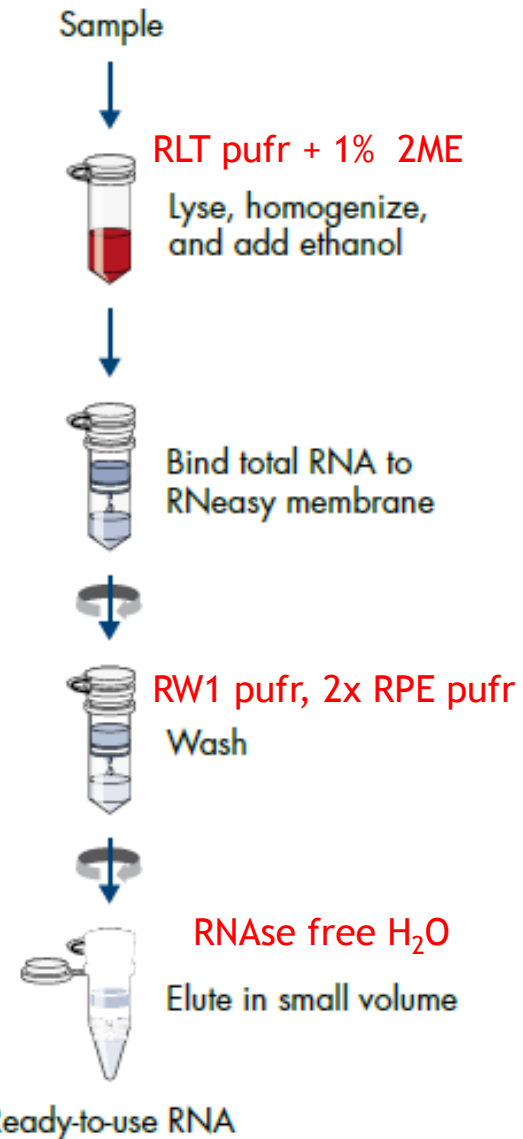


qRT-PCR

# Izolace celkové RNA

- ▶ Rneasy total RNA isolation kit (Quiagen)
  - ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=8zVGVFCs2mA>
- ▶ Podrobný návod:
  - ▶ <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- ▶  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  buněk opláchnutých PBS

## RNeasy Procedure



# Kvantifikace RNA a výpočet pro zpětnou transkripci

<http://www.u.arizona.edu/~gwatts/azcc/InterpretingSpec.pdf>

## 1. Kontrola kvality RNA

1. Absorbance 260 by měla být 0,2-1,2 jinak naředit
2. Poměr A260/280 by měl být kolem 2,1
3. Poměr A260/230 by měl být kolem 2, pod 1,8 nevhodné pro RT

## 2. Odečet koncentrace RNA

## 3. V kolika ul je 1000 ng?

$1000/91,6 = 10,9$  ul odebereme na RT, dořídíme do **11,5** ul RNase free H<sub>2</sub>O

## 4. Přidáme 1 μl 20 mM Oligo(dT)

## 5. Inkubace vzorků 5 minut při 65 °C (PCR cykler).

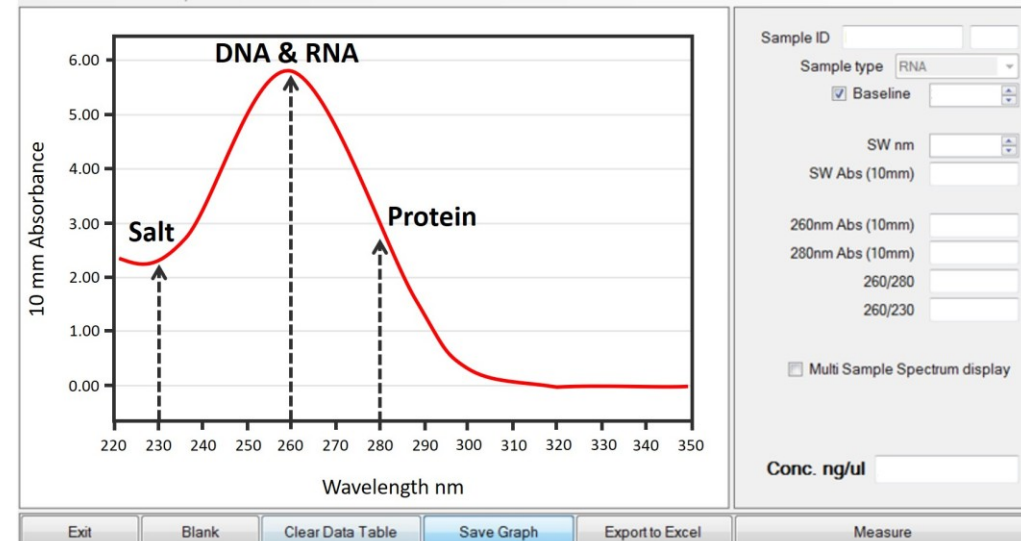
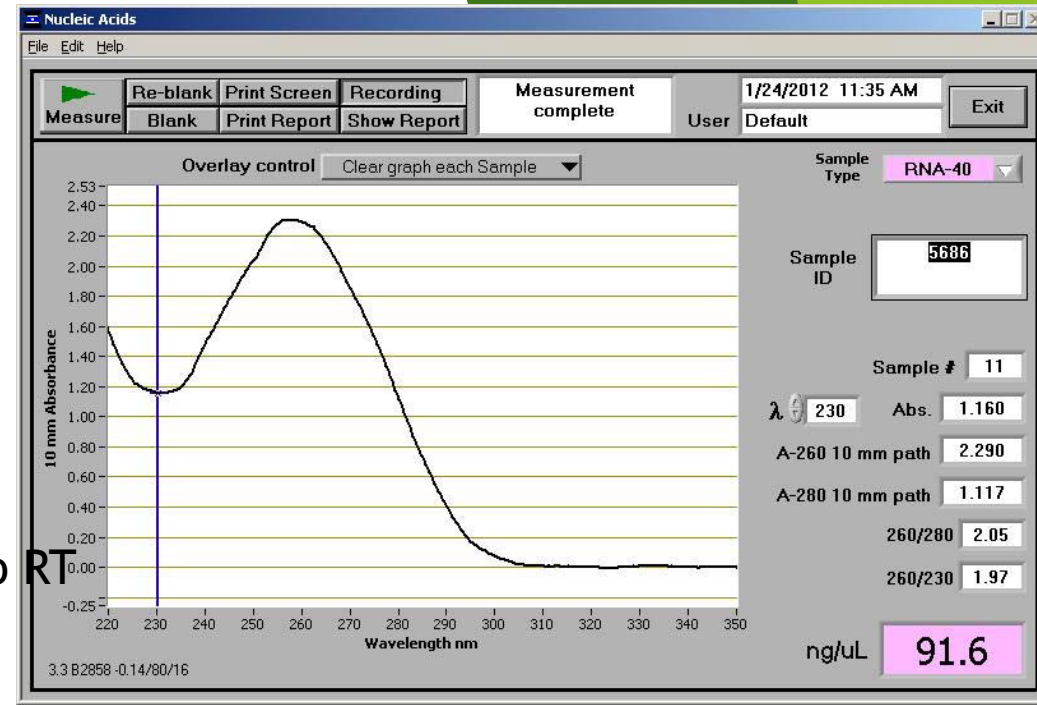
## 6. Připravíme reakční mix:

	1 vzorek	x vzorků
5x RT reakční pufr	4 ul	
dNTP	2 ul	
RiboLock	0,5 ul	
RevertAid RT	1 ul	

## 7. Připipetovat po 7,5 ul, celkový objem 20 ul

## 8. Inkubace při 42 °C po 1 h (PCR cykler)

## 9. Ukončení reakce denaturací RT při 70 °C/10 min



# Design primerů

Nalezení vhodného templátu mRNA

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

Nastavení parametrů pro design primerů

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT\\_SEQUENCE=NM\\_004996.4&LINK\\_LOC=nucore](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT_SEQUENCE=NM_004996.4&LINK_LOC=nucore)

Primery - příklad

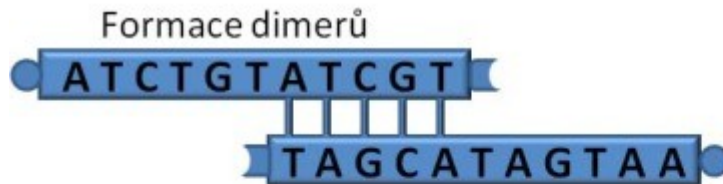
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg\\_time=1605692810&job\\_key=gYte8UoMR6RgmkKfT\\_9mrTXkd58Y92yCGQ](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1605692810&job_key=gYte8UoMR6RgmkKfT_9mrTXkd58Y92yCGQ)

Otestování kvality primerů a zjištění optimální annealingové teploty

<http://oligo.net/downloads.html>

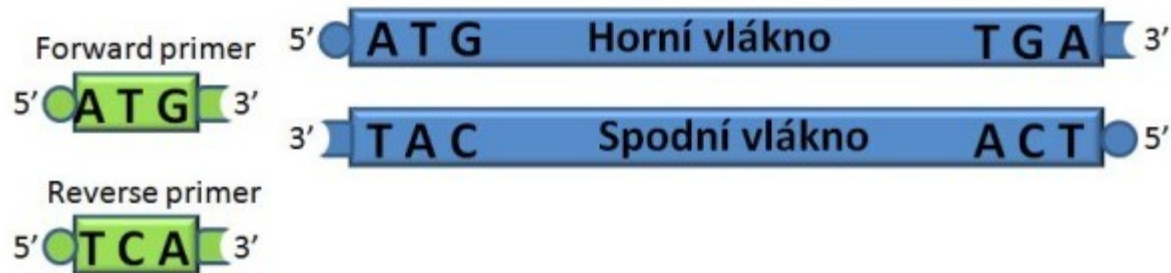
# Délka a sekvence primerů (SW Oligo)

- Primery jsou obvykle 20-25 nt dlouhé.
- Primery v daném páru musí mít srovnatelný počet GC:AT párů. Upřednostňujeme primery s 50 – 60% obsahem GC nebo AT párů.
- Sekvence mezi oběma primery nesmí být výrazně komplementární, vznikaly by tzv. dimery – Oligo SW
  - Rovněž nesmí být komplementarita v rámci sekvence primeru. Došlo by ke vzniku vlásenky



# Základy navrhování primerů

- v běžném zápisu sekvence DNA se zapisuje horní vlákno z dvouřetězcové molekuly DNA, a to ve směru 5'→3'.
- Sekvence předního („forward“) primeru je totožná se sekvencí běžně zapisovaného, tj. horního vlákna. Přední primer umožňuje syntézu horního vlákna podle templátového spodního vlákna.
- Zadní („reverse“) primer se navrhuje jako komplementární sekvence k hornímu vláknu, která je navíc v reverzní orientaci, tzn., že je zapisovaná ve směru 3'→5'. Takže při navrhování sekvence reverse primeru podle horního řetězce, musíme číst sekvenci primeru odzadu. Reverse primer umožňuje syntézu dolního vlákna podle templátového horního vlákna.



## Nasedání primerů a směr syntézy



# Teplota annealingu primerů

- Čím větší délka a vyšší obsah GC párů, tím je teplota nasedání vyšší
- Teplota nasedání primerů musí být dostatečně vysoká, aby nedošlo k nespecifickému nasedání primerů k templátové DNA, pokud by ale byla příliš vysoká, primery by nenasedaly vůbec.
- Je třeba, aby teplota nasedání byla optimální pro oba primery a obsah GC párů v obou primerech byl srovnatelný, tzn., aby byla srovnatelná teplota nasedání obou primerů.
- Pro výpočet teploty primerů můžete použít některý ze SW – oligo
- Se zvyšující se koncentrací  $Mg^{2+}$  se zvyšuje annealingová teplota

Co zohlednit při navrhování primerů:



[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT\\_SEQUENCE=NM\\_004996.4&LINK\\_LOC=nucore](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT_SEQUENCE=NM_004996.4&LINK_LOC=nucore)

PCR product size: SybrGreen 100-500, sonda UPL (Roche) cca 70-150

Exon junction span - primers must span exon-exon junction

Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

# Ředění primerů

Nr.	Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	OD	µg	nmol	Konzentration [pmol/µl]	Vol. für 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt	Synthese Maßstab	Reinigung	Modifikation	Barcode IDO	QC Rep
1	MERTKF	CACCATGAAAATAAACAA TGAAGAGATCG (29)	9.7	238	26,7	-	267	61,0	8944	34,5 %	0.05 µmol	HPLC	-	 016945549	-
2	MERTKR	GGACTTCTGAGCCTTCTG AGGAG (23)	8.9	255	35,9	-	359	64,2	7095	56,5 %	0.05 µmol	HPLC	-	 016945550	-

1. Když k lyofylizátu přidáme 267 µl dostaneme koncentraci 100 pmol/µl = 100 µM (µM/l)
2. Ředíme na výslednou koncentraci 0,1-1 µM podle toho, aby se nám to vešlo do lahvičky (2 ml)  
20 µM, 40 µM nebo



# Real time PCR

**Templátová DNA:** 1,5 ul cDNA do každé jamky

**Primery:** pro 25 µl reakci použijeme 0,25-2,5 µl z obou primerů. Množství primerů musí být optimální. Příliš vysoká koncentrace vede k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo párování primerů navzájem. Příliš nízká koncentrace primerů může vést k nedostatečnému množství produktu.

**dNTP směs:** je směs dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Obvyklá koncentrace každého dNTP v reakci je 200 µM (0,2 mM).

**MgCl<sub>2</sub>:** obvyklá koncentrace je 1,5 mM. MgCl<sub>2</sub> je nutný pro procesivitu a přesnost Taq polymerázy. Koncentrace MgCl<sub>2</sub> se odvíjí od koncentrace dNTP a platí, že pro specifitu reakce musí koncentrace MgCl<sub>2</sub> převyšovat koncentraci dNTP. Pro zvýšení specifity reakce zvyšujeme koncentraci MgCl<sub>2</sub>, a to až k 5 mM, přičemž koncentraci dNTP držíme stále na stejné úrovni. Někteří výrobci Taq polymerázy dodávají MgCl<sub>2</sub> zahrnuté do reakčního pufru.

**SybrGreen:** Interkalační barvivo je součástí reakčního pufru, ale v rámci šetření ředíme.

**Kontroly:** Používáme negativní a pozitivní kontrolu, pokud je to možné. V negativní kontrole použijeme místo testovaného vzorku vodu, tzn., negativní kontrola neobsahuje testovanou DNA. Pozitivní kontrola naopak obsahuje takovou DNA, která nám zajistí vznik požadovaného produktu.

# Real time PCR mix

Celkem 20 ul v jamce:

1,5ul cDNA templátu

18,5 ul Master mixu:

3 ul 2xcc Roche - LighCycler 480 SYBR green I master kit (směs nukleotidů, FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR green, MgCl<sub>2</sub>)

0,375 ul každého z primerů (SS 20 uM)

1,7 ul MgCl<sub>2</sub> (SS 25 mM)

Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H<sub>2</sub>O

primer (μM)	SYBR (μl)	MgCl <sub>2</sub> (μl)	voda (μl)	primer 1 (μl)	primer 2 (μl)	templát (μl)
10	3	1,7	12,3	0,75	0,75	1,5
20	3	1,7	13,05	0,375	0,375	1,5
40	3	1,7	13,425	0,1875	0,1875	1,5
20/40	3	1,7	13,24	0,375	0,1875	1,5

	Sybr green	1. primer	2. primer	MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
1 vzorek	3	0,375	0,375	1,7	13,05 ul

x vzorků

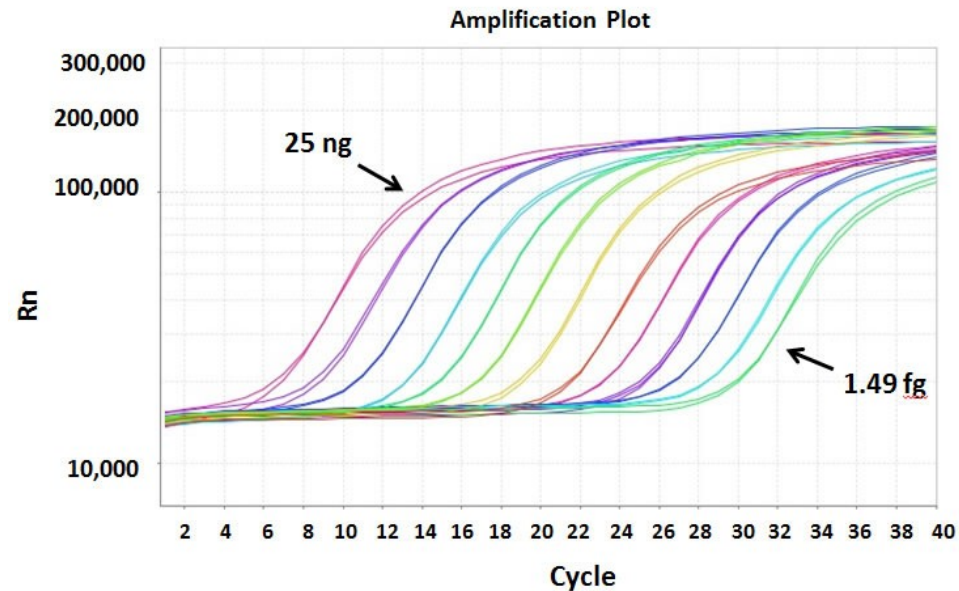
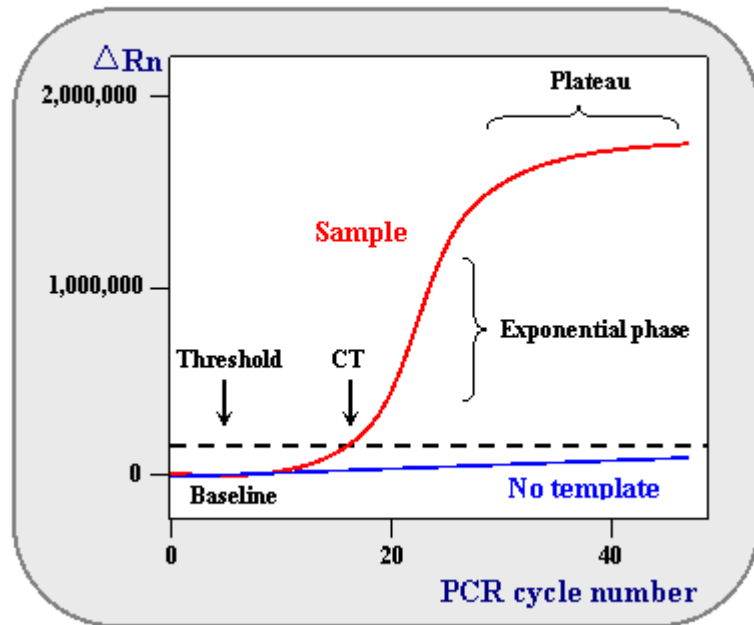
Pipetování reakcí:

<https://www.youtube.com/watch?v=0rCxdtlXNj8>

# Hodnocení kvantitativní real time PCR

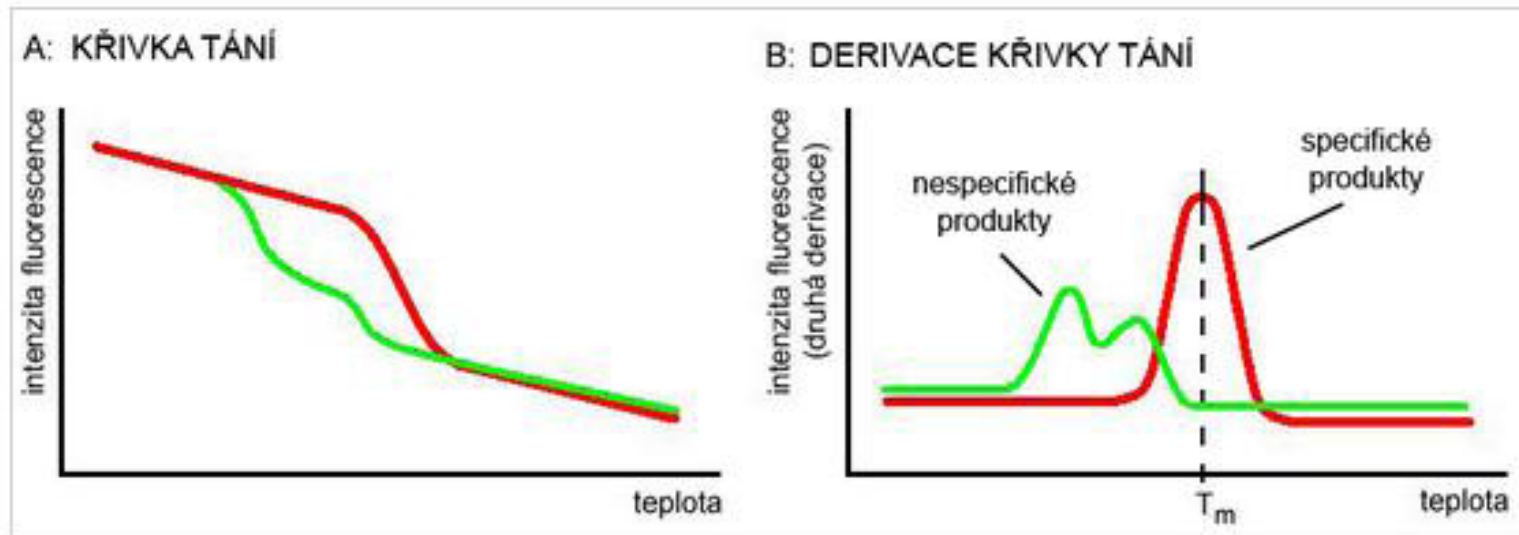
- ▶ Určení Ct (Cp) - manuálně nebo pomocí maxima 2. derivace - bod, kde dochází k strmému stoupání amplifikační křivky vzorku
- ▶ Čím vyšší Ct, tím méně molekul mRNA bylo ve vzorku

**Model of real time quantitative PCR plot**



# Křivka tání (melting curve)

- ▶ Na konci reakce proběhne postupné zahřívání celé reakce, po dosažení bodu tání  $T_m$  dojde k degradaci DNA (pokles fluorescence)
- ▶ Specifitu reakce ilustruje křivka tání (melting curve) - musí mít jen jeden vrchol = jeden produkt



Více info: [https://theses.cz/id/go0fw3/Bakalarska\\_praceEliska\\_Ruzickova.pdf](https://theses.cz/id/go0fw3/Bakalarska_praceEliska_Ruzickova.pdf)  
<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

# Hodnocení kvantitativní real time PCR

#####	Samples	MeanCp	hprt					
myo D				DCp	2 <sup>-</sup> DCp	x10	na K	
1 k 1d	A1, B1	19,75474	19,58113		0,17361829	0,8866163	8,866163	1
1 a26 1d	A2, B2	20,6692	19,33026		1,33894189	0,3953105	3,953105	0,445864
1 a30 1d	A3, B3	19,99559	19,50746		0,4881269	0,7129501	7,129501	0,804125

Velmi důkladné video o celé RT PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=9UWKIFGh0h0>