

Grupa.....

Wrocław,

Imię i nazwisko studenta:

Imię i nazwisko prowadzącego:

Ćwiczenie nr 4.

Badanie metylacji DNA

Badanie populacyjne ekspresji mikroRNA- algorytmy w analizie qPCR.

Na zajęcia przynieść kalkulatory z funkcjami potęgowymi.

Odczynniki:

Woda (DEPC)- wolna od nukleaz
Plazmidowe DNA z ćwiczenia 2
Enzymy restrykcyjne: *Bam*HI, *Bcl*II
10 FastCut Buffer
10x Fast Digest Buffer
Bufor TBE,
1% żel agarozowy w buforze TBE
Marker DNA Perfect 1kb plus
6x Loading Buffer

Sprzęt:

Miniwirówka
Termoblok
Aparat do elektroforezy
Transiluminator

Zadanie 1. Metylacja DNA

1. Z pokoju przygotowawczego odebrać próbki plazmidowego DNA (izolowane przez Państwa na ćwiczeniu 2).
2. Reakcje przygotować zgodnie z tabelą poniżej, w sterylnych probówkach (3 szt) o pojemności 1,5 ml (probówki koniecznie podpisać!). W przypadku zbyt dużego stężenia plazmidowego DNA, przygotować jego 10-krotne rozcieńczenie przy użyciu sterylnej wody, w czystej probówce). Kolejność pipetowania zgodnie z tabelą.

Tabela. Skład reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi. Objętość końcowa reakcji 10 μ l.

Składnik	pcDNA3/ <i>Bam</i> HI	pcDNA3/ <i>Bcl</i> II	pcDNA3
Woda	Oblicz objętość	Oblicz objętość	Oblicz objętość
10x FastDigest Buffer	1 μ l	-	-
10x FastCut Buffer	-	1 μ l	-

Plazmidowe DNA (1 µg)	Oblicz objętość	Oblicz objętość	Oblicz objętość
BamHI (10U)	1 µl	-	-
BclI (10U)	-	1 µl	-

- Składniki reakcji wymieszać (vortex lub pipetowanie), po czym zwirować tak, aby roztwór znalazł się na dnie próbówki.
- Reakcje z enzymami BamHI, prowadzić w 37° C (termo blok) przez 30 minut. Reakcje z enzymem BclI prowadzić w tym samym czasie w temperaturze 50°C.

Zadanie 2. Elektroforeza produktów trawienia z zadania 1

- Do reakcji z trawienia plazmidowego DNA enzymami BclI dodać 2 µl buforu do próbek (6x Loading Buffer)
- Próbówki zwirować i nakładać na dołki w żelu agarozowym. Pamiętać, aby do pierwszego dołka nałożyć marker długości fragmentów DNA (drabinka DNA). Elektroforezę prowadzić przez 45-60 min przy 80-100V.
- Po elektroforezie żel umieścić na lampie UV (transiluminator). Wyniki przedstawić graficznie poniżej na schemacie

1	2	3	4	5	6

Marker DNA Perfect 1kb plus pcDNA/BamHI pcDNA/BclI Natywny pcDNA3

Ilość i wielkość produktów po trawieniu *BamHI*:.....

Ilość i wielkość produktów po trawieniu *BclI*:.....

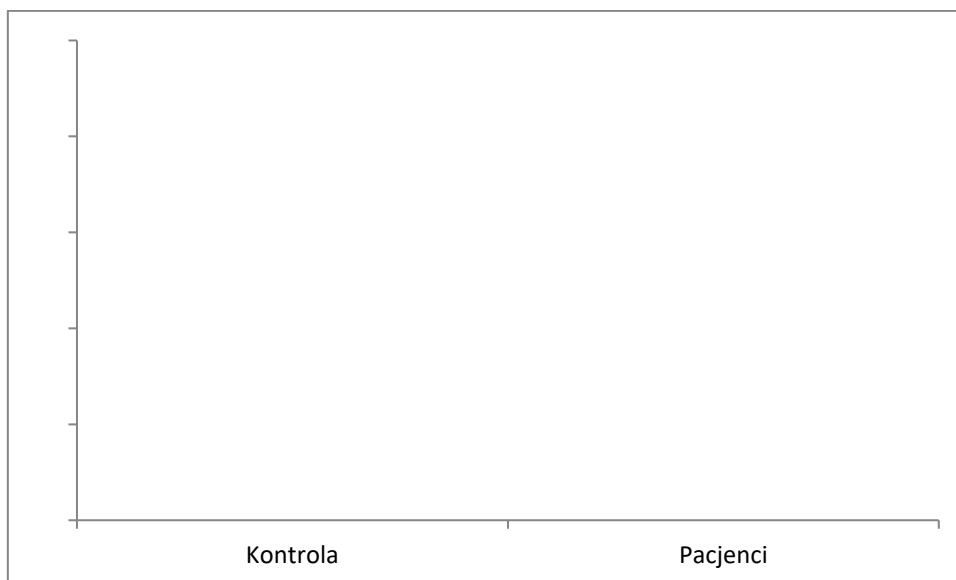
WNIOSEK: **Otrzymany plazmid posiadał / nie posiadał* metylację dam** (* niewłaściwe skreślić)

Zadanie 3.

Korzystając z algorytmu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ uzupełnij tabelę 1 i 2 oraz oblicz średnią ekspresję mikroRNA dla pacjentów oraz osób z grupy kontrolnej. Wynik przedstaw również w formie graficznej w postaci wykresu słupkowego (poniżej), pamiętając o dobraniu odpowiedniej skali na osi y.

Średnie względna ekspresja grupy kontrolnej (RQ)..... log RQ.....

Średnie względna ekspresja grupy badanej (RQ)..... log RQ.....



$\Delta Ct = \text{średnia } Ct(\text{gen badany miR29c}) - \text{średnia } Ct(\text{gen referencyjny RNU48})$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{pacjent/ kontrola}) - \text{średnia } \Delta Ct \text{ dla wszystkich kontrol}$

Instrukcja ćwiczeń „Diagnostyka molekularna” dla IV roku Analityki Medycznej

Kontrola	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	K12	K13	K14	K15	K16	K17	K18	K19	K20
RNU48																				
Ct1	18,39 3	19,61 9	19,80 8	19,60 2	19,19 8	19,21 7	19,17 1	18,956	18,05 9	18,63 5	16,93 8	18,01 6	17,63 8	18,80 3	18,77 4	22,02 8	18,77 5	18,80 3	18,17 6	18,72 1
Ct2	18,57 4	19,62 6	19,91 7	19,78 4	19,32 6	19,29 4	19,29 0	19,013	18,27 0	18,73 4	16,96 9	17,98 8	17,79 9	18,89 3	18,76 7	21,97 7	19,02 4	18,91 7	18,39 4	18,67 4
Ct3	18,78 0	19,74 7	19,96 4	19,71 3	19,25 2	19,35 9	19,46 5	19,030	18,42 1	18,82 6	17,11 3	18,05 7	17,93 3	19,14 4	18,85 7	22,03 9	19,00 8	18,95 1	18,25 6	18,81 8
Średnia ct																				
miR29c																				
Ct1	25,51 3	26,05 0	25,83 0		25,69 2	25,49 3	25,21 8	25,950	24,84 5	23,45 5	23,44 3	23,61 6	23,80 2	25,09 0	24,25 6	28,12 2	24,92 2	24,02 9	24,73 0	24,96 2
Ct2	25,62 9	26,22 1	25,98 5	25,71 0	25,83 9	25,55 0	25,34 4	26,046 4	24,98 9	23,56 7	23,66 7	23,88 6	23,70 0	24,96 0	24,30 2	28,02 7	24,99 9	24,19 2	24,97 3	24,91 8
Ct3	25,71 9	26,31 6	26,17 8	25,72 3	25,98 9	25,49 8		26,581	25,25 8	23,79 1	23,68 3	23,93 3	24,06 8	25,14 7	24,58 4		25,33 3	24,45 1	25,05 0	25,17 5
Średnia ct																				
Δ ct																				
Średnia ΔCt dla wszystkich kontrol:																				
ΔΔct																				
RQ=2 ^{-ΔΔct}																				
LogRQ																				

Instrukcja ćwiczeń „Diagnostyka molekularna” dla IV roku Analityki Medycznej

Tabela 2. Pomiary Ct dla pacjentów

Pacjent	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20
RNU48																				
Ct1	18,780	18,605	16,538	20,914	17,372	18,397	21,197	17,593	21,573	18,073	20,229	19,218	19,191	18,567	19,093	20,457	18,341	18,156	18,755	18,780
Ct2	18,957	18,652	16,989	21,214	17,396	18,908	21,306	17,764	21,699	18,315	20,287	19,356	19,333	18,650	18,984	20,451	18,741	18,226	18,829	18,957
Ct3	19,149	18,745	17,188	21,163	17,626	18,563	21,436	17,836	21,868	18,305	20,312	19,429	19,234	18,748	19,101	20,626	18,518	18,255	18,968	19,149
Średnia ct																				
miR29c																				
Ct1	22,020	22,891	26,616	22,995	23,001	23,191	23,306	21,681	23,450	22,191	23,585	21,833	25,334	24,097	25,871	22,013	22,815	24,892	24,438	22,020
Ct2	22,340	22,954	26,731	23,160	22,890	23,180	23,352	22,025	23,654	22,226	23,718	21,934	25,532	24,078	25,840	22,201	22,816	24,918	24,651	22,340
Ct3	22,340	22,989	28,041	23,67	23,274	23,148	23,484	22,050	23,635	22,572	23,712	22,138	25,754		26,210	22,262	23,193	25,287	24,651	22,340
Średnia ct																				
Δ ct																				
ΔΔct																				
RQ=2 ⁻ ΔΔct																				
LogRQ																				