

E2050 Laboratorní cvičení z molekulární biologie a mikrobiologie

EUBAKTERIÁLNÍ qPCR Z BUKÁLNÍHO STĚRU

Vyučující: Mgr. Pavla Holochvá, Ph.D.

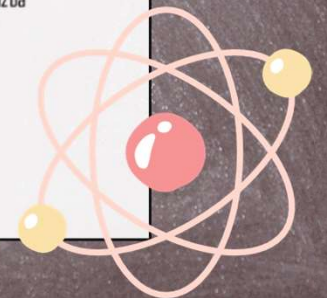
Garance: doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Cvičení 9

MUNI | RECETOX



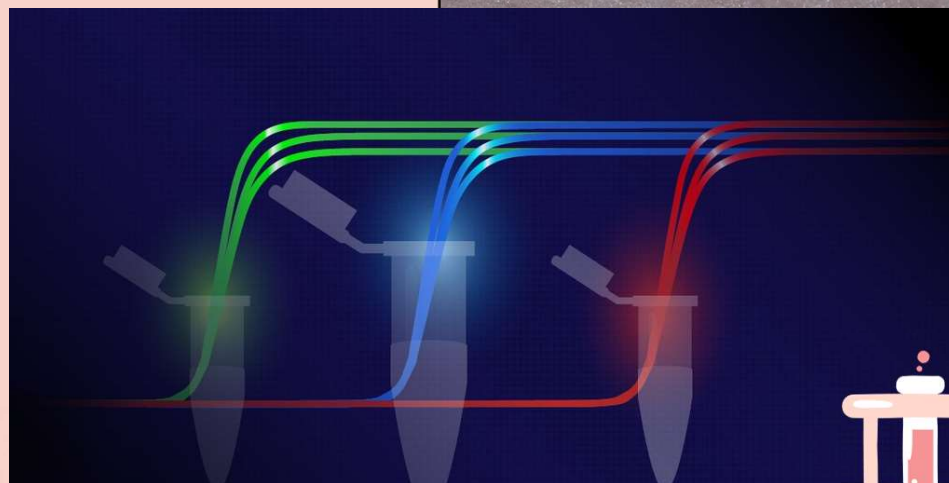
Rozvrh cvičení





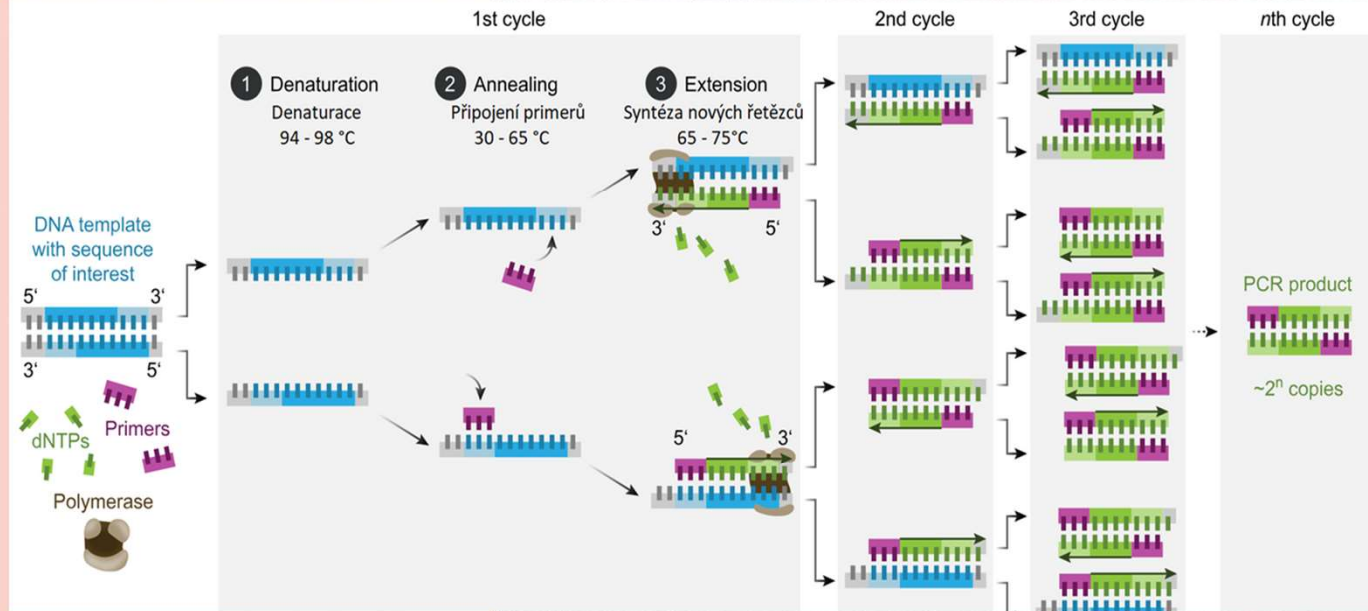
NÁPLŇ DNEŠNÍHO CVIČENÍ

- eubakteriální qPCR analýza
