

PCR

Složení PCR reakce:

destilovaná voda	15,5 ul
10x PCR pufr	2,5 ul
10mM směs dNTP	1 ul
20uM forward primer	2 ul
20uM reverse primer	2 ul
100 ng plazmidové DNA	1 ul
<u>Taq polymeráza (5U/ul)</u>	<u>1 ul</u>
celkem	25 ul

Průběh PCR reakce:

1. 94°C – 2 minuty
2. 94°C – 30 s
3. 55°C – 30 s
4. 72°C – 30 s
5. bod 2-4 opakuj 30x
6. 72°C – 7 minut
7. 10°C – 1 minuta

Při pipetování PCR směsi se obvykle postupuje tak, že nejprve se zhotoví směs všech složek (mimo plazmidové DNA) spočítaná pro všechny vzorky + negativní kontrolu (PCR reakce bez plazmidové DNA) +1, přičemž jednotlivé složky se pipetují ve výše uvedeném pořadí. Jednotlivé vzorky plazmidové DNA se napipetují do 0,5ml zkumavek a přidá se k nim odpovídající množství PCR směsi. Zkumavky s PCR směsí se poté umístí do termocykléru a spustí se daný program.

Pozn. Taq polymerázu a dNTP je třeba při pipetování uchovávat na ledu.