



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### QRT-PCR – KALIBRAČNÍ KŘIVKY

1. Sériově naředit cDNA – 10X; do reakce 2 $\mu$ l, 6 datových bodů  
**mRNA** (12,5ng/ $\mu$ l):

jednotlivé reakce budou obsahovat:

25ng (bez ředění), 2,5ng, 0,25ng, 25pg, 2,5 pg, 0,25 pg

**celková RNA** (50ng/ $\mu$ l):

jednotlivé reakce budou obsahovat:

100ng (bez ředění), 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1 pg

2. Připravit mastermix pro požadovaný počet reakcí (viz tab. 1)

Tab. 1. Složení reakce s Taq-Man sondami

	Objem [ $\mu$ l]	
	1x	25x
<b>2x TQ Gene Expression Master Mix</b>	12,5	312,5
<b>20x TQ Gene Expression Assay (cycD1– FAM)</b>	1,25	31,25
<b>20x TQ Endogenous Control (GAPDH – VIC)</b>	1,25	31,25
<b>cDNA</b>	2	-
<b>PCR voda</b>	8	200

3. Do každé jamky na 96 jamkové destičce pipetovat 23 $\mu$ l takto připraveného mastermixu (triplikáty)
4. Do každé jamky nepipetovat 2 $\mu$ l cDNA odpovídajícího ředění
5. Do jamek sloužících jako *No Template Control* napipetovat 2 $\mu$ l PCR vody.
6. Provést qRT-PCR, po skončení běhu stanovit Treshold a jednotlivé Cts
7. Vypočítat účinnost PCR z grafu log. ředění vs. Ct



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### QRT-PCR – OPTIMALIZACE KONCENTRACE PRIMERŮ PRO ANALÝZU POMOCÍ SYBR GREEN

Cílem je otestovat, která z kombinací koncentrací primerů bude nejvhodnější (nízké Ct, absence nespecifické amplifikace)

Reverse Primer (nM)	Forward Primer (nM)		
	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### Postup:

1. Zředit zásobní roztok primerů (GAPDH, 100 $\mu$ M) na výslednou koncentraci 5 $\mu$ M a 2,5 $\mu$ M\*
2. Podle tabulky připravit a rozpipetovat 96 jamkovou destičku

	Objem [ $\mu$ l]	
<b>2x Power SYBR Green Master Mix</b>	12,5	
<b>Reverse primer</b>	různá	50-900nM
<b>Forward primer</b>	různá	50-900nM
<b>cDNA</b>		25ng
<b>PCR voda</b>	různá	

Wells	2x Power SYBR Green Master Mix	5 $\mu$ M (2,5 $\mu$ M *) Forward Primer	5 $\mu$ M (2,5 $\mu$ M *) Reverse Primer	Templát	PCR voda	Finální objem
A1–A2	12,5	0,5*	0,5*	2,5	9,0	25
A3–A4	12,5	0,5*	1,5	2,5	8,0	25
A5–A6	12,5	0,5*	4,5	2,5	5,0	25
B1–B2	12,5	1,5	0,5*	2,5	8,0	25
B3–B4	12,5	1,5	1,5	2,5	7,0	25
B5–B6	12,5	1,5	4,5	2,5	4,0	25
C1–C2	12,5	4,5	0,5*	2,5	5,0	25
C3–C4	12,5	4,5	1,5	2,5	4,0	25
C5–C6	12,5	4,5	4,5	2,5	2,0	25
D1–D2	12,5	0,5*	0,5*	0	11,5	25
D3–D4	12,5	0,5*	1,5	0	10,5	25
D5–D6	12,5	0,5*	4,5	0	7,5	25
E1–E2	12,5	1,5	0,5*	0	10,5	25
E3–E4	12,5	1,5	1,5	0	9,5	25
E5–E6	12,5	1,5	4,5	0	6,5	25
F1–F2	12,5	4,5	0,5*	0	7,55	25
F3–F4	12,5	4,5	1,5	0	6,5	25
F5–F6	12,5	4,5	4,5	0	3,5	25