**Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR**

***Den 2***

Úkol č. 3: Kalibrační křivky – Taqman sondy

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

- přepsaná cDNA má koncentraci 50 ng/μl (celkový objem je 20 μl)

- cDNA zředit na koncentraci 12,5 ng/μl

- jednotlivé reakce budou obsahovat: 25 ng (bez ředění), 2,5 ng, 0,25 ng, 25 pg,
2,5 pg, 0,25 pg

1. Připravit mastermix pro požadovaný počet reakcí dle tabulky

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Objem [μl]** |
| **1x** | **25x** |
| **2x Gene Expression Master Mix** | 12,5 | 312,5 |
| **Gene Expression Assay (cyclin D1-FAM)** | 1,25 | 31,25 |
| **Endogenous Control (GAPDH–VIC)** | 1,25 | 31,25 |
| **cDNA** | 2 | - |
| **PCR voda** | 8 | 200 |

1. Do každé jamky na 96 jamkové destičce pipetovat 23 μl takto připraveného mastermixu

(triplikáty)

1. Do každé jamky nepipetovat 2 μl cDNA odpovídajícího ředění
2. Do jamek sloužících jako *No Template Control* napipetovat 2 μl PCR vody
3. Provést qRT-PCR, po skončení běhu stanovit Treshold a jednotlivé Cts
4. Vypočítat účinnost PCR z grafu log. ředění vs. Ct

Úkol č. 4: Optimalizace koncentrace primerů pro analýzu pomocí SYBR green

Cílem je otestovat, která z kombinací koncentrací primerů bude nejvhodnější (nízké Ct, absence nespecifické amplifikace)

**Postup:**

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

