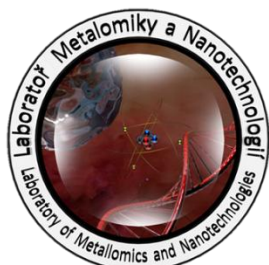




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Příprava buněčného lyzátu, izolace celkové RNA pomocí kolonek/TriPure reagent, stanovení koncentrace RNA

Vyučující: Mgr. Monika Holubová, Bc. Petr Štěpka

Pro optimální provedení RT-PCR je nutná izolace dostatečného množství kvalitní RNA. Součástí protokolu výrobce u obou izolačních postupů (kolonky, TriPure) je použití lyzačního pufru pro uvolnění nukleových kyselin do roztoku. Dále se oba postupy liší. Stanovení koncentrace provádíme na přístroji NanoDrop.

Izolace RNA pomocí kolonek

- Buňky seškrábnout do média
- Centrifugace 7min/2700ot/4°C
- Odsát supernatant
- Buňky rozsuspendovat ve 2ml PBS a spočítat
- Odebrat 1 milion buněk a centrifugace 7min/2700ot/4°C
- Odsát supernatant



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



- K buňkám přidat 200 μ l PBS
- Přidat 400 μ l Lysis/Binding buffer a vortex 15s
- Obsah přenést na kolonku umístěnou ve zkumavce (max. 700 μ l)
- Centrifugace 15s/8000ot
- Vyprázdnit zkumavku a kolonku umístit zpět
- Na kolonku nanést předem připravenou směs (90 μ l DNase buffer + 10 μ l DNázy)
- Inkubace 15min při 15-25 $^{\circ}$ C
- Přidat 500 μ l Wash buffer I
- Centrifugace 15s/8000ot
- Vyprázdnit zkumavku a kolonku umístit zpět
- Přidat 500 μ l Wash buffer II
- Centrifugace 15s/8000ot
- Vyprázdnit zkumavku a kolonku umístit zpět
- Přidat 200 μ l Wash buffer II
- Centrifugace 2min na max. otáčky
- Vyprázdnit zkumavku a kolonku umístit do nové sterilní eppendorfky (1,5ml)
- Přidat 100 μ l Elution Buffer
- Centrifugace 1min/8000ot.
- Obsah zkumavky měřím na Nanodropu

Izolace RNA TriPure reagentem

- 200 μ l TriPure/ 20 mg tkáně resp. $1 \cdot 10^6$ buněk resp. 200 μ l séra
- Homogenizace tkáňovým homogenizérem (důležité pro vysoké množství výtěžku)
- 5 min. inkubace (15-25 $^{\circ}$ C) – disociace nukleoproteinových komplexů, důležité pro čistotu vzorku (A_{260}/A_{280})
- Přidání 0,04 ml čistého chloroformu
- 15 sec. vortex, inkubace 15 min., (15-25 $^{\circ}$ C)
- Centrifugace 10600 rpm, 15 min., 2 $^{\circ}$ C



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



- Horní fázi odebrat do čisté epiny
- Precipitace isopropanolem – 0,1 ml (0,5 ml isopropanolu/ 1ml TriPure), promíchat obrácením, inkubace 10 min., 15-25°C
- Centrifugace 10600 rpm, 10 min., 2°C
- Odstranit supernatant
- Promytí peletu 0,2 ml 75% EtOH (1 ml EtOH/1 ml TriPure)
- Centrifugace 8400 rpm, 5 min., 2°C
- Odstarnit supernatant
- Vyschnutí peletu (ne úplně, snížila by se rozpustnost), zbytek supernatantu můžeme odstranit pipetou
- Rozsuspendovat v 50 µl RNase free vody
- Inkubace 15 min., 58°C, rozsuspendování (pro zvýšení výtěžku možnost prodloužit dobu inkubace na 30 min.)
- Skladovat při -15 - -25°C

Měření koncentrace RNA

- Před začátkem měření pečlivě očistíme místo nanesení vzorku NK
- Provedeme kalibrační měření vody (MB grade)
- Provedeme měření blanku (roztok, v němž je rozpuštěna NK)
- Zvolíme vhodný program (RNA/DNA)
- 2 µl vzorku naneseme na místo odečtení absorbance
- Po skončení měření pečlivě očistíme místo nanesení vzorku NK



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

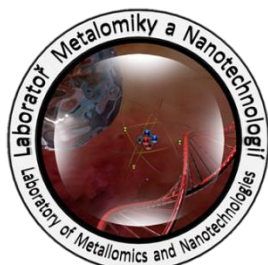


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Přepis RNA do cDNA

Vyučující: RNDr. Jan Balvan, Ing. Markéta Sztalmachová, Ing. Hana Polanská

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do DNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptasou, která se vyskytuje u mnoha typů retrovirů. V současné době lze reverzní transkripci provádět in vitro (ve zkumavce, mimo biologický systém), a je využívána v řadě molekulárně biologických aplikacích, zejména pak v izolacích sestřižených genových variant a průkazu tkáňově specifické transkripce jednotlivých genů. V dnešní době jsou komerčními firmami dodávány různé typy rekombinantních reverzních transkriptas. Reverzní transkripcí získáme molekulu DNA, která je označována jako cDNA (z angl. complementary DNA).

