



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR

Den 1

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

Číslo skupiny	Buněčná linie	S čínidlem	Bez čínidla
1	HL-60	ATRA	1x
2	U937	TPA	1x
3	T98G	Temozolomid	1x

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. 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 pufru na kolonku
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
8. Přidat 500 μ l RPE pufru na kolonku, rychle převrátit
 - o centrifugace 15s / 11000 rpm, slít supernatant
9. Přidat 500 μ l RPE pufru 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 (pozor, poměry absorbance při 260/280 nm a 260/230 nm musí být větší než 1,5)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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
H ₂ O	Doplnit do 13 µl

2. Inkubovat 10 min/ 65°C. Po skončení inkubace ochladit na 0°C.
3. 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

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