

# VZOROVÝ PROTOKOL

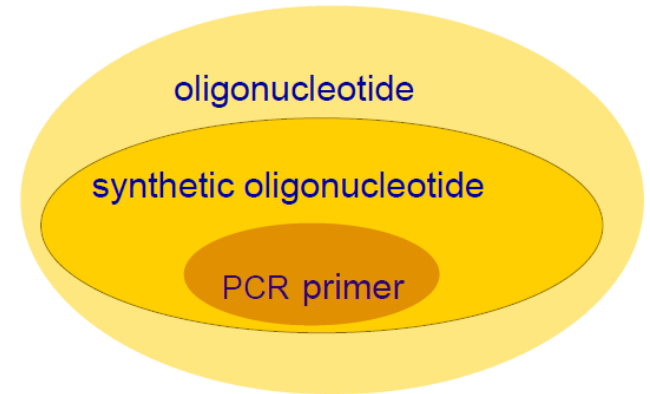
## C7301 Základy genomiky - cvičení

Úloha: DESIGN, SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ

Číslo skupiny:

Jména:

Datum:

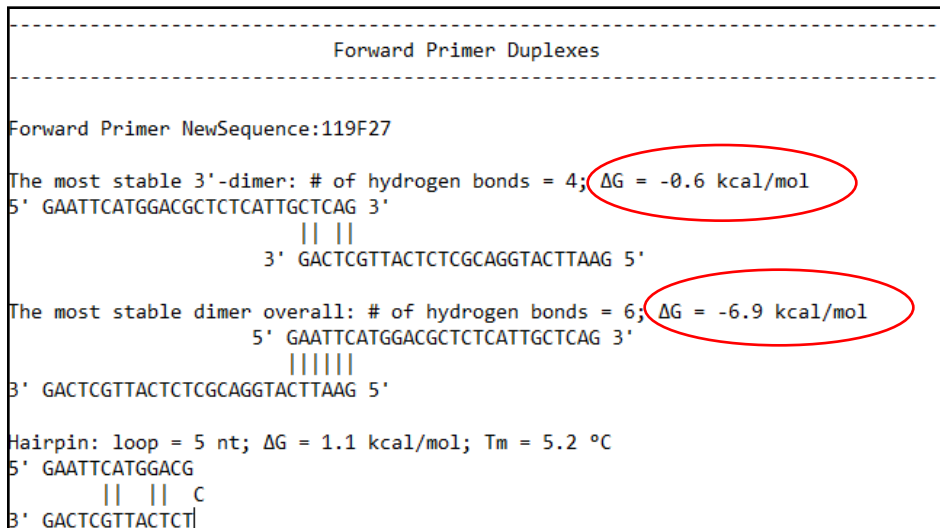
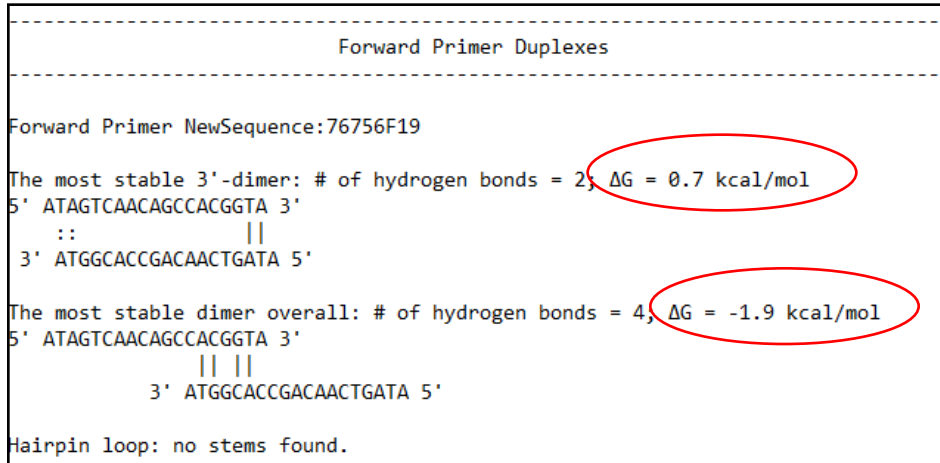


## Návrh sekvence primeru pro PCR



- Komentujte prosím výstupy z programu Oligo
- Na snímcích 2, 3, 4 a 5 porovnejte, který ze dvou uvedených výpisů charakterizuje **kvalitnější primer/y**
- Uveďte proč a komentář запиšte **přímo do snímku**
- Na pozitivním vlákně sekvence *Arabidopsis thaliana* na snímku 7 vyberte manuálně *forward* a *reverse* primer předepsané délky v označené pozici, vypište sekvenci obou primerů

# Sekundární struktury





## Score / Priming Efficiency

```
NewSequence:76858R22
5' TATTTGATTTAGTGGTCCCGAT 3'
Length:                22-mer
Score:                 948points ←
3' Position:          76858
Tm/tm:                54.5   54.0 °C (salt 155.8 mM, oligo 200.0 nM)
ΔG/Δg (25 °C):       -30.5  -29.9 kcal/mol
ΔS/Δs:                -459.9 -449.1 cal/°K * mol
ΔH/Δh:                -167.7 -163.8 kcal/mol
3'ΔG:                 -7.3 kcal/mol
Degeneracy:           1
P.E.#:                466/466 ←
1/E:                  4.76 nmol/A260
                      32.5 μg/A260
```

```
NewSequence:575R21
5' TTAGTTAATATCCACTTGAGG 3'
Length:                21-mer
Score:                 900points ←
3' Position:          575
Tm/tm:                50.0   49.0 °C (salt 155.8 mM, oligo 200.0 nM)
ΔG/Δg (25 °C):       -27.6  -26.7 kcal/mol
ΔS/Δs:                -441.6 -429.6 cal/°K * mol
ΔH/Δh:                -159.3 -154.8 kcal/mol
3'ΔG:                 -6.9 kcal/mol
Degeneracy:           1
P.E.#:                423/423 ←
1/E:                  4.81 nmol/A260
                      31.4 μg/A260
```

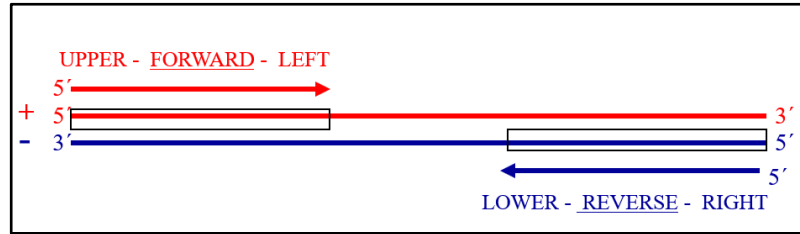
## PCR parametry

PCR						
Set score: 950 ←						
F/R PCR Product Optimal Annealing Temperature: 48.5 °C (Max: 65.5 °C)						
	Position	Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E.#	Score
F/R Product	n/a	124	75.9	30.6	n/a	950
Forward Primer	76756	19	55.9	47.4	446/446	959
Reverse Primer	76858	22	54.5	36.4	466/466	948
Product Tm - Reverse Primer Tm: 21.4 °C						
Primers Tm difference: 1.4 °C						

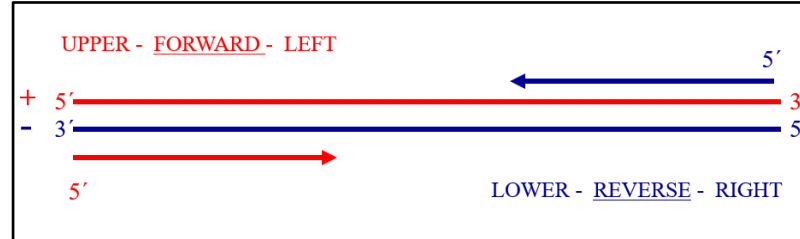
PCR						
Set score: 755 ←						
F/R PCR Product Optimal Annealing Temperature: 52.0 °C (Max: 61.0 °C)						
	Position	Length	Tm [°C]	GC [%]	P.E.#	Score
F/R Product	n/a	471	82.8	40.3	n/a	755
Forward Primer	125	21	60.7	52.4	487/487	814
Reverse Primer	575	21	50.0	33.3	423/423	900
Product Tm - Reverse Primer Tm: 32.8 °C						
Primers Tm difference: 10.7 °C						
Comments:						
High difference between (F/R) product and primer melting temperatures. ←						

## Terminologie primerů

červené ⊕ vlákno  
modré ⊖ vlákno



## Nasedání primerů



## Příklad

manuálního výběru dvojice primerů z ⊕ vlákna.  
Aplikujte tento příklad v úloze zadané na snímku 7.

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

```

+ 5' 1 ATGGCTTCTG CTCAATCTT CTAC ACCAA AGCTCTGTCT TGAAAATCAA
51 TGTCATGGTT GTGGACGATG ATCATGTTTT CCTTGATATC ATGTCACGCA
101 TGCTTCAACA CTCCAAATAC AGAGGTAATT AAATATTATT ATCATATTAT
151 ATATAATATG TTATTGATTT 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 GTTTACTTTA TGTTATGAAC TATCTCAAT
751 TTGTGAAATA TTTCATAACT AATGTGGAAC ACTATATAAC CCCTCCATAC
801 AAAACGTAAG TAAAATTTAT GAAATCCTAT CATTTTTTAA GGTTAAACCA
851 ATCAAAAAGT AATAATTCTT GGTACTTGCA ATATTTTTGT CATTATATTT
901 TAGTTTATTA ATTTATTTT GATTAATGG TTTTAGATCC ATCAGTTATG
951 GAGATCGCAG TTATAGCTGT AGACGATCCG AAGAAAGCAT TATCTACTCT
1001 AAAAAATCAA CGAGACAATA TAGATCTCAT AATCACAGAT TATTATATGC
1051 CTGGTATGAA CGGTTTACAA CTCAAAAAAC AAATCACTCA GGAATTTGGA
1101 AATTTACCGG TCTTAGGTAA CATTTTTTGT TCTTTACAAC TTAATTTAAA
    
```

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

na ⊕ vlákně  
čteme zprava doleva  
a komplementárně

Vyznačte na části **+**vlákna sekvence *Arabidopsis thaliana* **forward** a **reverse** primer dle označení:

**yyyyFxx** forward primer (yyyy = pozice **5** - konce primeru)

**zzzzRxx** reverse primer (zzzz = pozice **3** - konce primeru)

(xx = počet bazí primeru)

```
49609 TTCTTGTTCAATCACAGCTCCTCAATGATTTCCCTTATTGTGCAGGGTACTGATTCAGGCGTTGACACGTAT
      F L F N H S S S M I S L I V Q G T D S G V D T Y
49681 TTTGGTTTGTGCACTTATCCTGGTCAGGAGCTACGGCGCCGTATCGATTTTAAGGTAACACCTGAAAACCTCC
      F G L C T Y P G Q E L R R R I D F K V T P E N S
49753 TAATGTCACACAATGCAGAAAAGAATAAGTGGGTTAGTCAAAGATAAAAAGGACAATACCATGATTGATTC
      - C H T M Q K R T K W V S Q R - K G Q Y H D - F
49825 AGCTATGTCTAGGTTGATCTCTTCCCGGAAGATCATTCAATAAATAGTCTTTTTTCATAGGTCTATCCAAGG
      S Y V - V D L F P E D H S I N S L F S - V Y P R
49897 GATATCTATTCGTTTGGACTCATAGCCTGGACAGGGAACGACGTGTTGAACAGAAGGTATGGATATGATTC
      D I Y S F G L I A W T G N D V L N R R Y G Y D F
49969 ATTTGTATACATGTCTCACTAAACACATTTGTTGGTAGATAAAGAACACAGCATATGTATATATATATGCGA
      I C I H V S L N T F V G R - R T Q H M Y I Y M R
50041 TGATAACTGCAGGCTGAGATTGCTAGCAGAATCGAAAGGATATCGACTTGACGACACTGGACTATTCCCAGC
      - - L Q A E I A S R I E R I S T - R H W T I P S
50112 TACTCAGACTTCTACTGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCTAAGGCT
```

Každá skupina bude označovat přímo v přiložené sekvenci jiné primery.

**Skupina 1:** 49682F21      49845R18      **Skupina 4:** 49629F20      50071R19

**Skupina 2:** 49754F19      49920R20      **Skupina 5:** 49765F21      50075R22

**Skupina 3:** 49828F22      50072R19      **Skupina 6:** 49830F19      50080R21

Zde prosím vypište sekvenci vybraného forward a reverse primeru od jeho 5 - konce.

**Forward: 5** ..... **3**      **Reverse: 5** ..... **3**

## Syntéza a purifikace PCR primeru

- Komentujte prosím následující snímky
- Komentář zapište přímo do snímku

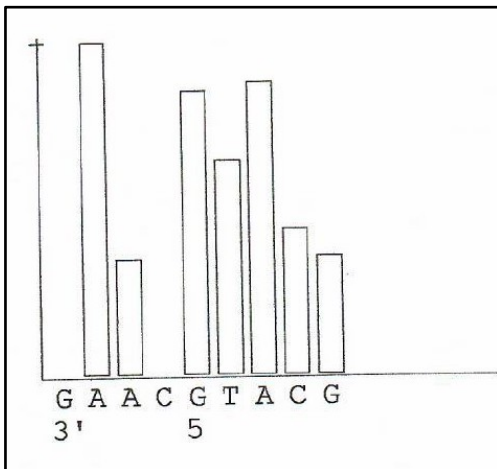
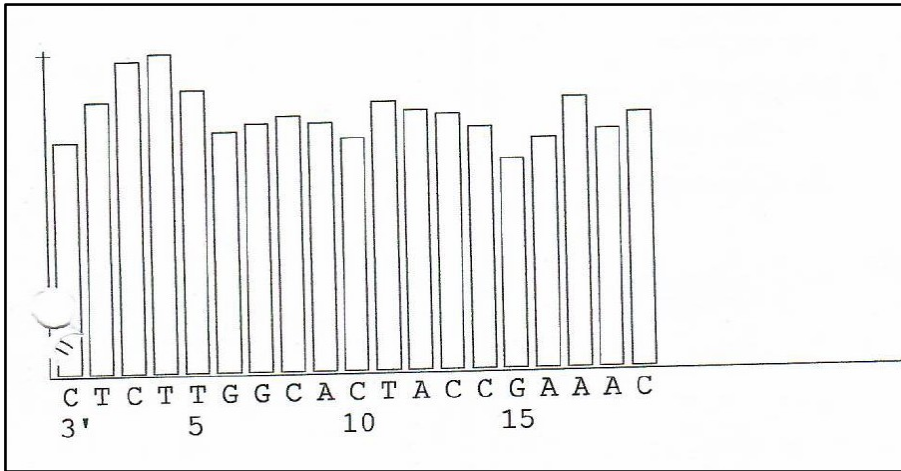


Označte správnou odpověď: Syntéza začíná od 5 / 3 - konce primeru  
Syntézy se účastní / neúčastní polymeráza  
Syntéza probíhá ve vodném / nevodném prostředí



## Průběh syntézy (histogram)

Vysvětlete, proč první histogram zaznamenává úspěšnou syntézu a druhý nikoliv.



Každá skupina bude počítat s jiným **výtěžkem** syntézy.

Skupina 1: 10 OD

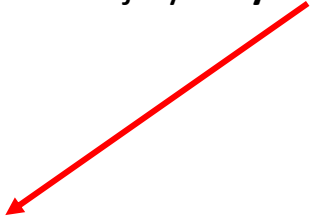
Skupina 2: 12 OD

Skupina 3: 15 OD

Skupina 4: 9 OD

Skupina 5: 14 OD

Skupina 6: 11 OD



oligonukleotid je po syntéze vysušen,  
ale pokud by byl následně rozpuštěn v 1 mL:

Výtěžek ( $A_{260}$ ) =  OD (je-li rekonstituováno v 1 ml)

Extinkční koeficient vybraného oligonukleotidu:  $\epsilon = 270.2$   
Molekulová hmotnost vybraného oligonukleotidu:  $MW = 8741.795$

Molekulová hmotnost  $MW$  a extinkční koeficient  $\epsilon$  pro výpočty množství a koncentrace oligonukleotidu jsou uvedeny výše.

Výpočet množství oligonukleotidu ( $\mu\text{mol}$ ):  $\text{výtěžek} / \epsilon$   
Výpočet množství oligonukleotidu ( $\mu\text{g}$ ):  $(\text{výtěžek} / \epsilon) \times MW$

Výpočet koncentrace oligonukleotidu:  $c (\mu\text{mol/litr}) = \frac{\text{výtěžek (OD/ml)}}{\epsilon \times 10^{-3} (\text{litr}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm})}$   
rozpuštíme-li výtěžek v 1 mL

Odhad množství oligonukleotidu: 1 OD ss DNA = 33  $\mu\text{g}$

Zde vyjádřete zadaný výtěžek ve všech uvedených jednotkách:

.....OD

.....  $\mu\text{mol}$

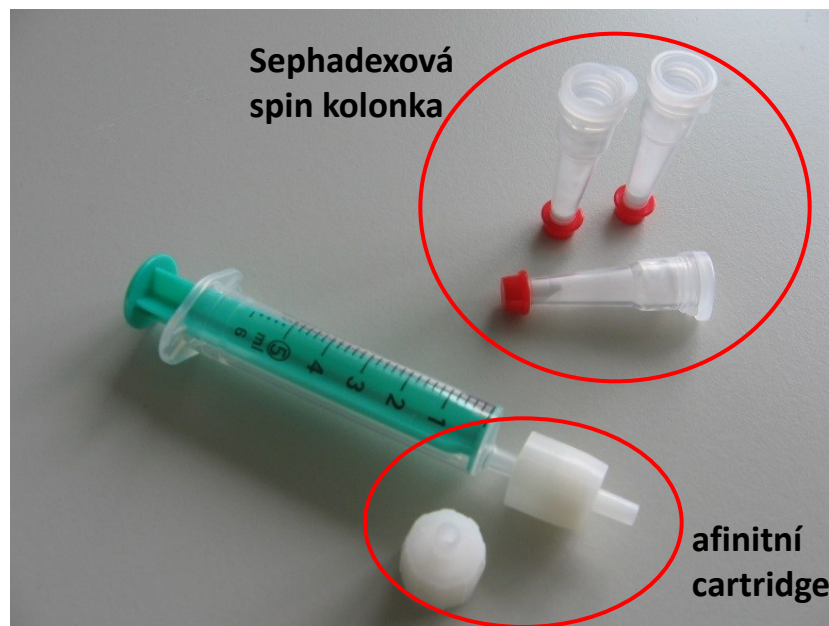
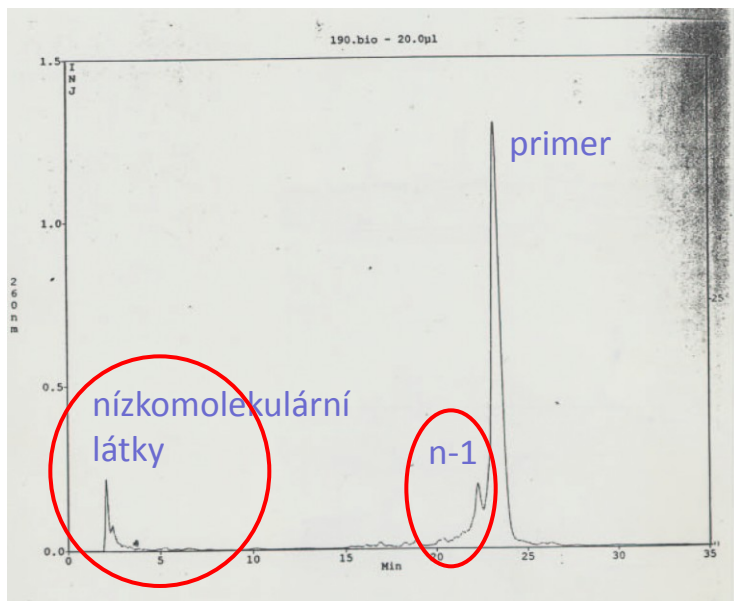
.....  $\mu\text{mol/L}$

Vypočtěte, v jakém objemu je třeba rozpustit výtěžek, abyste dostali **zásobní roztok o koncentraci 500  $\mu\text{M}$** :

.....  $\mu\text{L}$

## Purifikace syntetického primeru

Odsolení gelovou chromatografií na Sephadexu nebo **afinitní chromatografie** na cartridge:

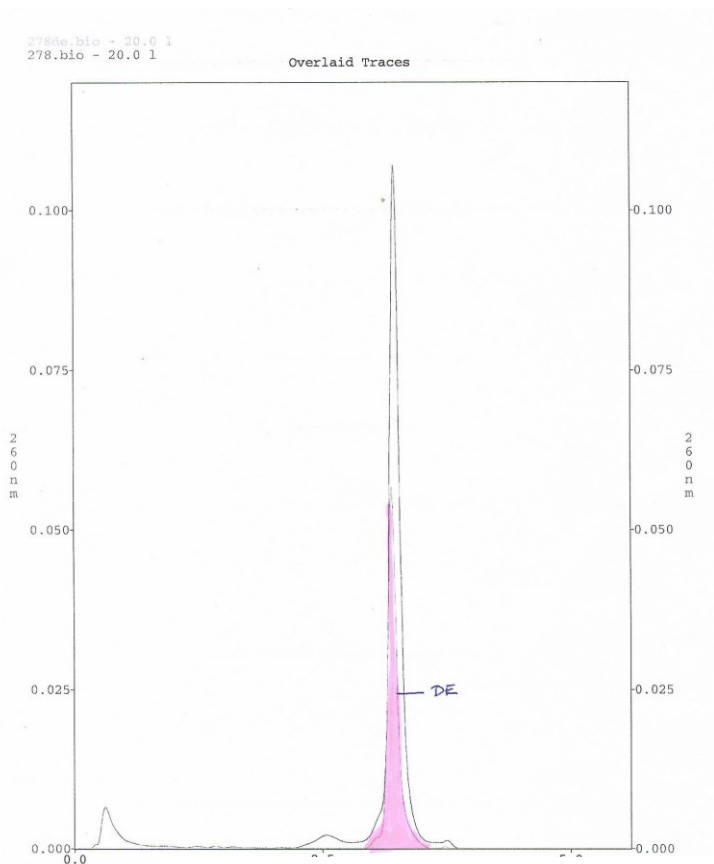


Spojte čarou, které nečistoty jsou po syntéze z primeru odstraněny na Sephadexu a které vazbou na afinitní cartridge.

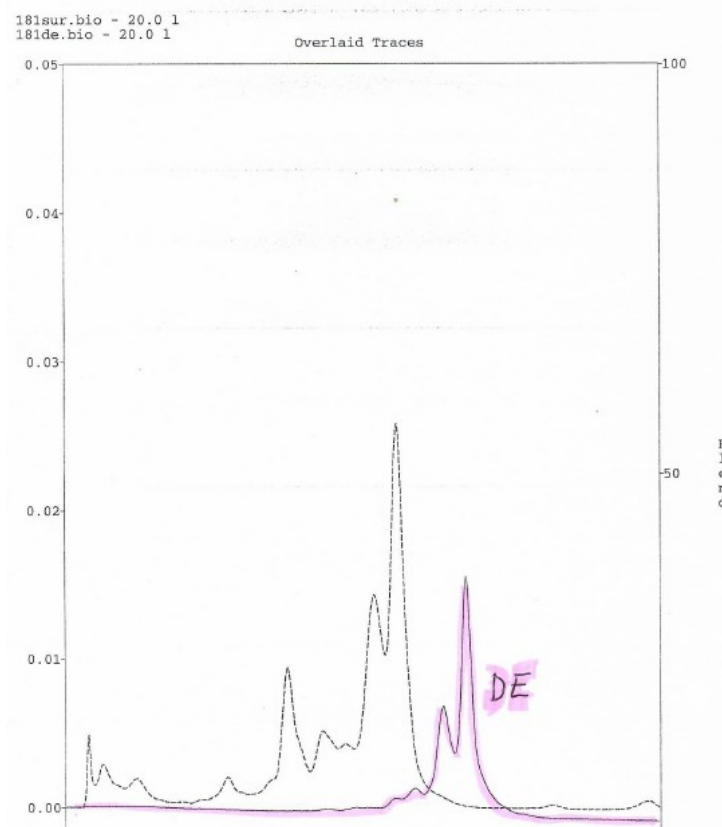
## Chromatografická kontrola kvality nasyntetizovaného primeru

Chromatogram surového primeru je označen černě, chromatogram odsoleného primeru je označen červeně (DE, desalted).

Definujte u **prvního obrázku**, co bylo ze surového primeru odstraněno gelovou chromatografií, a odhadněte, jak se změnila koncentrace purifikovaného primeru ve srovnání se surovým.



Syntéza primeru je OK



Syntéza primeru není OK

**Nevyplněný vzorový protokol C7301** Základy genomiky - cvičení DESIGN, SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ je vložen do ISu (Manipulace se studijními materiály) pod názvem **Protokol a SYNTEZA-TEAMS\_12-2021.pptx**. Vyplňte.

Kompletně **vyplněné** protokoly (jeden protokol za každou dvojici) prosím odešlete ve formátu **pdf** do středy **15.12.2021** na adresu [hanak@sci.muni.cz](mailto:hanak@sci.muni.cz). Děkuji.

Ohledně připomínek k odevzdanému protokolu vás budu jednotlivě kontaktovat mailem. Teprve po vyřešení všech dotazů a výslovném odsouhlasení správnosti protokolu budu považovat tuto část cvičení pro konkrétní dvojici za ukončenou.

Děkuji vám za účast v C7301: DESIGN, SYNTÉZA A PURIFIKACE OLIGONUKLEOTIDŮ.

*Hana Konečná*