

Для успешного дизайна ПЦР-исследований руководствуйтесь общими рекомендациями:

- 1) Продукт амплификации должен быть 75–200 п.о.: продукты более 200 будут амплифицироваться с большим количеством накапливающихся ошибок секвенирования; а продукты менее 75 п.о. сложно отличить по размеру от димеров.
- 2) Обычно создаются праймеры длиной 18–30 п.о. (чем короче, тем эффективнее и тем менее специфична наработка продукта).
- 3) Избегайте формирования вторичных структур (self complementarity должна быть как можно ниже).
- 4) Избегайте более 4 повторов одного и того же нуклеотида подряд (G или C – желательно избегать более 3 повторов). Динуклеотидные повторы тоже следует избегать.
- 5) GC-состав – желательно от 40 до 60%.
- 6) Температура плавления праймеров может находиться в пределах от 50 до 65°C.
- 7) Если размер продукта важен для исследования (фрагментный анализ), то во избежание ошибок секвенирования следует добавлять специальные “PIG-tail”: https://www.future-science.com/doi/abs/10.2144/96206st01?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr pub++0pubmed
- 8) Праймеры не должны различаться по температуре плавления на более чем 5°C.
- 9) Температура отжига должна быть на 3–5°C ниже, чем температура плавления.

Задание 1.

Получите праймеры для амплификации следующего фрагмента **ДНК** человека (убедитесь, что Вы ищете последовательность в правильной базе данных, т.е. в базе данных **геномов**):

5' –

AGAGTGGGCG AGGCGCGGAG GTCTGGCCTA TAAAGTAGTC GCGGAGACGG GGTGCTGGTT
TGCGTCGTAG TCTCCTGCAG CGTCTGGGGT TTCCGTTGCA GTCCTCGGAA CCAGGACCTC
GGCGTGGCCT AGCGAGTTAT GGCGACGAAG GCCGTGTGCG TGCTGAAGGG CGACGGCCCA
GTGCAGGGCA TCATCAATTT CGAGCAGAAG GCAAGGGCTG GGACGGAGGC TTGT

–3'

Продукт должен быть как минимум **150 п.о.** в длину (посмотрите, есть ли настройки, позволяющие задать минимальный размер продукта).

Напишите отчёт, в нём отразите последовательности прямого и обратного праймеров.

Решение :

Primers for target on one template

Primers common for a group of sequences

Retrieve recent results

Publication

Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

AGAGTGGGCG AGGCGCGGAG GTCTGGCCTA TAAAGTAGTC GCGGAGACGG GGTGCTGGTT

TGCGTCGTAG TCTCTGCGAG CGTCTGGGGT TTCCGTTGCA GTCCTCGGAA CCAGGACCTC

GGCGTGGCCT AGCGAGTTAT GCGGACGAAG GCCGTGTGCG TGCTGAAGGG CGACGGCCCA

GTGCAGGGCA TCATCAATTT CGAGCAGAAG GCAAGGGCTG GGACGGAGGC TTGT

Or, upload FASTA file

Выберите файл

Файл не выбран

Range

From

To

Forward primer

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m)

Min

Max

Min

Opt

Max

Max T_m difference

Exon/intron selection

Exon junction span

Exon junction match

Min 5' match

Min 3' match

Max 3' match

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion

Intron length range

☐ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Min

Max

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check

Search mode

Database

Exclusion

Organism

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

Max target amplicon size

Allow splice variants

☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Automatic

Refseq representative genomes

☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)
☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Homo sapiens

Add organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type

Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end

Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer

4000

☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

☐ Show results in a new window
☒ Use new graphic view

Input PCR template Id|Query_1
Range 1 - 234

Specificity of primers Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: RefSeq Representative Genome Database (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports [Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGCCTATAAAGTAGTCGCGG	Plus	21	24	44	59.66	52.38	4.00	2.00
Reverse primer	AATTGATGATGCCCTGCACTG	Minus	21	199	179	59.25	47.62	4.00	3.00
Product length	176								

Products on intended targets
>NC_000021.9 Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 176
Features associated with this product:
superoxide dismutase [cu-zn]

Forward primer	1	TGGCCTATAAAGTAGTCGCGG	21
Template	31659655	31659675
Reverse primer	1	AATTGATGATGCCCTGCACTG	21
Template	31659830	31659810

Прямой праймер: TGGCCTATAAAGTAGTCGCGG (длина: 21 п.о.)

Обратный праймер: AATTGATGATGCCCTGCACTG (длина: 21 п.о.)

Оба праймера имеют длину 21 п.о., что соответствует общим рекомендациям для минимальной длины продукта амплификации. Предполагаемый продукт амплификации будет иметь длину 176 п.о., что также удовлетворяет критерию задачи.

Задание 2.

Фрагмент какого гена будет амплифицирован? На какой хромосоме он расположен? Каковы его координаты в хромосоме (с какой по какую позицию он располагается?)

Добавьте дополнительную информацию в отчёт.

NC_000021.9 Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p14 Primary Assembly 100% 234 31659632 31659865 SOD1-DT

Фрагмент ДНК, который будет амплифицирован, находится на хромосоме 21 человека (Human chromosome 21), и это часть гена SOD1-DT.

Координаты фрагмента на хромосоме указаны следующим образом:

Начальная позиция: 31659632

Конечная позиция: 31659865

Т.е. амплифицируемый фрагмент ДНК находится в интервале от позиции 31659632 до позиции 31659865 на хромосоме 21 человека.

Задание 3.

Скорректируйте протокол амплификации, отметьте свои изменения **цветом** и поясните, почему, по Вашему мнению, они необходимы:

Этап	Длительность (минут)	Температура (°C)	Повторения
Изначальная денатурация	3:00	95	x1
Денатурация	1:00	95	x60
Отжиг	1:00	45	
Элонгация	1:00	72	
Финальная элонгация	5:00	72	x1

Денатурация. Обычно для обеспечения достаточного уровня амплификации достаточно 25–35 циклов. И если количество повторений слишком большое, это может привести к повреждению ДНК. Поэтому нужно уменьшить количество повторений до 30 для экономии времени и ресурсов.

Отжиг. Температура отжига 45°C слишком низкая. Обычно температура отжига подбирается на 3–5°C ниже температуры плавления самого низкотемпературного праймера. Поэтому нужно увеличить температуру отжига до 55°C, чтобы обеспечить специфичное связывание праймеров с матричной ДНК.

Задание 4.

Разработайте систему для секвенирования методом Sanger следующих вариантов:

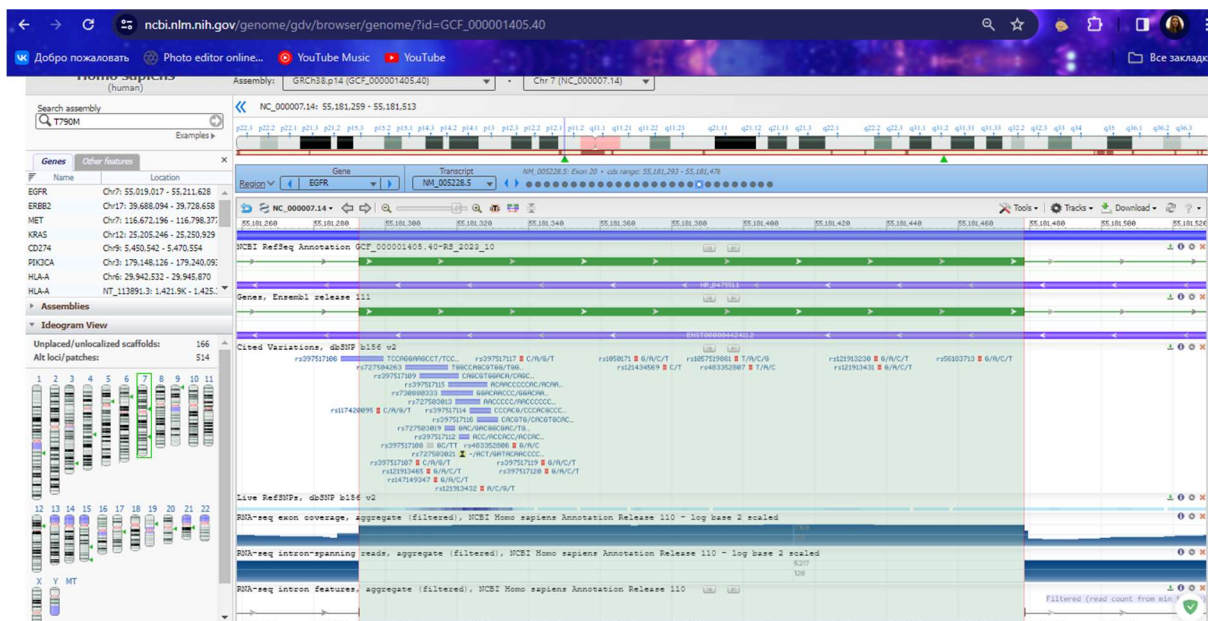
- 1) EGFR:p.T790M

(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=102218023>);

Мутация T790M находится в гене EGFR (эпидермальный фактор роста).

Genomic Mutation ID	COSV51765492
Legacy Identifier	COSM6240
Gene name	EGFR
AA mutation	p.T790M (Substitution - Missense, position 790, T→M)
CDS mutation	c.2369C>T (Substitution, position 2369, C→T)
Nucleotides inserted	n/a
Genomic coordinates	GRCh38, 7:55181378..55181378, view Ensembl contig
CDD	n/a
HomoloGene	n/a
Ever confirmed somatic?	Yes
Remark	n/a
Recurrent	n/a

Геномные координаты мутации EGFR:p.T790M указаны следующим образом: GRCh38, 7:55181378..55181378



Мутация располагается на хромосоме 7 человека (Human chromosome 7) и имеет единственную геномную координату 55181378.

Primer-BLAST

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primer Parameters

Retrieve recent results
Publication
Tips for finding specific primers

Range

Forward primer

Reverse primer

</

Reverse primer CCAGTTGAGCAGGTACTGGG Minus 20 55181460
 55181441 60.04 60.00 5.00 1.00
 Product length 120
 Products on intended targets
 >NC_000007.14 Homo sapiens chromosome 7, GRCh38.p14 Primary
 Assembly

product length = 120

Features associated with this product:

epidermal growth factor receptor isoform e precursor

epidermal growth factor receptor isoform f precursor

Forward primer 1 CTGGGCATCTGCCTCACC 18

Template 55181341 55181358

Reverse primer 1 CCAGTTGAGCAGGTACTGGG 20

Template 55181460 55181441

Я выбрала первый вариант, потому что температура плавления (Tm) близка к идеальным значениям для ПЦР.

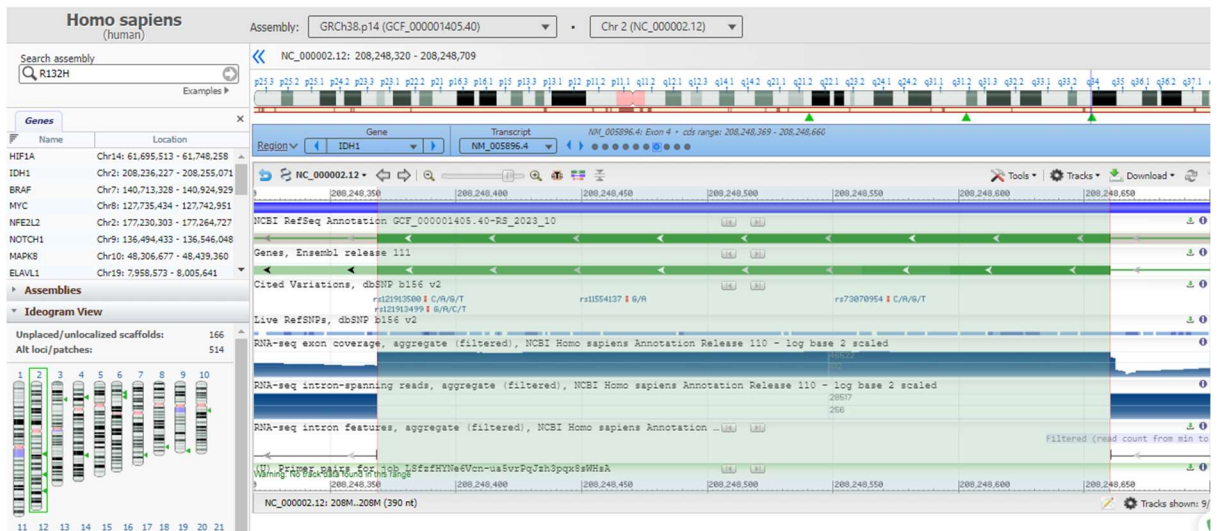
2) IDH1:R132H

(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=128246620>) ;

Мутация R132H находится в гене IDH1.

Genomic Mutation ID	COSV61615239
Legacy Identifier	COSM28746
Gene name	IDH1
AA mutation	p.R132H (Substitution - Missense, position 132, R→H)
CDS mutation	c.395G>A (Substitution, position 395, G→A)
Nucleotides inserted	n/a
Genomic coordinates	GRCh38, 2:208248388..208248388, view Ensembl contig
CDD	NP_005887.2
HomoloGene	21195 , view the multiple sequence alignment
Ever confirmed somatic?	Yes
Remark	n/a
Recurrent	n/a
Drug resistance	Resistance has been observed for the following drugs in samples curated with this mutation (or the DNA variant at the same genomic location on an alternative transcript, overlapping gene or fusion, which shares a COSM id) Note that the same resistance pattern may not apply to all samples. For more details, look at the Samples section. Enasidenib
Alternative Ids	111232754 {IDH1 ENST00000345146}, 134176922 {IDH1 ENST00000446179}

Геномные координаты мутации GRCh38, 2:208248388..208248388, т.е мутация располагается на хромосоме 2 и имеет единственную геномную координату 208248388.



Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAS1).

Primers for target on one template | **Primers common for a group of sequences**

Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

Or, upload FASTA file

Range
Forward primer From To
Reverse primer From To

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference

ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1710445438&job_key=PzXhb9lq34L4vNq519n-i63C77mA0fSkqQ

Genes: IDH1

(U) Primer pairs for job: PzXhb9lq34L4vNq519n-i63C77mA0fSkqQ

Primer 1: 208248350
Primer 2: 208248498

NC_000002.12: 208M..208M (391 nt)

Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	T _m	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TATTGCCAACATGACTTAC	Plus	19	208248350	208248368	50.36	36.84	5.00	0.00
Reverse primer	AAATGGCACCACATACGAAATA	Minus	20	208248498	208248479	52.93	35.00	6.00	2.00

Products on intended targets
>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p14 Primary Assembly

product length = 149

Features associated with this product:
isocitrate dehydrogenase [nadp] cytoplasmic
isocitrate dehydrogenase [nadp] cytoplasmic

Forward primer 1 TATTGCCAACATGACTTAC 19
Template 208248350 208248368

Reverse primer 1 AAATGGCACCACATACGAAATA 20
Template 208248498 208248479

Primer pair 1


```

Sequence (5'→3')      Template strand Length      Start Stop Tm
GC%      Self complementarity Self 3' complementarity
Forward primer  TATTGCCAACATGACTTAC  Plus 19      208248350
208248368  50.36 36.84 5.00  0.00
Reverse primer  AAATGGCACCATACGAAATA  Minus 20     208248498
208248479  52.93 35.00 6.00  2.00
Product length  149
Products on intended targets
>NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p14 Primary
Assembly

```

product length = 149

Features associated with this product:

isocitrate dehydrogenase [nadp] cytoplasmic

isocitrate dehydrogenase [nadp] cytoplasmic

```

Forward primer  1      TATTGCCAACATGACTTAC  19
Template        208248350 ..... 208248368

Reverse primer  1      AAATGGCACCATACGAAATA  20
Template        208248498 ..... 208248479

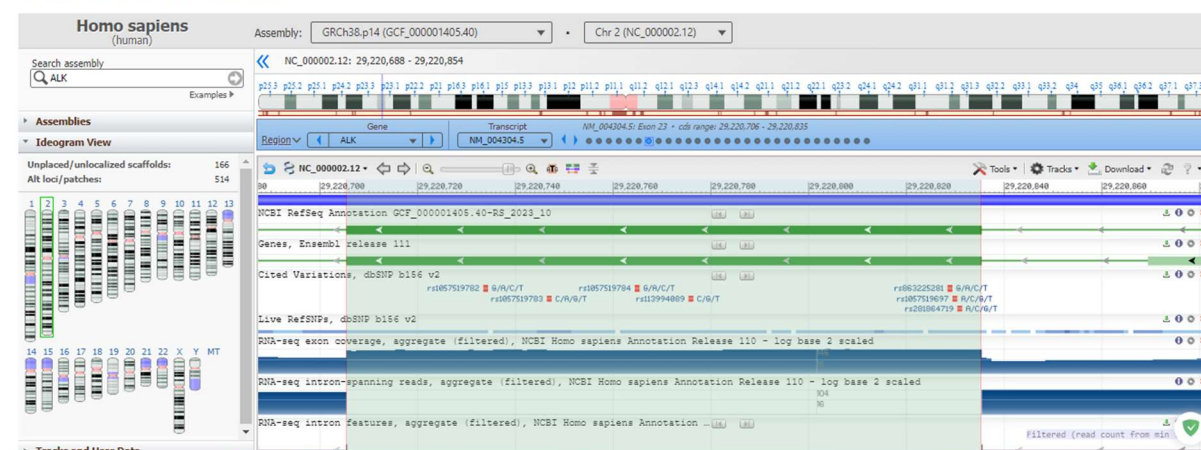
```

Выбрала 1 пару, т.к. длина продукта амплификации и температура плавления более подходящая.

3) Экзон 23 ALK.

Выбираем 23 экзон гена ALK

Genome Data Viewer



Координаты 23 экзона 29220706-29220835.

A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template Primers common for a group of sequences

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) ?

NC_000002.12

Or, upload FASTA file Файл не выбран

Range ?

	From	To
Forward primer	2922065	2922068
Reverse primer	2922085	2922090

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size Min Max

70 250

of primers to return Min Opt Max Max T_m difference

10 55.0 60.0 65.0 3 ?

Primer melting temperatures (T_m)

NC_000002.12: 29M..29M (339 nt)

Tracks shown: 3/990

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start
Forward primer	TGCTCCTGTCCTTGGCACAAC	Plus	21	29220656
Reverse primer	TTGCCCAGACTCAGCTCAGTTAAT	Minus	24	29220887
Product length	232			
Products on intended targets				

>[NC_000002.12](#) Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p14 Primary Assembly

```
product length = 232
```

Features associated with this product:

alk tyrosine kinase receptor isoform 1 precursor

alk tyrosine kinase receptor isoform 2

Forward primer 1 TGCTCCTGTCCTTGGCACAAC 21

Template	29220656	29220676
Reverse primer	1	TTGCCCAGACTCAGCTCAGTTAAT	24
Template	29220887	29220864

Подобрался 1 праймер