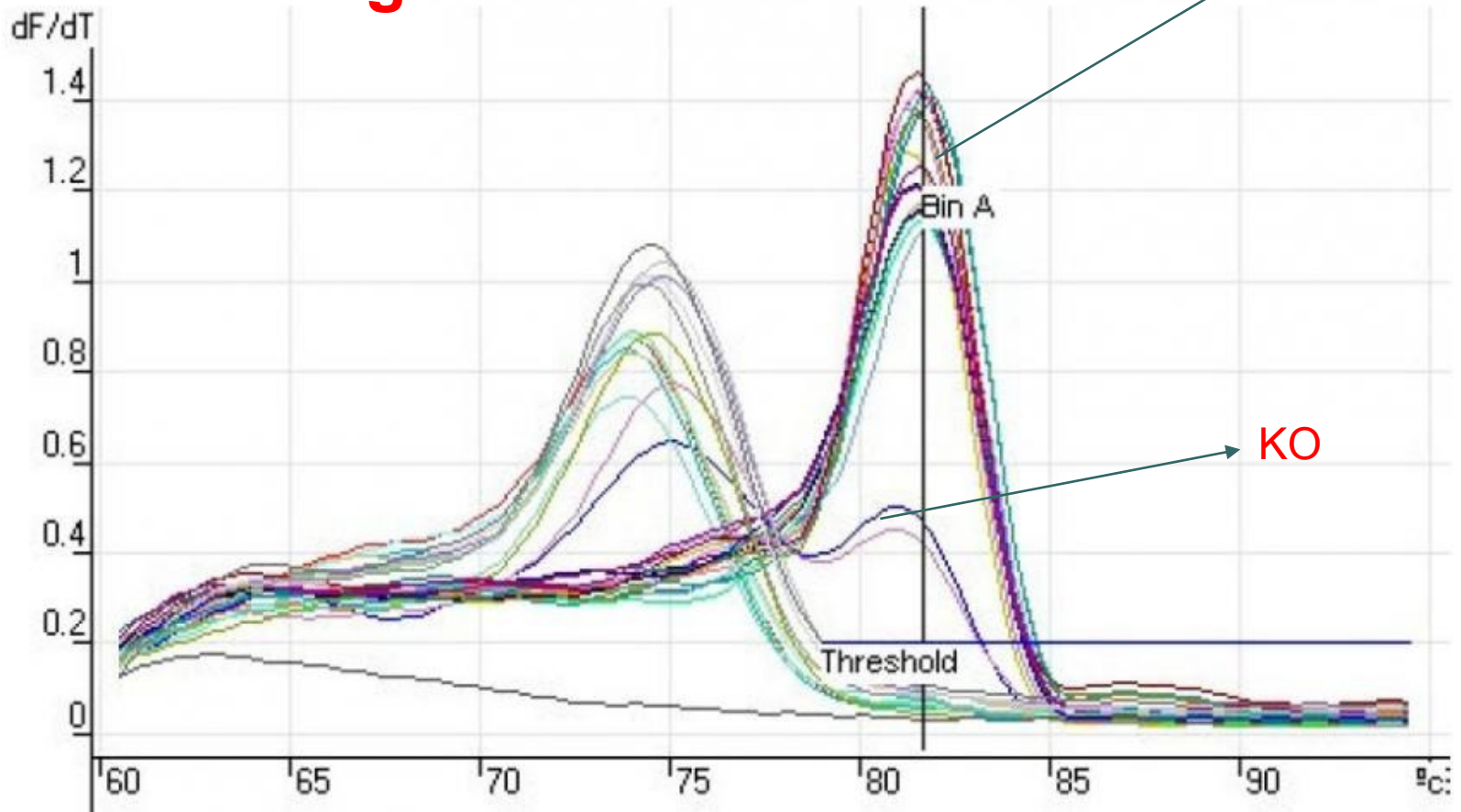
# Příklad výstupu



Získání hodnoty  $C_p$ : 1) fit pointy manuálně 2) pomocí 2. derivace automaticky

# Ověření specifiity reakce

**melting curve**



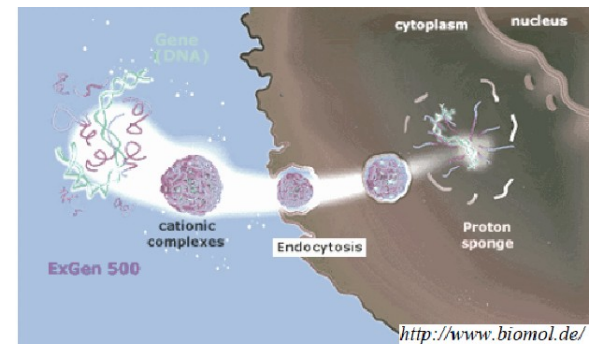


# Vyhodnocení qRT-PCR

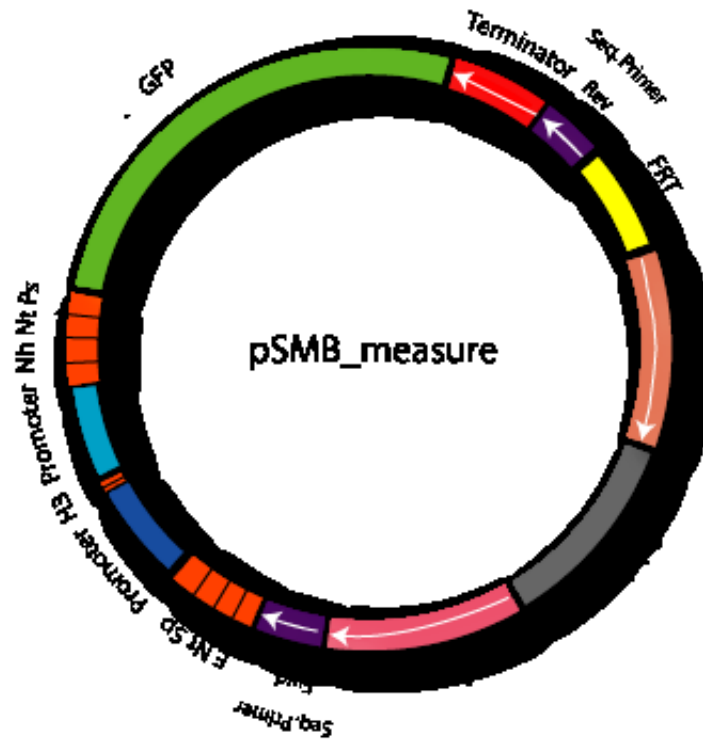
Name	Cp		průměr	GAPDH	$\Delta C_p$ C1-GAPDH	$2^{-\Delta C_p}$
F16 K3	31,84	31,43	31,635	36,39	-4,755	27,0021
F16 LY3	32,17	33,18	32,675	36,985	-4,31	19,8353
F16 K6	32,25	32,13	32,19	35,225	-3,035	8,1965
F16 LY6	31,83	31,84	31,835	34,97	-3,135	8,7847
F16 K9	31,16	31,01	31,085	36,34	-5,255	38,1867



# Transfekce



- Přenos cizorodé DNA pomocí klonovacích vektorů
- Vektory - molekuly DNA do nichž je včleněn gen zájmu
- Nejčastěji se používají plazmidy - malé bakteriální kruhové molekuly DNA



# Nejčastější metody transfekce

- Směs negativně nabitého  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  a pozitivně nabitého  $\text{CaCl}_2$  tvoří precipitát, do kterého se naváže DNA
- Kationické polymery DEAE-dextran, **polyetylenimin (PEI)** – negativně nabitá DNA se naváže na polykation a endocytózou se přenese do buněk
- Liposomy (**lipofectamin**) – DNA je obalena lipidovou kapsulkou, která může fúzovat s membránou
- Fugene – neznámé složení neliposomálního typu, etanol
- Elektroporace – vytvoření pórů (**Neon**)
  - Nukleofekce – kombinace elektroporace a dalších činidel

*Krevní buňky je možné transfekovat jen elektroporací*

# Plusy a mínusy

## ○ PEI

- + cena/efektivita
- nutnost výměny média (toxicita)

