

Rami Basal

Optimalisering av metoden for genekspresjonsanalyse av HSP70 etter stressaksjon på A549-celler

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Ann-Kristin Tveten

Mai 2023

Rami Basal

Optimalisering av metoden for genekspresjonsanalyse av HSP70 etter stressaksjon på A549-celler

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Ann-Kristin Tveten
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for biologiske fag Ålesund

Optimalisering av metoden for genekspresjonsanalyse av HSP70 etter stressaksjon på A549-celler

Forord

Som en bioteknologi student ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet i Ålesund (NTNU), kan jeg si at jeg har alltid vært veldig interessert i vitenskapelig forskning og opptatt av teknologiske anvendelser innen medisinske felt spesielt. Studietiden ved NTNU har gitt meg muligheten til å bygge et godt grunnlag innenfor det vitenskapelige forskningsfeltet som jeg elsker.

Til tross for all utviklingen som vi kan ha nådd i dag innen medisinsk sektor, krever det fortsatt at vi jobber kontinuerlig for å forbedre behandlingsmetoder, søke etter alternative behandlinger. Og til og med optimalisere teknikker som brukes i laboratoriearbeid slik at vi kan forberede oss godt nok til å kjempe mot nye sykdommer og til og med sykdommer som relativt er fortsatt uhelbredelige, som kreft.

Som det skjedde med mange andre, tok kreft fra meg noen av mine kjære som står mitt hjerte nærmest. Derfor var mitt valg av denne bacheloroppgaven, til ære for deres minne på den ene siden, og et uforminsket ønske om at det skal være en akseptabel begynnelse å fortsette det jeg liker, slik at kanskje en dag kan jeg tilføre litt verdi på dette feltet.

En av utfordringene jeg møtte og i tillegg at jeg studerer i et fremmedspråk som ikke er mitt morsmål, var at jeg av en eller annen grunn måtte jobbe alene og uten noen kollegaer. Dette ga meg derimot mer erfaring og evne til å tenke og jobbe selvstendig. Derfor er jeg veldig takknemlig overfor Ann-Kristin Tveten for å ha gitt meg som en enkeltstudent muligheten og selvtiliten til å jobbe med dette prosjektet som inkluderer en god praktisk del og laboratoriearbeid. Og for hennes veiledning, tålmodighet og støtte underveis.

Takk til alle som lærte meg noe, til familien min, og mine venner.

Til hvert håp som er igjen i oss..

...Hver innsats vil bære frukt, og enhver suksess, selv om den kan komme sent, er vakker.

Sammendrag

I denne studien har vært lungekreftceller A549 brukt som ble dyrket tidligere ved både normal temperatur (37°C) og høye temperatur (42°C) og for å kunne se på optimalisering av genekspresjonsanalyse av stresshormoner HSP70.

Forsøket startet med å isolere RNA fra både normale og stressede cellene hvor det er RNA som er hovedkomponent av celle som vises uttrykket av HSP70. Etter RNA-isolering ble konsentrasjonene av RNA målt ved hjelp av Qubit 4.0 fluorometer og samme instrumentet ble brukt igjen for å måle konsentrasjonene av cDNA som ble tillaget ved hjelp av PCR. Siste trinn var amplifisering av målgen (qPCR på cDNA) slik at vi får fornøftige resultater og verdier for å brukes i en kjent formel ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) for å beregne den relative foldgenekspresjonen til prøvene etter utføring av Real-time polymerase chain reaction (qPCR). Og det siste nevnte trinnet i prosedyren var det som i hovedsakelig optimaliseres.

Resultatene av dette forsøket viste at analysemetoden som ble jobbet med for å forbedres kunne til slutt måle at cellene som har dyrket ved 42 grader har fått stress response. Best resultat kom etter at 7,5µl SYBR Green, 1µl Forward primer, 1µl Revers primer, 2µl cDNA templat, og 8,5µl Nukleasefritt vann, ble benyttet for å klargjøre qPCR-reaksjonene for amplifisering av målgen med å ta 0,8 ng/µl som cDNA-standard konsentrasjon og inkuberer disse reaksjonene i qPCR-maskinen etter et bestemt skjema.

Abstract

In this study, lung cancer cells A549 were used, which were grown previously at both normal temperature (37°C) and high temperature (42°C) and to be able to look at optimization of gene expression analysis of stress hormones HSP70.

The experiment started by isolating RNA from both normal and stressed cells where it is RNA that is the main component of the cell that shows the expression of HSP70. After RNA isolation, the concentrations of RNA were measured using the Qubit 4.0 fluorometer and the same instrument was used again to measure the concentrations of cDNA prepared by PCR. The last step was amplification of the target gene (qPCR on cDNA) so that we get reasonable results and values to be used in a known formula ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) to calculate the relative fold gene expression of the samples after performing Real-time polymerase chain reaction (qPCR). And the last mentioned step in the procedure was the one that is mainly optimized.

The results of this experiment showed that the analysis method that was worked on to improve could ultimately measure that the cells that have grown at 42 degrees have received a stress response. The best result came after 7.5 µl SYBR Green, 1 µl Forward primer, 1 µl Reverse primer, 2 µl cDNA template, and 8.5 µl Nuclease-free water were used to prepare the qPCR reactions for amplification of the target gene by taking 0.8 ng/ µl as cDNA standard concentration and incubate these reactions in the qPCR machine according to a specific scheme.

Forord	1
Sammendrag	2
Abstract	3
Forkortelser	5
1.0 Introduksjon	6
1.1 Apoptose	6
1.2 Heat shock response	7
1.3 HSPs sin rolle i kreftcelle	9
1.4 Cellekultivering	9
1.5 Pneumocytter, Lungekreft og A549-cellelinjer:	10
1.6 Genekspresjonsanalyse	11
1.6.1 RNA Isolering	12
1.6.2 cDNA Syntese	12
1.6.3 PCR og qPCR	13
1.6.4 Ct, $\Delta\Delta$ Ct og tolkning av resultat	14
2.0 Materialer og metoder	15
2.1 mRNA-Isolering	16
2.2 Bestemmelse av RNA-konsentrasjonen	17
2.3 Tillaging av cDNA	18
2.4 Amplifisering av målgen (qPCR på cDNA)	19
3.0 Resultat	23
3.1 Isolerte RNA konsentrasjoner	23
3.2 cDNA-konsentrasjoner	23
3.3 Målgen amplifiserings resultat (qPCR resultat)	25
4.0 Diskusjon	28
5.0 Konklusjoner	32
Referanser	33
A.0 Appendikser	38
A.1 RNA-Isolering	38
A.2 Bestemmelse av RNA/DNA-konsentrasjon	44
A.3 Tillaging av cDNA	46
A.4 Amplifisering av målgen (qPCR på cDNA)	48

Forkortelser

A549	En spesifikk lung epitelkarsinom celletype fra en 58 år gammel mann
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
HSPs	Heat shock proteins
HSF	Heat shock factors
HSP70	Heat shock proteins med molekylvekter på 70 kDa
kDa	Kilodalton (En atommasseenhet)
EF1	Spesifikk forward primer (Proteinsyntese forlengelsesfaktor)
cDNA	Komplementært DNA
ssDNA	Single stranded DNA
dsDNA	Double stranded DNA
PCR	Polymerase chain reaction
RT PCR	Reverse transcription PCR
qPCR	Quantitative PCR
Ct	Cycle threshold
Tm	Primer-Smeltepunkt Temperatur
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution (calcium, magnesium, no phenol red)
RLT	En lyseringsbuffer for lysering av celler og vev før RNA-isolering
RW1	Buffer for vasking av membranbundet RNA
Buffer RPE	En 55 ml konsentrert buffer for vasking av membranbundet RNA
TAE-buffer	En bufferløsning som inneholder en blanding av Tris-base, acetate og EDTA
GelDoc	Geldokumentasjonssystem eller gelbildesystem.
N1/Nc1/nc1	Normale celler nr.1
N2/Nc2/nc2	Normale celler nr.2
S1/Sc1/sc1	Stressede celler nr.1
S2/Sc2/sc2	Stressede celler nr.2

1.0 Introduksjon

Cellenes heat shock respons ble opprinnelig referert til som en metabolsk reaksjon på temperaturer som var høyere enn det typiske området (37°C). Imidlertid har det blitt funnet at oksidativt stress og tungmetaller også kan stimulere denne responsen. Proteinskade, som resulterer i utfoldet proteinaggregering, er en viktig biologisk konsekvens av disse stressfaktorene. For å bekjempe dette øker cellene uttrykket av chaperoneproteiner, også referert til som heat shock proteiner, som hjelper til med refolding av feilfoldede proteiner og reduserer akkumuleringen av proteinaggregering. Forbigående beskyttelse er gitt, noe som fører til termotoleranse og cellene blir mer motstandsdyktige mot giftig og stress (1, 2, 3).

Problemstillingen i denne oppgaven tar et utgangspunkt av at metodene som vanligvis beskrives i prosedyrene for genekspressjonsanalyse generelt er fremdeles under optimaliseringen. Med dette prosjektet ble A549-cellelinjer utsatt for heat shock (42°C) som en stressfaktor slik at vi kan gå videre med å utføre og optimalisere en bestemt metode for genekspressjonsanalyse av HSP70-stressrespons.

1.1 Apoptose

Hos flercellede organismer er apoptose, også kjent som programmert celledød, et normalt utviklingsstadium der en celle starter prosesser som fører til cellens egen død (4, 5).

Mange menneskelige problemer, inkludert nevrologiske sykdommer, iskemiskader, autoimmune lidelser og ulike kreftformer, påvirkes av upassende apoptose, enten for lite eller for mye (5, 6).

I celler hjelper stressresponser med å overleve og drepe skadede eller uønskede celler, som er et viktig aspekt ved fysiologi. Det finnes flere typer stressresponser, inkludert heat shock, utfoldet protein, DNA-skader og oksidativt stress. Naturen og varigheten av stresset, så vel som celletypen, påvirker alle på typen og graden av cellerespons. Videre dikterer samspillet mellom disse reaksjonene ofte den stressede cellens skjebne. Mekanismen som en celle dør gjennom, påvirkes av en rekke ytre variabler samt cellens evne til å takle stress (1, 7).

Som et sett med synkroniserte og koordinerte hendelser kan "celledelingssyklusen" brukes til å beskrive prosessen med å duplisere DNA og dele celler. Minst to forskjellige typer kontrollmekanismer for celledelingssyklusen er identifisert: en kjedereaksjon av proteinfosforlyringer som flytter en celle fra en fase av syklusen til den neste, og en serie sjekkpunkter som sikrer at

alle nødvendige prosesser er utført. og, om nødvendig, pause cellens progresjon til neste fase (8, 9).

Noen onkogene mutasjoner hemmer celledøds mekanismer, og fremmer derfor genetisk ustabilitet og resulterer i akkumulering av genmutasjoner som bidrar til oppkomst og spredning av svulster (10). Kreft er en sykdom med feil cellevekst, som kontrolleres av cellesyklusen. Alle maligniteter tillater for mange celler og for lite celledød, noe som kan forårsake svulster (11, 12). Kreftcellenes evne til å reagere på cytotoksiske behandlinger som kjemoterapi, stråling eller immunterapi er i stor grad avhengig av deres evne til å gjennomgå celledød som respons på cytotoksiske stimuli, og derfor kan abnormiteter i celledødsprosesser gi motstand mot disse behandlingene (13, 14).

Genespresjonsanalysen og en forståelse av mekanismer på molekylært nivå kan gjøre oss i stand til å gripe inn i unormale cellulære stressreaksjoner som er assosiert med mange vanlige menneskelige lidelser. For eksempel, avhengig av det tiltenkte resultatet, kan slike responser byttes fra celledød til overlevelsesprogrammer eller omvendt. Noe som kan føre til oppdagelsen av nye behandlingsmetoder (1).

1.2 Heat shock response

Mye nyere forskning har undersøkt heat shock responsen over hele genomet. Fra archaea til menneskelige cellelinjer fant forskere at mellom 50 og 200 gener er betydelig slått på i forskjellige modellorganismer.

Stress proteiner kan kategoriseres i syv grupper basert på deres funksjoner:

- Når det gjelder hvor mye de uttrykkes, er Hsps, som nå oftere kalles molekylære chaperones, den vanligste klassen på tvers av alle arter.
- Komponenter av det proteolytiske systemet utgjør den andre gruppen som kreves for å kvitte seg med proteiner som har foldet seg feil og festet seg sammen på en måte som ikke kan fikses.
- Den tredje gruppen består av enzymer som endrer RNA og DNA. Disse enzymene er nødvendige for å fikse DNA-skader og prosessering problemer som oppstår når en celle er stresset.
- Metabolske enzymer utgjør den fjerde Hsp-gruppen. Hvor omorganisering og stabilisering av cellens energiforsyning kan nødvendiggjøre endringer i metabolske veier.

- Den femte gruppen inneholder transkripsjonsfaktorer og kinaser som er regulatoriske proteiner
- Den sjette gruppen av proteiner inkluderer de som bidrar til å opprettholde cellestrukturen.
- Gruppe 7 omfatter proteiner som er essensielle for å opprettholde membranstabilitet og inkluderer transportproteiner, avgiftende proteiner og membranmodulerende proteiner.(3)

I starten av heat shock responsen opphører generell proteintranskripsjon og translasjon, antagelig for å redusere belastningen av feilfoldede proteiner. Imidlertid aktiveres heat shock faktorer, som øker uttrykket av et utvalg av beskyttende gener, selektivt under disse forholdene (HSF). Virveldyrceller inkluderer tre distinkte HSF-er: HSF1 er nødvendig for heat shock responsen og utviklingsprosesser, HSF2 og HSF4 er kritiske for differensiering og utvikling, og HSF3 er eksklusivt for fugleceller (15, 16, 17).

I målgener binder heat shock faktorer (HSF) seg til oppstrømssekvenser (heat shock elementer) som kan aktivere eller indusere ekspresjonen av heat shock proteiner (HSP). Denne prosessen aktiveres av ulike stressfaktorer og gjør at HSPs påvirker cellulære prosesser som bestemmer skjebnen til cellen (1).

Hsps er en familie av evolusjonært konserverte proteiner med molekylvekter på 110, 90, 70, 60, 40 og 15–30 kDa. I likhet med Hsp90 fungerer disse proteinene som molekylære chaperoner inne i cellene, og hemmer for tidlig folding av begynnende polypeptider. Andre, som Hsp27 og Hsp70, er induserbare Hsp-er som overuttrykkes som respons på miljømessige og fysiologiske påkjenninger (18, 19, 20).

Hsp70 er en av de HSP proteiner som kan finnes i nesten hver celle som undersøkes i både prokaryote og eukaryote.(20). I fravær av gunstige forhold (som for eksempel dyrkning av celler på 42°C istedenfor 37°C), fester Hsp70 seg til proteinsubstratene og holder dem stabile mot denaturering eller aggregering til situasjonen blir bedre. I tillegg til det den gjør under en stressreaksjon, har Hsp70 mange jobber å gjøre under normal vekst. Det hjelper til med proteinfolding, flytte proteiner og vesikler rundt inne i celler, danne og bryte opp komplekser og bryte ned proteiner som ikke lenger er nødvendige. Så denne chaperonen har en stor effekt på proteinhomeostase ved å kontrollere kvalitetskontrollen og omsetningen av proteiner både når kroppen ikke er under stress og når den er under stress. Genetiske og biokjemiske studier har

knyttet det til en rekke sykdommer, inkludert kreft, som er i samsvar med dets brede spekter av handlinger og funksjoner (21).

1.3 HSPs sin rolle i kreftcelle

Hsps uttrykkes i større mengder i mange solide svulster og hematologiske maligniteter. Spesielt HSP90, HSP70 og HSP27 (22, 23, 24).

Det mangefasetterte utseendet til HSP70 kan forklares med det faktum at det kan endre konformasjoner gjennom hele funksjonssyklusen, slik at det kan fungere på en rekke måter som ennå ikke er fullt kjent når det gjelder kreft. For å bygge en effektiv HSP70-basert anti-kreftterapi, er det nødvendig med ytterligere undersøkelser av HSP70-funksjoner i kreftkjennetegn (24).

For ondartede celler gir evnen til å undertrykke celledød, aldersrelatert nedgang, immunresponser og fremme angiogenese og metastaser HSP70 overtaket. Av denne grunn er kreft-"avhengighet" til HSP70 fornuftig, siden HSP70-uttrykk er nært knyttet til både tumoroverlevelse og tumorvekst. Antikreftforskning ser derfor aktivt på strategier som for eksempel HSPs kjemiske hemmere (22, 24).

Mutasjoner kan være forårsaket av feil i DNA-reparasjon, samt arvelige eller ervervede feil i genomets vedlikeholdsmekanismer. Mangler i DNA-skaderespons bidrar betydelig til karsinogenese og forårsaker kreftprogresjon og dens motstandsdyktighet mot behandling (25, 1).

1.4 Cellekultivering

Cellekultur involverer dyrking av eukaryote eller prokaryote celler i laboratoriet. I en klinisk kontekst brukes cellekultur til å lage modellsystemer som studerer grunnleggende cellebiologi, dupliserte sykdomsmekanismer eller tester legemiddeltoksisitet. Cellekulturapplikasjoner tillater gen- og molekylveismanipulasjon. Bruken av cellelinjer i vitenskapelig forskning er fordelaktig på grunn av deres homogenitet og muligheten for redundans av de medfølgende dataene (26). Mange forskningsentre, bioteknologiske selskaper og sykehuslaboratorier dyrker kreftceller. Og evnen til å dyrke kreftceller i laboratoriet har vist seg uvurderlig i søken etter å bedre forstå kreftbiologien og måten ulike medisiner påvirker kreftceller på (27).

1.5 Pneumocytter, Lungekreft og A549-cellelinjer:

To forskjellige typer lungeceller (pneumocytter) kan skilles fra hverandre:

Pneumocytter av type I er cellene som utgjør det indre plateepitel i lungealveolene, som er den delen av lungene som er ansvarlig for gassutveksling.

Pneumocytter type II er mer uvanlig enn andre typer alveolære celler. Disse cellene er store og sfæriske og genererer overflateaktive stoffer. Overflatespenningen til alveolene kan senkes takket være tilstedeværelsen av overflateaktivt middel, som også spiller en viktig rolle for å opprettholde alveolenes åpne struktur (28).

Celler i bronkiene er den primære kilden til de fleste lungekreft. Dessuten dreper lungesykdom flere mennesker over hele verden enn noen annen kreftrelatert årsak. Småcellekarsinomer står for 15–20 % av alle lungekrefttilfeller, mens ikke-småcellede karsinomer (NSCLC) står for 80–85 prosent av alle tilfeller. Anslagsvis 60 % av tilfellene er adenokarsinomer, mens 25 % er plateepitelkarsinomer, som begge faller inn under paraplyen for ikke-småcellet karsinom.

Ikke-småcellet lungekreft har tre undertyper, hvorav den tredje er storcellet karsinom.

Storcellede nevroendokrine karsinomer og karsinoider utgjør nevroendokrine svulster, som er en sjeldnere type lungekreft (29, 30).

Målrattede terapier har transformert paradigmet for medikamentutvikling for ikke-småcellet lungekreft (NSCLC) som et resultat av funnet av spesifikke mutasjoner i tyrosinkinaser, som EGFR og ALK. Medikamentresistens på den annen side setter bioteknologi og farma under press for å produsere nye behandlinger for denne tilstanden.

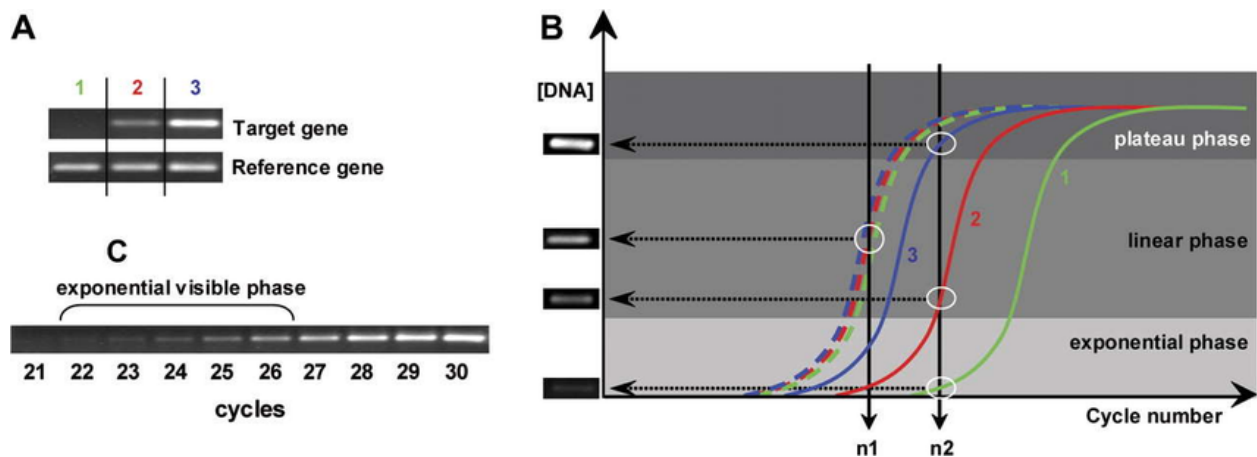
En biopsi- eller cytologiprøve brukes til å definitivt diagnostisere lungekreft. Bronkoskopi, eller en spesiell nål satt inn gjennom brystveggen, brukes ofte for å få disse prøvene.

Mange humane ikke-småcellede lungekreftcellerlinjer blir nå brukt i grunnleggende forskning og medisinopplæring. Epitekarsinom fra en 58 år gammel mannlig pasient med en KRAS-mutant og en EGFR-villtype er en regelmessig brukt linje, og den kalles A549 (29, 30).

1.6 Genekspresjonsanalyse

Undersøkelsen av den transkripsjonelle oppførselen til biologiske systemer, klassifisering av celletilstander ved sykdom og mange andre ting kan oppnås ved hjelp av en kraftig teknikk kjent som genekspresjonsanalyse, som er mye brukt. Hvor målingen av genuttrykk gir kvantitative data angående populasjonen av RNA-arter i celler og vev (31, 32).

Genekspresjon analyse kan benyttes for å studere genuttrykk og stressreaksjon av cellene etter at de dyrkes i forskjellige temperatur. Da kan man isolere totalt RNA og kjøre cDNA syntese og amplifiserings teknikk med å bruke spesifikke primere slik at et målgen normaliseres mot et referansegene og $2^{-\Delta\Delta CT}$ metode benyttes ut fra qPCR-resultat for å finne forskjellen i genekspresjon mellom stressede og ikke stressede celler. (33, 34).



Figur 2: Normalisering i semi-kvantitative RT-PCR. (A) Eksempel på ekspresjonskvantifisering av et målgen i tre cDNA-prøver (1, 2, og 3). (B) Kurver som tilsvarer den utførte PCR (A).

Amplifikasjon er vist med fargede linjer for målgenet og med stiplede linjer for referansegene.

Hver cDNA-prøve (1 i grønt, 2 i rødt og 3 i blått) fortynnes til intensiteten til båndet som tilsvarer referansegene oppnådd fra hver prøve er den samme etter et definert antall (n_1) PCR-sykluser.

Etter dette normaliseringstrinnet kan målgenuttrykket analyseres ved endepunkt, etter n_2 sykluser med PCR.

(C) For å definere den eksponentielle fasen, utføres PCR ved å bruke en rekke syklustall (her fra 21 til 30) (35).

1.6.1 RNA Isolering

Det første steget for å starte en genekspresjonsanalyse og se på stressresponsen, er å isolere RNA. Derfor kan vi si at kvaliteten på det ekstraherte RNAet har en innvirkning på nøyaktigheten til genekspresjon profilerings baserte teknologier og metoder for å identifisere transkripsjonelle endringer som reflekterer de originale prøvene (36, 37).

Grunnen for å isolere RNA og ikke DNA at den genetiske koden for å lage proteiner finnes i mRNA, som transkriberes fra DNA (37,38,39). Den hovedforskjellen mellom en kreftcelle og en normal celle ligger i genene som blir transkribert eller ikke transkribert og hvor ofte de blir transkribert. Det er mulig å bestemme hvilke gener som blir transkribert og i hvilken grad ved å analysere mRNA-molekylene som finnes i en celle (40).

Det kreves grundige laboratorieprosedyrer for å isolere et intakt RNA som ikke har blitt degradert eller skadet fra celler eller vev. Endogene ribonukleaser, som finnes i nesten alle levende celler og ødelegger transkripsjoner veldig raskt, må raskt og effektivt hemmes for å lykkes med å isolere RNA av høy kvalitet. Rask behandling vil derfor være avgjørende. Tilberedning av RNase-free reagenser og utstyr for cellelyse er tilleggskrav for RNA-isolering (37).

1.6.2 cDNA Syntese

cDNA, også kjent som komplementært DNA, er et fragment av DNA som spiller en viktig rolle innen genetisk forskning og inneholder bare kodende sekvenser som etter en bestemt reaksjon produseres fra messenger-RNA (mRNA) ved hjelp av enzymet revers transkriptase (41, 42).

Siden det er mRNA templat som brukes ved cDNA Syntese vil revers transkriptase PCR (RT PCR) benyttes istedenfor standard PCR som bruker DNA templat (41, 43).

Primer-annealing, DNA-polymerisering og enzyminaktivering er de tre grunnleggende prosessene som finner sted under revers transkripsjon. Effektiviteten og spesifisiteten til revers transkripsjon kan påvirkes av de valgte primerne, som er avhengige av om ett- eller to stegs RT-PCR utføres. Primeren som ble brukt, mål-RNA og revers transkriptase, påvirker alle temperaturen og tiden i denne prosessen (43, 44, 45).

1.6.3 PCR og qPCR

Prinsippet for PCR er å amplifisere en spesifikk liten del av DNA (DNA-målgen). Og mengden av amplifisert produkt avhengig av de tilgjengelige substratene i reaksjonen, som blir redusert ettersom reaksjonen fortsetter (46).

DNA-polymerase, magnesium, nukleotider, primere, DNA template og en termosyklus er alt som trengs for standard PCR. I en PCR-reaksjon denaturerer det varme dobbeltrådet DNA (dsDNA), primere justeres til enkeltrådene, og DNA-polymerase utvider primerne til å lage to kopier av den DNA-tråden. Amplifikasjonssykluser involverer denaturering, annealing og forlengelse ved forskjellige temperaturer og perioder. Både template og primersettet skal optimaliseres hver syklusfase i en PCR-reaksjon. Analysering av det amplifiserte produktet kan startes etter 20-40 sykluser (47).

PCR passer seg godt for å brukes som en analysemetode for å se på genekspressjonen og endringer i hvordan gener uttrykkes (48).

RT PCR og qPCR er også andre forskjellige PCR-metoder. I RT-PCR, eller revers transkripsjonspolymerasekjedereaksjon, kan RNA brukes som templat. Revers transkriptase konverterer RNA til sin komplementære DNA (cDNA) form. For at RT-PCR skal fungere, må RNA-templat være av høy kvalitet og renhet. Å lage en kombinasjon av DNA og RNA er det første trinnet i RT-PCR. RNase H-aktiviteten til revers transkriptase ødelegger RNA-komponenten til hybridene. Revers transkriptase bruker sin DNA-avhengige DNA-polymeraseaktivitet for å konvertere det delvis fullførte ssDNA til cDNA (43, 47).

For mange applikasjoner blir nukleinsyrer detektert, beskrevet og kvantifisert ved bruk av kvantitativ PCR (qPCR). Fluorescerende merking i qPCR som SYBR Green gjør det mulig å samle inn data mens PCR analyse utføres. Fluorescerende merking, som bruker et dsDNA-bindende fargestoff, muliggjør måling av de amplifiserte DNA-molekylene i fargestoffbasert qPCR. Fluorescensen måles over hver syklus. Mengden av duplisert DNA er direkte korrelert med fluorescenssignalet, noe som muliggjør sanntids kvantifisering av DNA (43, 47).

1.6.4 Ct, $\Delta\Delta\text{Ct}$ og tolkning av resultat

qPCR-resultat beregnes ut fra Ct-verdier, og leses fra ulike kurver. Ct-verdien (Syklus terskelverdi) er punktet på amplifikasjonsplottets kurve der terskelverdien krysses. Dette tallet viser hvor mange sykluser hver prøve går gjennom for å nå den amplifikasjons terskelverdien. Det er like mengde av cDNA trengs til genekspressjonsanalyse men samtidig, avhengig av hvor mye cDNA som tilsettes i prøven, vil Ct-verdien variere. Jo mindre cDNA var opprinnelig tilstede i prøven jo flere sykluser det tar å oppnå Ct-verdien. Hvert gen i analysen vil ha sin egen terskelverdi (48, 49, 50).

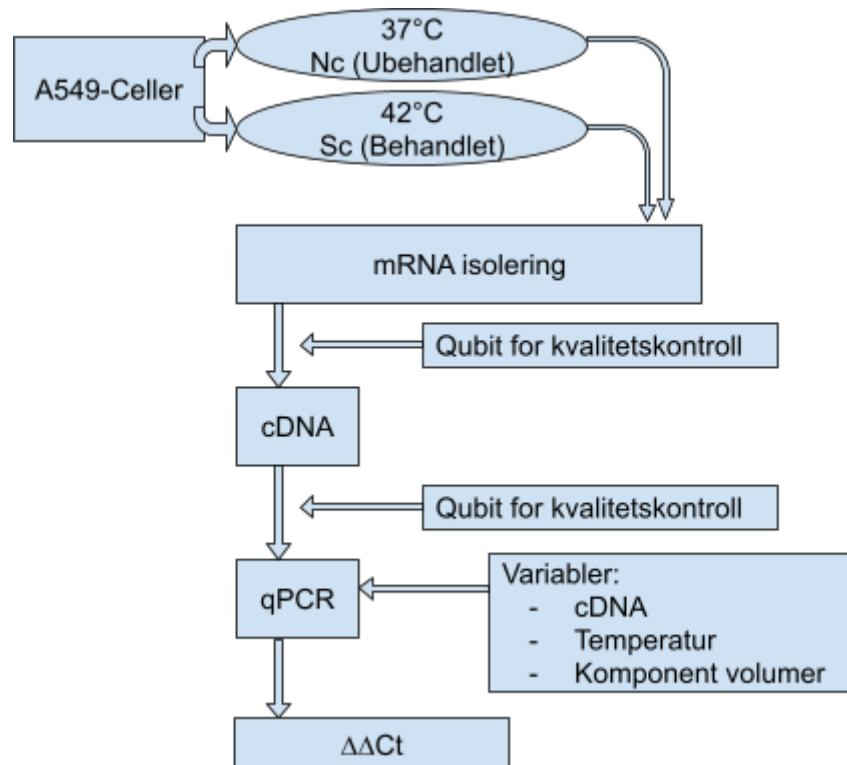
Beregningen av endringer i genuttrykk bruker differansen mellom Ct-verdier som startpunkt for å benyttes inne i kjent formelen kalles $\Delta\Delta\text{Ct}$ som er i utgangspunktet forskjellen mellom ΔCt -verdiene til prøven som ble behandlet (eksperimentell) og prøven som ikke ble behandlet (kontroll). Det vil si å sammenligne genet av interesse (målgenet) med et gen som ikke endres av eksperimentet (et normaliseringsgen) (33, 34, 49).

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{målgen}) - \Delta\text{Ct} (\text{normaliseringsgen})$$

$$\text{Fold gene expression} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$$

2.0 Materialer og metoder

Utgangspunktet for denne studien var fire celleflasker av A549-celler dyrket av andre studenter ved standardbetingelser i celleinkubator 37°C og 5% CO₂. To av celleflaskene ble så overført til en inkubator på 42°C i 2 timer. Derfor er de videre forsøkene utført på to celleflasker dyrket ved normale betingelser dvs 37°C og to celleflasker inkubert ved stressbetingelser som er 42°C.



Figur 1: Flytskjema-Genekspresjonsanalyse

2.1 mRNA-Isolering

Følgende trinn ble fulgt for de alle 4 flaskene for å isolere mRNA fra både stressede og ikke stressede celler ved hjelp av kitet RNeasy fra Qiagen. Første del av prosedyren ble utført i LAF-benk for å trypsinere cellene før mRNA-isoleringen. Gammelt medium ble fjernet og cellene ble vasket med 2x 3ml HBSS fra GE lifesciences. Etter vasking ble det tilsatt 0,5 ml 0,25% Trypsin fra Life Technologies og trypsineringen ble overvåket ved hjelp av invertmikroskop. Når ca 80% av cellene har løsnet, ble 4 ml medium fra ATTC tilsatt for å inaktivere trypsinet og cellekulturen ble blandet forsiktig ved å pipetteres rolig opp og ned og overført til et 15 ml Falconrør. Deretter ble røret tatt ut av LAF-benken og celleduspensjonen ble sentrifugert på 1200rpm i 3 min. 3 ml av supernatant ble suget av og kastet og pelletet ble løsnet ved å pipetteres rolig opp og ned. Celleduspensjonen ble overført til et eppendorfrør for å sentrifugere på 300g i 5 min. Deretter ble 350µl RLT lysesbuffer fra kitet RNeasy fra Qiagen tilsatt og suspensjonen ble blandet ved vortex i ca 1 minutt. Ett volum med 70% etanol som er like mye i mengden som celleduspensjonen (dvs 1,85 ml) ble tilsatt og blandet godt ved å pipettere. Etter det ble 700 µl av lysatet overført til en RNeasy-spin-kolonne som står i et 2ml oppsamlingsrør. Innholdene ble sentrifugert 15 sekunder ved 8000g eller 10000 rpm, væsken ble tømt ut og oppsamlingsrøret ble satt tilbake. Også 700 µl buffer RW1 fra Qiagen ble tilsatt og oppsamlingsrøret ble sentrifugert i 15 sekunder på 8000g eller 10000 rpm, væsken ble tømt ut og oppsamlingsrøret ble satt tilbake. 500 µl buffer RPE fra Qiagen ble tilsatt, og oppsamlingsrøret ble sentrifugert i 15 sekunder på 8000g eller 10000 rpm, væsken ble tømt ut og oppsamlingsrøret ble satt tilbake. Igjen ble 500 µl buffer RPE tilsatt, men denne gangen ble oppsamlingsrøret sentrifugert i 2 minutter på 8000 g eller 10000 rpm, væsken ble tømt ut, og oppsamlingsrøret ble kastet hvor et helt nytt eppendorfrør ble utnyttet. 50 µl RNase fritt vann ble tilsatt, og eppendorfrøret ble sentrifugert i 1 minutt på 8000g eller 10000 rpm. Og til slutt ble de rørene med isolerte mRNA-et merket og fryset på -20 °C.

2.2 Bestemmelse av RNA-konsentrasjonen

Dette steg ble utført ved hjelp av kitet Qubit RNA BR Assay fra Invitrogen og konsentrasjonene ble analyserte på instrumentet Qubit 4.0 fluorometer. 10 µl av isolerte RNA-et ble førts overført til et rent pcr-rør for konsentrasjonsbestemmelse. Qubit working solution ble laget (200 microliter for hvert analyserør trengs) i forholdet 1:200 Qubit RNA BR Reagent/Qubit RNA BR Buffer i henhold til følgende tabell:

Tabell 1: Viser forholdet mellom komponentvolumer for å klargjøre assay tubes som ble brukt for bestemmelse av RNA-konsentrasjonen.

Volume	Standards	Samples
Working Solution	190 µL	180-199 µL
Standard (from kit)	10 µL	–
Isolerte RNA samples	–	1-20 µL
Totalt volume in each Assay Tube	200 µL	200 µL

6 analyserør (assay tubes) ble brukt: 2 for standardene og 4 rør for de forskjellige prøvene. Som tabell 1 viser, måtte hvert en av de to standardene rør inneholder 190 microliter av Qubit working solution mens de andre rørene kunne inneholde 180-199 microliter og det som avgjorde dette var RNA-konsentrasjonen siden Qubit 4.0 Flurometer kunne ikke måle en verdi høyere enn 6 µl/ml. Dvs at for 6 analyserør ville mengden av Qubit working solution være mellom 1100 µl og 1176 µl. Da ble en litt større mengde tilberedet dvs 1330 µl Qubit working solution ble laget i forholdet : $(1330/200 = 6,65 \mu\text{l reagent})$ og $(1330-6,65 = 1323,35 \text{ buffer})$. Tabellen ble fulgt for å fylle innholdet i de 6 rørene. Rørene innhold ble blandet med vortex i 2-3 sekunder og inkubert ved romtemperatur i 2 minutter. Deretter ble konsentrasjonene av prøvene målt med Qubit 4.0 fluorometer (Med valget RNA Broad Range Assay for å kalibrere med standardene), og fortynningsforholdet til Qubit working solution ble endret flere ganger til den beste avlesningen ble oppnådd.

2.3 Tillaging av cDNA

Dette trinn ble utført ved hjelp av Quantabio qScript XLT cDNA SuperMix, 20 µl som totalt volum ble satt og blandet i pcr-rør for hver prøve (4 rør totalt) og i henhold til følgende tabell mens rørene står på is:

Tabell 2: Viser forholdet mellom komponentvolumer for å klargjøre pcr-rørene som ble brukt for tillaging av cDNA.

Komponent	Volum (20 µL-reaksjon)	Sluttkonsentrasjon
qScript XLT cDNA Supermix 5x	4 µL	1x
RNA templat	Variabelt	(2 µg - 10 pg total RNA)
Rnase/Dnase-fritt vann	Variabelt	
Totalt volum	20 µL	

Som tabellen viser, er RNA volum og Rnase fritt vann volum variable verdier og sammen måtte være 16 µl. Og med å tilsette 4 µL qScript XLT cDNA Supermix 5x fra Quantabio, ville volumet i hvert pcr-rør ble 20 µL totalt. Avlesninga av RNA-konsentrasjoner fra Qubit 4.0 fluorometer avgjorde hvor mye RNA måtte tilsatt. Dvs så lenge RNA-konsentrasjon var ligges i intervallet (10 pg/µl-2 µg/µl) ville være greit å tilsette 1 µl RNA og 15 µl Rnase fritt vann. Til slutt ble 4 forskjellige pcr-rør klargjort som tabell 3 viser:

Tabell 3: Viser innholdene av pcr-rørene som ble brukt for tillaging av cDNA.

Rør nummer	Komponentene
Rør nr.1	4 µl Supermix, 1 µl RNA fra <u>normale celler 1</u> og 15 µl Rnase fritt vann
Rør nr.2	4 µl Supermix, 1 µl RNA fra <u>normale celler 2</u> og 15 µl Rnase fritt vann
Rør nr.3	4 µl Supermix, 1 µl RNA fra <u>stressede celler 1</u> og 15 µl Rnase fritt vann
Rør nr.4	4 µl Supermix, 1 µl RNA fra <u>stressede celler 2</u> og 15 µl Rnase fritt vann

Alle rørene ble blandet forsiktig med vortex og spinnet ned og deretter ble de plassert i pcr-maskin og inkubert etter følgende skjema :

- 5 minutter på 25 grader
- 60 minutter på 42 grader
- 5 minutter på 85 grader
- Hold på 4 grader

* cDNA-konsentrasjoner ble målt på samme måte som har gjort for å ta RNA-konsentrasjonen. Dvs ved hjelp av Qubit RNA BR Assay Kit og instrumentet Qubit 4.0 fluorometer. Og beste avlesningsresultat var ved fortynningsforholdet: 5 µL cDNA til 195 µL Working Solution. Til slutt ble de rørene med ferdige tillaget cDNA oppbevart i fryser på -20 grader for å brukes senere.

2.4 Amplifisering av målgen (qPCR på cDNA)

Dette trinn ble avgjort ved hjelp av PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix fra Thermo Fisher Scientific og med å bruke spesifikke primere (HSP70 og EF1), Dvs to forskjellige primere ble brukt for hver prøve:

- Primer par HSP70 fra Invitrogen (Som målgen):
Forward primer TCCGGTGTGGATCTGACCAAAGAC
Reverse primer TGTTTAGGCCAGGAAGCATCCATG
- Primer par EF1 fra Invitrogen (Som normaliseringsgen):
Forward primer GATTGCGCTGTGCTGGTTGT
Reverse primer CTTGCAGGCGATGTGAGCAG

Først og fremst måtte cDNA-konsentrasjonene justeres hvor standard konsentrasjon av cDNA som brukes for qPCR er 0,4 ng/µl mens 0,8 ng/µl tas i bruk i det andre forsøket. Hver brønn av qPCR-plate ville inneholde 2 µl cDNA. Derfor ble fortyning for (8 brønn + 2 ekstra) laget av de 4 forskjellige cDNA-prøvene (N1/N2/S1/S2) med å benytte formelen: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$. qPCR-plate ble brukt og PCR-reaksjonene ble tilsatt og blandet i hver brønn i henhold til følgende tabell:

Tabell 4: Viser standard forholdet mellom komponentvolumer for å klargjøre qPCR-reaksjonene for amplifisering av målgen.

Component	Volume (10µl/well)	Volume (20µl/well)
Power Up SYBR Green Mastermix	5 µl	10 µl
Forward and revers primers	Variable	Variable
cDNA templat	Variable	Variable
Nukleasefritt vann	Variable	Variable
Total	10 µl	20 µl

Forsøket ble utført to ganger med forskjellige komponentvolumer i hver brønn til de beste resultater ble oppnådd:

Tabell 5: Viser forholdet mellom komponentvolumer som ble brukt for å klargjøre qPCR-reaksjonene for amplifisering av målgen i tre forskjellige forsøk.

Component	Forsøk 1	Forsøk 2 og 3
Power Up SYBR Green Mastermix	10 µl	7,5µl
Forward primer (HSP70/EF1)	1,5 µl	1 µl
Revers primer (HSP70/EF1)	1,5 µl	1 µl
cDNA templat	2 µl	2 µl
Nukleasefritt vann	5 µl	8,5 µl
Total	20 µl	20 µl

I det første forsøket og i henhold til tabell 5, ble hver enkelt komponentvolum tilsatt en og en til hver brønn på PCR plate og blandet i slutten. En raskere og mer effektiv arbeid teknikk ble brukt i det andre forsøket og i henhold til tabell 5 for å oppnå bedre resultat, Der ble to rør brukt for å tilsette og blande delvis av komponenter først og i nok mengder for alle brønnene (innholdene av hver rør vises i tabell 6 nedenfor) 13 µl av blandingen ble tilsatt til hver brønn. deretter ble 2 µl cDNA av (N1/N2/S1/S2) tilsatt en og en til sin riktig egen brønn med å sette merke på å tilsette vann istedenfor cDNA til brønnene av negativ kontroll. Til slutten ble 5 µl nukleasefritt vann tilsatt til hver brønn slik at total komponentvolum på hver enkel brønn blir 20 µl.

Tabell 6: Viser komponentvolumer som ble tilsatt i de to rørene som brukt for å klargjøre de første 13 µl av 20 µl av qPCR-reaksjonene for amplifisering av målgen i forsøk 2 og 3.

Rør1 Komponent	Rør 2 Komponent	Volume	Total
Power Up SYBR Green Mastermix	Power Up SYBR Green Mastermix	7,5µl ×20	150 µl
Forward primer (HSP70/EF1)	Forward primer (HSP70/EF1)	1 µl ×20	20 µl
Revers primer (HSP70/EF1)	Revers primer (HSP70/EF1)	1 µl ×20	20 µl
Nukleasefritt vann	Nukleasefritt vann	3,5 µl ×20	70 µl
Total komponentvolum	Total komponentvolum	13 µl ×20	260 µl

qPCR-plate ble blandet forsiktig med vortex og spinnet ned før å plasseres i qPCR-maskin og inkubert etter følgende Tabell:

Tabell 7: Viser inkubering forhold for qPCR-maskin som ble brukt i de forskjellige forsøkene.

Forsøk 1 og 2				Foersøk 3			
Step	Temperature	Duration	Cycles	Step	Temperature	Duration	Cycles
Dual-lock DNA polymerase	95°C	3 minutes	Hold	Dual-lock DNA polymerase	95°C	3 minutes	Hold
Denature	95°C	15 seconds	40	Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal/extend	60°C	1 minute	40	Anneal	58°C	15 seconds	40
				Extend	72°C	1 minute	40
Melt	95°C	30 seconds	1	Melt	95°C	30 seconds	1
Melt	65°C	30 seconds	1	Melt	65°C	30 seconds	1
Melt	95°C	30 seconds	1	Melt	95°C	30 seconds	1

3.0 Resultat

3.1 Isolerte RNA konsentrasjoner

RNA Konsentrasjoner som ble målt med Qubit 4.0 fluorometer vises i tabell 8:

Tabell 8: Viser isolerte RNA konsentrasjoner.

Isolerte RNA celler	Konsentrasjonen
N1 (Normale celler nr.1)	$2,74 = 2,74 \cdot 200/1 = 548 \mu\text{g/ml} = 0,548 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
N2 (Normale celler nr.2)	$3,70 = 3,70 \cdot 200/1 = 740 \mu\text{g/ml} = 0,740 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
S1 (Stressede celler nr.1)	$5,20 = 5,20 \cdot 200/1 = 1040 \mu\text{g/ml} = 1,040 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
S2 (Stressede celler nr.2)	$5,00 = 5,00 \cdot 200/1 = 1000 \mu\text{g/ml} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

3.2 cDNA-konsentrasjoner

cDNA-konsentrasjoner ble målt med Qubit 4.0 fluorometer og resultatene vises i tabell 9:

Tabell 9: Viser cDNA-konsentrasjoner.

cDNA- celler	Konsentrasjonen
N1 (Normale celler nr.1)	$0,0790 = 0,0790 \cdot 200/5 = 3,16 \mu\text{g/ml} = 3,16 \text{ ng}/\mu\text{l}$
N2 (Normale celler nr.2)	$0,0740 = 0,0740 \cdot 200/5 = 2,96 \mu\text{g/ml} = 2,96 \text{ ng}/\mu\text{l}$
S1 (Stressede celler nr.1)	$0,0357 = 0,0357 \cdot 200/5 = 1,428 \mu\text{g/ml} = 1,428 \text{ ng}/\mu\text{l}$
S2 (Stressede celler nr.2)	$0,0820 = 0,0820 \cdot 200/5 = 3,28 \mu\text{g/ml} = 3,28 \text{ ng}/\mu\text{l}$

cDNA-konsentrasjonene ble justert hvor formelen $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ ble benyttet med å anta 0,4 ng/ μ l som standard konsentrasjon i første forsøk og 0,8 ng/ μ l i det andre forsøket. Grunnen til at cDNA fortynnes er for å ha like mengde av cDNA til genekspresjonsanalyse. Og resultatene vises i tabell 10:

Tabell 10: Viser cDNA-konsentrasjon fortyning som ble brukt i første og andre forsøk for å klargjøre de 2 μ l cDNA av de totale 20 μ l qPCR-reaksjonene for amplifisering av målgen.

Celler	Forsøk 1		Forsøk 2 og 3	
	cDNA-Volume	Vann-Volume	cDNA-Volume	Vann-Volume
	$C_1 \cdot V_1 / C_2 = V_2$	$20 - V_2$	$C_1 \cdot V_1 / C_2 = V_2$	$20 - V_2$
N1	$0,4 \times 20 / 3,16 = 2,53 \mu\text{l}$	17,47 μl	$0,8 \times 20 / 3,16 = 5,06 \mu\text{l}$	14,94 μl
N2	$0,4 \times 20 / 2,96 = 2,70 \mu\text{l}$	17,30 μl	$0,8 \times 20 / 2,96 = 5,4 \mu\text{l}$	14,6 μl
S1	$0,4 \times 20 / 1,428 = 5,60 \mu\text{l}$	14,40 μl	$0,8 \times 20 / 1,428 = 11,2 \mu\text{l}$	8,8 μl
S2	$0,4 \times 20 / 3,28 = 2,44 \mu\text{l}$	17,56 μl	$0,8 \times 20 / 3,28 = 4,88 \mu\text{l}$	15,12 μl

3.3 Målgen amplifiserings resultat (qPCR resultat)

I det første forsøket og som tabell 11 vises, var resultatene av qPCR dvs terskelverdier (Ct) er ikke helt lesbare hvor det er mangler på resultat av noen prøver i tillegg til at kontroll prøve ble ikke tilsatt på plass.

Tabell 11: qPCR resultat fra det første forsøket, Tabellen viser hvilke prøve ble satt i hvilke brønn, Syklus terskelverdi (Ct) og Primer-Smeltepunkt Temperatur (Tm) av hver enkel tilsatt prøve. NTC står for (No Template Control) hvor disse brønnene som markert med grønn farge her i tabellen (A9,B9,C9 og D9) ble ikke påfylt av kontroll prøve.

Well	Prøve type	Ct	Tm
A1	hsp70 nc1	No Ct	71.5
A2	hsp70 nc1	No Ct	67.5
A3	hsp70 nc1	37.7	76.5
A4	hsp70 nc1	No Ct	76
A5	hsp70 nc2	37.77	76
A6	hsp70 nc2	No Ct	68
A7	hsp70 nc2	36.82	76
A8	hsp70 nc2	No Ct	68.5
A9	NTC	No Ct	95
B1	ef1 nc1	38.14	76
B2	ef1 nc1	No Ct	72.5
B3	ef1 nc1	No Ct	70
B4	ef1 nc1	37.53	76.5
B5	ef1 nc2	35.98	76
B6	ef1 nc2	35.45	77
B7	ef1 nc2	No Ct	95
B8	ef1 nc2	36.99	76.5
B9	NTC	No Ct	93
C1	hsp70 sc1	35.99	82.5
C2	hsp70 sc1	No Ct	85
C3	hsp70 sc1	37.68	78
C4	hsp70 sc1	37.34	95
C5	hsp70 sc2	No Ct	85.5
C6	hsp70 sc2	36.62	80.5
C7	hsp70 sc2	38.32	80
C8	hsp70 sc2	36.53	79
C9	NTC	No Ct	68.5
D1	ef1 sc1	37.55	80
D2	ef1 sc1	No Ct	95
D3	ef1 sc1	36.03	80.5
D4	ef1 sc1	No Ct	78
D5	ef1 sc2	32.96	81
D6	ef1 sc2	31.95	81
D7	ef1 sc2	32.97	80.5
D8	ef1 sc2	33.26	81
D9	NTC	No Ct	65

I andre forsøket var resultatene av qPCR mer lesbare men det var fortsatt mangler på resultat av noen prøver. I dette forsøket ble også brønnene (A9,B9,C9 og D9) benyttet og påfylt av kontroll prøve. Og resultatene vises i tabell 12.

Tabell 12: qPCR resultat fra det andre forsøket. Tabellen viser hvilke prøve ble satt i hvilke brønn, Syklus terskelverdi (Ct) og Primer-Smeltepunkt Temperatur (Tm) av hver enkel tilsatt prøve.

Well	Prøve type	Ct	Tm
A1	hsp70 nc1	36.81	76
A2	hsp70 nc1	No Ct	85
A3	hsp70 nc1	36.73	76
A4	hsp70 nc1	36.87	76
A5	hsp70 nc2	36.08	79
A6	hsp70 nc2	35.61	76
A7	hsp70 nc2	36.47	76
A8	hsp70 nc2	36.91	79
A9	hsp70	No Ct	85
B1	ef1 nc1	35.81	81.5
B2	ef1 nc1	35.64	81.5
B3	ef1 nc1	36.18	81.5
B4	ef1 nc1	35.28	81.5
B5	ef1 nc2	35.35	81.5
B6	ef1 nc2	36.14	81.5
B7	ef1 nc2	36.54	81.5
B8	ef1 nc2	No Ct	65
B9	ef1	No Ct	65
C1	hsp70 sc1	No Ct	82
C2	hsp70 sc1	No Ct	65
C3	hsp70 sc1	No Ct	69.5
C4	hsp70 sc1	No Ct	85
C5	hsp70 sc2	35.18	77
C6	hsp70 sc2	33.57	76.5
C7	hsp70 sc2	No Ct	71.5
C8	hsp70 sc2	36.72	77.5
C9	hsp70	No Ct	85
D1	ef1 sc1	36.27	80
D2	ef1 sc1	35.08	80
D3	ef1 sc1	No Ct	79.5
D4	ef1 sc1	35.21	80.5
D5	ef1 sc2	34.06	80.5
D6	ef1 sc2	35.5	81.5
D7	ef1 sc2	34.95	80.5
D8	ef1 sc2	34.76	80.5
D9	ef1	No Ct	85

I tredje forsøket og etter å bruke annerledes inkubasjons forhold, var resultatene enda bedre enn resultatene fra første og andre forsøk hvor alle prøvene har lesbare Ct-verdier bortsett fra prøven som ble tilsatt i brønn A8. Resultatene vises i tabell 13.

Tabell 13: qPCR resultat fra tredje forsøk. Her ble noen ekstra kolonner tilsatt til tabellen for å beregne gjennomsnitt og standardavvik for de forskjellige parallellene av prøve-resultater. Bildet viser også noen uakseptable verdier som ble markert på rødt farge. Noen gjennomsnitt og standardavvik beregnet for annerledes paralleller av noen prøve-resultater og markert på grå farget slik at vi kvitt de uakseptable standardavvik-verdier for å kunne brukes videre i $\Delta\Delta Ct$ formelen.

Well	Prøve type	Ct	Ct Gjennomsnitt		Ct Standardavvik	Tm	Tm Gjennomsnitt	Tm Standardavvik	
A1	hsp70 nc1	28.53	28.6725		0.172892067	80	80.125	0.25	
A2	hsp70 nc1	28.56							
A3	hsp70 nc1	28.91							
A4	hsp70 nc1	28.69							
A5	hsp70 nc2	28.12	28.18		0.084852814	80	80.25	0.353553391	
A6	hsp70 nc2	28.24							
A7	hsp70 nc2	35.44				80.5			
A8	hsp70 nc2	No Ct				70			
A9	hsp70	39.74				70			
B1	ef1 nc1	24.64	25.285	24.7	0.085	0.677	79.5	79.375	0.25
B2	ef1 nc1	24.76							
B3	ef1 nc1	25.88		25.87	0.014				
B4	ef1 nc1	25.86							
B5	ef1 nc2	25.91	25.7075		0.198221257	79.5	79.5	0	
B6	ef1 nc2	25.84							
B7	ef1 nc2	25.58							
B8	ef1 nc2	25.5							
B9	ef1	No Ct				87.5			
C1	hsp70 sc1	25.33	25.8725		0.508224032	80	80.125	0.25	
C2	hsp70 sc1	25.55							
C3	hsp70 sc1	26.27							
C4	hsp70 sc1	26.34							
C5	hsp70 sc2	26.53	26.7125		0.254869248	80	80.375	0.25	
C6	hsp70 sc2	26.46							
C7	hsp70 sc2	26.89							
C8	hsp70 sc2	26.97							
C9	hsp70	No Ct				87.5			
D1	ef1 sc1	26.12	26.0975		0.053150729	79.5	79.5	0	
D2	ef1 sc1	26.02							
D3	ef1 sc1	26.14							
D4	ef1 sc1	26.11							
D5	ef1 sc2	25.2	26.345	25.235	0.0495	1.28	79.5	79.5	0
D6	ef1 sc2	25.27							
D7	ef1 sc2	27.49		27.455	0.0495				
D8	ef1 sc2	27.42							
D9	ef1	No Ct				70			

4.0 Diskusjon

Forutsetning for å sette i gang eksperimentet var å få tak i god vekst A549-celler og følge steriliseringsinstruksjonene og arbeid effektivt for å unngå prøveforurensningen.

Standardbetingelser i celleinkubator var 37°C og 5% CO₂. Det er de optimale forholdene hvor vi kunne kalle innholdet av de fire celleflaskene med normale celler og ennå ikke stressede celler.

Og når denne studien handlet om å optimalisere metoden av genekspressjonsanalyse av HSP70 etter stressaksjon på A549-celler, måtte 2 celleflasker av de prøvene øverføres til en inkubator med stressbetingelser på 42°C i 2 timer.

RLT- lysesbuffer ble brukt ved RNA-isolering For å ødelegge cellemembranen. Med å isolere RNA av både normale og stressede celler, kommer alle cellekomponenter ut og ikke bare RNA. Derfor var det nødvendig å følge spesifikke trinn og legge til spesielle buffere for å bli kvitt alle andre komponenter men først og fremst måtte sikre at RNA kommer ikke til å bli degradert av den komponenten som finnes overalt rundt oss som kalles RNase. Dette kunne oppnådd med å surge at lysesbufferen inneholdt komponenter som degraderer først RNase samt med å jobbe rask nok. Og siden hovedproduktet her er RNA, ble rDNase også nyttet for å degradere DNA. Isolatet ble først filtrert ved hjelp av en spinnkolonne og deretter vasket to ganger med forskjellige vaskebuffer for å bli kvitt saltene og andre celledeler. Med et polart stoff som hadde lavt ioneinnhold, som vann eller etanol, ble RNA eluert. For å hindre at RNA brytes ned, måtte det fryses umiddelbart etter isolering.

Ved måling av RNA-konsentrasjon, ble Qubit 4.0 fluorometer brukt. Dette instrumentet måler ikke en verdi som er høyere enn 6 µl/ml. Derfor var det trengs at fortynningsforholdet til Qubit working solution endres flere ganger slik at vi får lesbare verdier for alle prøvene.

RNA-konsentrasjonen kunne måles etter at 1 µL RNA til 199 µL Working Solution ble brukt som et akseptabelt fortynningsforhold.

Kvaliteten på mRNA som ble isolert i slutten er viktig for resultat av genekspressjonsanalys hvor mengden av mRNA brukes som mål i analysen. Derfor RNA-isolering må gjøres riktig med å følge prosedyren og RNA-konsentrasjon brukes som kvalitetsparameter på RNA-isoleringen, dvs måling av RNA-konsentrasjon ville være kvalitetssikring trinn.

PCR-maskin ble benyttet for tillaging av cDNA. På grunn av dets ustabilitet brytes RNA raskt ned av RNase. Derfor skulle RNA transformeres til cDNA hvor DNA er betydelig mer stabilt og kan lagres i lengre perioder uten å nedbrytes. Deretter ble cDNA-konsentrasjonene målt (som

en kvalitetsparameter) og igjen ved hjelp av Qubit 4.0 fluorometer hvor beste fortynningsforhold til Qubit working solution her var 5 µL RNA til 195 µL Working Solution.

Siste trinn i prosedyre var å amplifisere cDNA ved hjelp av qPCR. Og dette steget som trengte å optimaliseres mest. Grunnen til at vi valgte qPCR og ikke PCR at qPCR gir oss Ct-verdier for normale og stressede celler. Ct representerer antall sykluser som kreves for en individuell prøve for å oppnå amplifikasjonsterskelen. Disse verdier kan brukes ved hjelp av $\Delta\Delta Ct$ formelen for å beregne forskjellen i uttrykksnivåer som kan fortelle oss noe om genekspressjonsnivået til A549 genen ved stressende forhold.

Det var i hovedsakelig 3 variabler som ble testet ut da vi optimaliserte metoden, disse variablene er, cDNA-konsentrasjon, komponentvolumer, og temperaturen av annealing og extending.

Første gang ved justering av cDNA konsentrasjonene som en kvalitetssikring trinn for å sikre å ha like mengde av cDNA i alle prøvene som brukes i genekspressjonsanalyse, ble 0,4 ng/µl antatt som standard konsentrasjon for å gå videre i prosessen. Men slutte resultatene som ble vist på qPCR etter amplifisering trinn, var uleselige, noe som indikerer at

cDNA-konsentrasjonene som ble brukt var lave. Derfor ble 0,8 ng/µl antatt som standard konsentrasjon da dette steget ble gjennomført igjen ved andre og tredje forsøk (Tabell 10).

I første forsøk med å amplifisere cDNA og med hensyn til tabell 5 i metoden som viser komponentvolumer som ble brukt for å klargjøre qPCR-reaksjonene og tabell 7 som viser inkubering forhold for qPCR-maskin, fikk vi resultatene som vises i tabell 11. Der ser vi at det var mange Ct verdier som er uleselige, noe som gjør umulig å velge passende paralleller av prøvene for å beregne $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Derfor var det nødvendig i forsøk 2 å endre forholdet mellom komponentvolumer av qPCR-reaksjonene (tabell 5 og 6) samtidig med å øke cDNA konsentrasjonen, men samme inkubering forhold for qPCR-maskin ble brukt (tabell 7).

Med å endre alle nevnte i det andre forsøket fikk vi resultatene som vises i tabell 12. Disse var bedre resultat med mer lesbare paralleller men det var fortsatt noen uleselige verdier som hindrer oss fra å beregne $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Forsøket ble utført en tredje gang med samme forholdet mellom komponentvolumer av qPCR-reaksjonene men med annerledes inkubering forhold for qPCR-maskin (tabell 7). Da fikk vi enda bedre resultat med lesbare verdier for alle 36 tilsatte prøvene bortsett fra to (tabell 13). Å få disse to uakseptable verdier, kunne være hendt blant annet på grunn av feil pipettering av komponenter i brønnene av qPCR-plate. Heldigvis kunne vi gå videre i prosessen og beregne Ct Gjennomsnitt, Ct Standardavvik, Tm Gjennomsnitt og Tm Standardavvik for de forskjellige parallellene av prøveresultater. Standardavvik brukes her

som kvalitetsparameter som må være $\leq 0,5$ for å godkjenne parallelle prøver som skal brukes i beregningen av $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Da har vi fått 0,677323163 og 1,282354605 som to uakseptable Ct Standardavvik verdier. Grunnen til det kan være at vi ikke kunne ha akkurat like mengden av cDNA i alle prøvene og dette vises igjen hvor viktig det var å være nøye med kvalitetssikring trinn ved tilberedning av cDNA-konsentrasjonene. På grunn av de to uakseptable Ct Standardavvik ville det være uriktig å beregne $2^{-\Delta\Delta Ct}$ med å bruke Ct Gjennomsnitt av disse parallellene som gir uakseptable Ct Standardavvik. Noe annet som kunne gjøres i dette tilfellet var å beregne gjennomsnitt og standardavvik på nytt for noen annerledes paralleller slik at vi fikk standardavvik-verdier som kunne godkjennes. På dette grunnlaget fikk vi flere brukelig alternativer av Ct Gjennomsnittsverdier og avhengig av hvilke Ct Gjennomsnitt som ble brukt ble forskjellige verdier av $2^{-\Delta\Delta Ct}$ beregnet istedenfor å få en bestemt verdi.

Case 1: Her prøvde vi å finne på hvordan resultatene av genekspresjon vil se ut med å se bort fra Ct Standardavvik:

A. For Nc1 og Sc1 ved å tas 25,285 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Nc1:

$$\Delta Ct = \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{HSP70 målgen})} - \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{EF1 normaliseringsgen})}$$

$$\Delta Ct (\text{Nc1}) = 28,6725 - 25,285$$

$$\Delta Ct (\text{Nc1}) = 3,3875$$

$$\Delta Ct = \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{HSP70 målgen})} - \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{EF1 normaliseringsgen})}$$

$$\Delta Ct (\text{Sc1}) = 25,8725 - 26,0975$$

$$\Delta Ct (\text{Sc1}) = -0,225$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Sc1}) - \Delta Ct (\text{Nc1}) = (-0,225) - (3,3875) = -3,6125$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.1} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{12,23125}$$

B. For Nc2 og Sc2 ved å tas 26,345 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Sc2:

$$\Delta Ct = \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{HSP70 målgen})} - \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{EF1 normaliseringsgen})}$$

$$\Delta Ct (\text{Nc2}) = 28,18 - 25,7075$$

$$\Delta Ct (\text{Nc2}) = 2,4725$$

$\Delta Ct = \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{HSP70 målgen})} - \text{Gjennomsnittsverdi av } Ct_{(\text{EF1 normaliseringsgen})}$

$$\Delta Ct (\text{Sc2}) = 26,7125 - 26,345$$

$$\Delta Ct (\text{Sc2}) = 0,3675$$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Sc2}) - \Delta Ct (\text{Nc2}) = (0,3675) - (2,4725) = -2,105$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.2} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{4,3019776}$$

Kvalitetsparameter som man velger i en analysemetode, har mye å si på hvordan resultater kommer ut. Og dette er spesielt her med hvor stort standardavvik man aksepterer og tar i bruk mellom Ct-verdier for en prøve.

Beregninger som kommer i Case 2 og Case 3 vil vise oss hvordan de akseptable resultatene av genekspresjon vil være når Ct Standardavvik tas i bruk. Og samtidig vil de vise hvordan resultatene kan også varierer med å velge forskjellige paralleller av Ct-verdier for noen prøver som i stort sett inneholder litt ulike mengder av cDNA-konsentrasjoner.

Case 2:

A. For Nc1 og Sc1 ved å tas 24,7 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Nc1:

$$\Delta Ct (\text{Nc1}) = 3,9725$$

$$\Delta Ct (\text{Sc1}) = -0,225$$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Sc1}) - \Delta Ct (\text{Nc1}) = -4,1975$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.1} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{18,34735}$$

B. For Nc2 og Sc2 ved å tas 25,235 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Sc2:

$$\Delta Ct (\text{Nc2}) = 2,4725$$

$$\Delta Ct (\text{Sc2}) = 1,4775$$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Sc2}) - \Delta Ct (\text{Nc2}) = -0,995$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.2} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{1,993081}$$

Case 3:

A. For Nc1 og Sc1 ved å tas 25,87 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Nc1:

$$\Delta Ct (Nc1) = 2,8025$$

$$\Delta Ct (Sc1) = -0,225$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (Sc1) - \Delta Ct (Nc1) = -3,0275$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.1} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{8,15396}$$

B. or Nc2 og Sc2 ved å tas 27,455 Ct Gjennomsnittsverdi i bruk for Ef1Sc2:

$$\Delta Ct (Nc2) = 2,4725$$

$$\Delta Ct (Sc2) = -0,7425$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{treated sample}) - \Delta Ct (\text{untreated sample})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (Sc2) - \Delta Ct (Nc2) = -3,215$$

$$\Rightarrow \text{Fold gene expression for cellene nr.2} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = \mathbf{9,28563}$$

5.0 Konklusjoner

Metoden av HSP70-genekspresjonsanalyse ble utført flere ganger ved ulike forhold mellom variablene i prosedyre. I slutten kunne vi få en bestemt analysemetode for å måle genekspresjonen og vise graden av HSP70-stressresponsen for A549-celler som har dyrket ved 42 grader. Med å prøve å unngå feilkilder som kunne påvirke resultatene, kan vi si at metoden kan brukes trygd fremover. Uansett vil ende mer fremtidige optimaliseringer være nyttig slik at analyseringen gir mer nøyaktige og raskere resultat.

Referanser

1. Fulda S, Gorman A, Hori O, Samali A. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death [Internett]. Hindawi-International Journal of Cell Biology; 2010 [cited 2023 5. feb]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/214074/>
2. Dokladny K, Myers O, Moseley B. Heat shock response and autophagy—cooperation and control [Internett]. Taylor and Francis Group, Informa PLC; 2014 [cited 2023 5. feb]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2015.1009776>
3. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death [Internett]. ScienceDirect; 2010 [cited 2023 5. feb]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276510007823>
4. Roald B. apoptose [Internett]. Store medisinske leksikon; 2022 [cited 2023 7. feb]. Available from: <https://sml.snl.no/apoptose>
5. Renehan A, Booth C, Potten C. What is apoptosis, and why is it important? [Internett]. National Library of Medicine; 2001 [cited 2023 7. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1120576/>
6. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death [Internett]. National Library of Medicine; 2007 [cited 2023 7. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117903/>
7. Perkins N, Gilmore T. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B [Internett]. Nature Portfolio; 2006 [cited 2023 8. feb]. Available from: <https://www.nature.com/articles/4401838>
8. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer [Internett]. The Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS); 1997 [cited 2023 8. feb]. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.94.7.2776>
9. Park MT, Lee SJ. Cell Cycle and Cancer [Internett]. Korea Institute of Science and Technology; 2003 [cited 2023 8. feb]. Available from: <http://koreascience.or.kr/article/JAKO200310103463052.page>
10. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression [Internett]. Nature Portfolio; 2004 [cited 2023 8. feb]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature03098>
11. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer, Carcinogenesis [Internett]. Oxford Academic; 2000 [cited 2023 8. feb]. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article/21/3/485/2365672?login=true>

12. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer [Internet]. Cell Press; 2000 [cited 2023 8. feb]. Available from: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)81683-9?](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)81683-9?)
13. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis, A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy [Internet]. Cell Press; 2002 [cited 2023 8. feb]. Available from: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(02\)00625-6?](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(02)00625-6?)
14. Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy [Internet]. Cell Press; 2001 [cited 2023 8. feb]. Available from: [https://www.cell.com/trends/cell-biology/fulltext/S0962-8924\(01\)02124-9?](https://www.cell.com/trends/cell-biology/fulltext/S0962-8924(01)02124-9?)
15. Morimoto RI, Kroeger PE, Cotto JJ. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. [Internet]. National Library of Medicine; 1996 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8856973/>
16. Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond [Internet]. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB); 2001 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj00-0294rev>
17. Shabtay A, Arad Z. Reciprocal activation of HSF1 and HSF3 in brain and blood tissues: is redundancy developmentally related? [Internet]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology; 2006 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00685.2005>
18. Jäättelä M. Heat shock proteins as cellular lifeguards [Internet]. Taylor and Francis Group, Informa PLC; 2009 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07853899908995889>
19. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77
20. Hu C, Yang J, Qi Z, Wu H, Wang B, Zou F, Mei H, Liu J, Wang W, Liu Q. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities [Internet]. National Library of Medicine; 2022 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9345296/>
21. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target [Internet]. National Library of Medicine; 2010 [cited 2023 10. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895966/>
22. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy [Internet]. *Nature Portfolio*; 2009 [cited 2023 15. feb]. Available from: <https://www.nature.com/articles/6605066>

23. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins with Tumorigenic Properties, Cell Cycle [Internet]. Taylor and Francis Group, Informa PLC; 2006 [cited 2023 15. feb]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.5.22.3448>
24. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 Multi-Functionality in Cancer [Internet]. National Library of Medicine; 2020 [cited 2023 15. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7140411/>
25. Hoeijmakers J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. [Internet]. Nature Portfolio; 2001 [cited 2023 15. feb]. Available from: <https://www.nature.com/articles/35077232>
26. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Basic Science Methods for Clinical Researchers. [Internet]. National Library of Medicine; 2017 [cited 2023 18. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149418/>
27. Langdon SP. Cancer Cell Culture, Methods and Protocols. [Internet]. Springer Nature; 2004 [cited 2023 18. feb]. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1385/1592594069?noAccess=true>
28. Holck P. pneumocytt [Internet]. Store medisinske leksikon; 2019 [cited 2023 19. feb]. Available from: <https://sml.snl.no/pneumocytt>
29. Franklin M. A549 – A Model For Non-Small Cell Lung Cancer [Internet]. MI BioResearch; 2016 [cited 2023 19. feb]. Available from: <https://web.archive.org/web/20180625185455/https://www.mibioresearch.com/knowledge-center/model-spotlight-a549-a-model-for-non-small-cell-lung-cancer/>
30. Henning O, Hofslie E. lungekreft [Internet]. Store medisinske leksikon; 2022 [cited 2023 19. feb]. Available from: <https://sml.snl.no/lungekreft>
31. Lovén J, Orlando DA, Sigova AA, Lin C, Rahl PB, Burge CB, Levens DL, Lee TI, Young RA. Revisiting Global Gene Expression Analysis [Internet]. ScienceDirect; 2012 [cited 2023 22. feb]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412012263>
32. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, Nucleic Acids Research [Internet]. Oxford Academic; 2002 [cited 2023 22. feb]. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/30/1/207/1332640?login=true>

33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [Internet]. ScienceDirect; 2001 [cited 2023 19. mars]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202301912629>
34. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, Biostat Bioinforma Biomath [Internet]. National Library of Medicine; 2013 [cited 2023 19. mars]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280562/>
35. Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Wuytswinkel OV, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references, Journal of Experimental Botany [Internet]. Oxford Academic; 2009 [cited 2023 19. mars]. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article/60/2/487/631727?searchresult=1>
36. Samadani AA, Nikbakhsh N, Fattahi S, Pourbagher R, Aghajanzpour Mir SM, Mousavi Kani N, Abedian Z, Akhavan-Niaki H. RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter? [Internet]. National Library of Medicine; 2015 [cited 2023 24. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359706/>
37. Krieg P. A laboratory guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. 1996; John Wiley and Sons Ltd.
38. Wang D, Farhana A. Biochemistry, RNA Structure [Internet]. National Library of Medicine; 2022 [cited 2023 24. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>
39. Sen SK. MESSENGER RNA (MRNA) [Internet]. National Human Genome Research Institute; 2023 [cited 2023 24. feb]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna>
40. Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional Addiction in Cancer [Internet]. National Library of Medicine; 2017 [cited 2023 24. feb]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5308559/>
41. Chauhan T. The Process Of CDNA Synthesis And CDNA Library Preparation [Internet]. Genetic Education; 2019 [cited 2023 27. feb]. Available from: <https://geneticeducation.co.in/the-process-of-cdna-synthesis-and-cdna-library-preparation/>

42. Shchelochkov OA. CDNA (COPY DNA) [Internet]. National Human Genome Research Institute; 2023 [cited 2023 27. feb]. Available from:
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Copy-DNA>
43. Chauhan T. Reverse Transcription PCR: Principle, Procedure, Protocol, Advantages, Limitations, Applications [Internet]. Genetic Education; 2019 [cited 2023 27. feb]. Available from:
<https://geneticeducation.co.in/reverse-transcription-pcr-principle-procedure-protocol-advantages-limitations-applications/>
44. 5 Steps to Optimal cDNA Synthesis [Internet]. ThermoFischer; [cited 2023 28. feb]. Available from:
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/5steps-cDNA.html>
45. Guidelines for RT-PCR [Internet]. QIAGEN; [cited 2023 28. feb]. Available from:
<https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/real-time-rt-pcr/guidelines-for-rt-pcr>
46. Carr AC, Moore SD. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting [Internet]. National Library of Medicine; 2012 [cited 2023 05. mars]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365123/>
47. Neidler S. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR? [Internet]. Enzo Life Sciences; 2017 [cited 2023 05. mars]. Available from:
<https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
48. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction [Internet]. National Library of Medicine; 2006 [cited 2023 05. mars]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460794/>
49. Bradburn S. How To Perform The Delta-Delta Ct Method [Internet]. Top Tip Bio; [cited 2023 20. mars]. Available from:
https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/?utm_content=cmp-true
50. Real-Time PCR: Understanding Ct [Internet]. ThermoFischer; [cited 2023 20. mars]. Available from:
<https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

A.0 Appendikser

A.1 RNA-Isolering

October 2019

RNeasy[®] Mini Handbook

RNeasy Mini Kit

For purification of total RNA from animal cells, animal tissues, bacteria, and yeast, and for RNA cleanup

RNeasy Protect Mini Kit

For immediate stabilization of RNA in harvested animal tissues and subsequent total RNA purification

RNeasy Plant Mini Kit

For purification of total RNA from plants and filamentous fungi

- 1b. Cells grown in a monolayer (do not use more than 1×10^7 cells):
Cells can be either lysed directly in the cell-culture vessel (up to 10 cm diameter) or trypsinized and collected as a cell pellet prior to lysis. Cells grown in cell-culture flasks should always be trypsinized.

To lyse cells directly:

Determine the number of cells. Completely aspirate the cell-culture medium, and proceed immediately to step 2.

Note: Incomplete removal of cell-culture medium will inhibit lysis and dilute the lysate, affecting the conditions for binding of RNA to the RNeasy membrane. Both effects may reduce RNA yield.

To trypsinize and collect cells:

Determine the number of cells. Aspirate the medium, and wash the cells with PBS. Aspirate the PBS, and add 0.1–0.25% trypsin in PBS. After the cells detach from the dish or flask, add medium (containing serum to inactivate the trypsin), transfer the cells to an RNase-free glass or polypropylene centrifuge tube (not supplied), and centrifuge at $300 \times g$ for 5 min. Completely aspirate the supernatant, and proceed to step 2.

Note: Incomplete removal of cell-culture medium will inhibit lysis and dilute the lysate, affecting the conditions for binding of RNA to the RNeasy membrane. Both effects may reduce RNA yield.

2. Disrupt the cells by adding Buffer RLT.

For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 5). Vortex or pipet to mix, and proceed to step 3.

Note: Incomplete loosening of the cell pellet may lead to inefficient lysis and reduced RNA yields.

Table 5. Volumes of Buffer RLT for lysing pelleted cells

Number of pelleted cells	Volume of Buffer RLT (μ l)
$<5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

For direct lysis of cells grown in a monolayer, add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 6) to the cell-culture dish. Collect the lysate with a rubber policeman. Pipet the lysate into a microcentrifuge tube (not supplied). Vortex or pipet to mix, and ensure that no cell clumps are visible before proceeding to step 3.

Table 6. Volumes of Buffer RLT for direct cell lysis

Dish diameter (cm)	Volume of Buffer RLT (μ l)*
<6	350
6–10	600

* Regardless of the cell number, use the buffer volumes indicated to completely cover the surface of the dish.

3. Homogenize the lysate according to step 3a, 3b, or 3c.

See "Disrupting and homogenizing starting material", page 22, for more details on homogenization. If processing $\leq 1 \times 10^5$ cells, homogenize by vortexing for 1 min. After homogenization, proceed to step 4.

Note: Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the RNeasy spin column. Homogenization with a rotor–stator or QIAshredder homogenizer generally results in higher RNA yields than with a syringe and needle.

- 3a. Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at full speed. Proceed to step 4.
 - 3b. Homogenize the lysate for 30 s using a rotor–stator homogenizer. Proceed to step 4.
 - 3c. Pass the lysate at least 5 times through a blunt 20-gauge needle (0.9 mm diameter) fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.
4. Add 1 volume of 70% ethanol to the homogenized lysate, and mix well by pipetting.

Important: Do not centrifuge.

Note: The volume of lysate may be less than 350 μ l or 600 μ l due to loss during homogenization.

Note: When purifying RNA from certain cell lines, precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.

5. Transfer up to 700 μ l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the flow-through.*

Reuse the collection tube in step 6.

If the sample volume exceeds 700 μ l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.*

Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see “Eliminating genomic DNA contamination”, page 26), follow Appendix D (page 82), steps 1–4, after performing this step.

* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

-
6. Add 700 μ l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.*

Reuse the collection tube in step 7.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 82).

7. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 8.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

8. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane.

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

9. **Optional:** Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 8.

* Flow-through contains Buffer RLT or Buffer RW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for safety information.

-
10. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to elute the RNA.
11. If the expected RNA yield is $>30 \mu\text{g}$, repeat step 10 using another 30–50 μ l RNase-free water, or using the eluate from step 10 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 10.
- If using the eluate from step 10, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

A.2 Bestemmelse av RNA/DNA-konsentrasjon

QUICK REFERENCE



Qubit[®] RNA BR Assay Kit

Rev. Date 13 September 2012

Cat. nos. Q10210, Q10211

Pub. no. MAN0006882

Detailed protocol is available online at www.lifetechnologies.com/manuals, and on the USB drive provided with the Qubit[®] 2.0 Fluorometer.

WARNING! For every chemical, read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from www.lifetechnologies.com/support.

Chemical	CAS	Warning
DMSO	67-68-5	Components of the product may be absorbed into the body through the skin.

1. Set up 2 assay tubes for the standards and 1 tube for each user sample.
2. Prepare 200 μ L of Qubit[®] Working Solution for each standard and sample by diluting the Qubit[®] RNA BR Reagent 1:200 in Qubit[®] RNA BR Buffer.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.



3. Prepare the assay tubes (use 0.5-mL PCR tubes) according to the following table.

Volume	Standards	Samples
Working Solution (from step 2)	190 μ L	180–199 μ L
Standard (from kit)	10 μ L	—
User Sample	—	1–20 μ L
Total in each Assay Tube	200 μ L	200 μ L

4. Vortex standards and samples for 2–3 seconds and incubate at room temperature for 2 minutes.
5. Select **RNA Broad Range Assay** on the Qubit[®] 2.0 Fluorometer to calibrate with standards and read the samples.

Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.lifetechnologies.com/termsandconditions. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.lifetechnologies.com/support.

© 2012 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

For support visit www.lifetechnologies.com/support

www.lifetechnologies.com

A.3 Tilling av cDNA



qScript™ XLT cDNA SuperMix

Cat No.	95161-025	Size:	25 x 20- μ L reactions	(1 x 100 μ L)
	95161-100		100 x 20- μ L reactions	(1 x 400 μ L)
	95161-500		500 x 20- μ L reactions	(2 x 1 mL)

Store at -25°C to -15°C

Description

qScript XLT cDNA SuperMix is a next-generation tool for first-strand cDNA synthesis, providing a highly sensitive and easy-to-use solution for two-step RT-PCR and RT-qPCR. qScript XLT is an engineered M-MLV reverse transcriptase with reduced RNase H activity and improved activity and stability at higher temperatures. Combined with a precise mixture of reaction components, this SuperMix enables superior results over a wide dynamic range of input RNA, with up to 8-fold higher sensitivity than cDNA synthesis kits utilizing an RNase H(+) reverse transcriptase (RT). This 5X concentrated master mix provides all necessary components (except RNA template) for first-strand synthesis including: buffer, dNTPs, MgCl₂, primers, RNase inhibitor protein, qScript XLT reverse transcriptase and stabilizers. The unique blend of oligo (dT) and random primers in the qScript XLT cDNA SuperMix captures unbiased representation of all RNA sequences into cDNA product (including the 5'-end, 3'-end, or central regions of long RNAs) and works exceptionally well with a wide variety of RNA templates. However, due to the relatively short average length of random-primed first-strand product, amplicon length for conventional RT-PCR applications should be limited to 1 kb or less.

Components

qScript XLT cDNA SuperMix 5X reaction buffer containing optimized concentrations of MgCl₂, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), recombinant RNase inhibitor protein, qScript reverse transcriptase, random primers, oligo(dT) primer and stabilizers.

Storage and Stability

Store components in a constant temperature freezer at -25°C to -15°C upon receipt

For lot specific expiry date, refer to package label, Certificate of Analysis or Product Specification Form.

Reaction Assembly

Place components on ice. Mix, and then briefly centrifuge to collect contents to the bottom of the tube before using.

Component	Volume for 20- μ L rxn.	Final Concentration
qScript XLT cDNA SuperMix (5X)	4 μ L	1X
RNA template	variable	(2 μ g to 10 μ g total RNA)
RNase/DNase-free water	<u>variable</u>	
Total Volume (μ L)	20 μ L	

Note: for smaller reaction volumes (i.e. 10- μ L reactions), scale components proportionally.

Reaction Protocol

- Combine reagents in 0.2-mL micro-tubes or 96-well plate sitting on ice.
- After sealing each reaction, vortex gently to mix contents. Centrifuge briefly to collect components at the bottom of the reaction tube.
- Incubate:
 - 5 minutes at 25°C
 - 60 minutes at 42°C*
 - 5 minutes at 85°C
 - Hold at 4°C
- Use 1/10th (or less) of the first-strand product as template for PCR / qPCR amplification. The optimal amount of cDNA for PCR can vary depending on the amount of starting RNA template, choice of detection chemistry, and abundance of the specific target sequence. The high yield of cDNA resulting from reactions containing \geq 500 ng of total RNA can overwhelm detection of specific product by SYBR® Green I qPCR. If required, dilute cDNA product with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA. Store first-strand product at -20°C.

*Note: These conditions are provided as a general guideline and support maximum cDNA yield and sensitivity for global gene expression profiling. Specific applications may benefit from modified reaction conditions. qScript XLT can be used at temperatures up to 54°C for RNA with stable secondary structure(s). However, higher temperatures can compromise cDNA yield for other RNAs. Shorter incubation times (30 min) can be applied when using <500 ng of total RNA template without compromising cDNA yield.



Guidelines for Reverse Transcription-qPCR

Minus RT-controls: Accurate quantification of gene expression by RT-qPCR requires testing and reporting the extent of contamination of genomic DNA in each RNA sample for each gene of interest. The presence of trace amounts of gDNA does not usually interfere with quantification of high copy reference genes. However, it can have a significant contribution on signal for low copy genes. Even when using primers that are separated by intronic sequence or bridge exon junctions, the presence of genomic DNA can produce positive signals from amplification of pseudogene or off-target PCR product. Therefore, it is important to always include the appropriate "no RT" or "minus RT" control reactions in your experimental design.

Since the reverse transcriptase is an integral component of qScript XLT cDNA SuperMix, it is not feasible to construct a formal cDNA synthesis control that includes all components except the RT. The most direct method to test for the presence of genomic DNA is to bypass the RT step and use an equivalent amount of the RNA preparation directly for PCR amplification. For example: if you start with 1 µg of total RNA for cDNA synthesis and use 1/10th of the first-strand reaction as template for qPCR; then use 100 ng of total RNA as template for the minus RT-control qPCR. Any signal from the RNA only reaction is attributable to the presence of genomic DNA.

DNase digestion of total RNA: Trace levels of genomic DNA can obscure accurate quantification, particularly when the specific gene(s) of interest are low copy. PerfeCTa® DNase I is a high purity, recombinant DNase I preparation that is free of any contaminating RNases. It provides a simple and rapid solution to eliminate residual genomic DNA that is directly compatible with qScript XLT cDNA SuperMix, or other first-strand synthesis kits. The supplied Reaction Buffer and proprietary Stop Buffer support a simple heat-kill step that permanently inactivates all trace levels of DNase activity before the cDNA synthesis step. Heat-kill procedures used by other DNase I reagents are ineffective and not compatible with qScript XLT cDNA SuperMix. Residual, or renatured, DNase will degrade cDNA product and alter apparent expression levels. If using other sources of RNase-free DNase I, it is essential to remove all traces of DNase activity before proceeding with first-strand synthesis. Suitable RNA purification methods include phenol:chloroform extraction followed by ethanol precipitation, or the use of chaotropic salts and a silica-based RNA purification cartridge or column. Please call technical support at (800) 364-2149 or visit our web site at www.quantabio.com if you require additional information or protocols.

Quality Control

Kit components are free of contaminating DNase and RNase. qScript XLT cDNA SuperMix is functionally tested in reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). First-strand synthesis is performed in triplicate on each dilution of a log-fold serial dilution of HeLa cell total RNA from 1 pg to 1 µg. One-tenth of each first-strand reaction is used for qPCR amplification. Kinetic analysis must demonstrate linear resolution over five orders of dynamic range ($r^2 > 0.990$) and a PCR efficiency $> 90\%$.

Limited Label Licenses

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this manual and for use with components contained in the kit only. QIAGEN Beverly, Inc. grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this manual, and additional protocols available at www.quantabio.com. Some of these additional protocols have been provided by Quantabio product users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN Beverly, Inc.. QIAGEN Beverly, Inc. neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN Beverly, Inc. makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN Beverly, Inc. specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN Beverly, Inc. may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

This product is covered by US patent 7,470,515, US patent 7,638,612 and other patents pending in the United States and Europe. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer. The buyer is not authorized to sell or otherwise transfer this product, any of its components to a third party. The purchase of this product does not authorize the purchaser to use the product or any of its components for manufacture of commercial product. For information on obtaining a license to this product for purposes other than research, contact Licensing Department, QIAGEN Beverly, Inc. 100 Cummings Center Suite 407J Beverly, MA 01915; Telephone number: 1-800-364-2149.

©2018 QIAGEN Beverly Inc. 100 Cummings Center Suite 407J Beverly, MA 01915

Quantabio brand products are manufactured by QIAGEN, Beverly Inc.

Intended for molecular biology applications. This product is not intended for the diagnosis, prevention or treatment of a disease.

Related Products

PerfeCTa DNase I, Cat. No. 95150-01K

qScript is a trademark of QIAGEN Beverly, Inc.. PerfeCTa is a registered Trademark of QIAGEN Beverly, Inc. SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

A.4 Amplifisering av målgen (qPCR på cDNA)

PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

Universal 2X master mix for real-time PCR workflows

Catalog Numbers A25741, A25742, A25743, A25776, A25777, A25778, A25779, A25780, A25918

Pub. No. MAN0028468 Rev. B.0

Note: For safety and biohazard guidelines, see the “Safety” appendix in the following product documentation: *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0013511). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

This Quick Reference is intended as a benchtop reference for experienced users of PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. For detailed instructions, supplemental procedures, and troubleshooting, see the *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0013511).

Guidelines

Input DNA template requirements

Use 1–10 ng single-stranded cDNA or 10–100 ng gDNA per reaction.

IMPORTANT! In some cases, cDNA generated with the SuperScript™ IV VILO™ Master Mix is not compatible with the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. It can result in a high background signal. To ensure consistent results across different samples and assays, we recommend a different reverse transcription kit.

For kits recommended for reverse transcription of RNA to cDNA, see *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide* (Pub. No. MAN0013511).

If you use SuperScript™ IV VILO™ Master Mix and your results do not show a high background signal with your assay and sample, you can continue to use the SuperScript™ IV VILO™ Master Mix and the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix.

PCR reactions

- Four replicates of each reaction are recommended.
- Reaction mixes can be prepared depending upon experimental requirements. Scale the components according to the number of reactions and include 10% overage.
- If using smaller reaction volumes, scale all components proportionally. Reaction volumes <10 µL are not recommended.

NTC controls

No template control (NTC) reactions can be used to identify PCR contamination. NTC reactions contain all reaction components (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, primers, water) except sample, and therefore should not return a C_t value.

Methods

Set up the PCR reactions

1. Prepare the appropriate number of reactions, plus 10% overage.

Component	Volume (10 µL/well)	Volume (20 µL/well)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X)	5 µL	10 µL
Forward and reverse primers ^[1]	Variable	Variable
DNA template + Nuclease-Free Water ^[2]	Variable	Variable
Total	10 µL	20 µL

^[1] For optimal performance in Fast and Standard modes, use 300–800 nM for each primer.

^[2] Use 1–10 ng cDNA or 10–100 ng gDNA for each reaction.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

- Mix the components thoroughly, then centrifuge briefly to spin down the contents and eliminate any air bubbles.
- Transfer the appropriate volume of each reaction to each well of an optical plate.
- Seal the plate with an optical adhesive cover, then centrifuge briefly to spin down the contents and eliminate any air bubbles.

PCR can be performed on the reaction plate up to 24 hours after completing the set-up, when stored at room temperature.

Set up and run the real-time PCR instrument

- Place the reaction plate in the real-time PCR instrument.
- Set the thermal cycling conditions using the default PCR thermal cycling conditions specified in the following tables according to the instrument cycling parameters and melting temperatures of the specific primers.

Note: Standard cycling conditions are recommended for genomic DNA templates. Use only standard cycling conditions for the 7900HT Real-Time PCR Instrument and the 7500 Real-Time PCR Instrument.

Table 1 Fast cycling mode (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$)

Step	Temperature	Time	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	1
Activation (Dual-Lock™ DNA polymerase)	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	1 second ^[1] or 3 seconds ^[2]	40
Anneal/extend	60°C	30 seconds	

^[1] When using a QuantStudio™ Real-Time PCR System or a ViA™ 7 Real-Time PCR System.

^[2] When using a 7500 Fast Real-Time PCR System, 7900HT Fast Real-Time PCR Instrument, StepOnePlus™ Real-Time PCR System, or StepOne™ Real-Time PCR System.

Table 2 Standard cycling mode (primer $T_m \geq 60^\circ\text{C}$)

Step	Temperature	Time	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	1
Activation (Dual-Lock™ DNA polymerase)	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal/extend	60°C	1 minute	

Table 3 Standard cycling mode (primer $T_m < 60^\circ\text{C}$)

Step	Temperature	Time	Cycles
UDG activation	50°C	2 minutes	1
Activation (Dual-Lock™ DNA polymerase)	95°C	2 minutes	1
Denature	95°C	15 seconds	40
Anneal	55–60°C ^[1]	15 seconds	
Extend	72°C	1 minute	

^[1] Anneal temperature should be set to the melting point for your primers.

- Set the instrument to perform a default dissociation step.

A dissociation step can be performed up to 72 hours after the real-time PCR run if the plate is stored in the dark and up to 24 hours after the real-time PCR run if the plate is exposed to light.

Table 4 Dissociation curve conditions (melt curve stage)

Step	Ramp rate	Temperature	Time
1	1.6°C/second	95°C	15 seconds
2	1.6°C/second	60°C	1 minute
3 ^[1]	0.15°C/second	95°C	15 seconds

^[1] Dissociation

Use the following settings for Applied Biosystems™ instruments:

- Experiment type: Standard curve
- Reagent: SYBR™ Green reagents
- Reporter: SYBR™
- Quencher: None
- Passive reference dye: ROX™
- Ramp speed: Standard or fast (choose the same setting as in step 2)
- Melt curve ramp increment: Continuous

4. Set the reaction volume appropriate for the type of plate being used for your PCR reaction.

5. Start the run.

Analyze results

1. View the amplification plots.
2. Calculate the baseline and threshold cycles (C_T) for the amplification curves using the instrument software.
3. Check for nonspecific amplification using dissociation curves.
4. Perform relative or absolute quantitation.



Thermo Fisher Scientific Baltics UAB | V.A. Graiciuno 8, LT-02241 | Vilnius, Lithuania

For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to [thermofisher.com/symbols-definition](https://www.thermofisher.com/symbols-definition).

Revision history: Pub. No. MAN0028468

Revision	Date	Description
B.0	19 January 2023	Information was added about the compatibility of the SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix with the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix ("Input DNA template requirements" on page 1).
A.0	6 October 2022	New document for the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix. This document replaces 100031508, Rev. D, with the following edits: <ul style="list-style-type: none">• Information was added to indicate that cDNA generated with the SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix is not compatible with the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix.• The instruments in the instructions to set up and run the real-time PCR instrument were updated.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: This product may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of this product, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

[thermofisher.com/support](https://www.thermofisher.com/support) | [thermofisher.com/askaquestion](https://www.thermofisher.com/askaquestion)

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)

19 January 2023

ThermoFisher
SCIENTIFIC

