Lab rapport RNA analyse

Introduksjon

cDNA → qPCR  
• Dilution series 1/10 – 1/100 – 1/1000  
• Testa primerpar og pipetteringsferdigheiter  
• Mengde / lineærkurve for c-Myc (akutt respons-gen, ribosomal  
biogenese)  
• Delta-Delta-Ct metoden (Livak & Schmittgen, 2001)  
• Hent ut Ct-verdiane

cDNA → qPCR  
• Dilution series 1/10 – 1/100 – 1/1000  
• Testa primerpar og pipetteringsferdigheiter  
• Mengde / lineærkurve for c-Myc (akutt respons-gen, ribosomal  
biogenese)  
• Delta-Delta-Ct metoden (Livak & Schmittgen, 2001)  
• Hent ut Ct-verdiane

RT-qPCR is a method that allows molecular exercise physiologists to quantify RNA by first reverse transcribing RNA into cDNA. The cDNA is then amplified in a thermal cycler. A fluorescent dye is used that allows measurement of the concentration of the DNA product during each cycle with a fluorometer that is part of the thermal cyclers used for RT-qPCR. Western blotting involves the separation of denatured proteins within a gel followed by detection that involves antibodies raised against the protein of interest. Omic approaches allow the non-biased measurement of DNA, RNA and proteins, which allows the development of new hypotheses and gives an idea about the big picture (Wackerhage, 2014)

Metode

Resultat

Diskusjon

Konklusjon

Referanser

Målet:

RNA analyse

Tester i 1 plate

Del 1: Sammenligne prøver

Del 2: Fortynningsserie (kontroll prøve)

Materials

* A real-time PCR machine (We use QuantStudio 5)
* A qPCR reaction plate
* Nuclease-free water and pipette tips
* SYBR-green Master mix

Metode:

1. Combine a master-mix:

|  |  |
| --- | --- |
| **Component** | **Volume per reaction** |
| Sybr-green 2X master-mix | 5 μl[1](https://trainome.github.io/pr_cdnasynthesis_ver_2019-11-12.html#fn1) |
| Primermix, Forward and Reverese 5 μM[2](https://trainome.github.io/pr_cdnasynthesis_ver_2019-11-12.html#fn2) each | 1 μl |
| H2O | 2 μl |

1. Load the plate with primer-specific master-mix
2. Add 2 μl cDNA sample.
3. The final volume of the reaction may be optimized, 10 ul is a good starting point[↩︎](https://trainome.github.io/pr_cdnasynthesis_ver_2019-11-12.html#fnref1)
4. Primer concentrations might need further optimization[↩︎](https://trainome.github.io/pr_cdnasynthesis_ver_2019-11-12.html#fnref2)

Fylling av brønner:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | W0  + MHC1 | W2 + MHC1 |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| B | W0  + MHC1 | W2 + MHC1 |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| C | W0 + MHC1 | W2 + MHC1 |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| D | W0 + MHC2a | W2 + MHC2a |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E | W0 + MHC2a | W2 + MHC2a |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F | W0 + MHC2a | W2 + MHC2a |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G | W0 + MHC2x | W2 + MHC2x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H | W0 + MHC2x | W2 + MHC2x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| I | W0 + MHC2x | W2 + MHC2x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| J | W0 + MHCb2m | W2 + MHCb2m |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| K | W0 + MHCb2m | W2 + MHCb2m |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| L | W0 + MHCb2m | W2 + MHCb2m |  | 1/1 | 1/10 | 1/100 | 1/1000 | 1/10000 | 1/100000 |  |  |  |
| M |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| N |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Pool sample 1: Gul. W0 (2ul)+ mcmyc (8ul)

Pool sample 2: Blå W2 (2ul) + mcmyc (8ul)

Avvik: Brønn L4-L9 mangler mastermix mcmyc, dobbelt opp med mcmyc på noen kammer?

Load experiment fra usb minnepenn. Protokollen går av seg selv da denne er lagt inn.

Dekke brønn med plast og sentrifugere, deretter sette inn brønn (med plast) i pcr maskin (quant studio 5)

PCR maskinen viser CT verdi pr brønn

Resultat:

Ekstraksjon og analyse av RNA

Labkurs

cDNA 🡪 qPCR

qPCR har en standard linje, dersom denne ikke er det har det relasjon til:

* Pipetering
* Primer

Labrapport

Lab 03.10.23

cDNA analysen er allerede gjort, så det vi gjør er å utføre en qPCR test.

Pre og post prøver etter styrke

Personene har trent 2 ulike styrkeintervensjoner

2 deler av forsøket i dag:

Sammenligne prøver

Fortynnings (dilution) serie (for å teste primere):

fra 1 (1)🡪1/10 (2) 🡪 🡪🡪1/100.000

1: 100ul

2 (1/10): 10ul + 90ul H2O

3: (1/100): 10ul + 90ul H2O

Fortynner 10 ganger for hvert nye rør for å få forskjellige CT verdier og for å få et lineært forhold i

Referanser:

Wackerhage, H. (2014). *Molecular exercise physiology: An introduction*. Routledge.

* Wackerhage (2014) kap 3, Alternativ: Sharples/Morton/Wackerhage (2022) kap. 2-3

cDNA → qPCR  
• Dilution series 1/10 – 1/100 – 1/1000  
• Testa primerpar og pipetteringsferdigheiter  
• Mengde / lineærkurve for c-Myc (akutt respons-gen, ribosomal  
biogenese)  
• Delta-Delta-Ct metoden (Livak & Schmittgen, 2001)  
• Hent ut Ct-verdiane

cDNA → qPCR  
• Dilution series 1/10 – 1/100 – 1/1000  
• Testa primerpar og pipetteringsferdigheiter  
• Mengde / lineærkurve for c-Myc (akutt respons-gen, ribosomal  
biogenese)  
• Delta-Delta-Ct metoden (Livak & Schmittgen, 2001)  
• Hent ut Ct-verdiane  
• Samanlikna to ulike prøvar (pre-post treningsintervensjon)  
• Endring i MHC uttrykk (ref. Ellefsen et al., 2014→

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | W0 | W2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B | W0 | W2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C | W0 | W2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D | W0 | W2 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| F | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| G | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| H | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| I | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| J | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| K | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| L | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| M | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| N | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| O | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| P | W0 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Tester i 1 plate

Del 1: Sammenligne prøver: Sammenligne

Del 2: Fortynningsserie: Med primer

Tillegg:

Har gjort 13 x master mix først

Lager 25 x master mix på nytt på prøve CMYC

125ul sybr mix

25 ul Primer mix

50ul H2O

Utfylling i brønner:

Viser til excel skjema