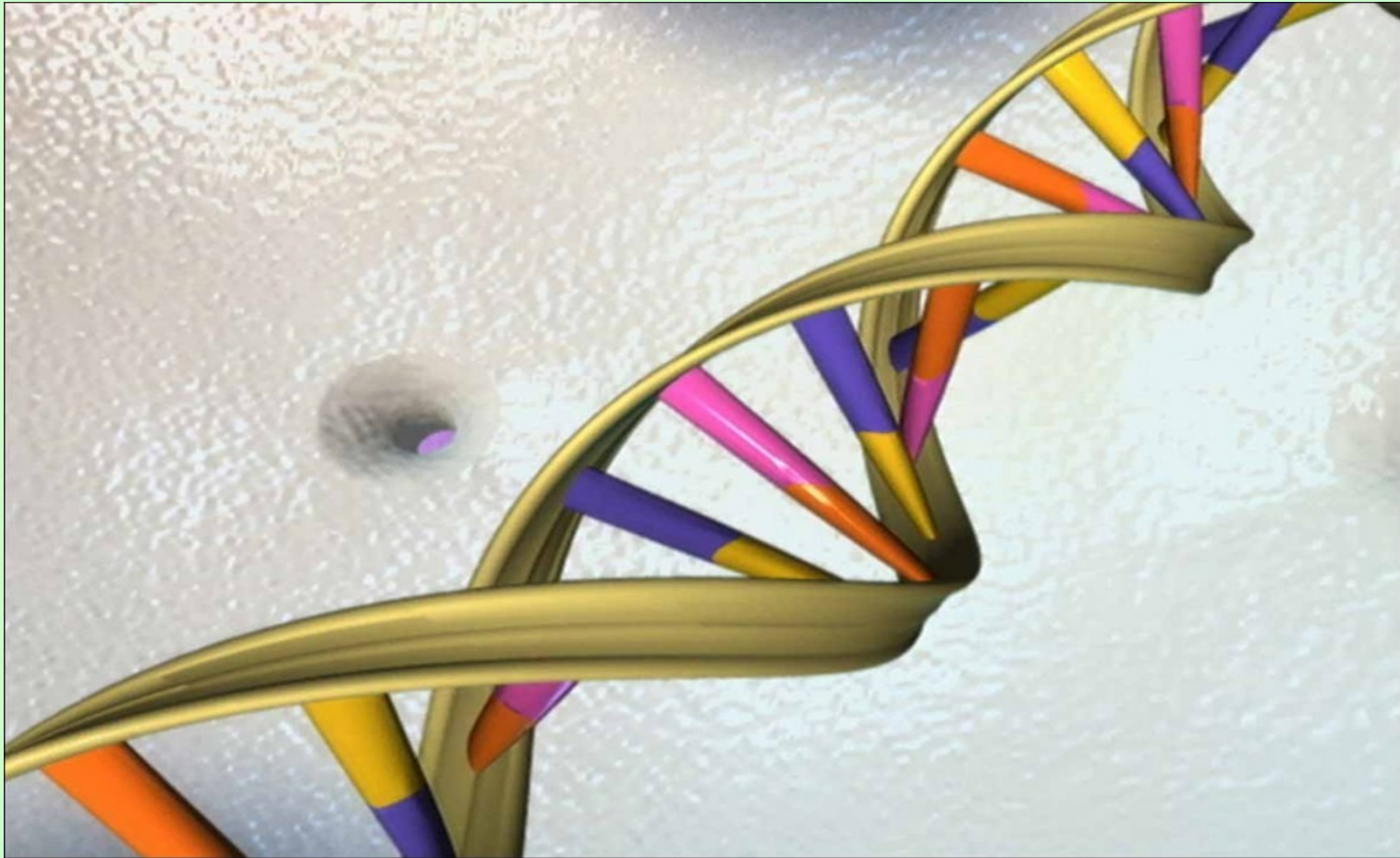


# RT – PCR: návrh primerů



# PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplifikace specifického úseku DNA - princip replikace *in vivo*

- **Denaturace DNA**

- **Připojení primerů** na protilehlé řetězce DNA: 3'-OH-konce proti sobě

- **Syntéza** komplementárního řetězce podle templátu (ssDNA)

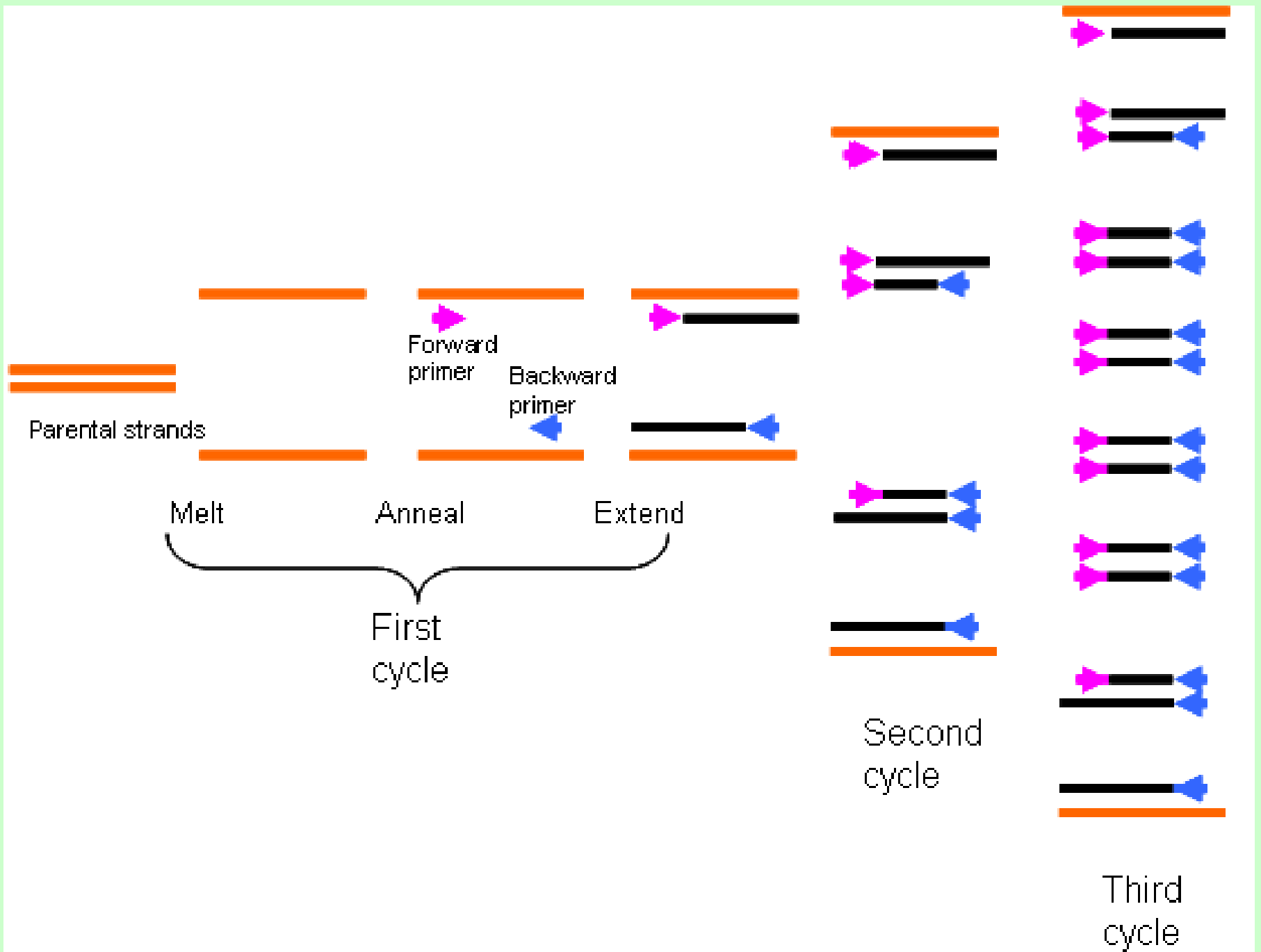
-teplotně stabilní DNA polymeráza

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>

-dNTP ve formě Na<sup>+</sup> nebo Li<sup>+</sup> solí

-Mg<sup>2+</sup> ionty ovlivňují aktivitu enzymu a zvyšují hodnotu T<sub>m</sub> u dsDNA

(koncentrace 1 mM - 5 mM)



## Vlastní reakce:

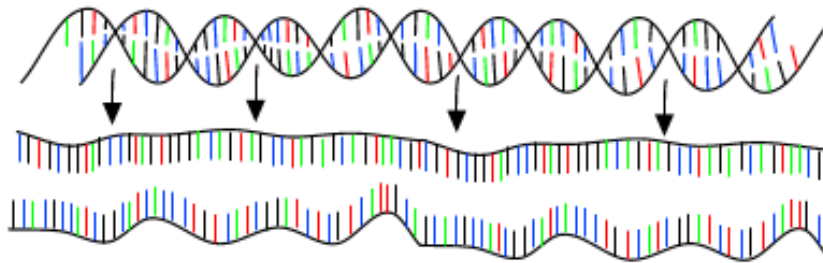
- 1) Počáteční denaturace DNA templátu 2 – 5 min / 95 °C.
- 2) Denaturační krok (separace řetězců) 94 – 95 °C / 20 – 45 s  
-umožňuje přístup primerů
- 3) Připojení primerů 55 - 65 °C / 30 – 90 s  
- teplota závisí na  $T_m$  primeru a templátu, pro oba primery by měla být  $T_m$  podobná.
- 4) Prodlužování primeru (polymerační reakce) 72 °C / 45 – 90 s  
-Taq DNA polymeráza syntetizuje DNA rychlostí cca 60 bází / s.

Nově syntetizované řetězce slouží jako templáty pro další cyklus.



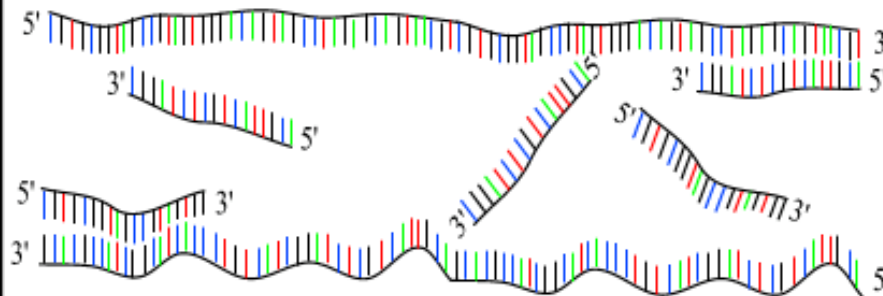
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

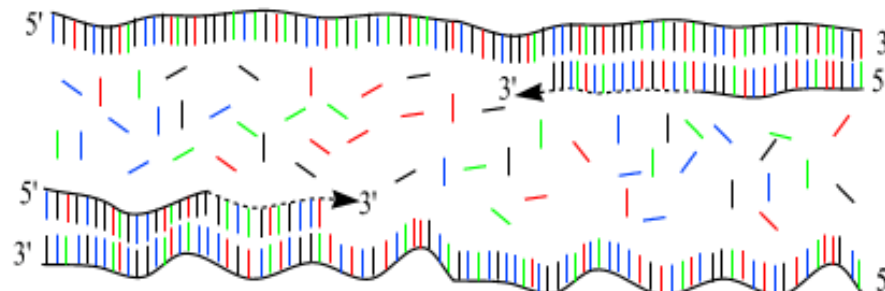
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C  
only dNTP's

# RT-PCR = Reverzní transkripce + PCR – analýza exprese

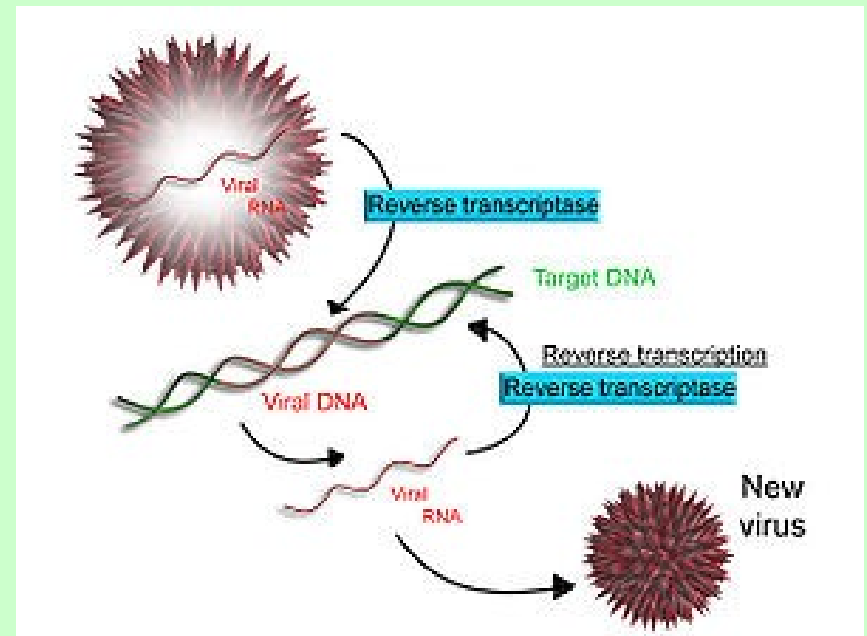
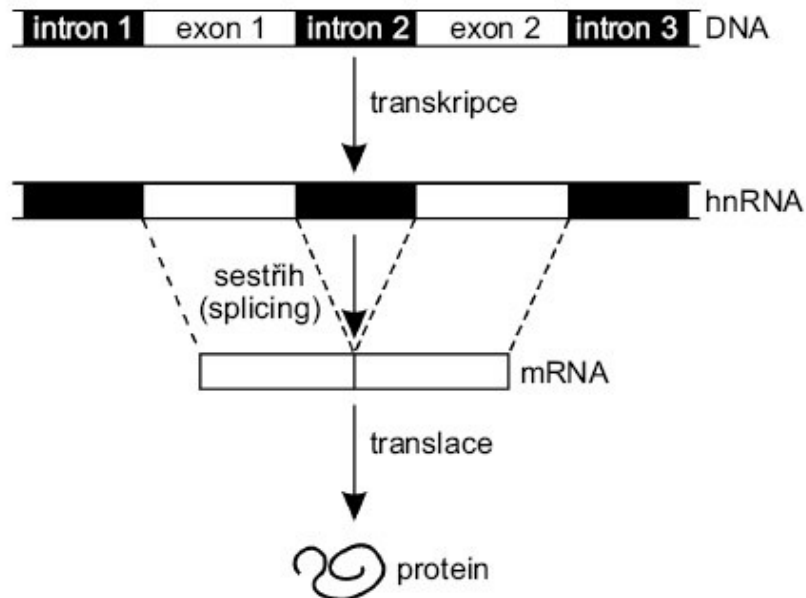
Transkripce → mRNA

Reverzní transkripce - mRNA → cDNA (na principu virové RT)

- Reverzní transkriptáza (RdDp)

- primery – poly T (mRNA) nebo náhodné nebo specifické

- nukleotidy

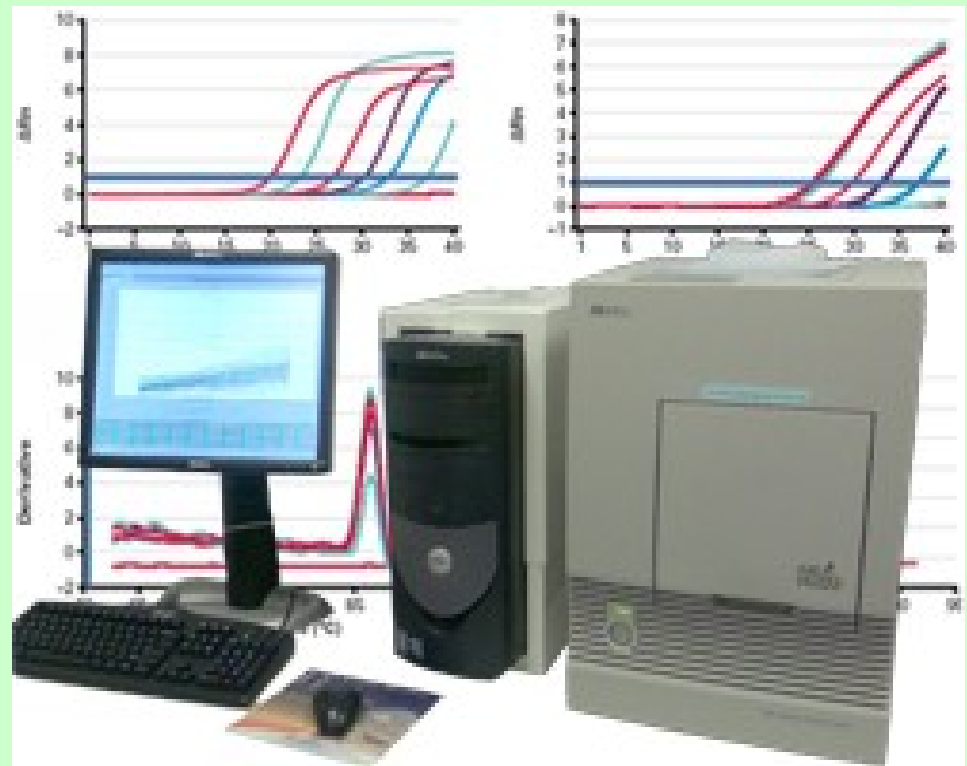


# Kvantitativní PCR (qPCR)

PCR sledovaná v reálném čase (real-time PCR)  
- detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu

Přístroj umožňuje:

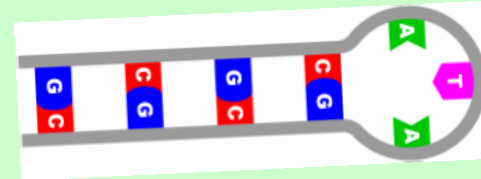
- cyklické střídání teplot
- detekci fluorescence
- monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR-produkty elektroforeticky



# Návrh primerů

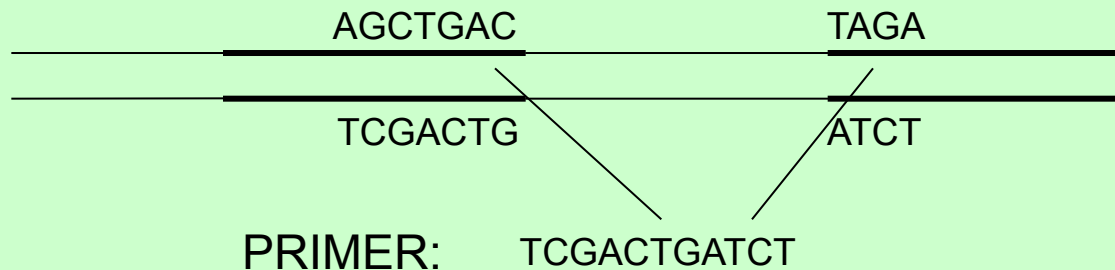
Optimálně:

- 18 – 25 bází
- bez vnitřních sekundárních struktur
- G+C 40 – 60 %
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- bez vzájemné komplementarity na 3'-koncích - nevytváří navzájem nebo samy se sebou duplexy
- bez falešných vazebných míst na matricové DNA
- T<sub>m</sub> teplotu 55 – 65 °C



## RT-PCR

Primery komplementární k sekvenci na spojení exon/exon  
(neamplifikují genomovou DNA)





# Návrh primerů

1. Vyhledání sekvence genu
2. Návrh sekvence
3. Kontrola – specifity
  - tvorby dimerů a sekundárních struktur ( $\Delta G^0 < 10$  kcal/mol)
  - $T_m$  – snižující se směrem k 3'konci
4. Určení délky produktu,  $T_a$  - závislost na iontové síle (Mg)

Využití programů a databází - např:

[Primer3](#)  
[Oligo Analyzer 3.0](#)  
[Oligonucleotide Properties Calculator](#)  
[Oligo](#) (demo for Windows)  
Jiný [OligoCalc](#)  
[WebPrimer](#)  
[Electronic PCR](#) (service at NCBI)  
[Virtual PCR](#)  
[PCRlinks.com](#)

# Návrh primerů - příklad

## 1. Vyhledat sekvenci genu – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database search results for the gene *Mus musculus* Pou5f1. The search was performed using the keyword "Nucleotide" and returned the reference sequence NM\_013633.2. The sequence is displayed in FASTA format, and the search results are shown in a table format. The table includes fields for LOCUS, DEFINITION, ACCESSION, VERSION, KEYWORDS, SOURCE, ORGANISM, REFERENCE, AUTHORS, TITLE, and JOURNAL.

NCBI Reference Sequence: NM\_013633.2

### Mus musculus POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1), mRNA

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS	NM_013633	1346 bp	mRNA	linear	ROD 14-FEB-2010
DEFINITION	Mus musculus POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1), mRNA.				
ACCESSION	NM_013633				
VERSION	NM_013633.2	GI:125490391			
KEYWORDS	.				
SOURCE	Mus musculus (house mouse)				
ORGANISM	<a href="#">Mus musculus</a> Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Mus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1346)				
AUTHORS	Ralston,A., Cox,B.J., Nishioka,N., Sasaki,H., Chea,E., Rugg-Gunn,P., Guo,G., Robson,P., Draper,J.S. and Rossant,J.				
TITLE	Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2				
JOURNAL	Development 137 (3): 395-403 (2010)				

**Change Region Shown**

**Customize View**

**Analyze This Sequence**

- ▶ Run BLAST
- ▶ Pick Primers

**Articles about the Pou5f1 gene**

- ▶ Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. [Development.
- ▶ Stk40 links the pluripotency factor Oct4 to the Erk/MAP pathway and controls extra [Proc Natl Acad Sci U S A.
- ▶ Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripoter [Proc Natl Acad Sci U S A.

[RefSeq Protein Product](#)

# Návrh primerů - příklad

**PCR Template** [Reset page](#) [Save search parameters](#)

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

NM\_013633.2

Or, upload FASTA file

**Range**

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  Max

# of primers to return

Primer melting temperatures (T<sub>m</sub>)

Min  Opt  Max  Max T<sub>m</sub> difference

Please note the recent change in default T<sub>m</sub> calculation [?](#)

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

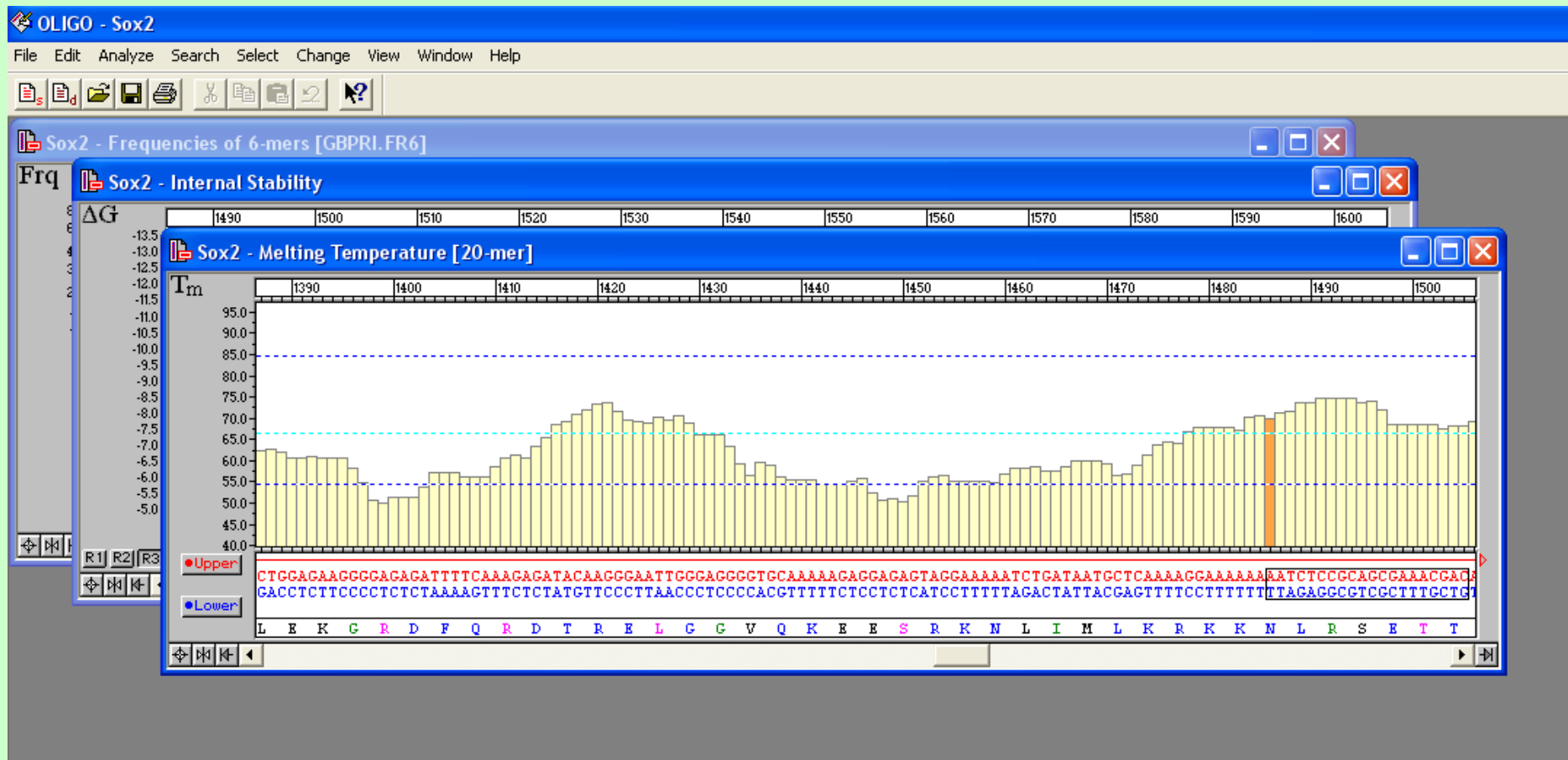
Exon junction span  [?](#)

Exon junction match

Exon at 5' side  Exon at 3' side

# Návrh primerů - příklad

1. Vyhledat sekvenci genu – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. Návrh primeru – NCBI pick primers nebo samostatné programy
3. Kontrola primerů - [Oligo Analyzer 3.0](#) (na webu) nebo programy (Oligo)

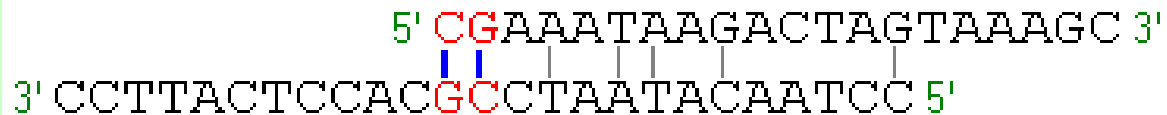


## PŘÍKLADY STRUKTUR VYTVÁŘENÝCH PRIMERY

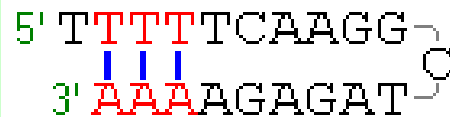
- Chybně navržená dvojice primerů, která vytváří stabilní duplex na 3'-konci:



- Správně navržená dvojice primerů, která vytváří pouze málo stabilní duplex na 5'-konci; na 3'-konci je G nebo C zaručující stabilní párování s templátem:



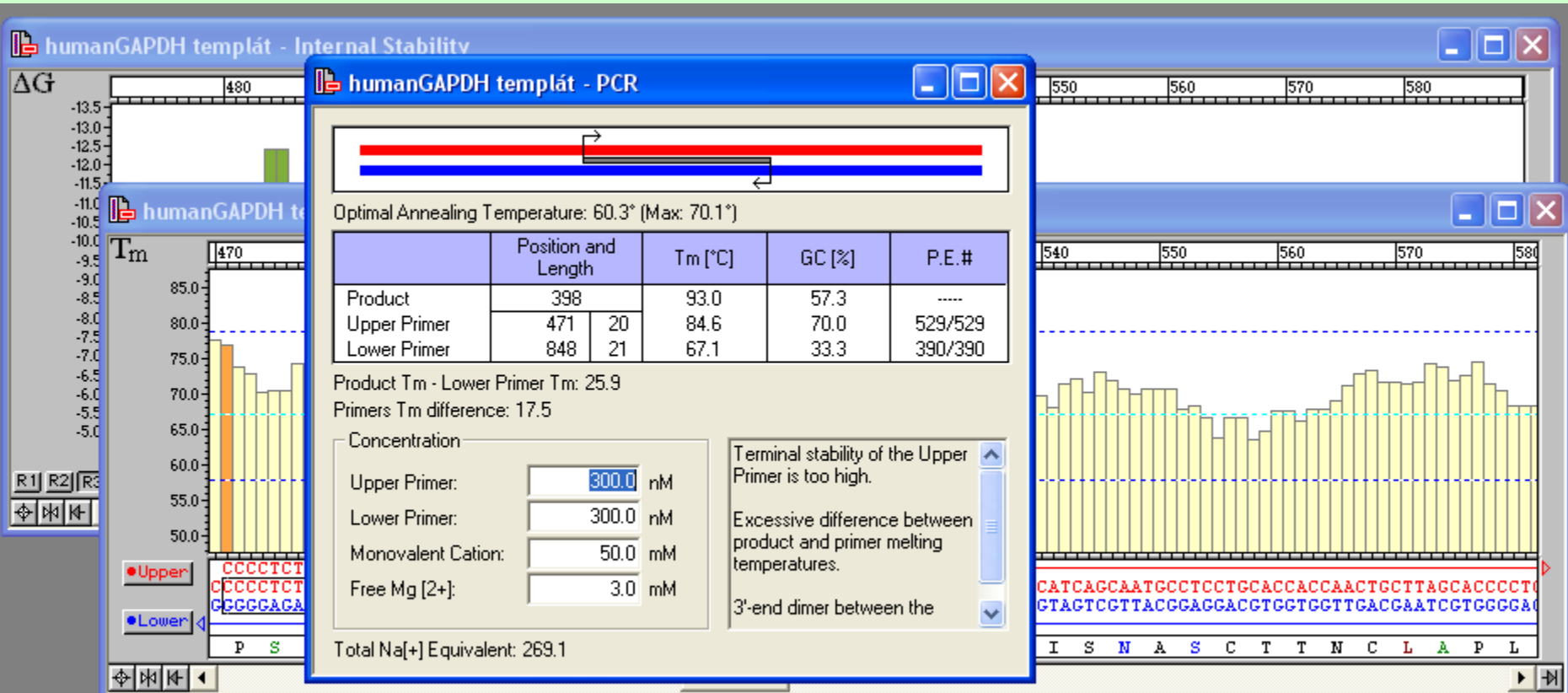
- Chybně navržený primer, vytvářející vlásenku:



# Návrh primerů - příklad

## 3. Kontrola primerů - [Oligo Analyzer 3.0](#) (na webu) nebo programy (Oligo)

### -Chybové hlášení



# Návrh primerů - příklad

1. Vyhledat sekvenci genu – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
2. Návrh primeru – NCBI pick primers nebo samostatné programy
3. Kontrola primerů - [Oligo Analyzer 3.0](#) (na webu) nebo programy (Oligo)
4. Zjištění optimální Ta a délky produktu – program Oligo

Sox2 - PCR

Optimal Annealing Temperature: 62.4° (Max: 72.0°)

	Position and Length	T <sub>m</sub> [°C]	GC [%]	P.E.#
Product	629	94.7	66.6	----
Upper Primer	758   20	70.6	50.0	403/403
Lower Primer	1367   20	77.7	60.0	446/446

Product T<sub>m</sub> - Upper Primer T<sub>m</sub>: 24.1  
Primers T<sub>m</sub> difference: 7.1

Concentration:

Upper Primer:  nM  
Lower Primer:  nM  
Monovalent Cation:  mM  
Free Mg [2+]:  mM

Total Na[+] Equivalent: 176.5

Excessive difference between product and primer melting temperatures.  
3'-end Upper Primer dimer.

*A pak už je to hračka*

