

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*, *tetK* lokalizovaného na plazmidu a bakteriálního genu *SAU* 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 *SAU* 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 II. Všechny reakce jsou připravovány v triplicátech v optických 96-jamkových destičkách. Reakční směs je připravována v objemu 10 µl a obsahuje 5 µl 2× konc. Master Mix (Roche), primery o výsledné koncentraci 300 µM, příslušnou DNA v celkovém objemu 1,25 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 (transduktant).
2. Příprava kalibračních řad:
 - Tři různé kalibrační přímky:

I. skupina (Tab.I):

- kalibrační přímka z **celogenomové bakteriální DNA** (kmen Jevons B) pro stanovení počtu kopií genu *SAU*, ředění připravit v koncentracích: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg a 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: 30 ng, 3 ng, 0,3 ng, 30 pg, 3 pg, 0,3 pg a 0,03 pg

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

III. skupina (Tab.III):

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

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

Poznámka: Pracovat ideálně ve třech skupinách, každá skupina připraví jednu mastermix a jednu kalibrační přímku. Skupina I a II napipetuje jednu destičku dohromady, skupina III (gen tetK) napipetuje destičku zvlášť.

3. Přípravit Master Mix:

Master Mix	Objem [ul]	
	1x	...x
SYBR Green I Master	5	
Primer R (5uM)	0,75	
Primer F (5uM)	0,75	
PCR voda	2,25	
DNA	1,25	
Celkem	10	

4. Do jamek na 96 jamkové destičce pipetovat 8,75 ul takto připraveného mastermixu (triplikáty viz Tab. I, II a III).
5. Do jamek dle Tab. I, II a III napipetovat DNA kalibrační přímky a neznámých vzorků (1,25 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 .

Poznámka: V tabulce IV vidíte vzorové výsledky, koncentrace DNA jsou přepočítány na log hodnoty, je třeba též započítat objem DNA, který dáváte do reakce. Graf I ukazuje, jak by měl vypadat finální výstup v protokolu.

Program reakce:

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

II. 95°C/15 s
III. 60°C/45 s } 40x

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

8. Vypočítat účinnost PCR z grafu: hodnoty log. ředění vs. průměrné hodnoty C_t , zjistit E, E%, R^2 , směrnici přímký (k) – vzor viz Tab. III, Graf I.

Dle vzorců:

Výpočet efektivity reakce (E)

$y=ax+b$; kde $a=k$

Směrnice (k)= $-\text{Log}(E+1)$

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

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

Stanovení PCN – výpočty do protokolu

Z dat uvedených v pdf souborech, které exportujete po dokončení reakce:

1. Vytvořte graf závislosti log koncentrace na C_p standardu a neznámých vzorků

- proložte datové body regresní přímkou a vypočítejte rovnici přímký a R^2 pro oba běhy (kvantifikace genu *blaZ* nebo *tetK* a genu *SAU*) do jednoho grafu
- vypočítejte a uveďte efektivitu obou běhů v %
- zdůvodněte proč je hodnota E menší případně větší než 100%
- srovnajte svoje výpočty s výsledky uvedenými v pdf souborech

2. Vypočítejte hodnoty PCN pro oba neznámé vzorky podle vztahu uvedeného v zadání úlohy

Tabulka I: Příprava kalibrační přímky pro gen SAU

Kalibrační přímka pro primery SAU1 a SAU2 (300 nM, 300 nM)

celogenomová
DNA Jevons B

Wells	Master Mix	Forward primer 5 μ M	Reverse primer 5 μ M	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
A1-A3	5	0,75	0,75	100 ng	1,25	2,25	10
A4-A6	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
A7-A9	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
A10-A12	5	0,75	0,75	0,1 ng	1,25	2,25	10
B1-B3	5	0,75	0,75	0,01 ng	1,25	2,25	10
B4-B6	5	0,75	0,75	0,001 ng	1,25	2,25	10
B7-B9	5	0,75	0,75	0,0001 ng	1,25	2,25	10

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
Transdukta	C1-C3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C4-C6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C7-C9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transdukta	C10-C12	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	D1-D3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

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
D4-D6	5	0,75	0,75	30 ng	1,25	2,25	10	
D7-D9	5	0,75	0,75	3 ng	1,25	2,25	10	
D10-D12	5	0,75	0,75	0,3 ng	1,25	2,25	10	
E1-E3	5	0,75	0,75	0,03 ng	1,25	2,25	10	
E4-E6	5	0,75	0,75	0,003 ng	1,25	2,25	10	
E7-E9	5	0,75	0,75	0,0003 ng	1,25	2,25	10	
E10-E12	5	0,75	0,75	0,00003	1,25	2,25	10	

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	u				

celogenomová DNA z transduktant (*blaZ*)

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
Transduktanta	F1-F3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	F4-F6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	F7-F9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	F10-F12	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	G1-G3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

Tabulka III: Příprava kalibrační přímky pro gen *tetK* (na zvláštní destičku)

Tabulka III: Kalibrační přímka pro primery tetK-F a tetK-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	5	0,75	0,75	30 ng	1,25	2,25	10	
A4-A6	5	0,75	0,75	3 ng	1,25	2,25	10	
A7-A9	5	0,75	0,75	0,3 ng	1,25	2,25	10	
A10-A12	5	0,75	0,75	0,03 ng	1,25	2,25	10	
B1-B3	5	0,75	0,75	0,003 ng	1,25	2,25	10	
B4-B6	5	0,75	0,75	0,0003 ng	1,25	2,25	10	
B7-B9	5	0,75	0,75	0,00003	1,25	2,25	10	

počet vzorků		Master Mix	F primer	R primer	PCR voda
	u				

celogenomová DNA z transduktant (*tetK*)

Vzorek	Wells	Master Mix	Forward primer 5µM	Reverse primer 5µM	Koncentrace DNA	Templát	PCR voda	Konečný objem
Transduktanta	C1-C3	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	C4-C6	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	C7-C9	5	0,75	0,75	10 ng	1,25	2,25	10
Transduktanta	C10-	5	0,75	0,75	1 ng	1,25	2,25	10
Bez tem.	D1-D3	5	0,75	0,75	-	0	3,5	10

Tab. IV: Předpokládaný výsledek (vzor)

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 I:



