

qRT-PCR

Kryostat

Mgr. Jiřina Medalová, Ph.D.

Mgr. Martina Lánová

RNDr. Josef Večeřa, Ph.D.

Izolace RNA – kvantifikace Nanodropem

	ng/ul	<1 A2660	A280	=2 A260/A280
DMSO I	375,65	0,885	0,456	1,94
TCDD I	401,2	0,984	0,523	2,01
DMSO II	487,6	1,219	0,605	2,01
TCDD II	383,1	0,941	0,541	1,88

A260... RNA

A280... DNA

Zpětný prepis mRNA do cDNA

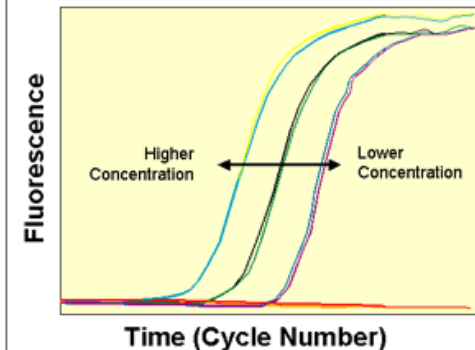
1. Změření koncentrace vyizolované RNA (Nanodrop) + kontrola kvality RNA
 - absorbance A260 nesmí být vyšší než 1 (případně ředit a měřit znova)
 - poměr absorbcí A260/280 musí být kolem 2
2. Spočítat kolik ul RNA je 1 ug RNA, který vstupuje do RT
3. Doředit do 11,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O
4. Přidat 1ul 0,5 ug/ul primeru poly(dT)18 ... ??? WS
5. Mix – Centrifugace – annealing primerů 5 min/65 C – přenos na 4 C
6. Přidat 4 ul 5xcc pufru pro traskriptázu s 0.1 M DTT (zrušení disulfidových můstků)
7. Přidat 0,5 ul RiboLock RNázového inhibitoru (inhibice potencionálně přítomných RNáz)
8. Přidat 2 ul 10 uM směsi nukleotidů (PCR grade) ... ??? WS
9. Přidat 1ul reverzní transkriptázy RevertAid (200 U)
10. Celkový objem je 20 ul
11. Inkubace 60 min/42 C
12. Denaturace transkriptázy 10 min/70 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

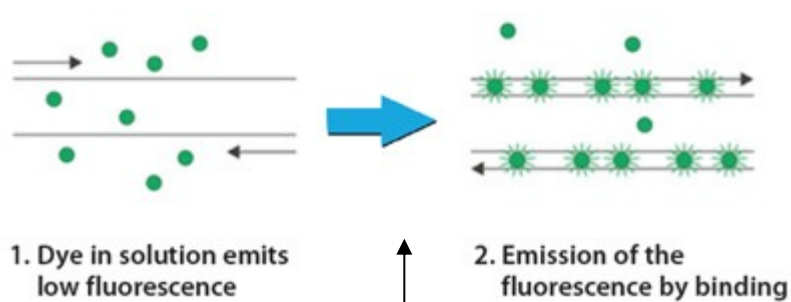


- LightCycler 480 (Roche)
- Do reakce se přidává Sybr Green (fluoreskuje jen po interkalaci do nově vytvořené dvouřetězcové DNA)
- Po každém cyklu se změří fluorescence vzorku
- Čím vyšší fluorescence, tím více produktu vzniklo
- Čím více molekul cDNA ve vstupu, tím dříve se začíná množit exponenciální řadou (dřívější cyklus – výstupní parametr **C_p**)
- Do jamky se pipetuje: **1,5 ul** cDNA z přepisu +
- Master mix:
 - 3 ul Sybr Green (2xcc LighCycler 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)

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

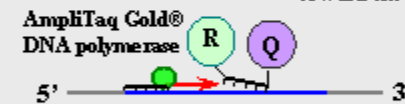
Annealing

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



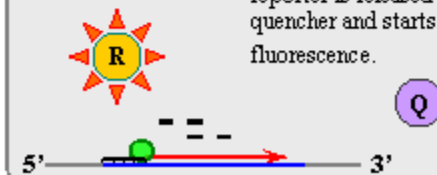
Probe displacement

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

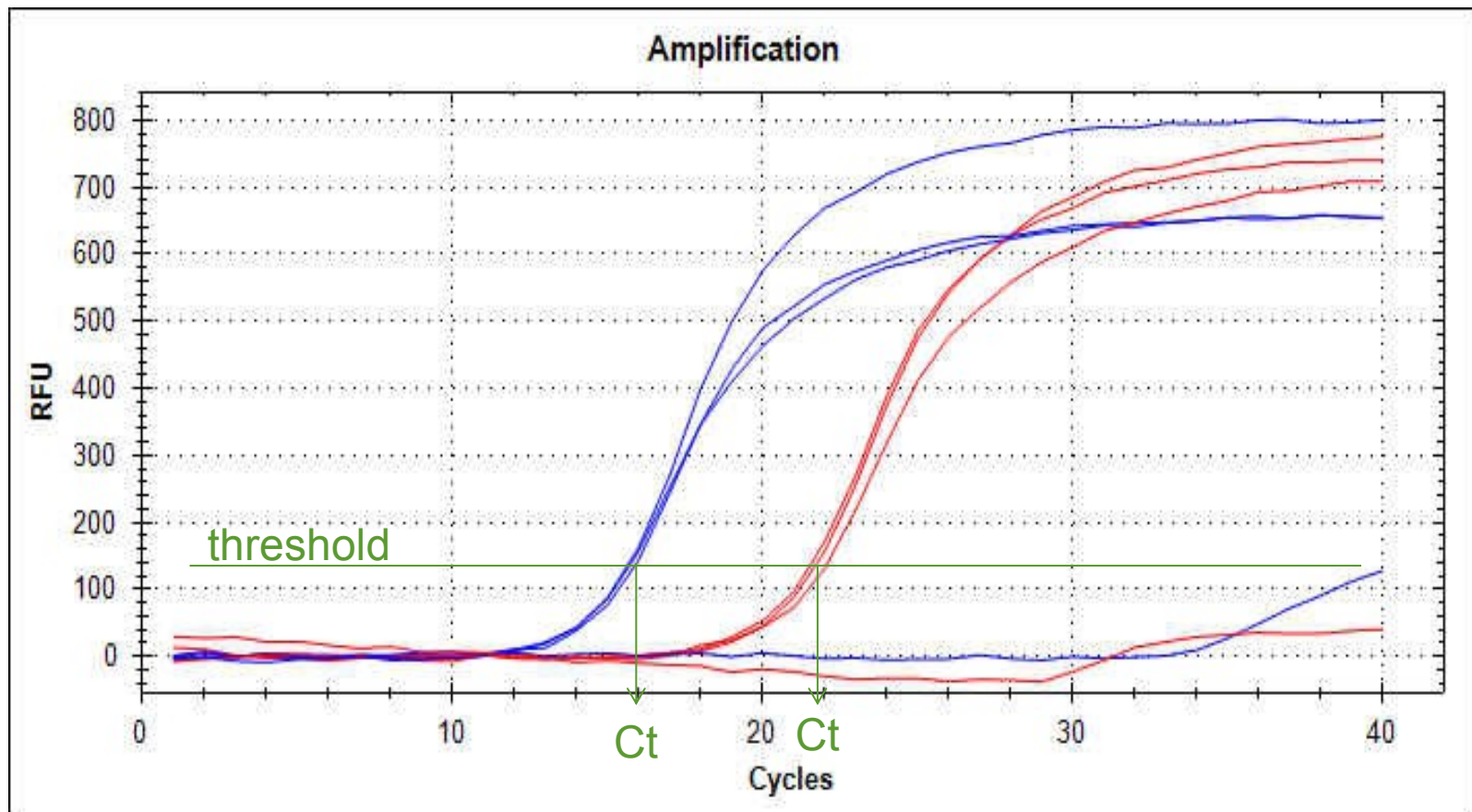
➤ One step qRT-PCR (BFU)

