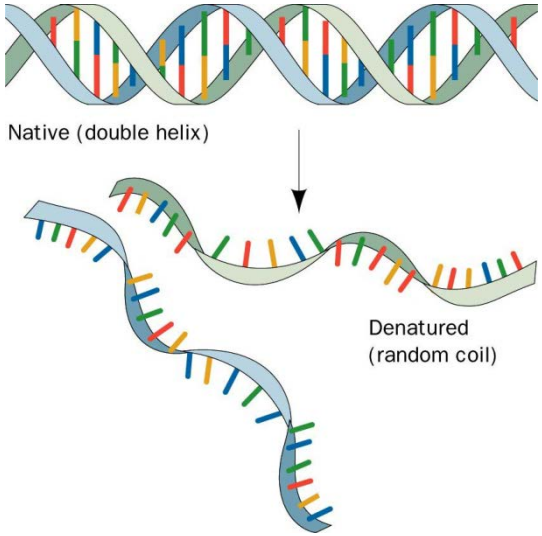
ÚVOD DO KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

V. Návrh primerů a sond

Hybridizace

• Úspěšný annealing sondy a primerů je kritický předpoklad úspěšné PCR



- Sekvence
- Koncentrace solí
- Tvorba heterodimerických stabilních struktur
- Párování bazí - nejen Watson a Crick
- Sekundární struktura
- Teplota tání DNA Tm

Melting temperature Tm

- jeden z nejdůležitějších parametrů, determinující annealingovou teplotu
- Tm – teplota, při které je 50% daného oligonukleotidu denaturováno
- „cooperativní melting“ – usnadněná denaturace po disociaci prvního páru bazí
- Sekvence: A═T < G≡C

- Rychlost renaturace (a tedy i Tm) přímo úměrná délce řetězce a jeho koncentraci a nepřímo úměrná komplexitě molekuly (struktura)

- Elektrostatické interakce mezi fosfátovýnmi molekulami
- kationty maskují + náboje fosfátů - vyšší iontová síla vede k vyšší Tm

Oligonukleotidy kratší než 20bp

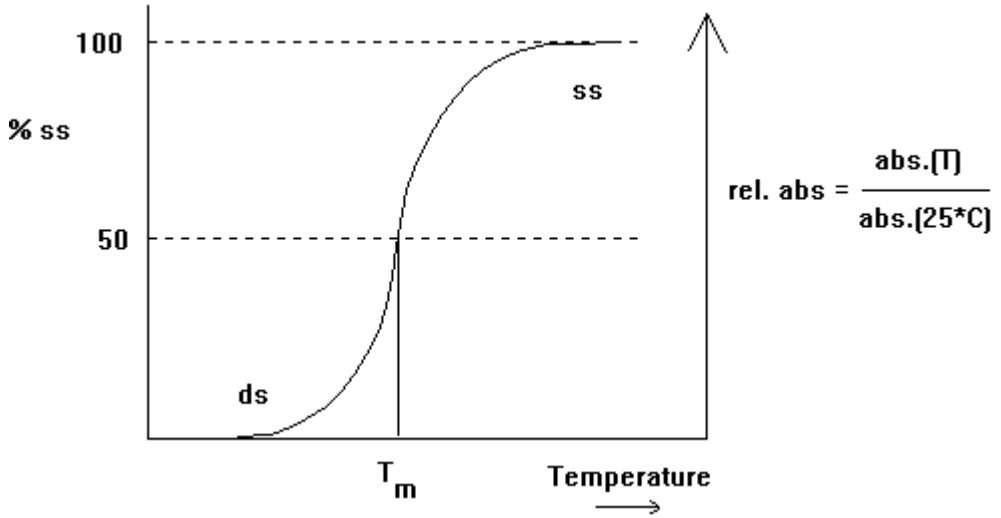
Tm = 2 x (A+T) + 4x (G+C)

Iontová síla, %GC a délka řetězce (N)

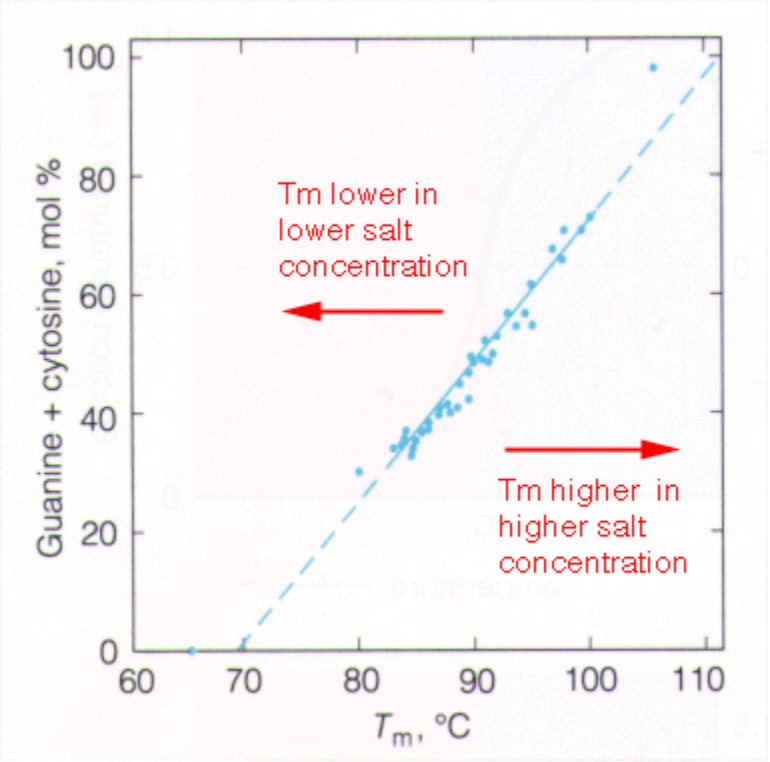
Tm=81,5+16,6 (log10[Na+]+0,41(%GC)-(625/N)

Web-based kalkulátory

http://insilico.ehu.es/tm.php



Melting temperature Tm



GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC

+

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

T_m - 25° ⇅ > T_m

GCTATTCAACTGAAGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

GCTATTCAACTGGAGAGGGCACAGC

+

CGATAAGTTGACTTCTCCCGTGTCG

T_m^* - 25° ⇅ > T_m^*

GCTATTCAACTG^{G}AGAGGGCACAGC
CGATAAGTTGAC$_{T}$TCTCCCGTGTCG

note: T_m^* is 4° lower than T_m

(In general, there is a 1° drop for every 1% mismatch)

Gibbsova (volná) energie a její změna (ΔG, ΔG^0)

•Schopnost látek jít do reakce

•Sekundární struktura DNA

• ΔG závisí na změně vnitřní energie a entropie

• Změna volné energie ΔG^0 (množství energie uvolněné nebo absorbované během reakce za stejné teploty a tlaku) - spontánní reakce - **$\Delta G<0$**

• Znalost termodynamického příspěvku párování bazí, mismatches, volných konců, vlásenkových struktur a smyček – predikce parametrů hybridizace

• Predice sekundární struktury – *nearest neighbor*

- *helix initiation factor* (GC/AT)

- *helix propagation* energie nutná pro vytvoření následujícího hybridizačního páru

- symetrie sekvence (duplexu)

- *Loop regions* – smyčky, vlásenky, výdutě atd.

