



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 μ l, 6 datových bodů
 - přepsaná cDNA má koncentraci 75 ng/ μ l (celkový objem je 20 μ l)
 - jednotlivé reakce budou obsahovat: 150 ng (bez ředění), 15 ng, 1,5 ng, 150 pg, 15 pg, 1,5 pg
2. Připravit mastermix pro požadovaný počet reakcí dle tabulky

	Objem [μ l]	
	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

3. Do každé jamky na 96 jamkové destičce pipetovat 23 μ l takto připraveného mastermixu (triplikáty)
4. Do každé jamky nepipetovat 2 μ l cDNA odpovídajícího ředění
5. Do jamek sloužících jako *No Template Control* napipetovat 2 μ 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. Přepsanou cDNA (koncentrace 75 ng/μl) zředit 5x.
2. Zředit zásobní roztok primerů (GAPDH, 100μM) na výslednou koncentraci 5μM a 2,5μM*
3. Podle tabulky připravit a rozpipetovat 96 jamkovou destičku (hodnoty v tabulce jsou v μl)

Wells	2x Power SYBR Green Master Mix	5μM (2,5μM *) Forward Primer	5μM (2,5μM *) 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