

Jméno studenta:  
UČO:

**MUNI | RECETOX**  
SCI



## Cvičení 09

# Eubakteriální qPCR z bukálního stěru

E2050 Laboratorní cvičení z molekulární biologie a mikrobiologie  
Mateřský obor: Životní prostředí a zdraví

Vypracovaly: Mgr. Pavla Holočová, Ph.D.  
Garance: doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA

Tato práce byla provedena za podpory Výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069)

Jméno studenta:  
UČO:

**MUNI | RECETOX**  
SCI

Poznámky studenta

Jméno studenta:  
UČO:

## Teoretický úvod

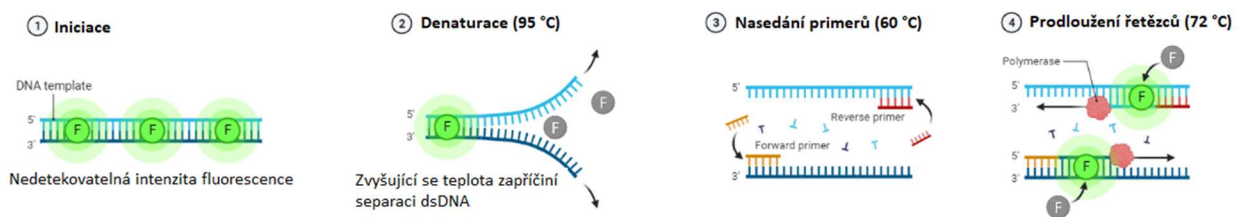
**Klíčová slova:** Real-time PCR, kvantitativní PCR (qPCR), gen pro 16S rRNA, fluorescenční značení, TaqMan<sup>TM</sup> sondy

Metoda real-time PCR (qPCR) slouží pro amplifikaci a kvantifikaci DNA ve vzorku. Metoda je založena na principu klasické PCR, ovšem s využitím speciálního cyklu, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává fluorescenční signál udávající kvantitu DNA, a to v průběhu každého cyklu.

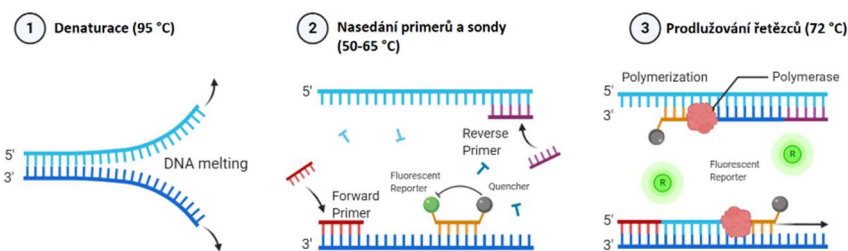
Bylo vyvinuto několik metodických postupů, jak k reakci přidat fluorescenční barvivo. Fluorescenční značka je buďto navázána nespecificky na dsDNA (SYBER<sup>®</sup> Green) nebo se využívá fluorescenčně značených sond (např. TaqMan<sup>TM</sup> sondy), které se na DNA váží specifickou sekvencí dovnitř amplifikované části DNA. Během amplifikace, kdy se exponenciálně zvyšuje množství PCR produktu, dochází současně k nárůstu fluorescence DNA (Obrázek 1).

A

### Princip fluorescenčního barvení pro qPCR



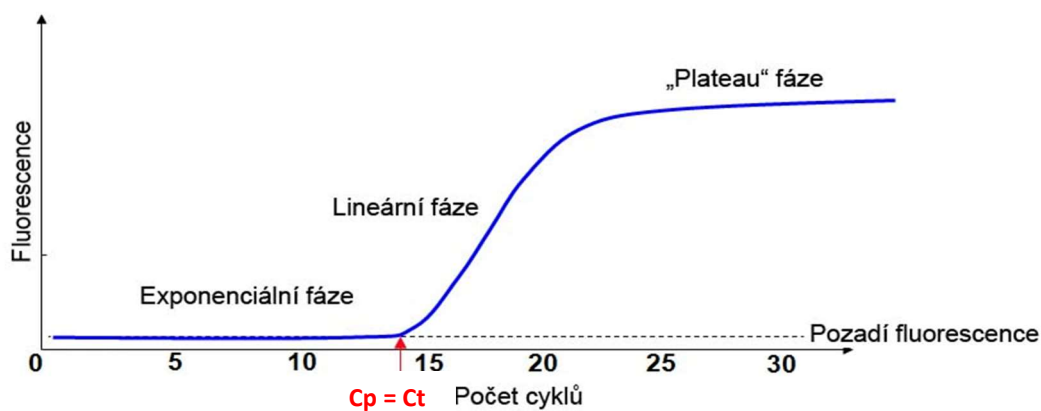
B



Obrázek 1: Příklady použití fluorescenčních barviv pro kvantifikaci DNA metodou qPCR. A) nespecifická vazba fluorescenčního barviva na DNA, B) specifická sonda označená reportérem a zhášedčem.

Jméno studenta:  
UČO:

Metoda qPCR se dělí do čtyř fází. V 1. fázi je množství DNA a tím i fluorescence nízká a nepřesahuje úroveň pozadí. Ve druhé exponenciální fázi je syntéza DNA již na takové úrovni, že intenzita fluorescence přesahuje úroveň pozadí a může být zachycena detektorem. V ideálním případě nárůst množství DNA je  $2^n$ , kde  $n$  je počet proběhlých cyklů PCR. Intenzita fluorescence a množství DNA věrně odráží množství templátové DNA dodané do reakce, a proto se kvantifikace templátové DNA provádí na základě fluorescence detekované v této fázi. 3. lineární fáze je množství templátové DNA na takové úrovni, že v této fázi dochází k strmému nárůstu fluorescence. 4. fáze je tzv. „plateau“ fáze, kdy je sice přítomno obrovské množství templátové DNA, ale dochází k tzv. „únavě“ reakce (např. některé komponenty reakce byly již spotřebovány), a tak se kinetika reakce výrazně zpomaluje. Hodnota fluorescence produkované v této fázi nemusí reflektovat množství DNA, a tak není vhodné tuto fázi pro kvantifikaci DNA využívat (Obrázek 2).

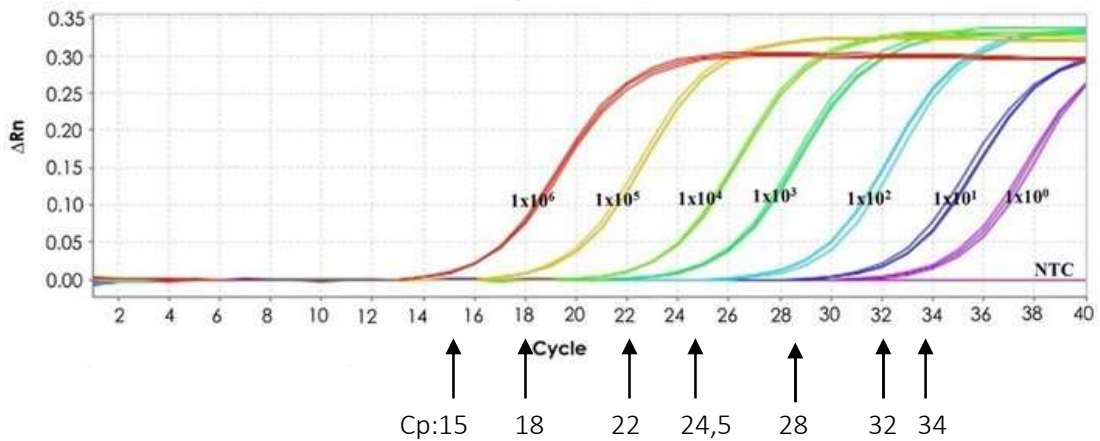


Obrázek 2: Průběh qPCR ukazující nárůst fluorescence během exponenciální, lineární a „plateau“ fáze. V obrázku je znázorněna hodnota Ct, jiné zdroje označují tuto hodnotu jako Cp.

Jak bylo zmíněno výše, pro kvantifikaci se používá bod, kdy dochází k první detekci fluorescence, a tento bod se nazývá Cp (crossing point) nebo také Ct hodnota (threshold cycle). Tato hodnota je rovna cyklu, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí reakce. Čím je Cp (Ct) nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA, a naopak (Obrázek 2).

Abychom mohli podle dané Cp hodnoty určit koncentraci DNA ve vzorku, je třeba připravit kalibrační křivku s přesně definovanými koncentracemi. Standardní křivka se připravuje z ředící řady templátové DNA (např. desítkové ředění). S jednotlivými vzorky ředící řady se provede qPCR a k získané Cp hodnotě se přiřadí koncentrace DNA (Obrázek 3). Pomocí kalibrační křivky se vypočítá také účinnost (efficiency) reakce, která při ideálním = lineárním průběhu reakce je 100 %.

Jméno studenta:  
UČO:



Obrázek 3: Příklad kalibrační křivky. Na obrázku jsou vidět křivky desítkového ředění a odpovídající Cp hodnoty.

V dnešním cvičení připravíte qPCR s nespécificky se vázaným fluorescenčním barvivem SYBER® Green s využitím absolutní kvantifikace. Amplifikovaná oblast DNA bude část genu pro 16S rRNA, což nám umožní kvantifikaci bakteriální DNA (resp. prokaryotní DNA) v klinickém vzorku. Pojem eubakteriální PCR se používá právě pro takovouto detekci. Vzorky se do reakce připravují v duplikátu, a to z důvodu pipetovací chyby. V rámci analýzy bude kromě vzorku analyzována také pozitivní kontrola a negativní kontrola. Pozitivní kontrola je současně kalibrátor o známé koncentraci, který nám umožní určit koncentraci DNA ve vzorku. Kvůli ztrátám při pipetování se při přípravě každé reakční směsi vždy počítá s cca 10% navýšením objemu reagensů, v našem případě se reakční směs bude připravovat pro 7 vzorků, ačkoliv do analýzy bude vstupovat jen 6. Vyhodnocení křivek a odečet koncentrací proběhne v dalším týdnu během cvičení 10.

Jméno studenta:  
UČO:

## Postup pro práci v laboratoři

Materiál:

- DNA extrahovaná z bukálního stěru (z předchozího cvičení 03)
- PCR voda
- LightCycler® 480 SYBER® Green I Master (polymeráza)
- Primery TotBac\_16S\_F a TotBac\_16S\_R (forward a reverse) pro 16S rRNA
- DNA pro pozitivní kontrolu 16S rRNA (pDNA)
- Strip mikrozkuvek pro LightCycler 480 (1 ks) + víčka
- Pipety (1-10 µl, 10-100 µl)
- Špičky (1-10 µl, 10-100 µl)
- Zkumavky (eppendorfký) o objemu 1,5 ml (1 ks)
- Vortex
- Spin centrifuga

### Příprava materiálu a pracovního prostoru

1. Připravte si prostor pro práci (vystříkat pracovní plochu ethanolem).
2. Připravte a nechte rozmrazit při pokojové teplotě (RT) materiál pro PCR: vzorek DNA, LightCycler® 480 SYBER® Green I Master, primery Reverse a Forward TotBac\_16S (10 µM), PCR-voda.  
*Poznámka: Tento materiál je již nachystaný na stole, zkontrolujte, že máte všechny.*
3. Doplněte změřenou koncentraci DNA z minulého cvičení a dopočítejte si množství potřebné pro přípravu reakční směsi v Tabulkách 1 a 2, viz šedě vyznačené buňky.

**Tabulka 1: Reakční směs pro 16S rRNA qPCR**

REAGENCIE	Finální koncentrace	MNOŽSTVÍ 1 reakce	MNOŽSTVÍ 7 reakce
LightCycler® 480 SYBER® Green I Master	1x	5 µl*	
PCR-voda	-	2,4 µl	
TotBac_16S Forward primer (10 µM)	0,3 µM	0,3 µl	
TotBac_16S Reverse primer (10 µM)	0,3 µM	0,3 µl	
DNA		2 µl	-
<b>Celkový objem</b>	-	<b>10 µl</b>	-

*\*Objem MasterMixu s polymerázou obvykle tvoří polovinu celkového objemu reakce. Pokud se rozhodneme do reakce přidávat méně nebo více DNA vzorku, pak celkový objem reakce upravujeme pomocí odebrání nebo přidání vody.*

4. Popište si 1,5 ml zkumavku pro přípravu reakční směsi číslem DNA vzorku. Popište si strip na bílé koncové části, která je určena pro popis číslem DNA vzorku.

