

qRT-PCR

Kryostat

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Mgr. Martina Lánová

RNDr. Josef Večeřa, Ph.D.

Bc. Lucie Smyčková

Izolace RNA – kvantifikace Nanodropem

Sample ID	ng/ul	<1 A260	A280	=2 260/280	260/230
1. DMSO	217,15	1,087	0,548	1,98	2,11
1. TCDD	202,6	1,013	0,517	1,96	2,2
2. DMSO	339,1	1,695	0,868	1,95	2,2
2. TCDD	295,5	1,477	0,742	1,99	2,21

A260... RNA
A280... DNA
A230... proteiny

Zpětný přepis mRNA do cDNA

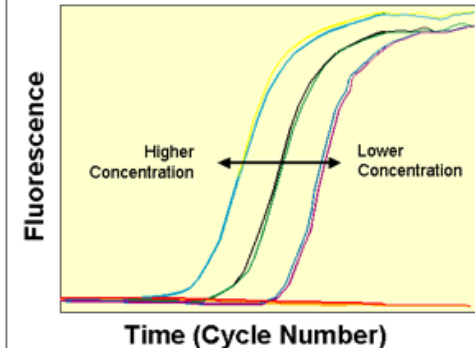
1. Změření koncentrace vyizolované RNA (Nanodrop) + kontrola kvality RNA
 - absorbance A260 nesmí být vyšší než 1 (případně ředit a měřit znova)
 - poměr absorbancí A260/280 musí být kolem 2
2. **Spočítat kolik ul RNA je 0,5 ug RNA, který vstupuje do RT**
3. Doředit do 21 ul sterilní RNase-free MQ H₂O
4. **Přidat 2 ul 10 uM směsi nukleotidů (PCR grade) ... ??? WS**
5. **Přidat 2 ul 20 uM primeru poly(dT)₁₅ ... ??? WS**
6. Mix – Centrifugace – 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 sterilní RNase-free MQ H₂O do celkového objemu 40 ul
10. Inkubace 50 min/37 C
11. Denaturace transkriptázy 10 min/90 C

Výsledkem získáme stejné množství molekul cDNA, jako bylo původních molekul mRNA v celkové RNA

Do qPCR vstupuje 1,5 ul z celkové cDNA

Real time PCR

Real-Time Monitoring of PCR



- LightCycler 480 (Roche)
- Do reakce se přidává Sybr Green (fluoreskuje jen po interkalaci do nově vytvořené dvouřetězcové 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**)
- Do jamky se pipetuje: **1,5 ul** cDNA z přepisu + Master mix:
 - 3 ul Sybr Green (2xcc LightCycler 480 SYBR green I master kit – obsahuje nukleotidy, polymerázu, SYBR green, MgCl₂)
 - 0,375 uM každého z primerů (SS 20 uM.... *Vypočítej kolik ul potřebujeme*)
 - **1,7 ul** MgCl₂ (SS 25 mM, *vypočítej výslednou koncentraci*)
 - Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O (celkový objem 20 ul)

Počítání

► Koncentrace bez přepočtu jednotek

SS 40 mM a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Trojčlenka: 20 uM.....100 ul ↑
 ↓ 40 mM.... x ul ↑
 x/100=0,02/40... 0,0005.100=x

Ředěním I: 40 mM.... 100 ul
 20 mM.... 50 ul
 20 uM.....50 nl = 0,05 ul

Ředěním II: 40 mM/0,02 mM = 2000 x ředěné
 100/2000

Vzorečkem: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ (pozor! Nutné stejné jednotky)
 $40x = 0,02 \cdot 100$ ul

► Koncentrace s přepočtem jednotek

SS: 40 mg/ml a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Nutné znát Mr látky (např 80)

1 M ... 80 mg/ml

0,5 M ... 40 mg/ml

► Ředění buněk

Spočítáme si, že máme $0,7 \times 10^6$ b v 2 ml (tj. $0,35 \times 10^6$ /ml)

A) chceme mít 1×10^6 /1ml

zjistíme, kolik máme buněk celkem ($0,7 \times 10^6$), Centrifugace a pak to doředíme 0,7 ml pufru

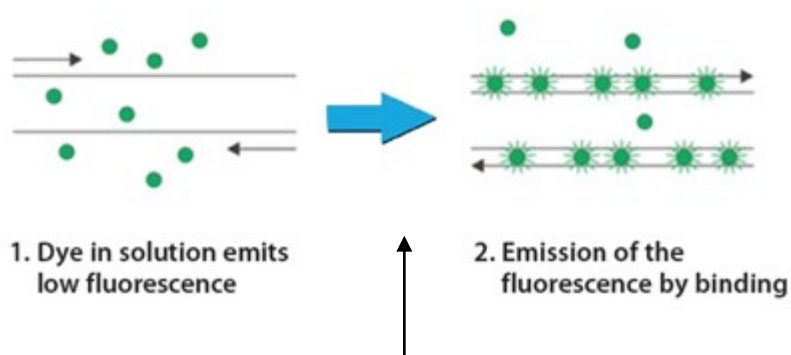
B) chceme odebrat 2×10^5 buněk = $0,2 \times 10^6$ buněk