- 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

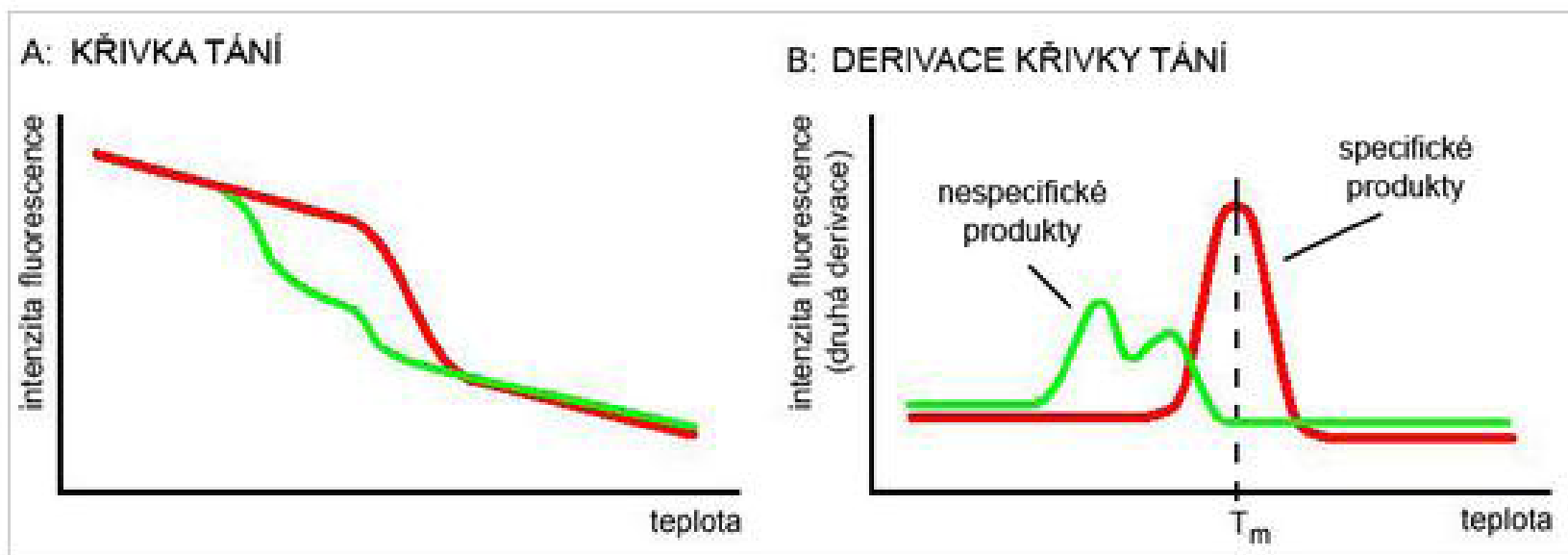
Příklad výstupu



Získání hodnoty Ct: 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	Ct		průměr	HPRT	Průměr - HPRT ↑ ΔCt	$2^{\Delta Ct}$
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

Počítání

► Koncentrace bez přepočtu jednotek

SS 40 mM a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Trojčlenka: 20 uM.....100 ul ↑
 ↓ 40 mM.... x ul ↑
 $x/100=0,02/40... 0,0005 \cdot 100=x$

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: $c1 \cdot V1 = c2 \cdot V2$ (pozor! Nutné stejné jednotky)
 $40x = 0,02 \cdot 100 \text{ ul}$

► 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 $0,35 \times 10^6 / \text{ml} = 0,7 \times 10^6$ b v 2 ml

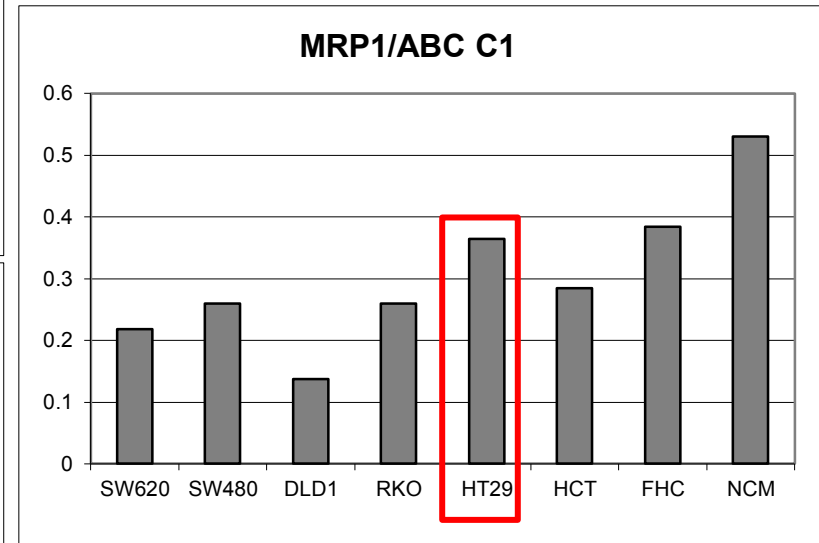
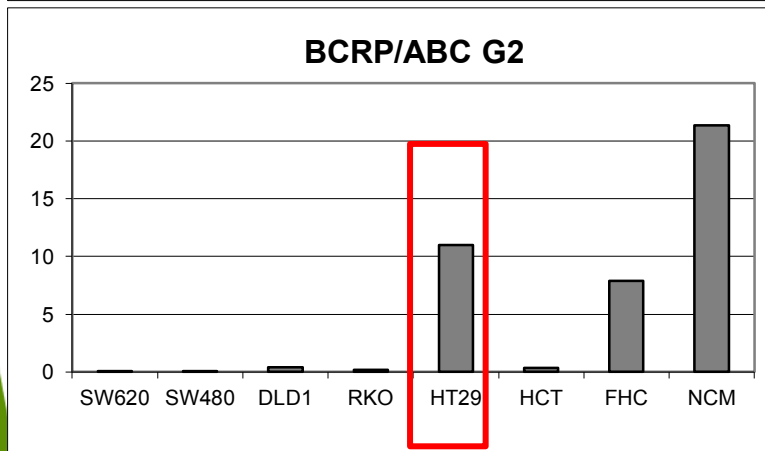
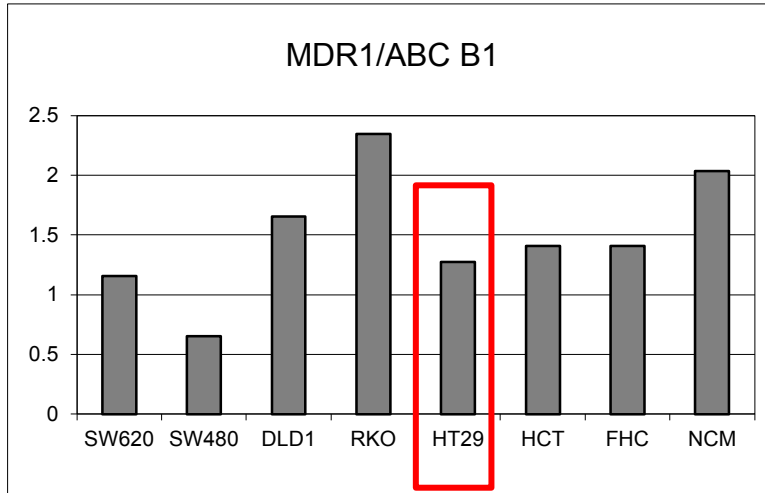
A) chceme mít $1 \times 10^6 / 1 \text{ml}$

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 z původní suspenze

Srovnání exprese ABC transportérů u střevních linií



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 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 na fixovaných i nefixovaných vzorcích tkání

Nevýhoda: nižší kvalita preparátů

