**Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR**

***Den 3***

Úkol č. 5: qRT-PCR analýza exprese a vliv inhibitorů na průběh PCR

**Skupina 1 a 3:**

Cíl: Najít rozdíl v expresi cycD1 v buňkách ošetřených nebo neošetřených TPA, případně ATRA, a zjistit, zda přítomnost ethanolu ovlivňuje průběh PCR reakce.

cDNA do reakce – upřesnění podle výsledků kalibračních křivek.

Pracovat v duplexu = v jedné jamce je jak sonda pro cycD1 (FAM), tak pro GAPDH (VIC).

Každý vzorek v triplikátu + NO RNA (přidám vodu) a NO RT kontroly.

Obdobně připravit 2 triplikáty s přidaným ethanolem na úkor vody – do jednoho triplikátu přidat 1 μl a do druhého 0,5 μl čistého ethanolu.

**Skupina 2:**

Skupina SYBR green

Cíl: Stanovit expresi GAPDH pomocí SYBR green a najít rozdíl v expresi cycD1 v buňkách ošetřených nebo neošetřených Temozolomidem.

Složení SYBR green experimentu shodné jako v případě optimalizace primerů - koncentrace primerů určena podle výsledků optimalizace.

Zároveň obdobně jako v případě skupin 1 a 3 najít rozdíl v expresi cycD1 v buňkách ošetřených nebo neošetřených Temozolomidem. Aplikovat 2 μl neředěné cDNA na každou jamku.

Pracovat v duplexu = v jedné jamce je jak sonda pro cycD1 (FAM), tak pro GAPDH (VIC).

Každý vzorek v triplikátu + NO RNA (přidám vodu) a NO RT kontroly.