

Sekvenační analýza 4. exonu genu pro LDL receptor

Použitý kit: BigDye® Terminator v1.1 **Cycle Sequencing Kit**, použitý přístroj: ABI PRISM

Templát pro sekvenační reakci: purifikovaný produkt PCR

(Změřit koncentraci DNA po purifikaci produktu PCR. Do sekvenační reakce je potřeba přidat množství DNA odpovídající cca 2 ng na každých 100 pb délky produktu PCR.)

Rozpis pro provedení sekvenační reakce:

Název	Požadovaná koncentrace	Množství přidáno do reakce	
H ₂ O	 µl	dopočítat
TRRM		4 µl	
5x SB		2 µl	
Primer		0,5 µl	
Produkt PCR	 ul	spočítat
Celkem		20	

(TRRM – BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix, SB – Sequencing buffer)

Teplotní profil sekvenační reakce:

1) Počáteční denaturace: 96 °C/1 min

2) 25 cyklů

Denaturace: 96 °C/30 s

Anneling: 50 °C/15 s

Polymerace: 60 °C/4 min

Purifikace sekvenační reakce

1. K 20 µl produktu po sekvenační reakci přidat: 2 µl 125 mM EDTA,
2 µl 3 M octan sodný, pH 5,2,
50 µl 96% etanolu
2. Vortex
3. Inkubace 15 min/teplota místnosti
4. Centrifugace 20min/teplota místnosti/13 tis. otáček
5. Odsát supernatant
6. Přidat 250 µl 70% etanolu
7. Vortex
8. Centrifugace 5 min/teplota místnosti/13 tis. otáček.
9. Odsát supernatant.
10. Vysušit 90°C/1min

