Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

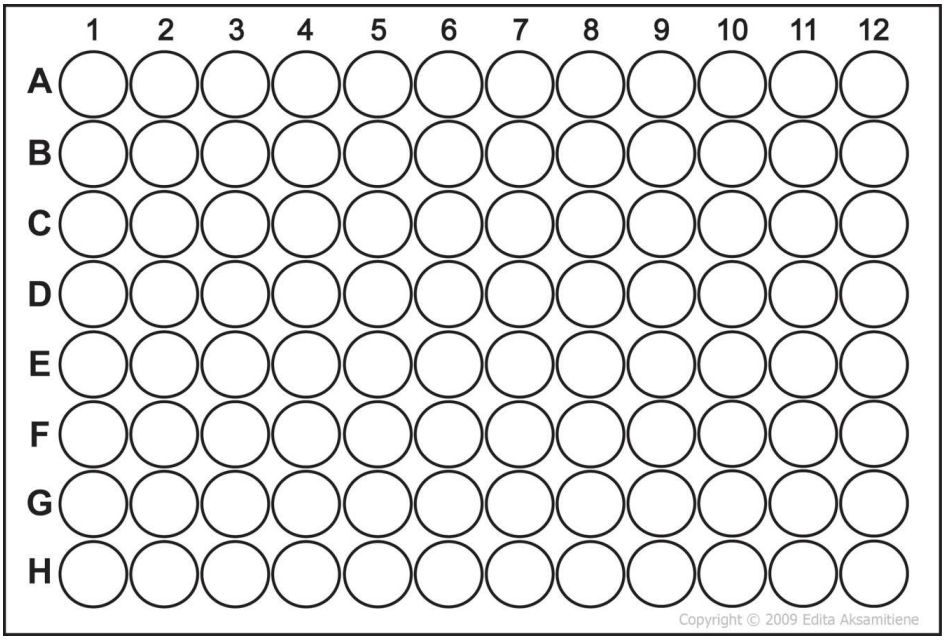
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

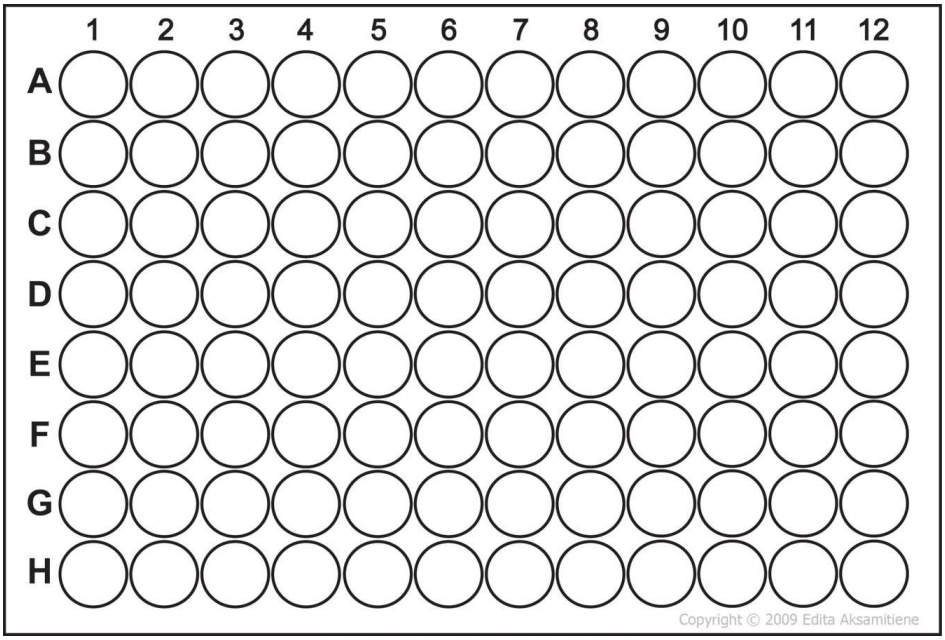
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

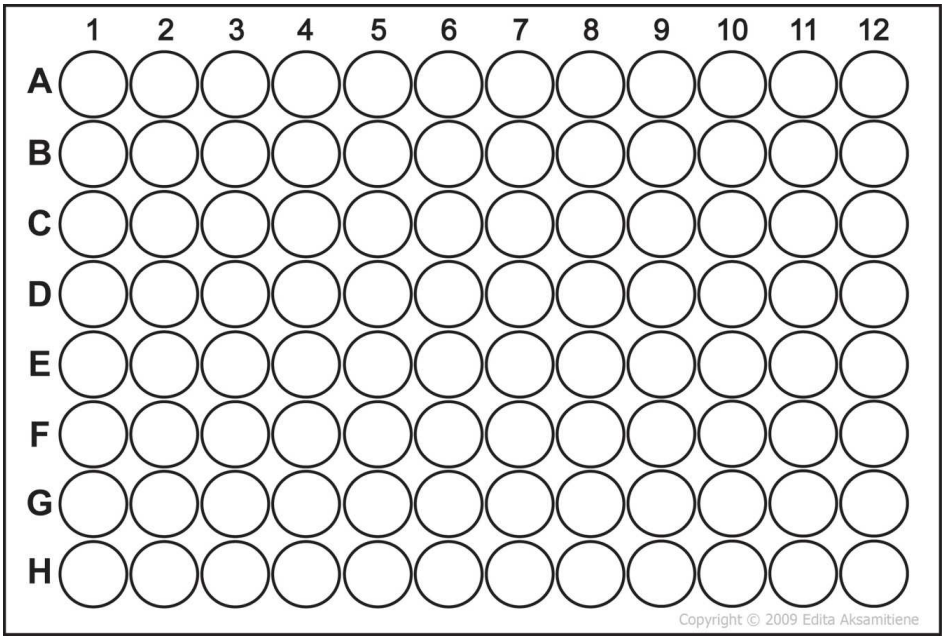
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

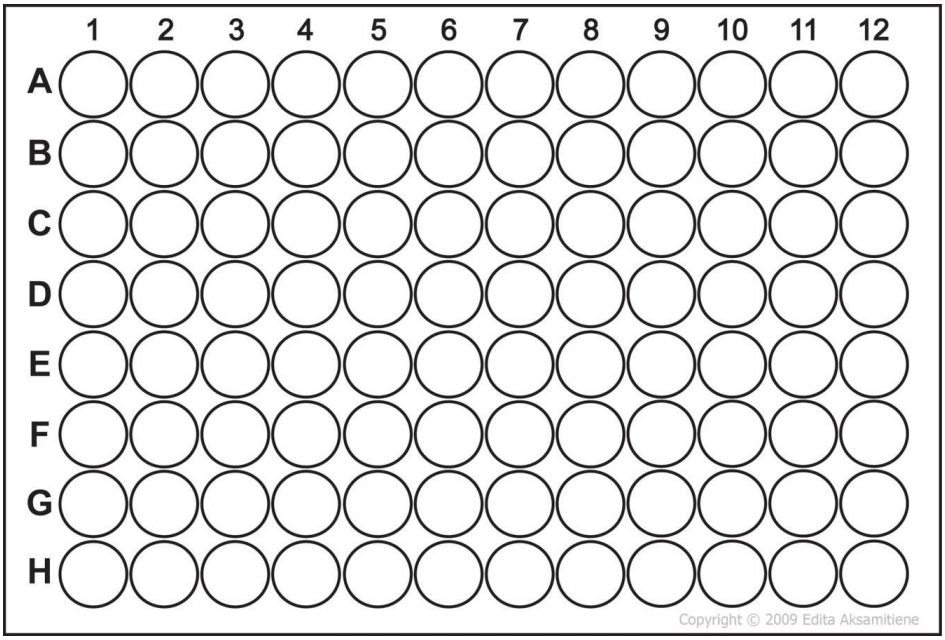
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

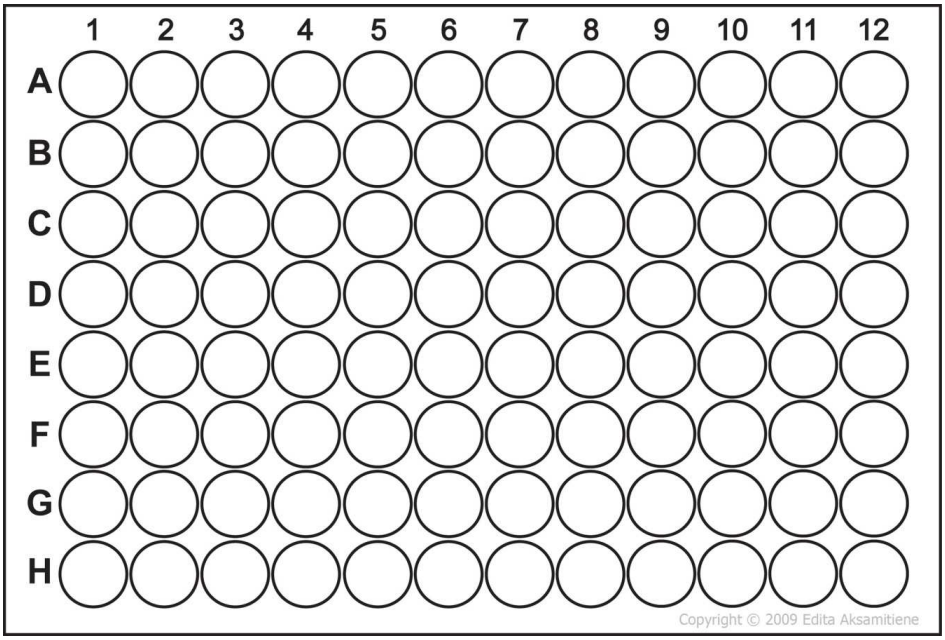
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

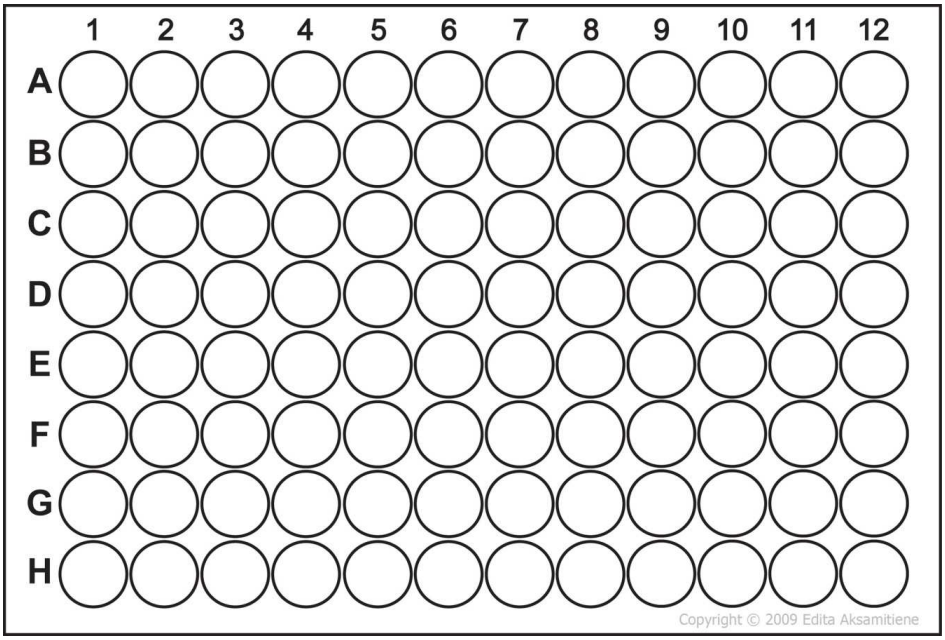
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

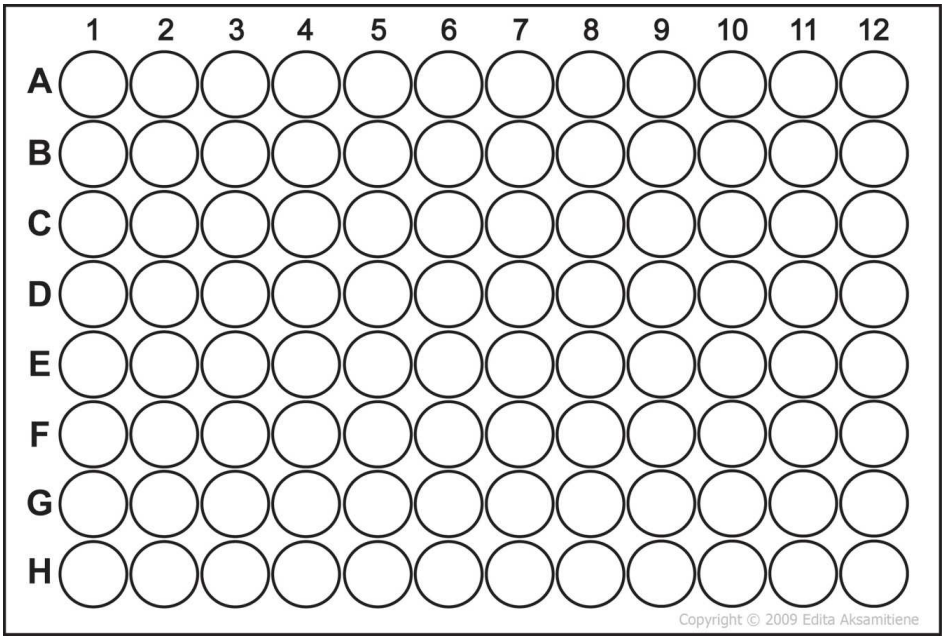
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity

Metody molekularnej analizy natywnych i genetycznie modyfikowanych komórek macierzystych

Wstęp

Różne populacje komórek macierzystych (KM) poza innym profilem wieloantygenowym posiadają różną ekspresję określonych genów. Charakterystyka genetyczna profilu markerów molekularnych ekspresjonowanych przez dany typ KM dostarcza ważnych informacji na temat m. in. ich potencjału do różnicowania. Wybrane markery mezenchymalnych KM (MSC), hematopoetycznych KM (HSC) oraz niehematopoetycznych KM na przykładzie komórek VSEL zawarto w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	Przykładowe markery
MSC	Mesp-1, Mesp-2, Brachyury
VSEL	Oct-4, Nanog, SSEA-1/4, Rex-1, Rif-1
HSC	Scl-2, Hox-B4

Narzędziem służącym do określenia profilu ekspresji wybranych markerów molekularnych jest Real-Time RT-PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Krokiem poprzedzającym analizę Real-Time RT-PCR jest izolacja RNA z komórek, a następnie jego przepisanie na cDNA podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Real-Time RT-PCR umożliwia analizę profilu ekspresji określonych mRNA, dla których zaprojektowano odpowiednie startery (primery) komplementarne do ich odcinków cDNA. Metoda ta dzięki możliwości jakościowej oraz ilościowej analizy ekspresji genów znajduje szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych, a także w diagnostyce, m. in. w wykrywaniu chorób przenoszonych przez kleszcze, wirusowego zapalenia wątroby, diagnostyki HIV.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest analiza i ocena ekspresji endogennych genów związanych ze stopniem zróżnicowania tkankowego komórek macierzystych metodą Real-Time RT-PCR.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentów rozpoczętych na wcześniejszych zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. Izolacja RNA z komórek MSC, szpiku kostnego, a także subpopulacji CD45+ i CD45- (Protokół izolacji RNA z hodowli komórkowych; GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, Eur$_x$)

Uwaga 1: Zestaw jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA (powyżej 200 nt) z hodowli komórkowych.
Uwaga 2: Maksymalna pojemność minikolumny 100 µg RNA.
Uwaga 3: Nie należy używać więcej niż $1x10^7$ komórek.
Uwaga 4: Przed użyciem buforu RL do 1 ml dodać 10 µl β-merkaptoetanolu (β-ME). Po dodaniu β-ME bufor RL jest stabilny przez 1 miesiąc.
Uwaga 5: Przeładowanie minikolumny zmniejsza wydajność i obniża jakość wyizolowanego RNA. Może również spowodowaćzapchaniesięminikolumny.
Uwaga 6: Należy uważać aby w trakcie wykonywania czynności związanych z protokołem nie wprowadzić śladów RNaz.
Uwaga 7: Poniższa procedura efektywnie eliminuje całość DNA lub w przypadku zbyt dużej ilości materiału użytego do izolacji i przeładowania minikolumny homogenizacyjnej większość DNA. W związku z tym w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, proponujemy oczyszczanie zgodnie z **Dodatkiem** wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).
Uwaga 8: Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania RNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania.
Uwaga 9: Dla otrzymania RNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu. Czynności należy wykonać możliwie szybko. Wszystkie kroki należy przeprowadzić w temperaturze pokojowej.

1. W probówce 2 ml typu Eppendorf zwirować hodowlę komórek przez 5 min z prędkością 1000 x g. Ostrożnie wybrać supernatant znad osadu *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

2. Dodać 400 µl buforu **RL** do osadu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie *(Wykonano podczas ćwiczenia nr 1 i 2).*

3. **Przenieść lizat do minikolumny homogenizacyjnej umieszczonej w 2 ml probówce odbierającej. Wirować przez 2 min z maksymalną prędkością.**

Uwaga 1: Wirowanie przez minikolumnę homogenizacyjną filtruje i homogenizuje lizat oraz eliminuje DNA.

4. Dodać 350 µl **70 % alkoholu etylowego** do przesączu (flow-through). Wymieszać dokładnie przez pipetowanie. Nie wirować.

Uwaga 1: Po dodaniu etanolu może strącić się osad.

5. Przenieść mieszaninę (razem z osadem jeżeli powstał) do minikolumny wiążącej umieszczonej w probówce odbierającej. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g. Wylać przesącz.

6. Dodać 400 µl buforu płuczącego **Wash DN1** do minikolumny. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Krok ten efektywnie eliminuje ślady DNA. Jednakże w przypadku niektórych zastosowań RNA szczególnie wrażliwych na minimalne ilości DNA, dalsze kroki proponujemy wykonać zgodnie z **Dodatkiem 2** (str. 16) wykorzystującym trawienie preparatu DNazą I (w trakcie izolacji na minikolumnie).

7. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

8. Dodać 650 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
   Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

9. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i powtórnie umieścić minikolumnę w probówce.

10. Dodać 350 µl buforu płuczącego **Wash RBW** do minikolumny.
    Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

Uwaga 1: Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli membrana nie jest całkowicie sucha, wylać przesącz, umieścić minikolumnę w probówce i ponownie wirować przez 1 min.

11. Minikolumnę umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 40-60 µl wody RNase-free centralnie na membranę.

12. Wirować przez 1 min z prędkością 11000 x g.

13. Usunąć minikolumnę, zamknąć probówkę. RNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2÷8°C lub zamrożone w -20°C (należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania RNA).

14. Zmierzyć stężenie RNA przy pomocy nanofotometru IMPLEN (Lid factor 50) oraz zanotować wartości absorbancji $A_{260/280}$ oraz $A_{260/230}$.

Nazwa próbki	**Stężenie (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**

II. ODWROTNA TRANSKRYPCJA (Protokół NG dART RT-PCR kit)

1. Przygotować mieszaninę do odwrotnej transkrypcji w probówce typu Eppendorf (1,5ml).

2. Do każdej próbówki 0.2 ml dodać po 6 µl mixu* oraz odpowiednie objętości wody oraz RNA zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli poniżej.

Odczynnik	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na … próbek (µl)**
5X NG cDNA Buffer*	4,0 µl	
50 µM Oligo$(dT)_{20}$*	0,5 µl	
200 ng/µl random hexamer primer*	0,5 µl	
RNA (300 ng)	x µl	
NG dART RT mix*	1 µl	
Uzupełnić RNase-free Water do objętości 20 µl		

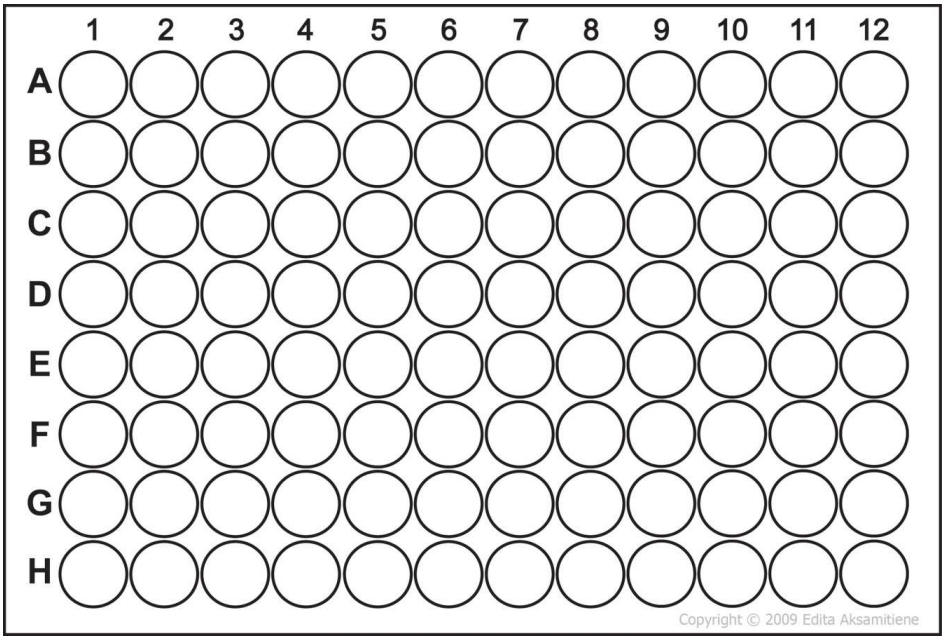
*Odczynniki wchodzące w skład 6 µl mixu

3. mRNA przepisywać na cDNA przy użyciu termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler. Warunki reakcji:

    1. 25°C 10 min.
    2. 50°C 40 min.
    3. 85°C 5 min.

III. REAL TIME RT-PCR (Protokół SG qPCR Master Mix (2X), Eur_x)

Próbki nakładane będą na 8-stanowiskowe paski do Real-Time PCR. 12 pasków utworzy obraz płytki zamieszczonej poniżej. Każdy zespół nakładał będzie próbki w takiej samej kolejności.



Schemat nakładania na stripy:

A1, A2- MSC B2-mikroglobulina
B1, B2- MSC Mesp1
C1, C2- SzK B2-mikroglobulina
D1, D2- SzK Scl-2
E1, E2- SzK Hox-B4
F1, F2- CD45+ B2-mikroglobulina
G1, G2- CD45+ Scl2
H1, H2- CD45+ Hox-B4

1. Dla każdego analizowanego genu przygotować osobne mieszaniny reakcyjnie zgodnie ze schematem zamieszczonym w tabeli. Każdą próbkę cDNA dla każdego analizowanego genu nakładać w duplikacie.

Odczynnik mixu	**Objętość na jedną próbkę (µl)**	**Objętość na ... próbek (µl)**
SG qPCR Master Mix (2X)	12,5 µl	
Forward Primer (5µM)	1,5 µl	
Reverse Primer (5µM)	1,5 µl	
ROX (1X)	0,5 µl	
Water, nuclease free	7,0 µl	

2. Do każdego dołka nakładać po 23 µl mixu oraz po 2 µl odpowiedniego cDNA.
3. Zamknąć stripy.
4. Zwirować płytkę utworzoną ze stripów (2000 rpm, 2 min.).

5. Warunki reakcji: 50°C 2 min.
   95°C 10 min.
   94°C 15 sek. -> 60 °C 30 sek. -> 72 °C 30 sek. **(40 cykli)**

6. Analizować na pomocą 7500 Fast Real-Time PCR System.

Zalecana literatura:

1. Applied Biosystems: Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen- Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DD*C*T Method

2. Thermo Scientific- Assessment of Nucleic Acid Purity