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

1. Počet odpovídajících párů bazí

- Kombinace vodíkových můstků a hydrofobních interakcí
- Pozice a typ neodpovídajícího páru (*mismatch*)

2. Sekvence – *nearest neighbor*

3. Sekundární struktura

- Charakter cílové sekvence
- Kompetice primeru nebo sondy s komplementárním řetězcem cílového duplexu

4. Volné konce

- Interakce mez 5’ a 3’ konci hybridizovaného oligonukleotidu a nejbližší sousedící báze
- Příklad:

ΔG^0 (GC) -0,96kcal/mol

ΔG^0 (AT) -0,50 kcal/mol

ΔG^0 W-C (TA/AT) -0,58ckcal/mol

ΔG^0 W-C (GC/CG) -2,24 kcal/mol

GTAGACAATCTCCATCTCCTATCCTGATTAGAG
****
GTTAGAGGTAGAGGATAGGA

Faktory ovlivňující stabilitu DNA DNA/RNA duplexu

5. Iontová síla

- Koncentrace iontů, zejména Mg^{II+}
- Kationty kompenzují negativní náboj fosfátových skupin a usnadňují formování duplexu
- Stabilita duplexu (Tm) je úměrná koncentraci iontů

6. Teplota

- Se stoupající T je udržení duplexu energicky náročnější, po překročení určité T je preferována ssDNA – vyšší entropie celého systému

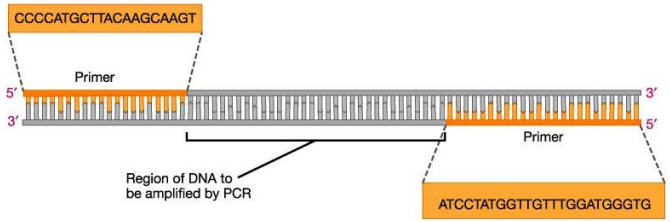
Není tedy nutná shodná Tm, ale shodná účinnost hybridizace obou primerů.

Primery se stejnou Tm, ale rozdílnou ΔG^0, mohou vykazovat rozdílnou úspěšnost při tvorbě duplexu než primery s odpovídající ΔG^0.

Design primerů

- Optimálně: primery jejichž 5'konce tvoří stabilní duplex, ΔG^0 <10 kcal/mol/37°C
- Plynulý přechod ΔG^0 směrem k 3'konci až k cca -6kcal/mol.
- Eliminace misprimingu (vzniklého hybridizací pouze 3'konce)
- Vyloučení repetitivních oblastí, které mohou tvořit sekundární struktury
- Komplementarita primerů – primer dimery
- Specifita – hybridizace k jedinečnému místu v genomu (BLASTn)

Vliv reakčního prostředí – i ideálně navržené primery mohou měnit své vlastnosti v závislosti na použitém PCR pufru a dalších parametrech PCR – vždy je nutná optimalizace jednotlivých PCR

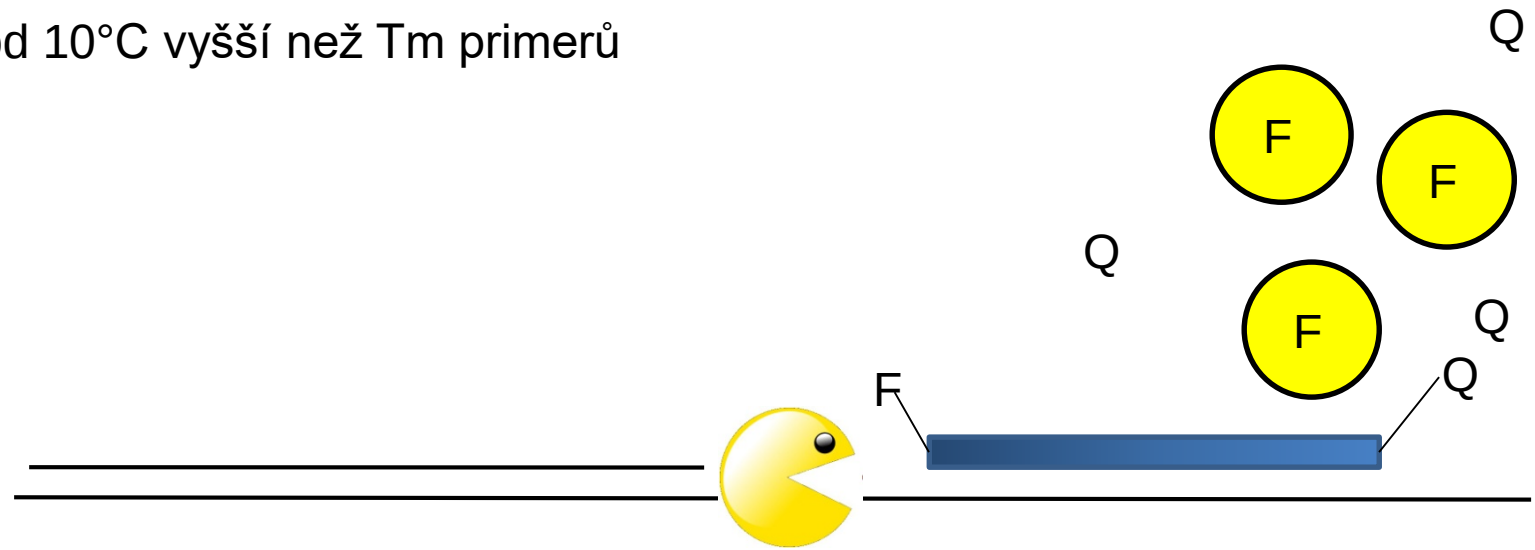


Design sond

- Různý design podle toho, zda je cílem kvantifikace DNA, mRNA nebo provedení alelické diskriminace nebo SNP
- Použitá chemie
- Detekce DNA, RNA nebo obou zároveň? Rozlišení HIV RNA od DNA začleněné do genomu
- Kombinace fluoroforu a zhášeče
- Modifikace sondy – LNA, PNA, MGB atd.
- Multiplex assay

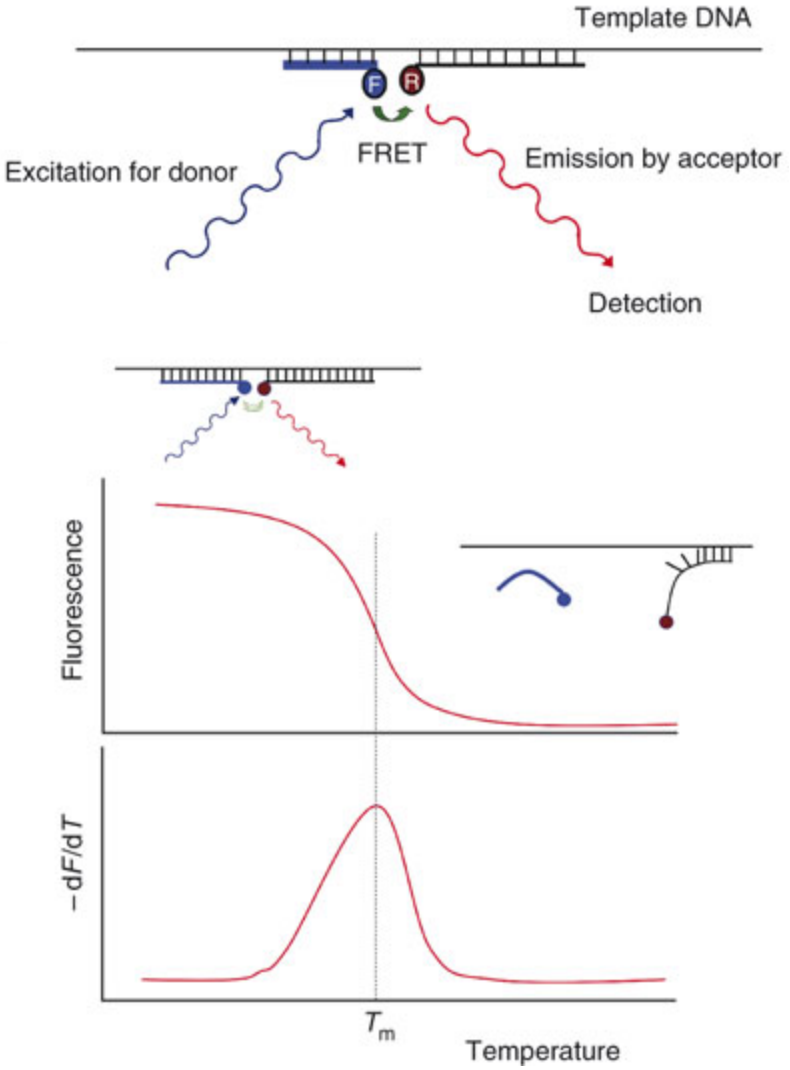
Design hydrolyzačních sond

- qPCR TaqMan - dvoukrokový proces – denaturace a annealing/extension
- Co nejnižší Ct a nejvyšší ΔR (ΔR_n)
- Umístění 5’ konce sondy v rámci stanovované sekvence co nejblíže 3’ konci jednoho z primerů – účinné štěpení sondy
- Optimální délka do 30 nukleotidů, obsah GC do 30%
- AT bohaté sekvence – začlenění LNA, PNA nebo MGP
- G – účinný quencher
- Minimum repeticí, zejména GGGG, začlenění inosinu do repetice řeší tento problém
- Tm proby od 10°C vyšší než Tm primerů



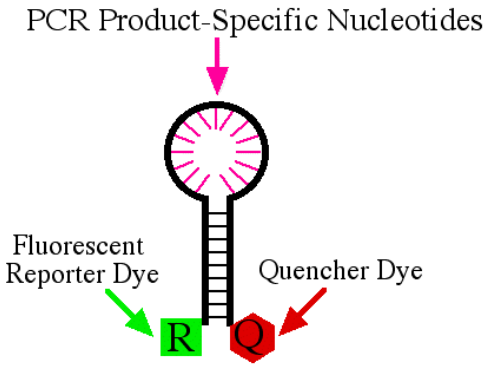
Design hybridizačních sond (Lightcycler probes)

- Sondy by měly být umístěny co nejdál od primeru 5’ – odečet fluorescence v annealingové fázi
- GC 50%
- Každá sonda má délku 23-35bp
- Sondy o stejné Tm – musí se vázat současně ; Tm sond o 5-10°C vyšší než Tm primerů
- 3’ konec akceptorové sondy fosforylován
- Donor FAM, akceptor Cy5 nebo Lightcycler Red 640/705
- Vzdálenost mezi sondami 1-5 bazí (zajištění FRET)



Design molekulárních majáků

- Vazba majáku ideálně uprostřed amplikonu
- Tm komplementárních ramen o 7-10°C vyšší než Tm primerů
- Délka do 39 bp - omezení sekundárních struktur

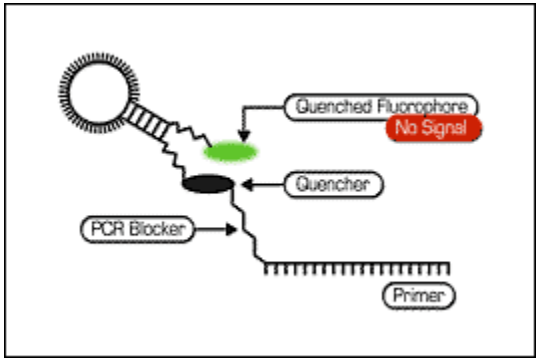


Design scorpion primers

Sonda připojena k 5' konci primeru a je komplementární

k nově syntetizovanému řetězci

- vlastní hybridizace sondy je intramolekulární událost
- 17-27bp; Tm sondy <Tm primeru
- Cíl sondy – 0-20bp od 3'konce primeru
- Hairpin struktura
- výpočet ΔG pro uzavřenou i hybridizovanou formu
  - MFold http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold

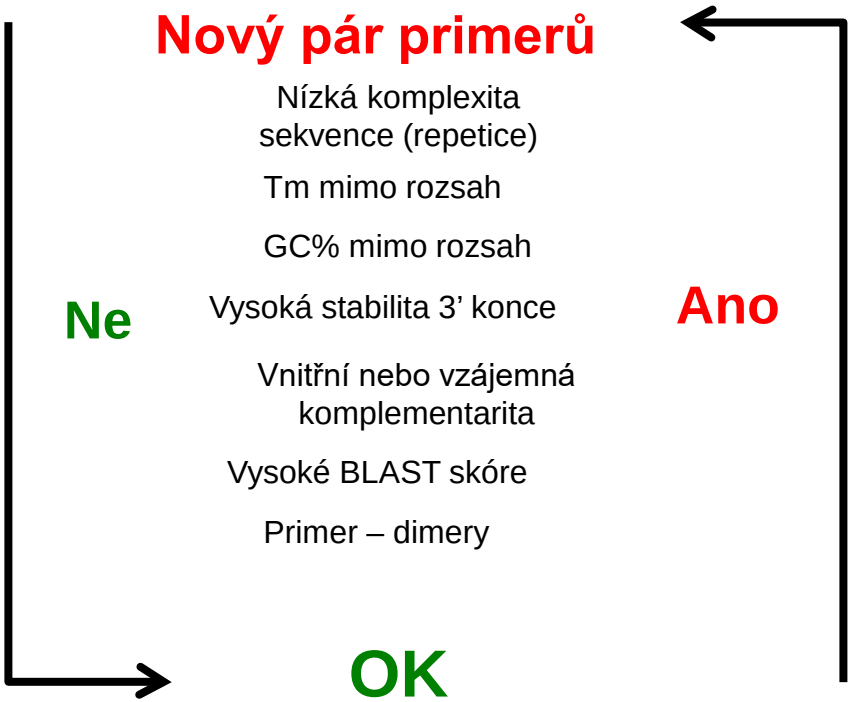


Design primerů

- Délka amplikonu, Tm, účinnost amplifikace i výtěžek

- Správná sekvence – BLASTn
- Sestřih – rozhraní exon/intron
- 3’ konec – klíčový pro eventuální mispriming G/C
- Repetice (zejména GC)
- Sekundární struktura, intraprimer homology
- Obsah GC 35-65%
- Délka 15-25bp
- Tm 55-60°C
- ∆G do -10kcal/mol
- V případě převažujících AT – vhodné začlenění LNA
- Eventuální modifikace - na 5’konci

Design primerů – web resources



Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Transcripts						
NM_005252.2	Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), mRNA	40.1	40.1	100%	0.014	100%
XM_001718466.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001717510.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
XM_001716725.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100128918 (LOC100128918), mRNA	32.2	32.2	80%	3.5	100%
NM_017780.2	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 7 (CHD7), mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_182923.3	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 2, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
NM_005552.4	Homo sapiens kinesin light chain 1 (KLC1), transcript variant 1, mRNA	30.2	30.2	75%	14	100%
XM_001726819.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
XM_001725069.1	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100131402 (LOC100131402), mRNA	28.2	28.2	70%	55	100%
Genomic sequences [show first]						
NW_001838113.2	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_11	40.1	901	100%	0.014	100%
NT_026437.11	Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, reference assembly	40.1	3647	100%	0.014	100%
NW_001838847.2	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly (based on HuRef SCAF_110	34.2	258	100%	0.89	100%

Design primerů – web resources

- Primer Bank

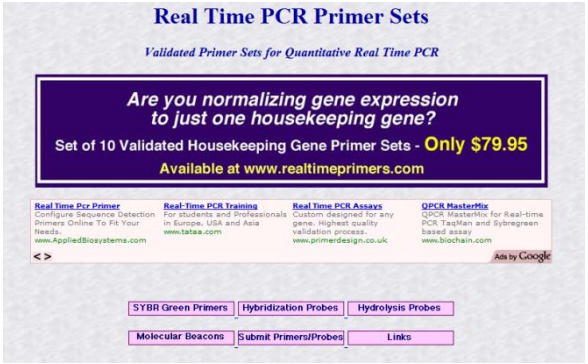
http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/

- RTPrimerDB

http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/

- Real Time PCR Primer Set

http://www.realtimeprimers.org/



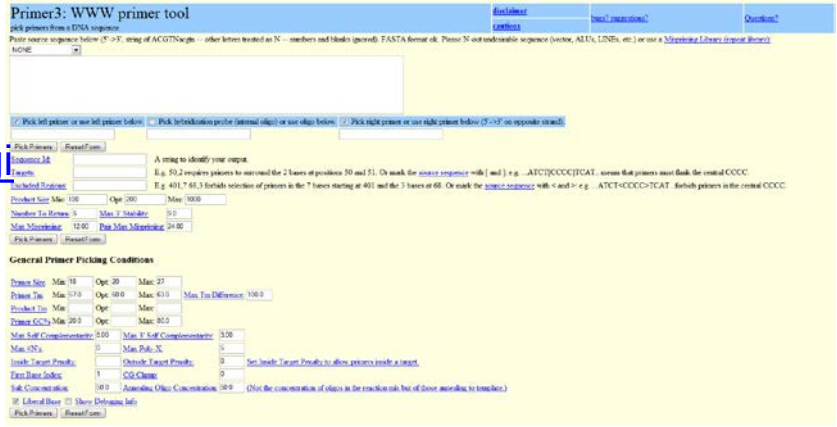
- QPPD

http://web.ncifcrf.gov/rtp/gel/primerdb/default.asp

Design primerů a sond– web resources

- Primer 3

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi



- Primer Express

http://www.appliedbiosystems.com

- Premier Biosoft International

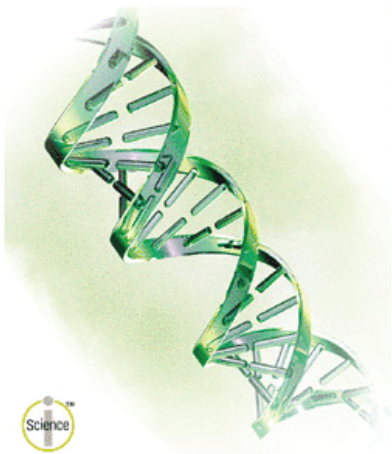
http://www.premierbiosoft.com

Design primerů a sond

Návrh primerů a TaqMan sond – Primer Express

```
                     /db_xref="UniSTS:477415"
     STS             1090..>1143
                     /gene="FOS"
                     /gene_synonym="AP-1"
                     /gene_synonym="C-FOS"
                     /standard_name="BP2S0015A10G9"
                     /db_xref="UniSTS:519218"
ORIGIN
        1 atgatgttct cgggcttcaa cgcagactac gaggcgtcat cctcccgctg cagcagcgcg
       61 tccccggccg gggatagcct ctcttactac cactcacccg cagactcctt ctccagcatg
      121 ggctcgcctg tcaacgcgca ggactttctgc acggacctgg ccgtctccag tgccaacttc
      181 attcccacgg tcactgccat ctcgaccagt ccggacctgc agtggctggt gcagcccgcc
      241 ctcgtctcct ctgtggcccc atcgcagacc agagcccctc acccttttcgg agtccccgcc
      301 ccctccgctg gggcttactc cagggctggc gttgtgaaga ccatgacagg aggccgagcg
      361 cagagcattg gcaggagggg caaggtggaa cagttatctc cagaagaaga agagaaaagg
      421 agaatccgaa gggaaaggaa taagatggct gcagccaaat gccgcaaccg gaggagggag
      481 ctgactgata cactccaagc ggagacagac caactagaag atgagaagtc tgcttttgcag
      541 accgagattg ccaacctgct gaaggagaag gaaaaactag agttcatcct ggcagctcac
      601 cgacctgcct gcaagatccc tgatgacctg ggcttcccag aagagatgtc tgtggcttcc
      661 cttgatctga ctgggggcct gccagaggtt gccaccccgg agtctgagga ggccttcacc
      721 ctgcctctcc tcaatgaccc tgagcccaag ccctcagtgg aacctgtcaa gagcatcagc
      781 agcatggagc tgaagaccga gcccttgat gacttcctgt tcccagcatc atccaggccc
      841 agtggctctg agacagcccg ctccgtgcca gacatggacc tatctgggtc cttctatgca
      901 gcagactggg agcctctgca cagtggctcc ctggggatgg ggcccatggc cacagagctg
      961 gagcccctgt gcactccggt ggtcacctgt actcccagct gcactgctta cacgtctttcc
     1021 ttcgtcttca cctaccccga ggctgactcc ttccccagct gtgcagctgc ccaccgcaag
     1081 ggcagcagca gcaatgagcc ttcctctgac tcgctcagct cacccacgct gctggccctg
     1141 tga
//
```

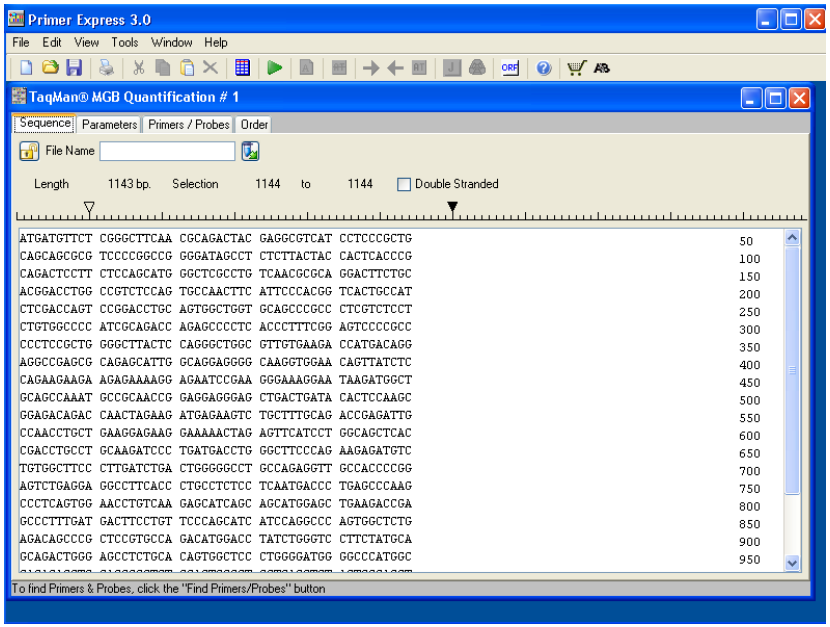
Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH



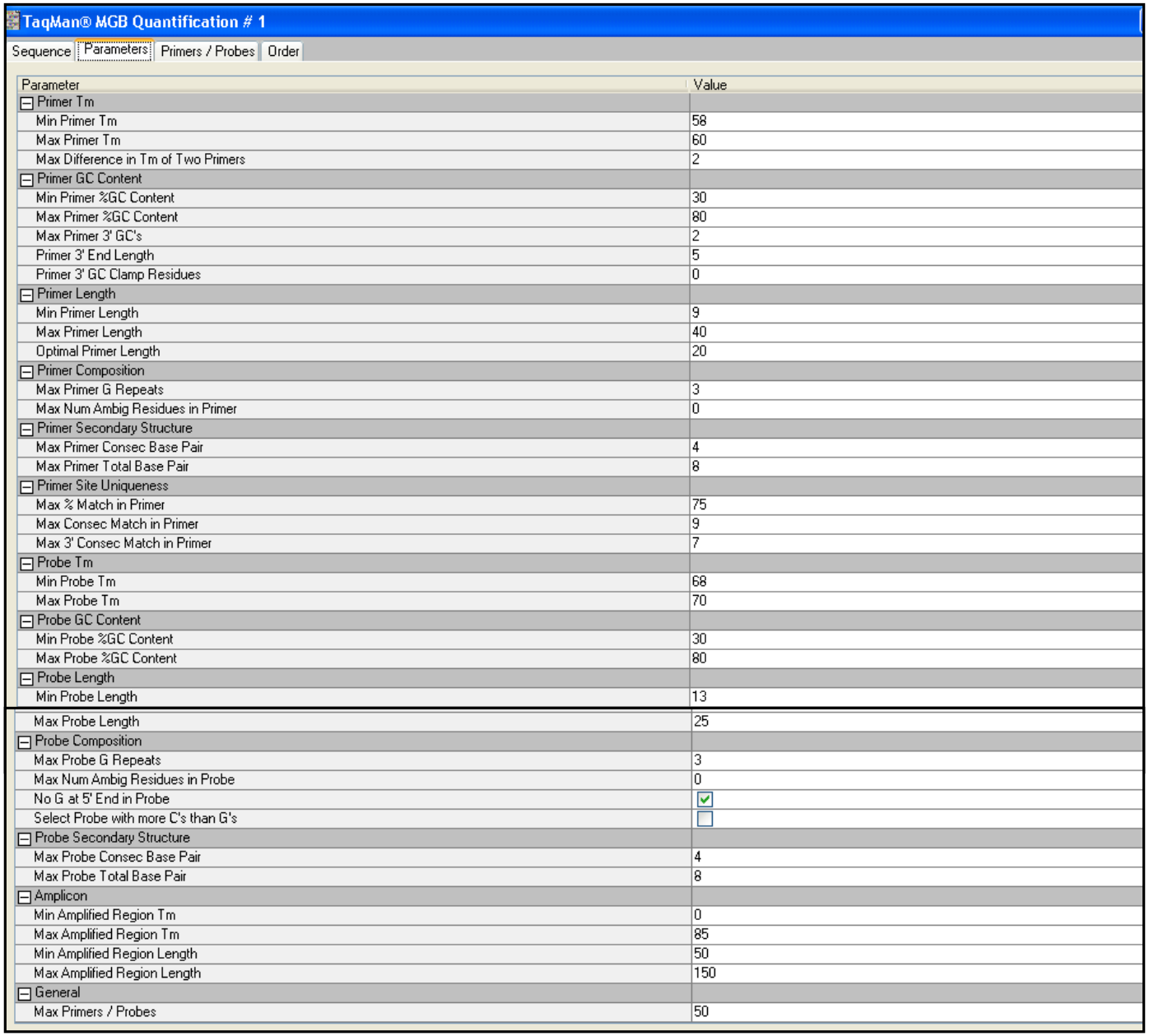
Applied Biosystems

Primer Express® Software for Real-Time PCR

Version 3.0



Design primerů a sond

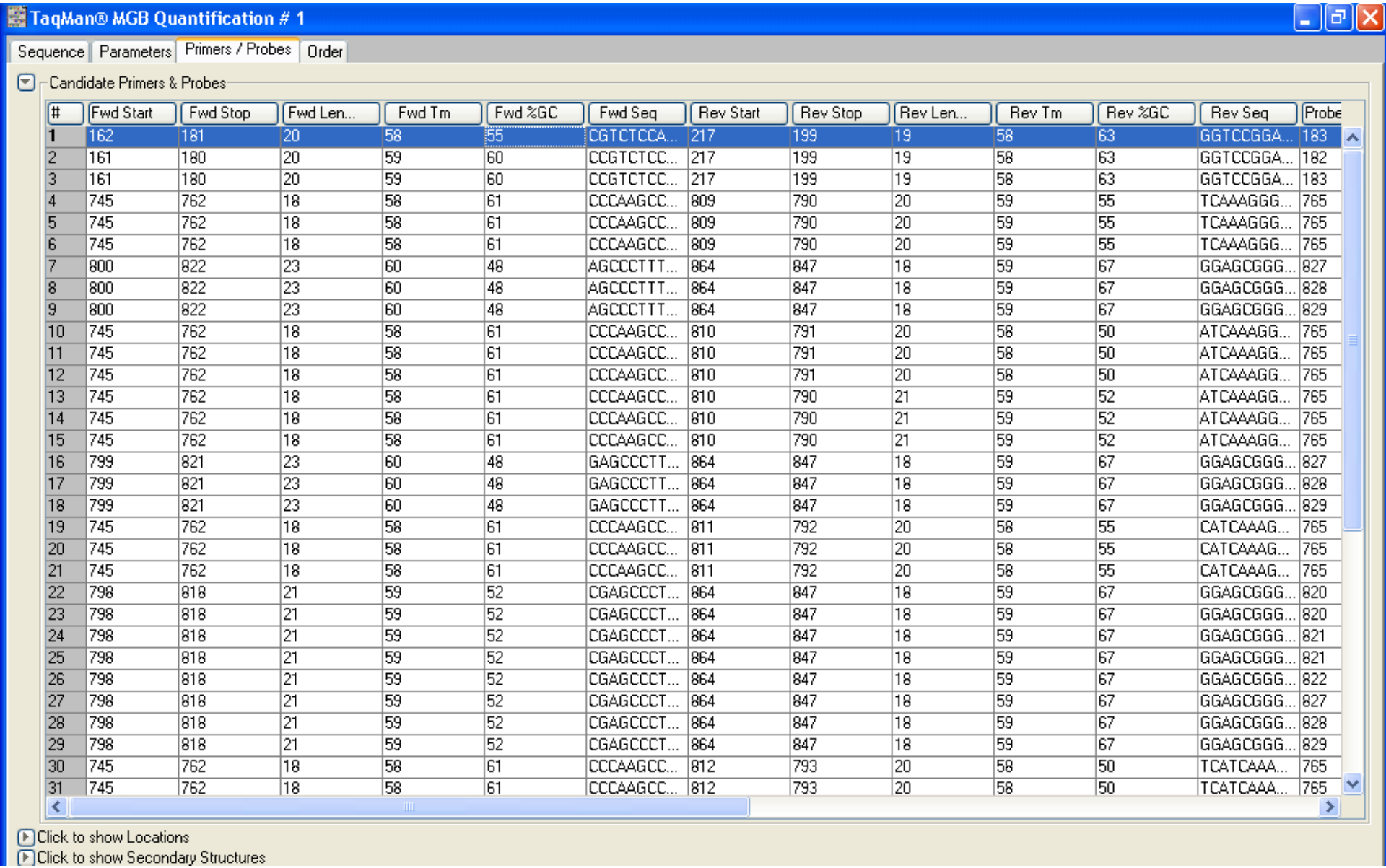


TaqMan® MGB Quantification # 1

Sequence | Parameters | Primers / Probes | Order

Parameter	Value
Primer Tm	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
Primer GC Content	
Min Primer %GC Content	30
Max Primer %GC Content	80
Max Primer 3' GC's	2
Primer 3' End Length	5
Primer 3' GC Clamp Residues	0
Primer Length	
Min Primer Length	9
Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
Primer Composition	
Max Primer G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Primer	0
Primer Secondary Structure	
Max Primer Consec Base Pair	4
Max Primer Total Base Pair	8
Primer Site Uniqueness	
Max % Match in Primer	75
Max Consec Match in Primer	9
Max 3' Consec Match in Primer	7
Probe Tm	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
Probe GC Content	
Min Probe %GC Content	30
Max Probe %GC Content	80
Probe Length	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	25
Probe Composition	
Max Probe G Repeats	3
Max Num Ambig Residues in Probe	0
No G at 5' End in Probe	☑
Select Probe with more C's than G's	☐
Probe Secondary Structure	
Max Probe Consec Base Pair	4
Max Probe Total Base Pair	8
Amplicon	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150
General	
Max Primers / Probes	50

Design primerů a sond



#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Len...	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Len...	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq	Probe
1	162	181	20	58	55	CGTCTCCA...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
2	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	182
3	161	180	20	59	60	CCGTCTCC...	217	199	19	58	63	GGTCCGGA...	183
4	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
5	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
6	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	809	790	20	59	55	TCAAAGGG...	765
7	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
8	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
9	800	822	23	60	48	AGCCCTTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
10	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
11	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
12	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	791	20	58	50	ATCAAAGG...	765
13	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
14	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
15	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	810	790	21	59	52	ATCAAAGG...	765
16	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
17	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
18	799	821	23	60	48	GAGCCCTT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
19	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
20	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
21	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	811	792	20	58	55	CATCAAAG...	765
22	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
23	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	820
24	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
25	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	821
26	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	822
27	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	827
28	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	828
29	798	818	21	59	52	CGAGCCCT...	864	847	18	59	67	GGAGCGGG...	829
30	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAAA...	765
31	745	762	18	58	61	CCCAAGCC...	812	793	20	58	50	TCATCAAA...	765

Design primerů a sond

Name	Value
Forward Primers	
Total primers tested:	35792
GC test passed:	35149
Ambiguity test passed:	963
Clamp test passed:	963
Tm test passed:	963
Avoid Excluded regions test passed:	963
Repeat test passed:	900
Self compare test passed:	741
Limit GC test passed:	214
Sequence compare passed:	84
Reverse sequence compare passed:	83

Reverse Primers	
Total primers tested:	35296
GC test passed:	34657
Ambiguity test passed:	946
Clamp test passed:	946
Tm test passed:	946
Avoid Excluded regions test passed:	946
Repeat test passed:	861
Self compare test passed:	703
Limit GC test passed:	205
Sequence compare passed:	95
Reverse sequence compare passed:	95
Primer Pairs	
Total pairs tested:	7885
Amplicon Length test passed:	691
Avoid Excluded regions test passed:	691
Tm Difference test passed:	691
Amplicon Tm test passed:	630

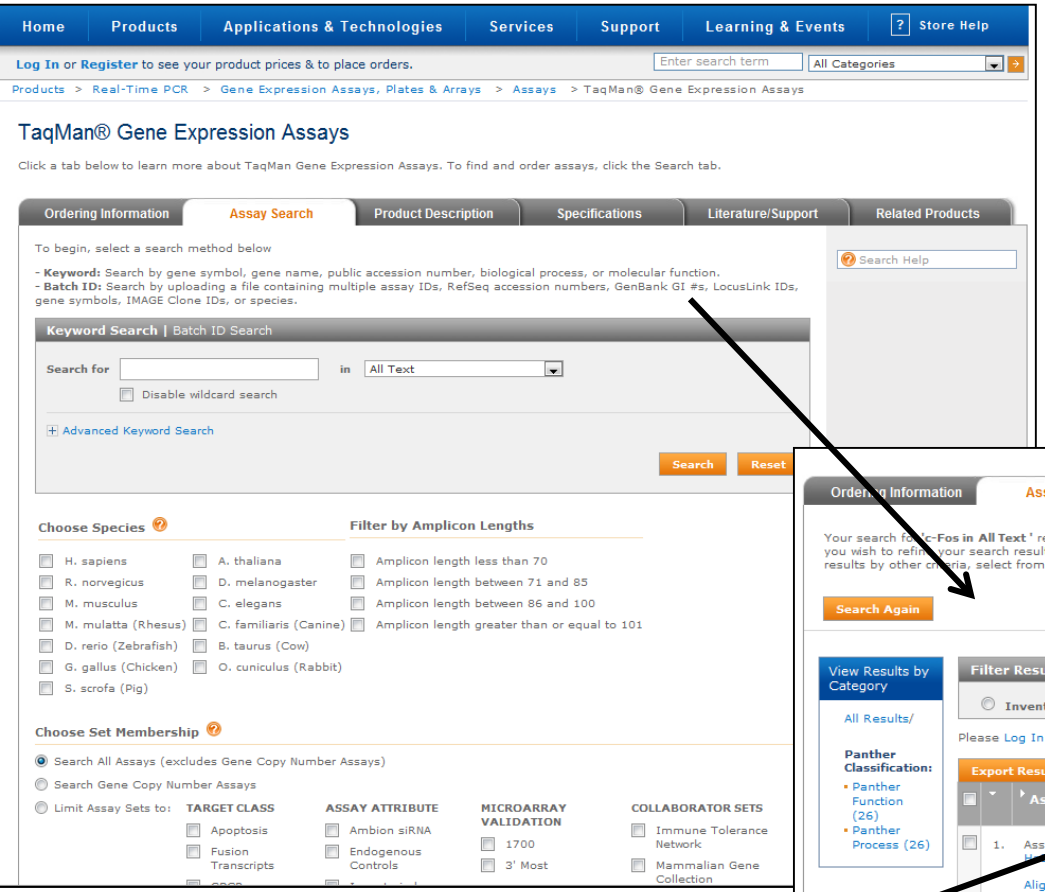
TaqMan Probes	
Total probes tested:	14450
GC test passed:	14128
Ambiguity test passed:	1178
Tm test passed:	1178
Avoid Excluded regions test passed:	1178
Repeat test passed:	1126
Self compare test passed:	1076
Sequence compare passed:	475
Reverse sequence compare passed:	458
Probe start test passed:	351