$0,2/0,35 = 0,57$ ml vezmeme s původní suspenze

qRT-PCR

- Kvantifikace hladiny mRNA využívající reverzní transkripci a PCR
- Kvantifikace je umožněna použitím fluorescenčně značených molekul inkorporujících se do nových molekul DNA při PCR při každém cyklu
- Po každém cyklu je provedena detekce přírůstku (real time)
- Odpadá nutnost kvantifikace pomocí elektroforézy

Značení nových řetězců DNA



- ▶ Interkalace fluorochromů vázajících se jen do dvouřetězcové DNA (SybrGreen)
- ▶ Značení nukleotidů pomocí ^{32}P
- ▶ Použití fluorescenčně značených prób (TaqMan)

TaqMan® Applied Biosystems

Annealing

R is reporter fluorophore, which emits at a wavelength absorbed by the quencher fluorophore (Q).



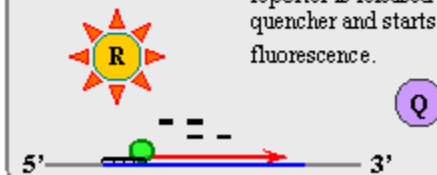
Probe displacement

DNA polymerase starts extending primers moving toward the probe.



Probe cleavage

The probe is degraded. The reporter is released from the quencher and starts to emit fluorescence.



Typy qRT-PCR

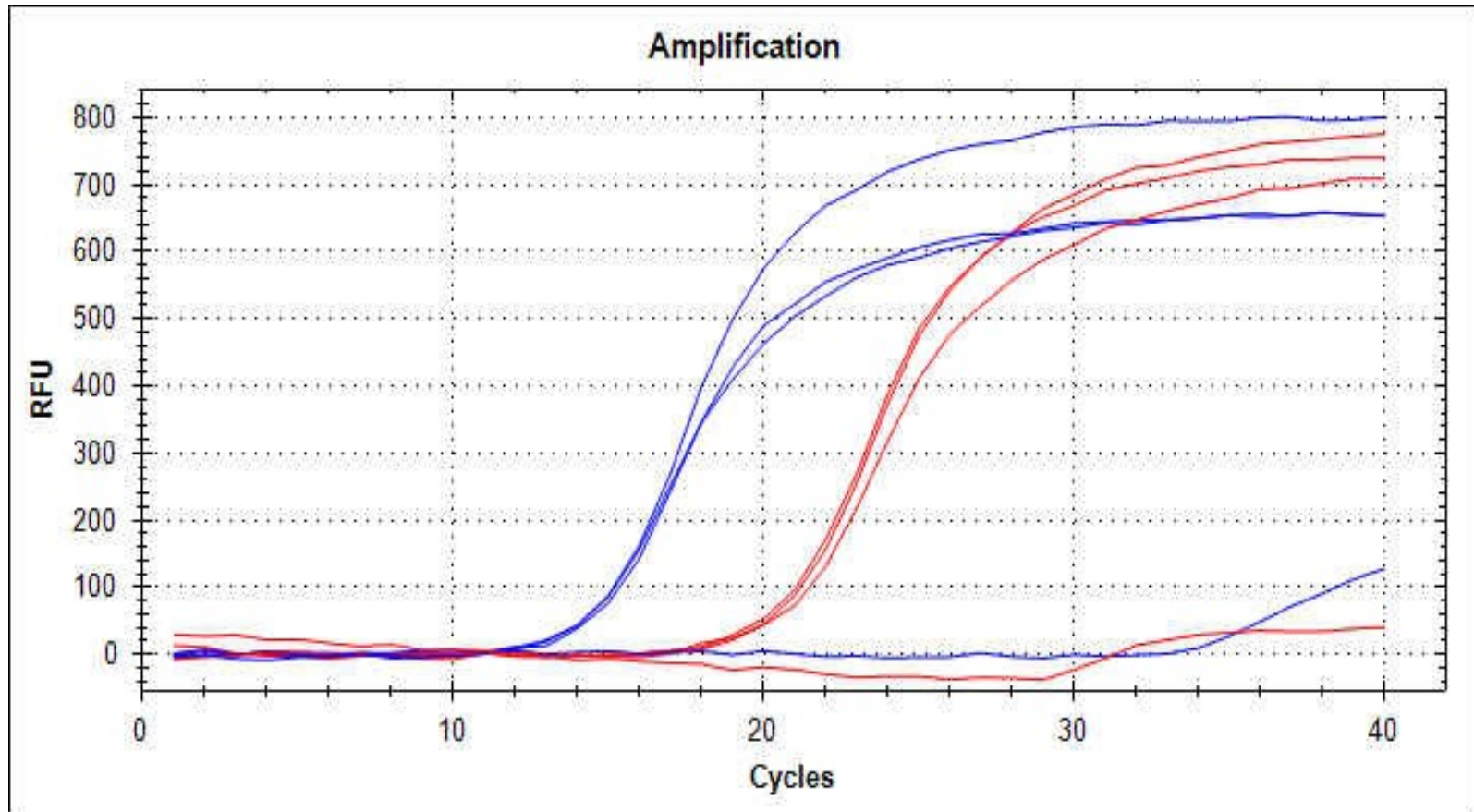
➤ One step qRT-PCR (BFU)