## ○ Lipofectamine

- + efektivita
- nutnost výměny média, cena

## ○ NEON

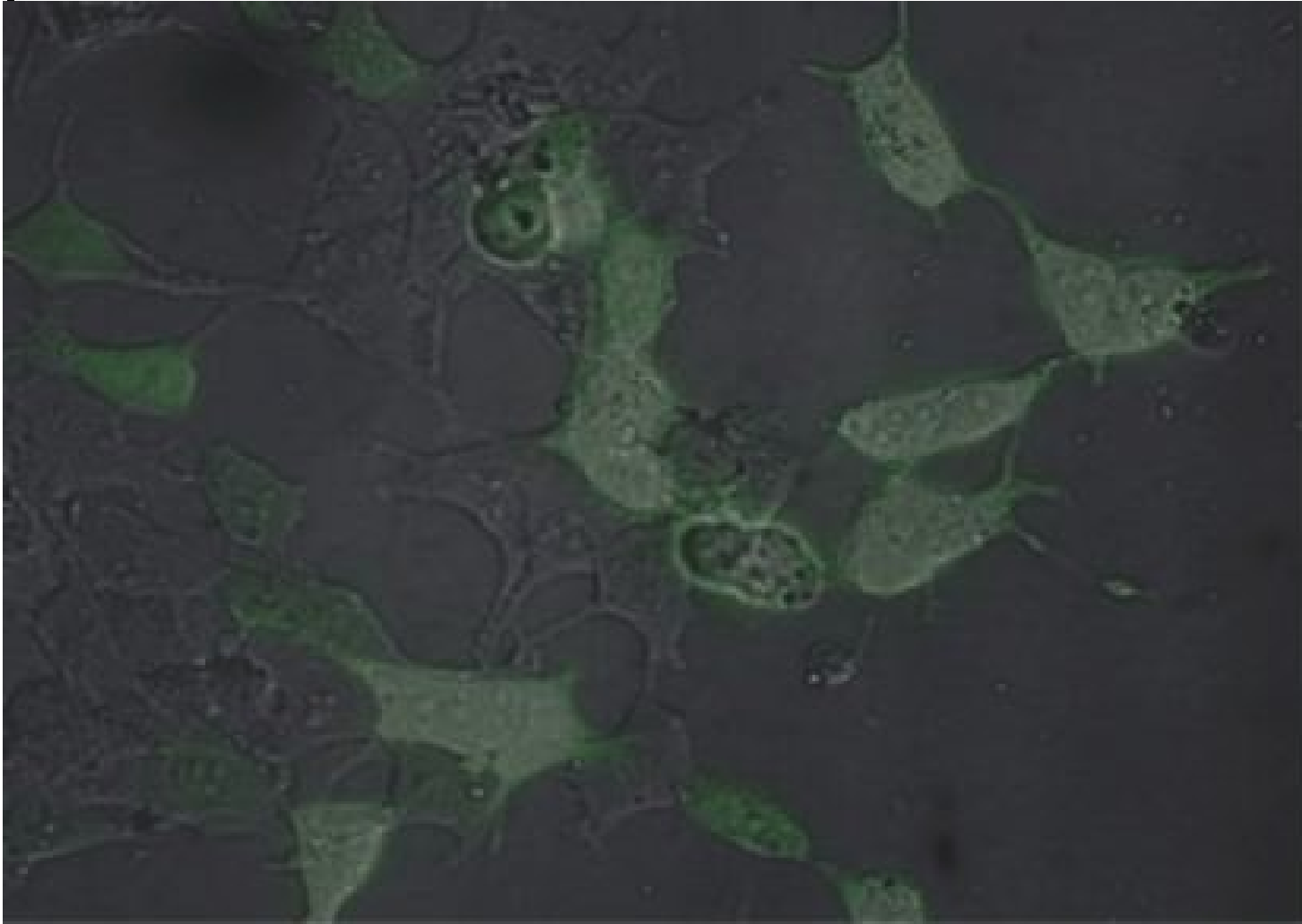
- + efektivita, není nutno měnit médium, použití na krevní buňky
- cena

## ○ Fugene

- + efektivita, není nutno měnit médium
- cena

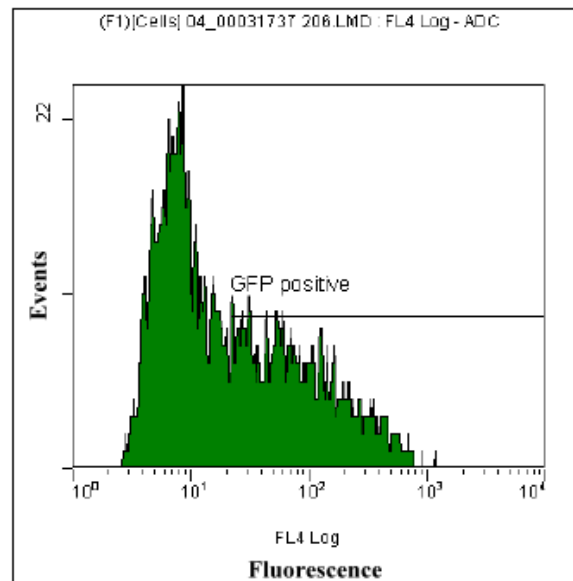


# ● ● ● Odhad účinnosti transfekce GFP



# Kvantitativní vyhodnocení účinnosti transfekce GFP

- Pomocí trypsin/EDTA uvolnit buňky do suspenze
- Změřit zelenou fluorescenci (kanál F1) průtokovým cytometrem Accuri C6



(F1)[Cells] 04_00031737 206.LMD : FL4 Log						
Region	Number	%Total	%Gated	X-Median 50.0	X-Mean	X-CV
ALL	5725	90.82	100.00	18.3	123	0.00
GFP positive	2721	43.16	47.53	89	250	0.00

# Kryostat

## Příprava vzorků:

Zalítí do OCT (polyethylen glykol + polyvinyl alkohol)

Zamražení tkáně v  $-80^{\circ}\text{C}$

Krájení řezů v kryostatu (mikrotom v chladné komoře)

$-20$  až  $-30^{\circ}\text{C}$

Složení mrazící směsi: 44% - pentafluoroethane,

52% - trifluoroethane, 4% - tetrafluoroethane

## Výhody kryořezů:

- Rychlá příprava vzorků, umožňující provést detekci proteinů i během operace
- Zachování enzymatické aktivity i antigenicity
- Zachycení látek, které se standardní technikou rozpustí (lipidy)
- Zachování buněčné morfolgie (není třeba chemické ani tepelné modifikace)
- Může se provést nefixovaných i nefixovaných vzorcích tkání

**Nevýhoda:** nižší kvalita preparátů

