



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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 genu zájmu 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 triplicátu + NO RNA (přidám vodu) a NO RT kontroly.

Obdobně připravit 2 triplicáty s přidaným ethanolem na úkor vody – do jednoho triplicátu přidat 1 μ l a do druhého 0,5 μ l čistého ethanolu.

Skupina 2:

Skupina SYBR green

Cíl: Charakterizovat účinek EtOH na průběh a efektivitu qPCR

Složení PCR shodné jako v případě optimalizace primerů - koncentrace primerů určena podle výsledků optimalizace.

Kalibrační křivky: Sériové ředění

1. Ředící varianty: Sériově naředit cDNA – 10X; do reakce 2 μ l, 6 datových bodů
 - přešpaná 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Na destičku připravit dvě varianty kalibračních řad:

1. kontrolní – bez ovlivnění
2. 2% EtOH (zásobní 100%) – na úkor vody v mastermixu

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Kalibrační křivka

množství templátu (ng)	log množství (pg)	průměrná Ct
100	6	16,51
10	5	20,68
1	4	23,73
0,1	3	26,57
0,01	2	29,76
0,001	1	32,99

Výpočet účinnosti reakce: v excelu – formát spojnice trendu, možnosti, zaškrtnou zobrazit rovnici regrese a zobrazit hodnotu spolehlivosti R

$$y = kx + q$$

$$y = -3,2126x + 23,435$$

$$R^2 = 0,9968$$

$$E = 10^{-1/k}$$

$$E = 10^{-1/-3,2126} = 10^{0,311} = \underline{2,046}$$

$$E \% = (2,046 - 1) 100 = \underline{104 \%}$$



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

