

Jméno:

Datum:

PROTOKOL qRT-PCR

1. Zpětná transkripce:

A. Spočítej, kolik ul celkové RNA vašeho vzorku představuje 1 ug RNA, který jsme vložili do zpětné transkripce.

Koncentrace RNA 0,1% DMSO: 680,35 ng/ul

Výsledek:

Koncentrace RNA 10 nM TCDD: 448,85 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 ul každého z primerů (*SS 20 uM.... Vypočítej výslednou koncentraci*) 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:

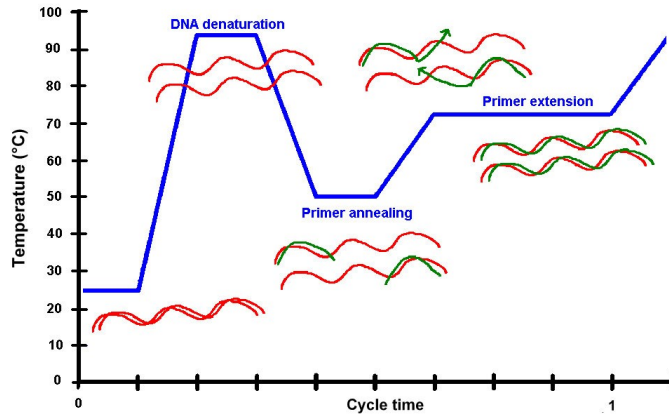
SYBR green		F(+) primer	R (-) primer	MgCl ₂	H ₂ O
1 jamka	3 ul	0,375 ul	0,375 ul	1,7 ul	13,05 ul
4 jamky	12 ul	1,5 ul	1,5 ul	6,8 ul	52,2 ul

=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. Spusť kvantitativní real time PCR (LightCycler - Roche)
8. Doplně teploty a délky trvání jednotlivých fází PCR:



9. Doplně kolik cyklů bude reakce trvat:
10. Popiš analýzu „melting curve“ cílového 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 srovnaj výsledek s 11:

13. Vypočítej relativní množství produktu

Vzorek	C_p průměr	HPRT	ΔC_p	$2^{-\Delta C_p}$
ABC B1 DMSO				
ABC B1 TCDD				
ABC C1 DMSO				
ABC C1 TCDD				
ABC G2 DMSO				
ABC G2 TCDD				
HPRT DMSO				
HPRT TCDD				

14. Srovnaj úroveň exprese svého genu s ostatními a formuluj závěr: