



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR

Izolace celkové RNA

RNeasy Mini kit (qiagen)

Přidat β -merkaptoetanol: 10 μ l na 1 ml RLT pufru

1. Každý vzorek rozsuspendovat v 1200 μ l RLT pufru, vortexovat
2. **v případě buffy coatu nechat 1 hodinu stát při RT, vortexovat**
3. Každý vzorek cfg přes 1 QIA Shredder
4. centrifugace 2 min/ max rychlost (14.5000 rpm)
5. Přidat 1 objem 70 % EtOH k supernatantu, promíchat pipetou
6. Pipetovat po 600 μ l na Minispin kolonky
 - o Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
7. Na stejnou Minispin kolonku napipetovat podruhé 600 μ l
 - o Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
8. Přidat 700 μ l RW1 pufru na kolonku
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
9. Přidat 500 μ l RPE pufru na kolonku, rychle převrátit
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
10. Přidat 500 μ l RPE pufru na kolonku, rychle převrátit
 - o centrifugace 2 min / 11000 rpm, slít supernatant
11. Centrifugace 1 min na max rychlost
12. Kolonky umístit do nové 1,5 ml epinky, přidat 40 μ l RNase free vody ke vzorkům
 - o Nechat stát cca 5 min
 - o ctg 1 min / 11000 rpm
13. Změřit koncentraci RNA a čistotu na nanodropu

Měření množství RNA a čistoty na Nanodropu:

Nutné změřit koncentraci, a absorbanci a tzv. Ratio při 260 /280 a 260/230. Obě hodnoty musí být nad 1,5. Jinak je nutné RNA precipitovat.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Reverzní transkripce RNA do cDNA

1. Připravit výchozí množství vzorku tak, aby množství RNA bylo 100ng, doplnit vodou do 10 μ l
2. Připravit Mastermix – 10 μ l, podle přiloženého návodu
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Složka	Množství (μ l)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
Nuclease-free H ₂ O	4,2
Total	10,0

3. Přidat 10 μ l připravených vzorků s RNA
4. udelat no RT kontrolu (žádná reverzní transkriptáza, místo toho voda) a 4 tubicky normalni RT reakce
5. Reverzní transkripce – dle návodu

	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Teplota	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Čas	10 min	120 min	5 min	neomezeně