

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

.....

.....

Ćwiczenie nr 4.

PCR jakościowy.

PCR ilościowy.

Na zajęcia proszę przynieść kalkulatory z funkcjami potęgowymi.

Zadanie 1. Reakcja Łańcuchowa Polimerazy.

WAŻNE! Pamiętaj o każdorazowej wymianie końcówek przy odpipetowywaniu nowego odczynnika (zapobieganie kontaminacji). Pracuj tylko w rękawiczkach z zachowaniem zasad sterylności!

1. Do sterylnej, podpisanej probówki o pojemności **0,2 ml** dodaj odczynniki zgodnie z informacjami zamieszczonymi w tabeli nr 1- **Próbka PCR** (kolejność również istotna). Jeden zespół na grupę zamiast próbki PCR przygotowuje reakcję kontrolną **NC** z wykorzystaniem materiału z kontrolnego RT – kontrola czystości odczynników. Wszystkie czynności wykonuj trzymając probówkę cały czas na lodzie.

Tabela 1.

Odczynnik	Stężenie końcowe	Próbka PCR	Próbka NC
Woda (DEPC)	-	5,5 µl	6,5
10x Pol Buffer C	1x	1 µl	1 µl
Starter FORWARD (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
Starter REVERSE (5 µM)	0,25 µM	0,5 µl	0,5 µl
dNTPs (2 mM każdy)	0,2 mM	1 µl	1 µl
DNA (cDNA z ćwiczenia 3)		1 µl (RT)	1 µl RT-NC
Polimeraza Taq (0,5U/ µl)	0,25U	0,5 µl	0,5 µl

2. Po dodaniu wszystkich składników, zawartość probówki delikatnie wymieszaj przez pipetowanie i zwirowanie, tak aby całość znalazła się na dnie probówki. Ponownie umieść probówkę w lodzie.

Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

3. Zaprogramuj termocykler na następujący profil termiczny

Wstępna denaturacja: 3 min- 94°C

Cykl:

Denaturacja: 30 s- 94°C

Przyłączanie starów: 30 s- 51°C

Synteza nici: 30 s- 72°C

Ilość cykli: 40

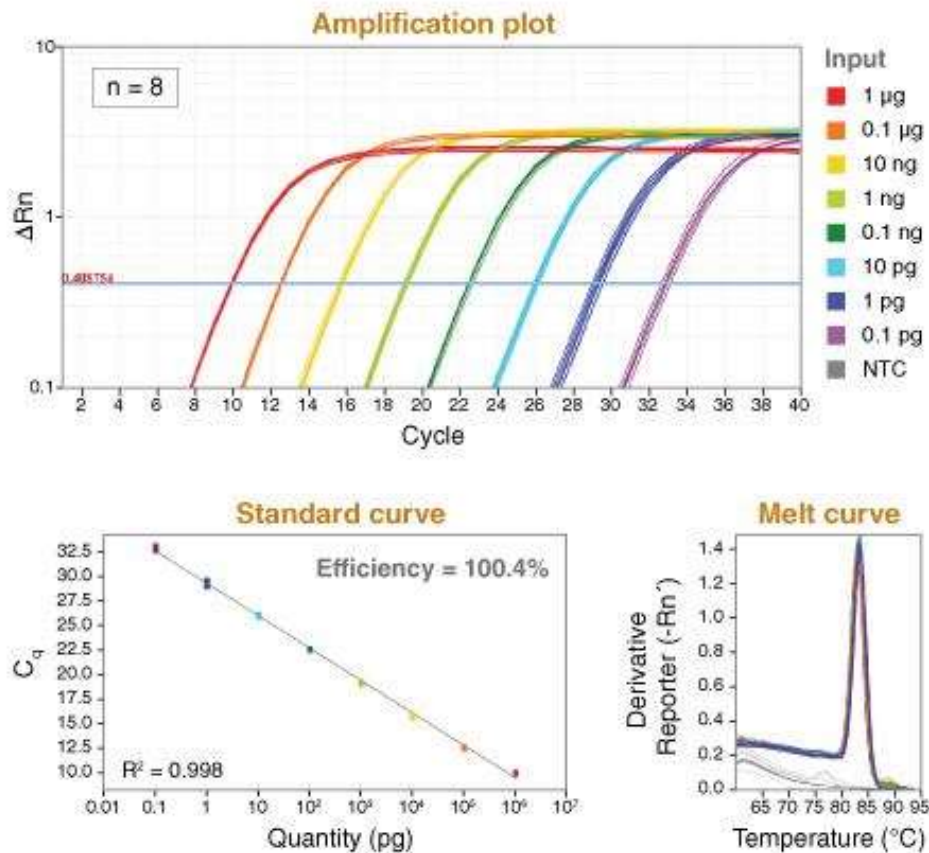
Dodatkowa elongacja 5 min.-72°C

4. Umieść próbkę w termocyklerze i rozpocznij reakcję.

5. Po zakończeniu reakcji próbki z produktami PCR oddaj do pokoju przygotowawczego w celu przechowania do kolejnych zajęć. Produkty przechowywać w -20° C. Unikać częstego rozmrażania/zamrażania materiału. **Dokładnie podpisać swoje próbki, nr grupy i inicjałami!!!**

Zadanie 2. Ilościowy PCR

1. **Krzywa standardowa przedstawia zależność cyklu C(t) reakcji PCR od ilości standardu beta-aktyny. Na podstawie tego wykresu wyznacz ekspresję beta aktyny w badanych próbkach (tabela 2).**



Instrukcja ćwiczeń „Biologia molekularna” dla II roku Farmacji

Tabela 2.

Próbka	Powtórzenie	C _t	Śr C _t	Ilość matrycy ACTB w próbce [pg]	Ilość cDNA użytego do reakcji PCR	Ilość ACTB na 1 ng cDNA
1.	1.	20,005			5ng	
	2.	20,062			5 ng	
	3.	19,985			5 ng	
2.	1.	25,478			2 ng	
	2.	25,512			2ng	
	3.	25,431			2ng	

2. Na podstawie wyników zawartych w tabeli nr 3 dokonaj stosownych obliczeń w celu określenia ekspresji (RQ) genu insuliny (INS) i VEGF metodami względnymi (względem kontroli). Jako wewnętrzną kontrolę (housekeeping gene) wybrano GAPDH. Wydajność przyrostu produktu (E) w reakcji PCR, wyznaczona na podstawie krzywych rozcieńczeń, dla GAPDH, INS i VEGF wynosiła odpowiednio 1,9925 (kierunkowa 3,34); 1,9645 (kierunkowa 3,41) i 1,9492 (kierunkowa 3,45).

Tabela 3.

Próbka	GAPDH (C _T)	INS (C _T)	VEGF (C _T)	RQ (INS)	RQ (VEGF)
1.Kontrola	20,122	25,617	29,012		
1.Badana	20,624	30,612	33,815		
2.Badana	19,855	24,988	28,918		
3.Badana	21,503	23,004	25,807		

Obliczenia: