



Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Přírodovědecká fakulta Masarykovy university



SYNTETICKÉ OLIGONUKLEOTIDY

Hana Konečná

CENTRÁLNÍ LABORATOŘ
Masarykovy Univerzity v Brně

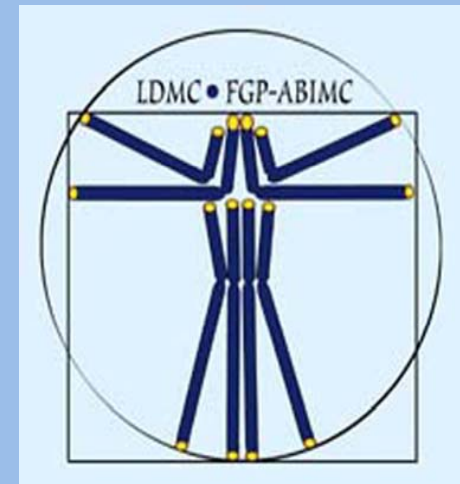
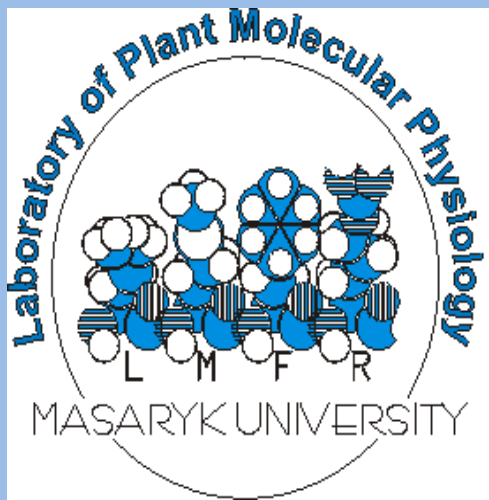


ODDĚLENÍ FUNKČNÍ GENOMIKY A PROTEOMIKY

Laboratoř molekulární
fyziologie rostlin

Centrální laboratoř
CL

Laboratoř analýzy
biologicky
významných komplexů



CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

- přístup k pokročilým technologiím na bázi sdílené instrumentace a její kvalifikované obsluhy

→ proteomické techniky

→ genomické techniky

- výuka - přednášky a praktické kurzy
- členství v ABRF
(Association of Biomolecular Resource Facilities)

TECHNIKY V CENTRÁLNÍ LABORATOŘI

- sekvenování a fragmentační analýza DNA
- syntéza a purifikace oligonukleotidů
- kapalinová chromatografie
- gelová elektroforéza
- analýza obrazu
- digesce proteinů
- hmotnostní spektrometrie
- minisklad reagensů pro molekulární biologii

SYNTETICKÉ OLIGONUUKLEOTIDY

- definice
- aplikace
- modifikace
- syntéza
- purifikace
- kontrola kvality

- design sekvence
- zásady navrhování
- software OLIGO 7
- praktická ukázka

oligonukleotid

- krátká jednořetězcová struktura
- DNA nebo RNA (event. PNA)
- **hydroxyl** na obou koncích
(normálně na 5' - konci fosfát)

oligonukleotid

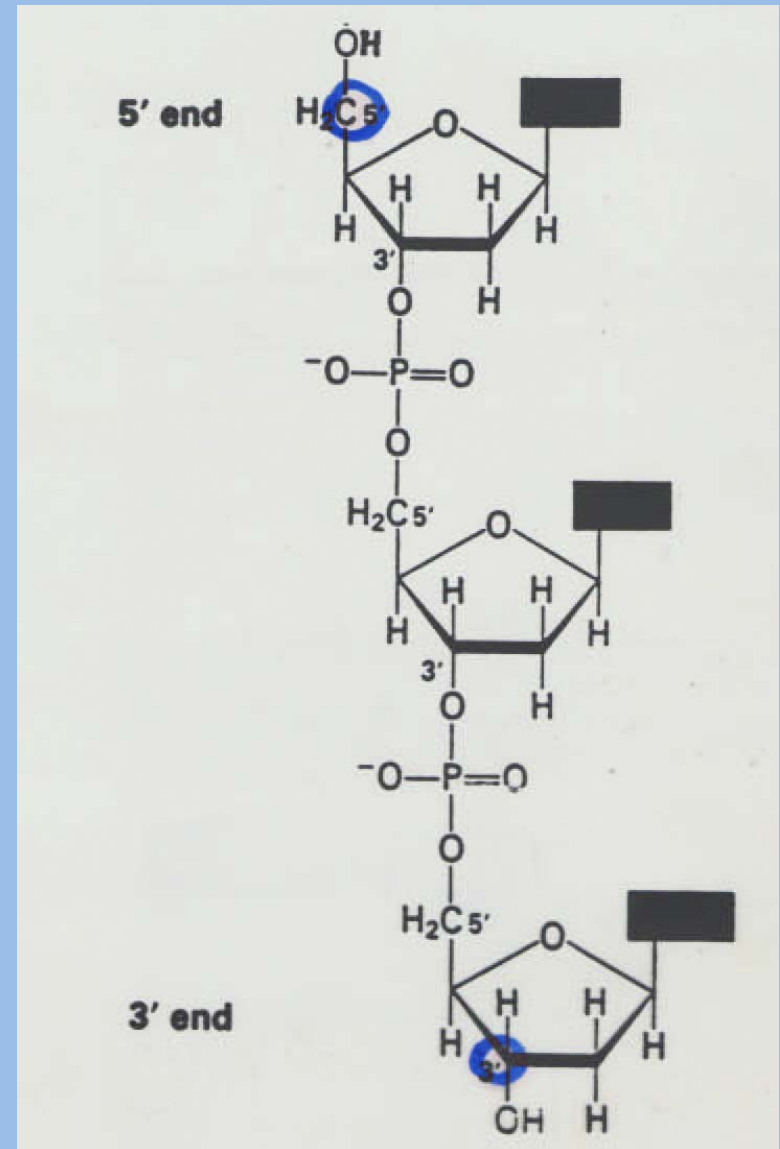


syntetický oligonukleotid



primer

orientace! polymeráza!

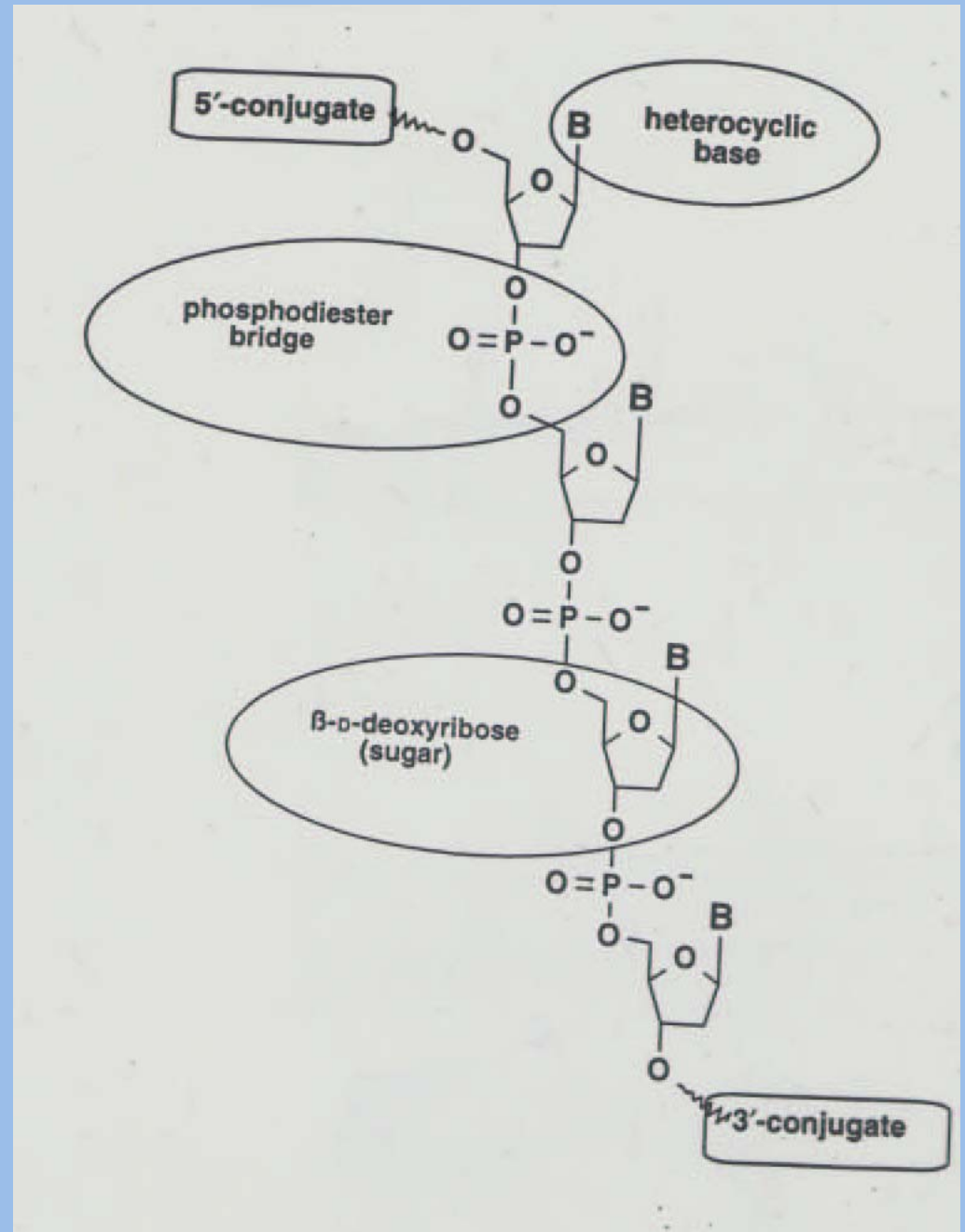


Aplikace syntetických oligonukleotidů

- konstrukce duplexů
- primery pro syntézu komplementární DNA
PCR, Real-Time PCR
- hybridizační sondy pro klonování
- místně cílená mutageneza
- strukturální rentgenová analýza NA
- NMR studia interakcí DNA-protein
- potenciální léčiva
- gene arrays

Modifikace

- degenerace
- konce řetězce
- báze
- fosfát
- cukr
- PNA



Degenerované oligonukleotidy

2-deoxyinosin ?

univerzální báze:

3-nitropyrrol ?

