



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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

QRT-PCR – KALIBRAČNÍ KŘIVKY

1. Sériově naředit cDNA – 10X; do reakce 2 μ l, 6 datových bodů

celková RNA (50ng/ μ 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 [μ l]	
	1x	25x
2x TQ Gene Expression Master Mix	12,5	312,5
20x TQ Gene Expression Assay (cycD1–FAM nebo JUN-FAM)	1,25	31,25
TQ Endogenous Control (GAPDH–VIC)	1,25	31,25
cDNA	2	-
PCR voda	8	200

3. Do každé jamky na 96 jamkové destičce pipetovat 23 μ l takto připraveného mastermixu (triplikáty)

4. Do každé jamky nepipetovat 2 μ l cDNA odpovídajícího ředění

5. Do jedné jamky sloužící jako *No Template Control* napipetovat 2 μ l vzorku NO RNA (po zpětné transkripci bez RNA), do jedné jamky sloužící jako *No RT Control* napipetovat 2 μ l vzorku NO RT (po zpětné transkripci bez reverzní transkriptázy).

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

Postup:

1. Zředit zásobní roztok primerů (GAPDH, 100 μ M) na výslednou koncentraci 5 μ M a 2,5 μ M*
2. Podle tabulky připravit a rozpipetovat 96 jamkovou destičku (hodnoty v tabulce jsou v μ l)

Wells	2x Power SYBR Green Master Mix	5 μ M (2,5 μ M *) Forward Primer	5 μ M (2,5 μ 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



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 2

Skupiny 1 a 3 budou pipetovat do jedné společné destičky. Skupina 2 bude mít k dispozici vlastní destičku.

Skupina 1:

Stanovení kalibrační křivky, výpočet účinnosti PCR.

Optimalizace s TaqMan sondou detekující cyklin D1 (cycD1) bude provedena na buňkách U937 neovlivněných TPA.

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

Skupina 2:

Stanovení optimální koncentrace primerů GAPDH, denaturační křivky.

Využití SYBR Green.

Skupina 3:

Stanovení kalibrační křivky, výpočet účinnosti PCR.

Optimalizace s TaqMan sondou detekující onkogen JUN bude provedena na buňkách RPMI senzitivní na Velcade.