

Jméno:

Datum:

PROTOKOL qRT-PCR

1. Zpětná transkripce:

A. Spočítej, kolik ul celkové RNA vašeho vzorku představuje 0,5 ug RNA, který jsme vložili do zpětné transkripce.

Koncentrace RNA DMSO: 339,1 ng/ul

Výsledek:

Koncentrace RNA TCDD: 295,5 ng/ul

Výsledek:

B. Spočítej, jaká je výsledná koncentrace směsi nukleotidů, když do reakce vstupují 2 ul 10 uM směsi nukleotidů a celkový objem je 40 ul.

Výsledek:

C. Spočítej, jaká je výsledná koncentrace směsi nukleotidů, když do reakce vstupují 2 ul 20 uM směsi primeru poly(dT) a celkový objem je 40 ul.

Výsledek:

2. Kvantitativní real time PCR

1. Do každé jamky (**20 ul**) patří:

1,5ul cDNA templátu (DMSO nebo TCDD)

18,5 ul Master mixu:

◆ 3 ul 2xcc Roche - LighCycler 480 SYBR green I master kit (směs nukleotidů, FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR green, MgCl₂)

◆ 0,375 uM každého z primerů (SS 20 uM.... *Vypočítej kolik ul potřebujeme*) Výsledek:

◆ 1,7 ul MgCl₂ (SS 25 mM, *vypočítej výslednou koncentraci*) Výsledek:

◆ Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O

2. Spočítej výsledky (viz výše).

3. Doplň tabulku pro 1 a 4 jamky – 1 gen – 2 vzorky v duplikátu:

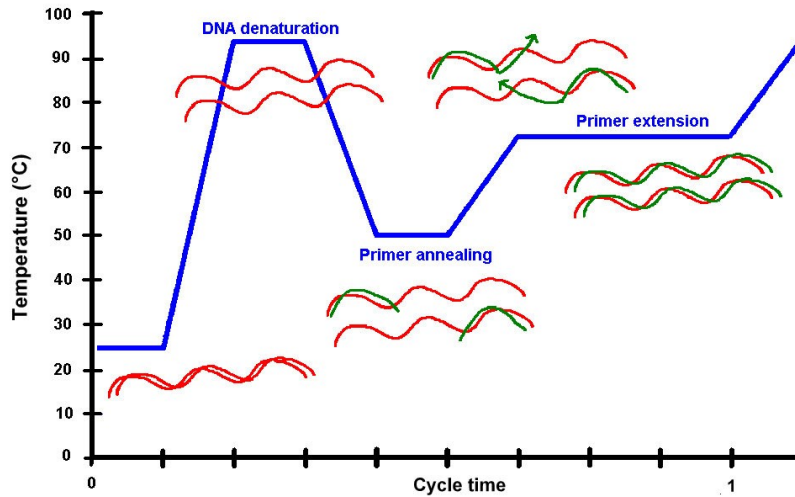
	SYBR green	F(+) primer	R (-) primer	MgCl ₂	H ₂ O
1j					
4j					

=18,5 ul

4. do malé eppendorf zkumavky napipetuj příslušné objemy napočítané pro 4 jamky. Rozděl Master mix do dvou zkumavek odpipetováním 37 ul (jedna zkumavka je pro DMSO, druhá pro TCDD) a přidej do každé 3 ul příslušného cDNA templátu (pracujeme v duplikátu).

5. Všechny složky reakce stále udržuj na ledu!!!!

6. Přepipetuj vzorky do speciální desky pro LightCycler.
7. Spust' kvantitativní real time PCR (LightCycler - Roche)
8. Doplň teploty a délky trvání jednotlivých fází PCR:



9. Doplň kolik cyklů bude reakce trvat:
10. Popiš analýzu „melting curve“ vašeho genu:
11. Popiš, jakým způsobem získáme hodnotu C_p manuálním prahováním pomocí fit pointů:
12. Popiš, jakým způsobem získáme hodnotu C_p pomocí 2. derivativu a srovnej výsledek s 11:

13. Vypočítej relativní množství produktu pro gen.....:

Vzorek	C_p	průměr	HPRT	ΔC_p	$2^{-\Delta C_p}$
DMSO					
TCDD					

14. Srovnej úroveň exprese svého genu s ostatními:

Závěr: