

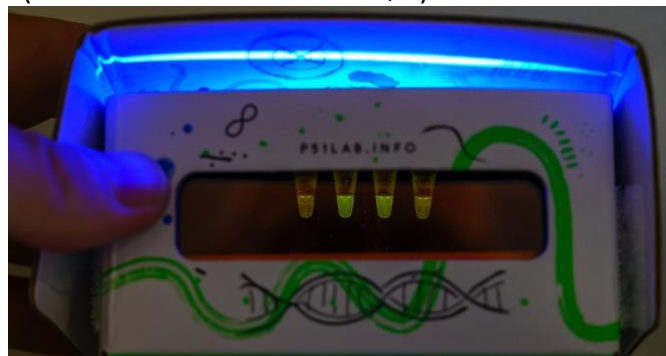
qPCR-eksperiment

Eksperiment

I dette eksperiment udføres en modificeret og forenklet version af qPCR (også kaldet RT-PCR, *Real Time*), så ændringen i fluorescens kan observeres ved hjælp af billigt udstyr. På denne måde fungerer eksperimentet som et eksempel på hvordan fluorescens og PCR kan bruges til at kvantificere mængden af nukleinsyrer (DNA eller RNA) i en prøve, samtidig med at det giver en introduktion til processen med qPCR generelt.

Anvendte teknikker

- Mikropipettering
- PCR
- Kvantitativ PCR (qPCR)
- Gelelektroforese (kan evt. udelades ved tidsnød)



Figur 1
p51-viewer med flourescerende PCR-prøver efter ca. 16 PCR-cykler

Biologisk baggrundsviden:

Se dokumentet "qPCR-baggrundsviden.pdf" på sysbio.dk

Matematisk baggrundsviden:

Se afsnit om eksponentiel og logistisk vækst i en gymnasimatematikbog (mat A og B?)

Overblik

Tidsforbrug	Lærer-forberedelse	Elevaktivitet
20 min	Pippetter DNA og nucleasefrit vand 10 min	A. Planlæg eksperiment og udfør fortynding 20 min
70 min	Pippetter og fordel PCR-reagenser forbered udstyr	B. Forberede og programmere PCR-maskine 20 min C. qPCR-kørsel og p51-observationer 50-60 min
Muligt stop (prøverne kan opbevares i køleskab i op til en uge)		
90 min	Fremstil agarose-geler	D. Gel elektroforese (kan evt. undlades) 20 min Påfør prøver på gel 50 min Elektroforese-"kørsel" 20 min Aflæsning af gel og diskussion af resultater

Materialer

	Reagenser/udstyr	Mængde pr elevgruppe	Opbevaring	Lærer- check- liste
qPCR-sæt fra miniPCR.com ¹	2x qGRN Master Mix: Taq DNA polymerase dNTP PCR-buffer med Mg ²⁺ qPCR flourescerende farve	75 µL	-20 °C	
	qPCR primer	40 µL	-20 °C	
	DNA-prøve (reference)	20 µL	-20 °C	
	Nuclease-frit vand	100 µL	-20 °C	
	100 bp DNA-standard	10 µL	-20 °C	
	Loading farve	30 µL	Stuetemp el. -20 °C	
	4 sammenhængtede PCR-rør	1	Stuetemp.	
Supplering ²	Gelgreen DNA-farve (10.000X Gelgreen)	2 µL pr 20 mL agarosegel	Stuetemp.	
	2 % agarosegel	0,4 g pr 20 mL agarosegel	5 °C eller stuetemp.	
	1X TBE elektroforese buffer	ca 100 mL*	Stuetemp.	
	Mikrocentrifugerør (1,7 mL) til at blande reagenser	4		
Supplering fra skolens materialer	PCR-maskine	1 (4 "slots")		
	P51-viewer (se figur 1)	1		
	2-20 µL pipette	1		
	2-20 µL pipettespidser	16		
	20-200 µL mikropipette	1		
	20-20 µL pipettespidser	16		
Vandfast tusch				
Kitler, sikkerhedsbriller etc...				

*Afhænger af elektroforesekarets udformning.

¹ Kan købes hos skolebutik.dk, kontaktperson Henrik Høvdinghof eller på minipcr.com.

² Kan købes som "Lab companion Kit" hos skolebutik.dk eller på minipcr.com.

A. Eksperimentel planlægning og fortynding

Du skal undersøge 3 prøver og en negativ kontrol ved hjælp af qPCR:

- Din lærer vil give dig et rør mærket R (Reference) med 20 μL med en kendt koncentration af DNA: 40 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Du bruger denne reference-prøve som basis til at beregne de relative koncentrationer af dine andre prøver.

2. Brug nedenstående til at planlægge prøve E (Eksperimentel) og prøve U (Ukendt som et andet elevhold skal undersøge):

- For at fremstille E-prøven skal I blande nukleasefrit vand og noget af jeres R-prøve for at fremstille en ny fortynding af DNA.
- Planlæg at fremstille mellem 20 og 40 μL prøve E, men brug maksimalt 10 μL af din R-prøve til at gøre det.
- Formålet med prøve E er at vælge en cyklus, hvor du forventer, at din prøve skal fluorescere i forhold til R, og lave en fortynding der vil være synligt fluorescerende ved denne cyklus.
- Når du har planlagt denne nye fortynding, skal du prøve at forudsige, ved hvilken PCR-cyklus der først vil observeres fluorescens i E-prøven. Dette er baseret på det faktum, at mængden af PCR-produkt teoretisk skal fordobles under hver PCR-cyklus. Du og din gruppe skal altså beslutte hvor fortyndet I vil lave jeres E-prøve.
- Det anbefales, at bruge en fortynding, der producerer fluorescens mellem 3 og 10 cyklusser efter den originale R-prøve.
- På tilsvarende måde skal laves en U-prøve, altså en prøve hvor I kender DNA-koncentrationen, men som er ukendt for et andet elevhold.
- Se evt. Bilag 1 hvor der er hjælp til at beregne koncentrationer i prøverne R, E og U efter udvalgte PCR-cykler.

Planlægning af "E-prøve" og "U-prøve" (Teori):

Den valgte fortyndingsfaktor for "E-prøve" er:
Antallet af yderligere cyklusser, som jeg forventer det vil tage før "E-prøven" at fluorescere sammenlignet med R:
Hvorfor tror jeg dette:
Den valgte fortyndingsfaktor for "U-prøve" er:
Antallet af yderligere cyklusser, som jeg forventer det vil tage for "U-prøven" at fluorescere sammenlignet med R:
Hvorfor tror jeg dette:

Fremstilling af "E-prøve" og "U-prøve" (Eksperimentel):

	R Reference DNA	Fortynding	E Eksperimentel DNA	U "Ukendt" DNA
Koncentration	1X (40 pg/ μ L)			
Tilført volumen			Fra R:	Fra E:
Tilsat volumen vand*				

* DNAase-frit vand

3. Mærk vha vandfast tusch et nyt 200 μ L rør

- Mærk dit rør E for Eksperimentel.

4. Lav din fortynding i rør E

- Brug prøve R og H₂O til at foretage en fortynding som beskrevet i tabellen ovenfor.
- Hvis den valgte fortyndingsfaktor er stor, kan der foretages en seriefortynding vha mere end et rør.

5. Mærk vha vandfast tusch et nyt 200 μ L rør

- Mærk røret U for Ukendt.
- Fjern mindst 10 μ L fra din E-prøve ved hjælp af en mikropipette og overfør til U-røret.
- Sørg for, at dit E-rør stadig indeholder mindst 10 μ L.

6. Find en anden gruppe, og byt U-rør

- Oplys IKKE til den anden gruppe hvad koncentrationen af DNA er i jeres U-prøve. Det er deres opgave at undersøge det!
- Din gruppes opgave er at bestemme koncentrationen af DNA i den anden gruppes U-prøve.

7. Planlæg dit eksperiment

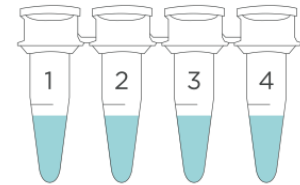
- Inden du går videre til **B. Forberedelse af PCR**, skal du i tabel 2 i afsnittet **Resultater** udfylde den første kolonne (cyklus nr.).
- Vælg observationsinterval – dvs hvor mange PCR-cykler der skal ventes mellem observationer af fluorescens. Det anbefales at observere prøverne efter ca. hver tredje cyklus, men brug den valgte fortyndingsfaktor som en vejledning.
- Den første observation af fluorescens skal være i cyklus 10.
- Det anbefales at der maksimalt foretages op til 7 yderligere PCR-observationer.

B. Forberedelse af PCR

1. Hvis ikke første kolonne i Tabel 2 i afsnittet **Resultater** er udfyldt, så gør det nu!

2. Mærk vha vandfast tusch fire sammenhængende PCR-rør (200 μ L):

- Mærk rørene 1 til 4
- Rør 1 er negativ kontrol (N).
- Rør 2 er DNA-referenceprøve (R).
- Rør 3 er din gruppes valgte eksperimentelle fortynding (E).
- Rør 4 er en anden gruppes ukendte fortynding (U).



3. Tilsæt PCR-reagenser til rør 1-4 som angivet i tabellen nedenfor:

Tilsat reagens	Rør 1	Rør 2	Rør 3	Rør 4
2X qGRN Mastermix (qMM)	15 μ L	15 μ L	15 μ L	15 μ L
qPCR Primer (qPP)	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L	7,5 μ L
DNAase frit vand	7,5 μ L			
DNA-opløsning*		R: 7,5 μ L	E: 7,5 μ L	U: 7,5 μ L

- **HUSK at skifte pipettespids før hver pipettering og sørg for at blande reagenserne ved at pipettere op og ned tre gange!!**
- **Der skal tilsættes 7,5 μ L DNA-opløsninger hhv fra prøverne R, E og U der blev fremstillet i afsnit A.**
- **Det endelige volumen i rør 1, 2, 3 og 4 skal være 30 μ L.**

4. Luk de fire PCR-rørene ved at trykke proppen fast

- Sørg for at al væsken er samlet i bunden af rørene
- Brug evt. "knipse-metoden" eller en mikrocentrifuge.

5. Observer de fire PCR-rør i en p51-viewer (eller en anden type blå-lys-illuminator):

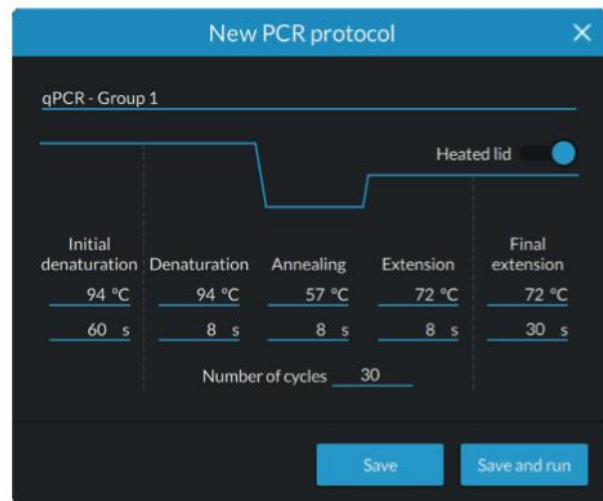
- Dæmp det omgivende lys ved fx at placere p51-vieweren i bunden af et skab.
- Observer ved stuetemperatur og noter observationerne i tabel 1 i afsnittet Resultater.
- NB! Der skal observeres ved 94 $^{\circ}$ C kort efter PCR-reaktionen er igangsat og noter ligeledes observationerne i tabel 1 i afsnittet Resultater.
- Tag eventuelt et foto med en mobiltelefon.

6. Placer de fire PCR-rør i PCR-maskinen og luk PCR-maskinen.

C. PCR-programmering

Anvend en PCR-protokol med følgende parametre:

- Initial denaturation 94 °C, 60 sek.
- Denaturation 94 °C, 8 sek.
- Annealing 57 °C, 8 sek.
- Extension* 72 °C, 8 sek.
- Antal cykler 30
- Final extension 72 °C, 30 sek.
- Heated lid ON



* Det er vigtigt at dette step på 8 sekunder gennemføres inden PCR-reaktionen stoppes og prøvernes fluorescens observeres og noteres i Tabel 2 i afsnittet Resultater. Afhængig af den anvendte PCR-maskine kan dette trin eventuelt forlænges til fx 15 sekunder, så det er muligt at trykke på pause efter 8-10 sekunder. Spørg din lærer hvis du er i tvivl.

D. PCR-observationer

1. I slutningen af den første denaturering (initial denaturation) på 60 sek.
 - Sæt PCR-maskinen på pause, men sørg for at temperaturen i PCR-rørene har været 94 °C i minimum 25 sek inden der trykkes på pause.
 - Tænd lyset i p51-vieweren.
 - Dæmp det omgivende lys ved fx at placere p51-vieweren i bunden af et skab.
2. Løft PCR-maskinens låg
 - Vær forsigtig! Låg og varmeblok er 94 °C!!
3. Observation ved 94 °C
 - Overfør så hurtigt som muligt de fire PCR-rør til p51-vieweren
 - Observer og noter observationerne i tabel 1 i afsnittet Resultater. Tag eventuelt et foto med en mobiltelefon.
4. Sluk for p51-vieweren og returner de fire rør til PCR-maskinen og fortsæt PCR-reaktionen
5. Lad PCR-protokollen køre indtil den næste planlagte observation (Tabel 2 i Resultater): cyklus 10

Måling af estimeret C_t (startende efter cyklus 10)

6. I slutningen af den 10. cyklus (Extension) .
 - Sæt PCR-maskinen på pause, men sørg for at temperaturen i PCR-rørene har været 72 °C i minimum 8 sek inden der trykkes på pause.
 - Tænd lyset i p51-vieweren.
 - Dæmp det omgivende lys ved fx at placere p51-vieweren i bunden af et skab.
7. Løft PCR-maskinens låg
 - Vær forsigtig! Låg og varmeblok er 94 °C!!

8. Observation ved 72 °C

- Overfør så hurtigt som muligt de fire PCR-rør til p51-vieweren
- Observer og noter observationerne i tabel 1 i afsnittet Resultater. Tag eventuelt et foto af rørene med en mobiltelefon.

9. Sluk for p51-vieweren og returner de fire rør til PCR-maskinen og fortsæt PCR-reaktionen.

10. Lad PCR-protokollen køre indtil den næste planlagte observation (Tabel 2 i Resultater).

11. Fortsæt indtil de planlagte observationer af flouescens er gennemført.

- Noter observationerne i Tabel 2 i resultater.

Bemærk! PCR-reaktionens produkter er stabile

- ved stuetemperatur i flere dage og
- op til en måned ved -18 °C.

NB! Forsøget kan afbrydes her eller der kan udføres gel-elektroforese med PCR-reaktionens produkter – se afsnit F Gelelektroforese

Resultater

Forslag til kvantificering af observeret flouescens:

0: Ingen flouescens

1: Svag flouescens

2: Moderat flouescens

3: Fuld flouescens

Tabel 1 - Indledende observationer

	Rør 1 Negativ kontrol	Rør 2 Reference DNA	Rør 3 Selvvalgt konc	Rør 4 Ukendt konc
Stuetemp.				
94 °C				

Tabel 2 – qPCR observationer (indfør tal mellem 0 og 3)

Efter Cyclus #	qPCR-observationer (efter 72 °C i 10-12 sek.)			
	Rør 1 Negativ kontrol (N)	Rør 2 Reference DNA (R)	Rør 3 Selvvalgt Konc (E)	Rør 4 Ukendt Konc (U)
10				

Tabel 3 - Afsluttende observationer (efter PCR-kørsel)

	Rør 1 Negativ kontrol	Rør 2 Reference DNA	Rør 3 Selvvalgt konc	Rør 4 Ukendt konc
Stuetemp.				

E. Beregning af DNA-koncentrationer

1. Noter i tabel 4 den cyklus hvor der først blev observeret fluorescence (Estimeret C_t).
2. Prøv, vha den udleverede R-prøve som reference, at beregne begyndelseskoncentrationen for både prøve E og prøve U.
3. Noter denne koncentration i kolonnen "Konc. vha fluorescence". Det er formodentlig svært at finde en præcis koncentration, men prøv alligevel.
Bemærk at qPCR-maskiner som benyttes i forskningslaboratorier er i stand til at foretage nøjagtige koncentrationsberegninger, fordi de overvåger reaktionen i hver cyklus og bruger præcise fluorometre til at måle meget små forskelle i fluorescence. Det bør dog, vha øjet og registrering af dine observationer, være muligt at rangordne de fire prøver med hensyn til relativ (faldende) koncentration og beregne en omtrentlig startkoncentration.
4. I søjlen "Konc. vha kendte værdier" noteres koncentrationen i rør E baseret på beregningerne af begyndelseskoncentrationen i afsnittet "Eksperimentel planlægning og fortynding".
5. Efter beregning af koncentrationerne baseret på den estimerede C_t skal den anden gruppes beregnede koncentrationer for prøve U noteres.

Tabel 4

Prøve	Estimeret C_t	Konc. vha fluorescens	Beregning	Konc. vha kendte værdier
Rør 1 (N)				
Rør 2 (R)				
Rør 3 (E)				
Rør 4 (U)				

6. Hvad kan der konkluderes på baggrund af tabel 4?
7. Hvilke(n) forklaring(er) er der mon på eventuelle afvigelser mellem de eksperimentelle og de beregnede resultater? Kan vi være sikker på at der er tale om eksponentiel vækst? Hvilken matematisk model beskriver formodentlig bedre koncentrationsændringerne i PCR-rørene i det udførte forsøg og evt. hvilke af de udførte forsøg (R, E eller U)? Begrund dit svar.

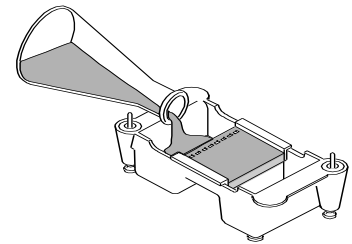
F. Gelelektroforese

Denne del af forsøget kan eventuelt droppes ved tidsnød, men det anbefales at gennemføre elektroforesen for at sammenligne "endepunkts-PCR-reaktionen" med de udførte qPCR-reaktioner.

Forberedelse af agarosegel

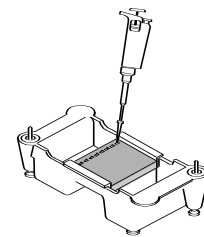
1. Anvend en ren og tør gel-støbeform og placer kam i toppen af gelen (minimum 5 brønde).
2. For hver elevgruppe fremstilles en 2 % agarosegel (0,4 g agarose pr. 20 mL 1X TBE Buffer).
3. Efter opløsning af agarose i TBE Buffer opvarmes blandingen indtil den ikke længere er uklar.
4. Lad agarosegelen afkøle i ca. et minut ved stuetemperatur
5. Tilsæt gelfarve (fx GelGreen eller SYBR Safe) efter produktanvisning (fx 2 μL 10.000X GelGreen pr 20 mL agarose-gel).
6. Hæld agarosegelopløsningen i gelstøbeformen og lad agarosen størkne (ca. 10 minutter) og fjern kammen.

Agarosegel kan støbes op til tre dage før forsøget udføres og kan opbevares ved stuetemperatur hvis den tildækkes lufttæt.

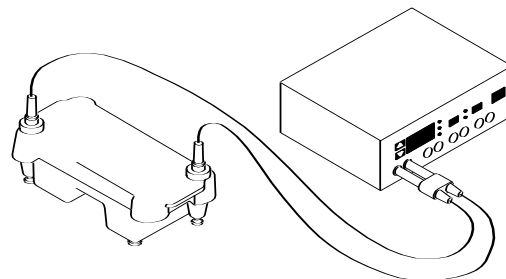


Kørsel af elektroforese

1. Placer gelen i et elektroforesekarret og tilsæt 1X TBE buffer indtil gelen og brøndene er dækket af ca. 5 mm buffer.
2. Tilsæt 6 μL Loading Dye (6X) til hvert PCR-rør
3. Overfør DNA-prøver vha mikropipette således:
 - Brønd 1: 7 μL DNA-standard
 - Brønd 2: 15 μL PCR-produkt fra Rør 1
 - Brønd 3: 15 μL PCR-produkt fra Rør 2
 - Brønd 4: 15 μL PCR-produkt fra Rør 3
 - Brønd 5: 15 μL PCR-produkt fra Rør 4

