



Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Přírodovědecká fakulta Masarykovy university



SYNTETICKÉ OLIGONUKLEOTIDY

Hana Konečná

CENTRÁLNÍ LABORATOŘ
Masarykovy Univerzity v Brně

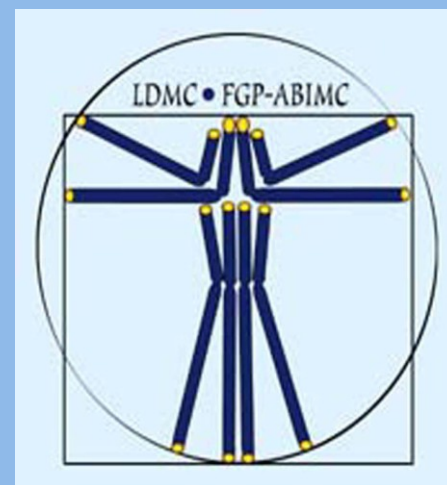
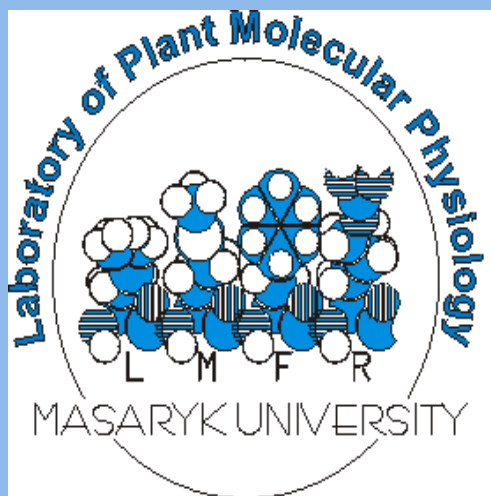


ODDĚLENÍ FUNKČNÍ GENOMIKY A PROTEOMIKY

Laboratoř molekulární
fyziologie rostlin

Centrální laboratoř
CL

Laboratoř analýzy
biologicky
významných komplexů



CENTRÁLNÍ LABORATOŘ

- přístup k pokročilým technologiím na bázi sdílené instrumentace a její kvalifikované obsluhy
 - proteomické techniky
 - genomické techniky
- výuka - přednášky a praktické kurzy
- členství v ABRF
(Association of Biomolecular Resource Facilities)

TECHNIKY V CENTRÁLNÍ LABORATOŘI

- sekvenování a fragmentační analýza DNA
- syntéza a purifikace oligonukleotidů
- kapalinová chromatografie
- gelová elektroforéza
- analýza obrazu
- digesce proteinů
- hmotnostní spektrometrie
- minisklad reagensí pro molekulární biologii

SYNTETICKÉ OLIGONUUKLEOTIDY

- definice
- aplikace
- modifikace
- syntéza
- purifikace
- kontrola kvality

- design sekvence
- zásady navrhování
- software OLIGO 6
- praktická ukázka

oligonukleotid

- krátká jednořetězcová struktura
- DNA nebo RNA (event. PNA)
- hydroxyl na obou koncích

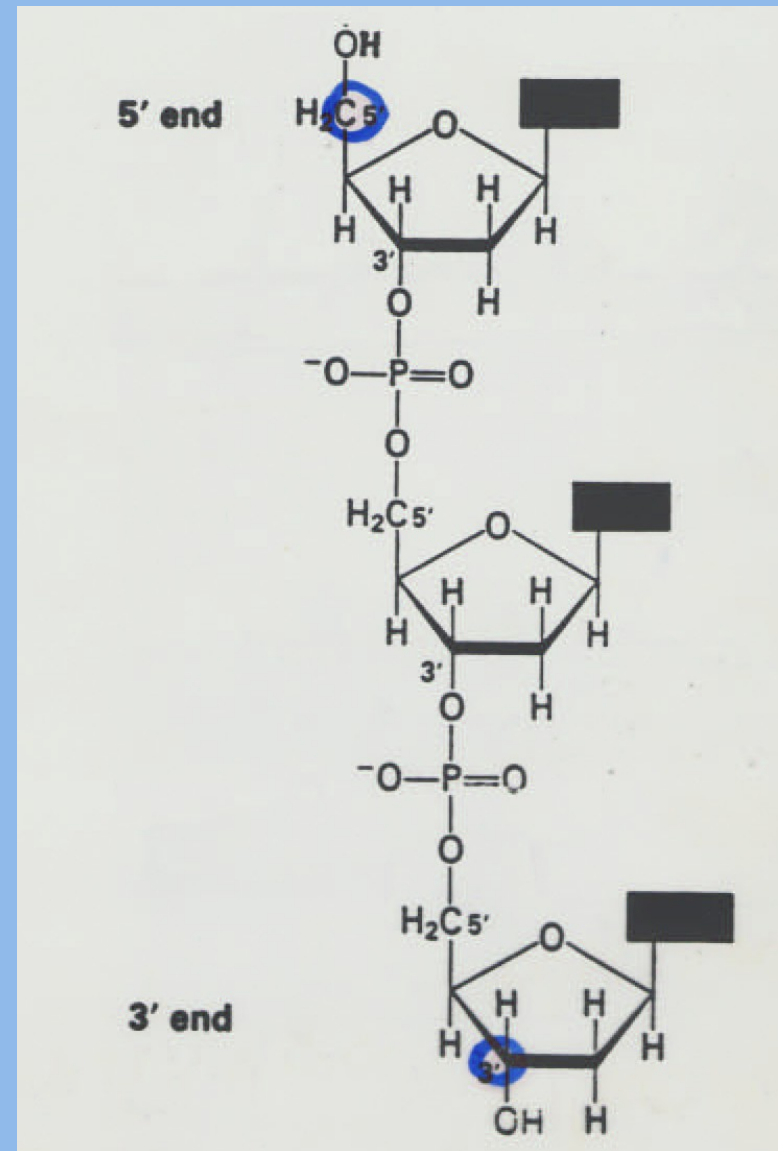
oligonukleotid



syntetický oligonukleotid



primer

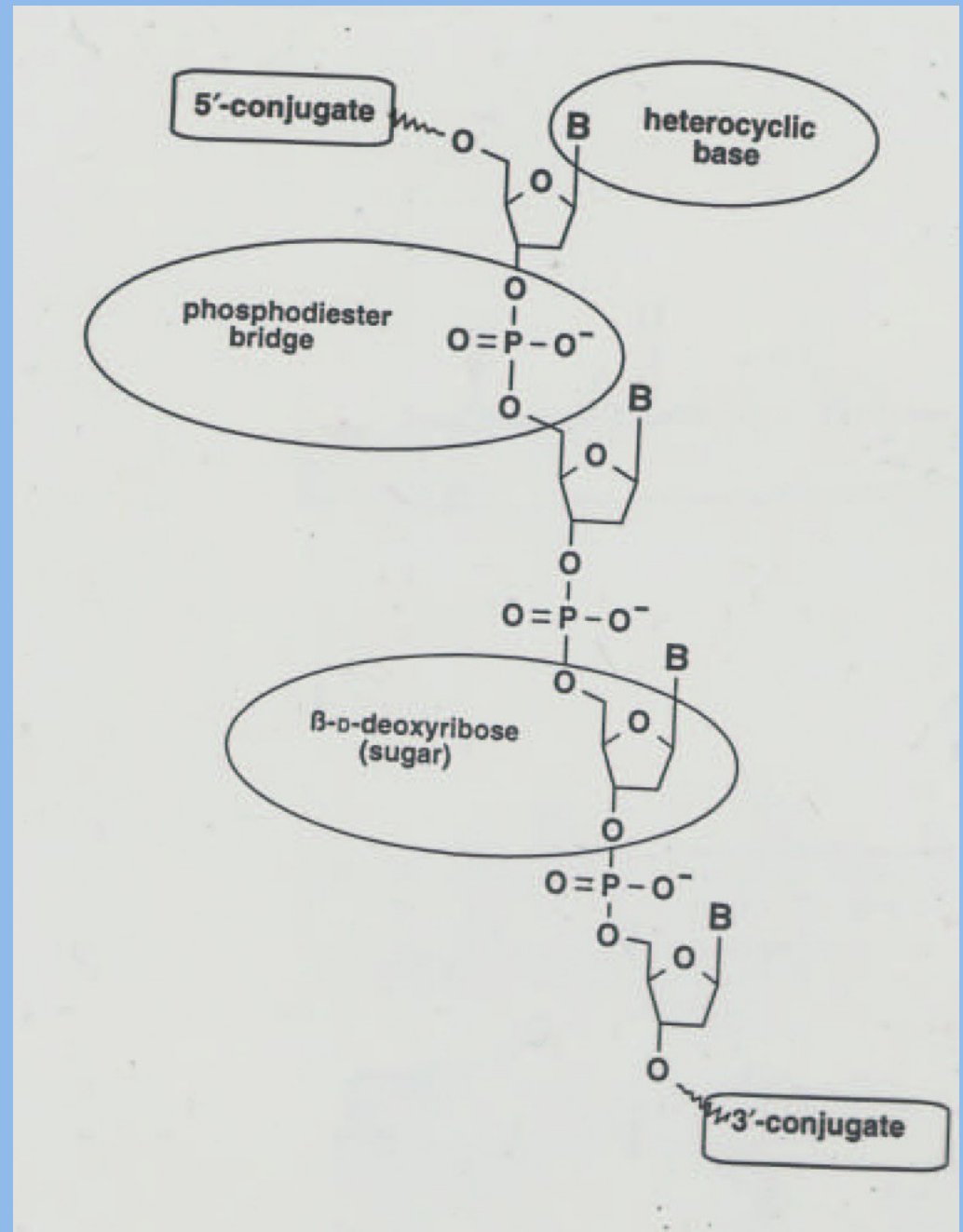


Aplikace syntetických oligonukleotidů

- konstrukce duplexů
- primery pro syntézu komplementární DNA
PCR, Real-Time PCR
- hybridizační sondy pro klonování
- místně cílená mutageneza
- strukturální rentgenová analýza NA
- NMR studia interakcí DNA-protein
- potenciální léčiva
- gene arrays

Modifikace

- degenerace
- konce řetězce
- báze
- fosfát
- cukr
- PNA



Degenerované oligonukleotidy

2-deoxyinosin ?

univerzální báze:

3-nitropyrrol ?

5-nitroindol ?

M	A or C
R	A or G
W	A or T
S	C or G
Y	C or T
K	G or T
V	A or C or G
H	A or C or T
D	A or G or T
B	C or G or T
N	G or A or T or C
X	G or A or T or C

Modifikace na 5' - konci

postsyntetické modifikace

sekvenování
fragmentační analýza
gene arrays
Real-Time PCR

5'

fosforylace

aminoskupina

thioskupina

digoxigenin

biotin

enzymy

psoralen

akridin

cholesterol

fluoresc. barviva

zhášedla

2,4-dinitrofenyl

TBR-chelát

spacer

větvení

blokáda

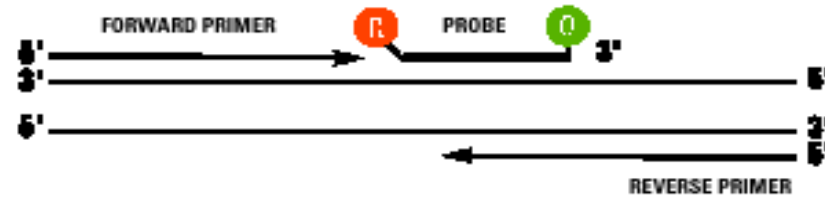
Modifikace na 3'-konci

derivatizovaná matrice

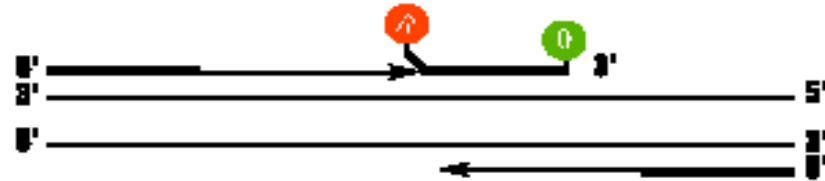
3'
fosfát
thioskupina
→ **aminoskupina**
spacer
akridin
→ **biotin**
→ **fluoresc.barviva**
→ **zhášedla**
cholesterol
2,4-dinitrofenyl

Real-Time PCR

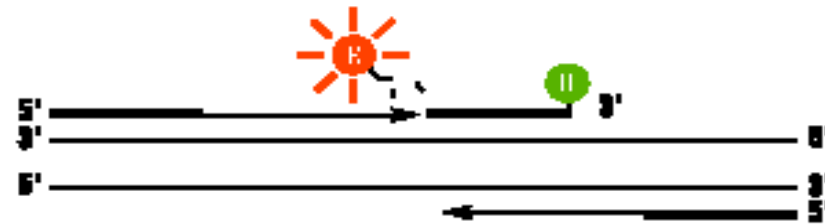
- 2x značená sonda
- REPORTER
- QUENCHER



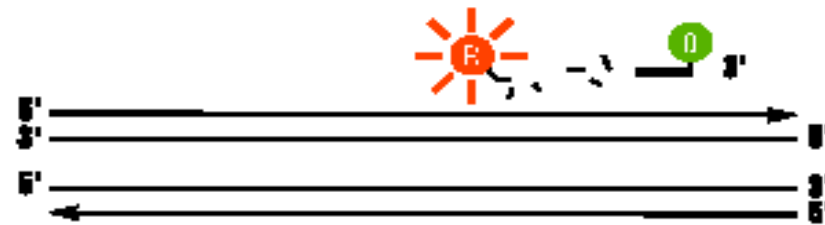
2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



Další modifikace

fosforothioáty
fosforodithioáty
H-fosfonáty
metylfosfonáty

← páteř

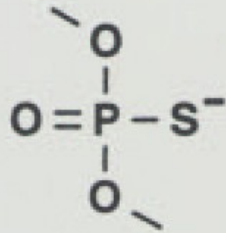
cukr →

modifikace v 2' pozici
modifikace ribózové jednotky

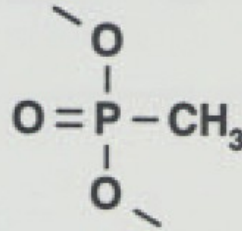
Terapeutika

nedegradována nukleázami!

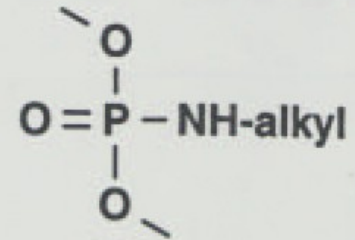
→ modifikace fosfodiesterové vazby



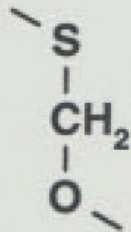
phosphorothioate



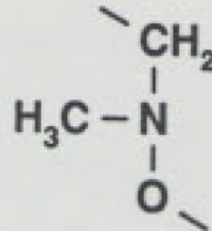
methylphosphonate



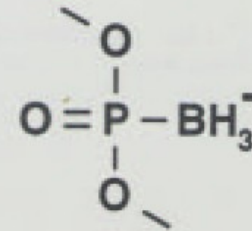
phosphoramidate



3'-thioformacetal



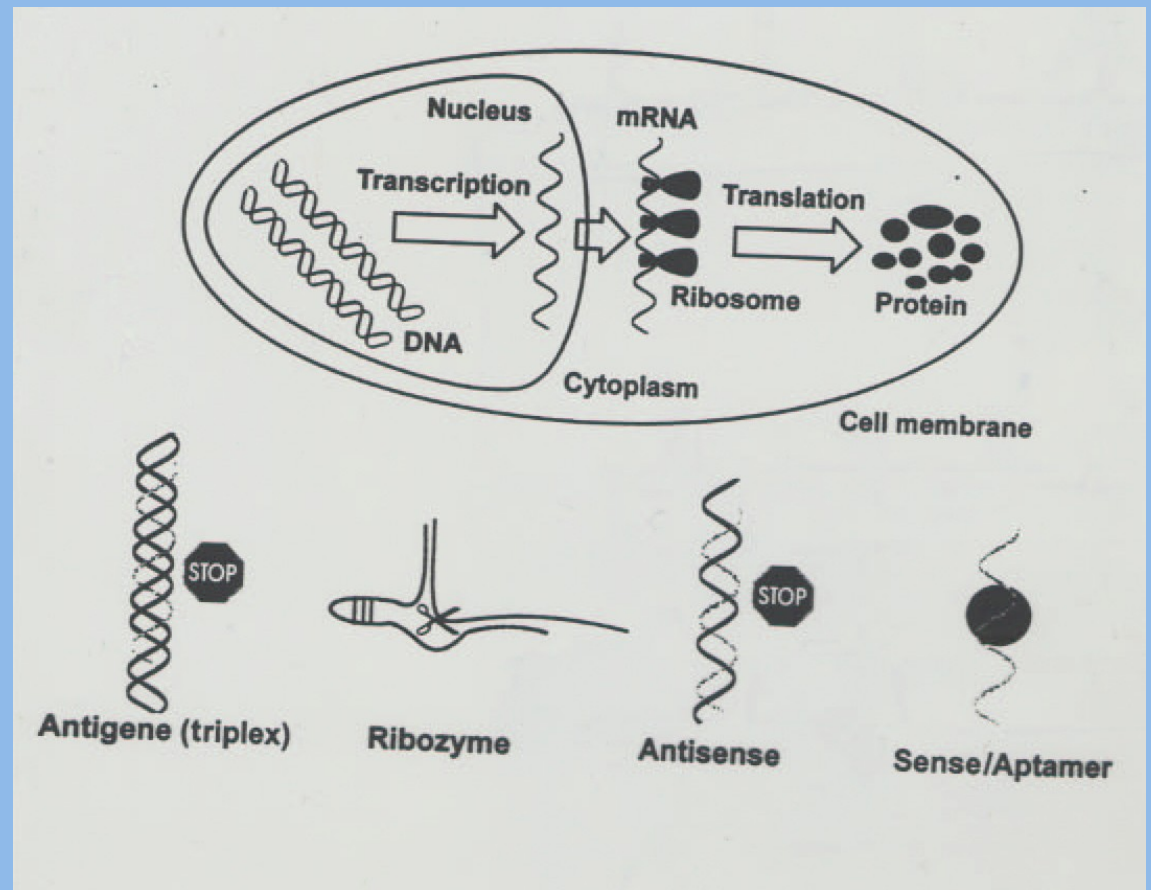
methylene(methyliminio)



boranophosphate

ANTISENSE oligonukleotid

- oligonukleotid nebo analog
- komplementární k segmentu RNA nebo DNA
- vazbou inhibuje jejich normální funkci

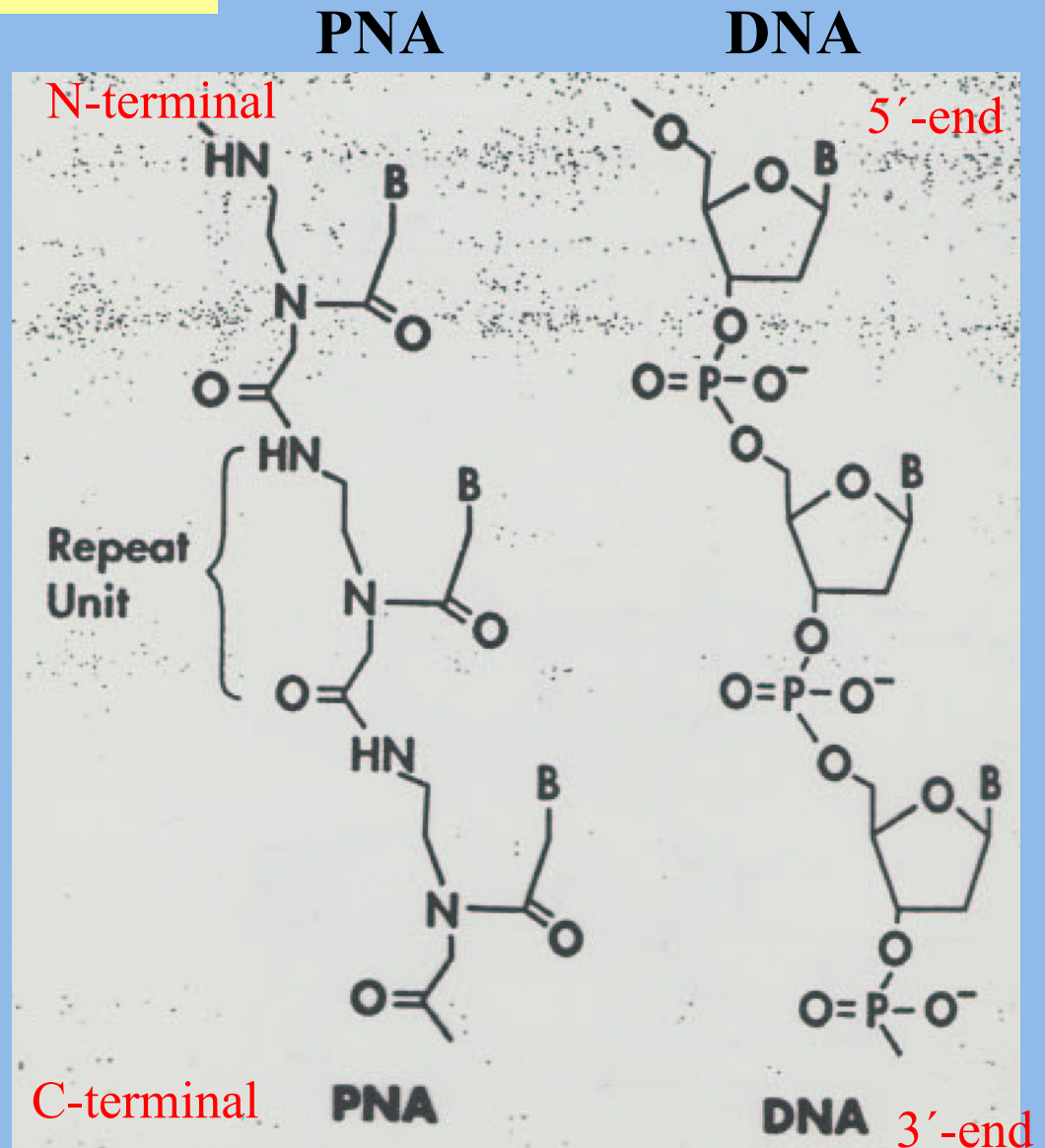


Peptidonukleová kyselina

PNA

- nenabitá molekula
- vazba k DNA/RNA

N-(2-aminoethyl)-glycin →

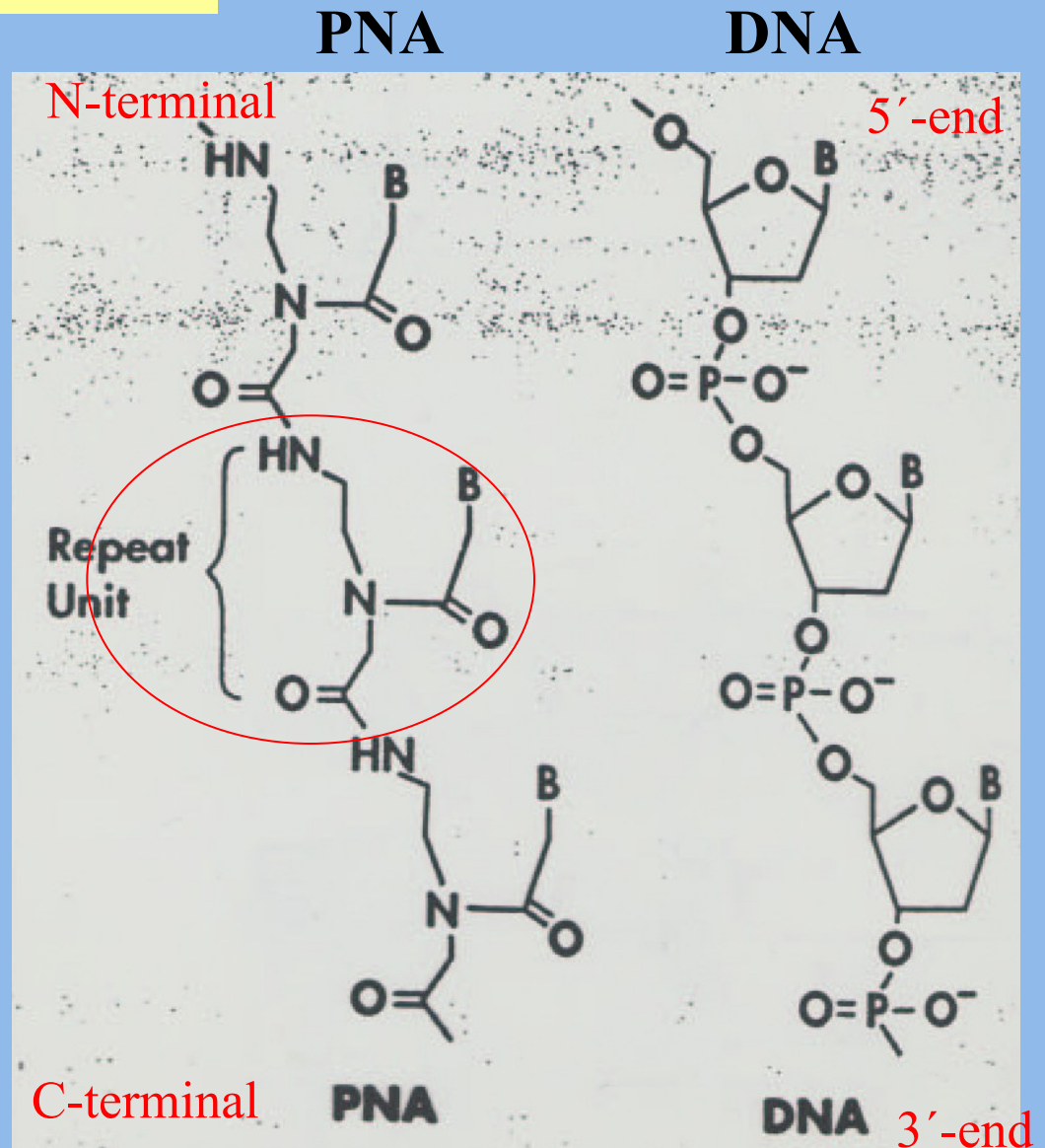


Peptidonukleová kyselina

PNA

- nenabitá molekula
- vazba k DNA/RNA

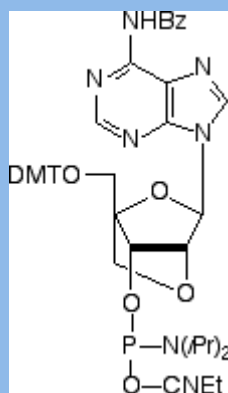
N-(2-aminoethyl)-glycin →



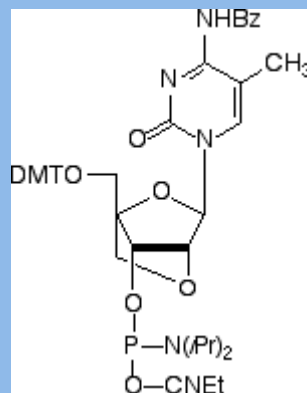
Vlastnosti PNA

- vysoká termostabilita
- T_m nezávisí na obsahu solí
- vyšší specificita
- vyšší afinita
- rezistentní k enzymům...

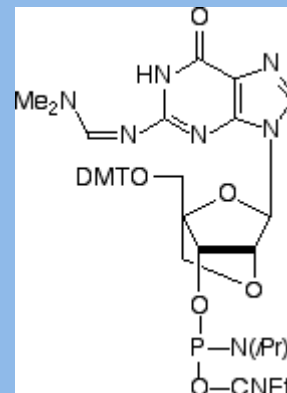
LNA



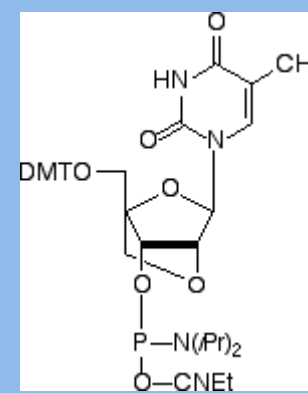
Bz-A-LNA



5-Me-Bz-C-LNA



dmf-G-LNA



T-LNA

Locked Nucleic Acid

2'-O, 4'-C methylenový můstek

potlačená flexibilita ribofuranózového kruhu

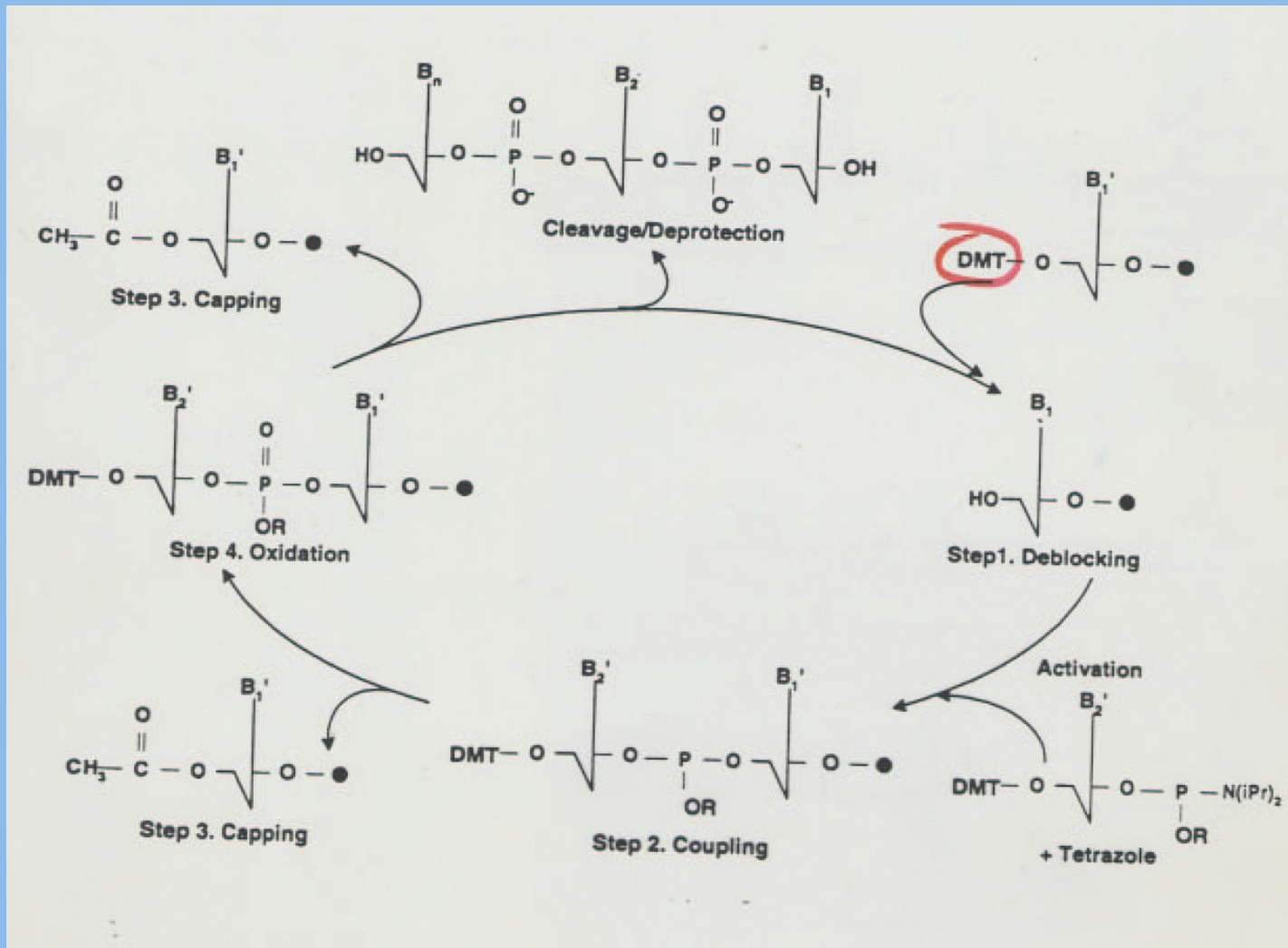
struktura je **zamčena** do rigidní C3-endo konformace

zlepšená hybridizace

výjimečná biostabilita

Syntéza oligonukleotidu

- organická syntéza na pevné fázi
- od 3'-konce k 5'-konci
- bezvodé prostředí



OLIGONUKLEOTIDY

design

syntéza

purifikace



EXPEDITE 8909

EXPEDITE 8909

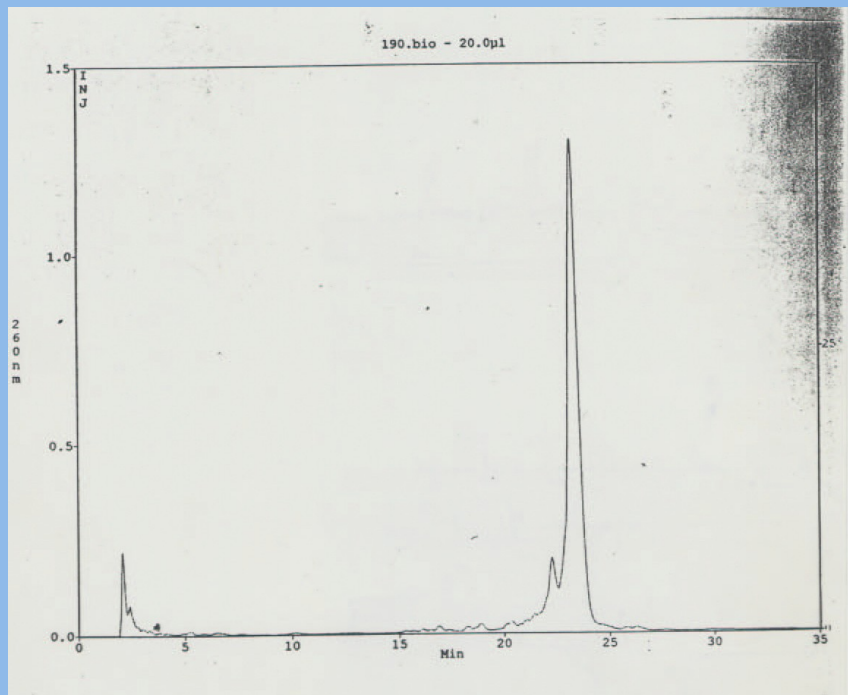
- rychlost
- nízká spotřeba reagensů
- několik koncentračních rozsahů
- dvě paralelní syntézy
- protokoly pro DNA, RNA, PNA, fosforothioáty
- Workstation: možnost editace základních protokolů - syntéza modifikací (značení biotinem, fluorescenčními značkami, degenerované oligonukleotidy, užití inosinu, aminoderiváty aj.)

Kontrola kvality

HPLC

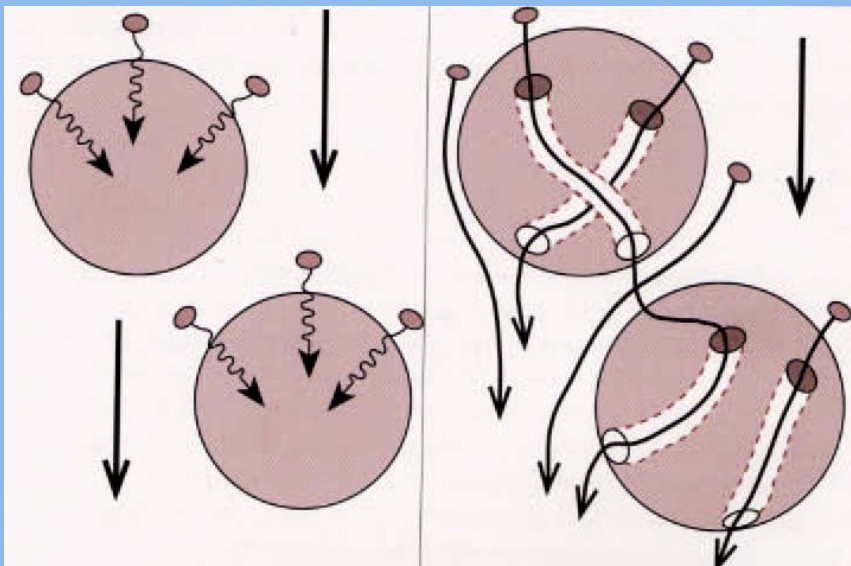
Perfúzní chromatografie

- anex
- RP



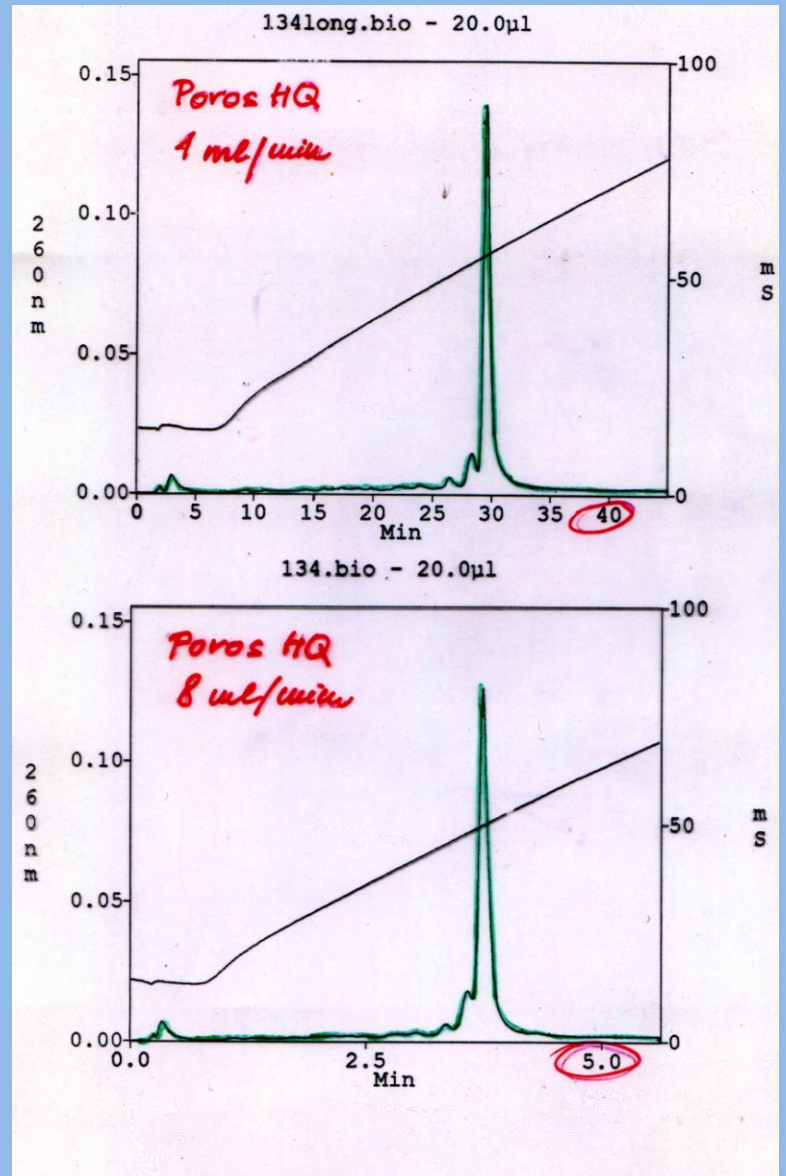
Perfúzní chromatografie

POROS



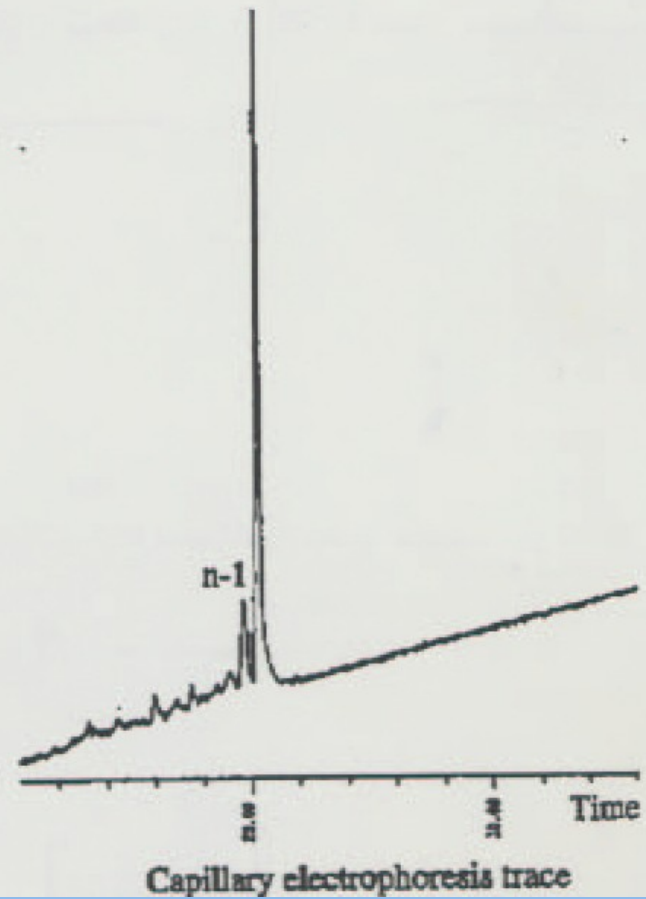
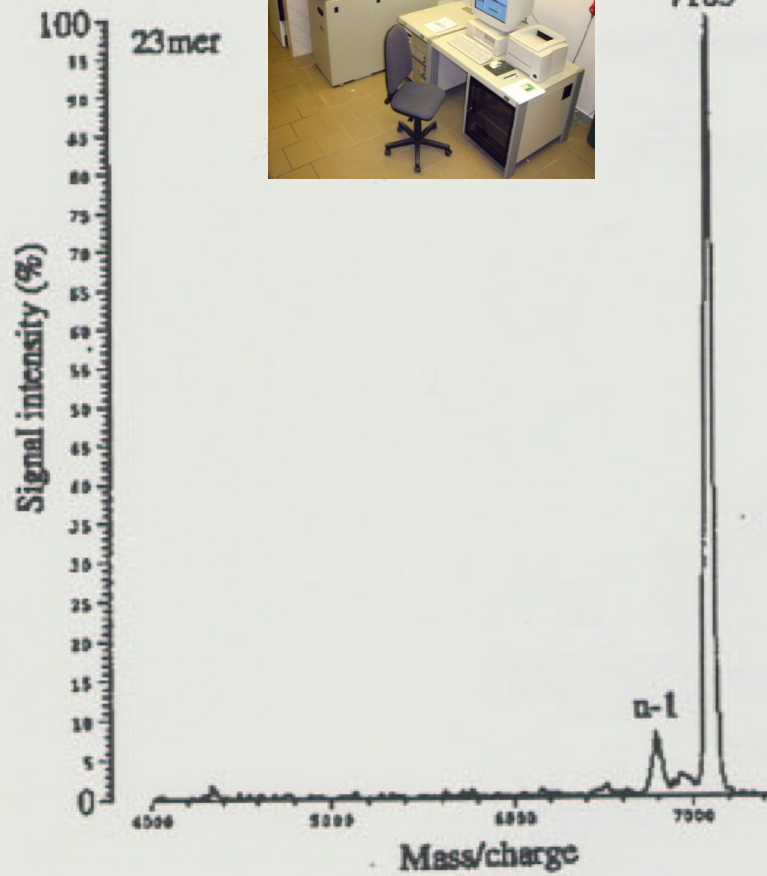
klasický sorbent

POROS

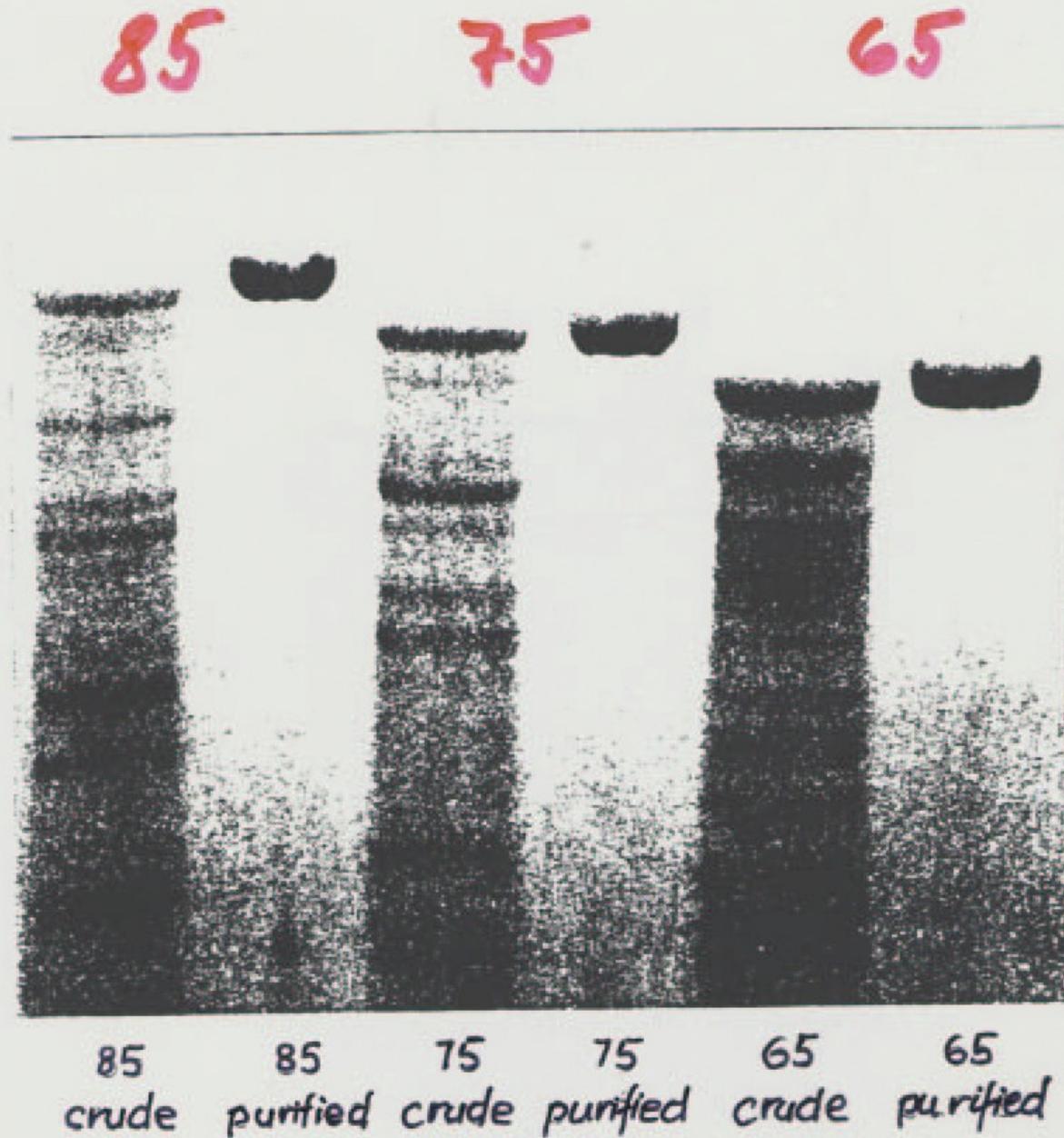


Maldi-Tof MS

CE

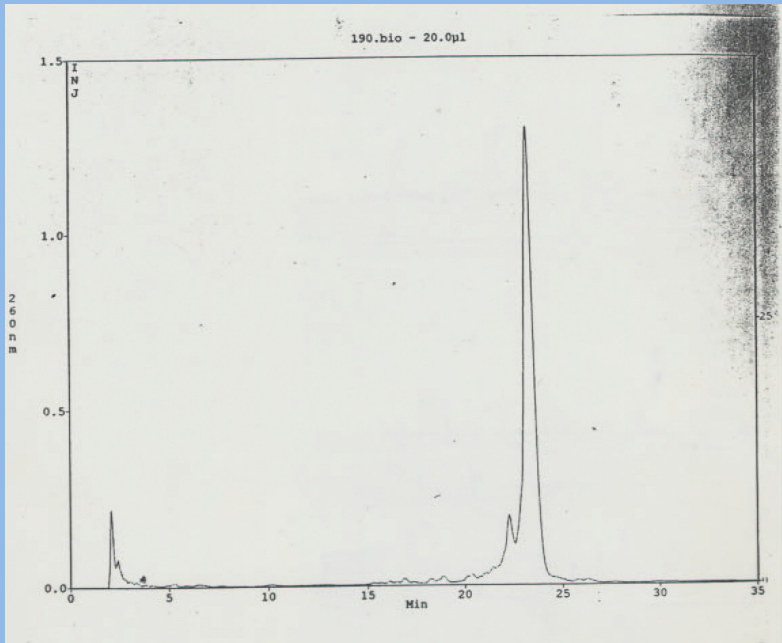


PAGE



PURIFIKACE

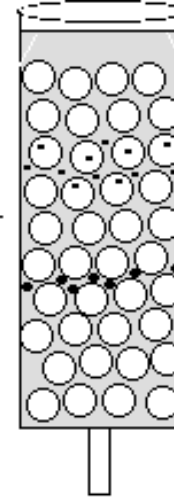
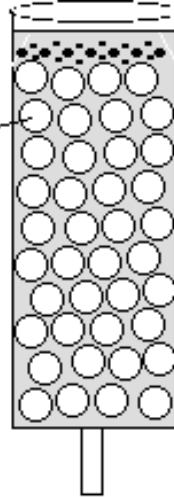
Sephadex
RP cartridge
HPLC



Odsolování

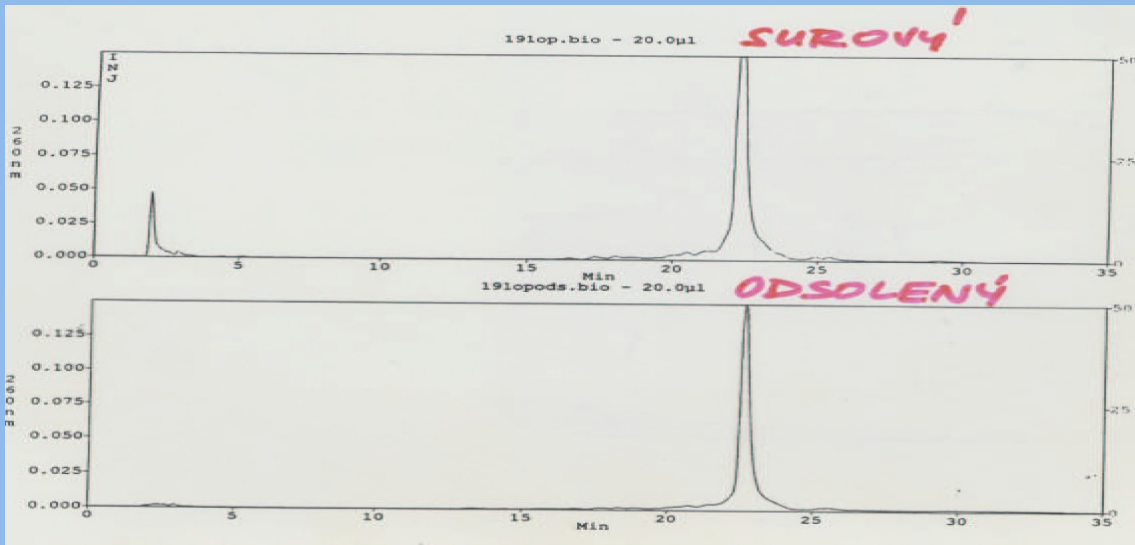


Gel beads have pores in them of a defined size range which allows smaller molecules to enter but excludes molecules larger than the pore diameters.



← Molecules smaller than gel bead pores
← Molecules larger than gel bead pores

- soli
- oligonukleotid




FGP - Firefox

Soubor Úpravy Zobrazit Přejít Zložky Nástroje Nápověda

file:///c:/Documents%20and%20Settings/lmfr/Dokumenty/DOCUMENT5/zaloha/CL/FGP.htm

Mozilla Firefox Přehled zpráv Startovní stránka M... Startovní stránka M... Bio-Chem Valve Inc. ... labelling miniprotean leaking -... idos.cz - Vyhledat G... Vivascience : Protein... Ústav imunologie Pet...

English

 **Oddělení funkční genomiky a proteomiky**
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

ABVMK **CL** **LMFR**

Vyhledávání OK

DFGP

- o NÁS
- o VÝZKUM
- o VÝUKA
- o PUBLIKACE
- o SPOLUPRÁCE
- o NOVINKY
- o VOLNÁ MÍSTA
- SLUŽBY**
- o TECHNICKÉ ZÁZEMÍ
- o ODKAZY
- o KONTAKTY

SLUŽBY

Proteomické techniky
Genomické techniky
Syntéza oligonukleotidů
Minisklad pro molekulární biologii

PROTEOMICKÉ TECHNIKY

Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza (Bio-Rad)
Kapalinové chromatografie Ultimate (Dionex-LC Packings)
Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000 (Bruker)

Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundantních proteinů, prefračníci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesci (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).

Kontaktní osoby

<u>Hana Konečná, RNDr.</u>	54949 5050	hanak@sci.muni.cz
	54949 1465	
<u>Zbyněk Zdrahal RNDr., Dr.</u>	54949 1466	zdrahal@sci.muni.cz
	54949 8258	

Objednávkový formulář
Ceník elektroforetických separací
Ceník MS analýz

DNA SEKVENOVÁNÍ A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

Genetický analyzátor DNA ABI PRISM 310, Perkin Elmer

Automatické stanovení sekvence nukleotidů DNA metodou kapilární elektroforézy s laserovým detektorem. Z jednoho stanovení je obvykle čitelných 450 - 600 bází. Výkonnost přístroje: až 4 500 bází/den. Další aplikací je stanovení délek fragmentů DNA, které je základem řady molekulárně-genetických analýz při charakterizaci genomových lokusů nově izolovaných genů, charakterizaci mutací a určování příbuzenských vztahů mezi jedinci. Kapacita až 825 genotypů denně.

Přečtěte si, prosím, [pravidla služby sekvenování](#).

Kontaktní osoba

<u>Eva Páderová MSc.</u>	54949 6341	paderova@sci.muni.cz
	54949 2517	

Objednávkový formulář pro sekvenaci DNA.

Hotovo

Start | Inbox - Mozill... | C:\Documents... | corel-obr001.j... | Microsoft Pow... | Acrobat Read... | FGP - Firefox | Správce staho... | Corel CAPTUR... | CS | 16:28

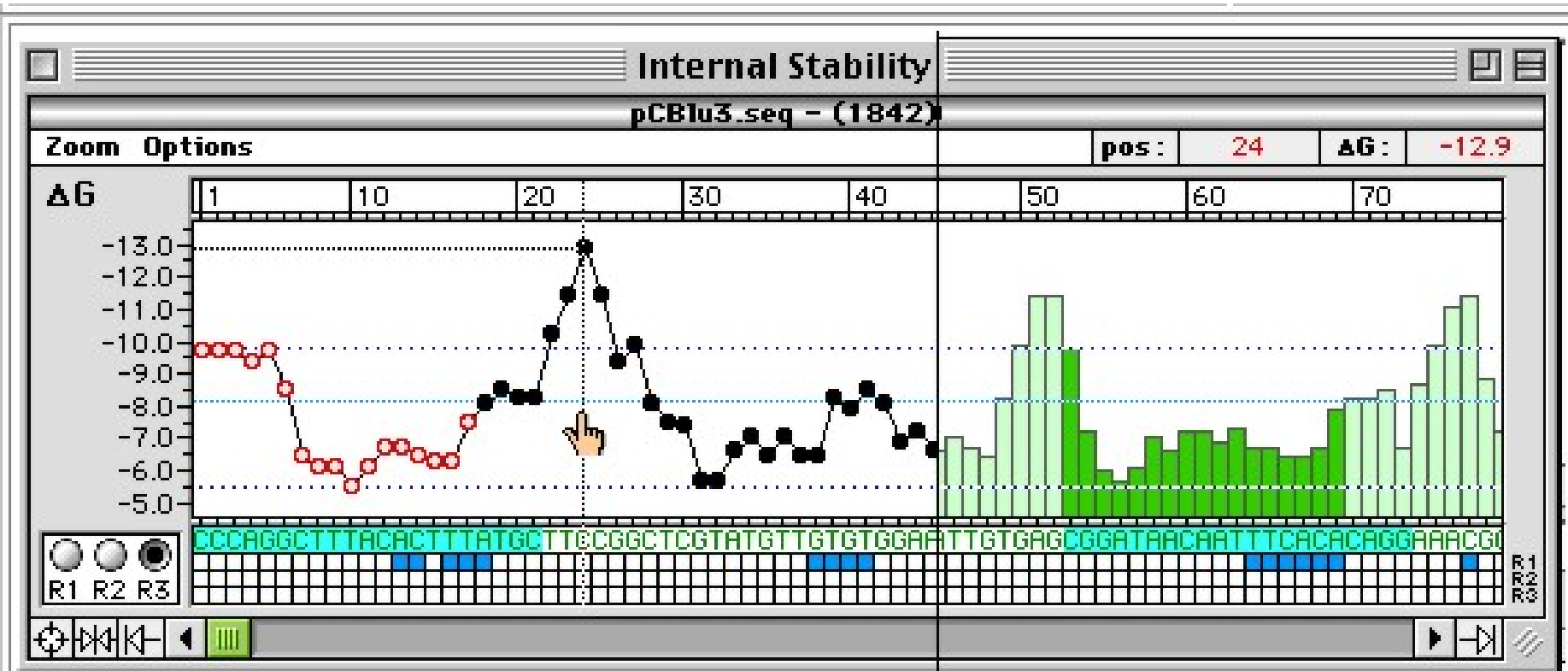
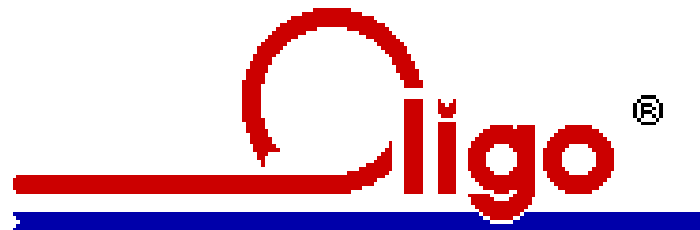
DESIGN OLIGONUKLEOTIDU

- manuální
- počítačový

http://bip.weizmann.ac.il/bio_tools/primers.html

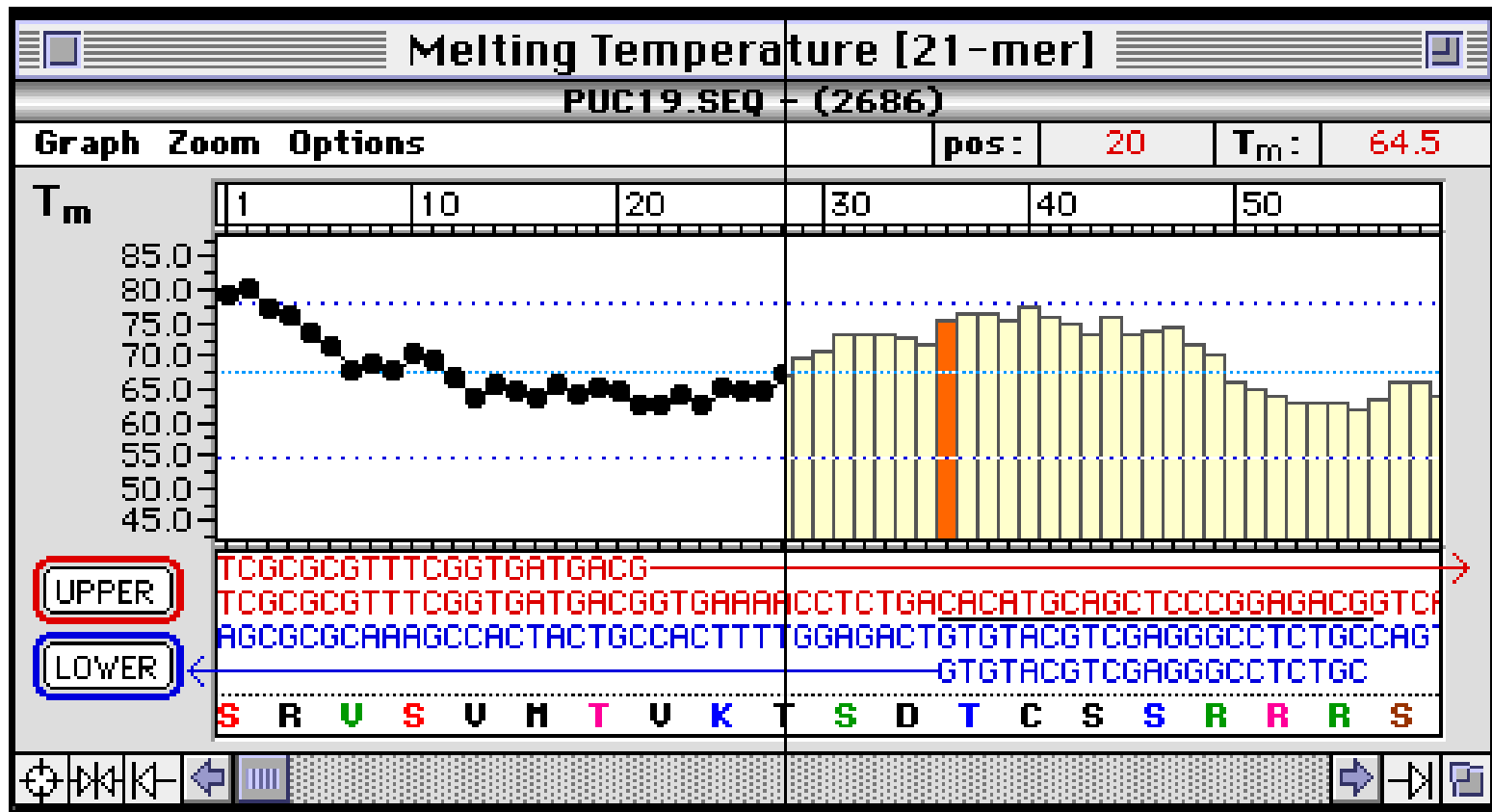
HLAVNÍ ZÁSADY NAVRHOVÁNÍ SEKVENCE

- vysoce specifické
- netvoří dimery a hairpins
- stabilní duplexy s aktivní sekvencí
- nepřiliš stabilní 3'-konec

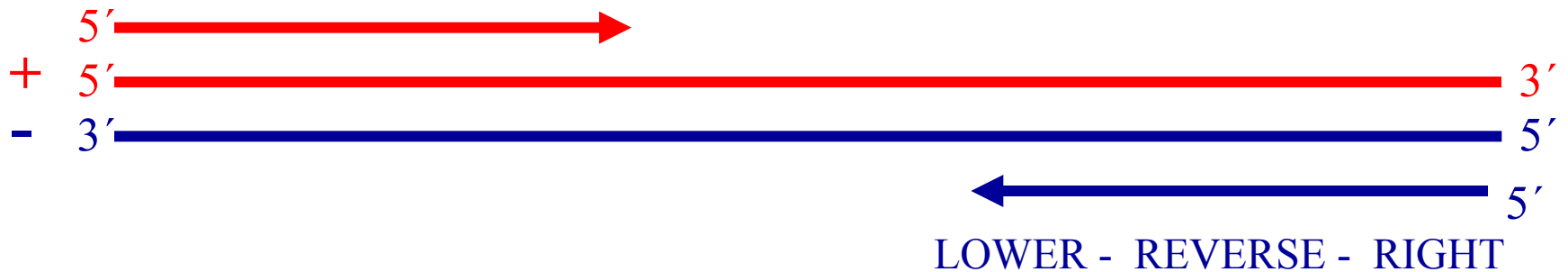


Dot Style

Bar Style



UPPER - FORWARD - LEFT



PRIMING EFFICIENCY

- 360 velmi vysoká
- 340 vysoká
- 320 střední
- 310 uspokojivá
- 300 nízká
- 290 velmi nízká

Selected Primers

pCBlu3.seq

pCBlu3:269U21 Upper Primer

5' CGGCGCCAGATCTGGTACCCA 3'

Length: 21-mer

5' Position: 269

T_m: 76.9 °C

ΔG (25 °C): -46.1 kcal/mol

Degeneracy: 1

P.E.*: 542/542

1/E: 5.12 nmol/A₂₆₀
33.1 μg/A₂₆₀

pCBlu3:817L21 Lower Primer

5' TACCGGGTTGGACTCAAGACG 3'

Length: 21-mer

3' Position: 817

T_m: 69.5 °C

ΔG (25 °C): -41.4 kcal/mol

Degeneracy: 1

P.E.*: 502/502

1/E: 4.89 nmol/A₂₆₀
32.0 μg/A₂₆₀

DUPLEX

- DIMER intermolekulární
- HAIRPIN intramolekulární

Upper Primer Duplexes

pCB1u3.seq

Upper Primer pCB1u3:85U21

The most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.9 kcal/mol

```
5' ACCATGATTACGCCAAGCGTG 3'
   |||
3' GTGCGARCCGCATTAGTACCA 5'
```

The most stable dimer overall: 4 bp, -8.0 kcal/mol

```
5' ACCATGATTACGCCAAGCGTG 3'
   ||||
3' GTGCGARCCGCATTAGTACCA 5'
```

Display Hairpin with 2 or more bp Stems

Hairpin: $\Delta G = -2.80$ kcal/mol, Loop = 3 nt, $T_m = 65$ °C

```
5' ACCATGATTACGCCA
   ||||
3' GTGCGA
```

Lower Primer Composition

pCBlu3.seq

Lower Primer pCBlu3:287L21

$T_d = 63.7^\circ$ [nearest neighbor method]
 $T_m = 73.4^\circ$ [%GC method]
 $T_m = 62^\circ$ [$2(A+T)^\circ + 4(G+C)^\circ$ method]

$T_m(\text{RNA})[1\text{M Na}] = 83.7^\circ$ [%GC method]
 $T_m(\text{DNA:RNA})[1\text{M Na}] = 77.5^\circ$ [%GC method]

$A_{260}/A_{280} = 1.93$ [single strand]
Mr = 6.6K [one strand]
Mr = 13.0K [two strands]
 $\mu\text{g}/\text{OD} = 47.4$ [dsDNA]

Base	Number	%
A	6	[28.6%]
C	4	[19.0%]
G	6	[28.6%]
T	5	[23.8%]
A + T	11	[52.4%]
G + C	10	[47.6%]

DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	0.006	27.4	20.9	-5.1
10	0.06	44.0	37.5	11.5
50	0.3	55.4	48.9	22.9
165	1	63.4	56.9	30.9
330	2	67.7	61.2	35.2
500	3	70.1	63.6	37.6
1000	6	73.4	66.9	40.9

Approximate T_m of the mismatched oligo
 Mismatch $T_m = T_d - 1.2(\% \text{ mismatch})^\circ$

mism. *	T_m	mism. *	T_m
0	63.7	3	46.5
1	58.0	4	40.8
2	52.3	5	35.1

Lower Primer False Priming Sites

M13MP18

Lower Primer - M13MP18:6310L19 (positive strand)
 Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency : 428 (above the threshold)

5'(6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(6328) ccaaaagggtcagtgctgc (6310)5'

Priming efficiency : 205 (above the threshold)

5'(6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(626) agcaaatggc--tgctgc (610)5'

Priming efficiency : 194 (above the threshold)

5'(6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(808) gtaatatggtcagtcctgc (790)5'

Priming efficiency : 185 (above the threshold)

5'(6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(5125) tctaagtggtcagtg-tgc (5108)5'

Priming efficiency : 121

5'(6328) GGT**TTT**C**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(5989) agaaaagtggc-gctctgc (5971)5'

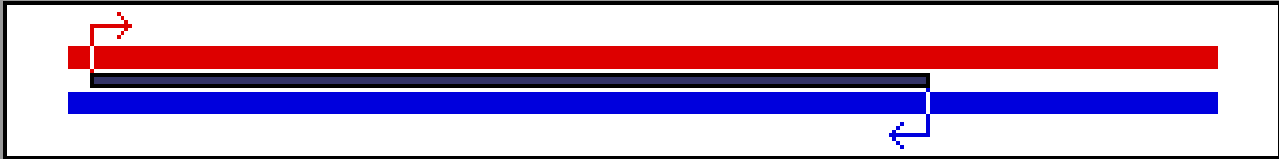
Lower Primer - M13MP18:6310L19 (negative strand)
 Priming efficiency of the perfect match is 428 (above the threshold)

Priming efficiency : 76

5'(6328) GGT**TTT**CC**CA**GT**CA**CG**AC**G (6310)3'
 |||||
 3'(5744) ccaaaaagcgggaaactgc (5762)5'

PCR

pCB1u.seq



Optimal Annealing Temperature: 58.3° (Max: 72.0°)

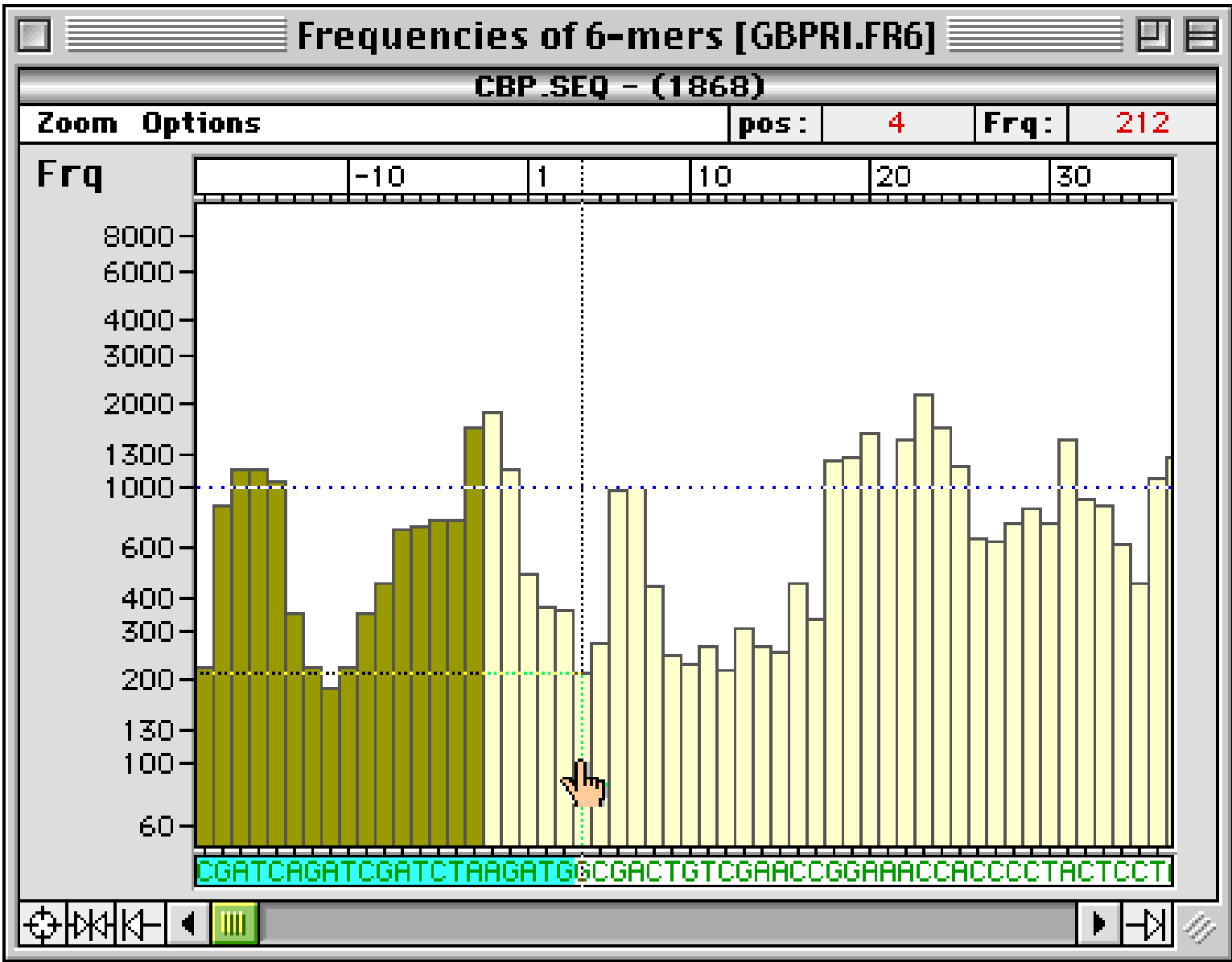
	Position and Length		T _m [°C]	GC [%]	P.E.*
Product	1352		88.0	51.3	-----
Upper Primer	37	21	72.2	47.6	452
Lower Primer	1368	21	79.9	57.1	506

Product T_m - Upper Primer T_m: 15.8
Primers T_m difference: 7.6

	Concentration	
Upper Primer	200.0	nM
Lower Primer	200.0	nM
Monovalent Cation	50.0	mM
Free Mg[2+]	0.7	mM

Terminal stability of the Lower Primer is too high.

Total Na[+] Equivalent: 155.8



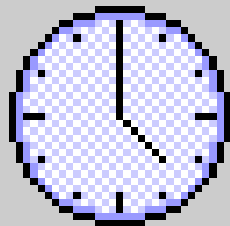
Hybridization Time

pCBlu.seq

DNA Length: nt.

Concentration: nM

$\mu\text{g/ml}$



$T_{1/2} = 45.4 \text{ sec}$

$T = 4 \text{ min } 46.9 \text{ sec}$

Database

Uni. Primers

Link Edit Analyze Import Export

Sorted

Sort

Sort

Sort

Sort

Sort

Sort

Sort

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	#	Date	ID Number	Sequence	Ref.	3' dim. ΔG	P.E.	T _m
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1	13 Jul 1994	X02513.6309L19	GGTTTTCCCAGTCACGACG	-40	-3.6 C	428/428	65.4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2	13 Jul 1994	X02513.6290L17	GTAAAACGACGGCCAGT	-20 (univ)	-2.9 M	294/402	57.8
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3	13 Jul 1994	X02513.6209U16	AACAGCTATGACCATG	reverse	-5.3 D	284/324	45.3
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4	13 Jul 1994	X52330.670U17	CGAGGTCGACGGTATCG	KS	-5.2 D	84/403	61.6
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5	13 Jul 1994	X52330.720L17	TCTAGAAGCTAGTGGATC	SK	-4.7 D	31/312	40.2
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6	12 Aug 1994	X52330.774L17	ATTAACCCTCACTAAAG	T3 alt	-1.6 M	336/336	44.9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7	12 Aug 1994	X52330.633U21	ACTCACTATAGGGCGAATTGG	new univ...	-5.0 NC	456/456	63.7
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	8	12 Aug 1994	X52330.779L18	CGCGCAATTAACCCTCAC	new rev...	-1.6 M	354/441	64.4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	9	12 Aug 1994	X02514.492L18	GGAATTGTGAGCGGATAA	-36 rev	-6.4 NC	401/401	58.1
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	10	12 Aug 1994	M77707.2855U17	ATTTAGGTGACACTATA	SP6	-4.8 NC	77/309	38.9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	11	12 Aug 1994	X53937.1540U18	CGCCAAGCTATTTAGGTG	SP6	-3.2 C	85/412	58.9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	12	12 Aug 1994	X53937.1657L18	GTAAAACGACGGCCAGTG	univ pGEM	-4.8 NC	316/420	61.4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	13	12 Aug 1994	X53937.1529U18	GACCATGATTACGCCAAG	SP6	-1.6 C	400/400	58.2
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	14	12 Aug 1994	X52330.669U17	TCGAGGTCGACGGTATC	KS	-1.6 C	158/384	57.8
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	15	12 Aug 1994	X52330.772L20	AATTAACCCTCACTAAAGGG	T3	-7.8 D	414/414	58.2
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16	12 Aug 1994	X52330.625U22	GTAATACGACTCACTATAGGGC	T7	-6.2 NC	426/426	58.4
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	17	12 Aug 1994	X52330.808L19	GGAAACAGCTATGACCATG	reverse	-5.3 D	343/387	57.6
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18	12 Aug 1994	X52330.720L20	CGCTCTAGAAGCTAGTGGATC	SK	-4.7 D	31/395	56.2
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19	28 May 1998	pCBlu3.240U17	CCGCGGAAGCTTGCATG		-5.3 D	451/451	68.5

pCBlu3.seq

Enzyme	Site	*Cuts	Positions & Fragment Sizes
ApaI	GGGCC^C	1	258 1842
ApaLI	G^TGCAC	1	766 1842
AscI	GG^CGCGCC	1	234 1842
AsuII	TT^CGAA	1	152 1842
BamHI	G^GATCC	1	175 1842
BclI	T^GATCA	1	146 1842
BglII	A^GATCT	1	276 1842
BssHII	G^CGCGC	1	235 1842
BspMII	T^CCGGA	1	1392 1842
BsrDI	GCAATG(2/0)	1	1408 1842
ClaI	AT^CGAT	1	158 1842
DraI	TTT^AAA	3	132 1182 1314 339 1653 321
EcoRI	G^AATTC	1	228 1842
EcoRV	GAT^ATC	1	264 1842
EagI	C^GGCCG	1	201 1842
Esp3I	CGTCTC(1/5)	1	1614 1842
HindIII	A^AGCTT	1	246 1842
HpaI	GTT^AAC	1	1136 1842
KpnI	GGTAC^C	1	282 1842
Ksp632I	CTCTTC(1/4)	1	424 1842
MstI	TGC^GCA	1	458 1842
NarI	GG^CGCC	1	270 1842
NcoI	C^CATGG	1	180 1842
NheI	G^CTAGC	1	193 1842
NotI	GC^GGCCGC	1	200 1842
PstI	CTGCA^G	1	187 1842
SacI	GAGCT^C	1	140 1842
SacII	CCGC^GG	1	240 1842
SalI	G^TCGAC	1	164 1842
SmaI	CCC^GGG	1	215 1842
SpeI	A^CTAGT	1	222 1842
SphI	GCATG^C	1	252 1842
SrfI	GCCC^GGGC	1	214 1842
Sse8387I	CCTGCA^GG	1	186 1842
SspI	AAT^ATT	1	1706 1842
SwaI	ATTT^AAAT	1	131 1842
XbaI	T^CTAGA	1	208 1842
XhoI	C^TCGAG	1	169 1842
XmaII	C^GGCCG	1	201 1842

