



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

### Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR

### QRT-PCR – IZOLACE RNA A REVERZNÍ TRANSKRIPCE

#### IZOLACE CELKOVÉ RNA (Sigma-Aldrich, Mammalian Total RNA Miniprep Kit, RTN-70)

1. Centrifugovat buňky (1500 rpm/5 min.)
2. Odstranit médium a promýt buňky 1 x PBS
3. Centrifugovat buňky (1500 rpm/5 min.)
4. Odstranit PBS
5. Lyzovat buňky přidáním 500 $\mu$ l **Lysis Solution/2-ME**
6. Nanést lyzát na filtrační kolonku (modré kolonky)
7. Cfg. 12000 rpm/2 min
8. Přidat k filtrátu 500 $\mu$ l 70% EtOH
9. Nanést po 700 $\mu$ l na izolační kolonku (bílá s červeným pruhem)
10. Cfg. 12000 rpm/15 sec. Filtrát odstranit
11. Nanést na kolonku 500 $\mu$ l **Wash Solution 1**
12. Cfg. 12000 rpm/15 sec. Filtrát odstranit
13. Přenést kolonku do čisté mikrozkuřavky
14. Nanést na kolonku 500 $\mu$ l **Wash Solution 2**
15. Cfg. 12000 rpm/15 sec. Filtrát odstranit
16. Nanést na kolonku 500 $\mu$ l **Wash Solution 2**
17. Cfg. 12000 rpm/2 min. Filtrát odstranit
18. Cfg. 12000 rpm/1 min.
19. Přenést kolonku do čisté mikrozkuřavky a eluovat RNA 50 $\mu$ l **Elution Solution**

#### IZOLACE mRNA (Roche, mRNA Isolation Kit)

1. Centrifugovat buňky (1500 rpm/5 min.)
2. Odstranit médium a promýt buňky 1 x PBS
3. Centrifugovat buňky (1500 rpm/5 min.)
4. Odstranit PBS
5. Lyzovat buňky přidáním 400 $\mu$ l **Lysis Buffer**
6. Homogenizovat injekční jehlou
7. Imobilizovat 300  $\mu$ l **SMP** a promýt 500  $\mu$ l **Lysis Buffer** (odstranit **Storage Buffer**)
8. Imobilizovat **SMP** a **Lysis Buffer** odstranit
9. K lyzátu přidat 3  $\mu$ l biotinylovaných **odT** a resuspendovat v takto připravené hybridizační směsi promyté **SMP**
10. Inkubovat kompletní hybridizační směs 5 min/37 $^{\circ}$ C
11. Imobilizovat **SMP** (cca 3 min)
12. Promýt **SMP** 500 $\mu$ l **Wash Buffer**
13. Imobilizovat **SMP**
14. Promýt **SMP** 500 $\mu$ l **Wash Buffer**
15. Imobilizovat **SMP**
16. Promýt **SMP** 500 $\mu$ l **Wash Buffer**
17. Imobilizovat **SMP**
18. Pečlivě odstranit **Wash Buffer**
19. Přidat 50 $\mu$ l **Redist. Water**
20. Inkubovat 2 min/65 $^{\circ}$ C
21. Separovat **SMP** a odebrat supernatant

Stanovit c [ng/ $\mu$ l], A260/A280, A260/A230, vyhodnotit celé absorpční spektrum



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

### REVERZNÍ TRANSKRIPCE (Roche, Transcriptor RT)

1. 1 µg celkové RNA nebo 250ng mRNA s 2 µl RH nebo 1 µl odT v celkovém objemu 13 µl inkubovat 10 min/ 65°C. Po skončení inkubace okamžitě přenést na led.
2. Reakci doplnit podle tabulky
3. Inkubovat 30 min/55°C. V případě RH předřadit annealingový krok 10 min/25°C
4. Inkubovat 5 min/85°C
5. Archivovat -25°C nebo méně

Tab. Reakční směs RT

Denaturovaná směs RNA + primerů	13 µl
RT Buffer	4 µl
RNAse inhibitor	0,5 µl
dNTPs	2 µl
Transcriptor RT	0,5 µl
Celkem	20 µl