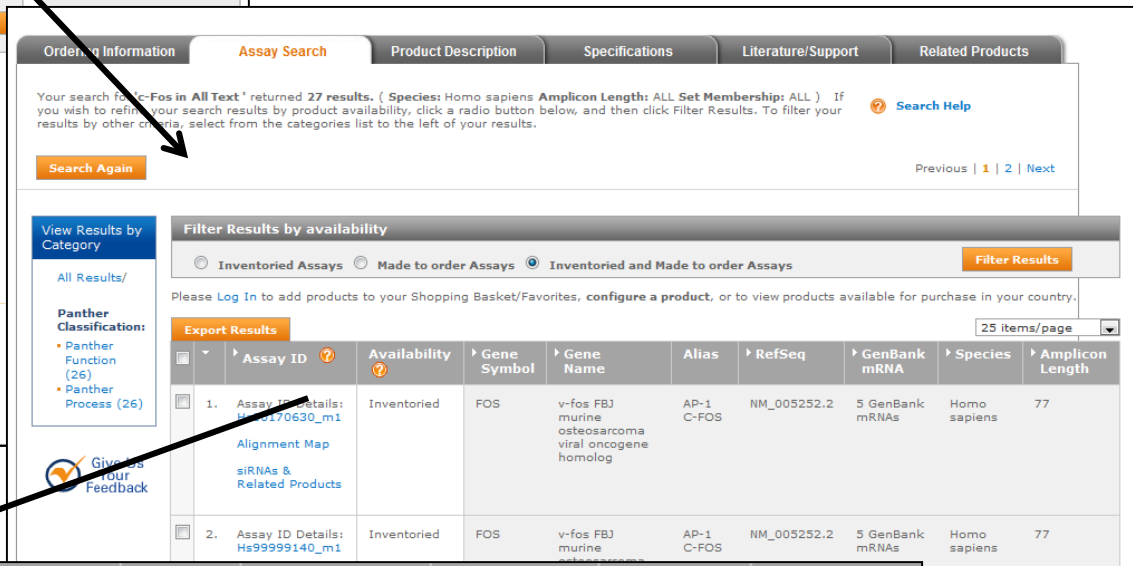
Design primerů a sond

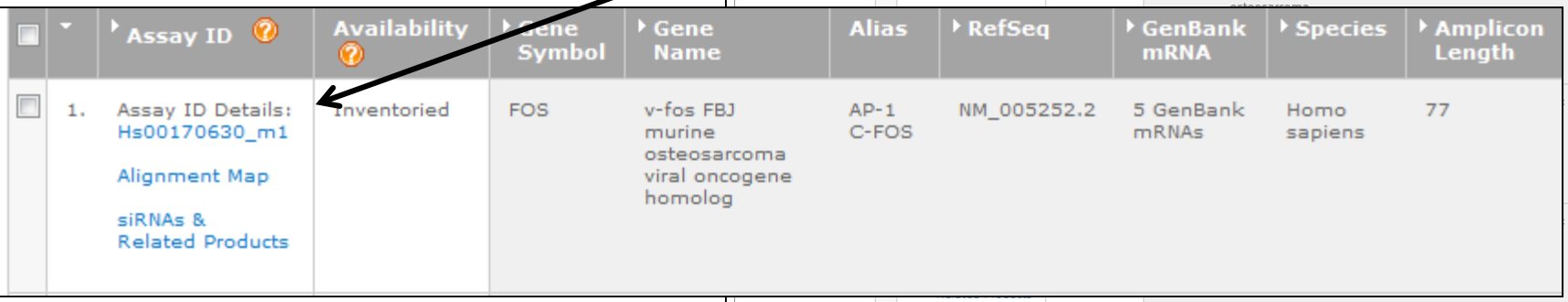
#	Fwd Start	Fwd Stop	Fwd Length	Fwd Tm	Fwd %GC	Fwd Seq	Rev Start	Rev Stop	Rev Length	Rev Tm	Rev %GC	Rev Seq	Probe Start	Probe Stop	Probe Length	Probe Tm	Probe %GC	Probe Seq	Amp Tm	Amp %GC	Amp Ta	Amp Len	Penalty
1	162	181	20	58	55	CGTCTCCAGTGCCAACTTCA	217	199	19	58	63	GGTCCGGACTGGTCGAGAT	183	197	15	69	67	TCCCACGGTCACTGC	84	61	62	56	31
2	161	180	20	59	60	CCGTCTCCAGTGCCAACTTC	217	199	19	58	63	GGTCCGGACTGGTCGAGAT	182	197	16	69	63	TTCCCACGGTCACTGC	85	61	62	57	36
3	161	180	20	59	60	CCGTCTCCAGTGCCAACTTC	217	199	19	58	63	GGTCCGGACTGGTCGAGAT	183	197	15	69	67	TCCCACGGTCACTGC	85	61	62	57	36
4	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	809	790	20	59	55	TCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	780	16	68	50	TGTCAAGAGCATCAGC	83	57	61	65	77
5	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	809	790	20	59	55	TCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	781	17	69	47	TGTCAAGAGCATCAGCA	83	57	61	65	77
6	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	809	790	20	59	55	TCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	782	18	69	50	TGTCAAGAGCATCAGCAG	83	57	61	65	77
7	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	844	18	70	61	CATCATCCAGGCCCAGTG	84	60	62	65	80
8	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	828	845	18	70	61	ATCATCCAGGCCCAGTGG	84	60	62	65	80
9	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	829	845	17	69	65	TCATCCAGGCCCAGTGG	84	60	62	65	80
10	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	791	20	58	50	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCA	765	780	16	68	50	TGTCAAGAGCATCAGC	83	56	60	66	82
11	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	791	20	58	50	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCA	765	781	17	69	47	TGTCAAGAGCATCAGCA	83	56	60	66	82
12	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	791	20	58	50	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCA	765	782	18	69	50	TGTCAAGAGCATCAGCAG	83	56	60	66	82
13	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	790	21	59	52	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	780	16	68	50	TGTCAAGAGCATCAGC	83	56	60	66	83
14	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	790	21	59	52	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	781	17	69	47	TGTCAAGAGCATCAGCA	83	56	60	66	83
15	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	810	790	21	59	52	ATCAAAGGGCTCGGTCTTCAG	765	782	18	69	50	TGTCAAGAGCATCAGCAG	83	56	60	66	83
16	799	821	23	60	48	GAGCCCTTTGATGACTTCCTGTT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	844	18	70	61	CATCATCCAGGCCCAGTG	84	61	62	66	85
17	799	821	23	60	48	GAGCCCTTTGATGACTTCCTGTT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	828	845	18	70	61	ATCATCCAGGCCCAGTGG	84	61	62	66	85
18	799	821	23	60	48	GAGCCCTTTGATGACTTCCTGTT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	829	845	17	69	65	TCATCCAGGCCCAGTGG	84	61	62	66	85
19	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	811	792	20	58	55	CATCAAAGGGCTCGGTCTTC	765	780	16	68	50	TGTCAAGAGCATCAGC	83	57	61	67	87
20	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	811	792	20	58	55	CATCAAAGGGCTCGGTCTTC	765	781	17	69	47	TGTCAAGAGCATCAGCA	83	57	61	67	87
21	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	811	792	20	58	55	CATCAAAGGGCTCGGTCTTC	765	782	18	69	50	TGTCAAGAGCATCAGCAG	83	57	61	67	87
22	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	835	16	69	50	TTCCCAGCATCATCCA	85	61	62	67	88
23	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	836	17	69	53	TTCCCAGCATCATCCAG	85	61	62	67	88
24	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	821	835	15	69	53	TCCCAGCATCATCCA	85	61	62	67	88
25	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	821	836	16	69	56	TCCCAGCATCATCCAG	85	61	62	67	88
26	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	822	834	13	69	62	CCCAGCATCATCC	85	61	62	67	88
27	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	844	18	70	61	CATCATCCAGGCCCAGTG	85	61	62	67	88
28	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	828	845	18	70	61	ATCATCCAGGCCCAGTGG	85	61	62	67	88
29	798	818	21	59	52	CGAGCCCTTTGATGACTTCCT	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	829	845	17	69	65	TCATCCAGGCCCAGTGG	85	61	62	67	88
30	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	812	793	20	58	50	TCATCAAAGGGCTCGGTCTT	765	780	16	68	50	TGTCAAGAGCATCAGC	82	56	60	68	92
31	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	812	793	20	58	50	TCATCAAAGGGCTCGGTCTT	765	781	17	69	47	TGTCAAGAGCATCAGCA	82	56	60	68	92
32	745	762	18	58	61	CCCAAGCCCTCAGTGGAA	812	793	20	58	50	TCATCAAAGGGCTCGGTCTT	765	782	18	69	50	TGTCAAGAGCATCAGCAG	82	56	60	68	92
33	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	835	16	69	50	TTCCCAGCATCATCCA	85	62	62	68	92
34	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	836	17	69	53	TTCCCAGCATCATCCAG	85	62	62	68	92
35	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	821	835	15	69	53	TCCCAGCATCATCCA	85	62	62	68	92
36	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	821	836	16	69	56	TCCCAGCATCATCCAG	85	62	62	68	92
37	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	822	834	13	69	62	CCCAGCATCATCC	85	62	62	68	92
38	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	822	836	15	68	60	CCCAGCATCATCCAG	85	62	62	68	92
39	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	823	837	15	68	60	CCAGCATCATCCAGG	85	62	62	68	92
40	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	840	14	68	64	CATCATCCAGGCCC	85	62	62	68	92
41	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	842	16	68	63	CATCATCCAGGCCCAG	85	62	62	68	92
42	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	827	844	18	70	61	CATCATCCAGGCCCAGTG	85	62	62	68	92
43	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	828	845	18	70	61	ATCATCCAGGCCCAGTGG	85	62	62	68	92
44	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	829	845	17	69	65	TCATCCAGGCCCAGTGG	85	62	62	68	92
45	797	816	20	58	55	CCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	830	845	16	68	69	CATCCAGGCCCAGTGG	85	62	62	68	92
46	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	867	851	17	59	71	CACGGAGCGGGCTGTCT	827	844	18	70	61	CATCATCCAGGCCCAGTG	84	60	62	68	96
47	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	867	851	17	59	71	CACGGAGCGGGCTGTCT	828	845	18	70	61	ATCATCCAGGCCCAGTGG	84	60	62	68	96
48	800	822	23	60	48	AGCCCTTTGATGACTTCCTGTTC	867	851	17	59	71	CACGGAGCGGGCTGTCT	829	845	17	69	65	TCATCCAGGCCCAGTGG	84	60	62	68	96
49	796	816	21	59	52	ACCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	835	16	69	50	TTCCCAGCATCATCCA	85	61	62	69	98
50	796	816	21	59	52	ACCGAGCCCTTTGATGACTTC	864	847	18	59	67	GGAGCGGGCTGTCTCAGA	820	836	17	69	53	TTCCCAGCATCATCCAG	85	61	62	69	98

Design primerů a sond

www.appliedbiosystems.com







Design primerů a sond

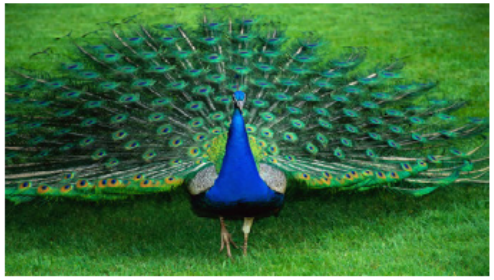
Roche Applied Science Czech Republic Login Quick Order Shopping Cart Help Contact Us

Home Products Special Interest Sites Support & Resources News Search ...