DNA extrahované ze vzorku
bukálního stěru

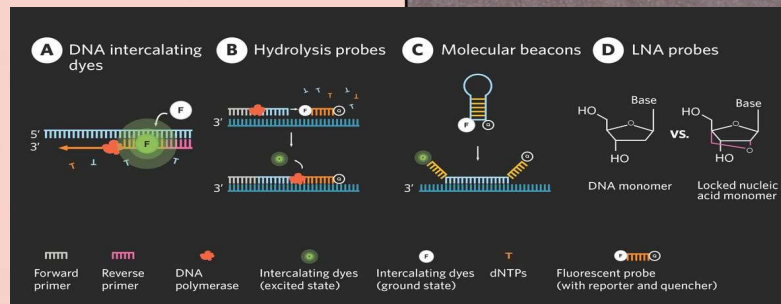


PRINCIP QPCR

- Princip PCR - exponenciální nárůst počtu amplifikovaného úseku DNA (2^n)

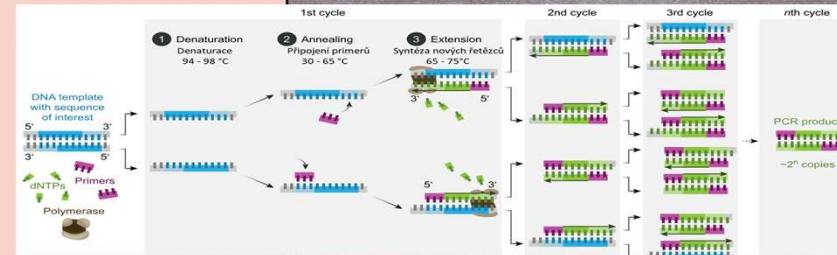


- Detekce a kvantifikace fluorescence v reálném čase

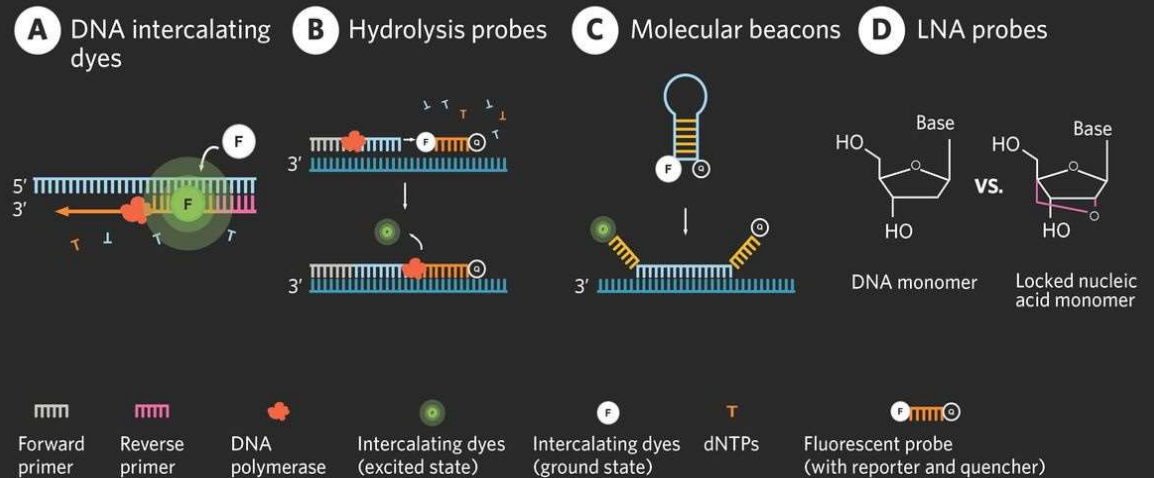


PRINCIP QPCR

- Princip PCR - exponenciální nárůst počtu amplifikovaného úseku DNA (2^n)

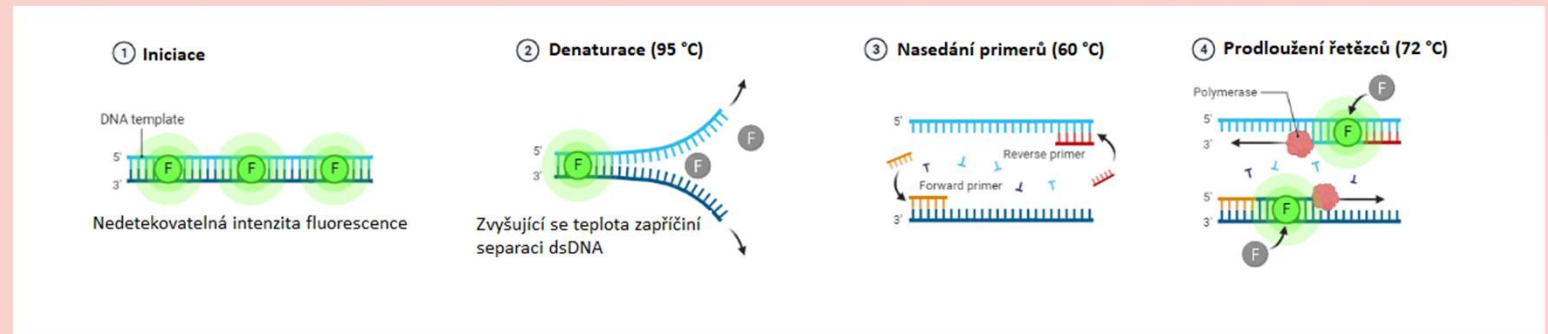


- Detekce a kvantifikace fluorescence v reálném čase

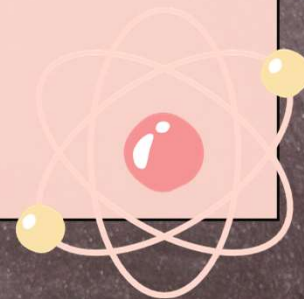
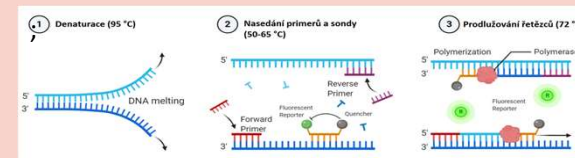


FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ

- interkalační barvivo - vazba na malý žlábek dsDNA - nespecificky SYBER® Green

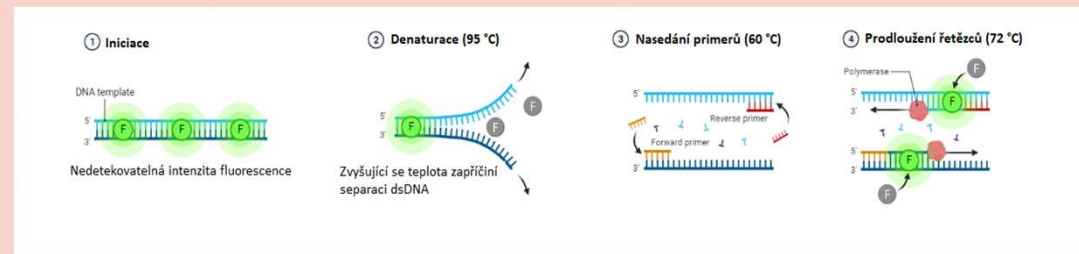


- hydrolyzační sondy - TaqMan™ - reportér + zhášec, vazba do vnitřní amplifikované části

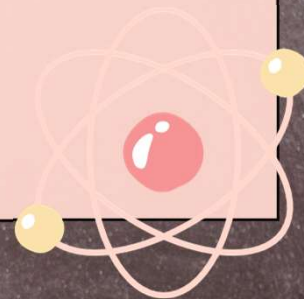
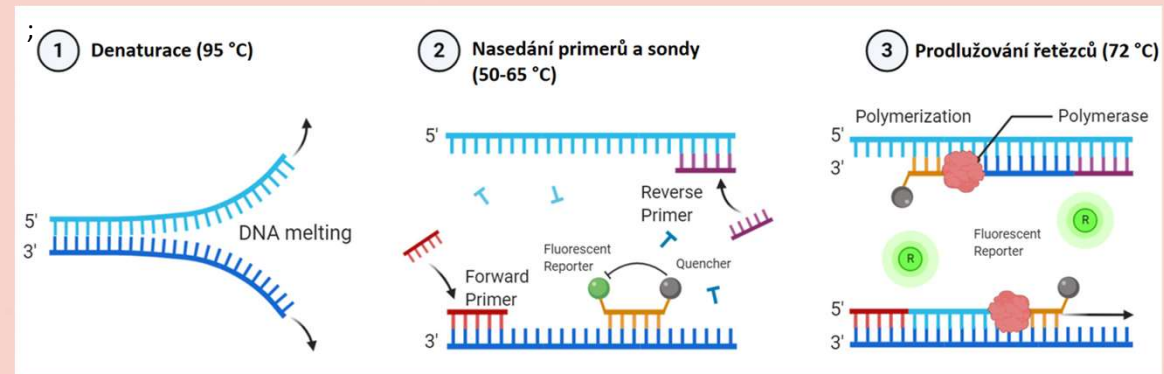


FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ

- interkalační barvivo - vazba na malý žlábek dsDNA - nespecificky SYBER® Green

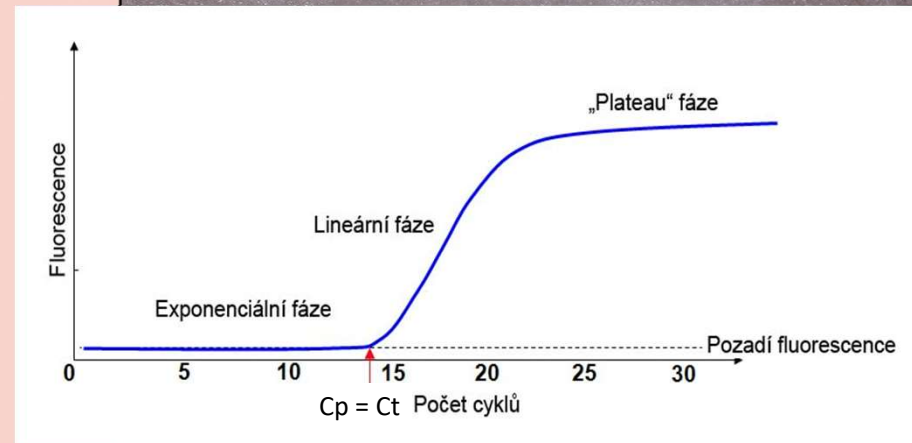


- hydrolyzační sondy - TaqMan™ - reportér + zhášec, vazba do vnitřní amplifikované části



KINETIKA PCR REAKCE

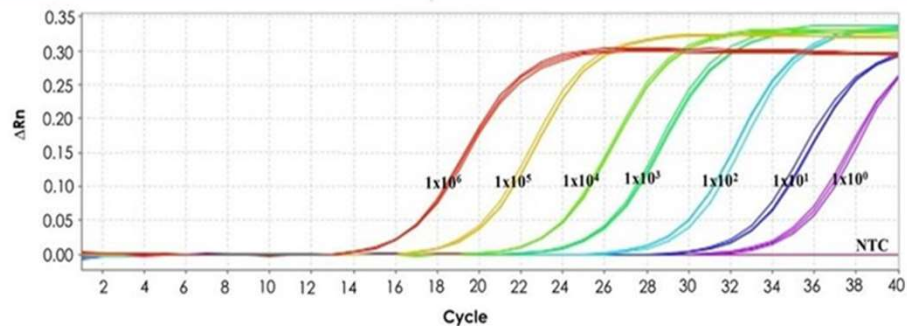
- **1. fáze:** množství DNA a tím i fluorescence je nízká a nepřesahuje úroveň pozadí.
- **2. fáze:** průběh reakce je v této fázi exponenciální, intenzita fluorescence nad úroveň pozadí - C_p (crossing point) neboli C_t (threshold cycle) = **kvantifikace**.
- **3. fáze:** jedná se o lineární fázi - dochází k strmému nárůstu fluorescence.
- **4. fáze:** tzv. „plateau“ fáze, dochází k únavě reakce (např. některé komponenty reakce byly již spotřebovány), není vhodná pro kvantifikaci DNA.



KINETIKA PCR REAKCE

Výpočet účinnosti (efficiency) reakce:

- Ovlivněno: nasedání primerů, složením reakce, přítomností PCR inhibitorů nebo naopak enhancerů.
- Kalibrační křivka - desítkové ředění DNA s požadovanou cílovou sekvencí
- Efektivita reakce = 100%, platí, že v každém cyklu dojde ke zdvojnásobení množství molekul DNA, tzn. reakce běží dle 2^n , kde n je počet proběhlých cyklů.



Příklad

- Efektivita reakce = 100% = 2
- Počet cyklů = 10
- $2^{10} = 1024$ molekul

- Efektivita reakce = 90% = 1,9
- Počet cyklů = 10
- $1,9^{10} = 613$ molekul

Rozpětí přijatelné účinnosti

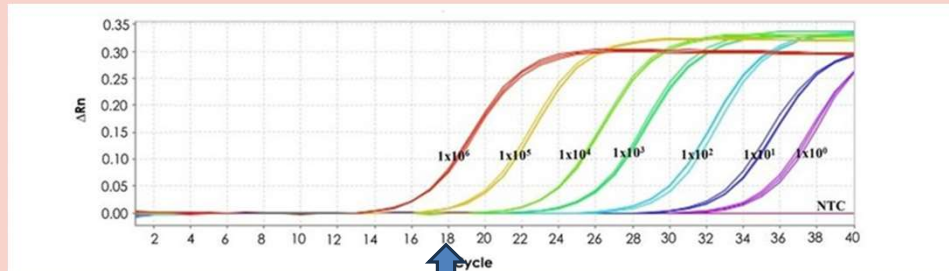
80 – 110 %





ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE

- Absolutní kvantifikace - pozitivní standard - známá koncentrace
 - odečet proti kalibrační křivce
 - vyjádření koncentrace v počet kopií DNA/ μ l



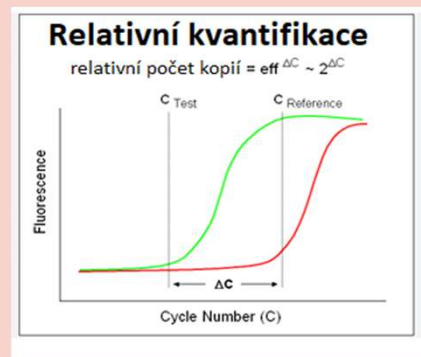
Standard o koncentraci 1×10^5 počet kopií DNA/ μ l



RELATIVNÍ KVANTIFIKACE

- Relativní kvantifikace - množství fluorescence testovaného vzorku se porovnává s množstvím fluorescence referenčního vzorku
- Výběr referenčních genů („housekeeping“) – výběr podle typu tkáně a typu fyziologického stavu – exprese referenčního genu musí být v dané „zdravé“ tkáni přítomna a stabilní
- Jednotky použité k vyjádření relativních veličin jsou irelevantní

- GAPDH
- Albumin
- Aktin
- Tubulin
- Cyklofilin
- 18S rRNA
- 28S rRNA
-



VYUŽITÍ qPCR

Multiplex qPCR

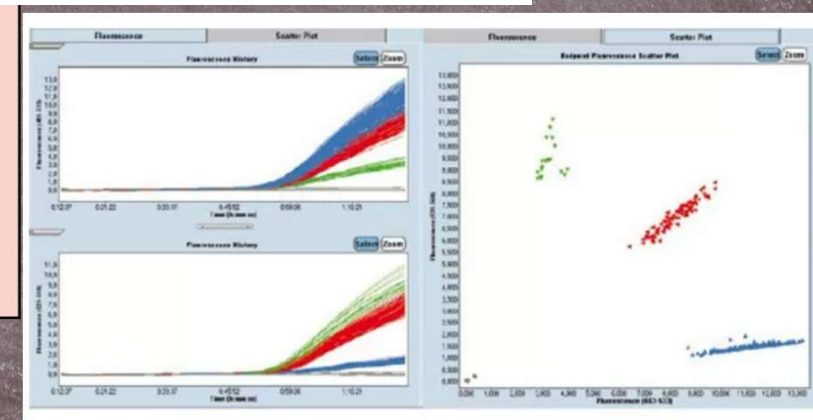
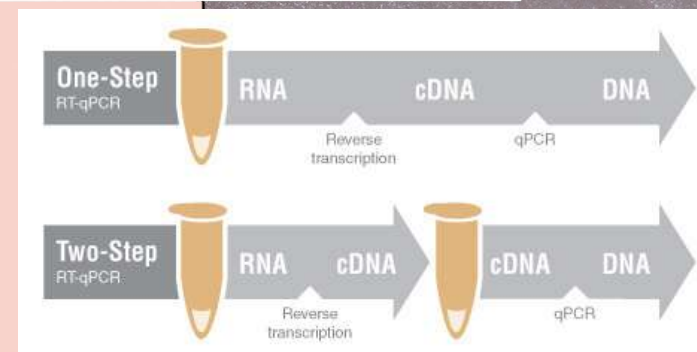
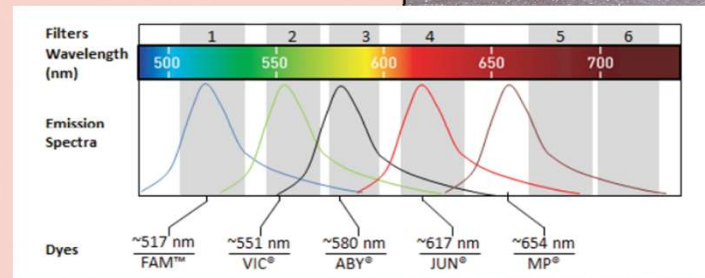
- detekce více cílů v jedné reakci
- úspora materiálu a vzorku
- odečet jednotlivých barev pro každý target

Reverzně transkripční qPCR (RT-qPCR)

- analýza RNA
- přepis RNA do cDNA (= complementary DNA)

Geotypizace

- hledání SNP pomocí fluorescenčně značených sond
- kombinace dvou sond – homozygot vs heterozygot





VYUŽITÍ QPCR V DNEŠNÍM CVIČENÍ

- Amplifikace části genu pro 16S rRNA – konzervativní gen pro prokaryotické mikroorganismy
- SYBER® Green fluorescenční barvivo – součást polymerázového mastermixu
– zbytečně nevystavovat světlu
- Absolutní kvantifikace
- Pozitivní kontrola = standard o koncentraci 1×10^5

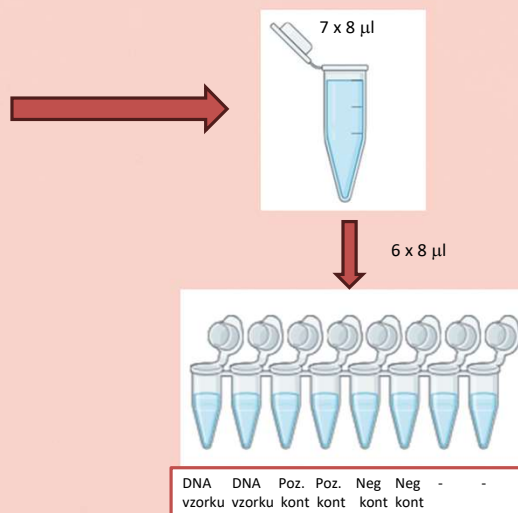
Cíl:

1. Detekce mikrobiální DNA v klinickém vzorku
2. Kvantifikace bakteriální nálože v klinickém vzorku
(ve vzorku je mikrobiální i lidská DNA)



DESIGN DNEŠNÍ PRÁCE

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ 1 reakce	MNOŽSTVÍ 7 reakce
LightCycler 480 SYBER Green I Master	5 μ l	<i>dopočítat</i>
PCR-voda	2,4 μ l	
TotBac_16S Forward primer (10 μ M)	0,3 μ l	
TotBac_16S Reverse primer (10 μ M)	0,3 μ l	
DNA	2 μ l	
Celkový objem	10 μ l	



Provedete 6 reakcí v duplikátu: 1.+2. DNA vzorku

3.+4. DNA pozitivní kontroly – zamezí falešně negativním výsledkům

5.+6. Negativní kontrola – místo DNA přidat PCR H₂O

– zamezí falešně pozitivním výsledkům

7. Nadbytek kvůli pipetovací chybě (~ 10 %)



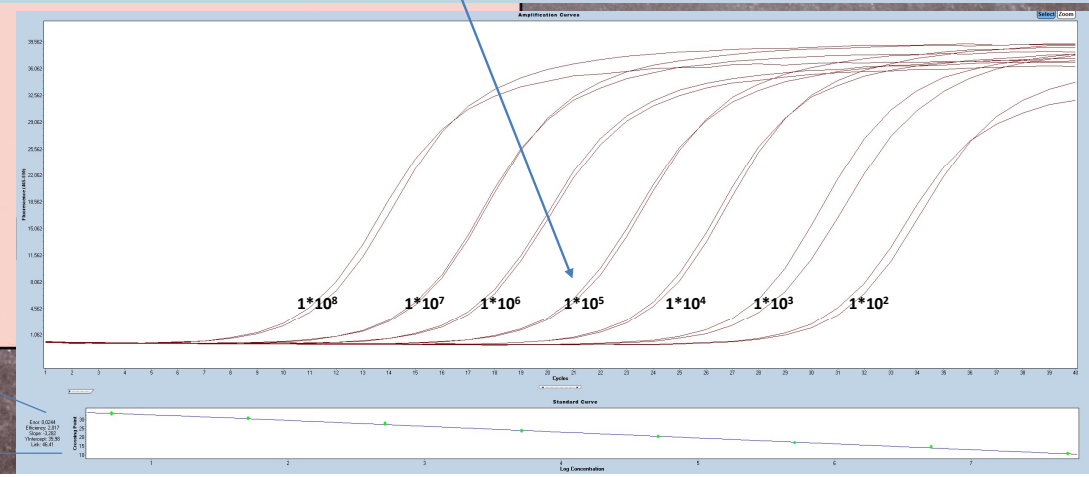
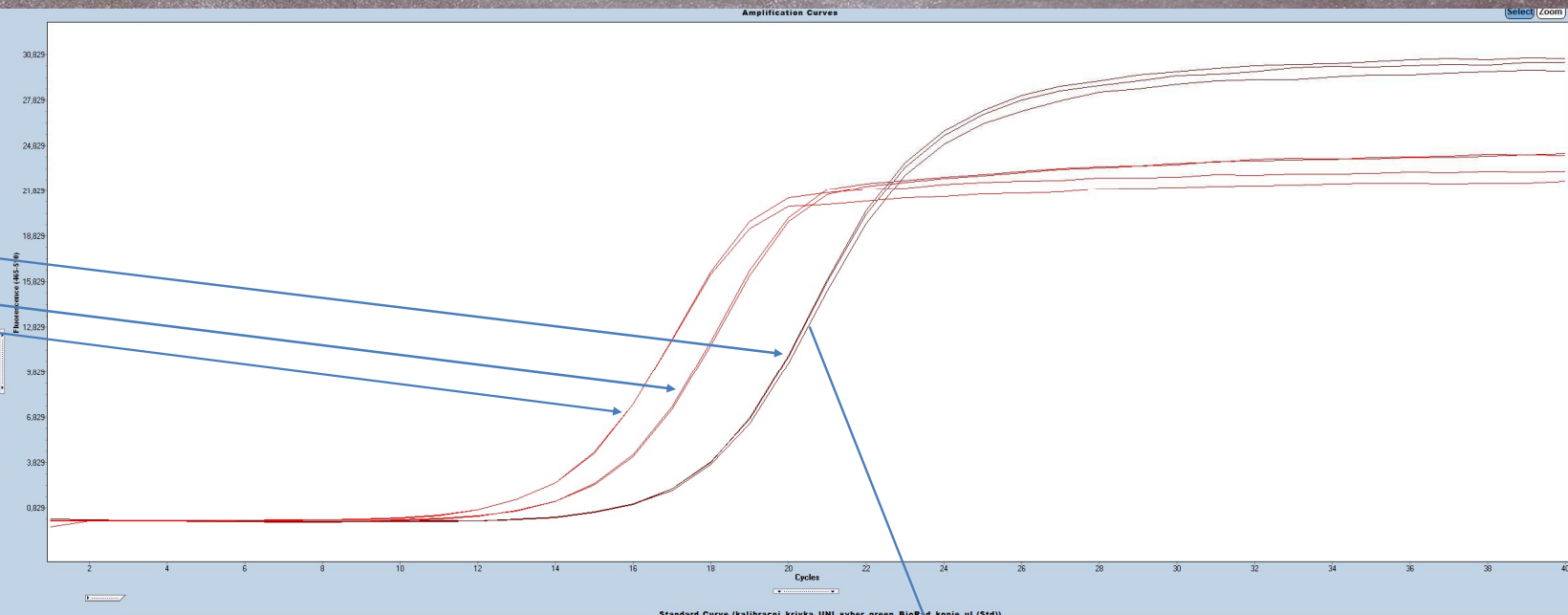
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abs Quant results