Mezi používané reversní transkriptasy patří MLV, AMV, Tth. Reversní transkriptasy M-MuLV (z Moloneyho myšního leukemického viru) a AMV (z ptačího myeloblastického viru) jsou schopny syntetizovat cDNA až do 10 kb, zatímco bakteriální termostabilní Tth DNA polymerasa jen do 2 kb. Reversní transkriptasa Tth na rozdíl od dvou předchozích nemá



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/

aktivitu RNasy H a vyžaduje navíc Mn^{+2} kationty v reakci.



Optimální reakční teploty se liší: M-MuLV = 37 °C, AMV = 42 °C, Tth = 65 °C. Používají se tři typy primerů: specifické oligonukleotidy pro syntézu vybrané určité mRNA, směs náhodných hexanukleotidů a oligo(dT)12-18. Schopnost uskutečnit reversní transkripci a PCR v jedné reakci a v jedné zkumavce je jedinečnou výhodou enzymu Tth, protože se podstatně snižuje riziko kontaminace a celá procedura se zjednodušuje.

Pomůcky a chemikálie:

- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit; Roche, Německo

Postup:

- Mastermix pro jednu reakci:
- Vzorek naředěný vodou do objemu 11 μ l
- Random Hexamer Primer (600 pmol/ μ l) 2 μ l
- Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (5x konc.) 4 μ l
- Protector RNase inhibitor (40 U/ μ l) 0,5 μ l
- Deoxynucleotide Mix (10 mM každý) 2 μ l
- Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μ l) 0,5 μ l
- Celkový objem mastermixu je 20 μ l
- Vzorky byly naředěny PCR vodou z kitu tak, aby v každé reakci bylo stejné množství RNA (500 ng)
- Reakce probíhá v termocykléru dle následujícího programu:
- 10 min 25°C
- 60 min 50°C
- 5 min 85°C
- Získaná cDNA je uchována při -20 °C, nebo je ihned použita k qRealTime-PCR



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

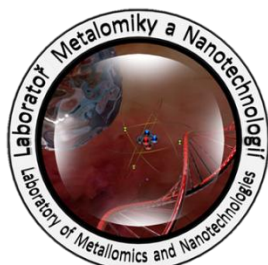


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Ukázka vyhledávání vhodných TaqMan sond v databázi, programování a pipetování qRT-PCR

Vyučující: Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Jan Balvan, Mgr. Michaela Fojtů, Bc. Petr Štěpka.

Sondy TaqMan

- Jedna sonda, na 5' konci fluorofor (reporter, R), na 3' konci zhášec (quencher, Q)
- Využívá se 5'→3' exonukleázové aktivity DNA polymerázy
- Pokud je přítomný templát/PCR produkt, sonda se na něj komplementárně váže a během extenzní fáze PCR je částečně hydrolyzována – uvolní se fluorofor a emituje fluorescenci, viz obr.1.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

