

Metodă de identificare a secvențelor polimorfe 4a/4b ale genei sintetazei endoteliale a oxidului nitric, care constă în aceea că se colectează proba integrală de sânge, se extrage ADN cu hidroxid de amoniu 0,7 M, se menține la temperatura camerei timp de 5 min și se incubează într-un termostat la temperatura de 100°C timp de 30 min cu agitare continuă, apoi ADN extras se amplifică cu utilizarea primerilor NOS3 sens: 5'-GCCCTATGGTAGTAGTGCCTTT-3' și NOS3 antisens: 5'-CCTCTTAGTGCTGTGGTCA-3' într-un amestec ce conține, în  $\mu\text{L}$ :

soluție Master Mix	12,5
primer sens în concentrație de 0,75 pM/ $\mu\text{L}$	1,25
primer antisens în concentrație de 0,75 pM/ $\mu\text{L}$	1,25
ADN genomic în concentrație de 5 ng/ $\mu\text{L}$	5
H2O ultrapură	5,
totodată soluția Master Mix conține, în $\mu\text{L}$ :	
MgCl2 în concentrație de 2,0 mM	2,0
dNTP în concentrație de 0,4 mM	0,2
Taq polimerază în concentrație de 0,05 unități/ $\mu\text{L}$	1,0
H2O ultrapură	9,3,

totodată se efectuează denaturarea inițială la temperatura de 94°C timp de 3 min, apoi se efectuează 30 de cicluri cu denaturarea la temperatura de 94°C timp de 1 min, la temperatura de 54°C timp de 30 s, la temperatura de 72°C timp de 30 s și la temperatura de 72°C timp de 5 min, se separă fragmentele amplificate de ADN în gel de agaroză de 1,8%, se colorează cu o soluție de bromură de etidiu de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  și se identifică secvențele polimorfe.