



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR *18. - 21. ledna 2010*

Izolace celkové RNA

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

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

1. Každý vzorek rozsuspendovat v 1200 μ l RLT pufu, vortexovat
2. Každý vzorek nanést na kolonu QIAshredder umístěnou ve 2 ml zkumavce (*rozdělíme na 2 samostatné shreddery*)
3. Centrifugovat 2 min, max. rychlost (14.5000 rpm)
4. Přidat 1 objem 70% EtOH k supernatantu, promíchat pipetou
5. Pipetovat po 600 μ l na Minispin kolonky
 - o Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
6. Na stejnou Minispin kolonku napipetovat podruhé 600 μ l
 - o Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
7. Přidat 700 μ l RW1 pufu na kolonku
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
8. Přidat 500 μ l RPE pufu na kolonku, rychle převrátit
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
9. Přidat 500 μ l RPE pufu na kolonku, rychle převrátit
 - o centrifugace 2 min / 11000 rpm, slít supernatant
10. Centrifugace 1 min na max rychlost
11. Kolonky umístit do nové 1,5 ml eppendorfky, přidat 40 μ l RNase free vody ke vzorkům
 - o Nechat stát cca 5 min
 - o Centrifugace 1 min / 11000 rpm
12. 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 celkové RNA do cDNA

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

Složka	Množství (µl)
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 µl připravených vzorků s RNA
4. Udelat NO RT (voda místo reverzní transkriptázy) a NO RNA kontrolu (voda místo RNA) +
4 mikrokumavky normální 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR *18. - 21. ledna 2010*

Den 1

Každá skupina provede izolaci RNA z poskytnutého materiálu a pak její zpětnou transkripci do cDNA.

Skupina 1:

- Buněčná linie U937 kultivovaná s TPA
- Buněčná linie U937 kultivovaná bez TPA

pozn.: TPA = 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, označovaný také jako PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)

Skupina 2:

- Buněčná linie U937

Skupina 3:

- Buněčná linie RPMI senzitivní na Velcade
- Buněčná linie RPMI rezistentní vůči Velcade