

5. Úloha: Stanovení počtu kopií plazmidů (plasmid copy number – PCN) v buňce pomocí QPCR

Cílem této úlohy bude stanovit počet kopií penicilinázového plazmidu u *Staphylococcus aureus* (pUSA300HOUMR-like) na bakteriální buňku pomocí QPCR.

Absolutní kvantifikací stanovíme počet kopií genu *blaZ* lokalizovaného na plazmidu a bakteriálního genu *mecA* lokalizovaného v jedné kopii na bakteriálním chromozomu. Přesný počet plazmidů na buňku (PCN) stanovíme podle vztahu:

$$PCN = \frac{\text{velikost chromozomální DNA [bp]} \times \text{množství plazmidové DNA [pg]}}{\text{velikost plazmidové DNA [bp]} \times \text{množství chromozomální DNA [pg]}}$$

Přesný postup: nastudujte samostatně z článků

LEE C.L. - OW D.S. - OH S.K. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. J Microbiol Methods, 2006, 65: 258-267

LEE C et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. J Biotechnol., 2006, 123: 273-280

Materiál:

- Celogenomová bakteriální DNA pro přípravu kalibrační přímky, desítkové ředění od 100 ng do 0,1 pg (1. Skupina). Kvantifikace bakteriálního genu *mecA* lokalizovaného na bakteriálním chromozomu.
- Plazmidová DNA pro přípravu kalibrační přímky, desítkové ředění od 100 ng do 0,1 pg (2. skupina). Kvantifikace plazmidového genu *blaZ* nebo *tetK* v závislosti na typu kvantifikovaného plazmidu (pT181 nebo pUSA300-HOUMR-like).
- DNA neznámých vzorků.
- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (protokol na stránkách výrobce <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/c5c29b3a-97ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>)
- RT-PCR grade water

Pro qPCR je používán přístroj značky Roche – Light Cycler 480. Všechny reakce jsou připravovány v triplicátech v optických 96 -jamkových destičkách. Reakční směs je připravována v objemu 20 µl a obsahuje 10 µl 2× konc. Master Mix (Roche), primery o výsledné koncentraci 300 µM, příslušnou DNA v celkovém objemu 2,5 µl.

Standardní řada pro qPCR je připravena 10-ti násobným ředěním plazmidové a celogenomové DNA. Standardní ředící řady jsou ideálně připravovány ze zásobních vzorků celogenomové DNA a jsou skladovány při -20°C.

Postup:

1. Izolace plazmidové a celogenomové DNA pro přípravu kalibrační přímky. Izolace celogenomové DNA neznámých vzorků (připraveno předem).
2. Příprava kalibračních řad:
 - Dvě různé kalibrační přímky:

I. skupina (Tab.I):

- kalibrační přímka z celogenomové bakteriální DNA (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *mecA*, ředění připravit v koncentracích: 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1 pg, 0,1 pg

- kalibrační přímka bude mít celkem sedm datových bodů a každé ředění bude pipetováno na 96-jamkovou destičku v triplikátu (př. 100 ng – jamky A1-A3) – z důvodů stanovení průměrné hodnoty C_t a standardní odchylky.

II. skupina (Tab.II):

- kalibrační přímka z plazmidové bakteriální DNA (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *blaZ*, ředění připravit v koncentracích: 30ng, 3ng, 0,3ng, 30pg, 3pg, 0,3pg, 0,03 pg

- kalibrační přímka bude mít celkem sedm datových bodů a každé ředění bude pipetováno na 96-jamkovou destičku v triplikátu (př. 30ng – jamky A1-A3) – z důvodů stanovení průměrné hodnoty C_t a standardní odchylky.

3. Připravit Master Mix:

Master Mix	Objem [ul]	
	1x	...x
SYBR Green I Master	10	
Primer R (5uM)	1,5	
Primer F (5uM)	1,5	
PCR voda	4,5	
DNA	2,5	
Celkem	20	

4. Do jamek na 96 jamkové destičce pipetovat 17,5 μ l takto připraveného mastermixu (triplikáty viz Tab. I a II).
5. Do jamek dle Tab. I a II napipetovat DNA kalibrační přímky a neznámých vzorků (2,5 ul/jamka). Pracovat rychle, reagentie chladíme na ledu, destičku nevystavujeme zbytečně dlouho přímému světlu.
6. Do jamek označených jako „non template“ pipetujeme pouze vodu – slouží jako negativní kontrola.
7. Provést QPCR, po skončení běhu stanovit Treshold a jednotlivé C_t .

Program reakce:

I. Iniciační denaturační krok : 95°C/10 min.

II. 95°C/15s
III. 60°C/45s } 40x

IV. disociační krok: 95°C/15s; 60°C/60s; 95°C/15s; 60°C/15s

7. Vypočítat účinnost PCR z grafu: hodnoty log. ředění vs. průměrné hodnoty Ct , zjistit E, E%, R², směrnici přímky (k) – vzor viz Tab. III, Graf I.

Dle vzorců:

Výpočet efektivity reakce (E)

y=ax+b; kde a=k

Směrnice (k)= -Log (E+1)

$$E=10^{-1/k}$$

$$E[\%]= (E-1)\times 100$$

Tabulka I: Příprava kalibrační přímky pro gen *mecA*

Kalibrační přímka pro primery *mecA*1575 a *mecA* 1657 (300 nM, 300 nM)

Wells	Master Mix	Forward primer 5 μ M	Reverse primer 5 μ M	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
A1-A3	10	1,5	1,5	100 ng	2,5	4,5	20
A4-A6	10	1,5	1,5	10 ng	2,5	4,5	20
A7-A9	10	1,5	1,5	1 ng	2,5	4,5	20
A10-A12	10	1,5	1,5	0,1 ng	2,5	4,5	20
B1-B3	10	1,5	1,5	0,01 ng	2,5	4,5	20
B4-B6	10	1,5	1,5	0,001 ng	2,5	4,5	20
B7-B9	10	1,5	1,5	0,0001 ng	2,5	4,5	20

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	ul				

celogenomová DNA

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5 μ M	Reverse primer 5 μ M	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
07/629	C1-C3	10	1,5	1,5	10 ng	2,5	4,5	20
07/629	C4-C6	10	1,5	1,5	1 ng	2,5	4,5	20
07/759	C7-C9	10	1,5	1,5	10 ng	2,5	4,5	20
07/759	C10-C12	10	1,5	1,5	1 ng	2,5	4,5	20
Bez tem.	D1-D3	10	1,5	1,5	-	0	7	20

Tabulka II: Příprava kalibrační přímky pro gen *blaZ*

Tabulka II: Kalibrační přímka pro primery blaZ-F a blaZ-R (300 nM, 300 nM)

plazmidová DNA *S. aureus* Jevons B

Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem	počet částic přepočet
A1-A3	10	1,5	1,5	30 ng	2,5	4,5	20	
A4-A6	10	1,5	1,5	3 ng	2,5	4,5	20	
A7-A9	10	1,5	1,5	0,3 ng	2,5	4,5	20	
A10-A12	10	1,5	1,5	0,03 ng	2,5	4,5	20	
B1-B3	10	1,5	1,5	0,003 ng	2,5	4,5	20	
B4-B6	10	1,5	1,5	0,0003 ng	2,5	4,5	20	
B7-B9	10	1,5	1,5	0,00003 ng	2,5	4,5	20	

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	ull				

celogenomová DNA

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
07/629	C1-C3	10	1,5	1,5	10 ng	2,5	4,5	20
07/629	C4-C6	10	1,5	1,5	1 ng	2,5	4,5	20
07/759	C7-C9	10	1,5	1,5	10 ng	2,5	4,5	20
07/759	C10-C12	10	1,5	1,5	1 ng	2,5	4,5	20
Bez tem. tetetempl.	D1-D3	10	1,5	1,5	-	0	7	20

Tab. III: Předpokládaný výsledek

blaZ	1	2	3	4	5	6	genomova	genomova	genomova	Efektivita	Efektivita %			
							DNA Tr.COL 124 ng	DNA Tr.COL 12,4 ng	DNA Tr.COL 1,24 ng					
Qty (pg/ul)	14000	1400	140	14	1,4	0,14	403000	96200	10400	1,951651	95			
log Qty	4,146	3,146	2,146	1,146	0,146	-0,8539	5,605	4,983	4,017					
Ct (prumer)	13,5308	17,168	20,6172	24,2799	27,5558	30,6694	8,7016	10,8138	14,1348					
StDev +/-	0,0898	0,1136	0,0741	0,0594	0,1389	0,3111	0,2667	0,0629	0,0612					
mecA	1	2	3	4	5	6	genomova	genomova	genomova	genomova	genomova	genomova	Efektivita reakce	Efektivita reakce (%)
							DNA Tr.COL 124 ng	DNA Tr.COL 12,4 ng	DNA Tr.COL 1,24 ng	DNA COL 109 ng	DNA COL 10,9 ng	DNA COL 1,09 ng		
Qty (pg/ul)	29700	2970	297	29,7	2,97	0,297	103000	14100	927	126000	20700	2610	1,914186	91%
log Qty	4,473	3,473	2,473	1,473	0,473	-0,527	5,013	4,149	2,967	5,100	4,316	3,417		
Ct (prumer)	13,049	16,444	20,02	23,754	27	30,793	11,108	14,128	18,367	10,772	13,542	16,722		
StDev +/-	0,041	0,043	0,043	0,119	0,166	0,138	0,333	0,012	0,328	0,2	0,141	0,046		

Graf

