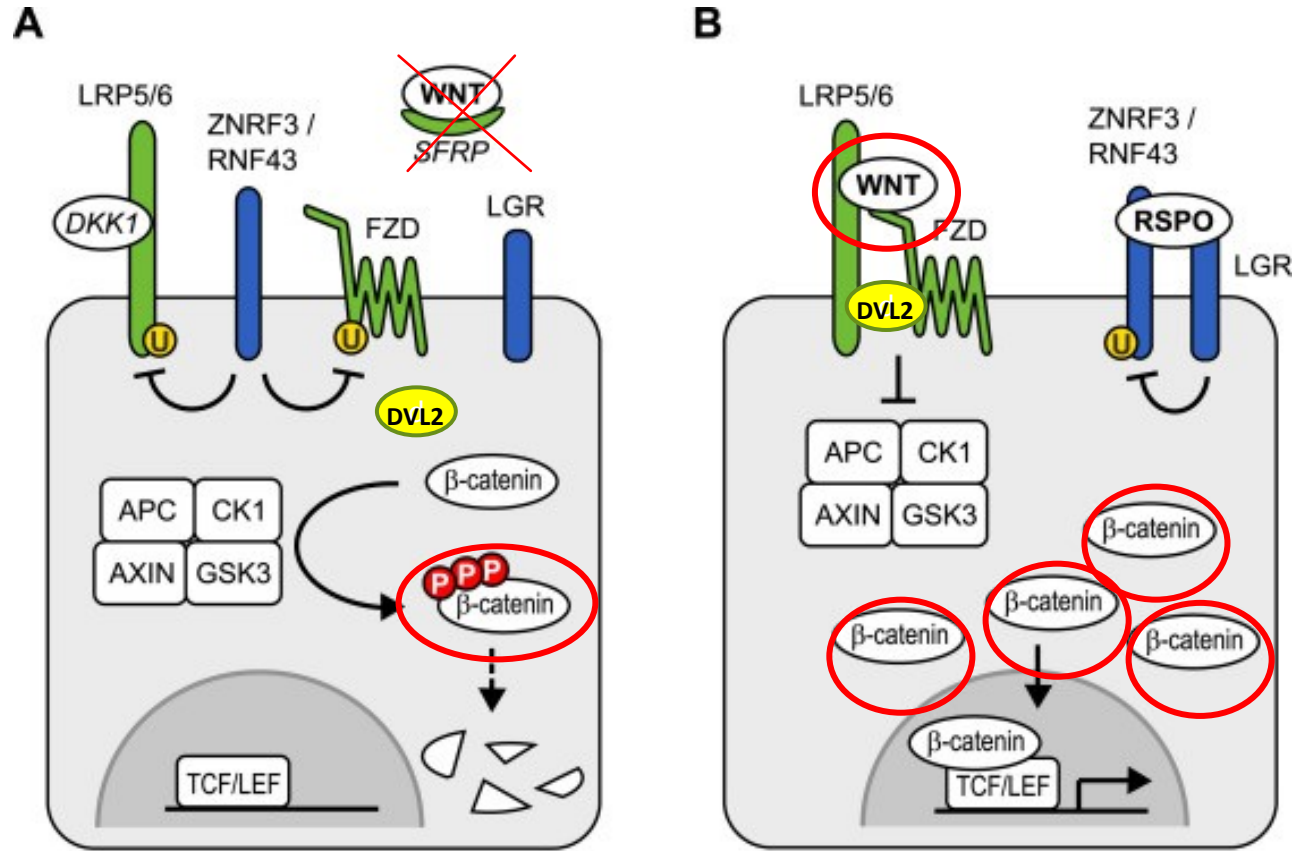
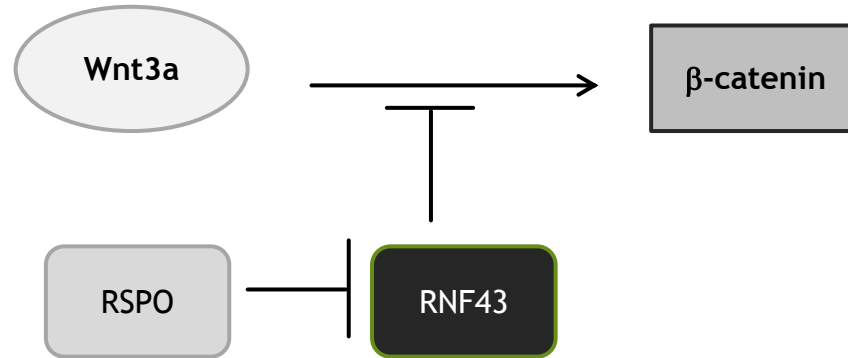


Wnt signaling



- P** Phosphorylation
- U** Ubiquitination

Očekávané výsledky



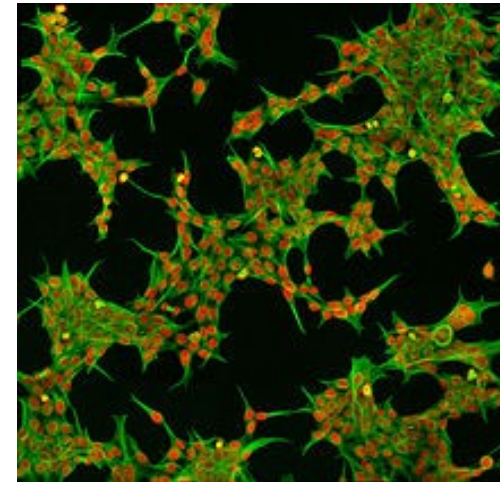
1. -CTR bez LGK-974 = catenin kontrolní hladina před ovlivněním exportu Wnt (450 ul DMEM)
2. CTR = catenin kontrolní hladina (450 ul DMEM + 0,45 ul LGK)
3. WNT3a = catenin ↑ (300 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a + 0,45 ul LGK)
4. RSPO = catenin ↑↑ (300 ul DMEM + 150 ul CM RSPO + 0,45 ul LGK)
5. WNT+ RSPO+ 0,45 ul LGK) = catenin ↑↑↑ (150 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a + 150 ul CM RSPO +

Metody

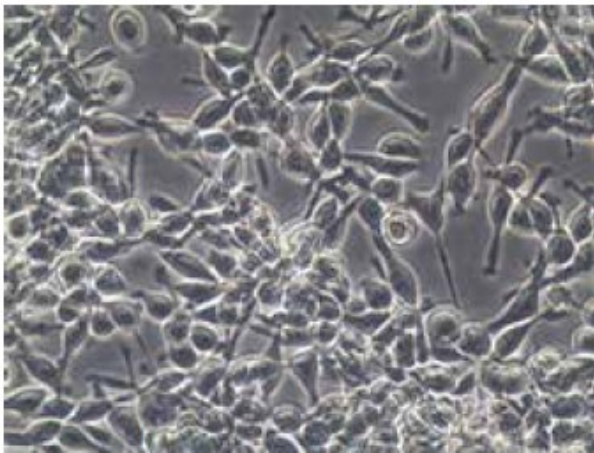
- ▶ Transfekce buněk
- ▶ RT-PCR
- ▶ Western blotting
- ▶ Imunoprecipitace
- ▶ Imunofluorescence

Modelová buněčná linie - HEK293

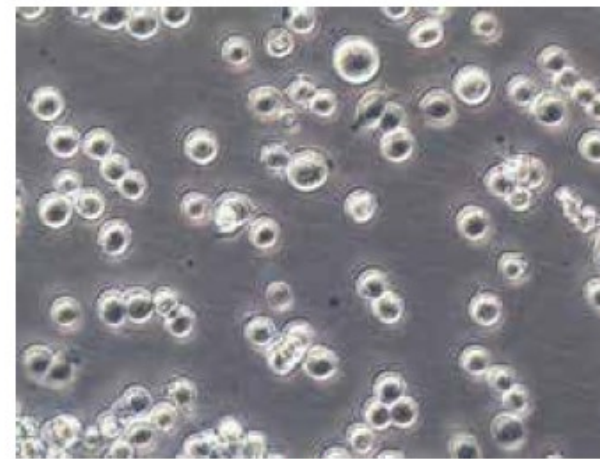
- ▶ linie odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk (1973), transformovaná (adenovirus 5 DNA)
- ▶ široce používaná - rychlý růst, výborně transfekovatelná - využití pro produkci rekombinantních proteinů
- ▶ existuje několik variant této buněčné linie, může růst jako adherentní i suspenzní



(Gibco, 2015; wikipedia.org)



adherentní



suspenzní

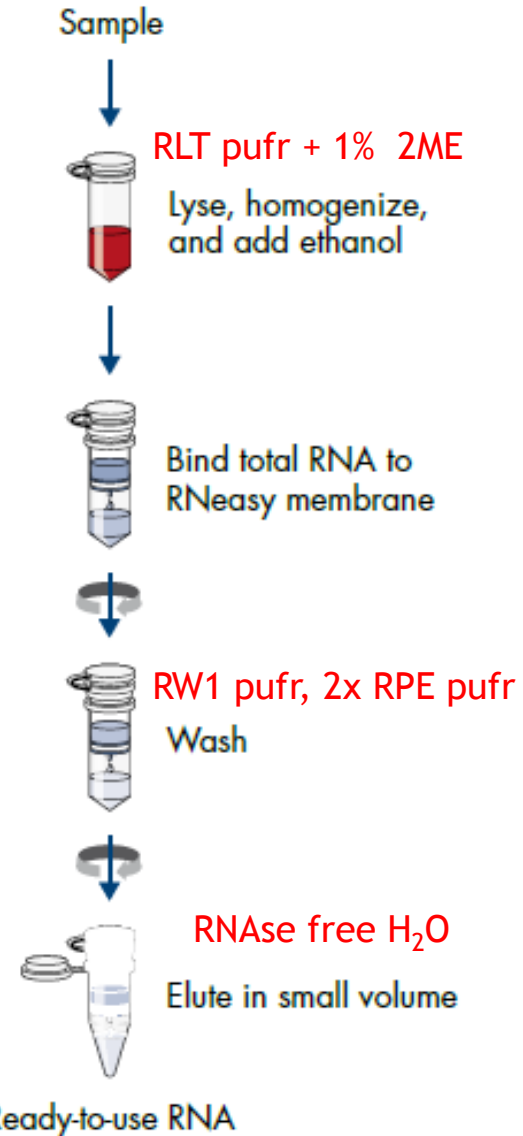
qRT-PCR

- ▶ dynamická regulace hladiny mRNA - detekce změn je zásadní pro studium změn exprese specifických genů;
- ▶ Kvantifikace exprese proteinů podle množství molekul mRNA využívající reverzní transkripci a PCR
- ▶ Reverzní transkripce převede mRNA na cDNA
 - ▶ **Primery oligoT**, náhodné hexa-nona oligonukleotidy, specifické primery pro konkrétní RNA
- ▶ Kvantifikace je umožněna použitím fluorescenčně značených molekul SYBR green – nárůst fluorescence po každém cyklu
- ▶ Po každém cyklu je provedena detekce přírůstku = odpadá nutnost kvantifikace pomocí elektroforézy

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>
- ▶ 1×10^6 - 1×10^7 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 - 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 RNA odebereme na RT, doředíme do **12** ul RNase free H₂O

4. Přidáme **1** ul 20 mM Oligo(dT)

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

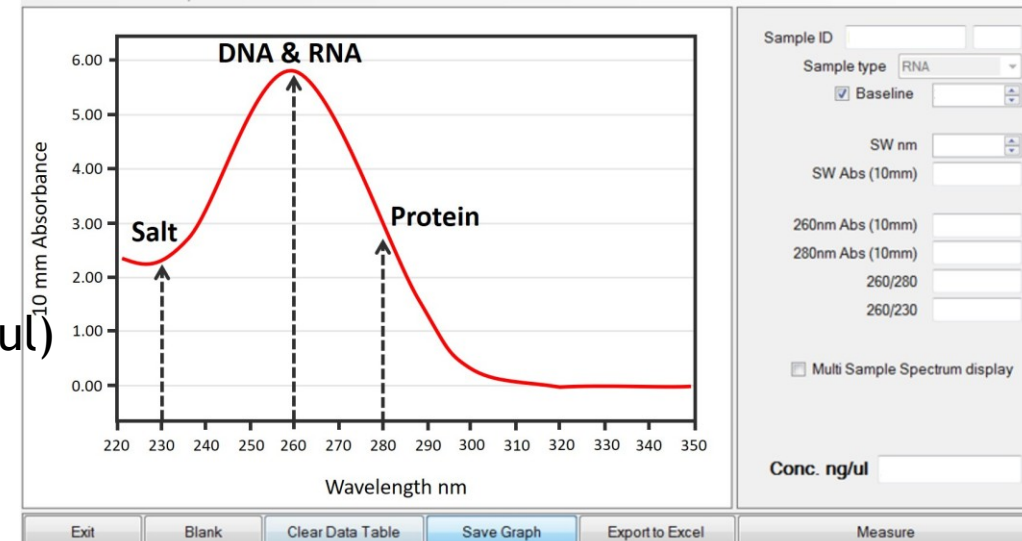
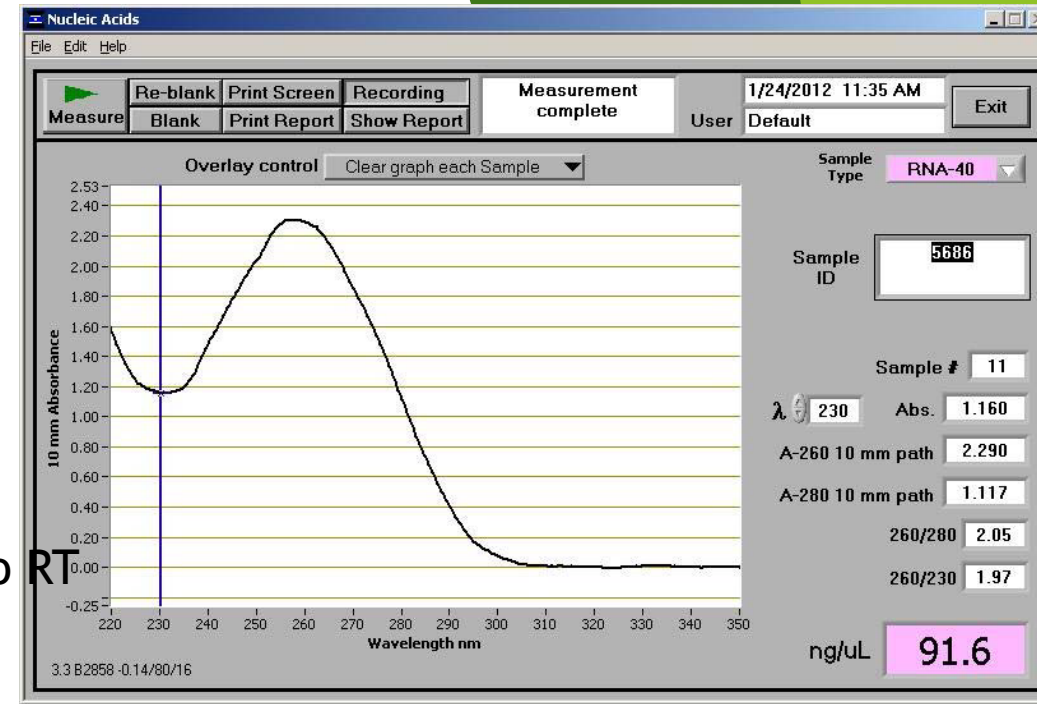
6. Připravíme reakční mix:

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

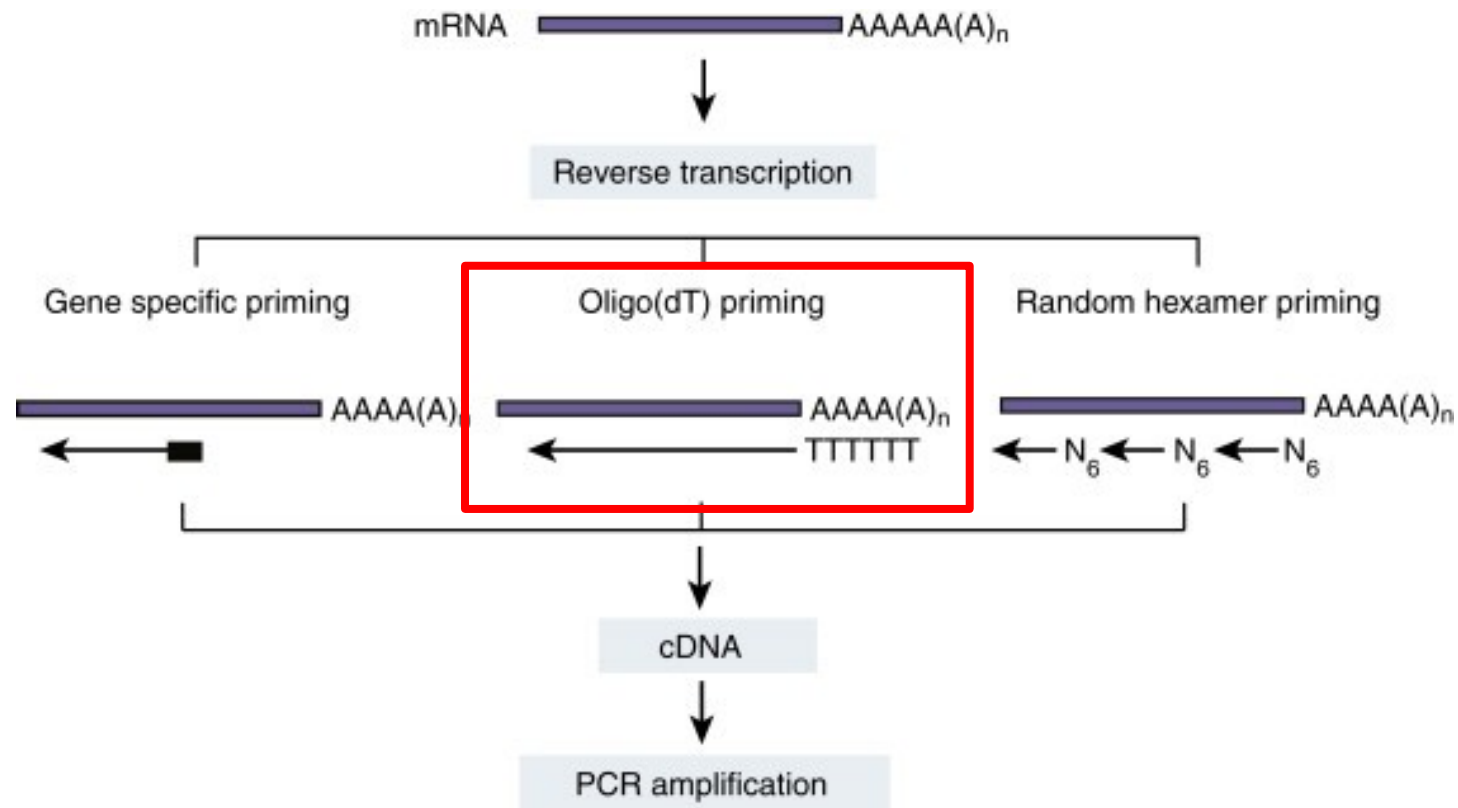
7. Připipetovat ke směsi RNA a oligo dT po **7** ul (celkový objem **20** ul)

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

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



Princip revezní transkripce



<https://microbeonline.com/rt-pcr-principles-applications/>

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, MgCl₂)

0,375 ul každého z primerů (SS 20 uM)

1,7 ul MgCl₂ (SS 25 mM)

Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O

primer (μM)	SYBR (μl)	MgCl ₂ (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

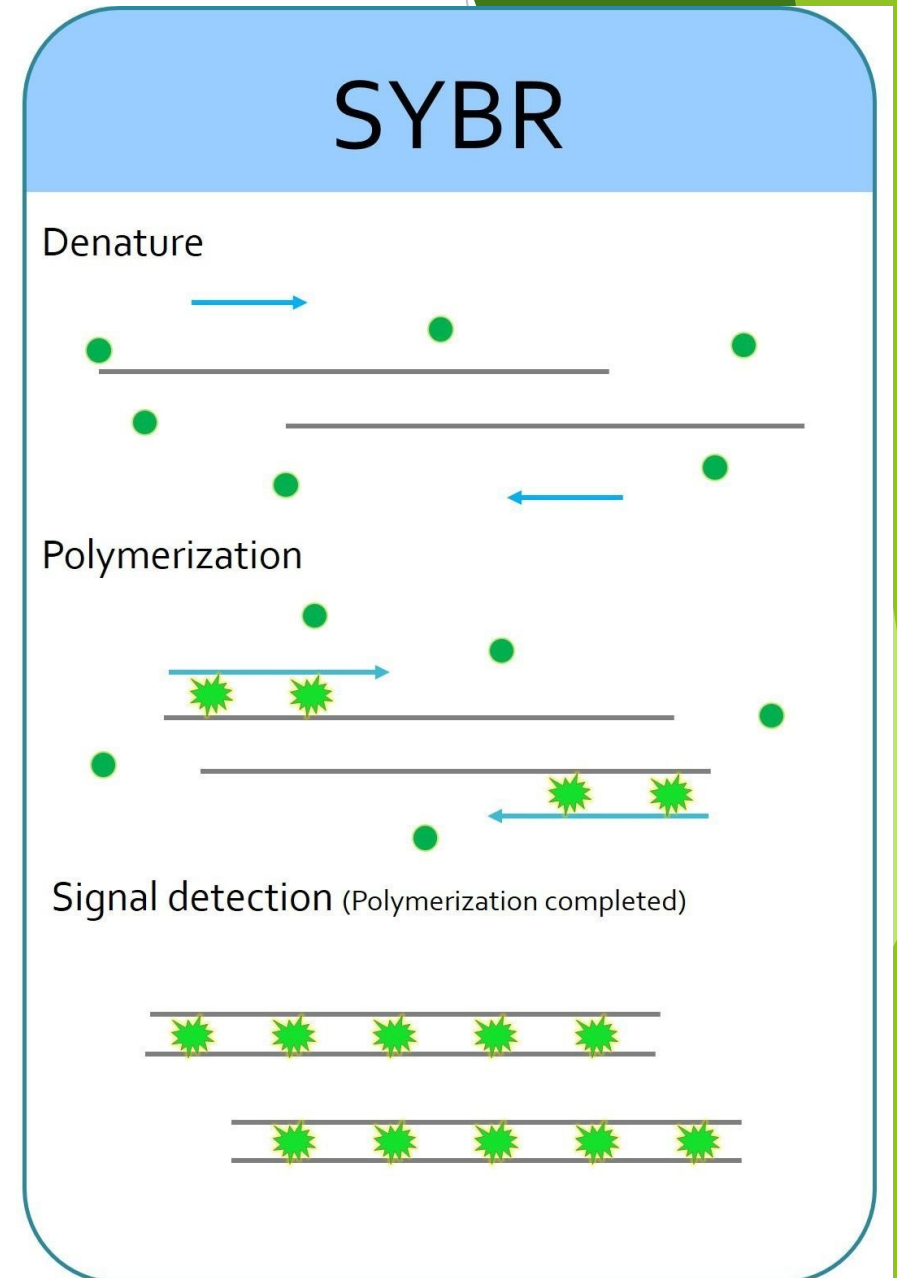
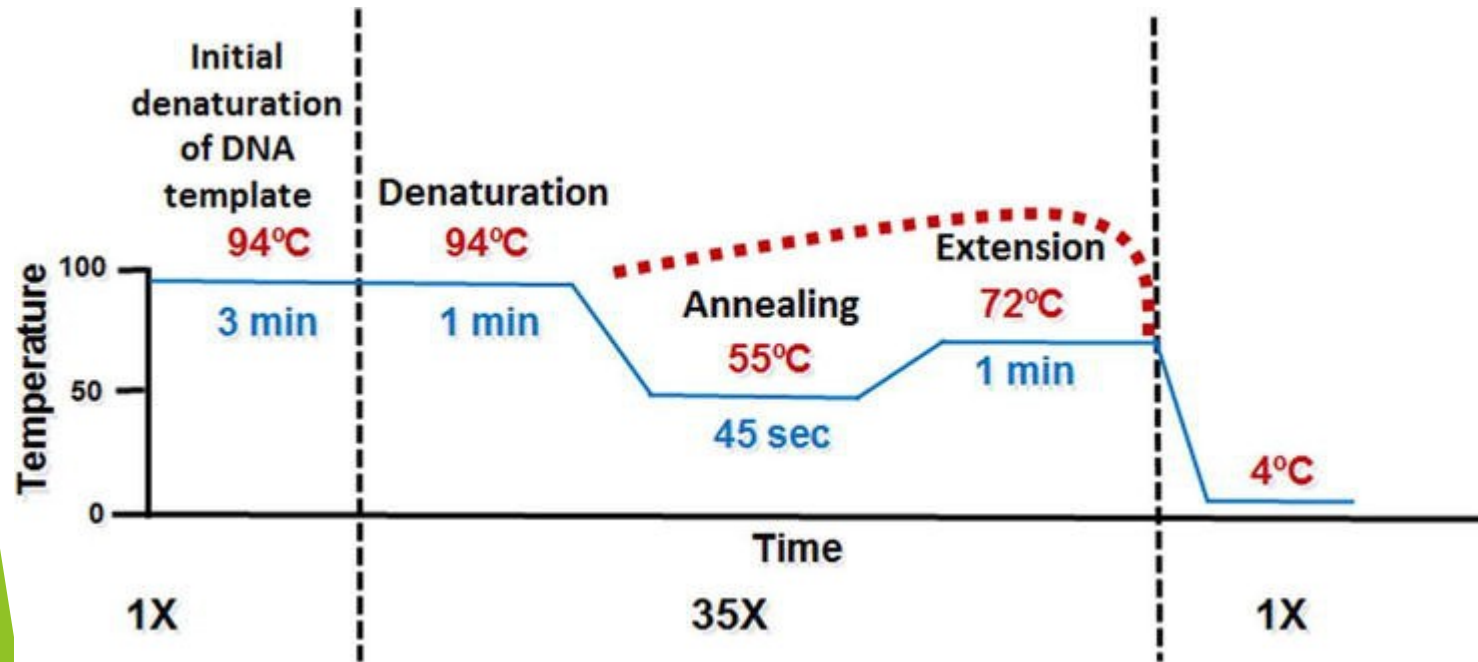
	Sybr green	1. primer	2. primer	MgCl ₂	H ₂ O
1 vzorek	3	0,375	0,375	1,7	13,05 ul

x vzorků

Pipetování reakcí:

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

Princip reakce real time PCR



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

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

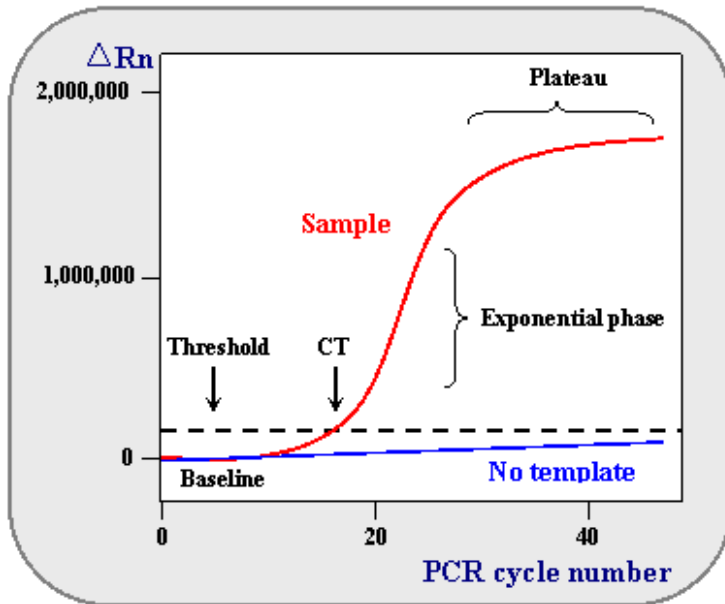
Exon junction span: Primery musí přesahovat exon-exon junction

Zatrhnout: Allow primer to amplify mRNA splice variants

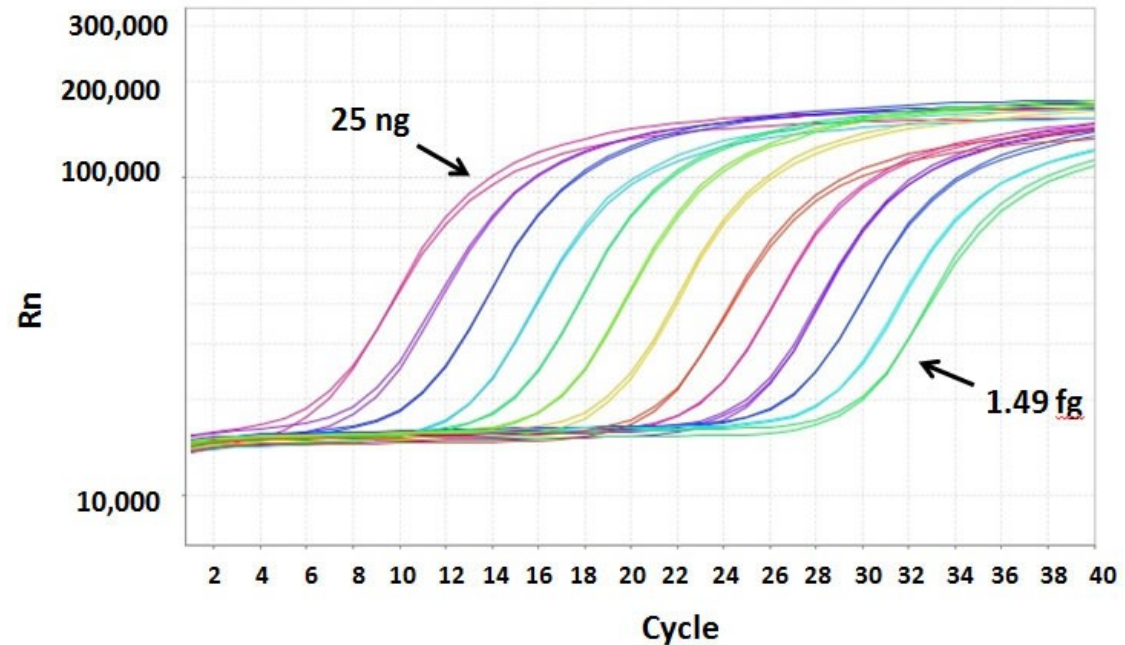
Hodnocení kvantitativní real time PCR

- ▶ 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



Amplification Plot



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).

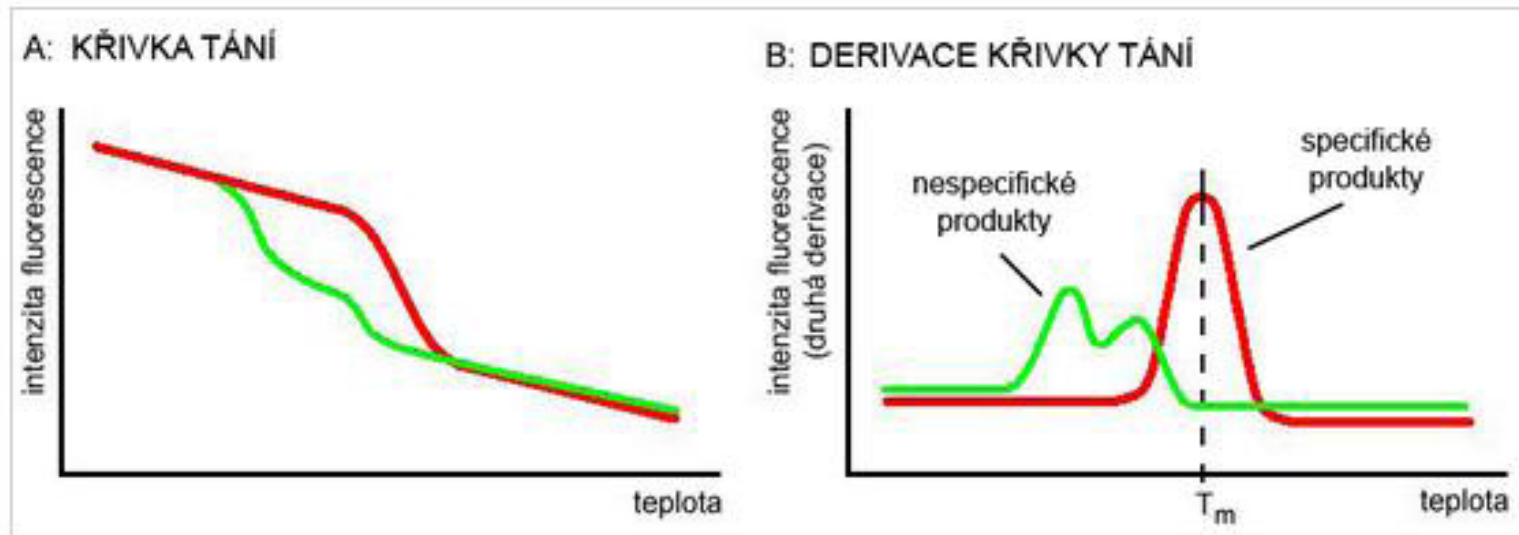
MgCl₂: obvyklá koncentrace je 1,5 mM. MgCl₂ je nutný pro procesivitu a přesnost Taq polymerázy. Koncentrace MgCl₂ se odvíjí od koncentrace dNTP a platí, že pro specifitu reakce musí koncentrace MgCl₂ převyšovat koncentraci dNTP. Pro zvýšení specifity reakce zvyšujeme koncentraci MgCl₂, a to až k 5 mM, přičemž koncentraci dNTP držíme stále na stejné úrovni. Někteří výrobci Taq polymerázy dodávají MgCl₂ 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.

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
<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>



Hodnocení kvantitativní real time PCR

#####	Samples	MeanCp	hprt					
myo D				DCp	2 ⁻ 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>

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 Report
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

The background features abstract, overlapping geometric shapes in various shades of green, including light lime green, medium green, and dark forest green. These shapes are primarily located on the left and right sides of the frame, leaving a large white central area.

Transfekce

Izolace plazmidové DNA

- ▶ Plazmidy (i jinou nízkomolekulární DNA) je možné množit pomocí kompetentních bakterií a následně izolovat pomocí kolonkových kitů (mini-, midi- a maxiprep)
- ▶ Heat shock kompetentních bakterií E. Coli plazmidem zájmu
- ▶ Růst bakterií na selekční půdě (antibiotikum)
- ▶ Izolace rezistentní kolonie a její namnožení v selekčním LB médiu
- ▶ Izolace nízkomolekulární DNA pomocí kolonkového kitu:
 - ▶ Lyzace bakteriálního peletu a RNA
 - ▶ Precipitace proteinů a genomové DNA
 - ▶ Přenos supernatantu na kolonu a vazba plazmidu na pryskyřičné kuličky (promytí)
 - ▶ Eluce plazmidové DNA a její přečištění

Izolace DNA pomocí kolonkového kitu

video návod on line

https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4.video

ke stažení

https://is.muni.cz/auth/el/1433/test/s_zakazky/ode15/045-medalova/DNA.mp4

Kontrola kvality DNA - nanodrop

A260... nukleové kyseliny

A280... proteiny

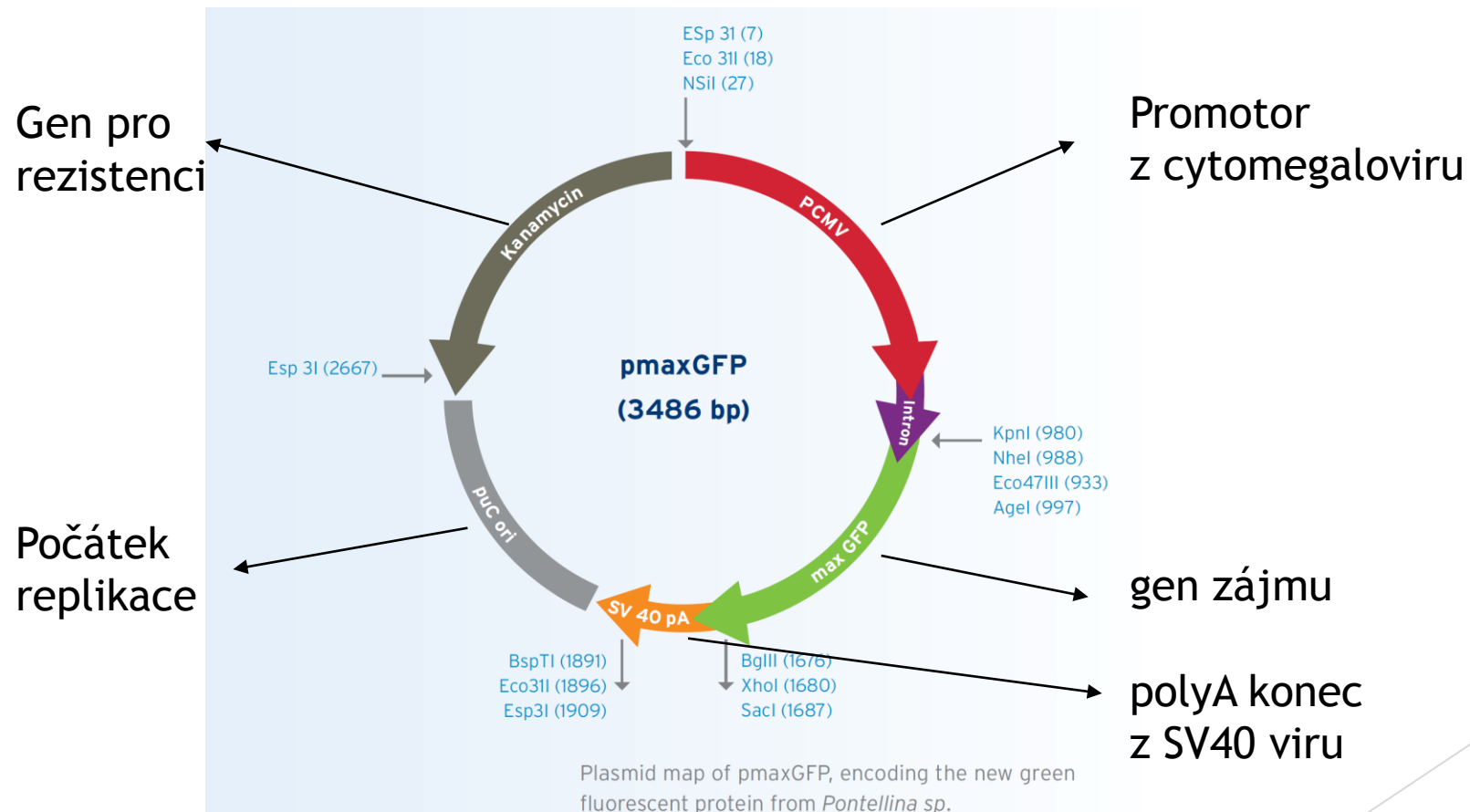
A230... příměsi

A260 max 1.0 (10x ředit vzorky)

DNA: A260/A280 ~ 1,8

Vektor pMaxGFP (AMAXA)

