

PCR IL-1 β +3953C/T RS1143634 (Kornman, 1997, Linhartová)

Délka produktu: CC 97bp + 85bp +12bp, CT 182bp + 97bp + 85bp + 12bp, TT 182bp +12bp

Primery:

IL-1BF CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A – forward (Ta = 58,79°C)

IL-1BR GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG – reverse (Ta = 58,80°C)

Reakční směs pro PCR 25 μ l:

MM		
roztok	Množství v μ l na 1 vzorek	
PCR voda	12,5	
Pufr DYNEX	2,5	
MgCl ₂ (25mM)	4,0	
IL-1BF	1,25	
IL-1BR	1,25	
dNTP	0,5	
Taq polymerasa (1U μ l ⁻¹)	1,0	
23,0 μ l MM + 2,0 μ l templátové DNA (50 ng μ l ⁻¹) + 1 kapka minerálního oleje na 1 vzorek		

Vzorky:

Průběh PCR v termocykleru Sensoquest labcyler (Schoeller):

1. 95°C 5 minut
2. 95°C 1 minuta
3. 60°C 1 minuta
6. 72°C 1 minuta krok 2.- 4. – cyklus 35x
7. 72°C 7 minut
6. 10°C 10 minut

Restrikční analýza 18 μ l: enzym TaqI

MM		
roztok	Množství v μ l na 1 vzorek	
Voda pro RA	1,0	
Pufr pro TaqI	1,7	
enzym	0,3	
3,0 μ l MM + 15 μ l pCR produktu + 1 kapka minerálního oleje na 1 vzorek		

65°C/4 hodiny nebo i přes noc

ELFO: 3,0% agarosa Serva, 3,0 μ l velikostní standard GeneRuler Fermentas, 15,0 μ l PCR RA produktu, 2,0 μ l Loading buffer