5-nitroindol ?

M	A or C
R	A or G
W	A or T
S	C or G
Y	C or T
K	G or T
V	A or C or G
H	A or C or T
D	A or G or T
B	C or G or T
N	G or A or T or C
X	G or A or T or C

Degenerované oligonukleotidy

Příklady:

ACG TAC GTA CGT ACG TAC nedegenerovaný

ACG T**A**M GTA CGT ACG TAC M = A/C

ACG TAC GTA C**D**T ACG TAC D = A/G/T

ACG TAC GTA CGT ACG **N**AC N = A/C/G/T

Modifikace na 5' - konci

postsyntetické modifikace

sekvenování
fragmentační analýza
gene arrays
Real-Time PCR

5'

fosforylace

aminoskupina

thioskupina

digoxigenin

biotin

enzymy

psoralen

akridin

cholesterol

fluoresc. barviva

zhášedla

2,4-dinitrofenyl

TBR-chelát

spacer

větvení

blokáda

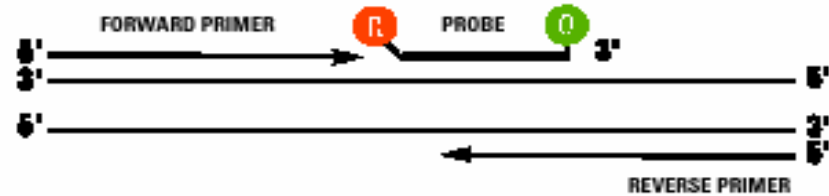
Modifikace na 3'-konci

derivatizovaná matrice

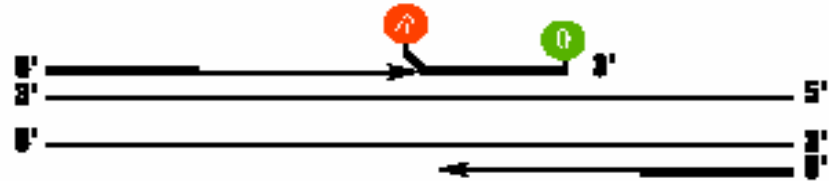
- 3'
- fosfát
- thioskupina
- aminoskupina
- spacer
- akridin
- biotin
- fluoresc.barviva
- zhášedla
- cholesterol
- 2,4-dinitrofenyl

Real-Time PCR

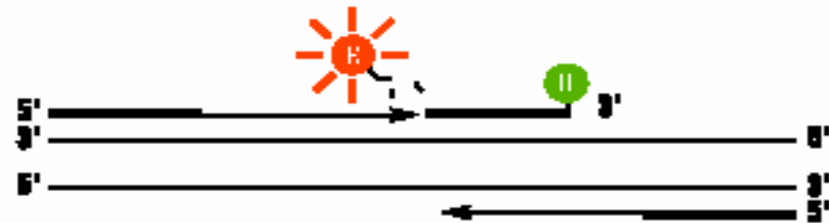
- 2x značená sonda
- REPORTER
- QUENCHER



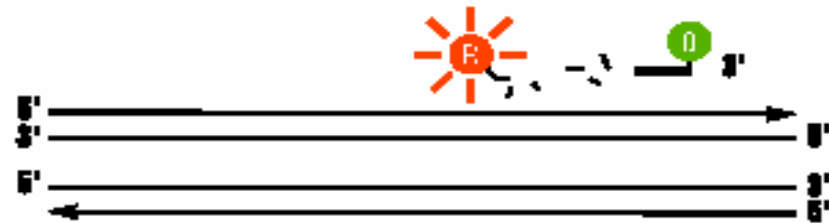
2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



Další modifikace

fosforothioáty
fosforodithioáty
H-fosfonáty
metylfosfonáty

← páteř

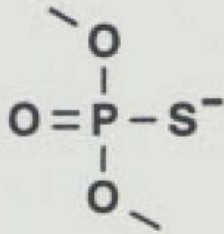
cukr →

modifikace v 2' pozici
modifikace ribózové jednotky

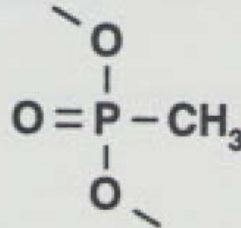
Terapeutika

nedegradována nukleázami!

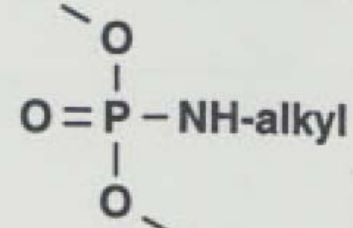
→ modifikace fosfodiesterové vazby



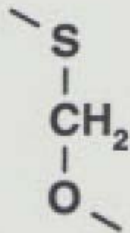
phosphorothioate



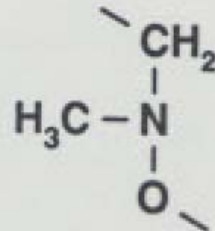
methylphosphonate



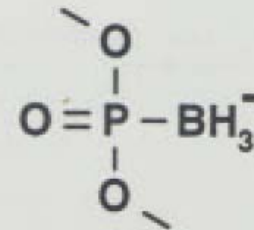
phosphoramidate



3'-thioformacetal



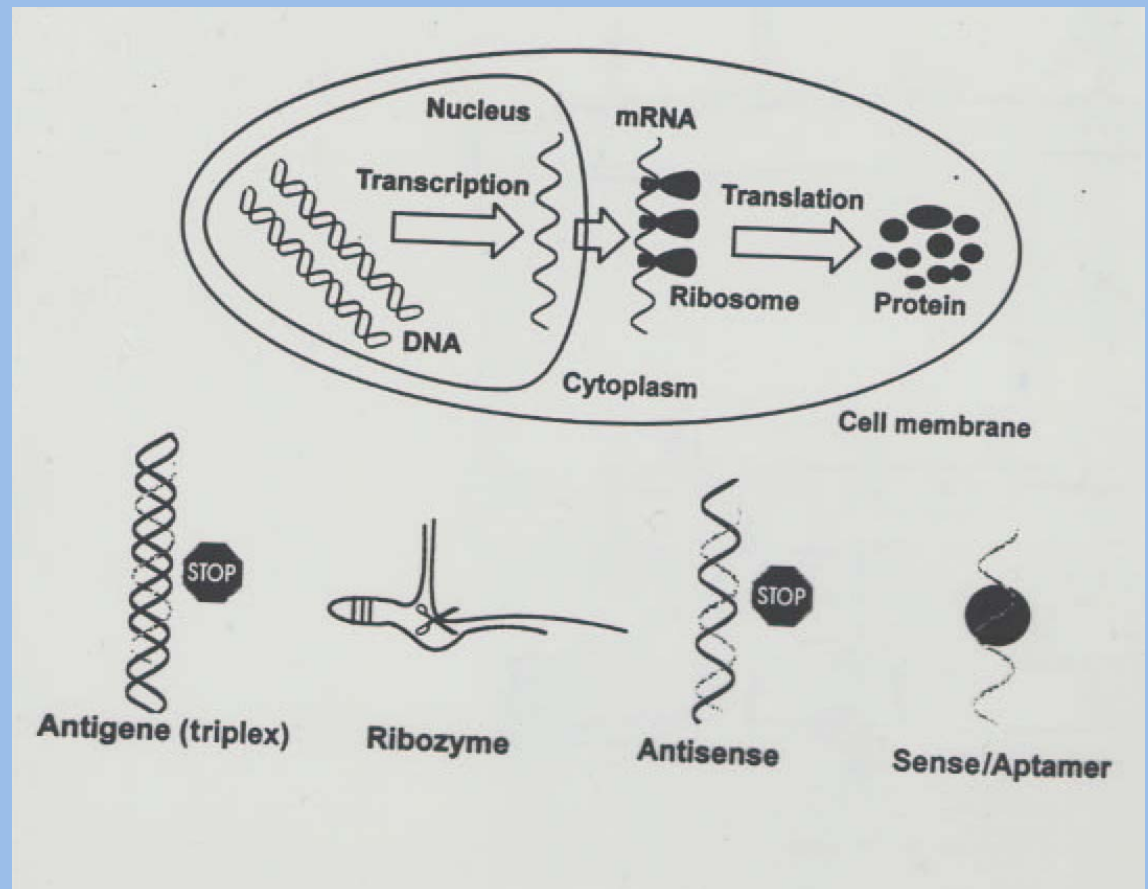
methylene(methyliminio)



boranophosphate

ANTISENSE oligonukleotid

- oligonukleotid nebo analog
- komplementární k segmentu RNA nebo DNA
- vazbou inhibuje jejich normální funkci

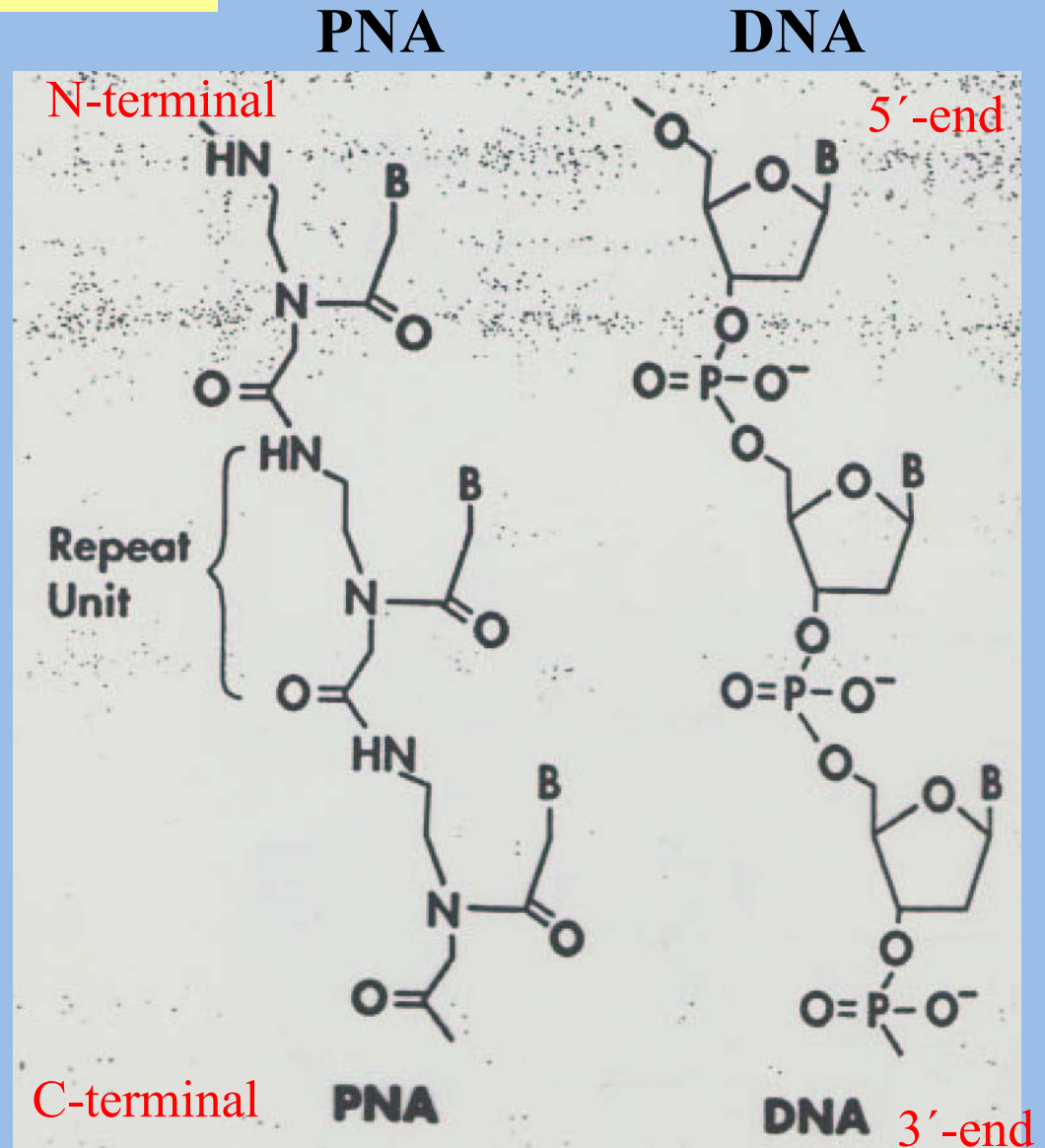


Peptidonukleová kyselina

PNA

- nenabitá molekula
- vazba k DNA/RNA

N-(2-aminoethyl)-glycin →



Peptidonukleová kyselina

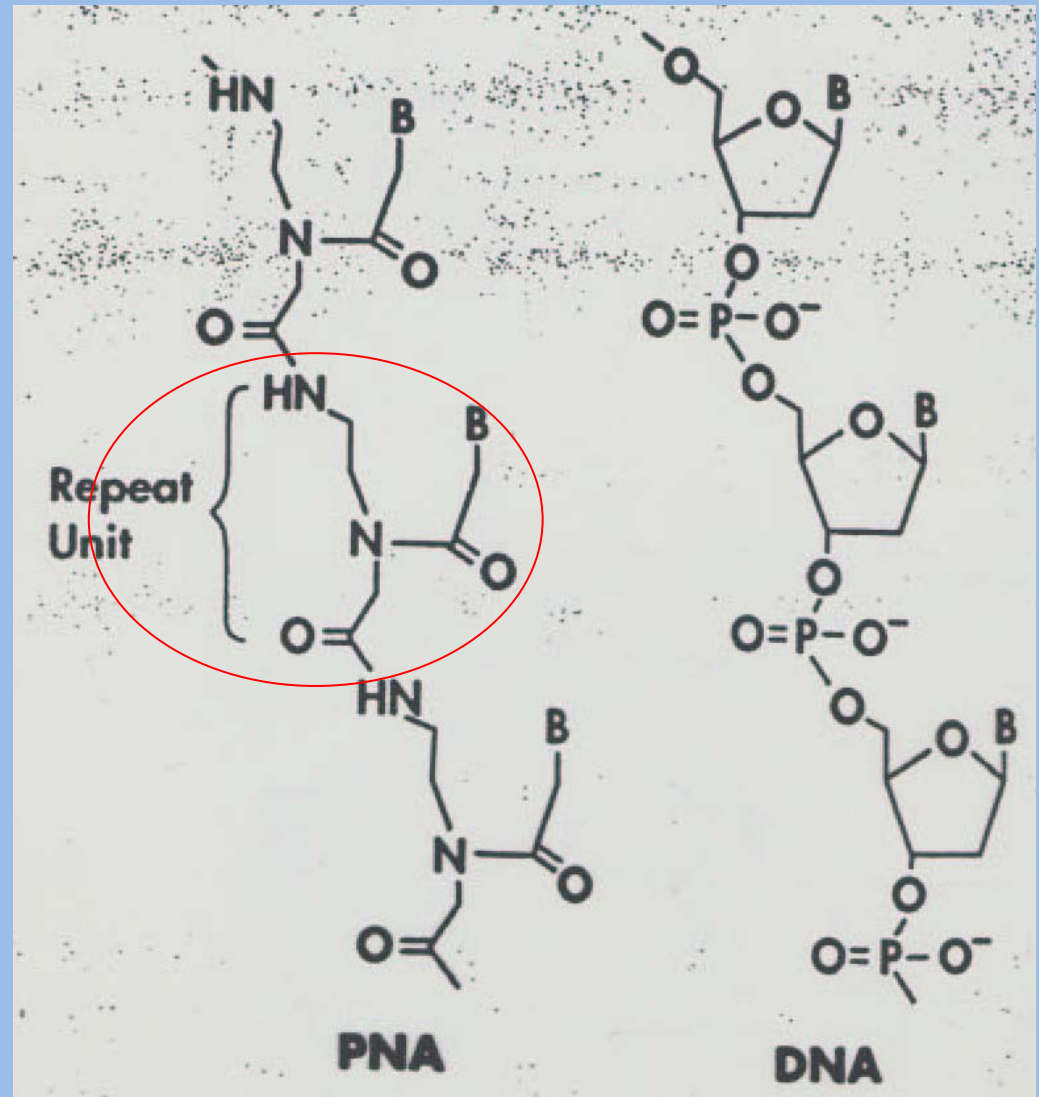
PNA

- nenabitá molekula
- vazba k DNA/RNA

N-(2-aminoethyl)-glycin →

PNA

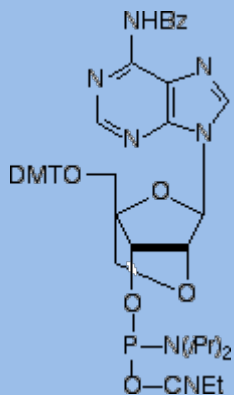
DNA



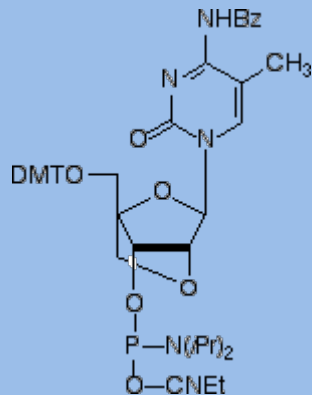
Vlastnosti PNA

- vysoká termostabilita
- T_m nezávisí na obsahu solí
- vyšší specificita
- vyšší afinita
- rezistentní k enzymům...

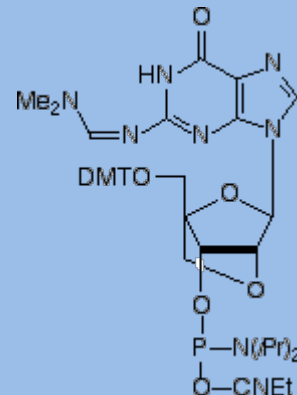
LNA



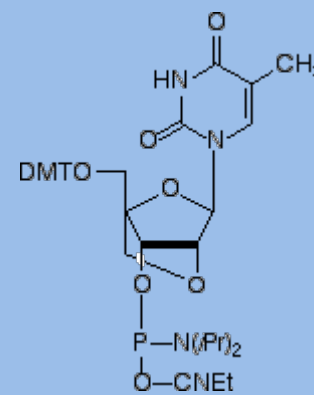
Bz-A-LNA



5-Me-Bz-C-LNA



dmf-G-LNA



T-LNA

Locked Nucleic Acid

2'-O, 4'-C methylenový můstek

potlačená flexibilita ribofuranózového kruhu

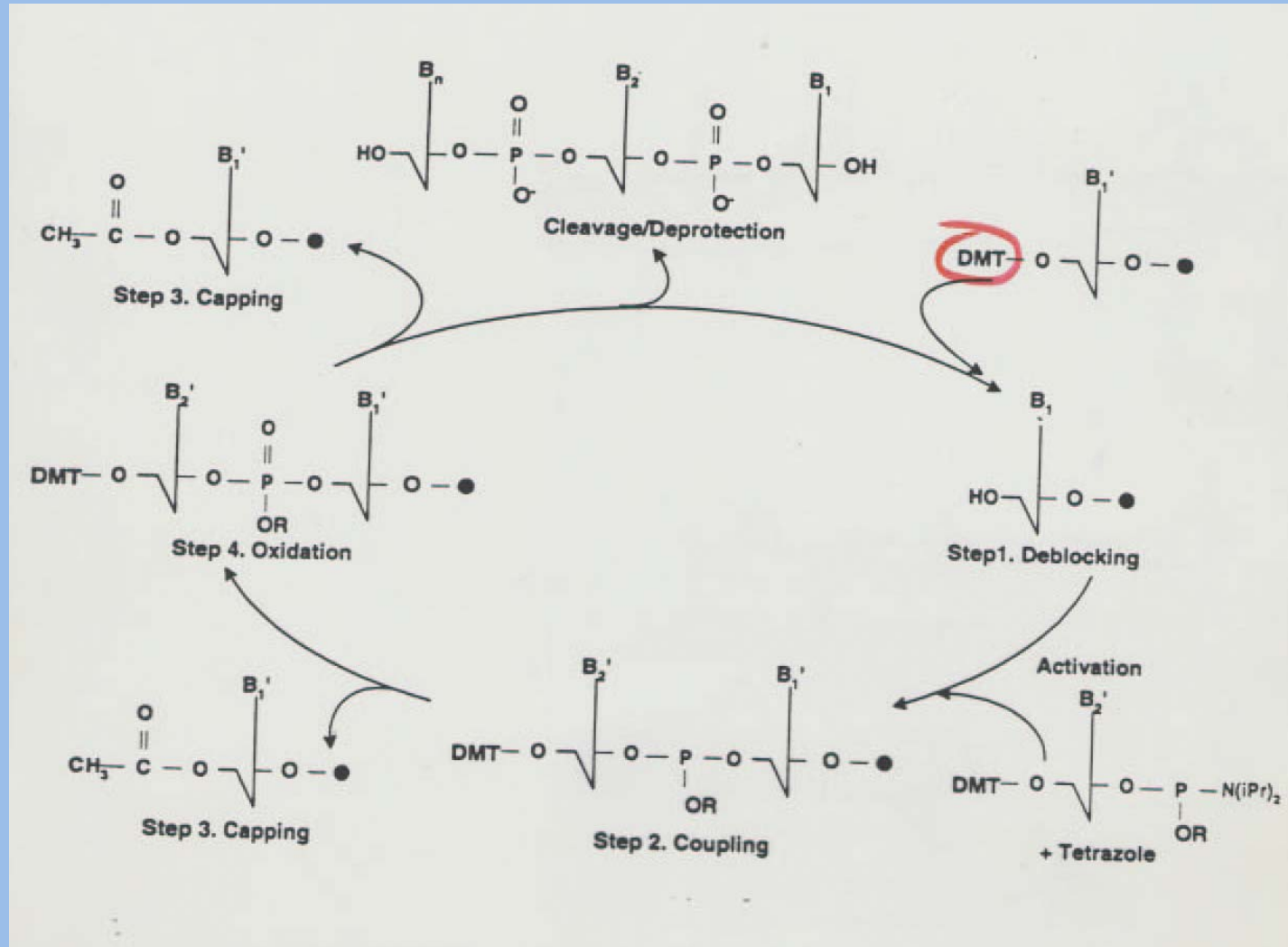
struktura je **zamčena** do rigidní C3-endo konformace

zlepšená hybridizace

výjimečná biostabilita

Syntéza oligonukleotidu

- organická syntéza na pevné fázi
- od 3'-konce k 5'-konci
- bezvodé prostředí



OLIGONUKLEOTIDY

design

syntéza

purifikace



EXPEDITE 8909

EXPEDITE 8909

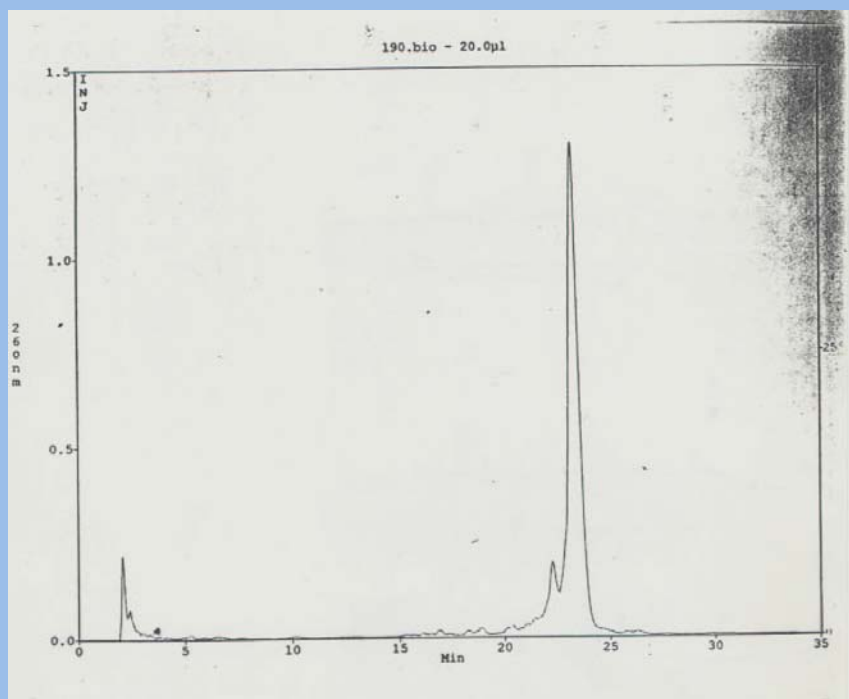
- rychlost
- nízká spotřeba reagensů
- několik koncentračních rozsahů
- dvě paralelní syntézy
- protokoly pro DNA, RNA, PNA, fosforothioáty
- Workstation: možnost editace základních protokolů - syntéza modifikací (značení biotinem, fluorescenčními značkami, degenerované oligonukleotidy, užití inosinu, aminoderiváty aj.)

Kontrola kvality

HPLC

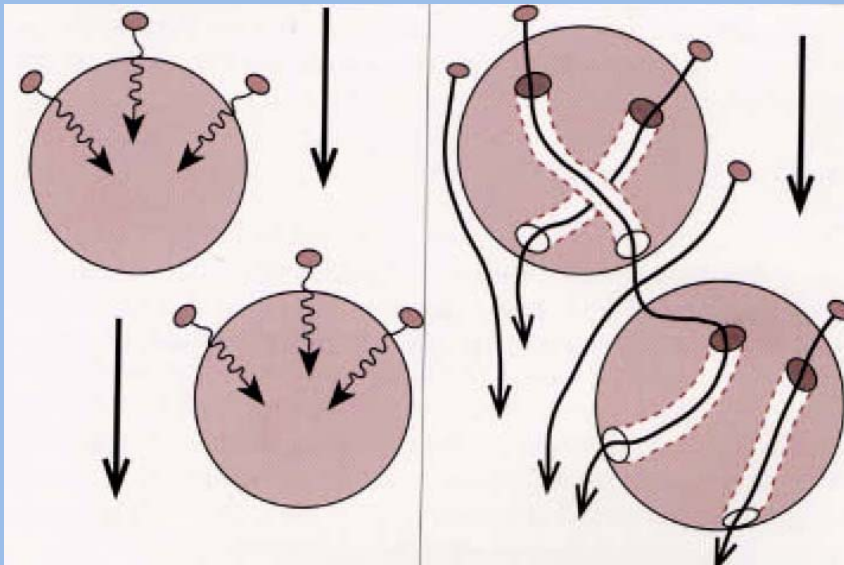
Perfúzní chromatografie

- anex
- RP



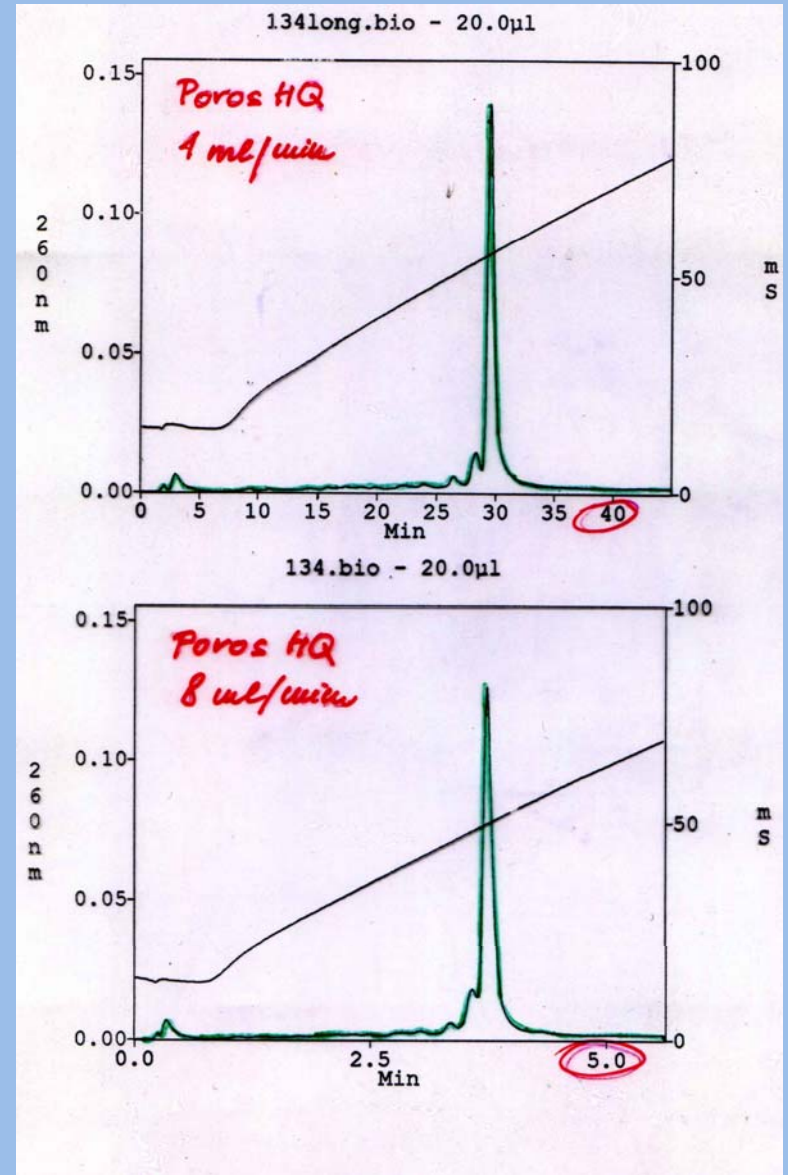
Perfúzní chromatografie

POROS



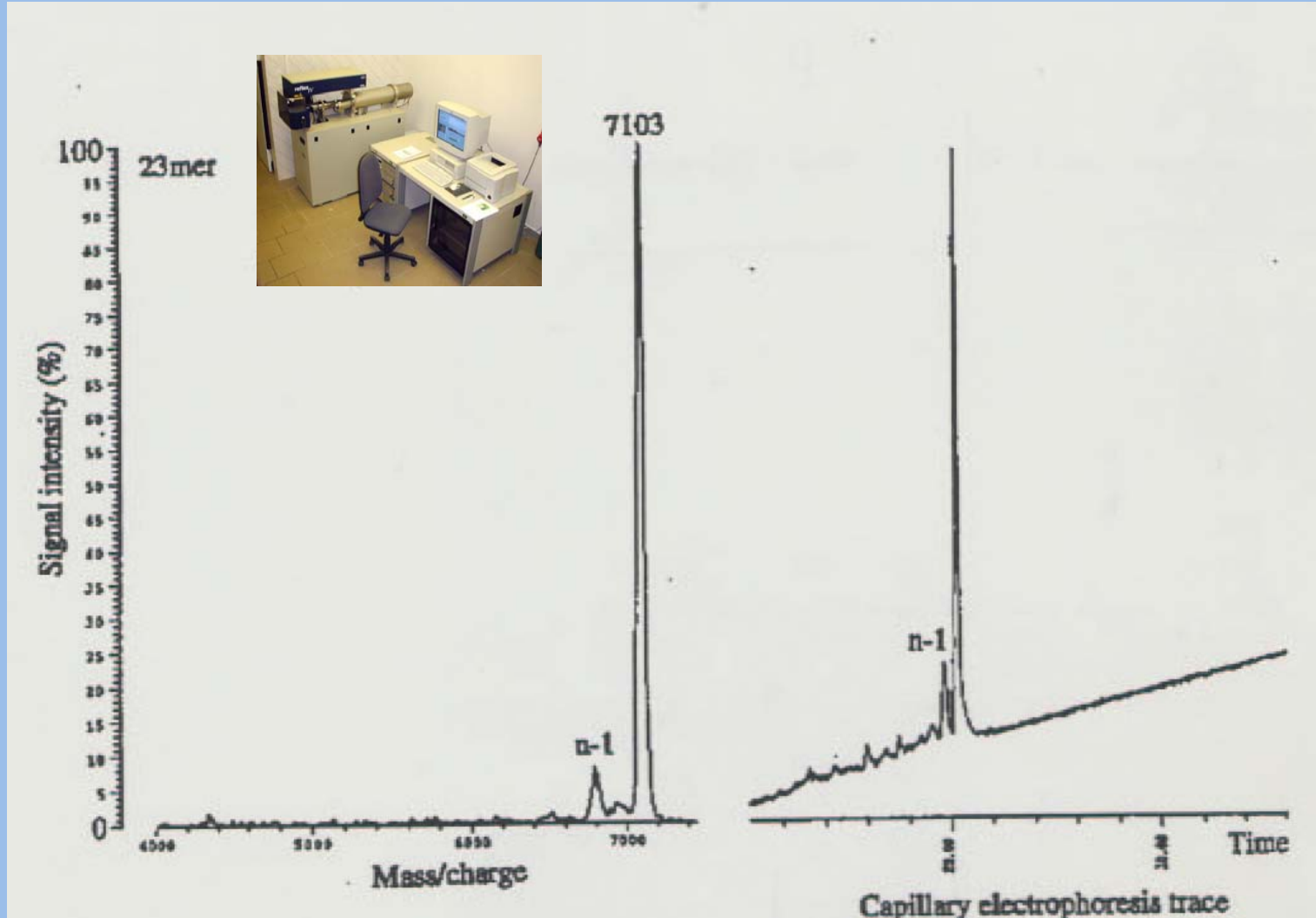
klasický sorbent

POROS

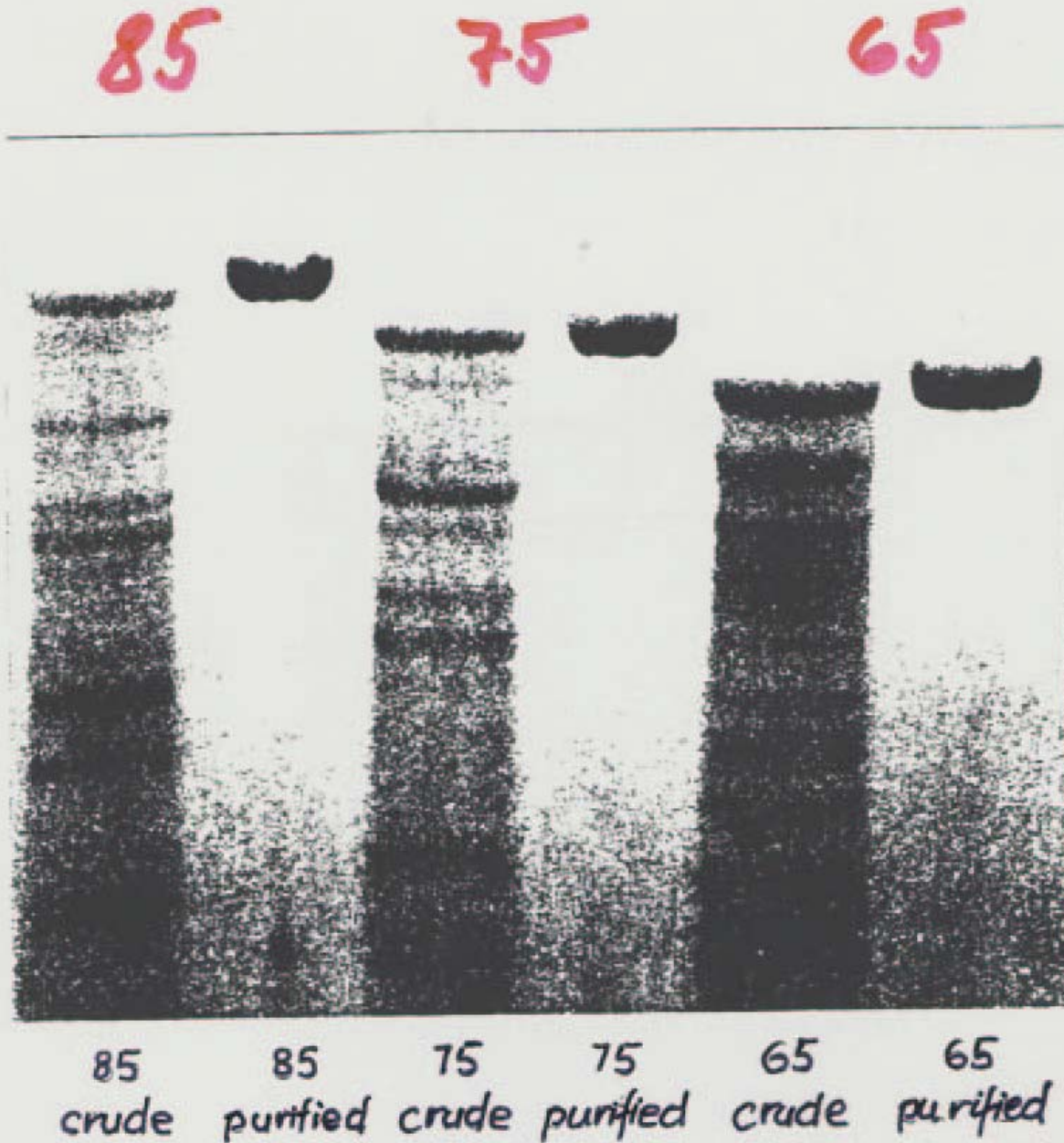


Maldi-Tof MS

CE

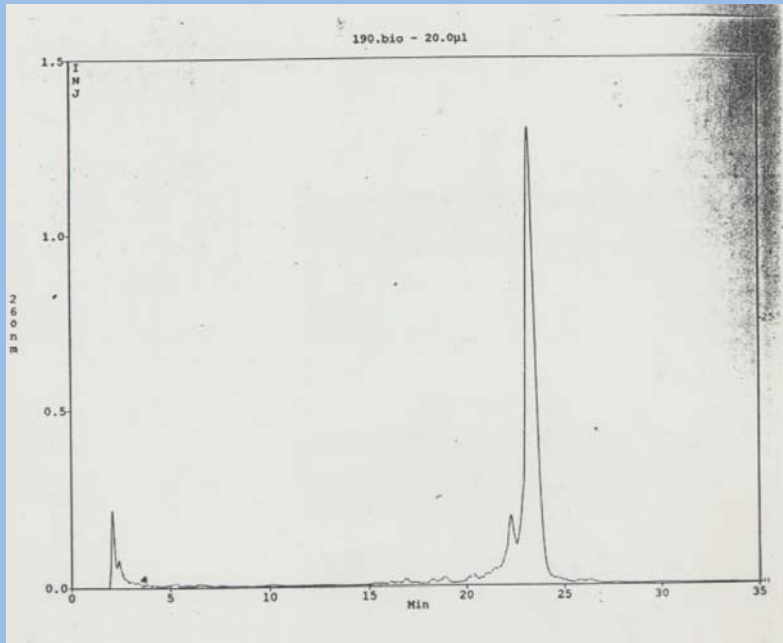


PAGE

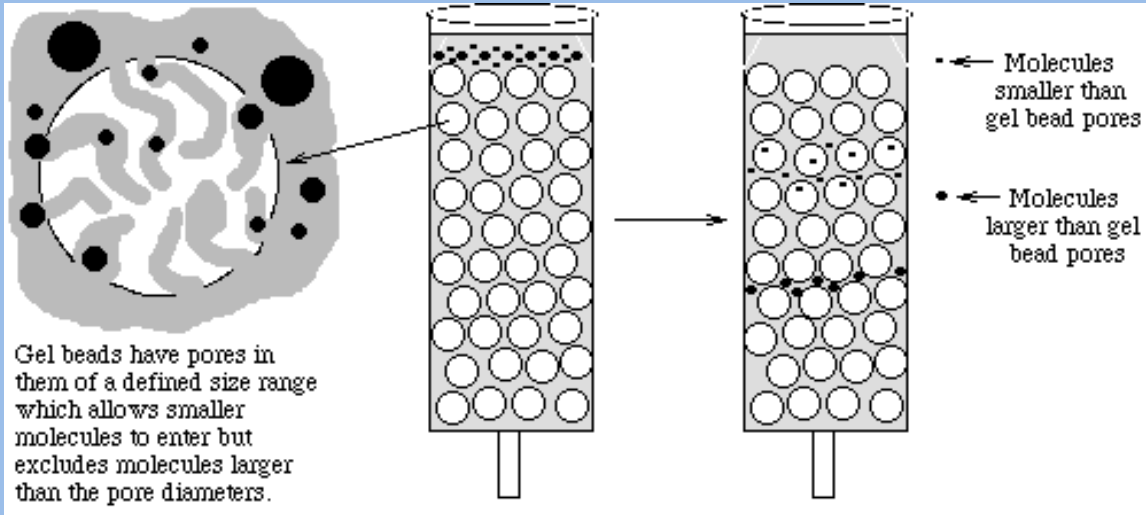


PURIFIKACE

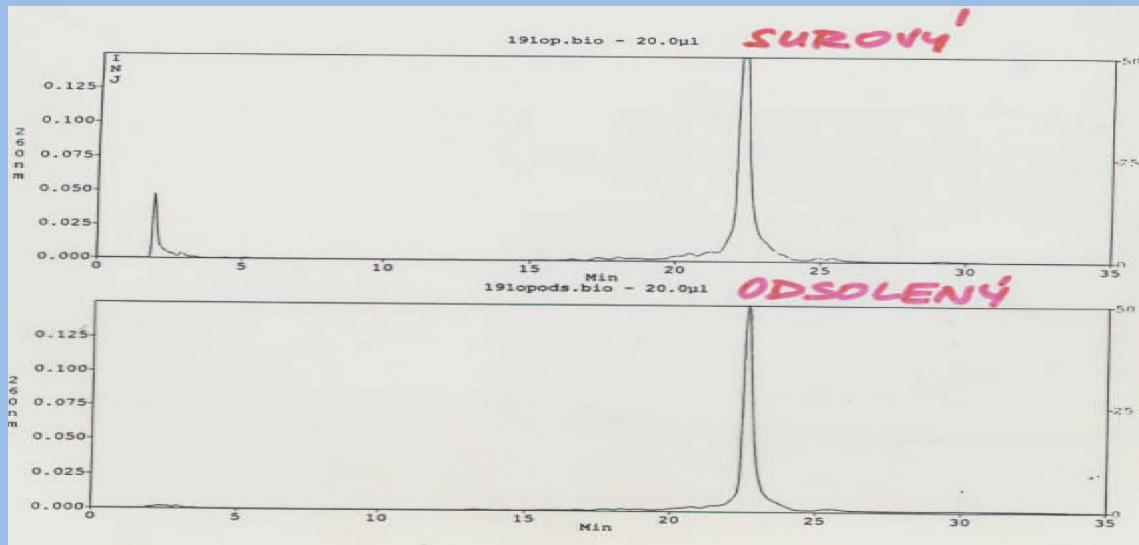
Sephadex
RP cartridge
HPLC



Odsolování



- soli
- oligonukleotid



OBJEDNÁVKY

www.sci.muni.cz/FGP

- on-line
- e-mail
- písemně

FGP - Firefox

Soubor Úpravy Zobrazit Přejít Záložky Nástroje nápověda

file:///c:/Documents%20and%20Settings/lnmfr/Dokumenty/DOCUMENTS/zaloha/CL/FGP.htm

Mozilla Firefox Přehled zpráv Startovní stránka M... Startovní stránka M... Bio-Chem Valve Inc. ... Labelling miniprotein leaking ... idos.cz - Vyhledat G... Vivascience : Protein... Ústav imunologie Pet...

English

Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

ABVMK CL LMFR

Vyhledávání OK

OFGP

- o NÁS
- o VÝZKUM
- o VÝUKA
- o PUBLIKACE
- o SPOLUPRÁCE
- o NOVINKY
- o VOLNÁ MÍSTA
- SLUŽBY**
 - proteomické techniky
 - genomické techniky
 - syntéza oligonukleotidů
 - minisklad další
- o TECHNICKÉ ZÁZEMÍ
- o ODKAZY
- o KONTAKTY

SLUŽBY

Proteomické techniky
Genomické techniky
Syntéza oligonukleotidů
Minisklad pro molekulární biologii

PROTEOMICKÉ TECHNIKY

Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza (Bio-Rad)
Kapalinové chromatografie Ultimate (Dionex-LC Packings)
Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000 (Bruker)

Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundančních proteinů, prefračníci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesci (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

Kontaktní osoby

<u>Hana Konečná, RNDr.</u>	54949 5050	hanak@sci.muni.cz
	54949 1465	
