**Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR**

***Den 1***

Úkol č. 1: Izolace celkové RNA z buněčných linií,změřění její koncentrace a čistoty

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Číslo skupiny** | **Buněčná linie** | **S činidlem** | **Bez činidla** |
| 1 | HL-60 | ATRA | 1x |
| 2 | U937 | TPA | 1x |
| 3 | T98G | Temozolomid | 1x |

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

- Přidat β-merkaptoetanol: 10 μl na 1 ml RLT pufru

1. Každý vzorek rozsuspendovat v 1200 μl RLT pufru, vortexovat
2. Každý vzorek nanást 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 μl na Minispin kolonky
   * Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
6. Na stejnou Minispin kolonku napipetovat podruhé 600 μl
   * Centrifugace 15s/11.000 rpm, supernatant odstranit
7. Přidat 700 μl RW1 pufru na kolonku
   * centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
8. Přidat 500 μl RPE pufru na kolonku, rychle převrátit
   * centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
9. Přidat 500 μl RPE pufru na kolonku, rychle převrátit
   * 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 μl RNase free vody ke vzorkům
    * Nechat stát cca 5 min
    * Centrifugace 1 min / 11000 rpm
12. Změřit koncentraci RNA a čistotu na nanodropu (pozor, poměry absorbance při 260/280 nm a 260/230 nm musí být větší než 1,5)

Úkol č. 2: Reverzní transkripce RNA do cDNA

Pro zpětnou transkripci vybrat lepší za dvou vzorků.

U každého vzorku je nutné přepsat také jeho No RT kontrolu.

Transcriptor kit (Roche)

* + 1. 1 μg celkové RNA s 2 μl náhodných hexamerů doplnit vodou na celkový objem 13 μl (na ledu)

|  |  |
| --- | --- |
| RNA | x μl (celkem 1 µg) |
| Random hexamers | 2 μl |
| H2O | Doplnit do 13 μl |
|  |  |

* + 1. Inkubovat 10 min/ 65°C. Po skončení inkubace ochladit na 0°C.
    2. Do každé zkumavky přidat 7 μl mixu podle tabulky (pozor, u No RT kontrol bude mix místo reverzní transkriptázy obsahovat vodu):

|  |  |
| --- | --- |
| RT Buffer | 4 μl |
| RNase inhibitor | 0,5 μl |
| 10 mM dNTPs | 2 μl |
| Reverse transcriptase | 0,5 μl |
|  |  |

* + 1. Pokračovat v inkubaci 25°C / 10 min, 55°C / 30 min, 85°C / 5 min, 0°C / forever
    2. Uložit cDNA v -20°C