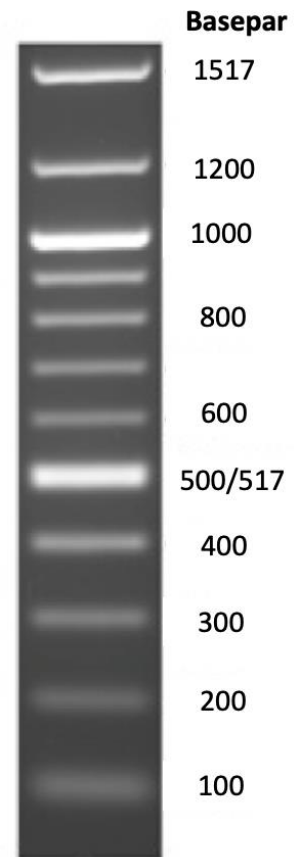


4. Sæt låget på elektroforesekarret og forbind ledningerne med strømforsyningen
5. Tænd for strømmen og tjek at der dannes små bobler ved elektroderne.
6. Lad elektroforesen køre i ca. 30 minutter ved 100V eller indtil farvestoffet har bevæget sig halvvejs gennem gelen.



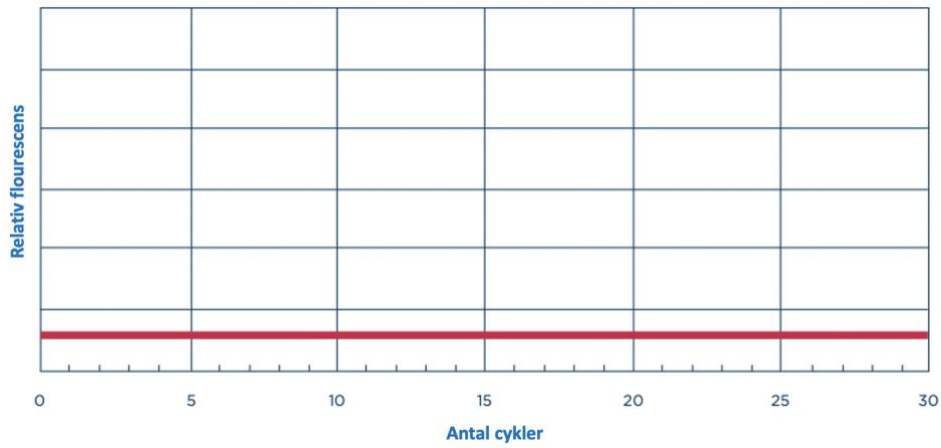
Aflæsning af gel – visualisering

7. Tænd for det blå lys på en illuminator
8. Placer gelen på illuminatoren.
9. Undersøg om DNA-båndene fra DNA-standarden kan skelnes som vist i figuren til højre.
10. Placer evt. gelen i elektroforesekarret og lad elektroforesen køre lidt længere tid for at sprede DNA-båndene lidt mere.
11. Sammenlign båndene fra PCR-produkterne med DNA-standarden.
12. Tag et foto med en mobiltelefon.



Arbejdsspørgsmål

1. Hvordan adskiller qPCR sig fra traditionel PCR?
2. Forklar med dine egne ord hvad der menes med C_t
3. En DNA-prøve, F, har en C_t -værdi der er 3 cykler større end en anden DNA-prøve, Q. Hvor meget større er DNA-koncentrationen i F sammenlignet med Q? Begrund dit svar.
4. Giv eksempler på hvordan det udførte forsøg adskiller sig fra hvordan qPCR udføres i et forskningslaboratorium.
5. Svarede E-prøvens fluorescence til din forventning? Kan du forklare en evt. afvigelse med nogle mulige fejlkilder?
6. Svarede den beregnede DNA-koncentration i den ukendte U-prøve til hvad den gruppe oplyste som forventet koncentration? Kan du forklare en evt. afvigelse med nogle mulige fejlkilder?
7. Skitser på grafen nedenfor resultaterne fra den udførte qPCR. Selvom vi ikke har de eksakte fluorescens-værdier, så prøv alligevel at placere R, E og U på grafen.



8. Indsæt et billede med resultatet fra gelelektroforesen nedenfor og angiv hvilke brønde der blev tilsat hhv R, E og U. Forklar desuden om du ud fra gelen kan afgøre hvilke af prøverne der før PCR indeholdt en stor eller lille DNA-koncentration? Begrund dine svar.
9. Studer grafen nedenfor med qPCR-resultater. Antag at du udførte et qPCR med disse fire DNA-prøver og at du efter 25 cykler afbrød forsøget og udførte gelelektroforese. Skitser hvordan du forventer at gelen vil se ud og begrund din skitse.

