BIOINFORMATIKA V PRAXI – CVIČENÍ 4

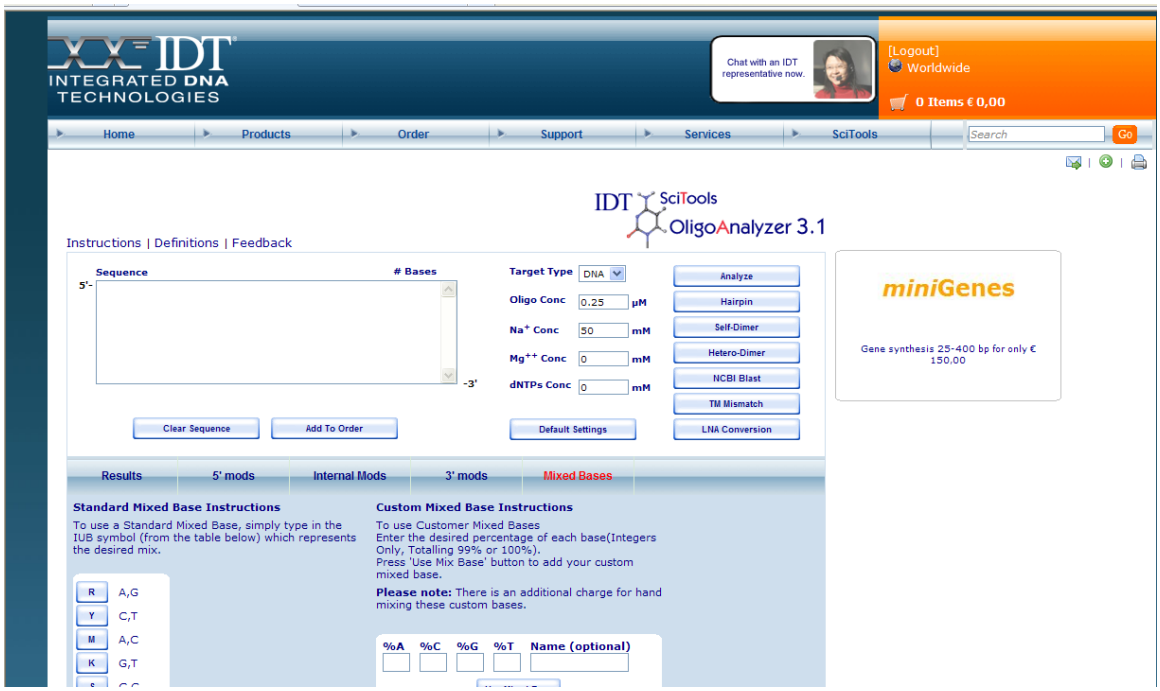
DESIGN PRIMERŮ

PRIMERY A JEJICH VÝZNAM V MOLEKULÁRNÍ BIOLOGII

Krátké oligonukleotidové řetězce, které slouží pro provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) označujeme jako primery. PCR má široké využití pro namnožení vybraných úseků DNA, detekci genů a dalších sekvencí, úpravu sekvencí (mutace) a řadu dalších aplikací. Návrh primerů tak musí zohledňovat účel, ke kterému budou použity.

SEZNÁMENÍ SE S PROGRAMEM PRO ANALÝZU PRIMERŮ

Krátké oligonukleotidy pro amplifikaci DNA in vitro (primery) lze v zásadě navrhovat ručně, s výhodou však můžeme používat počítačové programy. Ty mají svou nezastupitelnou roli zejména při analýze navržené sekvence primeru. Existuje řada programů pro tento účel a to včetně volně použitelných. V tomto cvičení budete používat program **OligoAnalyzer** na serveru firmy IDT: (http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/)



ÚKOL 1

Seznamte se s aplikací **OligoAnalyzer**.

Se kterými typy sekvencí umí aplikace pracovat?

Jaká je základní (default) uvažovaná koncentrace iontů a s jakými hodnotami umí program zacházet?

Jaké písmeno je užito pro označení následujících bazí (mixed base)?

VÝZNAM DÉLKY PRIMERŮ A ZASTOUPENÍ BAZÍ (A+T/G+C) – T_m

Jednou z charakteristik primerů je jejich délka, která v kombinaci s konkrétním zastoupení bazí určuje tzv. teplotu tání (T_m, melting temperature). Ta se zvyšuje s délkou primeru a se zvyšujícím se zastoupením G+C bazí. Vyšší T_m zvyšuje specifitu primeru, pokud je však hodnota T_m příliš vysoká, nebude PCR probíhat správně. Syntéza dlouhých primerů je rovněž technicky a tudíž i finančně náročnější.

Pro typickou PCR, kde míra shodnosti sekvence primeru a cílové DNA sekvence je vysoká (100 – 90%) se jako optimální délka primerů uvádí cca 17 – 28 bází. Optimální T_m se obvykle pohybuje v rozmezí 55 – 80°C. T_m dvojice primerů by se neměla lišit o více než ±2°C.

OTÁZKA

Jaký základní vzorec je použit programem OligoAnalyzer pro výpočet T_m (melting temperature, teplota tání) primeru?

ÚKOL 2

Zjistěte T_m následujících primerů (nastavení: default). Uvědomte si změnu T_m danou prodloužením sekvence a změnu danou složením (zastoupením G+C resp. A+T bazí).

#	Sekvence	Délka	G+C [%]	T_m
1				
2				
3				
4				
5				

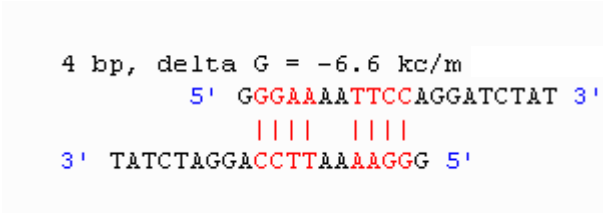
ÚKOL 3

Z následujících primerů vyberte vhodnou dvojici na základě jejich T_m.

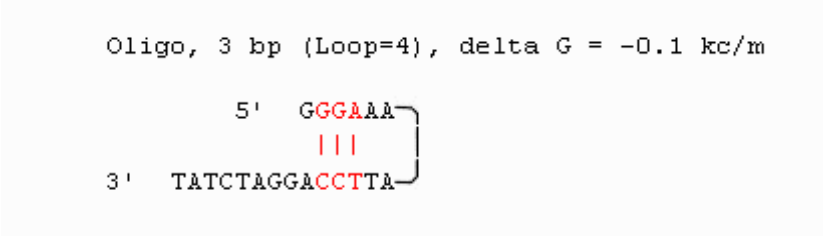
#	Sekvence	T_m	Vhodná dvojice s #
1			
2			
3			
4			
5			

ANALÝZA SEKVENCE PRIMERŮ – DIMERY, VLÁSENKY

I primery s vhodně zvolenou T_m mohou být nevhodné pro PCR, pokud by vytvářely nevhodné sekundární struktury. Pro správné nasednutí na cílovou DNA je třeba, aby primery existovaly jako monomerní molekuly a žádná z bazí nebyla blokována. K tomu však dochází, pokud primery tvoří dimery (ať již samy se sebou – homodimery, nebo s druhým primerem ve dvojici – heterodimery):



Podobně není žádoucí ani interakce uvnitř primeru, která vede ke tvorbě vlásenky:



V obou případech je důležité sledovat i konkrétní místo, kde by k těmto nežádoucím interakcím mohlo docházet. Obzvláště nevhodná je tvorba sekundárních struktur na 3' konci primeru.

ÚKOL 4
Odhalte možnou tvorbu dimerů u následujících dvojic primerů a označte zda se jedná o homodimer nebo heterodimer. Zároveň uveďte sílu dané interakce, tj. volnou Gibbsovu energii dané vazby (ΔG). Pokud může vznikat více různých dimerů, uvádějte jen nejstabilnější z nich.