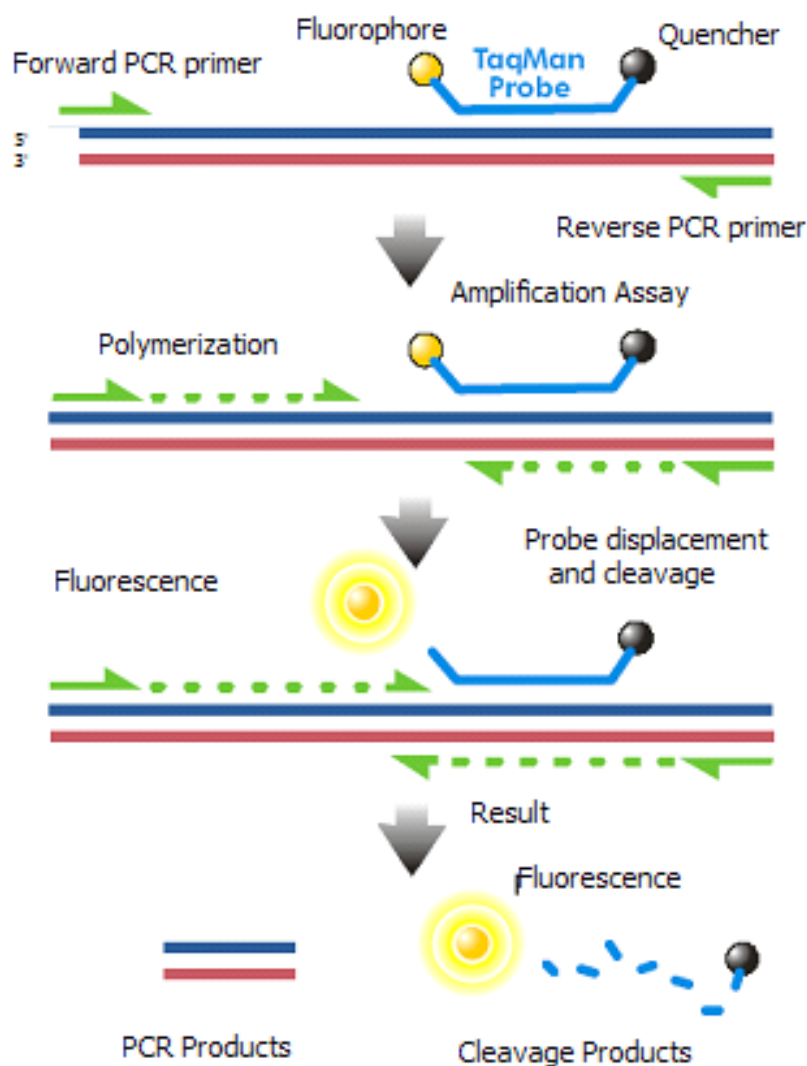


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Obrázek 1 Princip funkce TaqMan sond

Vyhledávání vhodných TaqMan sond provádíme na specializovaných webových stránkách:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastAlnAd

<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>

<http://alglab1.cs.ucr.edu/OFRG/PRISE.php>



Postup pipetování a programování qRT-PCR:

Reakční směs:

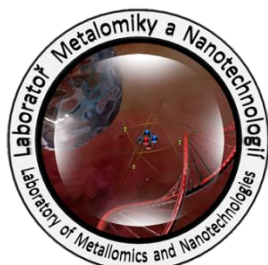
- Produkt reverzní transkripce ředíme 5 x a do každé jamky mikrotitrační destičky pipetujeme 5 μ l tohoto roztoku
- 10 μ l Master Mix (dodáno výrobcem)
- 1 μ l roztoku sonda + primer
- 4 μ l vody
-

Reakce probíhá v přístroji ABI PRISM 7500 dle programu:

- 50 °C 2 min
- 95 °C 10 min
- 95 °C 15 s
- 60 °C 1 min



Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Praktický kurz

Zpracování a vyhodnocení získaných experimentálních dat

Vyučující: Mgr. Monika Holubová, Mgr. Kristýna Hudcová, RNDr. Jan Balvan, Mgr. Martina Raudenská, Ph.D., RNDr. Michal Masařík, Ph.D.

U qPCR existují dva nejčastější přístupy k vyhodnocování míry exprese sledovaných genů:

- A. Metodou absolutní kvantifikace je stanovován konkrétní počet kopií mRNA na určitou jednotku (např. počet buněk použitých pro izolaci RNA).
- B. Častěji užívanou je kvantifikace relativní, při které jsou pro normalizaci množství mRNA vstupujícího do dané reakce použity takzvané housekeeping geny (HK; např. často používané geny pro ribosomální proteiny, B2M nebo GAPDH). Takové geny jsou pro určitou buněčnou populaci charakteristické tím, že míra jejich exprese je málo ovlivněna změnou stavu buňky (nebo na ni nemají vliv okolnosti, které jsou v pokusu vyšetřovány).

Relativní způsob hodnocení exprese má proti kvantifikaci absolutní výhodu v tom, že takto získané výsledky jsou výrazně méně zkresleny například nepredikovatelnými ztrátami



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



genetického materiálu RNA. Avšak i relativní kvantifikace genové exprese má svá úskalí. Nezřídka dojde ke zkreslení výsledků jinak zcela perfektně provedeného vyšetření špatnou volbou způsobu vyhodnocení dat získaných z vyšetření na základě tzv. crossing points – CP (nazývaných též cross thresholds – CT). Velmi oblíbenou je pro svou jednoduchost metoda $\Delta\Delta CT$, která je však vhodná výhradně pro PCR probíhající v exponenciální fázi amplifikace se 100% účinností (tzn. za zdvojnásobení počtu ampliconů mezi jednotlivými cykly). Přes frekventní použití je tato kvantifikační metoda bez znalosti efektivity amplifikace konkrétní PCR k vyhodnocování genové exprese relativní kvantifikací zcela nevhodná. Mnohem přesnější a korektnější přístup k posouzení míry exprese je stanovení reálné efektivity konkrétní PCR pro TG a HK, a jejich zohlednění při matematickém hodnocení míry exprese. Toto dnes již umožňují mnohé softwarové programy, které kromě vyhodnocení kalibračních křivek a relativní genové exprese na základě efektivity umožňují i statistickou validaci získaných výsledků (například: REST, GeNorm, qGENE).

evropský
sociální
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVYOP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost