



Analýza jednotlivých buněk: Cesta k heterogenitě

Vendula Rusňáková

wendula.rusnakova@img.cas.cz

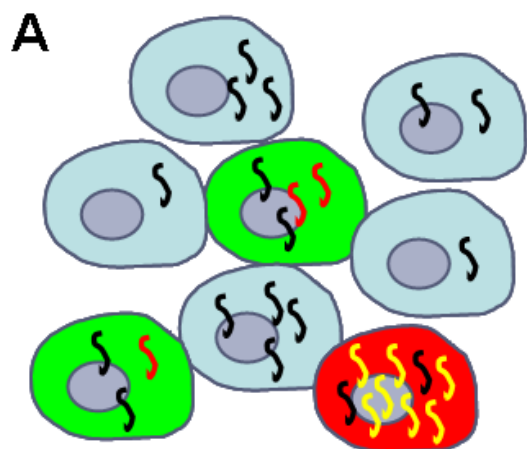
Laboratoř genové exprese BTÚ
TATAA Biocenter Praha



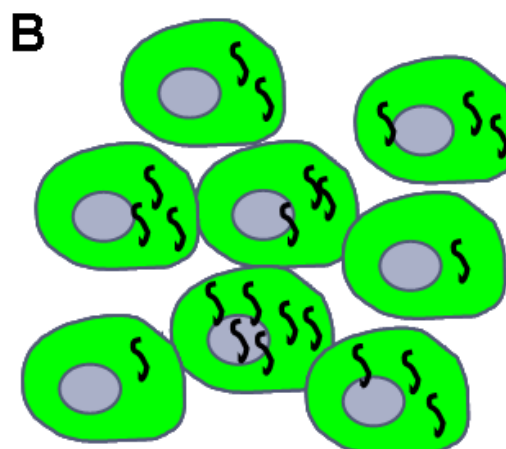
Obsah

- Motivace: Proč studovat jednotlivé buňky?
- Jak na to
- Úskalí a na co si dát pozor
- Astrocyty
- Analýza astrocytů
 - Experiment
 - Vyhodnocení
- Závěr

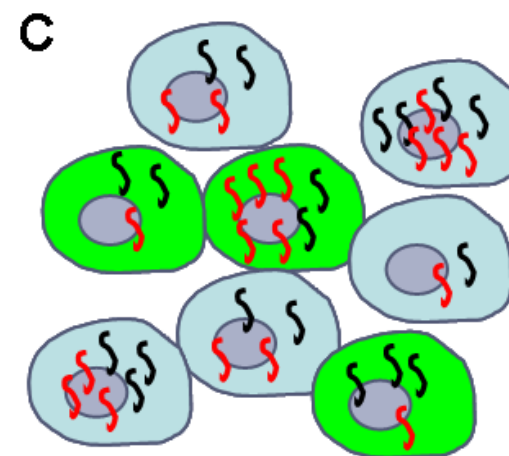
Motivace: Proč studovat jednotlivé buňky?



