



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Bi9310 – Úvod do kvantitativní PCR

## Den 2

### Úkol č. 3: Kalibrační křivky – Taqman sondy

1. Sériově naředit cDNA – 10X; do reakce 2  $\mu$ l, 6 datových bodů
  - přepsaná cDNA má koncentraci 50 ng/ $\mu$ l (celkový objem je 20  $\mu$ l)
  - cDNA zředit na koncentraci 12,5 ng/ $\mu$ l
  - jednotlivé reakce budou obsahovat: 25 ng (bez ředění), 2,5 ng, 0,25 ng, 25 pg, 2,5 pg, 0,25 pg
2. Připravit mastermix pro požadovaný počet reakcí dle tabulky

	Objem [ $\mu$ l]	
	1x	25x
<b>2x Gene Expression Master Mix</b>	12,5	312,5
<b>Gene Expression Assay (cyclin D1-FAM)</b>	1,25	31,25
<b>Endogenous Control (GAPDH-VIC)</b>	1,25	31,25
<b>cDNA</b>	2	-
<b>PCR voda</b>	8	200

3. Do každé jamky na 96 jamkové destičce pipetovat 23  $\mu$ l takto připraveného mastermixu (triplikáty)
4. Do každé jamky nepipetovat 2  $\mu$ l cDNA odpovídajícího ředění
5. Do jamek sloužících jako *No Template Control* napipetovat 2  $\mu$ l PCR vody
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 FONDĚM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

### 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)

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 $\mu$ M) na výslednou koncentraci 5 $\mu$ M a 2,5 $\mu$ M\*
2. Podle tabulky připravit a rozpipetovat 96 jamkovou destičku (hodnoty v tabulce jsou v  $\mu$ l)

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