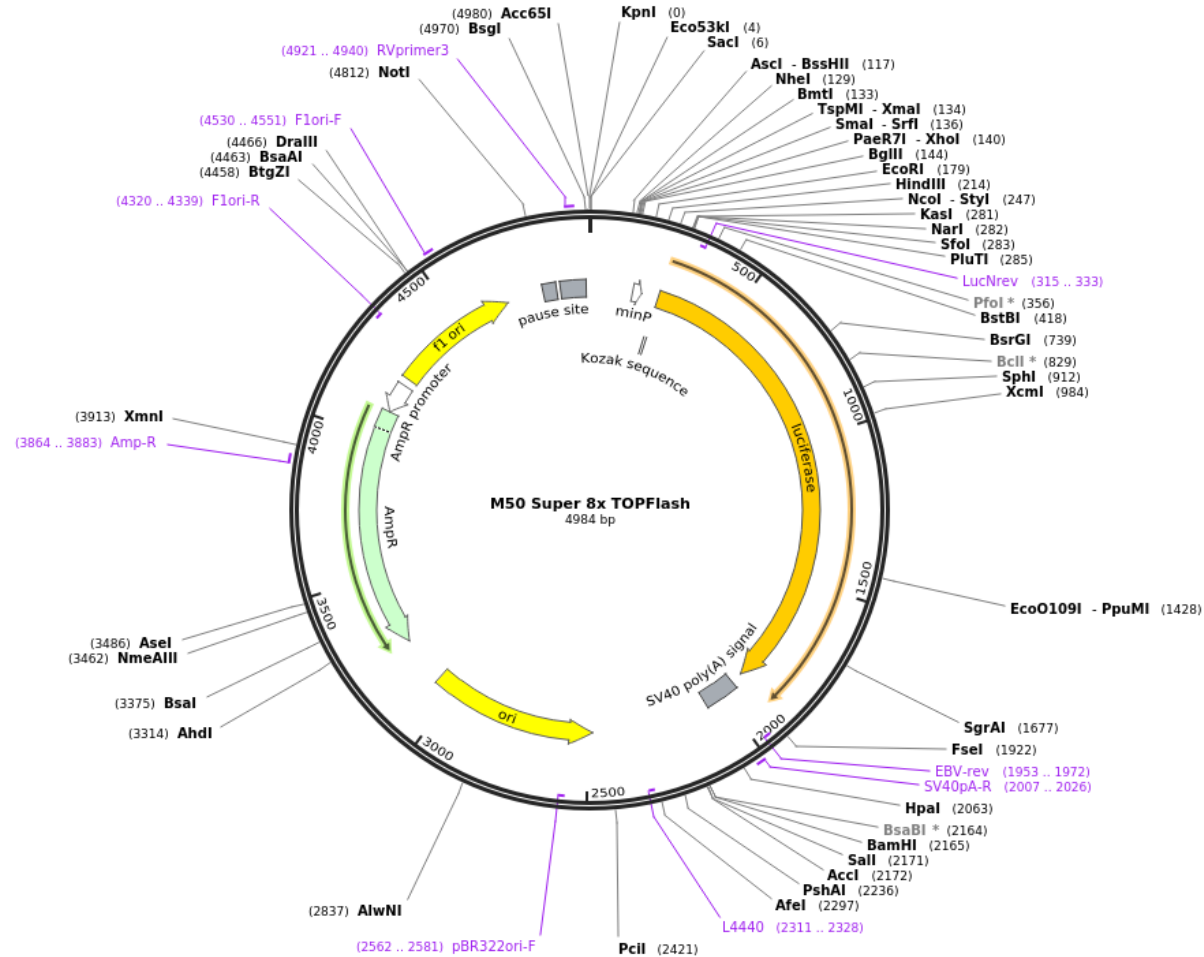
Gen pro GFP izolovaný z planktonového koryše *Pontellina Plumata*, konstitutivně přepisovaný plazmid slouží pro kontrolu účinnosti transfekce



Plazmid 368 - M50 Super 8x TOPFlash

Beta-cateninový reportér. 8xTCF/LEF vazebných míst před promotorem pro Fire Fly (FF) luciferázu

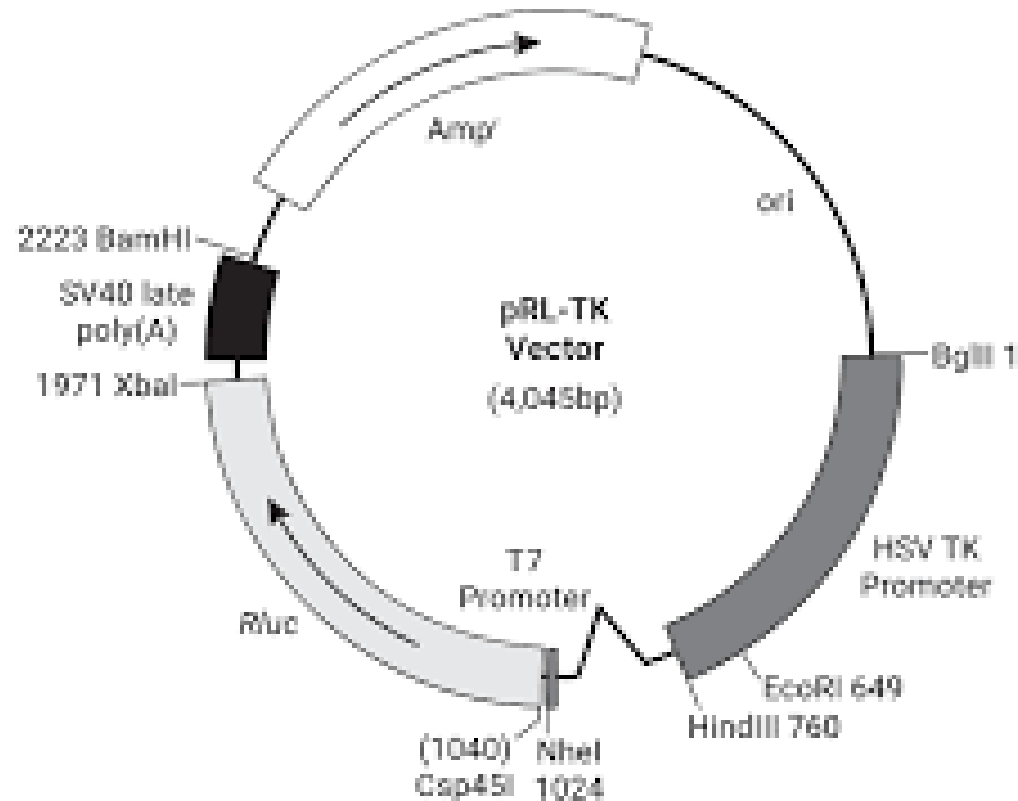
Created with SnapGene®



<https://www.addgene.org/12456/>

Plazmid 345 - pRLtkLuc

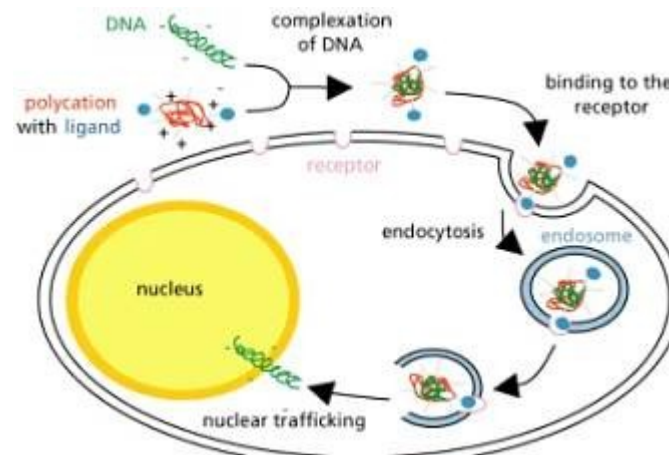
Konstitutivní exprese *Renilla* luciferázy (R) poskytuje vnitřní kontrolu, na kterou se může přepočítat exprese FF luciferázy, protože oba vektory se transfekují se stejnou účinností.



PEI (polyetylenimin)

DNA:PEI = 1:4

- ▶ Kationické polymery jsou hydrofilické, a proto jsou rozpustné ve vodě
- ▶ Jsou schopné velmi efektivně kondenzovat DNA (záporný náboj)
- ▶ Komplexy DNA/PEI musí být malé (< 100 nm)
- ▶ Internalizace endocytózou
- ▶ Akumulace v endosomech a lyzosomech kolem jádra
- ▶ Jen malé množství komplexů z těchto organel unikne a dostane se do jádra



Postup transfekce

Příprava transfekčních směsí - na 1 jamku:

- ▶ 100 ul DMEM pure + 150 ng každého plazmidu (celkem 0,45 ug DNA)

výpočet: SS plazmidu 500ng/ul

500 ng... 1 ul

150 ng... 0,3 ul

- ▶ 100 ul DMEM pure + 1,35 ul PEI (poměr DNA : PEI = 1:3, tj. $0,45 \times 3 = 1,35$)

		pRLtkLuc	TOP Flash	pmax GFP	PEI
<u>Výpočet:</u>	DMEM pure	345	368	251	
1 jamka	100 ul	0,3	0,3	0,3	1,35 ul

5+1 jamek

Připravené transfekční směsi důkladně zvertexujeme, krátce stočíme a necháme 10 minut inkubovat při RT.

- ▶ Obě zkumavky smícháme, důkladně promícháme a opět 10 minut inkubujeme při RT.
- ▶ Do každé jamky přidáme 203 ul výsledné transfekční směsi. Inkubujeme 3 hodiny v termostatu.
- ▶ Odsajeme médium, přidáme do vzorků 150 ul DMEM s 0,45 ul LGK (2,25 ul LGK + 750 ul DMEM) a 150 ul kondiciovaného média (CM) s WNT3a (W+) nebo R-spondinem (R+) (dle rozpisu vzorků). Doplníme do 450 ul DMEM. Do kontroly bez LGK přidáme jen 450 ul DMEM. Kontrolu označenou 0 vůbec nezpracováváme - je to kontrola bez ovlivnění. Inkubace přes noc.

Top Flash assay

- ▶ *Dual Luciferase Assay (kit Promega)*
- ▶ Odsajeme médium
- ▶ Přidáme opatrně 1 ml PBS, odsajeme, na sucho inkubujeme v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ /10 min
- ▶ Rozmrazíme pufr LAR II a Stop & glow buffer
- ▶ Naředíme si 5x lyzační pufr - 1 jamka 50 ul, 6+1 jamek 350 ul, tj. 280 ul MQ H₂O + 70 ul 5x lysis buffer
- ▶ Přidáme 50 ul 1x lyzačního pufru do každé jamky a inkubujeme 15 min/RT na třepačce
- ▶ Naředíme si 100x Stop & glow reagent v Stop & glow buffer (25 ul na jamku, tj. 6+2 = 200 ul)
- ▶ Nachystáme si luminometr a stripy na měření
- ▶ Do stripu nakapeme 20 ul lyzátu z každého vzorku (důkladně zhomogenizovaného)
- ▶ U luminometru velmi rychle přikápneme 25 ul LARII substrátu pro firefly (FF) luciferázu
- ▶ Změříme chemiluminiscenci
- ▶ Přidáme Stop & glow substrát pro renilla (R) luciferázu (inhibice aktivity FF luciferázy, substrát pro R luciferázu)
- ▶ Změříme chemiluminiscenci
- ▶ Výslednou hodnotu spočítáme jako podíl FF luciferázy a R luciferázy



WB

Příprava lyzátu na Western blotting

- ▶ izolace buněčných proteinů - lyze buněk, specifické pufry, centrifugace
- ▶ stanovení **koncentrace proteinů** v jednotlivých vzorcích, naředit vzorky na stejnou koncentraci
- ▶ ke vzorku proteinů se přidává:
 - ▶ **Tris pufr** - zajištění optimálního pH
 - ▶ **SDS, beta-mercaptoetanol, DTT** - denaturace proteinů
 - ▶ **glycerol** - zvýšení hustoty vzorku, lépe se udrží v jamce v gelu
 - ▶ **bromfenolová modř** - vizualizace pohybu proteinů v gelu

POSTUP

- ▶ Den předem byly vysety buňky (150 x 103 v 150 ul) a k buňkám byla přidána CM a LGK dle rozpisu.
- ▶ Ze vzorků odsajeme médium a opatrně přidáme 0,5 ml PBS, které také odsajeme
- ▶ Přidáme 100 ul Laemmli lyzačního pufru (sodium dodecyl sulfat, 2 % SDS, 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8, 0,05 % bromfenolová modř, 25% merkaptoetanol).
- ▶ Inkubujeme 10 minut na ledu a následně přeneseme do zkumavek (vzorky je možné uchovávat v -20 °C).

PRÁCE NA LEDU!

Rozbití buněčných struktur a DNA provedeme sonikací a vařením na 95 °C/5 min v bločku.

Vlastní SDS PAGE (Laemmli)

- ▶ Laemmliho (Tris-glycinový) diskontinuální systém pufrů - dva pufrů o různém pH pro přípravu zaostřovacího a rozdělovacího gelu a jeden pufr tvořící elektrolyt
- ▶ denaturované proteiny jsou pipetou vnesené do jamek polyakrylamidového gelu, které jsou vyplněné vhodným pufrům
- ▶ následně je do gelu vpuštěn elektrický proud, díky kterému proteiny záporně nabitě pomocí SDS migrují skrz gel směrem k anodě
- ▶ na základě jejich velikosti se každý protein pohybuje gelem rozdílnou rychlostí
 - ▶ menší proteiny pronikají póry v gelu snadněji než větší, které se střetávají s větším odporem
- ▶ proteiny se rozdělí podle své molekulové hmotnosti
 - ▶ menší proteiny postoupí dále než větší, které jsou blíže počátku, kam byly proteiny aplikovány

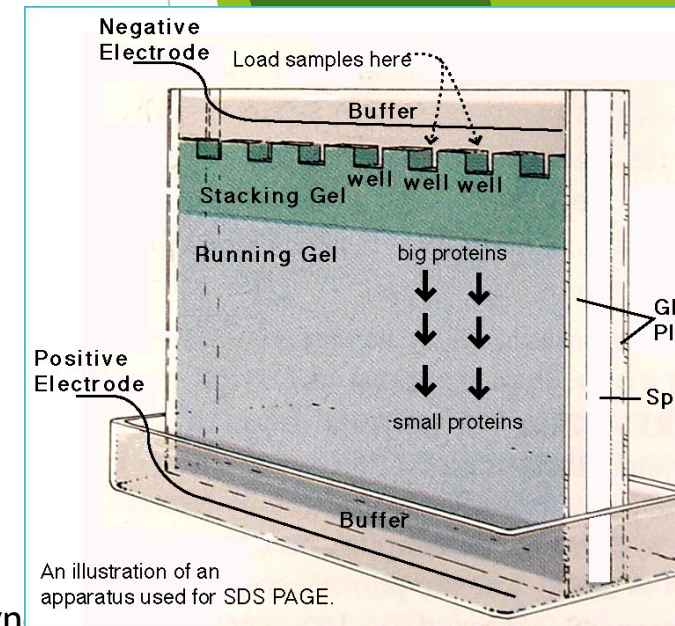
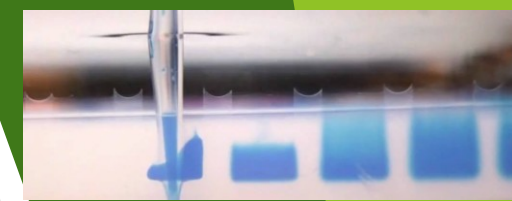
POSTUP:

2x polyakrylamidový gel 8 %, tloušťka 1,5 mm, 15 jamek

Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

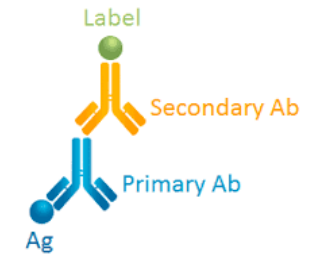
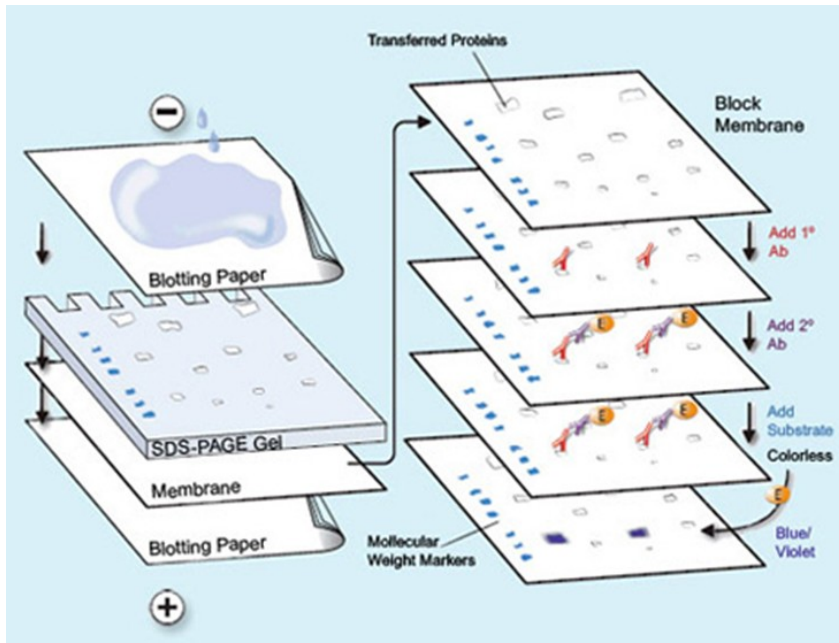
Do každé jamky v gelu napipetujeme 20 μ l z každého vzorku a do krajních jamek napipetujeme 1,5 μ l barevného proteinového standardu (PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific) dle rozpisu.

Elektroforéza 130 V 1 hodinu (proteiny, jež díky SDS získaly záporný náboj, migrují ke kladné elektrodě).

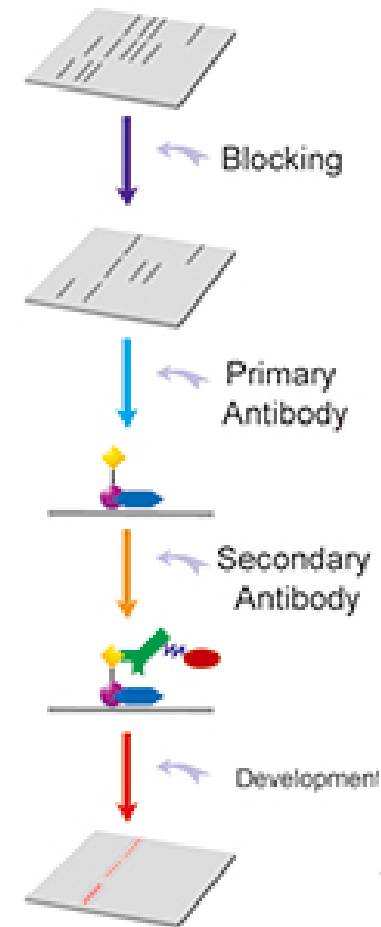


Imunodetekce - hlavní fáze

- ▶ detekce a identifikace proteinů přenesených na membránu s využitím specifických protilátek
- ▶ několik základních kroků:
 - ▶ odmytí blokačního agens
 - ▶ přidání **primární protilátky**
 - ▶ odmytí nadbytečné primární protilátky
 - ▶ přidání **sekundární protilátky**
 - ▶ odmytí nadbytečné sekundární protilátky
 - ▶ **detekce signálu** - intenzita úměrná množství detekovaného proteinu (různé možnosti)

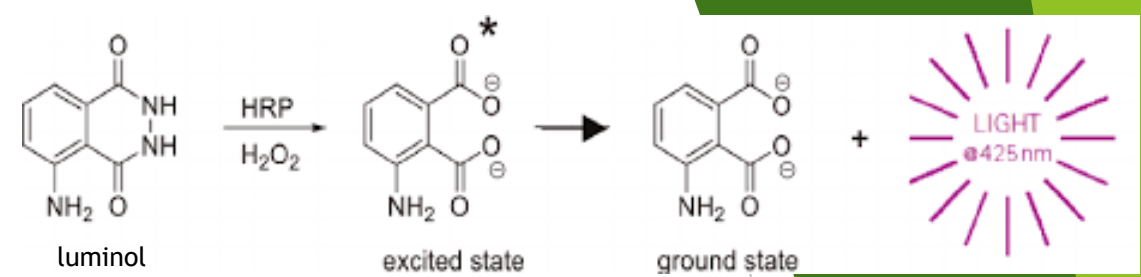


<https://www.cusabio.com>



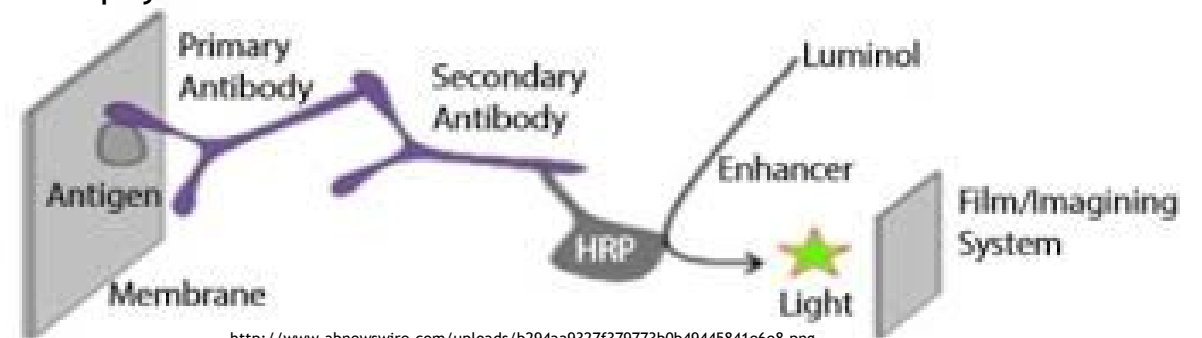
<http://www.merckmillipore.com/>
<http://www.bio-rad.com>

Detekce - chemiluminescence



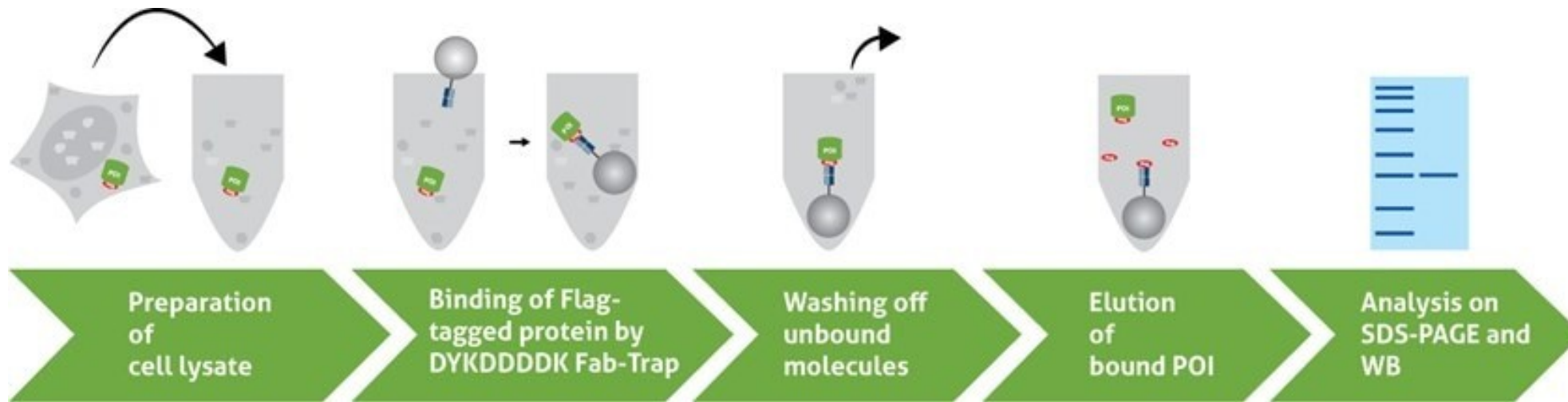
(Geschwender et al., 2013)

- ▶ nejčastější způsob imunodetekce po western blottingu
- ▶ široká škála detekčních kitů založených na chemiluminiscenční reakci
- ▶ princip reakce:
 - ▶ cílový protein - neznačená primární Ab - sekundární Ab je konjugovaná s HRP (peroxidáza) - sem se přidá luminol
 - ▶ HRP katalyzuje oxidaci luminolu - více kroková reakce, při které je emitováno chemiluminiscenční světlo (428 nm)
 - ▶ jeho množství je úměrné množství HRP (tj. množství sAb, pAb a cílového proteinu)
 - ▶ intenzitu reakce je možné zesílit (až 1000x) přidáním modifikovaných fenolů (p-iodofenol), které stimulují transfer elektronů mezi luminolem a HRP
 - ▶ účinnější detekce signálu, zvýšení citlivosti detekce
 - ▶ enhanced chemiluminescence (ECL) - řada komerčně dostupných kitů



Imunoprecipitace

Overexpresse proteinu zájmu - DVL2, označený FLAG proteinem. Přes protilátku k FLAG z lyzátu „vytáhneme“ DVL2 v komplexu dalších proteinů, které se na něj vážou. Pomocí WB tyto vazebné proteiny identifikujeme.



Imunofluorescence

- ▶ Místo buněk HEK (nejsou vhodné pro tuto aplikaci) použijeme buňky A375, ve kterých se konstitutivně exprimuje GFP (zelená)
- ▶ Vysejeme na krycí sklíčko (umístěné v jamce), další den přidáme Wnt a RSPO
- ▶ Další den pomocí protilátky k celkovému beta kateninu pozorujeme jeho translokaci do jádra. Tuto primární protilátku vizualizujeme pomocí II. protilátky s navázanou fluorescenční barvou Alexa 568 (emise v červené oblasti)
- ▶ Jádro nabarvíme pomocí DAPI (interkalační barvivo, modrá)
- ▶ Na konfokálním mikroskopu Leica SP8 pozorujeme translokaci beta kateninu do jádra po působení Wnt.

Počítání

► Koncentrace bez přepočtu jednotek

SS 40 mM a a potřebujeme 100 ul WS: 20 uM

Trojčlenka: 20 uM.....100 ul
 ↓ ↑
 40 mM.... x ul

$$x/100=0,02/40 \dots 0,0005 \cdot 100=x$$

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: $c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$ (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 $1 \times 10^6 / \text{ml}$

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