

IV KB, etap finałowy. Rozwiązanie zadania 5

Zadanie 5 (10 pkt)

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (QPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*) pozwala na określenie ilości komplementarnego DNA (cDNA, ang. *complementary DNA*) w przygotowanej próbce w stosunku do ilości badanych genów referencyjnych. Po izolacji z materiału biologicznego całkowitego RNA i odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo-dT uzyskuje się DNA komplementarne do wszystkich mRNA zawartych w próbce, w tym do Twojego genu badanego (nazwijmy go „**gen A**”) i genów referencyjnych (niech będą to „**gen R1**” i „**gen R2**”). Ten cDNA stanowi matrycę w QPCR.

Wykonujesz następujący eksperyment: oznaczasz ilość genu A i dwóch genów referencyjnych: R1 i R2 stosując dla każdego oznaczenia trzy ilości matrycy:

120 ng/studzienkę, 60 ng/studzienkę i 30 ng/studzienkę według schematu obrazującego studzienki w płytce do przeprowadzania reakcji (każda ilość DNA jest w duplikacie, czyli w dwóch powtórzeniach):

A_120	A_120	R1_120	R1_120	R2_120	R2_120
A_60	A_60	R1_60	R1_60	R2_60	R2_60
A_30	A_30	R1_30	R1_30	R2_30	R2_30

W każdej studzience znajdzie się przed pomiarem **10 µl** mieszaniny reakcyjnej (V_k). Korzystasz z gotowego, komercyjnie dostępnego zestawu, zawierającego tzw. „2x mix”, w którym wszystkie (za wyjątkiem matrycy i starterów, które musisz dodać oddzielnie) potrzebne składniki są w stężeniu dwa razy większym niż ich stężenie końcowe w mieszaninie reakcyjnej.

Do każdej studzienki napipetujesz:

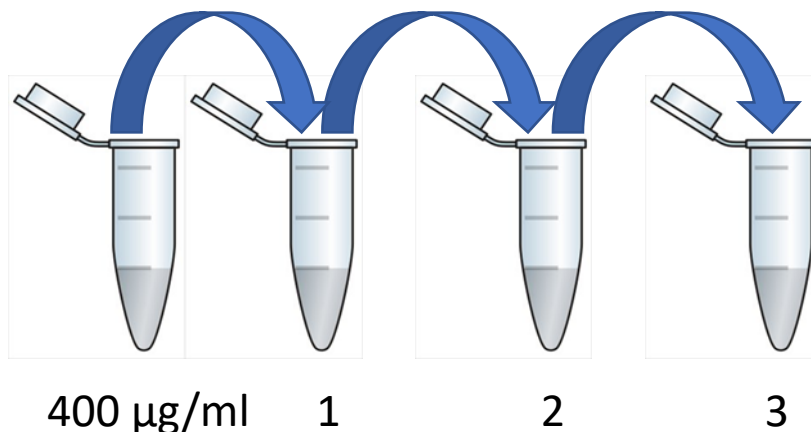
- **5 µl „2x mix”,**
- **3 µl Twojej próbki (matrycy cDNA)**
- **2 µl równomolowej mieszaniny starterów**
do studzienek oznaczonych kolorem żółtym będzie napipetowana mieszanina dwóch starterów specyficznych w stosunku do genu A, zielonym – genu R1, a niebieskim - genu R2.

Oznaczyłaś/oznaczyłeś **stężenie cDNA w Twojej próbce – wynosi ono 400 µg/ml**, a po oznaczeniach zostało Ci tej próbki bardzo niewiele, wobec tego musisz oszczędnie nią gospodarować używając tylko tyle ile konieczne.

Zamówiłaś/zamówiłeś 3 pary starterów, każda para specyficzna w stosunku do jednego z oznaczanych genów. **Stężenie każdego ze starterów wynosi 100 µM.**

Pytania:

- A. Oblicz jakie stężenia DNA (wyrażone w $\mu\text{g/ml}$) znajdują się w studzienkach oznaczonych jako A/R1/R2_30, A/R1/R2_60 i A/R1/R2_120 (2 pkt)
30 ng/10 μl = 3 ng/ μl = 3 $\mu\text{g/ml}$. Analogicznie: 6 $\mu\text{g/ml}$ i 12 $\mu\text{g/ml}$
- B. Policz jakie musisz przygotować rozcieńczenia próbki DNA w wodzie **według poniższego schematu**, na którym 1 oznacza stężenie najwyższe, a 3 najniższe. Z tych probówek będziesz dodawać po **3 μl** do studzienek. Podaj jaką objętość roztworu DNA (i o jakim stężeniu) oraz ile wody napipetujesz do każdej z probówek 1, 2 i 3, żeby uzyskane objętości DNA dokładnie wystarczyły na wszystkie studzienki. (5 pkt)



Obliczenia: **W każdej probówce musi się znaleźć 18 μl , ponieważ musimy dodać cDNA o danym stężeniu do 6 studzienek (6 studzienek * 3 μl).**

W probówce 1 musi być stężenie DNA = 120 ng : 3 μl = 40 ng/ μl ,

w probówce 2 - 60 ng : 3 μl = 20 ng/ μl ,

w probówce 3 – 30 ng : 3 μl = 10 ng/ μl .

Jeśli przygotowujemy rozcieńczenia w sposób kroczący, czyli tak jak na rysunku, to najlepiej policzyć “od tyłu”:

Probówka 3: tu ma być stężenie DNA 10 ng/ μl uzyskane z roztworu 20 ng/ μl , a więc roztwór z probówki 2 musimy rozcieńczyć dwukrotnie. Potrzebujemy 18 μl , a więc:

Probówka 3 (10 ng/ μl) = 9 μl roztworu 20 ng/ μl z prob. 2 + 9 μl wody

Analogicznie postępujemy z Probówką 2, ale musimy uwzględnić, że musimy tutaj mieć o 9 μl więcej, a więc 18 μl + 9 μl = 27 μl . Tutaj także musimy rozcieńczyć DNA dwukrotnie, ponieważ użyjemy DNA z probówki 1 (40 ng/ μl)

Probówka 2 (20 ng/ μl) = 13,5 μl roztworu 40 ng/ μl z prob. 1 + 13,5 μl wody

Analogicznie chcemy postąpić z probówką 1: potrzebujemy, żeby w niej objętość DNA wynosiła 18 μl + 13,5 μl = 31,5 μl .

Nasz wyjściowy roztwór cDNA ma stężenie 400 ng/μl, a zatem musimy rozcieńczyć ten roztwór 10-krotnie, aby uzyskać stężenie 40 ng/μl:

Probówka 1 (40 ng/μl) = 3,15 μl roztworu 400 ng/μl + 28,35 μl wody.

Jednak, biorąc pod uwagę dokładność pipet automatycznych, lepiej by było ten roztwór przygotować następująco:

Probówka 1 (40 ng/μl) = 3,5 μl roztworu 400 ng/μl + 31,5 μl wody.

Normalnie w laboratorium, odżałowałabym 5 μl cDNA i przygotowała te roztwory z nadmiarem, biorąc pod uwagę nieuniknione straty podczas pipetowania (tzw. "rozkurz"), przykładowo:

Probówka 1 (40 ng/μl) = 5 μl roztworu wyjściowego 400 ng/μl + 45 μl wody

Probówka 2 (20 ng/μl) = 20 μl roztworu 40 ng/μl z prob. 1 + 20 μl wody

Probówka 3 (10 ng/μl) = 15 μl roztworu 20 ng/μl z prob. 2 + 15 μl wody

Zatem w probówce 1 zostanie mi 30 μl, w probówce 2 – 25 μl, a w probówce 3 będzie 30 μl

!!! Należy pamiętać o dokładnym mieszaniu roztworów przed każdym kolejnym pipetowaniem !!!

- C. Podaj w jaki sposób, jak najoszczędniej, przygotujesz te trzy wymagane równomolowe mieszaniny dwóch starterów specyficznych dla każdego genu, tak, aby końcowe stężenie każdego startera w każdej studzience wynosiło **100 nM** (patrz założenie 1 poniżej). **(3 pkt)**

Obliczenia: **Do każdej studzienki będziemy dodawać po 2 μl równomolowej mieszaniny starterów, czyli mieszanina ta będzie rozcieńczana 5-krotnie (10 μl : 2 μl = 5 razy). Zatem musimy mieć roztwór, w którym każdy ze starterów będzie w stężeniu 5 razy większym, czyli 500 nM (100 nM * 5 = 500 nM). Mamy 100 μM wyjściowe roztwory wszystkich starterów, a więc każdy z tych roztworów musimy rozcieńczyć: 100 μM : 500 nM = 100 μM : 0,5 μM = 200 razy. Potrzebujemy 3 roztwory, każdy zawierający parę starterów specyficzną dla powielanego genu. Objętość każdego roztworu musi być co najmniej 12 μl (6 * 2 μl) (a w praktyce nieco większa biorąc pod uwagę straty podczas pipetowania). Od razu widać, że musimy zrobić większe objętości tych roztworów, bo 12 μl : 200 = 0,06 μl (patrz założenie 1).**

Wobec tego, żeby to zrobić najoszczędniej, dla każdej pary starterów przygotujemy równomolowe mieszaniny o końcowej objętości 100 μl (0,5 μl * 200 = 100 μl) :

0,5 μl startera 1 + 0,5 μl startera 2 + 99 μl wody

W ten sposób otrzymamy 3 roztwory par starterów, każdy w stężeniu 500 nM, które ulegną pięciokrotnemu rozcieńczeniu w każdej studzience, czyli każdy ze starterów będzie miał pożądane 100 nM stężenie końcowe.

Założenia:

1. Najmniejsza objętość, którą możesz napipetować to **0,5 μ l**
2. Dla uproszczenia, na potrzeby konkursu, objętości rozcieńczonego DNA w próbach 1, 2, 3 mają dokładnie odpowiadać potrzebnym ilościom. W laboratorium trzeba by było przygotować roztwory w objętościach około 8-15% większych (na tzw. „rozkurz”).