Home > Special Interest Sites > Genomic Systems > Real-Time PCR Systems > **Universal ProbeLibrary System**

Universal ProbeLibrary

- Real-Time PCR Systems
  - LightCycler® Carousel-Based System
  - LightCycler® 480 System
  - **Universal ProbeLibrary System**
    - System Description
    - Technology
    - Assay Design Center
    - User Statements and Application
    - Assay List
    - Performance
    - Product List
    - Support
    - Literature and References
    - Multimedia Presentations
    - Product Information and Pack Inserts



Gene Expression Quantification with Real-Time PCR - Simple and Fast

- Design real-time qPCR assays online in seconds.
- Rely on just 165 prevalidated probes for over five million qPCR assays for a large variety of organisms.
- Reduce the cost of gene expression analysis by performing multiplex qPCR assays with Universal ProbeLibrary Reference Gene Assays.

www.universalprobelibrary.com

Universal ProbeLibrary for Human *Roche Applied Science*

Specify your target(s): Advanced primer3 settings

By sequence ID, gene name or keyword

e.g. ENST00000331789, NM_001101 or X00351 or beta-actin

or

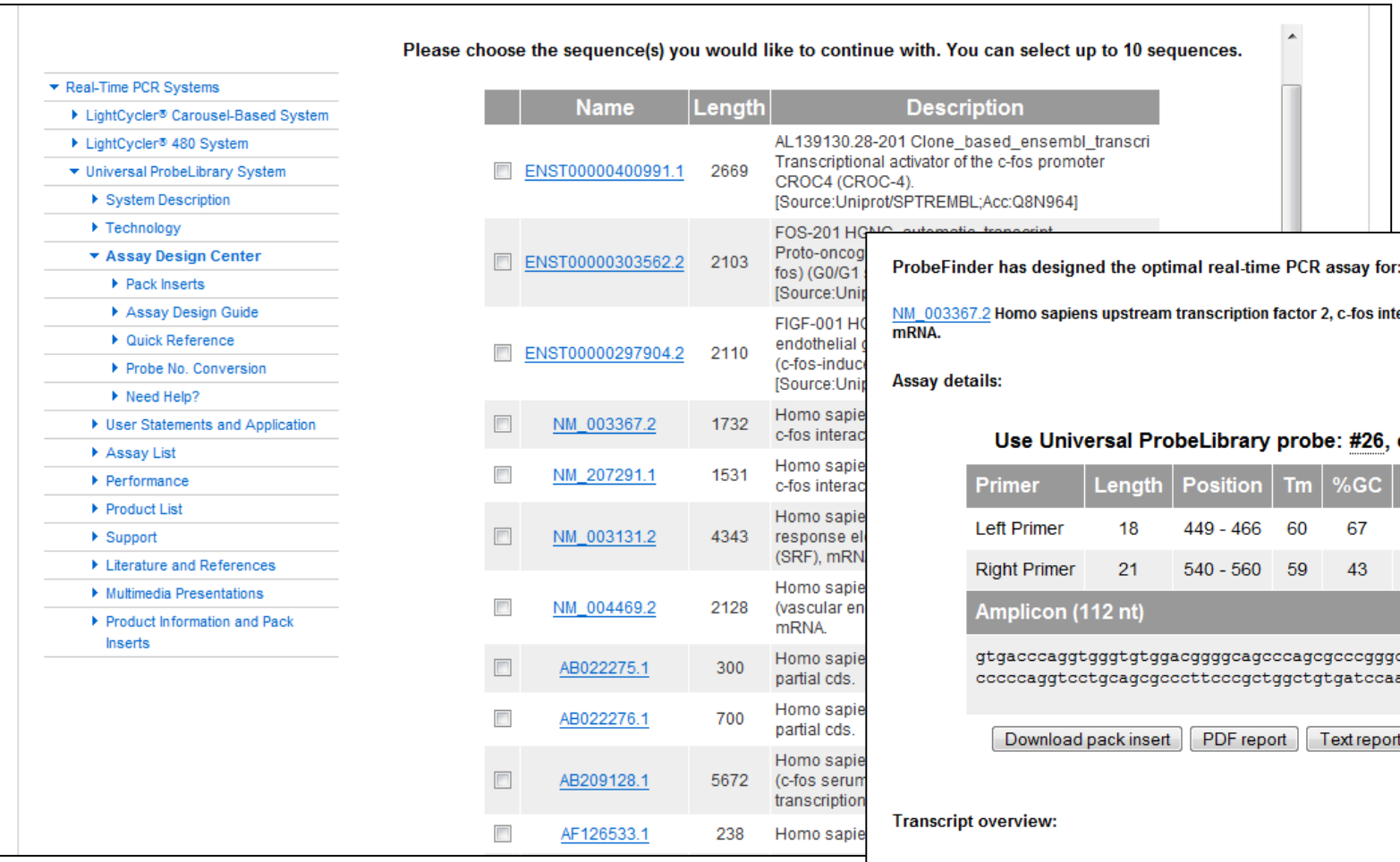
By sequence

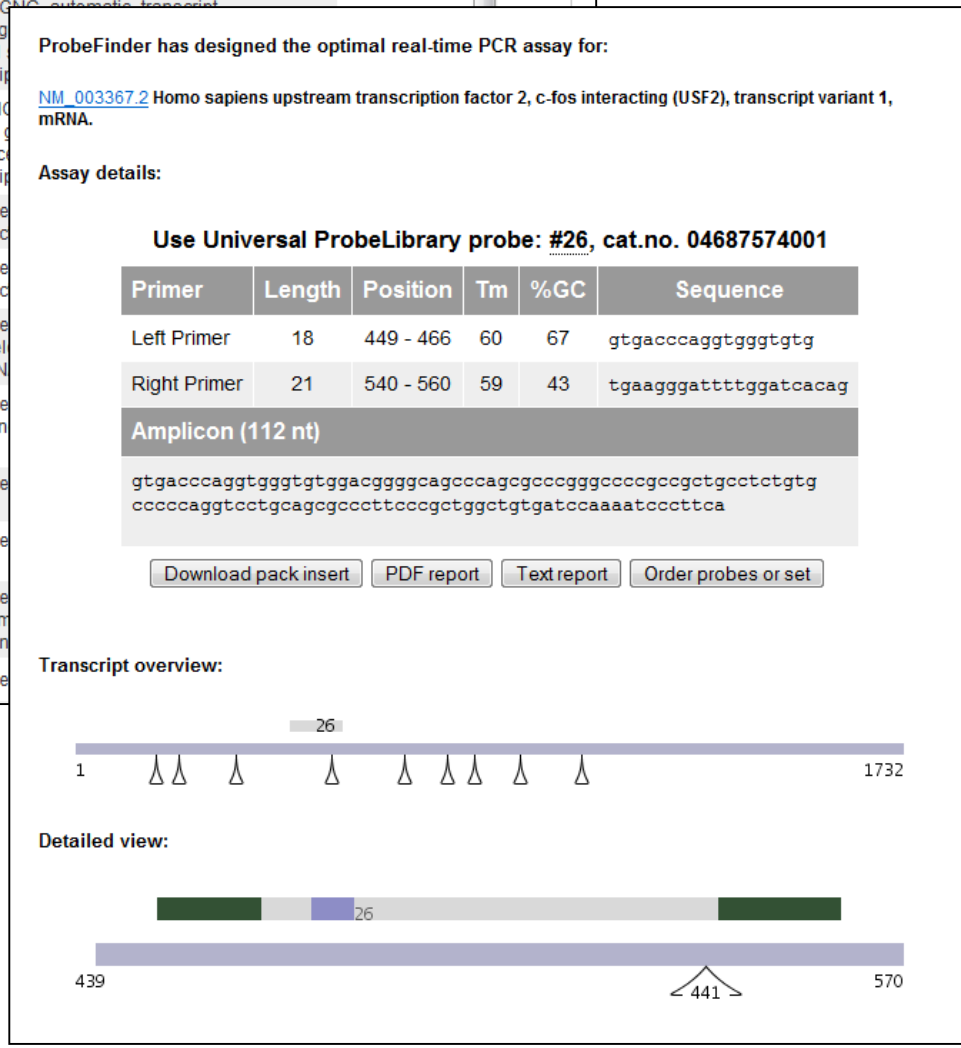
e.g.

```
>part of X00351 Human mRNA for beta-actin
CACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
GAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCCTGAACCCC
AAGGCCAACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG
TACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGTG
ATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCC
```

☑ Automatically select an intron spanning assay. ☐ Design multiplex PCR with reference gene.

Design primerů a sond





Design primerů a sond

Po dnešní přednášce:

- Rozumíte vlastnostem primerů i základních typů sond a znáte faktory, které ovlivňují jejich hybridizaci a účinnost

- Umíte navrhnout optimální sekvenci primerů i hydrolyzační sondy pomocí dostupných programů a rozumíte parametrům designu