Různé typy buněk
v tkáni



Heterogenita uvnitř
jediného typu
buněk



Hledání korelace
různých genů mezi
sebou

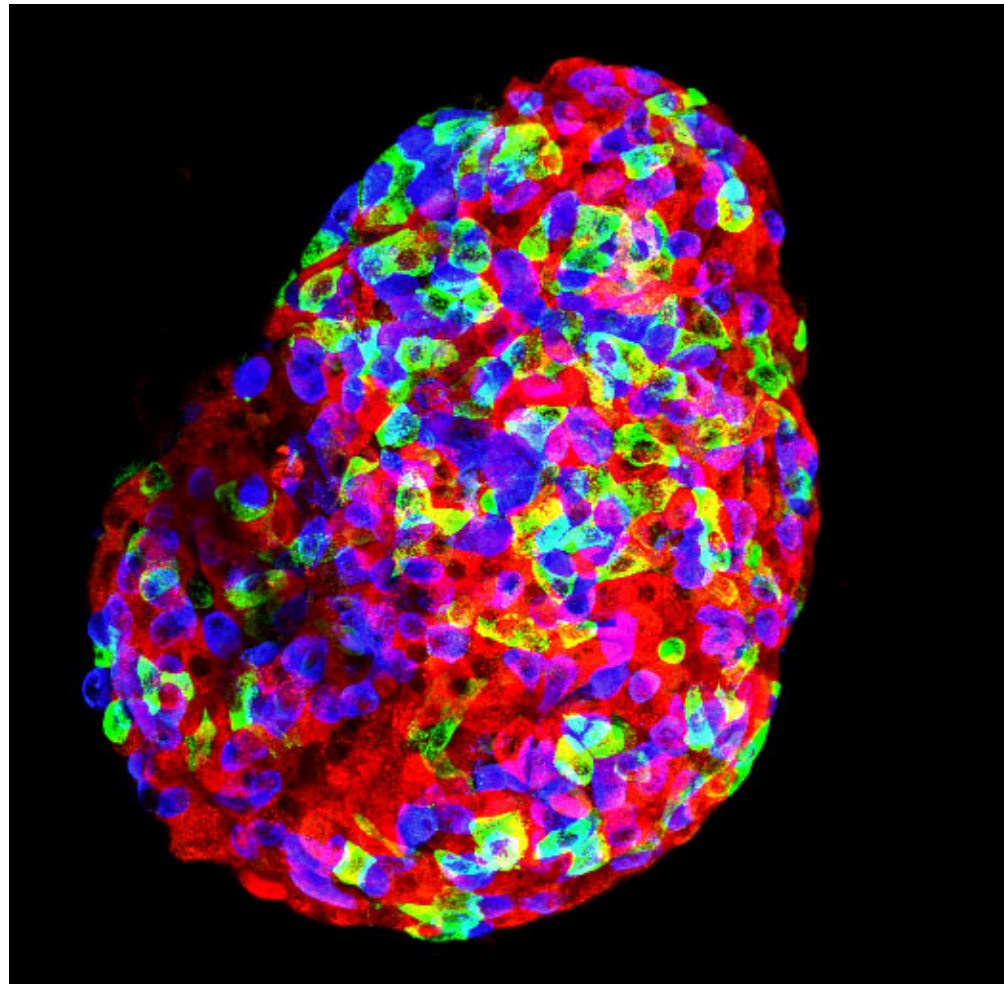
Motivace: Různé typy buněk

Langerhansovy
ostrůvky

δ buňky (<5 %)

α buňky (20
%)

β buňky (75 %)



Jak na to



- FACS
- Laserová mikrodisekce
- Mikro-manipulátor

- Purifikace
- Detergenty
- Zahřátí
- Osmoticky
- Mechanicky

- Reverzní transkriptasa
- Teplotní profil
- Preamplifikace
- Priming

- Mastermix
- Teplotní profil
- Preamplifikace
- Priming
- Detekce

- Normalizace
- Kvalita dat
- Statistika

Stahleberg et al., Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR., Methods., 2010,

Úskalí a na co si dát pozor: sběr buněk a lýze

Sběr buněk

➤ FACS

- odpaření lyzačního pufru
- správné vycentrování
- výběr správné oblasti buněk

➤ Mikromanipulátor

- změna lyzačního objemu
- separace buněk
- doba sběru

➤ Laserová mikrodisekce

- možná následná inhibice

Lýze

- neměnit teploty lyzátu

Úskalí a na co si dát pozor: RT a qPCR

Reverzní transkripce

- Minimální objem reakce
- Účinná reverzní transkriptasa

qPCR

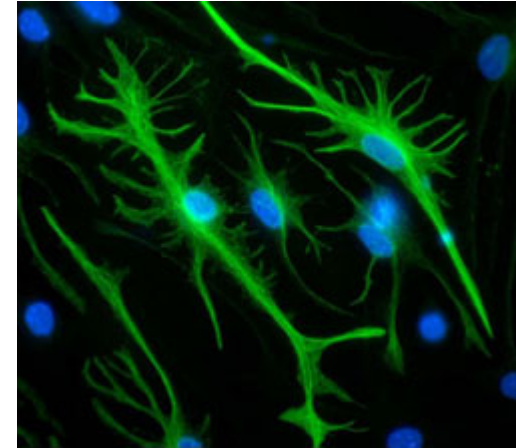
- Navržení assay
 - účinnost > 90-95 %
 - přes intron
 - kontrola LOD
 - žádné primery dimery do 45. cyklu
- Reakce
 - kontrola křivek tání
 - replikáty?
 - snaha o změření co nejvíce genů

Úskalí a na co si dát pozor: Analýza

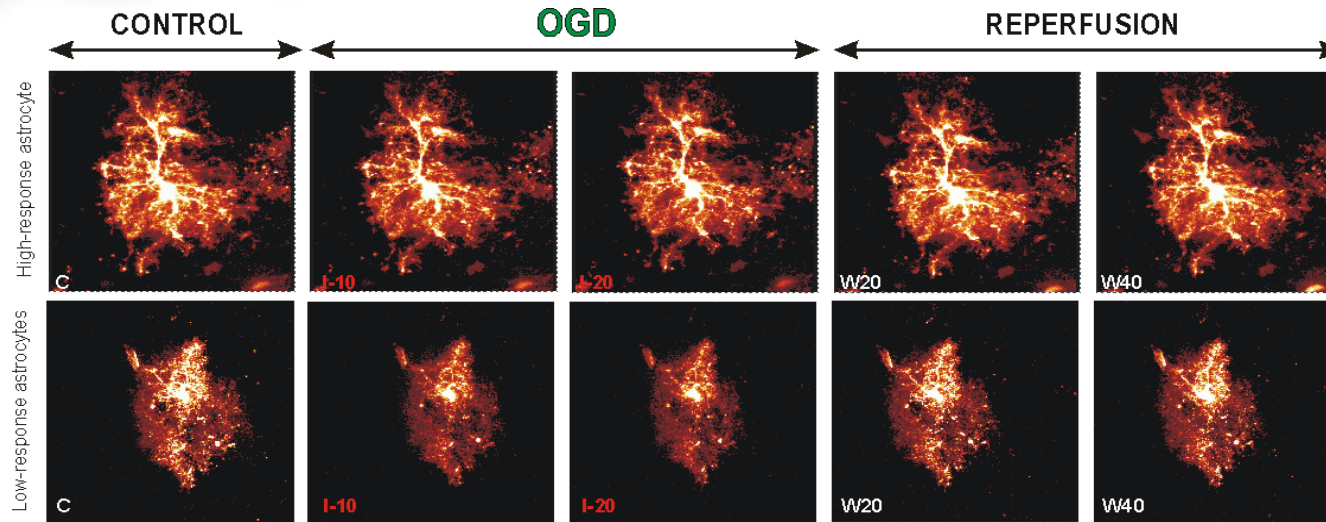
- Chybějící data
 - nahrazení (průměr replikátů, nejvyšší Cq +1)
- Normalizace
 - spike
 - referenční gen
 - mean-centrování
- Deskriptivní statistika
- Korelace
- Multivariantní analýza

Astrocyty

- Hvězdovitý tvar, nachází se v centrální nervové soustavě
- Typický marker intermediární filamentum, GFAP
- Funkce
 - strukturní, obklopují neurony
 - zajišťují výživu buněk
 - obsahují transportery pro neurotransmitery
 - kontrolují extracelulární koncentraci K^+ iontů
 - podílejí se na opravě CNS

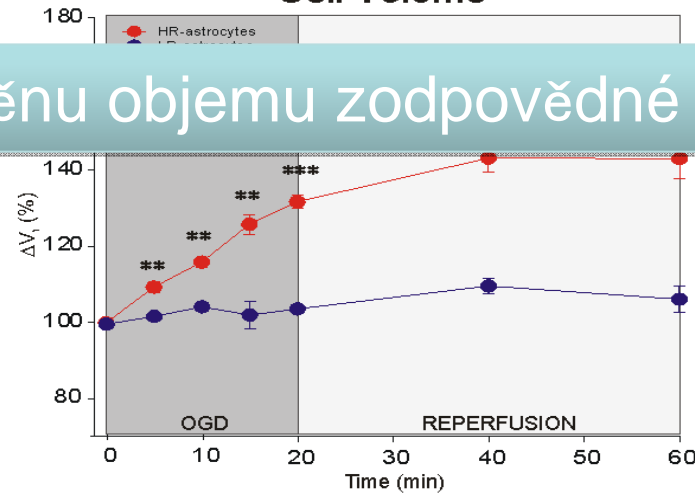


Astrocyty: Existují dvě populace?



Cell Volume

Jsou za změnu objemu zodpovědné iontové kanály?



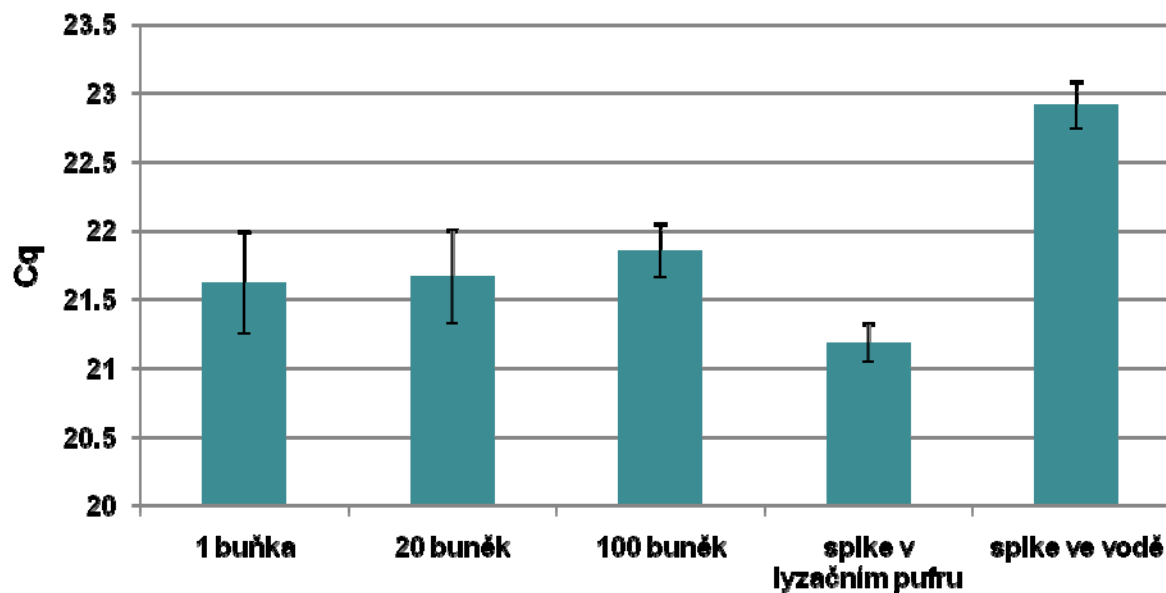
Změna objemu buňky při nedostatku kyslíku a glukosy (Oxygen-glucose deprivation)

Analýza astrocytů: Experiment

- Disociace tkáně na jednotlivé buňky
- Sběr buněk do lyzačního pufru
 - Real-Time Ready Cell lysis kit, Roche
- Reverzní transkripce
 - Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche
- qPCR: měřeno 10 genů
 - transportéry pro glutamát
 - draselné a chloridové kanály
 - ATPasa
 - spike
- Pre-processing
- Analýza

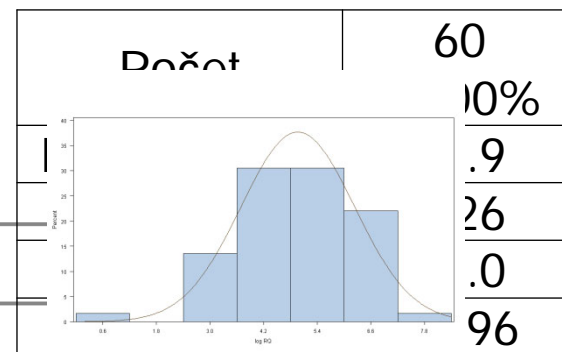
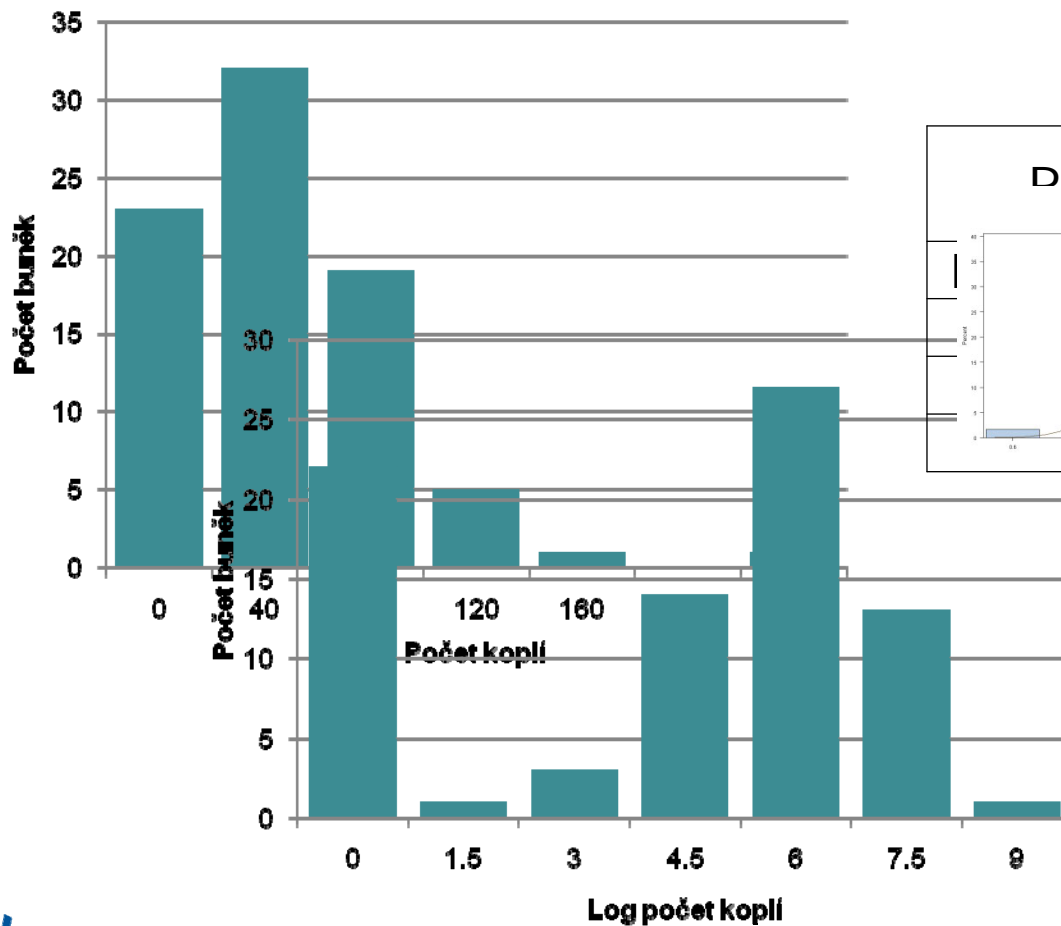


Analýza astrocytů : Kontrola inhibice v reverzní transkripci



	1 buňka	20 buněk	100 buněk	spike v lyzačním pufru	spike ve vodě
Průměr	21.62	21.66	21.85	21.18	22.91
SD	0.37	0.34	0.19	0.14	0.17
Min	21.09	21.33	21.86	21.04	22.76
Max	22.83	22.31	22.26	21.34	23.09

Analýza astrocytů: Referenční gen

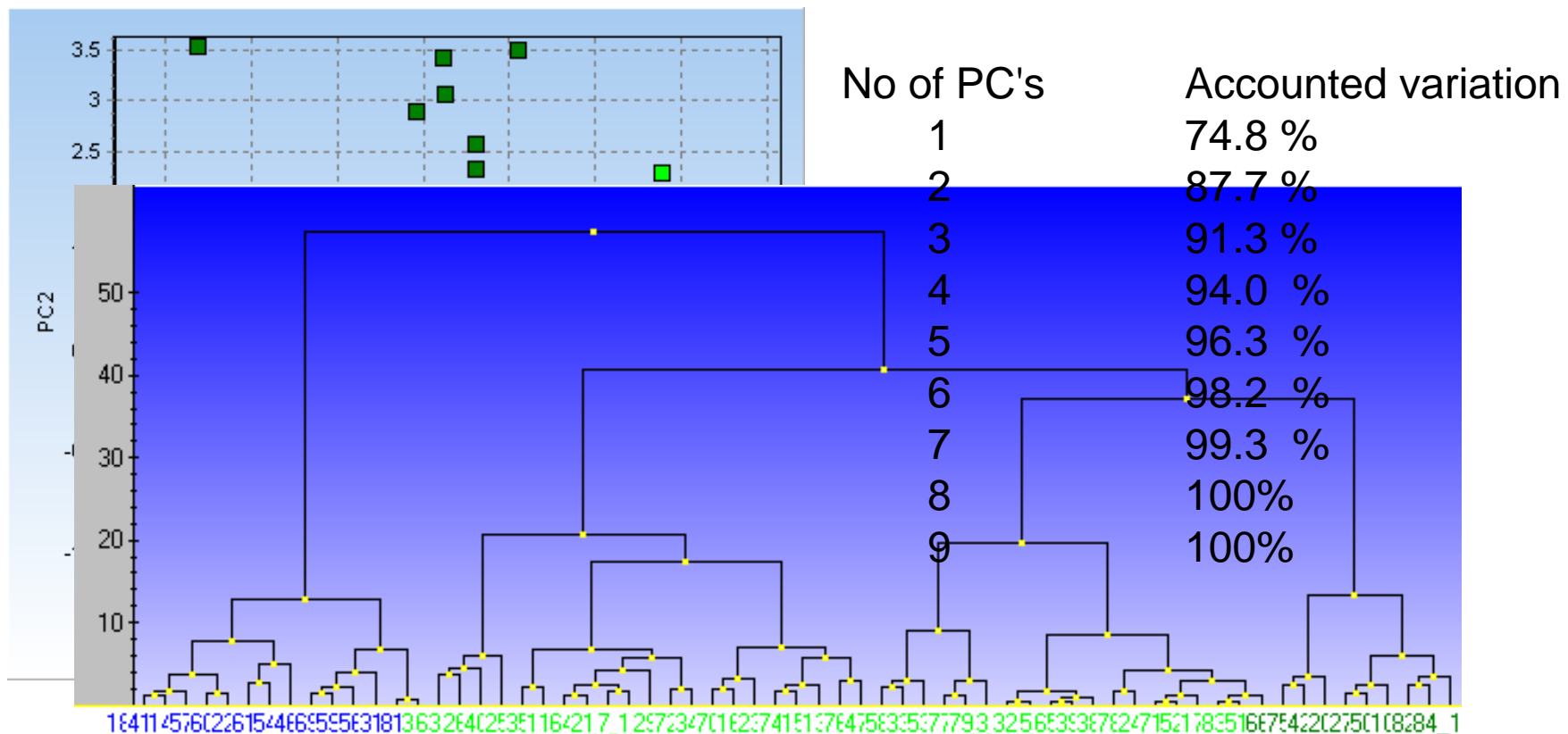


Analýza astrocytů: Deskriptivní statistika

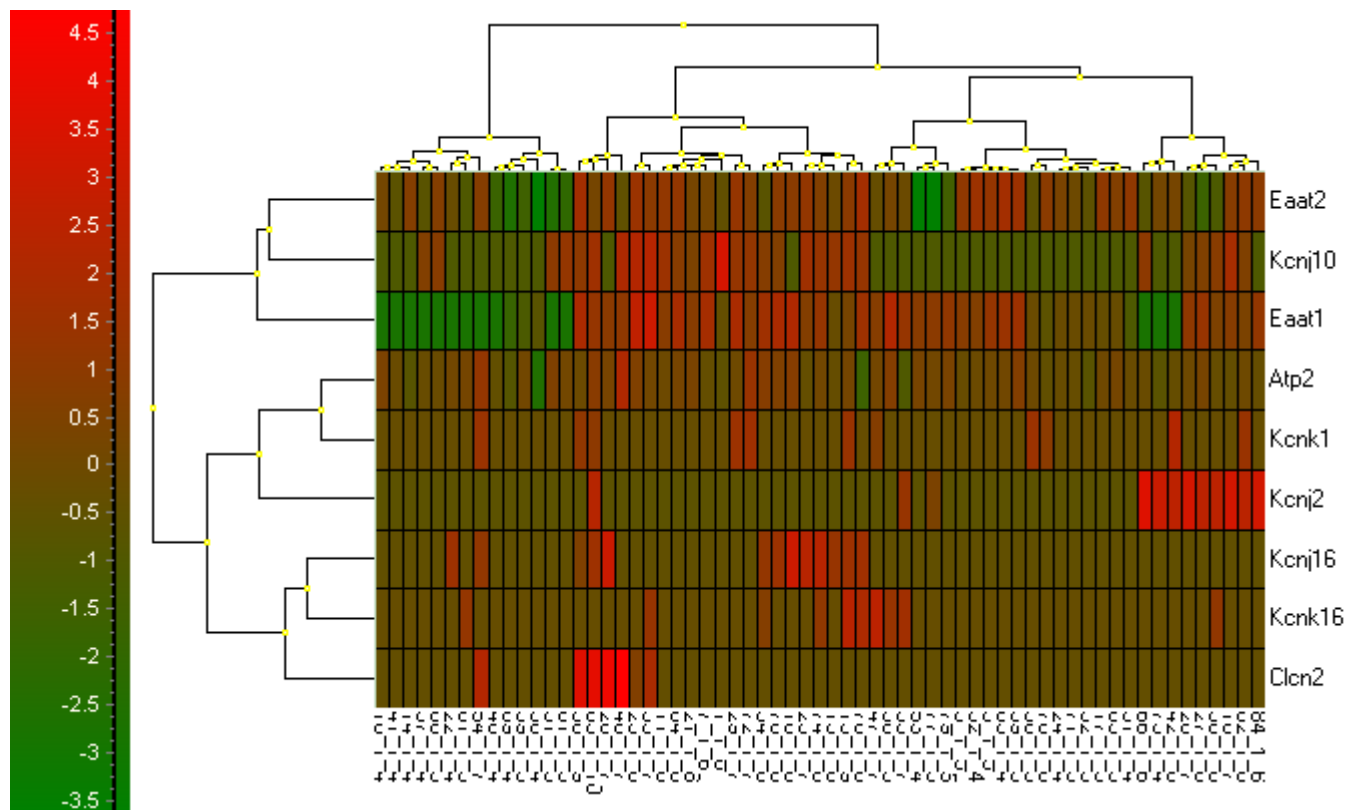
all cells									
	Atp2	Clcn2	Kcnj16	Eaat1	Eaat2	Kcnj10	Kcnj2	Kcnk1	Kcnk16
count	80.00	8.00	14.00	51.00	62.00	33.00	14.00	12.00	13.00
	95%	10%	17%	61%	74%	39%	17%	14%	15%
avg	31.32	35.10	34.42	34.06	33.07	35.40	33.89	35.20	34.50
sd	0.98	1.46	0.76	1.08	1.19	0.79	1.11	0.57	0.60
min	28.99	33.46	33.02	31.68	30.30	33.05	31.63	34.01	33.56
max	37.28	37.73	35.67	36.79	36.10	36.76	36.30	36.00	35.46

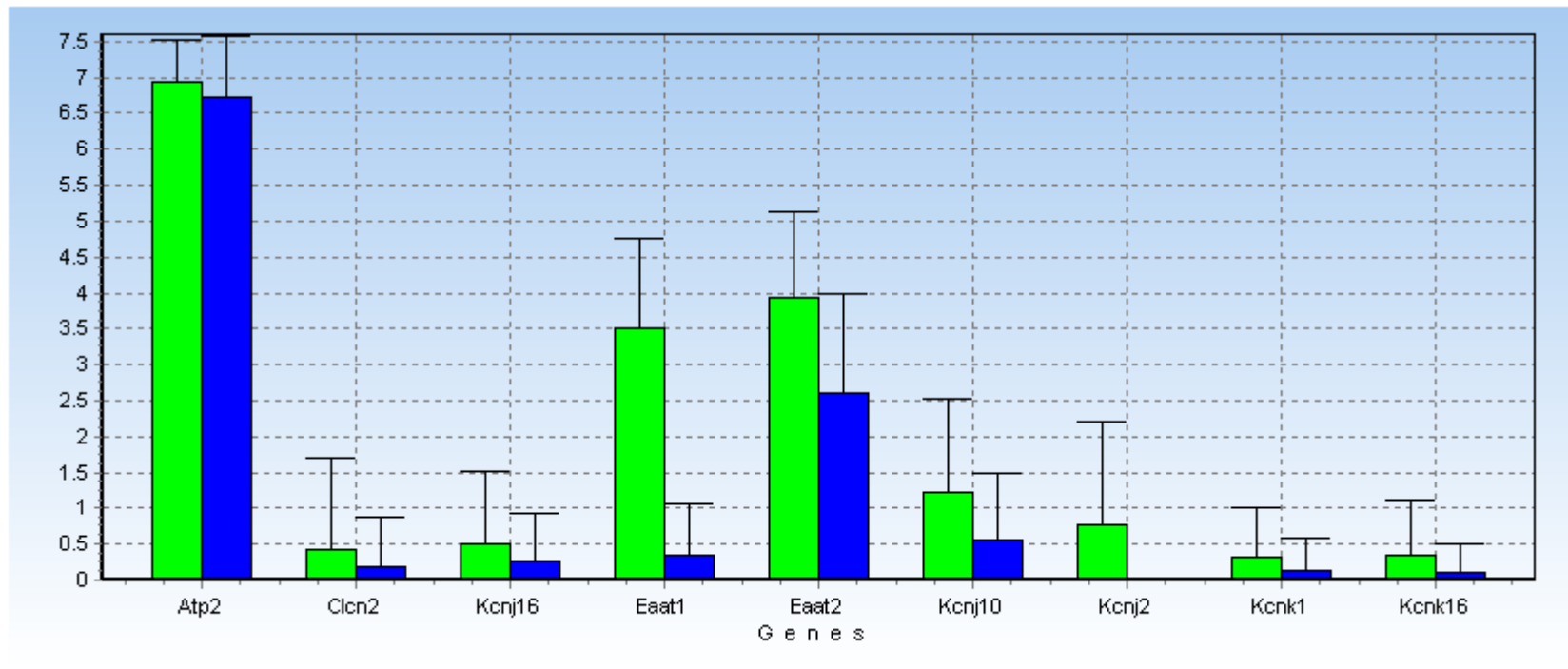
astrocytes									
	Atp2	Clcn2	Kcnj16	Eaat1	Eaat2	Kcnj10	Kcnj2	Kcnk1	Kcnk16
count	64.00	8.00	14.00	51.00	62.00	30.00	13.00	12.00	11.00
	98%	12%	22%	78%	95%	46%	20%	18%	17%
avg	31.17	35.10	34.42	34.06	33.07	35.30	33.96	35.20	34.51
sd	0.68	1.46	0.76	1.08	1.19	0.74	1.12	0.57	0.65
min	28.99	33.46	33.02	31.68	30.30	33.05	31.63	34.01	33.56
max	33.81	37.73	35.67	36.79	36.10	36.41	36.30	36.00	35.46

Analýza astrocytů: Multivariantní analýza



Analýza astrocytů: Multivariantní analýza





Závěr

- Práce se single cells vyžaduje optimální podmínky
- Pro kvalitní výsledky je nutné analyzovat velké množství buněk
- Multivariantní analýza se ukazuje jako nejvhodnější nástrojem pro analýzu single cells

SYMPOSIUM - EXHIBITION - WORKSHOPS

DEVELOPMENTS IN REAL-TIME PCR

From Preanalytics to Molecular Diagnostics

June 13th-June 17th 2011 Prague, Czech Republic

Symposium Highlights June 14th-15th

- Preanalytics - Sample preparation, extraction and purification
- Standardization and quality control; MIQE Guidelines
- Experimental design and data analysis
- Molecular diagnostics of complex diseases, detection and profiling of circulating tumor cells
- High throughput expression profiling
- Digital PCR and copy number variations
- Epigenetics and mutation analysis
- Single cell expression and profiling
- MicroRNAs and non-coding RNAs

Workshops June 13th, 16th-17th

- Introduction to Real-Time qPCR
- Hands-on qPCR
- Experimental design and statistical data analysis for qPCR
- Sample preparation and quality control
- Invited speakers course – Come and meet the experts in the field!

Key Speakers

- Klaus Pantel
- Uwe Oelmüller
- Mikael Kubista

Register at www.qpcrsymposium.eu

Students purchasing a workshop spot attend the conference free of charge
For more information and exhibition availability contact symposium@tataa.com



tataabiocenter

