

Polýmerázová řetězová reakce

V jakém množství deionizované vody rozpustíte lyofilizovaný vzorek primerů, aby jeho koncentrace byla 100 μM? Vzorek obsahuje 138,6 μg primeru, který je dlouhý 18 nukleotidů a jeho molekulová hmotnost je 5 119.

Řešení

10 ⁶ μl	1M roztoku má hmotnost	5 119 g primeru
10 ⁶ μl	100 μM roztoku má hmotnost	5 119 x 100 μg primeru
X μl	100 μM roztoku má hmotnost	138,6 μg primeru

$$X = 138,6 \times 10^6 / 5\ 119 \times 100 \mu\text{l} = 270,75 \mu\text{l}$$

Odpověď:

Vzorek lyofilizovaného plasmidu rozpustíme ve 271 μl deionizované vody.

Jaké množství primeru ze zásobního roztoku 100 μ M napipetujete do PCR reakce o objemu 20 μ l jestliže chcete do reakce dát 10pmol primeru?

Řešení

1M roztok	1mol částic/litr	1 μ mol částic/ μ l
1mM roztok	1nmol částic/ μ l		
1 μ M roztok	1pmol částic/ μ l		

100 μ M roztok	obsahuje	100 pmol	v	1 μ l
100 μ M roztok	obsahuje	10 pmol	v	X μ l

$$X = 10 \times 1/100 \mu\text{l} = 0,1 \mu\text{l}$$

Odpověď:

Chceme-li odebrat z roztoku 10pmol částic, pak odebereme 0,1 μ l.

Taq polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 190 a 490 bp?

Řešení:

150 nukleotidů	je připojeno za	1 s
190 nukleotidů	je připojeno za	X s

$$X = 190/150 = 1,27 \text{ s}$$

$$X = 490/150 = 3,27 \text{ s}$$

Odpověď:

Fragmenty jsou teoreticky nasyntetizovány za 1,27 sekundy a 3,27 sekundy

Jak dlouhý amplikon může vzniknout na níže popsaném úseku DNA (je uveden pouze jeden z komplementárních řetězců) pokud má experimentátor k dispozici následující dvojici primerů?

Primer forward:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG - 3'

Primer reverse:

5' - GAT AGC TAG AAT TGA TAG - 3'

Sekvence, na které probíhá amplifikace:

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG
TGA GTC ACC CCC GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT
TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

Řešení:

1) *Primer forward má stejnou sekvenci i orientaci jako zadaná sekvence*

2) *Primer reverse je třeba obrátit a vytvořit jeho komplementární sekvenci, je tedy třeba na zadané sekvenci hledat následující posloupnost:*

5' - CTA TCA ATT CTA GCT ATC - 3'

Pozice primerů jsou vyznačeny podtržením

5' - ATG TGA GCG GTC TAC TGG AAA TGC AGT GCA TCA GTC AGC GAT GGG
TGA GTC ACC CCC GTC ACG TCA GAT TCA TGA CTA AGC GTC CGT GCT
TGA TCG AGT CTA TCA ATT CTA GCT ATC ATC ATG GTT GAC ATC - 3'

Vzdálenost mezi ATG a ATC je 117 bp

Odpověď:

Na popsaném úseku DNA může vzniknout amplikon o délce 117 bp

Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje 10nmol nukleotidů za 30 minut při teplotě 72°C. Přepočtete tuto hodnotu na počet inkorporovaných nukleotidů za minutu.

Řešení:

10×10^{-9} mol	je připojeno za	30 min.
X mol	je připojeno za	1 minutu

$$X = 10 \times 10^{-9} / 30 \text{ mol}$$

1 mol	je	$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů
$10 \times 10^{-9} / 30$ mol	je	Y nukleotidů

$$Y = (10 \times 10^{-9} / 30) \times 6,023 \times 10^{23} / 1 \text{ [mol} \times \text{nukleotidů/mol]} \\ = 2 \times 10^{14} \text{ nukleotidů} = 200 \times 10^{12} \text{ nukleotidů}$$

Odpověď:

Jedna jednotka enzymu *Taq* polymerázy inkorporuje přibližně 200×10^{12} nukleotidů za minutu

Taq polymeráza připojuje nukleotidy rychlostí 150 nukleotidů/sekundu. Jak dlouho trvá tomuto enzymu, než nasyntetizuje fragmenty o délce 306 a 554 bp?

Řešení:

150 nukleotidů	je připojeno za	1 s
306 nukleotidů	je připojeno za	X s

$$X = 306/150 = 1,27 \text{ s}$$

$$X = 554/150 = 3,27 \text{ s}$$

Odpověď:

Syntéza těchto fragmentů trvá **Taq** polymeráze 2,04 sekundy a 3,69 sekundy

Jestliže frekvence začlenění chybného nukleotidu činí u *Taq* polymerázy 285×10^{-6} , kolikrát může tento enzym chybovat při syntéze 200 ng amplikonu o délce 500 bp? Co můžete říct o počtu chybných amplikonů v takovém výsledném vzorku DNA?

Řešení:

M (1 bp) = 650

1) Spočítáme počet nukleotidů v daném množství amplikonů

$6,023 \times 10^{23}$ nukleotidů	má hmotnost	650 g
X nukleotidů	má hmotnost	200×10^{-9} g

$$X = 6,023 \times 10^{23} \times 200 \times 10^{-9} / 650 = 1,85 \times 10^{14} \text{ nukleotidů}$$

2) Stanovíme podíl chybně začleněných nukleotidů

$$1,85 \times 10^{14} \times 285 \times 10^{-6} = 5,27 \times 10^{10} \text{ nukleotidů}$$

3) Stanovíme podíl chybných amplikonů

$$5,27 \times 10^{10} / 500 = 1,05 \times 10^8 \text{ amplikonů} = 105 \times 10^6 \text{ amplikonů}$$

Odpověď:

**Chybně bude začleněno $5,27 \times 10^{10}$ nukleotidů
105 milionů amplikonů bude chybných**

Poznámka:

Ve skutečnost bude počet chybných amplikonů vyšší, protože chyba v prvních cyklech se přenesla i do dalších amplikonů.