Primer 1a
Primer 1b

Dimer			
Typ			
ΔG			

Primer 2a
Primer 2b

Dimer			
Typ			
ΔG			

ÚKOL 5
U následujících primerů detekujte tvorbu vlásenek a seřaďte tyto primery podle tendence k tvorbě vlásenek od nejvyšší k nejnižší.

Primer	Vlásenka (ANO – NE)	ΔG	Pořadí

ANALÝZA MOŽNÉHO ŠPATNÉHO NASEDNUTÍ PRIMERŮ – FALSE PRIMING SITES (FPS)

I primery, které splňují všechny výše probírané parametry, se mohou ukázat jako nevhodné pro konkrétní účel, pokud nenasedají dostatečně specificky. Přítomnost více míst, která jsou rozpoznávána primery (false priming sites) vede k tvorbě více různých PCR produktů. Význam této analýzy se liší v závislosti na účelu PCR. Pro následné klonování a tvorbu rekombinantního proteinu je žádoucí tvorba jednoho PCR produktu, akceptovatelná je tvorba několika málo PCR produktů o různé délce. Na rozdíl od předchozích úkolů je v tomto případě klíčová nejen znalost sekvence primerů a samotného cílového úseku (genu) ale kompletní DNA přítomné v PCR směsi.

Komerční programy běžně nabízejí možnost detekce míst špatného nasednutí. U volně dostupných programů je tato funkce bohužel často opomíjena. Program **Primer-BLAST** na serveru NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) využívá propojení s databázemi a umožňuje tuto detekci provést.

ÚKOL 7

Pro následující geny navrhněte primery tak, aby ve výsledku byl amplifikován celý gen. Ověřte možnost tvorby nežádoucích produktů při použití DNA mateřského organismu jako templátu v PCR směsi. Ke každému genu doplňte navrženou dvojici primerů, délku PCR produktu a délku dvou velikostně nejbližších možných nežádoucích produktů.

Gen 1
Organismus:

Sekvence:

Gen 2
Organismus:

Sekvence:

Gen 3
Organismus:

Sekvence:

VLASTNÍ DESIGN PRIMERŮ

ÚKOL 8

Primer navrhujeme vždy s ohledem na smysl jeho použití. Je-li cílem detekce přítomnosti/nepřítomnosti genu, nemusíme primery navrhovat tak, aby PCR produkt obsahoval celý gen, nebo naopak může zahrnovat i část okolní DNA. Pro tuto aplikaci lze s výhodou využít on-line programy, které v rámci zadané sekvence navrhují optimalizované primery. Úkolem vědce je mezi nabízenými alternativami vybrat tu nejvhodnější.

Pomocí programu Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3) navrhněte pro následující sekvenci vhodné primery tak, aby výsledný PCR produkt měl délku mezi 350 a 500 bp. Pro nastavení ostatních parametrů využijte znalostí z předchozích úkolů.

Sekvence:

Primer	Sekvence	Délka	Pozice	T_m	GC [%]	Dimer	3' dimer	Vlásenka
Left								
Right								

Délka PCR produktu:

ÚKOL 9
Na základě výše získaných znalostí navrhněte vhodnou dvojici primerů ke genu, s nímž budete pracovat v následujícím cvičení:

Genová sekvence:

Primery by měly zahrnovat počátek a konec genu tak, aby výsledný PCR produkt obsahoval celý gen. Zkontrolujte T_m obou primerů, možnou tvorbu dimerů a vlásenek, primery by měly mít délku mezi 20 a 28 bp a obsah G+C bazí by měl být mezi 40 a 60 %.

Primer	Sekvence	Délka	Pozice	T_m	GC [%]	Dimer	3' dimer	Vlásenka
Left								
Right								

SAMOSTATNÝ PROJEKT
Vaším úkolem je navrhnout vhodnou dvojici primerů ke genu, který jste identifikovali v sekvenci zadané v předchozím cvičení. Opět platí, že primery by měly zahrnovat počátek a konec genu tak, aby výsledný PCR produkt obsahoval celý gen. Zkontrolujte T_m obou primerů, možnou tvorbu dimerů a vlásenek, primery by měly mít délku mezi 20 a 28 bp a obsah G+C bazí by měl být mezi 40 a 60 %.