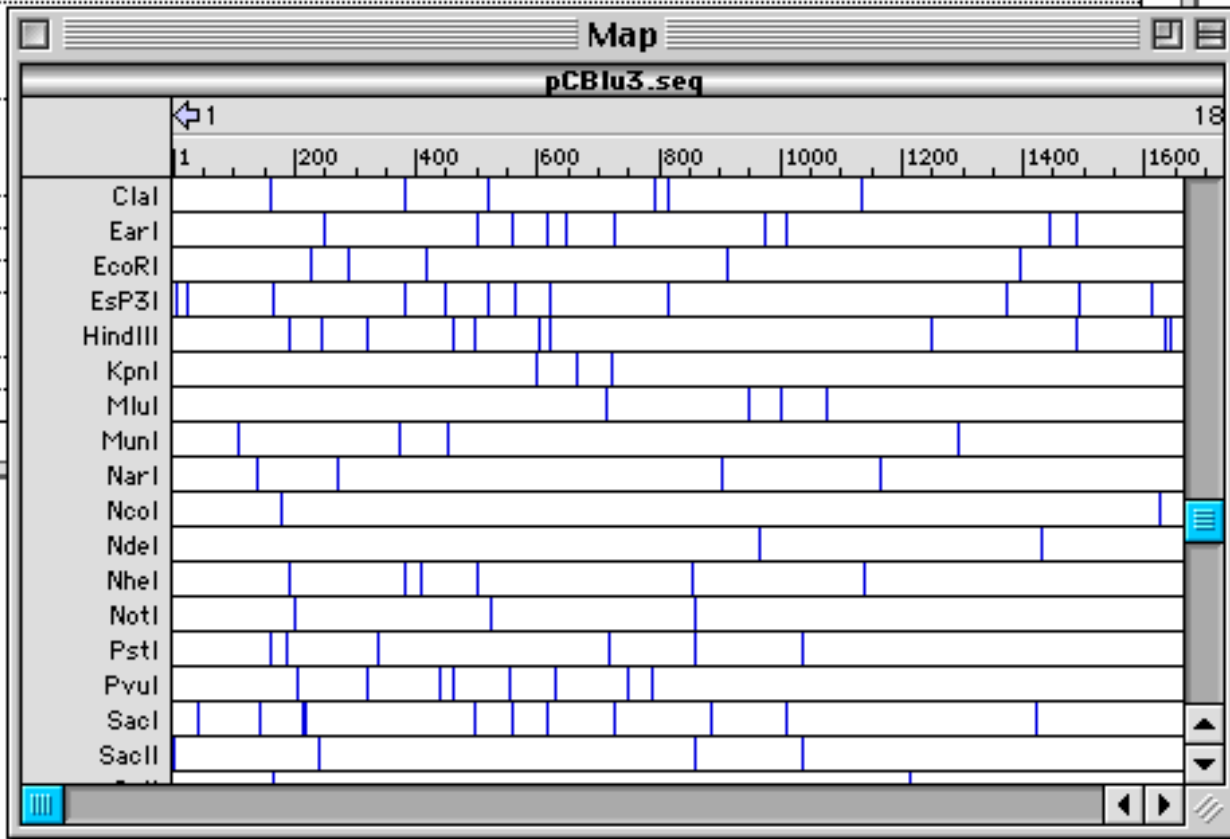
Non-cutting enzymes:

AatI AatII AflII AgeI AvrII BclI Bsp1407I BspHI Eco31I Eco47III FseI MluI NaeI NdeI NruI PacI PmaCI
PmeI PvuI PvuII SapI Scal SexAI SfiI SgfI SnaBI SphI Sse1825I Sse8647I UbaDI VspI XcmI

Table

pCBlu3.seq

Enzyme	Site	#Cuts	Positions & Fragment Sizes							
ClaI	ID1SeyR7	6	159	222	381	138	519	273	792	24
			816	318	1134	867				
EarI	LF3SSwL6	10	249	252	501	56	557	60	617	31
			648	80	728	247	975	35	1010	433
			1443	44	1487	604				
EcoRI	EF2NSsl6	5	227	60	287	129	416	497	913	483
			1396	673						
EsP3I										
HindIII										
KpnI										
MluI										
MunI										
NarI										
NcoI										
NdeI										



Edit Upper Primer

pCBlu3.seq

Accept/Discard Edit Search Change Rev.Translate

pos: 19

Insert

10

5' 133



Sequence Length 21 nt

Reading Frame 1

Degeneracy 1

T_d 59.2 °C

ΔG -36.2 kcal/mol

Loop T_m 42.0 °C

Loop ΔG -1.0 kcal/mol

RT. Method: Lathe

Codons

GCA

14.4

GCC

29.7

GCG

7.2

GCT

18.9

Ala

1 10 20 30 40 50

TTA ART GGA GCT CTG ATC ATT

L N G A L I I



Clipboard [11]: MQL | SS-RMAP

DNA

Concentrations

pCBlu.seq

- Constant Concentration**
 Constant Volume

- Current +Oligo:** 5.26 nmol/OD, 34.1 μ g/OD
 Current -Oligo: 5.19 nmol/OD, 33.9 μ g/OD
 Entire Sequence: 0.041 nmol/OD, 46.7 μ g/OD
 Upper Primer: 5.26 nmol/OD, 34.1 μ g/OD
 Lower Primer: 4.90 nmol/OD, 32.1 μ g/OD
 PCR Product: 0.063 nmol/OD, 46.7 μ g/OD

μ g
or **OD(260)**
or nmol
in μ L
yields μ M

PRAKTICKÁ ÚLOHA

Search for Primers and Probes

+ Strand Search - Strand Search

PCR Primers:

- Compatible Pairs
- Compatible with the Upper Primer
- Compatible with the Lower Primer
- Sequencing Primers
- Hybridization Probes

Duplex-free Oligonucleotides

Highly Specific Oligos (3'-end Stability)

Oligonucleotide with GC Clamp

Eliminate False Priming Oligonucleotides

Continue False Priming Search in Other File(s)

Oligonucleotides within Selected Stability Limits

Hairpin-free Oligonucleotides

Eliminate Homooligomers / Sequence Repeats

Eliminate Frequent Oligos

Consensus Primers

Complex Substrate

OK

Cancel

Search Ranges

Parameters

Defaults

Search Mode:

- Mark
- Unmark

Search Parameters

Search Method: PCR Primers [Compatible Pairs]

Search Stringency:

Automatically change stringency

Adjust Length to Match Tm's P.E.*'s Inverse PCR

- Oligonucleotide Length:** nt
- Acceptable 3'-Dimer ΔG :** kcal/mol
- Maximum Length of Acceptable Dimers:** Base Pairs
- 3'-terminal Nucleotides Checked for Dimers:**
- 3'-terminal Stability Range:** to kcal/mol
- GC Clamp Stability:** kcal/mol
- Minimum Acceptable Loop ΔG :** kcal/mol
- Oligo T_m Range [47.9 to 88.8]:** to °C
- Max Acceptable False Priming Efficiency:** Points
- Min Consensus Priming Efficiency:** Points
- Min Acceptable Homology:** %
- Max Number of Acceptable Sequence Repeats:**
- Max Degeneracy:**
- Frequency Threshold:**

 **Frequency Table:**
GBPRI.FR6

Consensus primer

- **CODEHOP** Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide
- pro **rozdílné** proteinové sekvence vyžadující degenerované primery
- **CORE** 3' - oblast 11 – 12 bp degenerovaná
- **CLAMP** 5' - oblast nedegenerovaná, délka dle požadované annealing teploty, obvykle 20 – 30bp
- specifický během časných cyklů
- selektivní v pozdních cyklech

OBJEDNÁVKY

www.sci.muni.cz/FGP

- on-line
- e-mail
- písemně

The screenshot shows a web browser window displaying the homepage of the Functional Genomics and Proteomics Department (FGP) at Masaryk University, Brno. The page is in English and features a green header with the department's name and logo. Below the header, there are three buttons labeled 'ABVMK', 'CL', and 'LMFR'. A search bar is located on the left side of the page. The main content area is divided into two columns. The left column contains a navigation menu with links to 'O NÁS', 'VÝZKUM', 'VÝUKA', 'PUBLIKACE', 'SPOLUPRÁCE', 'NOVINKY', 'VOLNÁ MÍSTA', 'SLUŽBY', 'TECHNICKÉ ZÁZEMÍ', 'ODKAZY', and 'KONTAKTY'. The right column contains the following sections:

- SLUŽBY**
 - Proteomické techniky
 - Genomické techniky
 - Syntéza oligonukleotidů
 - Minisklad pro molekulární biologii
- PROTEOMICKÉ TECHNIKY**
 - Jednorozměrná a dvojrozměrná multigelová elektroforéza (Bio-Rad)
 - Kapalinové chromatografy Ultimate (Dionex-LC Packings)
 - Hmotnostní spektrometry Reflex IV a Esquire 2000 (Bruker)
 - Nabízíme všechny kroky nutné ke zpracování vzorku - od izolace proteinů až po jejich charakterizaci a bioinformatické zpracování dat. Provádíme solubilizaci vzorku, depleci abundančních proteinů, prefračníci, isoelektrickou fokusaci na imobilizovaných gradientech pH, separaci polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (1-DE, 2-DE), barvení po separaci v gelu, image analýzu, dále pak frakcionaci a separaci kapalinovou chromatografií, proteinovou digesti (in-gel nebo in-solution) a MS analýzu (MALDI-TOF MS a LCMSMS).
 - Kontaktní osoby**

Hana Konečná, RNDr.	54949 5050	hanak@sci.muni.cz
	54949 1465	
Zbyněk Zdráhal RNDr., Dr.	54949 1466	zdrahal@sci.muni.cz
	54949 8258	
 - Objeďnávkový formulář**
 - Ceník elektroforetických separací**
 - Ceník MS analýz**
- DNA SEKVENOVÁNÍ A FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA**
 - Genetický analyzátor DNA ABI PRISM 310, Perkin Elmer
 - Automatické stanovení sekvence nukleotidů DNA metodou kapilární elektroforézy s laserovým detektorem. Z jednoho stanovení je obvykle čitelných 450 - 600 bází. Výkonost přístroje: až 4 500 bází/den. Další aplikací je stanovení délek fragmentů DNA, které je základem řady molekulárně-genetických analýz při charakterizaci genomových lokusů nově izolovaných genů, charakterizaci mutací a určování příbuzenských vztahů mezi jedinci. Kapacita až 825 genotypů denně.
 - Přečtěte si, prosím, **pravidla služby sekvenování**.
 - Kontaktní osoba**

Eva Páďerová MSc.	54949 6341	paderova@sci.muni.cz
	54949 2517	
 - Objeďnávkový formulář** pro sekvenaci DNA.