<u>Zbyněk Zdráhal RNDr., Dr.</u>	54949 1466	zdrahal@sci.muni.cz
	54949 8258	

Objeďnávkový formulář
Ceník elektroforetických separací
Ceník MS analýz

DNA SEKVENOVÁNÍ A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

Genetický analyzátor DNA ABI PRISM 310, Perkin Elmer

Automatické stanovení sekvence nukleotidů DNA metodou kapilární elektroforézy s laserovým detektorem. Z jednoho stanovení je obvykle čitelných 450 - 600 bází. Výkonost přístroje: až 4 500 bází/den. Další aplikací je stanovení délek fragmentů DNA, které je základem řady molekulárně-genetických analýz při charakterizaci genomových lokusů nově izolovaných genů, charakterizaci mutací a určování příbuzenských vztahů mezi jedinci. Kapacita až 825 genotypů denně.

Přečtěte si, prosím, **pravidla služby sekvenování**.

Kontaktní osoba

<u>Eva Paďerová MSc.</u>	54949 6341	paderova@sci.muni.cz
	54949 2517	

Objeďnávkový formulář pro sekvenaci DNA.

Hotovo

Start Inbox - Mozill... C:\Documents... corel-obr001)... Microsoft Pow... Acrobat Read... FGP - Firefox Správce sťah... Corel CAPTUR... CS 16:28

DESIGN OLIGONUKLEOTIDU

- manuální
- počítačový

www.protocol-online.org/prot/Research_Tools/Online_Tools/Oligo_Design/index.html

Hlavní kritéria pro sekvenci PCR primeru

- vysoce specifické
- netvoří dimery a vlásenky
- stabilní duplexy s aktivní sekvencí
- nepřiliš stabilní 3'-konec



OLIGO 6

- PCR primery,
- hybridizační sondy
- sekvenační primery

OLIGO 7 (od roku 2008)

- TaqMan sondy
- primery pro *nested PCR*
- *molecular beacons*
- siRNA

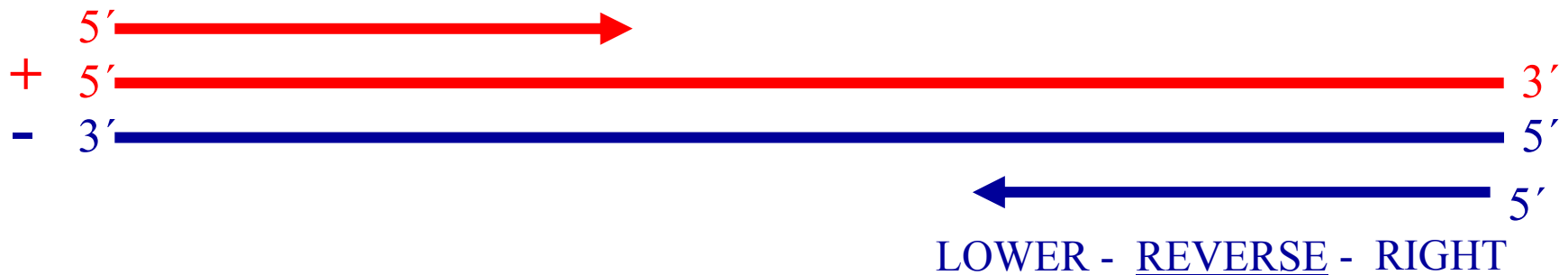
Terminologie PCR primerů

forward primer... část sekvence + vlákna

reverse primer... část sekvence - vlákna



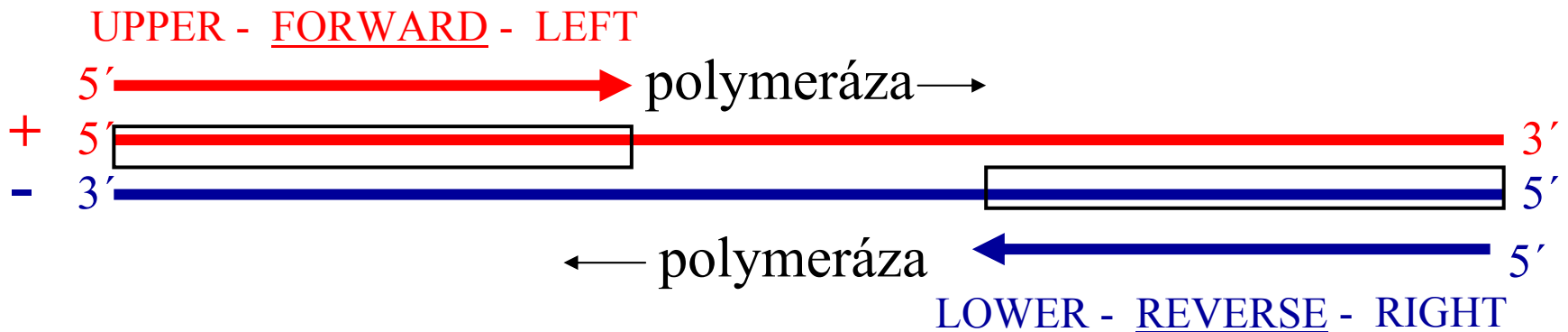
UPPER - FORWARD - LEFT



Terminologie

forward primer... část sekvence + vlákna

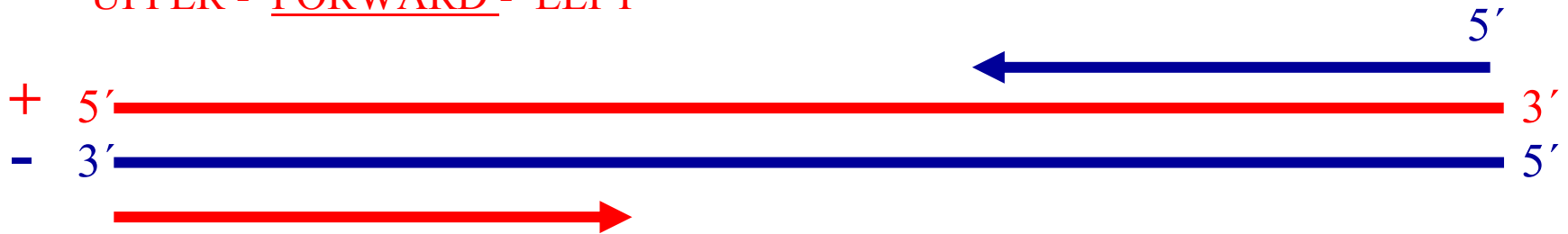
reverse primer... část sekvence - vlákna



Nasedání PCR primerů



UPPER - FORWARD - LEFT



5'

LOWER - REVERSE - RIGHT

5' CTT CTG CTC AAT CTT TCT AC 3' FORWARD

+ 5' 1 ATGGCTTCTG CTCAATCTTT CTACAACCAA AGCTCTGTCT TGAAAATCAA
51 TGTCATGGTT GTGGACGATG ATCATGTTTT CCTTGATATC ATGTCACGCA
101 TGCTTCAACA CTCCAAATAC AGAGGTAATT AAATATTATT ATCATATTAT
151 ATATAATATG TTATTGATT TTTGTTTGTG ATTTCATTTA GATTTTTATT
201 TCTATGATTT CTTAGCATGA AATACAATTT TTGGAGAAAC AACTAGCAGT
251 TTTAAAAACA AAACCTGAAT TTTGAGAAAT TCAAAGATGT TATATATATA
301 TGTCAAAATT TAACAATTAT TCTTCTAAAT CATCCGGATT CCGTTTACAT
351 GTACACATCT ACAATTTTCA ATTGAGGTAT TCTTGTTTTG ATGCCTTTGA
401 GACGAATAGT TTGATTGATA AAAAAAATTC TAACCAATAT GATATATAAA
451 GTTTATTTTC TTTTGTCAA ACCATACTTT AACTATGTA ACTTTTTTAA
501 GAGATTATTG AAAATAGTTT ATTTATAAAA TAGTAACCTA TTGTTGAATT
551 AAAAAAAAAA AAAAAATTGT AAATCGTGTT TGCAAACGAC ATGTGATTTA
601 TCTTAGTTTA AACTAGCTG ATATTCTTCA AATCGACTGT TCTTATAAGT
651 AATCAACCAA TTAGCATCAA TCACAATAAA TTGTAAACAC TTCAATGAAA
701 ATGGTGATTT TAAAGAATAT GTTTACTTA TGTTATGAAC TATCTCAAAT
751 TTGTGAAATA TTTCATAACT AATGTGGAAA ACTATATAAC CCCTCCATAC
801 AAAACGTAAG TAAAATTTAT GAAATCCTAT CATTTTTAAA GGTTAAACCA
851 ATCAAAAAGT AATAATTCTT GGTACTTGCA ATATTTTTGT CATTATATTT
901 TAGTTTATTA ATTTTATTTT GATTAAATGG TTTTAGATCC ATCAGTTATG
951 GAGATCGCAG TTATAGCTGT AGACGATCCG AAGAAAGCAT TATCTACTCT
1001 AAAAATTCAA CGAGACAATA TAGATCTCAT AATCACAGAT TATTATATGC
1051 CTGGTATGAA CGGTTTACAA CTCAAAAAC AAATCACTCA GGAATTTGGA
1101 AATTTACCGG TCTTAGGTAA CATTTTTTGT TCTTTACAAC TTAAATTTAA 3'

5' TGA AGA ATA TCA GCT AGT TT 3' REVERSE

Search for Primers & Probes

Search Options

Subsearches

Search in: + Strand - Strand

Search Mode: Select Verify

Complex Substrate

PCR Primers

Compatible with the Forward Primer Reverse Primer

TaqMan Probes & PCR Pairs

Compatible with the Upper Probe Lower Probe

Molecular Beacons & PCR Pairs

Nested Primers

Sequencing Primers

Hybridization Probes

siRNA Probes

After successfull search show:

Search

Cancel

Apply

Parameters

Ranges

Defaults

Search for Primers & Probes

Search Options

Subsearches

Search method: Compatible Pairs

- Eliminate Ambiguous Bases
- Duplex-free Oligonucleotides
- Highly Specific Oligonucleotides (3'-end Stability)
- 5'-end Stability
- siRNA Internal Stability
- Oligonucleotides with GC Clamp
- Oligonucleotides within Selected Tm Limits
- Hairpin-free Oligonucleotides
- Eliminate Mono- and Di-Nucleotide Repeats
- Detect Sequence Repeats
- Eliminate Frequent Oligonucleotides
- Omit High Secondary Structure Regions in the Template
- Check Primers/Probe Sequence Constraints
- Restrict the Number of G Bases
- Eliminate False Priming Oligonucleotides
- and Continue Above Search in Other File(s)
- Consensus Primers

Search

Cancel

Apply

Parameters

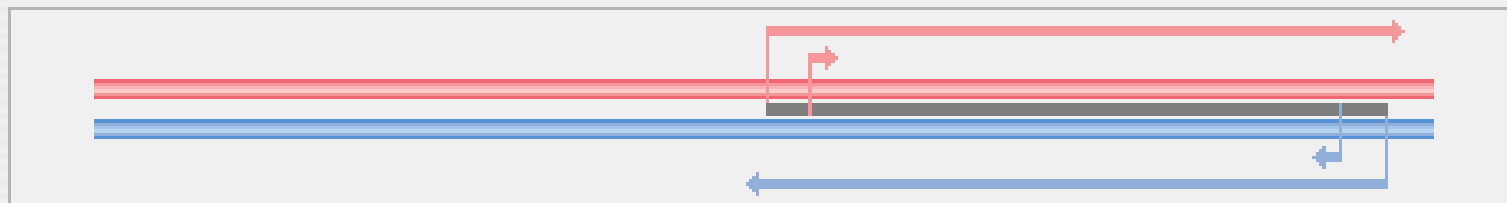
Ranges

Defaults



PCR

File: Human 4E.seq



Optimal Annealing Temperature: 50.8 °C (Max: 66.3 °C)

	Position and Length		T_m [°C]	GC [%]	P.E.#	Score
Product	862		78.9	29.6	n/a	697
Forward Primer	918	22	56.9	45.5	471 / 471	840
Reverse Primer	1753	27	55.3	29.6	489 / 489	834
Upper Oligo	979	24	56.5	33.3	479 / 479	917
Lower Oligo	1694	23	55.4	39.1	457 / 457	841

Product T_m - Reverse Primer T_m : 23.6 °C

Primers T_m difference: 1.6 °C

Comments:

	Concentration	
Forward Primer	200.0	nM
Reverse Primer	200.0	nM
Upper Oligo	200.0	nM
Lower Oligo	200.0	nM
Monovalent Cation	50.0	mM
Free Mg[2+]	0.7	mM

Total Na[+] Equivalent: 155.8 mM

Selected Primers			
File: BRCA2 gene.seq			
AY436640:15438F22		AY436640:15917R20	
5' CAATATATACCGTAGTCCCCTA 3'		5' CAGCTACATATTACGCCAGA 3'	
Length:	22-mer		20-mer
Score:	802 points		914 points
5' Position:	15438		15917
T_m/t_m :	53.4	52.6 °C	53.1
$\Delta G/\Delta g$ (25 °C):	-30.5	-29.2 kcal/mol	-28.6
$\Delta S/\Delta s$:	-472.1	-449.5 cal/°K * mol	-430.5
$\Delta H/\Delta h$:	-171.3	-163.2 kcal/mol	-157.0
3' ΔG :	-6.5 kcal/mol		-6.9 kcal/mol
Degeneracy:	1		1
P.E.#:	443/443		477/477
1/E:	4.63 nmol/A ₂₆₀		5.05 nmol/A ₂₆₀
	31.1 µg/A ₂₆₀		31.0 µg/A ₂₆₀

Priming Efficiency PE

- DUPLEXY
- DIMER intermolekulární
 - HAIRPIN intramolekulární

Current Oligo Duplexes

File: BRCA2 gene.seq

Current Oligo 21-mer [5042]

[Current+ Oligo] - The most stable 3'-dimer: # of hydrogen bonds = 10; $\Delta G = -0.7$ kcal/mol

```

5' GAATTAGATAAAATTCAAATTA 3'
      |||||
3' ATTAAACTTAAATAGATTAAG 5'

```

[Current- Oligo] - The most stable 3'-dimer: # of hydrogen bonds = 10; $\Delta G = -7.3$ kcal/mol; $T_m = 2.9^\circ\text{C}$

```

5' TAATTTGAATTTATCTAATTC 3'
      |||||
3' CTTAATCTATTTAAGTTTAAT 5'

```

The most stable dimer overall: # of hydrogen bonds = 10; $\Delta G = -7.4$ kcal/mol; $T_m = 2.2^\circ\text{C}$

```

5' GAATTAGATAAAATTCAAATTA 3'
      |||||
3' ATTAAACTTAAATAGATTAAG 5'

```

Hairpin: loop = 5 nt; $\Delta G = -3.0$ kcal/mol; $T_m = 54.6^\circ\text{C}$

```

5' GAATTAG-
      |||||
3' ATTAAACTTAAAT-

```



Current Oligo Hairpin Stems

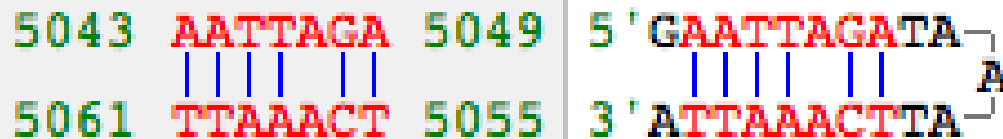
File: BRCA2 gene.seq

Current Oligo 21-mer [5042]

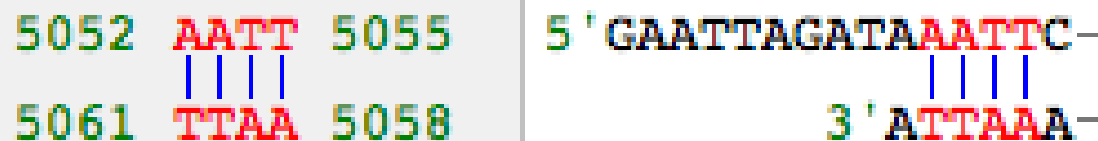
1. # of paired bases = 5; loop = 5 nt; $\Delta G = -3.0$ kcal/mol; $T_m = 54.6$ °C



2. # of paired bases = 6; loop = 5 nt; $\Delta G = 0.2$ kcal/mol; $T_m = 21.7$ °C



3. # of paired bases = 4; loop = 2 nt; $\Delta G = 0.9$ kcal/mol; $T_m = 8.7$ °C



Reverse Primer False Priming Sites

File: M13MP18

Reverse Primer M13MP18:6310R19 (positive strand)
Priming efficiency of the perfect match is 482 (above the threshold)

Priming efficiency: 482 (above the threshold)

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 ||| |||
3' (6328) c**caaa**ag**ggt**c**agt**g**ctgc** (6310)5'

Priming efficiency: 244 (above the threshold)

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 ||| |||
3' (626) ag**caa**at**ggtc**--**tgctgc** (610)5'

Priming efficiency: 193 (above the threshold)

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 ||| |||
3' (5125) t**cta**ag**tggt**c**agt**g**tg** (5108)5'

Priming efficiency: 191 (above the threshold)

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 ||| |||
3' (808) g**ta**at**atggt**c**agt**c**ctgc** (790)5'

Priming efficiency: 179

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 |||
3' (6315) t**gct**g**caac**at**ttt**g**ctgc** (6297)5'

Reverse Primer M13MP18:6310R19 (negative strand)
Priming efficiency of the perfect match is 482 (above the threshold)

Priming efficiency: 105

5' (6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**ACG** (6310)3'
 ||| |||
3' (5744) c**caaaa**ag**cggg**aa**actgc** (5762)5'



Forward Primer Composition

File: BRCA2 gene.seq

Forward Primer AY436640:6275F19

T_d	64.2°	[nearest neighbor method]
T_m	56.5°	[nearest neighbor method]
T_m	70.8°	[%GC method]
T_m	56°	[2(A+T) ^o + 4(G+C) ^o method]
T_m (RNA)[1M Na]	81°	[%GC method]
T_m (DNA:RNA)[1M Na]	74.7°	[%GC method]
A_{260}/A_{280}	1.59	[single strand]
Molecular Weight	5.8K	[one strand]
Molecular Weight	11.7K	[two strands]
$\mu\text{g}/\text{OD}$	47.4	[dsDNA]

Base	Number & %
A	2 [10.5%]
C	5 [26.3%]
G	4 [21.1%]
T	8 [42.1%]
A + T	10 [52.6%]
G + C	9 [47.4%]

DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	0.006	24.8	18.3	-7.7
10	0.06	41.4	34.9	8.9
50	0.3	52.8	46.3	20.3
165	1	60.8	54.3	28.3
330	2	65.1	58.6	32.6
500	3	67.4	60.9	34.9
1000	6	70.8	64.3	38.3

Approximate t_m of the mismatched oligo Mismatch $t_m = T_d - 1.2(\% \text{ mismatch})^o$

mism. #	t_m	mism. #	t_m
0	64.2	3	45.3
1	57.9	4	39.0
2	51.6	5	32.7

Oligonucleotide Database

File: NewDatabase.oddb # of Records: 29

#	Date	ID Number	Sequence	3'-Dim. ΔG		P.E. / p.e.		Tm / t _m		
<input type="checkbox"/>	21	12/02/06	AY436640:5916R19	AATGCCTGCCTTTAGTCTG	-	SC	430	430	54.1	54.5
<input type="checkbox"/>	22	12/02/06	AY436640:5916R20	CAATGCCTGCCTCTAGTCTG	0.3	SC	366	450	50.9	57.2
<input type="checkbox"/>	23	12/02/06	AY436640:5937R21	TCAATTTCTTTAGCTTGCCAT	0.3	SC	449	449	54.7	53.1
<input checked="" type="checkbox"/>	24	12/02/06	AY436640:5937R22	TTCAATTTCTTTAGCTTGCCAT	0.3	SC	458	458	55.9	53.8
<input type="checkbox"/>	25	12/02/06	AY436640:4695U22	TGCCTTAACAAAAGTAATCCAT	0.3	SC	432	432	54.5	53.0
<input type="checkbox"/>	26	12/02/06	AY436640:5325U22	AATTACGTCTTTCTTATGCCAA	0.3	SC	453	453	53.3	53.0
<input type="checkbox"/>	27	12/02/06	AY436640:5786L23	CTCTGCCTAGAACATTATCACTC	-0.3	SC	451	451	54.8	55.0
<input type="checkbox"/>	28	12/02/06	AY436640:5860L19	AACAACCAAAGCCAACCTG	-0.9	SC	444	444	55.3	55.9

Oligonucleotide Sets (64)

#	Forward Primer	Reverse Primer	Upper Oligo	Lower Oligo	
1	2	3	4		
<input type="checkbox"/>	36	8	23	25	28
<input type="checkbox"/>	42	8	24	25	28
<input checked="" type="checkbox"/>	47	9	14	25	27
<input type="checkbox"/>	39	9	15	25	27
<input type="checkbox"/>	33	9	16	25	27
<input type="checkbox"/>	61	9	17	25	27
<input type="checkbox"/>	48	9	18	25	27

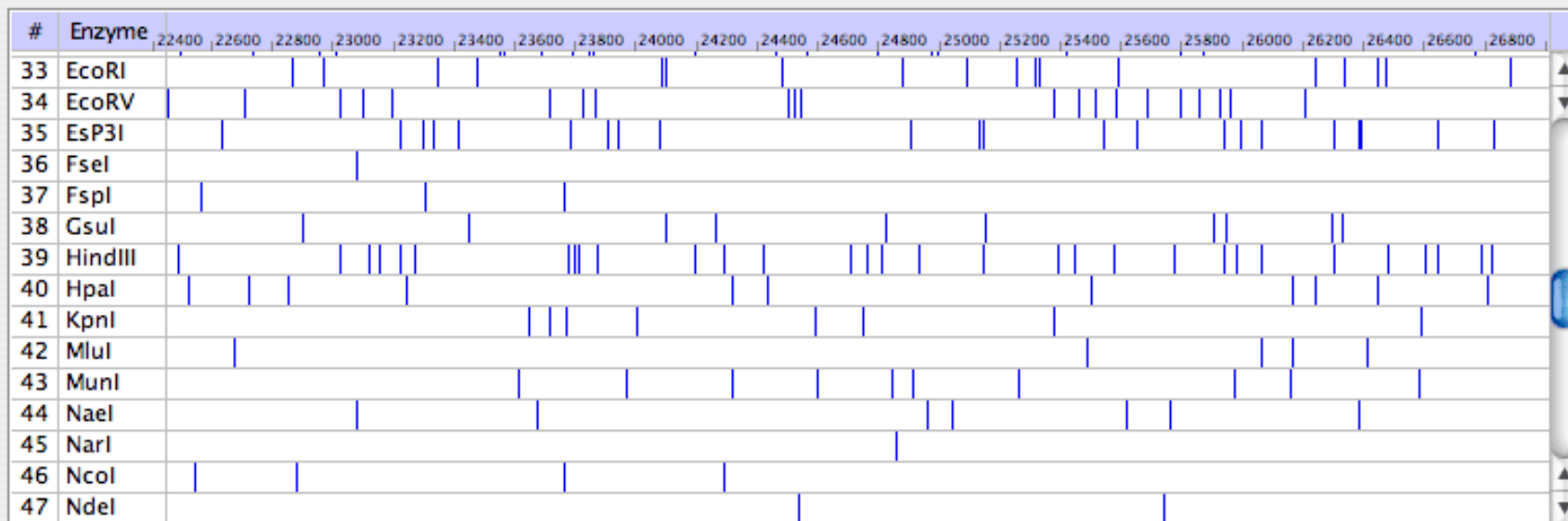
This database is linked to BRCA2 gene.seq

Selected oligo

Checked Set of nested primers

Restriction Enzyme Sites in Protein

File: BRCA2 gene.seq



#	Enzyme	Site	# Cuts	Positions & Fragment Sizes
41	KpnI	GT2VpzY6	8	-21253 23654 68 23722 52 23774 237 24011 585 24596 162 24758 629 25387 1219 26606 22851
42	MluI	TR1RVyA7	5	-22233 22674 2824 25498 576 26074 106 26180 244 26424 23033
43	MunI	QL3NawI5	10	-21287 23620 355 23975 351 24326 282 24608 242 24850 72 24922 351 25273 714 25987 187 26174 420 26594 22863
44	NaeI	AG2PAxR6	7	-21823 23084 597 23681 1286 24967 86 25053 573 25626 149 25775 623 26398 23059
45	NarI	GA2APzR6	1	-20043 24864 24593
46	NcoI	PW3HGwM5	4	-22361 22546 336 22882 887 23769 531 24300 25157
47	NdeI	HM2IawY5	2	-20366 24541 1211 25752 23705
48	NheI	AS2Lax-6	16	-22276 22631 322 22953 185 23138 88 23226 27 23253 461 23714 369 24083 312 24395 288 24683 151 24834 273 25107 536 25643 402 26045 30 26075 210 26285 372 26657 22800

Search: 22454 to 27004 End Cut Type: Blunt, Odd, 3'-overhang, 5'-overhang

Hybridization Time

File: M13MP18

DNA Length: nt.

Concentration: nM

$\mu\text{g/mL}$



$T_{1/2} = 45.4 \text{ sec}$

$T = 3 \text{ min } 47 \text{ sec}$



Concentrations

File: BRCA2 gene.seq

Constant Concentration Constant Volume

- Current +Oligo: 5.08 nmol/OD, 32.5 μ g/OD
- Current -Oligo: 4.67 nmol/OD, 30.9 μ g/OD
- Entire Sequence (ds): 0.001 nmol/OD, 48.1 μ g/OD
- Forward Primer: 5.98 nmol/OD, 35.0 μ g/OD
- Reverse Primer: 5.31 nmol/OD, 34.0 μ g/OD
- PCR Product (ds): 0.146 nmol/OD, 48.1 μ g/OD
- Upper Oligo: 4.83 nmol/OD, 31.2 μ g/OD
- Lower Oligo: 4.67 nmol/OD, 30.9 μ g/OD

μ g
or OD(260)
or nmol
in μ L
yields μ M

...nejlepším učitelem je praxe...