Positive
 Negative
 Uncertain
 Standard

Include	Color	Pos Name	Cp	Concentration	Stand...	Status
<input checked="" type="checkbox"/>		C2 ST 10na5	17,48	6,71E4	1,00E5	
<input checked="" type="checkbox"/>		C3 ST 10na5	17,43	1,01E5	1,00E5	
<input checked="" type="checkbox"/>		C4 ST 10na5	17,44	1,00E5	1,00E5	
<input checked="" type="checkbox"/>		C6 Sm11	14,88	6,03E5		
<input checked="" type="checkbox"/>		C7 Sm11	14,85	6,18E5		
<input checked="" type="checkbox"/>		D10 Sm117	13,76	1,32E6		
<input checked="" type="checkbox"/>		D11 Sm117	13,70	1,38E6		

Samples	MeanCp	Replicate Statistics		Mean conc	STD conc
		STD Cp			
C2, C3, C4	17,45	0,03		9,93E4	1,98E3
C5, E2					
C6, C7	14,86	0,02		6,10E5	8,87E3
C8, C9	15,62	0,09		3,59E5	2,35E4
C10, C11	14,54	0,09		7,64E5	5,00E4
D8, D9	16,21	0,04		4,79E5	1,18E4
D4, D5	15,07	0,01		5,27E5	4,70E3
D6, D7	12,71	0,08		2,77E6	1,61E5
D8, D9	14,06	0,07		1,07E6	4,97E4
D10, D11	13,73	0,04		1,35E6	4,25E4



Přístroj: LightCycler 480 Instrument II, Roche
 Software: LightCycler 480, version 1.5.1.62, Roche

Error: 0,0244
 Efficiency: 2,017
 Slope: -3,282
 YIntercept: 35,98
 Link: 46,41



INFORMACE O DUŠEVNÍM VLASTNICTVÍ

- Tato prezentace je autorským dílem vytvořeným zaměstnanci Masarykovy univerzity.
- Studenti kurzu/předmětu mají právo pořídit si kopii prezentace pro potřeby vlastního studia.
- Jakékoliv další šíření prezentace nebo její části bez svolení Masarykovy univerzity je v rozporu se zákonem.
- Toto cvičení bylo provedeno za podpory Výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069)