- 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

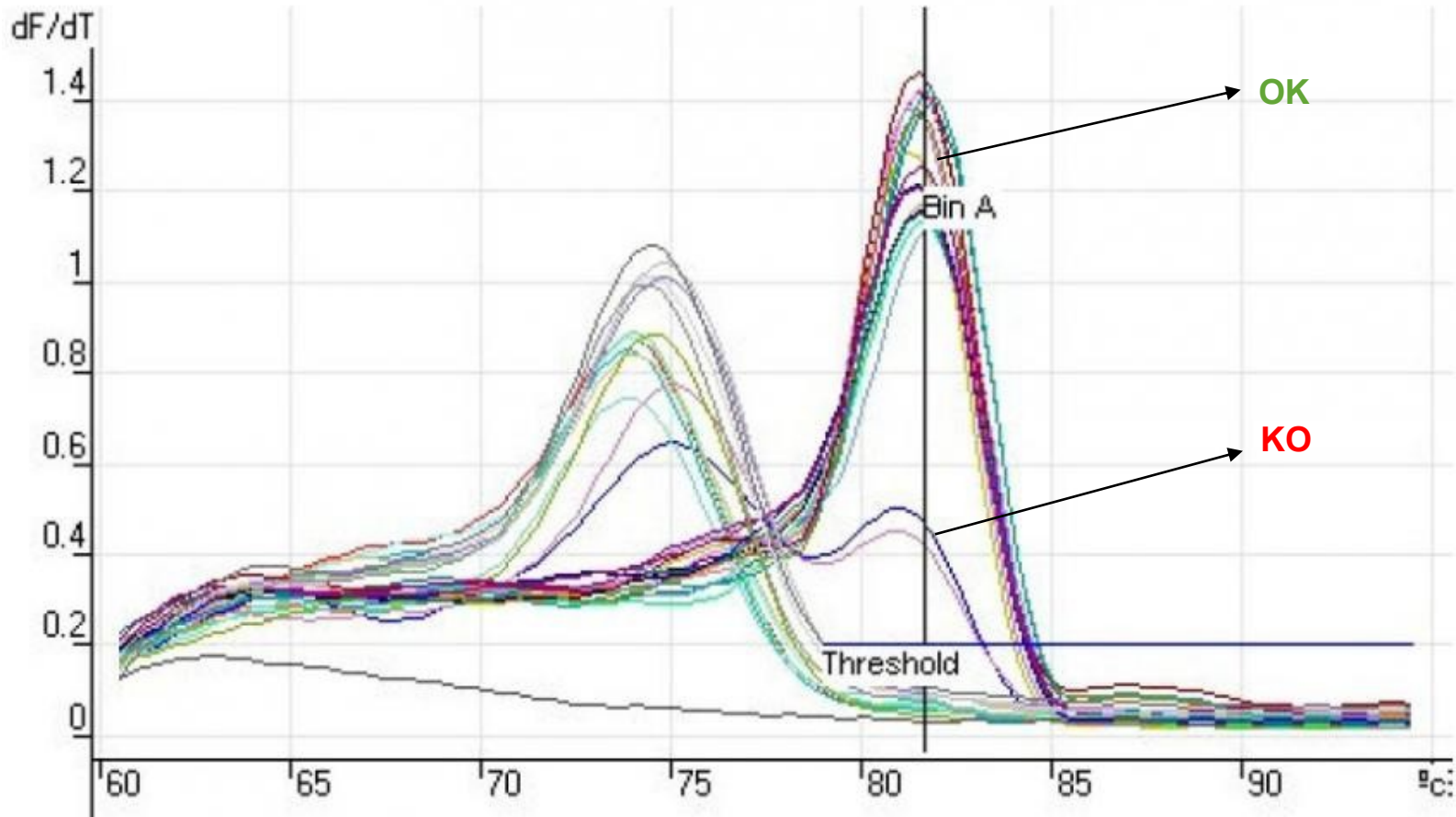
Příklad výstupu



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

Ověření specificity reakce

„melting curve“ ... hledání bodu tání produktu
jeden produkt = jeden bod tání = jeden peak



Vyhodnocení qRT-PCR

RT-PCR

Name	Cp		průměr	GAPDH	Průměr - GAPDH ↑ ΔC_p	$2^{-\Delta C_p}$
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

Kryostat

Příprava vzorků:

Zalítí do OCT (polyethylen glykol + polyvinyl alkohol)

Zamražení tkáně v -80 C

Krájení řezů v kryostatu (mikrotom v chladné komoře)
-20 až -30 C

Složení mrazící směsi: 44% - pentafluoroethane,
52% - trifluoroethane, 4% - tetrafluoroethane

Výhody kryorezů:

- 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 na fixovaných i nefixovaných vzorcích tkání

Nevýhoda: nižší kvalita preparátů