### Příprava reakční směsi a PCR

1. Připravte si reakční směs pro amplifikaci genu pro 16S rRNA do 1,5 ml zkumavky. Napipetujte dle Tabulky 1: LightCycler® 480 SYBER® Green I Master, PCR-vodu a oba primery pro 7 reakcí.  
*Poznámka: Vždy se postupuje v pipetování od reagentie s největším objemem a vždy pipetujeme malé objemy pod hladinu.*
2. Roztok ve zkumavce důkladně promíchejte propipetováním.  
*Poznámka: Alternativně lehce obsah promíchat na vortexu.*

Jméno studenta:

UČO:

3. Zkumavku po promíchání bleskově stočte na mikrocentrifuze.
4. Z takto připravené směsi přeneste 8  $\mu$ l do šesti zkumavek stripu.
5. Do první zkumavky přidejte 2  $\mu$ l DNA vzorku, do druhé zkumavky přidejte 2  $\mu$ l DNA pozitivní kontroly, do třetí zkumavky 2  $\mu$ l PCR-vody (negativní kontrola) – dle vzoru:

<b>A strana</b>	DNA vzorku	DNA vzorku	DNA poz kontrola	DNA poz kontrola	neg kontrola (H <sub>2</sub> O)	neg kontrola (H <sub>2</sub> O)	-	-	<b>Místo na popis</b>
-----------------	------------	------------	------------------	------------------	---------------------------------	---------------------------------	---	---	-----------------------

6. Strip uzavřete samostatným víčkem (**VÍČKO NEPOPISUJTE** – přes víčko se odečítá fluorescence).
7. Promíchejte na vortexu, bleskově stočte 1 minutu.
8. Všech 6 zkumavek s reakční směsí vložte do termocykleru a zapnout příslušný PCR program dle Tabulky 2.

**Tabulka 2:** Reakční podmínky programu EUB\_qPCR na LightCycler 480 Instrument II (Roche)

	Temperature	Time	Acquisition Mode	Ramp Rate (°C/s)	Cycles	Analysis mode
Preincubation	98 °C	3 min	None	4.4	1 x	None
Amplification	95 °C	10 s	None	4.4	40 x	Quantification
	55 °C	15 s	None	2.2		
	72 °C	20 s	Single	4.4		
Melting curve	95 °C	5 s	None	4.4	1 x	Melting Curves
	65 °C	1 min	None	2.2		
	97 °C	-	Continuous	0.06		
Cooling	40 °C	10 s	None	1.5	-	None

Jméno studenta:  
UČO:

Protokol k vyplnění:  
*Závěr/zhodnocení*



Jméno studenta:  
UČO:

Odpovězte na otázky:

**1) Vyberte správné tvrzení:**

- a) Během qPCR se detekuje snižující se intenzita fluorescence.
- b) Metoda qPCR využívá principu klasické PCR, kdy dochází k exponenciálnímu nárůstu počtu kopií DNA, a detekce nárůstu fluorescence během PCR.
- c) Metoda qPCR nesleduje nárůst množství amplifikované DNA v reálném čase, protože na to neexistuje vhodný přístroj.
- d) Nezáleží na množství detekované fluorescence.

**2) Vyberte správné tvrzení:**

- a) Pro stanovení koncentrace DNA ve výchozím vzorku se používá „plateau“ fáze.
- b) Pro stanovení koncentrace DNA ve výchozím vzorku se používá lineární fáze.
- c) Čím vyšší je  $C_p$  hodnota, tím více je DNA ve vzorku.
- d) Pro stanovení koncentrace DNA ve výchozím vzorku je klíčová  $C_p$  hodnota.

**3) Co je to  $C_p$  hodnota**

- a)  $C_p$  hodnota vyjadřuje množství fluorescence pod úroveň pozadí.
- b)  $C_p$  hodnota odpovídá cyklu qPCR, kdy dochází k prvnímu zachytu fluorescence nad úroveň pozadí.
- c)  $C_p$  hodnota určuje účinnost qPCR.
- d)  $C_p$  hodnota se v qPCR nevyužívá.

**4) Co je to účinnost reakce?**

- a) Účinnost reakce vypovídá o kinetice qPCR, zda probíhá lineárně, potom je účinnost reakce 100 %.
- b) Účinnost qPCR by neměla klesnout pod 80 % a překročit 110%.
- c) Účinnost qPCR se stanoví na základě kalibrační křivky připravené pomocí desítkového ředění templátové DNA.
- d) Všechna tvrzení jsou správná.

**5) Vyberte správné tvrzení o relativní kvantifikaci:**

- a) Využívá se pro absolutní kvantifikaci DNA ve vzorku.
- b) Vyjadřuje míru exprese genu v analyzovaném vzorku, porovnává se míra fluorescence analyzovaného vzorku a referenčního vzorku.
- c) Relativní kvantifikace využívá přesně stanovené jednotky koncentrace ng/ $\mu$ l.