

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

21.05.2021 r.

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Kierunek: Bioinformatyka

Przedmiot: Ekspresja mRNA i mikroRNA

oraz ich wzajemne interakcje

Wiktoria Wilman 11260

*Projekt*

***Praca z PickPrimers oraz miRBase***

# ***1. Praca z PickPrimers***

## ***a. Opis zadania***

Za pomocą funkcji Pick Primers, należy zaprojektować oligonukleotydy umożliwiające detekcję genu osteokalcyny – OCL (BGLAP).

## ***b. Opis rola OCL (osteokalcyny)***

Osteokalcyna – białko niekolagenowe zbudowane z 49 aminokwasów. Jest syntetyzowana przez osteoblasty, odontoblasty i hipertroficzne chondrocyty.

Jest uważana za wysoce swoisty marker wielkości obrotu kostnego i świadczy o aktywności osteoblastów. Jest uwalniana z osteoblastów, ale nie wpływa na kości. Zwiększa rozpad tkanki tłuszczowej, zwiększa uwalnianie insuliny, zwiększa proliferację komórek beta wysp trzustkowych.

Jej poziom wzrasta w następujących chorobach:

- osteoporoza
- nadczynność przytarczyc
- choroba Pageta
- nadczynność tarczycy
- nowotwory kości

Z obniżeniem jej poziomu mamy do czynienia w przypadku:

- niedoczynności tarczycy
- niedoczynności przytarczyc<sup>1</sup>

## ***c. Etapy tworzenia primerów***

1. Poprzez odpowiednie zapytanie wyszukujemy w bazie NCBI Nucleotide naszą sekwencję:

*(BGLAP) AND "Homo sapiens"[porgn: txid9606] AND mRNA*

---

<sup>1</sup> Źródło: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Osteokalcyna>

Ze względu na problem ze znalezieniem w bazie sekwencji pod nazwą OCL została użyta inna nazwa podana przez prowadzącą.

2. Znaleziono cząsteczkę mRNA:

☐ [Homo sapiens bone gamma-carboxylate protein \(BGLAP\), mRNA](#)

1. 506 bp linear mRNA

Accession: NM\_199173.6 GI: 1519313061

[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)

[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

3. W wybranym rekordzie wybrano format FASTA (który przedstawia sekwencję nukleotydową cząsteczki), a następnie wybrano opcję Pick Primer znajdującą się w tabeli opcji po prawej.

4. W programie Pick Primer wybrano 2 różne zestawy opcji zgodnie z zasadami projektowania primerów:

a. Wersja z długością produktu PCR między 100 a 150

The screenshot displays the 'Pick Primer' web interface. The 'PCR Template' section at the top has a text input field containing 'NM\_199173.6' and a 'Clear' button. To the right, there are 'Range' fields for 'From' and 'To' with 'Clear' buttons. Below the input field, there is a 'Browse...' button and a 'No file selected.' message. The 'Primer Parameters' section contains several input fields: 'Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)' and 'Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)' both with 'Clear' buttons; 'PCR product size' with 'Min' (100) and 'Max' (150) fields; '# of primers to return' (5); 'Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>)' with 'Min' (57.0), 'Opt' (60.0), 'Max' (63.0), and 'Max T<sub>m</sub> difference' (3) fields. The 'Exon/intron selection' section includes a dropdown for 'Exon junction span' (No preference), 'Exon junction match' with 'Min 5' match' (7), 'Min 3' match' (4), and 'Max 3' match' (8); 'Intron inclusion' checked; and 'Intron length range' with 'Min' (1) and 'Max' (10000) fields. At the bottom, another 'Primer Parameters' section shows 'PCR Product T<sub>m</sub>', 'Primer Size' (Min 15, Opt 20, Max 25), and 'Primer GC content (%)' (Min 50.0, Max 60.0).

b. Wersja z długością produktu PCR między 150 a 200

Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

### PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [?](#) [Clear](#)

NM\_199173.6

Or, upload FASTA file [Browse...](#) No file selected.

Range [?](#) [Clear](#)

Forward primer  From  To

Reverse primer

### Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [?](#) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [?](#) [Clear](#)

PCR product size

Min  150 Max  200

# of primers to return  5

Primer melting temperatures ( $T_m$ )

Min  57.0 Opt  60.0 Max  63.0 Max  $T_m$  difference  3 [?](#)

### Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [?](#)

Exon junction span  No preference [?](#)

Exon junction match

Min 5' match  7 Min 3' match  4 Max 3' match  8

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [?](#)

Intron inclusion ☒ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [?](#)

Intron length range

Min  1 Max  10000 [?](#)

### Primer Parameters

PCR Product  $T_m$

Min  Opt  Max

Primer Size

Min  15 Opt  20 Max  25

Primer GC content (%)

Min  50.0 Max  60.0

c. Wersja z długością produktu PCR między 200 a 250

Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

### PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [?](#) [Clear](#)

NM\_199173.6

Or, upload FASTA file [Browse...](#) No file selected.

Range [?](#) [Clear](#)

Forward primer  From  To

Reverse primer

### Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [?](#) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [?](#) [Clear](#)

PCR product size

Min  200 Max  250

# of primers to return  5

Primer melting temperatures ( $T_m$ )

Min  57.0 Opt  60.0 Max  63.0 Max  $T_m$  difference  3 [?](#)

### Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [?](#)

Exon junction span  No preference [?](#)

Exon junction match

Min 5' match  7 Min 3' match  4 Max 3' match  8

Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [?](#)

Intron inclusion ☒ Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [?](#)

Primer Parameters

PCR Product Tm

Min

Opt

Max

Primer Size

Min

Opt

Max

15

20

25

Primer GC content (%)

Min

Max

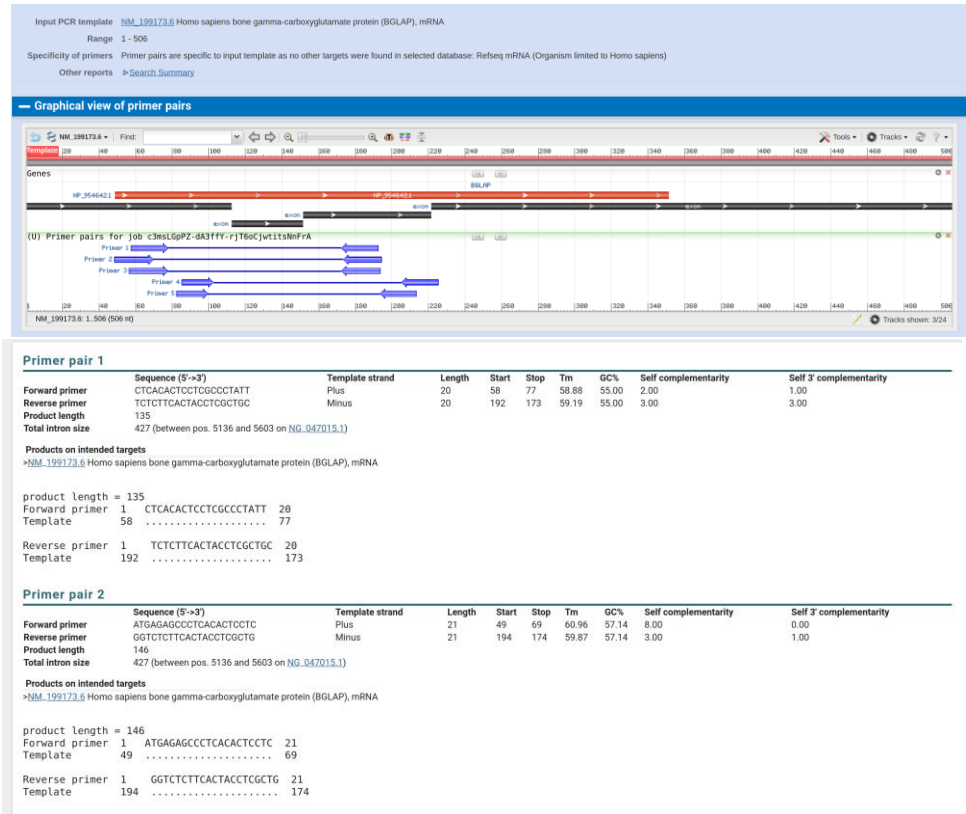
50.0

60.0

d. Wyniki

Jako wyniki otrzymano sety primerów o różnych parametrach.

a. Wersja z długością produktu PCR między 100 a 150



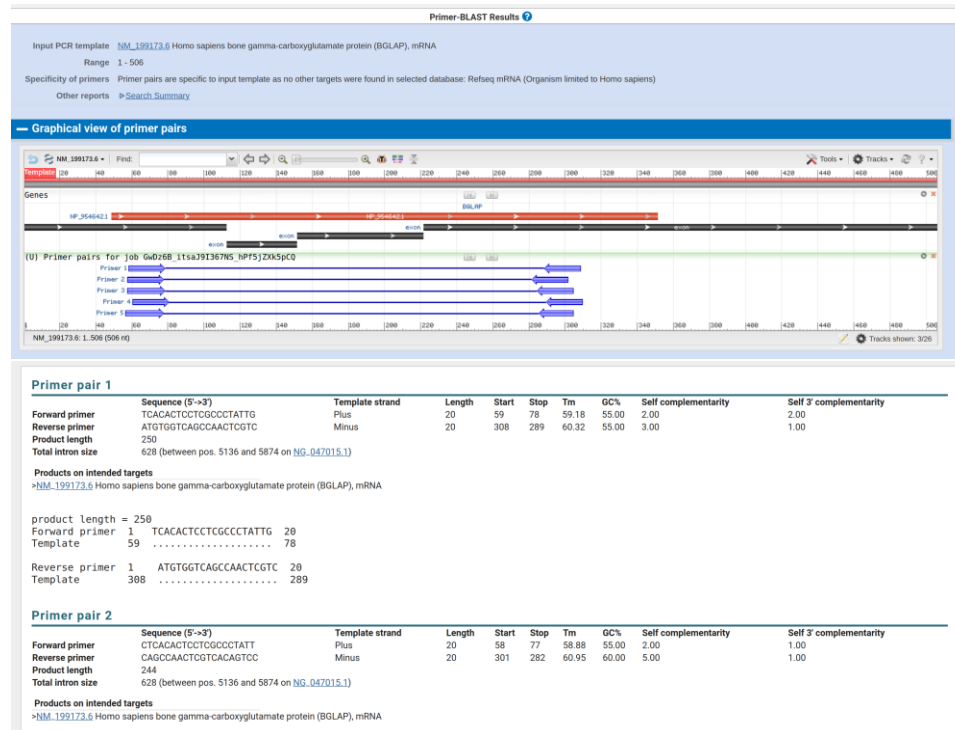
Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCACACTCTCGCCCTATT	Plus	21	57	77	61.30	57.14	2.00	1.00
Reverse primer	GTCTCTTCACTACCTCGCTGC	Minus	21	193	173	60.47	57.14	3.00	3.00
Product length	137								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 137									
Forward primer	1 CCTCACACTCTCGCCCTATT	21							
Template	57 .....	77							
Reverse primer	1 GTCTCTTCACTACCTCGCTGC	21							
Template	193 .....	173							
Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGCACTTTGCATCGCT	Plus	17	86	102	58.72	58.82	4.00	2.00
Reverse primer	GGCTCCAGCATTGATACA	Minus	20	225	206	59.82	55.00	5.00	2.00
Product length	140								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 140									
Forward primer	1 CCGCACTTTGCATCGCT	17							
Template	86 .....	102							
Reverse primer	1 GGCTCCAGCATTGATACA	20							
Template	225 .....	206							
Primer pair 5									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGGCCGCACTTTGCATC	Plus	17	83	99	58.62	58.82	4.00	1.00
Reverse primer	TTGATACAGGTAGCGCTGG	Minus	20	213	194	59.54	55.00	4.00	3.00
Product length	131								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 131									
Forward primer	1 TGGCCGCACTTTGCATC	17							
Template	83 .....	99							
Reverse primer	1 TTGATACAGGTAGCGCTGG	20							
Template	213 .....	194							

## b. Wersja z długością produktu PCR między 150 a 200

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACCGAGACCATGAGAG	Plus	20	36	55	59.83	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	CTCTTCACTACCTCGCTGCC	Minus	20	191	172	60.18	60.00	3.00	1.00
Product length	156								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 156									
Forward primer	1 CCACCGAGACCATGAGAG	20							
Template	36 .....	55							
Reverse primer	1 CTCTTCACTACCTCGCTGCC	20							
Template	191 .....	172							
Primer pair 2									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACCGAGACCATGAGAGC	Plus	20	37	56	60.46	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	GGGTCTCTTCACTACCTCGC	Minus	20	195	176	59.54	60.00	3.00	2.00
Product length	159								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 159									
Forward primer	1 CACCGAGACCATGAGAGC	20							
Template	37 .....	56							
Reverse primer	1 GGGTCTCTTCACTACCTCGC	20							
Template	195 .....	176							

Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCACACTCCTCGCCCTATTG	Plus	20	59	78	59.18	55.00	2.00	2.00
Reverse primer	ATTGATACAGGTAGCGCTGG	Minus	21	214	194	59.93	52.38	4.00	3.00
Product length	156								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length =	156								
Forward primer	1 TCACACTCCTCGCCCTATTG 28								
Template	59 .....								
Reverse primer	1 ATTGATACAGGTAGCGCTGG 21								
Template	214 .....								
Primer pair 4									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCACACTCCTCGCCCTATT	Plus	20	58	77	58.88	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CCATTGATACAGGTAGCGCCT	Minus	21	216	196	59.93	52.38	4.00	2.00
Product length	159								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length =	159								
Forward primer	1 CTCACACTCCTCGCCCTATT 28								
Template	58 .....								
Reverse primer	1 CCATTGATACAGGTAGCGCCT 21								
Template	216 .....								
Primer pair 5									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCACCGAGACCATGAGA	Plus	20	35	54	61.89	60.00	4.00	0.00
Reverse primer	TGATACAGGTAGCGCTGGG	Minus	20	212	193	61.40	60.00	4.00	2.00
Product length	178								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
>NM_199173.6 Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length =	178								
Forward primer	1 GCCACCGAGACCATGAGA 28								
Template	35 .....								
Reverse primer	1 TGATACAGGTAGCGCTGGG 20								
Template	212 .....								

## c. Wersja z długością produktu PCR między 200 a 250



Primer pair 3

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCACACTCTCGCCCTATTG	Plus	21	58	78	60.20	57.14	2.00	2.00
Reverse primer	GGTCAGCCAACCTGTCACAG	Minus	20	304	285	60.95	60.00	3.00	3.00
Product length	247								
Total intron size	628 (between pos. 5136 and 5874 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								

Products on intended targets

>[NM\\_199173.6](#) Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA

product length = 247

Forward primer	1	CTCACACTCTCGCCCTATTG	21
Template	58	.....	78
Reverse primer	1	GGTCAGCCAACCTGTCACAG	20
Template	304	.....	285

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACACTCTCGCCCTATTGGC	Plus	20	61	80	61.97	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	GATGTGGTCAGCCAACCTGT	Minus	20	309	290	60.32	55.00	3.00	2.00
Product length	249								
Total intron size	628 (between pos. 5136 and 5874 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								

Products on intended targets

>[NM\\_199173.6](#) Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA

product length = 249

Forward primer	1	ACACTCTCGCCCTATTGGC	20
Template	61	.....	80
Reverse primer	1	GATGTGGTCAGCCAACCTGT	20
Template	309	.....	290

Primer pair 5

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCACACTCTCGCCCTATT	Plus	21	57	77	61.30	57.14	2.00	1.00
Reverse primer	GGTCAGCCAACCTGTCACA	Minus	19	304	286	59.93	57.89	3.00	1.00
Product length	248								
Total intron size	628 (between pos. 5136 and 5874 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								

Products on intended targets

>[NM\\_199173.6](#) Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA

product length = 248

Forward primer	1	CCTCACACTCTCGCCCTATT	21
Template	57	.....	77
Reverse primer	1	GGTCAGCCAACCTGTCACA	19
Template	304	.....	286

Jako ostateczny wybór 3 setów primerów spośród wyestymowanych zostały wybrane 1 sety primerów z każdej opcji ustawień parametrów:

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTCACACTCTCGCCCTATT	Plus	20	58	77	58.88	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	TCTCTTCACTACCTCGCTGC	Minus	20	192	173	59.19	55.00	3.00	3.00
Product length	135								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
> <a href="#">NM_199173.6</a> Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 135									
Forward primer	1 CTCACACTCTCGCCCTATT	20							
Template	58 .....	77							
Reverse primer	1 TCTCTTCACTACCTCGCTGC	20							
Template	192 .....	173							

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCACCGAGACCATGAGAG	Plus	20	36	55	59.83	60.00	4.00	2.00
Reverse primer	CTCTTCACTACCTGCTGCC	Minus	20	191	172	60.18	60.00	3.00	1.00
Product length	156								
Total intron size	427 (between pos. 5136 and 5603 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
> <a href="#">NM_199173.6</a> Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 156									
Forward primer	1 CCACCGAGACCATGAGAG	20							
Template	36 .....	55							
Reverse primer	1 CTCTTCACTACCTGCTGCC	20							
Template	191 .....	172							

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCACACTCTCGCCCTATTG	Plus	20	59	78	59.18	55.00	2.00	2.00
Reverse primer	ATGTGGTCAGCCAACCTGTC	Minus	20	308	289	60.32	55.00	3.00	1.00
Product length	250								
Total intron size	628 (between pos. 5136 and 5874 on <a href="#">NG_047015.1</a> )								
Products on intended targets									
> <a href="#">NM_199173.6</a> Homo sapiens bone gamma-carboxylglutamate protein (BGLAP), mRNA									
product length = 250									
Forward primer	1 TCACACTCTCGCCCTATTG	20							
Template	59 .....	78							
Reverse primer	1 ATGTGGTCAGCCAACCTGTC	20							
Template	308 .....	289							

Te trzy zestawy zostały wybrane ze względu na najlepsze spełnianie następujących kryteriów:



- startery miały takie same długości
- pary GC były zawarte pomiędzy 50 a 60%, a ich zawartości były najbardziej zbliżone w zestawach
- startery miały najbardziej zbliżoną temperaturę topnienia
- Na końcu 3' jest nukleotyd C lub G

Wybór ostatecznego zestawu zależałby od konkretnej długości produktu jaką chcemy otrzymać w trakcie PCR.

## 2. Praca z miRBase

### a. Opis zadania

Należy wyszukać sekwencję miRNA miR-320 dla człowieka, poprzez wpisanie właściwej nazwy cząsteczki miRNA, z uwzględnieniem przedrostków typowych dla danego gatunku.

### b. Raport dla cząsteczki hsa-miR-320

Aby wyszukać sekwencję miR-320 dla człowieka użyłam w wyszukiwarce hsa-miR-320. W związku z wyszukiwaniem daną komendą zostały odnalezione 22 rekordy z 4 następujących grup:

---

**Your query "hsa-miR-320" returned 22 results**

We found 22 unique results for your query ("hsa-miR-320"), in 4 sections of the database.		
Section	Description	Number of hits
miRNA name	match the accession or ID of a hairpin precursor entry	12
Previous ID	match a previous ID of a hairpin precursor entry	1
Mature name	match the accession or ID of a mature miRNA sequence	10
Previous mature ID	match the previous mature ID of a mature entry	2

Pod powyższą tabelą wyświetliły się konkretne rekordy – do dalszej analizy został wybrany pierwszy z nich o numerze dostępu MI0000542. W logach sprawdziłam zmiany w nazwie i upewniłam się, że jest to szukana przeze mnie hsa-miR-320:

---

## MI0000542 change log

Version	Accession	ID	Change
2.2	<a href="#">MI0000542</a>	<a href="#">hsa-mir-320</a>	new
3.0	<a href="#">MI0000542</a>	<a href="#">hsa-mir-320</a>	<a href="#">sequence</a>
11.0	<a href="#">MI0000542</a>	<a href="#">hsa-mir-320a</a>	name
22	<a href="#">MI0000542</a>	<a href="#">hsa-mir-320a</a>	<a href="#">sequence</a>

Na stronie mamy wiele informacji dotyczących hsa-mir-320:

- Accession: MI0000542 (change log)
- Previous IDs: hsa-mir-320
- Symbol: HGNC:MIR320A
- Description: [Homo sapiens](#) miR-320a stem-loop
- Gene family: MIPF0000163; [mir-320](#)
- Literature search: 201 open access papers mention hsa-mir-124-1 (1377 sentences)
- Stem-loop:

Deep sequencing: 1706144 reads, 5.33e+03 reads per million, 160 experiments

- Confidence: Annotation confidence: high
- Genome context: Coordinates (GRCh38; GCA\_000001405.15) , chr8: 22244966-22245037 [-]
- Database links:

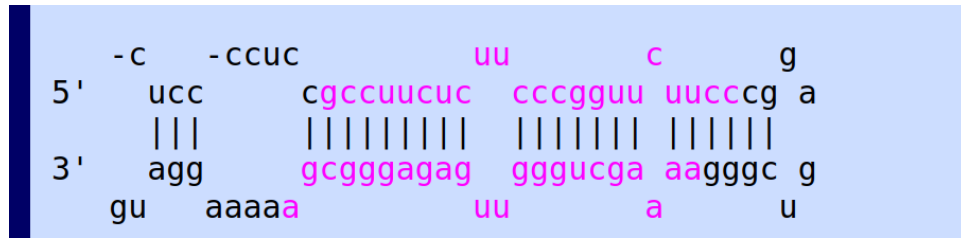
EntrezGene:MIR320A

HGNC:MIR320A

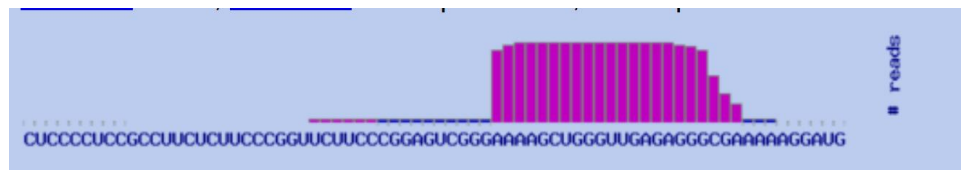
RNAcentral:URS00006FED78\_9606

miRBase Tracker:MI0000542

Nić pasażerska to sekwencja na 5' i nić wiodąca to sekwencja na 3' na poniższym rysunku:



Nić pasażerska to fragment o niskich kolumnach a nić wiodąca to fragment o wysokich kolumnach na różowo na poniższym rysunku:



Nić pasażerska i nić wiodąca zostały również opisane na poniższym zdjęciu, odpowiednio hsa-miR-320a-5p to dojrzała nić pasażerska, a hsa-miR-320a-3p to dojrzała nić wiodąca:

Mature sequence hsa-miR-320a-5p	
Accession	<a href="#">MIMAT0037311</a>
Sequence	10 - gccuucucuuccgguucuucc - 31 <a href="#">Get sequence</a>
Deep sequencing	<a href="#">1004</a> reads, 94 experiments
Evidence	not experimental
Mature sequence hsa-miR-320a-3p	
Accession	<a href="#">MIMAT0000510</a>
Previous IDs	hsa-miR-320
Sequence	42 - aaaagcuggguugagaggcgga - 63 <a href="#">Get sequence</a>
Deep sequencing	<a href="#">1693285</a> reads, 159 experiments
Evidence	experimental; cloned [1-4], Illumina [5]
Database links	RNAcentral: <a href="#">URS00003CF1AD_9606</a>
Predicted targets	TargetScanVert: <a href="#">hsa-miR-320a</a> miRDB: <a href="#">hsa-miR-320a-3p</a> microrna.org: <a href="#">hsa-miR-320a-3p</a>